

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E**  
**BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**DISSERTAÇÃO**

**LEVANTAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS**  
**EM ISOLADOS DE COGUMELO SHIITAKE (*Lentinula***  
***edodes* (Berk.) Pegler)**

**RAFAELA DE SOUZA MENEZES**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA**  
**APLICADA**

**LEVANTAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM ISOLADOS DE**  
**COGUMELO SHIITAKE (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler)**

**RAFAELA DE SOUZA MENEZES**

*Sob a Orientação do Professor*

**Ricardo Luiz Louro Berbara**

*e Co-orientação do Professor*

**Sael Sánchez Elías**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada**, no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada da UFRRJ, área de Concentração em Biotecnologia Aplicada.

Seropédica, RJ

Julho de 2019

## **Ficha catalográfica**

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – A autora”.

O presente trabalho foi realizada com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA  
APLICADA

**RAFAELA DE SOUZA MENEZES**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada. Área de Concentração em Biotecnologia Aplicada.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM -----/-----/-----

---

Sael Sánchez Elías. Dr. Eng<sup>o</sup>. Agrônomo  
UFRRJ

---

Irene da Silva Coelho. Dra. Eng<sup>a</sup>. Agrônoma  
UFRRJ

---

Yoannis Domínguez Rodríguez. Dr. Biólogo  
UNESP

## AGRADECIMENTOS

Meu profundo agradecimento ao Senhor Jesus por ter posto pessoas tão competentes e motivadas durante toda minha trajetória;

A começar pela minha família, minha mãe: Marleide de Souza, pelas orações, minha irmã, Rita de Souza Menezes; ao meu pai; Mauro Marques de Menezes, pelo suporte financeiro e emocional, minha vó, Lúcia Marques de Menezes por me alimentar.

Aos meus amigos de fé, irmãos camarada: Cíntia Luiza, Stéfanny Ribeiro, Rita Hilário, Jaqueline Jesus, Mayara Santos Rocha, Camila Costa, Clarice Verissimo e João Ciriaco pelo amor sincero a mim dispensado;

Aos Professores Ricardo Berbara e Sael Sanchèz, que prontamente me concederam uma oportunidade de demonstrar meu trabalho;

Aos meus mentores intelectuais acadêmicos; Douglas Chaves, Irene Coelho, Neide Epifanio e Carlos Inácio, pela gentileza e generosidade;

A todos os Professores que generosamente dividiram o conhecimento com a minha pessoa;

Ao órgão de fomento CAPES por proporcionar suporte financeiro, apoio de aperfeiçoamento científico. Além do apoio e suporte da EMBRAPA- Agrobiologia, FAPERJ e CNPQ.

## RESUMO

MENEZES, Rafaela de Souza. **Levantamento de Metabólitos Secundários em Isolados de Cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler )** RJ. 2019. 52 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Com a crescente comercialização e aceitação, o cogumelo *Lentinula edodes* está entre as espécies mais consumidas no Brasil, surgindo a necessidade de sua caracterização morfológica, genética e com relação à composição de bioativos presentes na espécie. Por conta disso alguns estudos relacionados ao seu cultivo, valor medicinal e nutracêutico são cada vez mais frequentes. No âmbito genético, as regiões espaçadoras internas transcritas (*ITS*) têm sido amplamente utilizadas para definir variações interespecíficas, inclusive para integrantes do reino *Fungi*. Já para caracterização metabólica são lançadas mão de técnicas cromatográficas para o levantamento de bioativos com potencial biotecnológico. Com isso, o presente trabalho procurou sequenciar regiões *ITS* com o intuito de promover a confirmação da classificação da espécie dos isolados alvo da pesquisa, assim como considerar o levantamento de metabólitos secundários contidos em amostras de micélio destes mesmos isolados. Foram obtidos produtos de amplificação de tamanho de aproximadamente 625 pb. Os isolados do presente trabalho agruparam com os isolados de *L. edodes* provenientes do banco de dados e diferenciaram-se das demais espécies representantes do gênero *Lentinula*. A análise de sequências da região *ITS* foi adequada para diferenciação interespecífica do gênero *Lentinula*, confirmando seu potencial para identificação e caracterização molecular de fungos. Essas amostras seguiram para análises quantitativas, em que os componentes da fase móvel destas amostras foram identificados e quantificados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- Detector de Arranjo de Diodos (CLAE- DAD). Além disso, foi feita análise por espectrofotômetro de compostos antioxidantes e fenólicos totais. Com relação aos compostos fenólicos totais, foi observado uma concentração de 0,48 mg de ácido gálico/ml de extrato de micélio. O fracionamento químico realizado com micélio, evidenciou que estes metabólitos secundários são passíveis de observação através da técnica de cromatografia líquida, com isso foram observados no cromatograma gerado, a presença de cinco possíveis biocompostos com diferentes tempos de retenção. Através da injeção de padrões foram observados os mesmos tempos para estrutura do ácido 2,4 dimetoxibenzóico e 2,4 dihidroxibenzóico. Com isso, o presente trabalho encontrou valores que justificam que a extração alcoólica destes metabólitos também se demonstra baixa reforçando que a natureza destes compostos em cogumelos são de natureza polar.

**Palavras-chave:** Shiitake. Isolados. Sequenciamento. CLAE.

## ABSTRACT

MENEZES, Rafaela de Souza. **Bioprospection of Secondary Metabolites in Isolates of Shiitake Mushroom (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler)** RJ. 2019. 52 p. Master of Science (Plant Pathology and Advanced Biotechnology). Institute of Biological Sciences and Health - University Federal Rural of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The upward demand and acceptance, the mushroom *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (shiitake mushroom) is among the most consumed species in Brazil. The need for studies that investigate its morphological, genetic characterization and bioactive composition present in the species are increasing as well. Because of this, some studies related to its cultivation, medicinal and nutraceutical values are becoming more frequent. Genetically, transcribed internal spacer regions (ITS) have been widely used to define interspecific variations, including for members of *Fungi* kingdom. For metabolic characterization, chromatographic techniques are used to bioprospected actives with biotechnological potential. Thus, this research sought to sequence ITS regions in order to promote the confirmation of species classification of the target isolates of the study, as well as consider the survey of secondary metabolites contained in mycelium samples from these isolates. Approximately 625 bp size amplification products were obtained. The isolates of the present study grouped with the *L. edodes* isolates from the database and differed from the other species representing the genus *Lentinula*. Sequence analysis of the ITS region was adequate for interspecific differentiation of the genus *Lentinula*. Confirming its potential for identification and molecular characterization of fungi. These samples were also followed for quantitative analysis, in which the mobile phase components of these samples were identified and quantified in High Performance Liquid Chromatography-Diodes Arrangement Detector (HPLC-DAD). In addition, spectrophotometer analysis of total antioxidant and phenolic compounds was performed. Regarding total phenolic compounds, a concentration of 0.48 mg gallic acid / ml mycelium extract was observed. The chemical fractionation performed with mycelium showed that these secondary metabolites can be observed by the liquid chromatography technique, with the presence of five possible biocompounds with different yield times in the generated chromatogram. Through the injection of patterns, the same times were observed for the structure of 2,4 dimethoxybenzoic acid and 2,4 dihydroxybenzoic acid. Thus, the present work found values that justify the metanolic extraction of these metabolites also demonstrates low which reinforced that the nature of these compounds in mushrooms are polar.

**Key Words:** Shiitake. Isolates. Sequencing. HPLC

## LISTA DE ABREVIACÕES

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector "photodiodearray"
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EC50	Concentração Efetiva
UV	Ultra Violeta
PCR	Polimerase Chain Reaction



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequência de primers utilizados na amplificação do gene 18S rDNA .....	8
<b>Tabela 2.</b> Caracterização química presente no extrato metanólico de <i>L. edodes</i> .....	16

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação dos componentes da parede do micélio e os estágios de desenvolvimento dos fungos. ....	2
<b>Figura 2.</b> Eletroforese em gel de agarose 0,8 % do DNA total extraído das amostras de micélio: 1- $\lambda$ 1 - DNA do fago lambda a 10 ng $\mu$ L-1; 2- $\lambda$ 2 - DNA do fago lambda a 30 ng $\mu$ L-1; 3-10: UFRRJ STB5, STB2801, SHOSTB, SHOSTB2802, SHO23, SHO, M14, SHO20 .....	11
<b>Figura 3.</b> Eletroforese em gel de agarose 1,0% dos produtos de PCR com marcador .....	11
<b>Figura 4.</b> Dendograma baseado na análise “Neighbour-joining” derivado das sequências das regiões ITS rDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”, de isolados de <i>L. edodes</i> e de sequências obtidas do GenBank de diferentes isolados de espécies. ....	12
<b>Figura 5.</b> Curva de calibração para análise de compostos fenólicos totais (A) .....	13
<b>Figura 6.</b> Curva de calibração para análise da Atividade Antioxidante Total pelo método de DPPH .....	14
<b>Figura 7.</b> Curva de calibração para análise de diferentes absorvâncias a partir das diluições da amostra.....	15
<b>Figura 8.</b> Curva de calibração para análise da correlação entre % de inibição de DPPH e presença de compostos fenólicos na amostra .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Figura 9.</b> Cromatograma da amostra de micélio a partir do extrato metanólico .....	15
<b>Figura 10.</b> Perfil em UV da molécula 2,4 dimetoxibenzóico (A) .....	18
<b>Figura 11.</b> Perfil em UV da molécula 2,4 dihidroxibenzóicos .....	18

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>2</b>
2.1. Características Gerais dos Fungos.....	2
2.2. Classificação dos Principais Filos Pertencentes ao reino <i>Fungi</i> .....	2
2.3. Ciclo de Vida dos Fungos .....	4
2.4. Importantes Classes do Filo Basidiomycota.....	4
2.5. Espaçadores Moleculares .....	5
2.6. Metabolismo Fúngico.....	6
2.7. Compostos Fenólicos .....	6
2.8. Atividade Antioxidante .....	6
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>7</b>
3.1. Isolamento/ Manutenção de Linhagens.....	7
3.2. Extração de DNA Total das Amostras .....	8
3.3. Avaliação da Quantidade e Qualidade do DNA Total .....	8
3.4. Reação de PCR .....	8
3.5. Sequenciamento pelo Método de <i>Sanger</i> .....	8
3.6. Análise de Agrupamento.....	8
3.7. Preparo das Amostras.....	8
3.8. Análise de Compostos Fenólicos Totais .....	9
3.9. Análise de Atividade Antioxidante Total.....	9
3.10. Perfil em CLAE- DAD de Extrato Metanólico .....	10
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>11</b>
4.1. Isolamento/ Manutenção de Linhagens.....	12
4.2. Extração de DNA Total das Amostras .....	20
4.3. Avaliação da Quantidade e Qualidade do DNA Total .....	25
4.4. Reação de PCR .....	26
4.5. Sequenciamento pelo Método de <i>Sanger</i> .....	27
4.6. Preparo das Amostras.....	9
4.7. Análise de Compostos Fenólicos Totais .....	9
4.8. Análise de Atividade Antioxidante Total.....	9
4.9. Perfil em CLAE- DAD de Extrato Metanólico .....	10
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>30</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>36</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção comercial de cogumelo tem sido considerado como uma boa opção econômica para pequenos e médios produtores, uma vez que não é necessário o emprego de tecnologias muito sofisticadas. Entretanto, a produção nacional não é tão difundida e incentivada como em alguns países como a China, onde o consumo médio é de 800 gramas por habitante. No Brasil, segundo a ANPC (2013) esse consumo não passa de 160 gramas por habitante, sendo atribuído ao fato do alto preço que o produto é apresentado ao mercado, além da falta de conhecimento por parte do consumidor. Dos grandes benefícios obtidos pelo consumo regular desse tipo de alimento, podem ser destacadas suas propriedades medicinais e nutricionais presentes em diferentes quantidades dependendo da espécie em questão.

A espécie *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, seu nome shiitake significa "cogumelo do carvalho" também conhecido como um dos fungos da podridão branca, é característico pela capacidade de degradação da lignocelulose. Apresenta alto teor de proteínas e polissacarídeos, assim como aroma único. Além disso, na literatura existem inúmeros levantamentos de compostos funcionais encontrados nesta espécie, como os polissacarídeos com atividade antitumoral. O lentinan é um b-glucano que foi o primeiro composto antitumoral isolado do shiitake (Chiraha et al., 1970) a partir de micélio (LEM) e KS-2 (Wasser e Weiss, 1999), inibe a tumorigênese principalmente pela ativação do sistema imunológico e por induzir a expressão gênica de citocinas imunomoduladoras e seus receptores (Borchers et al., 1999; Ooi e Liu, 2000; Sugui et al., 2003) Entre os metabólitos de grande interesse se encontram também compostos fenólicos e benzóicos que são precursores importantes de função antioxidante.

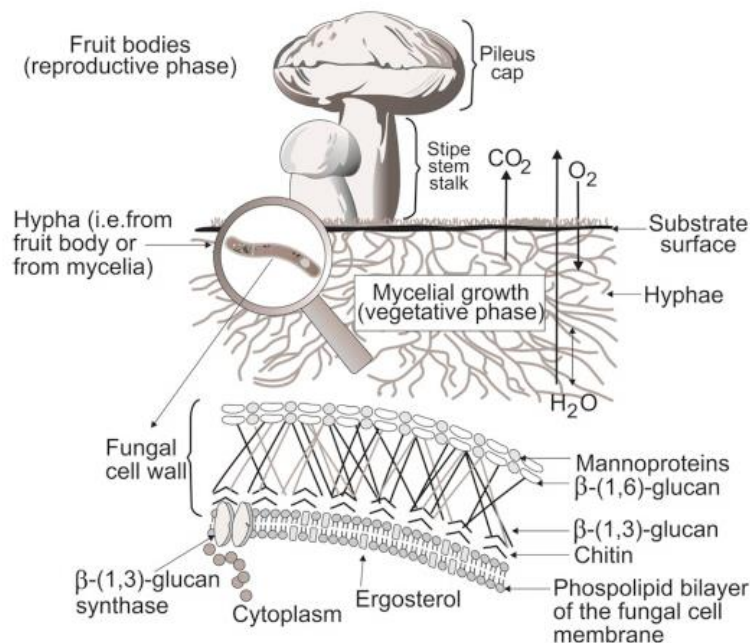
Estudos mostraram que esses efeitos antimutagênicos de *L. edodes* podem variar entre as linhagens (Sugui et al., 2003), provavelmente pelas diferenças sazonais, geográficas ou intraespecíficas que podem influenciar na composição química dos cogumelos e, conseqüentemente, modular os seus efeitos (Grüter et al. 1991). Com isso, o presente trabalho procurou sequenciar regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) com o intuito de promover a confirmação da classificação da espécie dos isolados alvo da pesquisa, assim como considerar o levantamento de metabólitos contidos em amostras de micélio destes mesmos isolados.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Características Gerais dos Fungos

Fungos são microorganismos que se diferem das plantas em composição química, aparência, seu desenvolvimento e tipo de vida. Por essa razão, o reino *Fungi* foi separado dos demais reinos (DERMEK, 1984). São organismos eucariontes que apresentam paredes rígidas por serem formadas basicamente por  $\beta$ -D-glucanas, proteínas, e quitinas (SÁNCHEZ, 2017).

Com relação ao estilo de vida apresentados pelos fungos, estes podem ser saprófitas, parasitas, simbióticos, ou ainda saproparasitas. Dermek (1984), descreve que o papel mais importante dos fungos na natureza é a decomposição, a quebra e destruição de restos de plantas e animais mortos. Junto com bactérias, eles quebram a matéria orgânica em materiais mais simples para reutilização dos mesmos (Figura 1).



**Figura 1.** Representação dos componentes da parede do micélio e os estágios de desenvolvimento dos fungos.

Fonte: Sánchez, 2017.

### 2.2. Classificação dos Principais Filos Pertencentes ao reino *Fungi*

Em função da complexidade de estruturas que podem originar, os basidiomicetos podem ser indicados como a linhagem mais derivada entre os componentes do reino *Fungi*. A formação de esporos sexuais ou basidiósporos pode ser indicada como a principal

característica dos basidiomicetos. Tais esporos estão localizados em basídios e estes em basidiocarpo. De maneira geral, possuem dimensões macroscópicas, bem visíveis a olho nu, com variações de coloração como laranja, branco, marrom, vermelho, amarelo e negro. Apresentam-se também de tamanho e de forma variáveis. Este grupo é conhecido como cogumelo de chapéu, ou de orelha-de-pau, entre outras denominações populares. Os basidiomicetos representam o segundo maior grupo de fungos, possuem registros de 29.900 espécies, aproximadamente 1.350 gêneros, em 130 famílias (KIRK et al. 2001).

A posição e o número de basidiósporos, divide os basidiomicetos nas classes Teliomycetes, Hymenomycetes e Gasteromycetes (SILVEIRA, 1995). Na classe dos Hymenomycetes ou propriamente Basidiomycetes, estão incluídos os únicos que apresentam um basídio verdadeiro, seus basidiomas podem atingir dimensões de alguns centímetros até quase um metro, são todos visíveis a olho nu; a morfologia dos píleos, das lâminas e os poros são usados como caracteres de importância sistemática. A grande maioria desses indivíduos são saprófitos (SILVEIRA, 1995). Os basidiomicetos mais conhecidos apresentam suas estruturas de reprodução em formas macroscópicas, popularmente esses basidiomicetos são conhecidos como cogumelos e orelhas-de-pau, existem outros grupos menos conhecidos como os fungos gelatinosos, os fungos gasteromicetos e os fungos identificados por ferrugens e carvões. Estes fungos estão presentes em ambientes aquáticos e terrestres, podem se comportar como parasitas, sapróbios e micorrízicos.

Os fungos basidiomicetos ligninolíticos, atacam a madeira dura (hardwood) ou madeira mole (softwood), enquanto outros, como os Ascomycetes, degradam unicamente madeira dura. A degradação da lignina por basidiomicetos ligninolíticos é mais rápida que quaisquer outros organismos e eles são responsáveis pela maior parte da degradação da lignina na natureza. Os basidiomicetos constituem até 2/3 da biomassa viva do solo, sendo de suma importância para atuar como decompositores no ambiente (RAVEN, 2001). A maioria apresenta hábito saprófito, realizam a decomposição de folhas, galhos e troncos, são encontrados em diferentes biomas, sob uma grande variedade de substratos. A ciclagem de nutrientes é um dos grandes papéis de importância ecológica atribuído a esses fungos.

Este filo tem como representantes cogumelos venenosos como *Amanita* spp. e comestíveis como *Agaricus* spp.; gasteromicetos, orelhas-de-pau, ferrugens e carvões. A natureza das hifas é septada com doliporo, o método de reprodução assexuada se faz por brotamento, conídios (esporos imóveis, incluindo uredósporos) e fragmentação. O tipo de esporo sexuado é o basidiósporo (RAVEN, 2001).

A classe Basidiomycetes se caracteriza em função da sua morfologia. A partir da microscopia óptica e depois com a microscopia eletrônica, o estudo da morfologia dos basidiomicetos desenvolveu-se nos níveis macroscópico, microscópico e ultraestrutural. Em nível macroscópico o estudo é direcionado às formas, aos tamanhos e às colorações, bem como ao desenvolvimento dos basidiomas?. As descrições de estruturas como basídios, esferocistos, cystídeos, contexos, ornamentação de esporos, trama das lamelas e morfologia, ocorrem em nível microscópico. Em termos de ultraestrutura, como a estrutura e organização da parede celular, ornamentação de esporos, e poro septal, o estudo acontece em nível ultraestrutural.

### **2.3. Ciclo de Vida dos Fungos**

Embora o ciclo de vida dos fungos varie de classe, a maioria deles seguem um padrão bastante similar. A maioria deles apresentam esporos com um núcleo haplóide simples (possuindo metade do número de cromossomos,  $n$ ). Estes esporos germinam, dando origem à hifa, que também apresentam um núcleo. Seguindo a hifa pode produzir novamente esporos haplóides ou fundir com outra hifa originando uma hifa diplóide (AGRIOS, 2005). Em ascomicetos, por exemplo, a hifa dicariótica é encontrada apenas no ascoma, transformando-se em hifa ascógena. No caso dos basidiomicetos, estes apresentam reprodução sexuada e assexuada, sendo a reprodução assexuada na fase vegetativa, por meio da fragmentação do micélio (artrosporos) e da produção de conídios, oídios e clamidósporos (URBEN, 2017).

### **2.4. Importantes Classes do Filo Basidiomycota**

A característica geral dos fungos da ordem Agaricales é a produção de corpos de frutificação (basidioma) que, comumente são chamados de cogumelos. Nesses corpos de frutificação, são produzidos basidióporos unicelulares, apresentam corpos de frutificação de textura carnosa, às vezes resistentes na forma de guarda-chuva, com basídios produzidos na superfície de suas lamelas (ALEXPOULOS; MIMS, 1979). A volumosa quantidade de espécies de Agaricales é distribuída em ambientes selvagens, entre estas existem muitas micorrízicas e as que não são micorrízicas; possui elevado potencial de domesticação e está sujeita à intensivo cultivo com possibilidade de se associar à silvicultura. Podem ser citadas as seguintes espécies (LAKHANPAL, 1994): *Lactarius deliciosus*, *Lactarios sanguifluus*, *Russula brevipes*, *Amanita caesaria*, *Pleurotus citrinopileatus* e *Tricholoma lobayense*. A ordem Agaricales tem grande expressividade no que diz respeito aos cogumelos comestíveis e venenosos.

Considerando a variedade de substratos onde são encontrados e os habitats por eles ocupados, podemos dizer que a ordem Agaricales apresenta espécies de comportamento simbiótico, saprófito e parasita (URBEN et al., 2004). O basidiocarpo ou basidiomas, pertencente a este grupo de indivíduos, é a parte que denominamos de cogumelo, onde observamos como partes mais evidentes o estipe e o píleo. Possui forma variada e o píleo pode manifestar cores diversas bem como modificações na superfície, apresentando-se sedosa, lisa, rugosa, escamosa ou viscosa e ainda apresentar restos do véu universal (uma membrana constituída por hifas que estão entrelaçadas fortemente, apresentando-se, de certa forma solta, tendo como função a proteção das lamelas presentes em alguns membros de Agaricaceae, que no caso possui valor taxonômico (PEGLER; SPOONER, 1994; URBEN et al., 2004).

A ordem Agaricales, apresenta como característica geral a produção de corpos de frutificação, carpóforo, esporóforo ou basidiomata que são conhecidos como cogumelos. Além das características macroscópicas do basidiomata (chapéu), aspectos microscópicos se mostram de grande importância para reunir estes indivíduos na ordem Agaricales e distribuí-los em famílias, gêneros e espécies. Tais aspectos são: presença e forma de lamelas; trama da hifa no esporóforo; presença de estruturas estéreis (cistídeos); tamanho, forma, ornamentação e coloração de basidiósporos, além de aspectos bioquímicos. Alexopoulos e Mims (1979), juntamente com o trabalho de outros micologistas considerando essas características, descreveram onze famílias para os Agaricales. Por outro lado, Kendrick (1992), em seu trabalho, descreve dezesseis famílias que no geral apresentam duzentos e oitenta gêneros e dez mil espécies. Como principais famílias da ordem Agaricales podemos citar: Boletaceae, Russulaceae, Hygrophoraceae, Amanitaceae, Tricholomataceae, Volvareaceae, Rhodophylaceae, Strophariaceae, Agaricaceae, Cortinariaceae. (ALEXOULOPOULOS e MIMS, 1979).

## **2.5. Espaçadores Moleculares**

A região dos espaçadores internos transcritos se apresenta como unidades repetidas dentro do DNA nuclear ribossomal. Esta região é comumente utilizada para identificação tanto de espécies quanto de subunidades filogenéticas. Esta região também é conhecida por apresentar uma certa variabilidade dentro de espécies. Embora a variação intraespecífica seja melhor elucidada por este tipo de região, a existência da divisão entre inter e intraespecífica é implícita e presumida por interpretações direcionadas para classificação de espécies (NILSON et al., 2014).



## **2.6. Metabolismo Fúngico**

Metabólitos secundários são comumente distinguidos dos primários por serem universalmente distribuídos como compostos intermediários. Este tipo de metabolismo é geralmente representado por compostos bioativos, usualmente com baixo peso molecular, sendo produzidos por famílias de componentes relacionados à diferentes estágios e parte do organismo. Ainda não se sabe bem ao certo quanto à propriedade celular a eles dispensada. Os organismos sintetizadores destes metabólitos são restritos em sua distribuição taxonômica, ou seja, apenas um pequeno grupo de organismos produzem determinados metabólitos (KELLER et al., 2005).

## **2.7. Compostos Fenólicos**

Compostos fenólicos são substâncias encontradas em todas as plantas como metabolismo secundário, incluindo grupos simples como fenóis, ácidos hidroxibenzóicos, ácidos cinâmicos e derivados, entre outros (NACZK & SHAHIDI, 2004).

A caracterização química destes compostos é definida por possuírem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, além de seus respectivos grupos funcionais (ANGELO & JORGE, 2007). Geralmente apresentam estrutura variável e por conta disto é justificada a multifuncionalidade destes compostos.

Nos alimentos, os compostos fenólicos podem contribuir para a amargura, adstringência, cor, sabor, odor e estabilidade oxidativa do produto (NACZK & SHAHIDI, 2004). Antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOARES, 2002).

Assim sendo, o potencial destes compostos está relacionado aos diversos tipos de atividades exercidas, como antioxidante, antibacteriana, antiviral, anticarcinogênica, anti-inflamatória e vasodilatadora (DUTHIE et al., 2000; BREINHOLT, 1999; NACZK & SHAHIDI, 2004).

## **2.8. Atividade Antioxidante**

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: a dos com atividade enzimática e a dos sem essa atividade. Na primeira, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radicais e são consumidas durante a

reação. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos (ANGELO & JORGE, 2007)

Segundo Balasundram et al. (2006), ao agir como antioxidantes, a estrutura dos compostos fenólicos é um fator determinante. No caso dos ácidos fenólicos, por exemplo, a atividade antioxidante depende do número e posição dos grupos hidroxilas em relação ao grupo funcional carboxila, tendo aumentada sua propriedade antioxidante quanto maior o seu grau de hidroxilação.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Isolamento e Manutenção de Linhagens**

Foram utilizados os isolados de 8 linhagens de shiitake (*L. edodes*) presentes na micoteca do Laboratório de Biologia do Solo / UFRRJ. A manutenção das linhagens foi dada de forma a preservar-las a médio prazo, com os isolados imersos em óleo mineral.

#### **3.2 Extração de DNA Total das Amostras**

Para a extração do DNA total, cada isolado foi cultivado em meio de cultura sólido Batata Dextrose Ágar (BDA). Em seguida, foi destacado 500 mg de micélio, sendo submetido em solução de extração (Tris-HCl 200 mM pH 8,0, EDTA 25 mM pH 8,0, SDS 1%, NaCl 25 mM) e vortexado. As amostras foram incubadas a 65°C. Posteriormente foram adicionados clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugados em 13.000 rpm. O próximo passo foi transferir a fase superior para um novo microtubo e adicionar igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após a centrifugação a 13.000 rpm foi transferida a fase superior para um novo microtubo (aprox. 400µL) foram adicionados 2 volumes de etanol 100% gelado e incubados a -20°C por 2 ou para a precipitação do DNA. As amostras seguiram novamente para a centrifugação e lavadas com etanol 70% (500 µL). Após completa volatilização, as amostras foram ressuspensas em água destilada e armazenados em freezer.

#### **3.3 Avaliação da Quantidade e Qualidade do DNA Total**

Após a extração, as amostras foram armazenadas a -20° C, e a quantidade e a qualidade do DNA obtido também foram avaliadas por fluorimetria Qubit. A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% acrescido de SYBR green (Invitrogen), a fim de realizar estimativas de concentração, comparando a intensidade da

banda da amostra com a intensidade da banda do marcador fago Lambda ( $\lambda$ ) (Pomega), nas concentrações de 25 e 50 ng. O gel foi visualizado sob luz UV 254 nm e as imagens foram capturadas com a utilização do sistema de fotodocumentação L-PIX EX (Loccus Biotecnologia).

### 3.4 Reação de PCR

Para a amplificação de fragmento gênico do rDNA foram utilizadas as seguintes sequências de oligonucleotídeos: ITS1 e ITS4 (Tabela 1). Como controle positivo foi utilizada uma amostra DNA fúngico amplificada anteriormente do gênero *Sporothrix* spp. e como controle negativo foi utilizada água destilada. A reação de PCR teve um volume de 20  $\mu$ L (25 mM de MgCl<sub>2</sub>; 2,5 mM de dNTPs; 5,0 pmol/ $\mu$ L de cada iniciador; 5 U/ $\mu$ L de Taq DNA polimerase; e tampão 1X). O sistema de amplificação foi realizado em termociclador BIORAD T100TM (ThermalCycler), e o perfil térmico de PCR foi de um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 4 min, seguido por 34 ciclos como segue: desnaturação das fitas-molde a 94 °C por 1 min, pareamento dos iniciadores a 50 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 5 min. Ao término das ciclagens, o produto amplificado foi analisado usando um marcador em gel de agarose a 1,0 %.

**Tabela 1.** Sequência de primers utilizados na amplificação do gene 18S rDNA

Primers	Sequência 5'-3'	Região do DNA	Tamanho do amplicon	Referência
ITS1-F	CTTGGTCATGAGGAAGTAA	18S rDNA	700 a 900pb	Olivera, 2014
ITS4-R	TCCTCCGCTTTATTGATATGC	16S rDNA		

### 3.5 Sequenciamento pelo Método de Sanger

As sequências foram geradas através eletroferograma e em seguida, foram editadas manualmente através do programa DNA Baser, formando as sequências *Contigs*. A partir destes fragmentos (em torno de 700 pares de base) as amostras foram comparadas no GenBank, BLASTn 32 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) em que foi possível fazer a análise de similaridade das sequências geradas com as disponíveis no banco de dados.

### **3.6 Análise de Agrupamento**

Após o alinhamento, os contigs foram curados nos programas BioEdit e utilizados para buscar sequências 40 similares no banco de dados do NCBI – GenBank. Foi feito o download das sequências similares aos contigs e seu alinhamento com estes para a montagem das árvores filogenéticas. As árvores foram montadas no software MEGA7 pelo método de Neighbour Joining, com modelo de substituição Kimura 2 parâmetros (KIMURA, 1980), com valor de bootstrap calculado a partir de 1000 réplicas.

### **3.7 Preparo das Amostras**

As amostras de micélio foram retiradas da micoteca do Laboratório de Química Biológica do Solo – UFRRJ. Estas amostras foram levadas a estufa de ventilação forçada a 50<sup>o</sup> C durante 48 horas. Posteriormente, foram levadas para o Laboratório de Farmácia Viva-UFRRJ onde foram trituradas em moinho de faca, sendo pesados 2g em balança analítica e posteriormente adicionado 40 ml de metanol, pelo meio extrativo de maceração. Após completa volatilização do solvente, as amostras seguiram para o liofilizador.

### **3.8 Análise de Compostos Fenólicos Totais**

As amostras foram preparadas em solução hidroalcolica 70% em uma concentração de 3mg/mL. Foi retirada uma alíquota de 0,5 ml da amostra diluída sendo esta transferida para tubos com tampa de rosca, sendo adicionado 2,5 de reagente de Folin (1:10). Após 5 minutos de repouso foram adicionados 2 mL de Carbonato de Sódio (4%). Os tubos foram deixados de repouso por 2 h ao abrigo de luz e na sequência, foram feitas leituras de absorbância a 740 nm. Para o preparo do branco foram utilizados 0,5 mL de metanol acrescido de 2,5 mL de Folin, 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 5 mL de água em que foi utilizado o ácido gálico como padrão.

### **3.9 Análise de Atividade Antioxidante Total**

O ensaio foi dado conforme descrito por Ruffino et al. (2007), em que uma solução inicial de 60 µM de DPPH foi preparada para obtenção de curva padrão em balão volumétrico de 10 ml de soluções variando de 10, 20, 30, 40 e 50 µM. Em ambiente escuro, foi transferido alíquota de aproximadamente 4 ml para cubetas de vidro para realizar a leitura ( $\lambda = 515$  nm), sendo utilizado metanol como branco. Para a diluição das amostras, foram preparadas 5

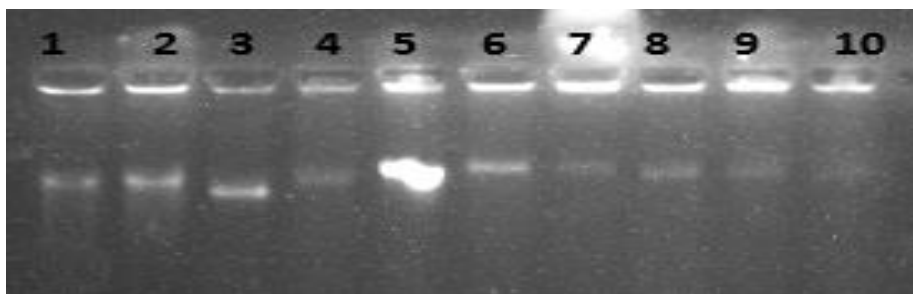
diluições diferentes (1, 2, 5, 7 e 10 µg/ml) sendo feitas 5 repetições de cada diluição. Em ambiente protegido de luz foi transferido uma alíquota de 0,1 ml de cada diluição com 3,9 ml de DPPH.

### **3.10 Perfil em CLAE- DAD de Extrato Metanólico**

Para a obtenção do extrato, foi utilizada seringa filtro com 0.2 µm de poro para filtrar 20 µl de amostra passando pelo sistema CLAE. A separação foi atingida com coluna (100 mm×4.6 mm, 3.5 µm) utilizando um fluxo 0.8 ml/min em temperatura ambiente. A fase móvel consistiu no eluente A (solução aquosa de Ácido Acético, 1% v/v) e eluente B (Acetonitrila, 100%), sendo utilizado o seguinte programa de gradiente para eluição: 0-2 min, 5% B; 2-5 min, 15% B; 5- 6 min, 40% B; 6-16 min, 60% B; 16-18 min, 90% B; 18-20 min 5% B; 20-22 min 5% B. A absorvância da solução foi medida de 280 a 370 nm.

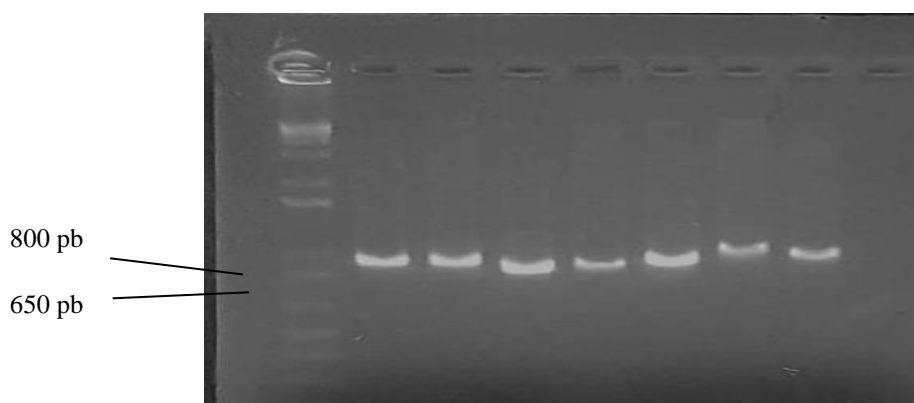
#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo, a qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose, sendo percebida boa intensidade nas bandas. De acordo com as análises qualitativas as bandas se mantiveram intactas sem nenhuma degradação aparente, sendo que este protocolo, portanto demonstrou-se altamente reproduzível (Figura 2).



**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 0,8 % do DNA total extraído das amostras de micélio: 1-  $\lambda$ 1 - DNA do fago lambda a 10 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>; 2-  $\lambda$ 2 - DNA do fago lambda a 30 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>; 3-10: UFRRJ STB5, STB2801, SHOSTB, SHOSTB2802, SHO23, SHO, M14, SHO20

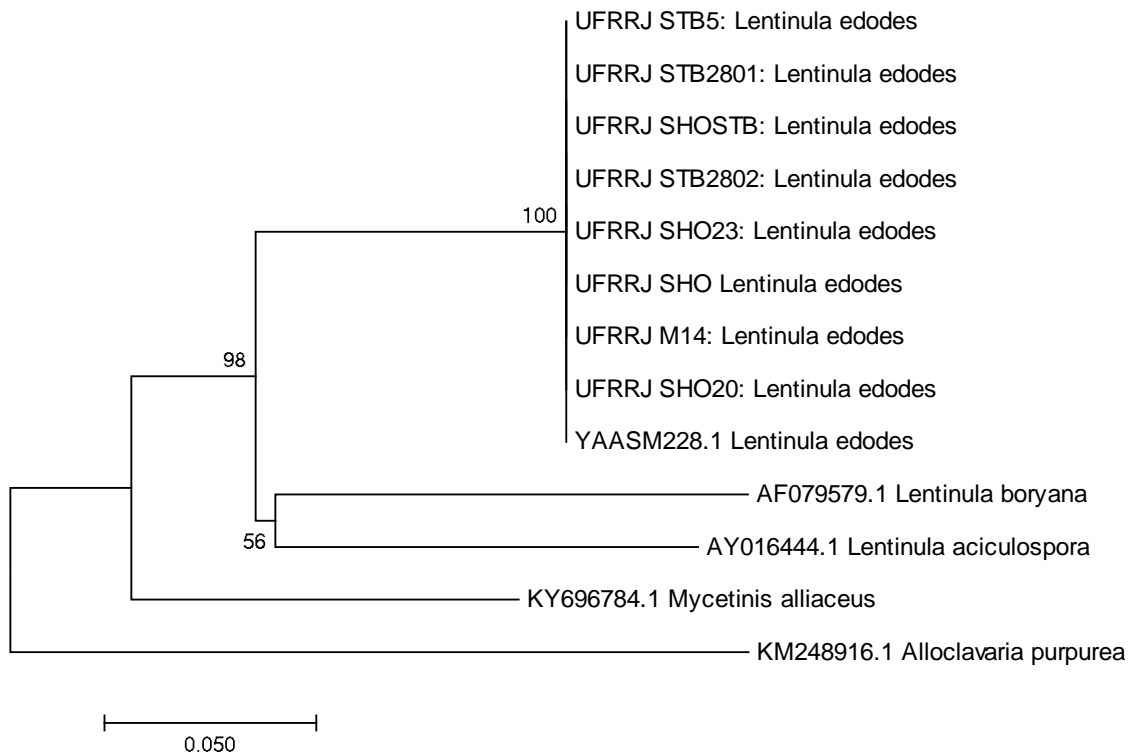
Para o estudo da variação genética, a região ITS foi amplificada e os produtos de PCR foram confirmados com bandas entre 650 e 737 pares de base. Foram observadas altas concentrações de DNA nos produtos de PCR, sendo quantificados 1035.2, 751.8, 701.6, 186.3, 605.3, 510.2, 237.8, 426 ng/ $\mu$ l (Figura 3).



**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose 1,0% dos produtos de PCR com marcador

Segundo Schoch *et al.* (2012), ao sequenciar estas subunidades percebeu que não são suficientes para separação entre espécie, o mesmo que o presente trabalho verificou. Entretanto, com base na análise das sequências obtidas nestes fragmentos, os isolados apresentam similaridade com a espécie *L. edodes* depositada no banco de dados NCBI

(YAASM228.1). Além disso, a análise filogenética baseada na sequência de nucleotídeos apontou como grupo externo as espécies *Mycetinis alliaceus* e *Alloclavaria purpurea*. Pode-se observar que estas regiões são relativamente pequenas e facilmente amplificáveis ao ser usado um único par de primers universal (Figura 4).



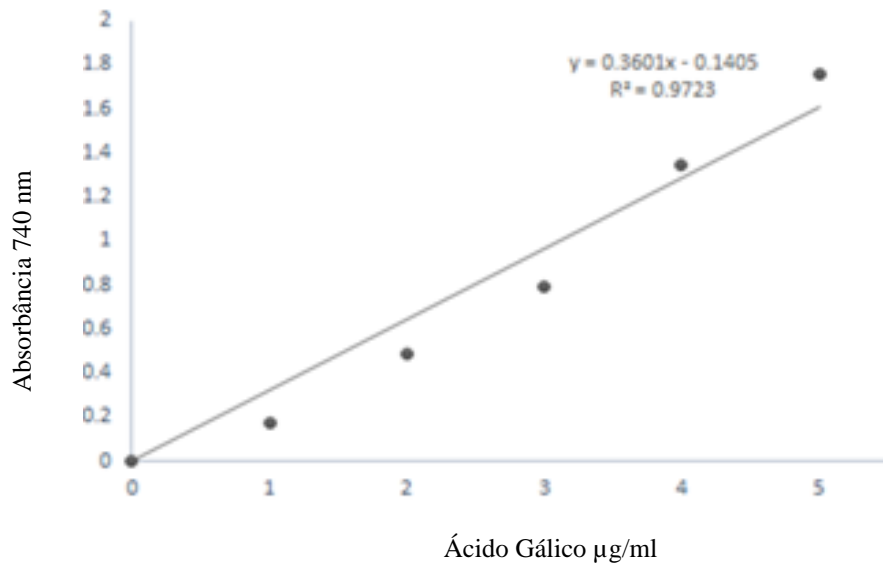
**Figura 4.** Dendrograma baseado na análise de agrupamento pelo método de “Neighbour-joining” derivado das sequências das regiões ITS rDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”, de isolados de *L. edodes* e de sequências obtidas do GenBank de diferentes isolados de espécies.

A identificação da posição taxonômica precisa das espécies é essencial para programas de seleção, por exemplo, empregados para quaisquer experimentos de desenvolvimento de novas estirpes, bem como para qualquer programa de criação de cogumelos recém-criado (SIDDIQUEE et al., 20012; LECHNER et al. 2002). Quanto à domesticação e reprodução híbrida, a informação intra e interespecies é altamente valiosa. A região ITS se demonstra como um marcador útil para informações interespecies que permitem produtores e pesquisadores reconhecer as espécies de interesse, vigor híbrido e minimização dos efeitos de endogamia (AVIN et al., 2014)

#### 4.1 Análise de Compostos Fenólicos Totais

A baixo são observados os resultados das análises de dos compostos fenólicos totais (Figuras 5).

Com relação à composição fenólica total, foi observado 0,48 mg de ácido gálico/ml de extrato metanólico de micélio, valor bem próximo ao encontrado em outros trabalhos. Silva (2011) avaliou em diferentes espécies de cogumelos a composição de compostos fenólicos totais e observou um valor de 0,78 mg de ácido gálico/ml de extrato metanólico de micélio a partir também de extratos alcólicos, chegando bem próximo ao encontrado no presente trabalho.

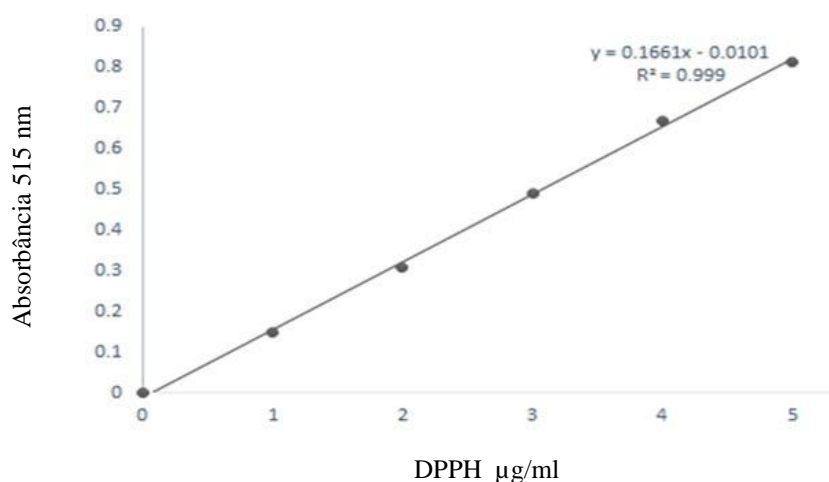


**Figura 5.** Curva de calibração para análise de compostos fenólicos totais (A)



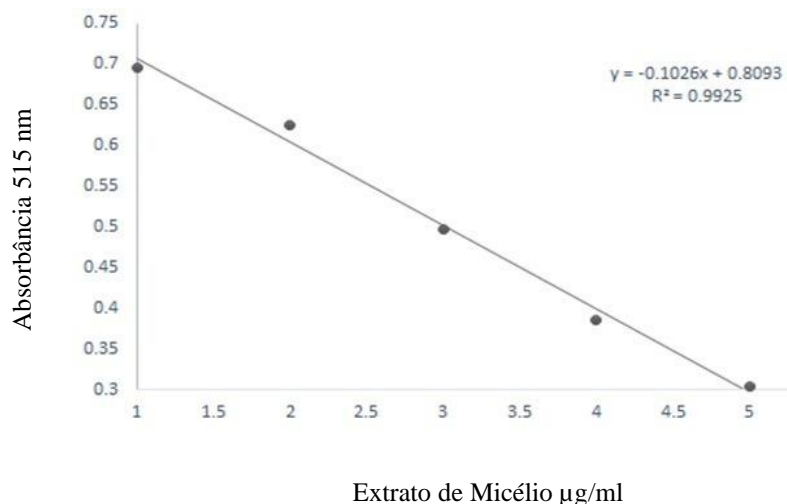
## 4.2 Análise da Atividade Antioxidante Total

Com efeito dos antioxidantes na reação, foi observado o decréscimo de absorvância das amostras (Figura 6). Elmastas et al. (2007) explicam que este decréscimo se deve a habilidade do reagente em poder doar seu hidrogênio. O DPPH é considerado um bom aceptor de elétrons ou de radical hidrogênio, virando uma molécula dimagnética estável. Segundo os mesmos autores, a redução da capacidade do DPPH é observada pelo decréscimo da absorvância induzida pelas moléculas de antioxidantes presentes na amostra (Figura 6).



**Figura 6.** Curva de calibração para análise da Atividade Antioxidante Total pelo método de DPPH

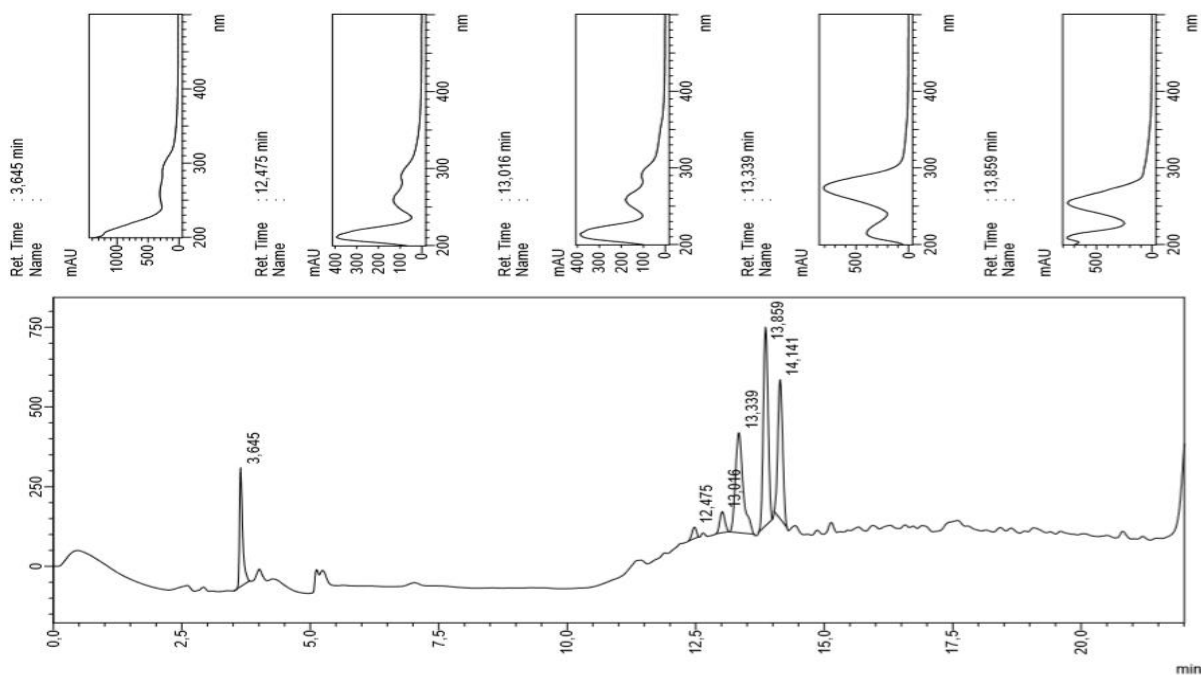
Foi calculado em torno de EC<sub>50</sub> 8,0 mg/ml para atividade antioxidante destes micélios. Sabendo-se que quanto menor o valor de EC<sub>50</sub>, maior será a atividade antioxidante, Cheung et al. (2003) obtiveram o valor de EC<sub>50</sub> 1, 25 mg/ml, neste caso, os autores avaliaram extratos metanólicos e aquosos. O valor da atividade antioxidante total observada neste trabalho demonstrou-se abaixo do esperado. Isto pode ser atribuído ao fato do solvente utilizado. Ainda assim, Campos et al. (2005), consideram como baixo potencial antioxidante EC<sub>50</sub> equivalente a 25 mg/ml, sendo portanto atribuído ao material analisado neste trabalho uma boa atividade antioxidante.



**Figura 7.** Curva de calibração para análise de diferentes absorbâncias a partir das diluições da amostra

### 4.3 Perfil em CLAE- DAD do Extrato Metanólico

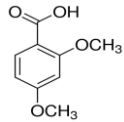
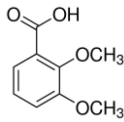
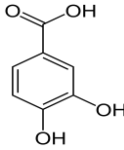
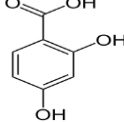
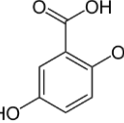
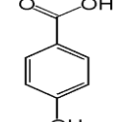
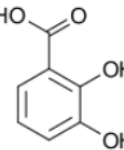
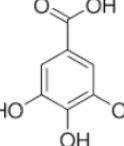
O estudo cromatográfico pode ser categorizado como parte do levantamento de compostos bioativos presentes em amostras (Acharya et al. 2015). Neste estudo, foi caracterizado de acordo com o tempo de retenção dos metabólitos previamente separados e com uso de padrões autênticos, sendo possível analisar a presença de cinco diferentes picos na corrida (Figura 9).

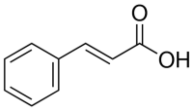
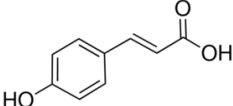
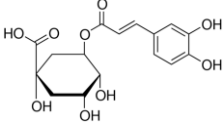
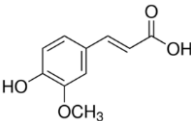
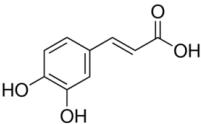


**Figura 8.** Cromatograma da amostra de micélio a partir do extrato metanólico

Na tabela 2 estão presentes os compostos corridos neste trabalho, sendo analisados os diferentes tempos de retenção e espectro no UV- vis. De acordo com os tempos de retenção e comprimento de absorção foram levantados dois possíveis moléculas: ácido 2,4 dimetoxibenzóico e ácido 2,4 dihidroxibenzóico (Figuras 10 e 11).

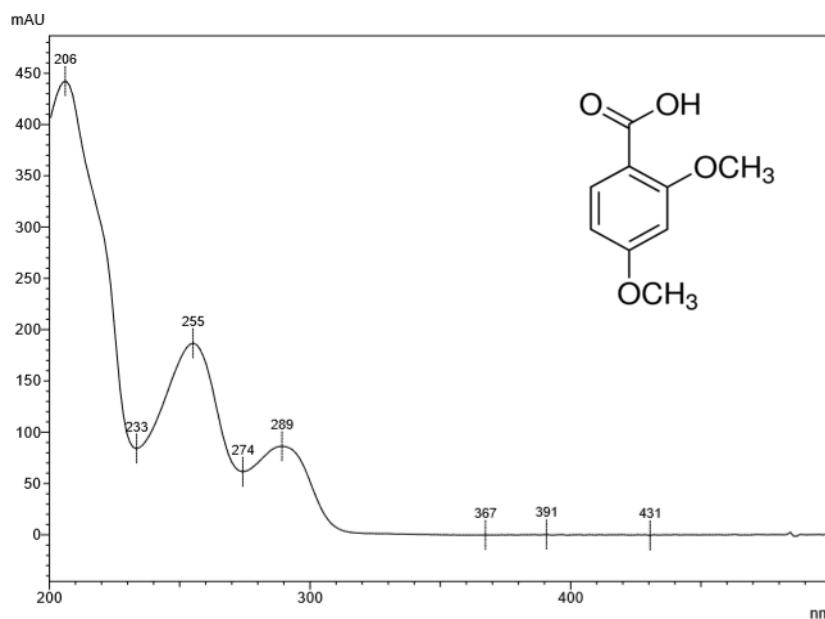
**Tabela 2.** Caracterização química presente no extrato metanólico de *L. edodes*

Nome da Molécula	Estrutura Química	TR (min)	$\lambda$ (nm)	P/ A
Ácido 2,4 dimetoxibenzóico		13,61	255	+
Ácido 2,3 dimetoxibenzóico		14,3	260	-
Ácido 3,4 dihidroxibenzóico		11,7	254	-
Ácido 2,4 dihidroxibenzóico		11,91	260	+
Ácido 2,6 dihidroxibenzóico		12,04	287	-
Ácido 4 hidroxibenzóico		13,09	271- 280	-
Ácido 2,3 dihidroxibenzóico		10,63	320	-
Ácido gálico		8,36	210	-

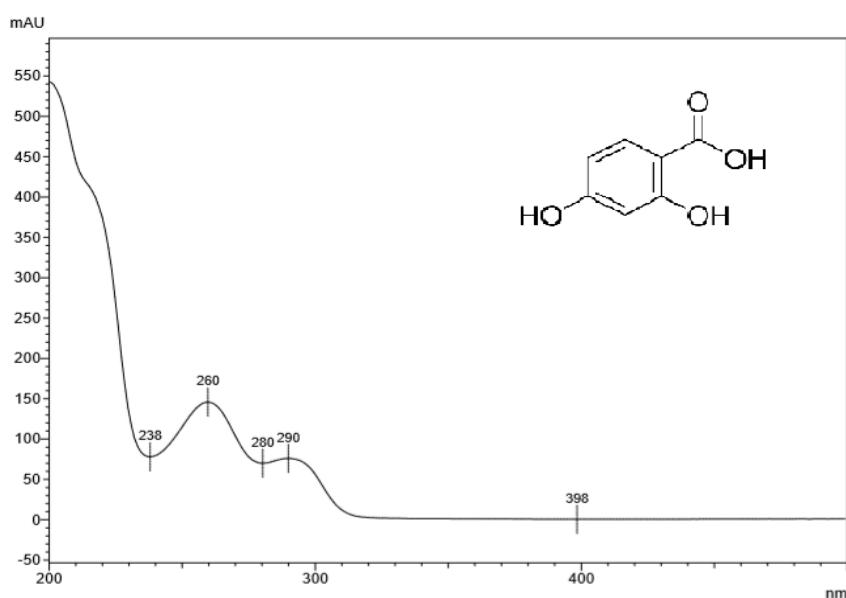
Nome da Molécula	Estrutura Química	TR (min)	$\lambda$ (nm)	P/ A
Ácido Trans cinâmico		15,20	274	-
Ácido para- cumárico		7,89	254	-
Ácido clorogênico		3,26	285	-
Ácido trans- ferúlico		8,90	309	-
Ácido cafeico		9,26	280	-

TR:Tempo de Retenção; $\lambda$ : comprimento de onda no espectro UV (nm) e P/ A: Presença ou Ausência da molécula

Na tentativa de elucidar as diferenças de potencial antioxidante existentes entre os compostos fenólicos, Hraš *et al.* (2000), realizaram uma comparação quantitativa do comportamento cinético da inibição da oxidação de alguns ácidos benzóicos (ácidos p-hidroxibenzóico, vanílico, sirínico, e 3,4 dihidroxibenzóico) e cinâmicos (ácidos p-cumárico, ferúlico, sinápico e caféico) e notaram que no caso dos ácidos benzóicos, a hidroxila presente na molécula do ácido p-hidroxibenzóico não confere a este nenhuma propriedade antioxidante. Já a metoxila presente com a hidroxila no ácido vanílico confere a ele uma pequena atividade antioxidante. No caso do ácido sirínico, o qual possui dois grupamentos de metoxila, a ação é ainda maior.



**Figura 9.** Perfil em UV da molécula 2,4 dimetoxibenzóico (A)



**Figura 10.** Perfil em UV da molécula 2,4 dihidroxibenzóicos

Barich *et al.* (2004), descreveram quimicamente o composto 2,4 dimetoxibenzóico como possuindo estruturas planares aproximadas, formando um dímero de ligação de hidrogênio típico com uma molécula vizinha. Esta molécula apresenta grupo metil e/ ou carboxílico fora do plano molecular, conforme ditado por interações estéricas. Estas características os diferem, por exemplo, do composto de mesmo grupo 2,5 dimetoxibenzóico, que forma uma ligação de hidrogênio intramolecular comum entre os grupos carboxílicos.

Já o ácido 2, 4 dihidroxibenzóico, segundo composto levantado no presente trabalho, apontado na literatura como, um dos compostos aromáticos utilizados na indústria farmacêutica e cosmética, bem como na produção de corantes e plásticos (DESSIMOZ *et al.*,

2012). Como produto comercial apresenta as propriedades químicas do resorcinol e do ácido salicílico, podendo ser utilizado em reações químicas para determinação colorimétrica.

#### 4.6. CONCLUSÕES

O processo de extração de DNA total em micélio de *L. edodes* demonstrou um bom resultado, indicando que uso da região ITS resultou um bom marcador para identificação de espécies, neste estudo e para as 8 linhagens de *L. edodes* estudadas.

Para espécie *L. edodes*, os marcadores ITS1 e ITS 4 não demonstraram-se eficientes para separação intraespecífica.

O micélio avaliado apresentou baixa atividade antioxidante (8,0 mg / ml de extrato metanólico de micélio) e de compostos fenólicos totais (0,48 mg de ácido gálico/ml de extrato metanólico de micélio).

Com relação ao perfil cromatográfico do extrato metanólico se demonstrou pobre com relação à presença de compostos fenólicos sendo levantados dois possíveis componentes presentes na amostra (2,4 hidroxibenzóico ; 2,4 metoxibenzóico)

#### 4.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C. J. & MIMS, C. W. *Introductory mycology*. New York: John Wiley & Sons, 1979.

ANGELO, P. M. & JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz. Univ. Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP*. v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE COGUMELOS. Disponível em <http://www.anpc.org.br/index.php/informacoes/cogumelos> Acesso em: 25/03/2019.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, v. 99, n.1, p.191-203, 2006.

BORCHERS, A. T.; STERN, J. S.; HACKMAN, R. M.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M.E. Mushrooms, tumors, and immunity. *Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine* v.221, p.281–293, 1999

CHIRAHA, G.; HAMURO, J.; MAEDA, Y. Y.; ARAI, Y.; FUKUOKA, F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially Lentinan, from *Lentinus edodes*. *Cancer Research* v. 30, p. 2776–2781, 1970

DUTHIE, G. G.; DUTHIE, S. J.; KYLE, J. A. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition research reviews*, v. 13, n. 1, p. 79-106, 2000.

GRUTER, A.; FRIEDERICH, U.; WURGLER, F.E. The mutagenicity of edible mushrooms in a histidine-independent bacterial test system. *Food and Chemical Toxicology* v.29, n.3, p. 159–165, 1991

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n.12, p. 937, 2005.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; DAVID, J.C.; STALPERS, J.A. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 9 ed. CABI Bioscience, Egham. 2001.

LAKHANPAL, T. N. Prospects of mushrooms from the wild. In: NAIR, M. C. Advances in mushroom biotechnology. Jodhpur: Scientific Publishers, 1994.

NACZK, M. & SHAHIDI, F. Extraction and Analysis of Phenolics in Food. Journal of Chromatography, n. 1054, p. 95-111, 2004.

NILSSON, R. H.; HYDE, K. D.; PAWŁOWSKA, J.; RYBERG, M.; TEDERSOO, L.; AAS, A. B.; ARNOLD, A. E. Improving ITS sequence data for identification of plant pathogenic fungi. Fungal Diversity, v.67, n.1, p. 11-19, 2014.

OOI, V. E.; LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. Current Medicine and Chemistry v.77, p. 715–729, 2000

RAVEN, P.H., EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. Biologia Vegetal. 7°. ed. Coord. Trad. J.E. Kraus. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2007.

SÁNCHEZ, C. Bioactives from mushroom and their application. Food Bioactives. Springer, Cham. p. 23-57. 2017.

SILVEIRA, V. D. Micologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995.

SUGUI, M.M.; ALVES de LIMA, P.L.; DELMANTO, R.D.; da EIRA, A.F.; SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R. Antimutagenic effect of *Lentinula edodis* (BERK.) Pegler mushroom and possible variation among lineages. Food and Chemical Toxicology, n. 1, p.555-560, Brazil, 2003.

URBEN, A. F. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada: biotecnologia e aplicações na agricultura e na saúde. Ed. técnica. 3. ed. ver. e ampl. – Brasília, DF: EMBRAPA, 2017.



URBEN, A. F.; OLIVEIRA, H. C. B.; VIEIRA, W.; CORREIA, M. J.; URIARTT, H. A.; SANTOS, J. K. P.; RIBEIRO, V. L. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004

WASSER, S.P.; WEISS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical Reviews in Immunology* n. 19, p. 65–96, 1999

WASSER, S. & WEIS, A. L. Therapeutic Effects of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: A Modern Perspective. **Critical Reviews in Immunology**, v. 19, p. 65-96, 1999.

CHIHARA, G. Lentinan and its related polysaccharides as host defense potentiators: Their application to infectious diseases and cancer. **Immunotherapeutic Prospects of Infectious Diseases**. p. 9-18, 1990.

CHIHARA, G.; HAMURO, J.; MAEDA, Y. Y.; ARAI, Y.; FUKUOKA F. Fractionation and Purification of the Polysaccharides with Marked Antitumor Activity, Especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (An Edible Mushroom). **Cancer Research**, v. 30, p. 2776-2781, 1970.

MAEDA, Y. Y.; WATANABE, S. T.; CHIHARA, C.; ROKUTANDA, M. Denaturation and renaturation of b-1,6; 1,3-Glucan, Lentinan, associated with expression of T-Cellmediated Responses. **Cancer Research**, v. 48, p. 671-675, 1988.

Song X X, Zhao Y, Song C Y, Li C H, Song Y, Chen M J, Bao D P, Tan Q. ITS1/5.8S/ITS2, a good marker for initial classification of shiitake culinary-medicinal *Lentinula edodes* (Agaricomycetes) strains in China. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 20, 227–242, 2018

Oliveira, K. K. C. **Atividade antimicrobiana de basidiomicetos ocorrentes na Amazônia**. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas, Porto Alegre, 2014

CHEN, L.; GONG, Y.; CAI, Y.; LIU, W.; ZHOU, Y.; XIAO, Y. Genome Sequence of the Edible Cultivated Mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) Reveals Insights into Lignocellulose Degradation. **Plos One** - DOI:10.1371/journal.pone.0160336. August 8, 2016.

LECHNER, B. E.; PETERSEN, R.; RAJCHENBERG, M.; ALBERTÓ, E. Presence of *Pleurotus ostreatus* in Patagonia, Argentina. **Revista Iberoamericana de Micología**, Vol. 19, Nº. 2, pp. 111–114, 2002.

SIDDIQUEE, S.; TAN, S. G.; YUSUF, U. K.; FATIHAH, N. H. N.; HASAN, M. M. Characterization of Malaysian *Trichoderma* isolates using random amplified microsatellites (RAMS). **Molecular Biology Reports**, Vol. 39, Nº. 1, pp. 715–722, 2012. DOI: 10.1007/s11033-011-0790-6.

AVIN, F. A.; BHASSU, S.; TAN, Y. S.; SHAHBAZI, P.; VIKINESWARY, S. Molecular Divergence and Species Delimitation of the Cultivated Oyster Mushrooms: Integration of IGS1 and ITS. **The Scientific World Journal**, Vol. 2014, p. 1-10, 2014

SILVA, A. C.E & JORGE, N. Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**. 2011.

CHEUNG L. M.; CHEUNG P. C. K.; OOI V. E. C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushrooms extracts. **Food Chem**. N. 81, Vol.2, p.249-55. 2003.

ELMASTAS M.; ISILDAK O.; TURKEKUL I.; TEMUR N. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **J Food Compos. Anal** 20, v. 3-4, p. 337-45. 2007.

BARCIA M.T.; JACQUES A.C.; PERTUZATTI P.B.; ZAMBIAZI R.C. Determinação de ácido ascórbico e tocoferóis em frutas por CLAE, **Semin. Ciênc. Agr.** v. 31, p. 381–390. 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 5.ed. Porto Alegre: **Artemed**. 954p. 2013.

CAMPOS JUNIOR, F. Perfil dos composto fenólicos em cogumelos comestíveis produzidos no Brasil. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. **Campinas**, SP: [s.n.], 81p. 2013.

SIQUEIRA, A. L. C. **Validação de métodos para a determinação de compostos fenólicos em melancia**. Dissertação (Mestrado) em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco. 2013.

VERZA, S.G. **Avaliação das variáveis analíticas dos métodos de determinação do teor de taninos totais baseados na formação de complexos com substâncias proteicas e derivados da polivinilpirrolidona**. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SCHOLZ, M. B. S.; KITZBERGER, C. S. G.; DURAND, N.; CHARMETANT, P.; LEROY, T. Ácidos orgânicos e açúcares em acessos da coleção de café da Etiópia do IAPAR e cultivares de café arábica, **IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Curitiba, 2015.

ARAÚJO, E. M. P. **Técnicas espectroscópicas e quimométricas como ferramentas na confirmação da estrutura de substâncias isoladas de produtos naturais ou obtidos por síntese** (Tese). Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2012.

OLIVEIRA, G. S. **Desenvolvimento de métodos cromatográficos para a padronização do extrato de Eugenia speciosa Cambess**. Monografia. Curso de Licenciatura em Química, Faculdade de Ciências – Departamento de Química - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 2016.

BARICH, D. H.; ZELL, M. T.; POWELL, D. R.; MUNSON, E. J. 2,4-Dimethoxybenzoic acid and 2,5-dimethoxybenzoic acid. **Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications**. 2004.

DESSIMOZ, A.-L.; BERGUERAND, C.; RENKEN, A.; KIWI-MINSKER, L. Kinetic and thermodynamic study of the aqueous Kolbe–Schmitt synthesis of beta-resorcylic acid. **Chemical Engineering Journal**, 200-202,p 738. 2012.

ALVAREZ-PARRILLA, E; DE LA ROSA, L. A.; LEGARRETA, P.; SAENZ, L; RODRIGO-GARCÍA, J.; GONZÁLEZ-AGUILAR. G. A. Daily consumption of apple, pear and orange juice differently affects plasma lipids and antioxidant capacity of smoking and non-smoking adults. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. N°. 61, Vol. 4, p 369-380. 2007.

SILVA, A. C., & JORGE, N. Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**. 2011;13(Esp): 375-84

DEGÁSPARI, C. H., & WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, Jan.- Jun./2004

PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. Instituto de Biociências, **Universidade de São Paulo**. ISBN 978-85-85658-71-7. 2017.

HELENO, S. A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J. R. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, Vol.173, p. 501-513. 2015.

HRAŠ, A.; RIŽNER, M. H.; ŽELJKO K.; DAVORIN B. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. **Food chemistry**. N°.71, Vol. 2, p.229-233. 2000

KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, Nova Iorque, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.