

TAISE MURARO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE *Pleurotus sajor-caju* SOBRE O CRESCIMENTO
DE MICRO-ORGANISMOS DA MICROBIOTA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS**

JOINVILLE

2016

TAISE MURARO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE *Pleurotus sajor-caju* SOBRE O CRESCIMENTO DE
MICRO-ORGANISMOS DA MICROBIOTA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS**

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

JOINVILLE

2016

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

M972a Muraro, Taise
Avaliação do efeito de *Pleurotus sajor-caju* sobre o crescimento de micro-organismos da microbiota intestinal de camundongos / Taise Muraro; orientadora Dra. Regina Maria Miranda Gern – Joinville: UNIVILLE, 2016.

119 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente
– Universidade da Região de Joinville)

1. *Pleurotus sajor-caju*. 2. Prebióticos. 3. Polissacarídeos. 4. Propriedades medicinais. I. Gern, Regina Maria (orient.). II. Título.

CDD 616.01

Termo de Aprovação

“Avaliação do Efeito de *Pleurotus sajor-caju* sobre o Crescimento de Micro-Organismos da Microbiota Intestinal de Camundongos”

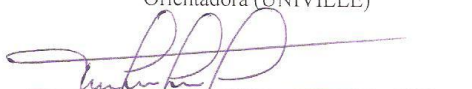
por

Taise Muraro

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.



Prof. Dra. Regina Maria Miranda Gern
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:



Prof. Dra. Regina Maria Miranda Gern
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Érika Dantas de Medeiros Rocha
(IELUSC)



Prof. Dra. Elisabeth Wisbeck
(UNIVILLE)



Prof. Dra. Marcia Luciane Lange Silveira
(UNIVILLE)

Joinville, 29 de fevereiro de 2016

“A persistência é o menor caminho do êxito”. (Charles Chaplin)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe. Pela imensa dedicação, incentivo e carinho. E por sempre me ajudar nos momentos em que precisei. Ao meu pai (in memoriam).

Ao meu filho. Razão pelo qual sigo meus estudos.

Ao meu marido. Pelo carinho, compreensão e apoio incondicional.

A todos, por compreender a minha preocupação com este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar no caminho dos estudos e por mais esta oportunidade que tive.

Ao meu esposo, Ivan, por ser tão importante na minha vida. Graças ao seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio e amor, esta etapa da minha vida pôde ser concretizada. Obrigada por ter feito esse sonho se realizar!

Ao meu filho, pelo amor, e por ser minha força para não desistir dos meus objetivos.

A minha irmã Odete, que me ajudou a entender um pouco mais sobre as análises laboratoriais, pelo incentivo em continuar os estudos e pelo carinho.

À minha orientadora, Prof^a Regina Gern, pelos ensinamentos, por estar sempre pronta para ajudar, pela paciência e pela forma tão tranquila e carinhosa de conduzir as orientações, muito obrigada pelo acolhimento, de coração !

À Prof^a Carmen Heyder, uma pessoa muito especial e querida, a qual agradeço não somente pela ajuda técnica e por sua opinião sempre muito coerente, nas reuniões realizadas, mas também pelos bons momentos compartilhados.

Agradeço com muito carinho ao Prof^o Eduardo Manoel, sempre muito prestativo, foi parte fundamental nas tomadas de decisões nas reuniões e no tratamento com os camundongos no biotério. Obrigada pelos ensinamentos e incentivo e desculpa o termo mas, você é feral!!!

A Prof^a Márcia Luciane Lange Silveira pela gentileza e auxílio no laboratório de Biotecnologia.

Também agradeço a minha maravilhosa amiga Michele Ouriques por sua ajuda essencial, pelas energias positivas que sempre me proporcionou, por ouvir meus desabafos, por me acalmar nos dias estressantes, pela sua ternura, pelo carinho e por sempre estar pronta a me ajudar e não me deixar desistir. Lembrarei de você sempre!

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

Aos alunos de medicina, Thales, Bruno e Leandro pela parceria e ajuda.

Aos professores do Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, pela

contribuição na minha formação.

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

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

A TODOS VOCÊS, MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Fungos da classe dos Basidiomicetos têm sido amplamente utilizados por suas propriedades medicinais e nutricionais. Dependendo das condições de cultivo do fungo e dos métodos de extração dos compostos bioativos, substâncias com diferentes estruturas e, conseqüentemente, com diferentes bioatividades podem ser obtidas. Estas substâncias podem atuar tanto como antimicrobianos quanto estimular o crescimento de micro-organismos mostrando, portanto, potencial prebiótico. Este trabalho avaliou o efeito de frações extrativas polissacarídicas obtidas do micélio e do caldo de cultivo em meio líquido de *Pleurotus sajor-caju* sobre a massa corporal e a microbiota intestinal de camundongos albinos Swiss machos. A massa corporal dos animais foi monitorada no 1º, 14º, 28º e 56º dias da dieta. As substâncias foram administradas por gavagem nas doses de 10, 30, 60 e 300 mg kg⁻¹. Os animais foram divididos em 5 grupos: grupo controle (C), que foi alimentado com solução de carboximetilcelulose; grupo S1, que recebeu a fração extrativa do caldo de cultivo de *P. sajor-caju*; grupo S2, que recebeu a fração extrativa do micélio de *P. sajor-caju*; grupo S3, que recebeu a fração extrativa do micélio desproteínizada e grupo S4, que recebeu a fração extrativa do caldo de cultivo de *P. sajor-caju* desproteínizada. As fezes dos camundongos foram coletadas no 1º, 14º, 28º e 56º dia e avaliadas quanto a presença de bifidobactérias, lactobacilos e enterobactérias por meio da técnica da contagem em placas, contendo meio de cultivo específico para cada micro-organismo. Resultados mostraram que, em relação ao controle, a fração extrativa S1, na dose de 60 mg kg⁻¹, promoveu uma inibição de 77% no crescimento de bifidobactérias em 14 dias. O crescimento de bifidobactérias também foi inibido em 88% pela substância S2, na dose de 10 mg kg⁻¹, em 14 dias. A fração extrativa S2, na dose de 10 mg kg⁻¹, promoveu ativação de 1852% no crescimento de lactobacilos e na dose de 30 mg kg⁻¹ promoveu ativação de 567% no crescimento de bifidobactérias, ambos em 28 dias. A fração extrativa S4, na dosagem de 10 mg kg⁻¹, estimulou em 310% o crescimento de bifidobactérias, na dose de 30 mg kg⁻¹ estimulou em 311% o crescimento de enterobactérias e na dose de 60 mg kg⁻¹, estimulou em 482% o crescimento de bifidobactérias, todas em 28 dias. A fração extrativa S2, na dose de 300 mg kg⁻¹, estimulou em 158% e 486% o crescimento de bifidobactérias em 14 e 28 dias, respectivamente. Esta mesma fração e dose estimulou em 226% o crescimento de lactobacilos, em 28 dias. Nenhum resultado de ativação ou inibição do crescimento manteve-se até o 56º dia, indicando que o efeito é dependente da administração da substância. A fração extrativa do micélio desproteínizada (S3) não apresentou efeito sobre o crescimento de nenhum dos micro-organismos testados. Provas bioquímicas para a identificação das enterobactérias estimuladas pela fração S4 indicaram a presença de bactérias potencialmente patogênicas como *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella* sp,

Edwardsiella tarda, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* e bacilos Gram-negativos não fermentadores, compondo as colônias. As demais frações extrativas tanto do caldo de cultivo quanto do micélio apresentam um possível potencial prebiótico, com destaque para a substância S2, que foi capaz de ativar o crescimento de lactobacilos e bifidobactéria, sem alterar o conteúdo de enterobactérias. Quanto à massa corporal, o aumento do peso proporcionado pela ingesta de S4 pode estar relacionado a suposta ausência de proteínas na substância e ao melhor aproveitamento de nutrientes na dieta.

Palavras-chaves: *Pleurotus sajor-caju*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterobactereaceae*, prebiótico, polissacarídeos

ABSTRACT

Fungi of the class of Basidiomycetes have been widely used for its medicinal and nutritional properties. Depending on the fungal culture conditions and extraction methods of bioactive compounds, substances with different structures, and hence with different bioactivities can be obtained. These substances can act as antimicrobial agents or can stimulate the growth of microorganisms, showing prebiotic potential. This study evaluated the effect of extractive fractions obtained from the mycelium and from the culture broth of *Pleurotus sajor-caju* cultured in liquid medium - on body weight and on the intestinal microbiota of males Albino Swiss mice. The body weight of the animals was monitored on the 1st, 14th, 28th and 56th days of the diet. The substances were administered by gavage at concentrations of 10, 30, 60 and 300 mg kg⁻¹. The animals were divided into 5 groups: control group (C), which were fed with carboxymethyl cellulose solution; S1 group, which received the extractive fraction of *P. sajor-caju* culture broth; S2 group, which received the extractive fraction of the mycelium of *P. sajor-caju*; S3 group, which received the extractive fraction of the mycelium deproteinized, S4 group which received the extractive fraction of the culture broth deproteinized. The feces of mice were collected at the 1st, 14th, 28th and 56th days and evaluated for the presence of bifidobacteria, lactobacilli and enterobacteria by the count plate agar technique, using plates containing culture medium specific for each microorganism. Results showed that, compared to control group, the extractive fraction of the group S1 in the dose of 60 mg kg⁻¹, promoted a 77% inhibition on the growth of bifidobacteria, on the 14th day. The growth of bifidobacteria was also inhibited by 87% by S2 substance at the dose of 10 mg kg⁻¹, on the 14th day. The extractive fraction S2 promoted activation on the growth of lactobacillus (1852%) and at a dose of 30 mg kg⁻¹, on the growth of bifidobacteria (567%), both on the 28th day. The extractive fraction S4, at a dose of 10 mg kg⁻¹, stimulated the growth of bifidobacteria in 310%. S4 also stimulated the growth of enterobacteria (311%) and bifidobacteria (482%), at doses of 30 and 60 mg kg⁻¹, respectively, both on the 28th day. Biochemistry assays for identification of enterobacteriaceae whose growth was stimulated by S4 fraction indicates the presence of potential pathogens such as *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella* sp, *Edwardsiella tarda*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* and bacilli Gram-negative composing the colonies. S2, at a dose of 300 mg kg⁻¹, stimulated by 158% and 486% the growth of bifidobacteria on the 14th and 28th days, respectively. This same fraction and dose stimulated at 226% the growth of lactobacilli, on the 28th day. No results of activation or inhibition of growth remained until the 56th day, indicating that the effect on growth was dependent on the administration of all substances. The deproteinized extractive fraction of the mycelium (S3) showed no effect on growth of all the tested microorganisms. The results suggested that the extractive fraction of the mycelium (S2) present a possible prebiotic potential, being capable to promote the growth of lactobacilli and bifidobacteria without changing the enterobacteriaceae content. Regarding the body weight, weight gain provided by S4 intake may be related to a lack of protein in the substance and better utilization of nutrients in the diet.

Key-words: *Pleurotus sajor-caju*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterobacteriaceae*, prebiotic, polysaccharides

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A. Representação esquemática do ciclo sexual de um fungo da classe dos basidiomicetos. B. Representação esquemática da formação do basídio.	27
Figura 2 – Principais estruturas dos corpos frutíferos dos basidiomicetos	28
Figura 3 - Corpos frutíferos de <i>Pleurotus sajor-caju</i>	31
Figura 4 - Placa de Petri contendo <i>Pleurotus sajor-caju</i> em meio TDA.....	49
Figura 5 - Cultivo de <i>Pleurotus sajor-caju</i> em biorreator de mistura completa modelo Biostat B em processo descontínuo simples.....	50
Figura 6 - Filtração à vácuo para separação da biomassa e caldo de cultivo obtidos.	51
Figura 7 - Fração extrativa do caldo de cultivo (S1).....	51
Figura 8 – (A) Mistura de biomassa micelial e água em agitador magnético com aquecimento a 100°C, (B) Sobrenadante sendo concentrado em rotavapor, (C) Fração extrativa do micélio (S2).....	52
Figura 9 – Variação da massa corporal dos camundongos tratados com as substâncias S1, S2, S3 e S4 na dose de 10 mg kg ⁻¹ em 14, 28 e 56 dias em relação ao controle. As barras representam o erro padrão.....	61
Figura 10 - Variação da massa corporal dos camundongos tratados com as substâncias S1, S2, S3 e S4 na dose de 30 mg kg ⁻¹ em 14, 28 e 56 dias em relação ao controle. As barras representam o erro padrão.....	62
Figura 11 - Variação da massa corporal dos camundongos tratados com as substâncias S1, S2, S3 e S4 na dose de 60 mg kg ⁻¹ em 14, 28 e 56 dias em relação ao controle. As barras representam o erro padrão.....	62
Figura 12 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de <i>Lactobacillus</i> spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do caldo de cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada (S4), na dose de 10 mg kg ⁻¹ . Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.	66
Figura 13 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de <i>Lactobacillus</i> spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do caldo de cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada (S4), na dose de 30 mg kg ⁻¹ . Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.	66

Figura 14 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Lactobacillus* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do caldo de cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada (S4), na dose de 60 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.67

Figura 15 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Bifidobacterium* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do caldo de cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada (S4), na dose de 10 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.68

Figura 16 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Bifidobacterium* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do caldo de cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada (S4), na dose de 30 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.69

Figura 17 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Bifidobacterium* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do caldo de cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada (S4), na dose de 60 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.69

Figura 18 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Enterobacteriaceae* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do caldo de cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada (S4), na dose de 10 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.73

Figura 19 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Enterobacteriaceae* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do caldo de cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada (S4), na dose de 30 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.73

Figura 20 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Enterobacteriaceae* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do caldo de cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada

(S4), na dose de 60 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.74

Figura 21 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Lactobacillus* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do micélio (S2), na dose de 300 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.81

Figura 22 – Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Bifidubacterium* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do micélio (S2), na dose de 300 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Percentual de ativação e/ou inibição do crescimento de lactobacilos, bifidobactérias e enterobactérias promovido pelas substâncias S1 (fração extrativa do caldo de cultivo), S2 (fração extrativa do micélio) e S4 (fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada).....	76
Tabela 2 - Percentual de ativação e/ou inibição do crescimento de lactobacilos e bifidobactérias promovido pela substância S2 (fração extrativa do micélio) na dose de 300 mg kg ⁻¹	83
Tabela 3- Crescimento celular de <i>Lactobacillus</i> spp presentes nas fezes de camundongos alimentados com a fração extrativa do caldo do cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada (S4), nas concentrações de 10 (A), 30 (B) e 60 (C) mg kg ⁻¹ e fração extrativa do micélio (S) na concentração de 300 mg kg ⁻¹ . Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.	119
Tabela 4- Crescimento celular de <i>Bifidobacterium</i> spp presentes nas fezes de camundongos alimentados com a fração extrativa do caldo do cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada (S4), nas concentrações de 10 (A), 30 (B) e 60 (C) mg kg ⁻¹ e fração extrativa do micélio (S) na concentração de 300 mg kg ⁻¹ . Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.	120
Tabela 5- Crescimento celular de <i>Enterobacteriaceae</i> spp presentes nas fezes de camundongos alimentados com a fração extrativa do caldo do cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada (S4), nas concentrações de 10 (A), 30 (B) e 60 (C) mg kg ⁻¹ . Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.	121

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Polissacarídeos presentes em fungos do gênero <i>Pleurotus</i>	33
Quadro 2 - Concentração e gêneros bacterianos presentes no sistema digestório humano	40
Quadro 3- Distribuição dos animais de acordo com as concentrações e as substâncias avaliadas	54
Quadro 4 - Provas bioquímicas para identificação das bactérias isoladas no meio EMB.	59

LISTA DE ABREVIATURAS

- CIT - Teste do Citrato
- CMC - Carboximetilcelulose
- EMB - Eosin Methylene Blue
- FOS - Fruto-oligossacarídeo
- GAS - Produção de gás a partir da glicose
- GLI- Fermentação da glicose
- H₂S - Produção de gás sulfídrico
- IND - Teste do Indol
- LBS - *Lactobacillus* Selection Agar
- LIS - Descarboxilação da lisina
- MOT - Motilidade
- MRS - Main-Rogosa-Sharp
- S - fração extrativa selecionada para aplicação em dose de 300 mg kg⁻¹
- S1 - fração extrativa do caldo de cultivo de *Pleurotus sajor-caju*
- S2 - fração extrativa do micélio de *Pleurotus sajor-caju*
- S3 - fração extrativa do micélio de *Pleurotus sajor-caju* desproteïnizada
- S4 - fração extrativa do caldo de cultivo de *Pleurotus sajor-caju* desproteïnizada
- TDA - Trigo Dextrose Agar
- TRI - Prova da Desaminação do L-Triptofano
- UFC - Unidade Formadora de Colônias

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
CONTEXTO INTERDISCIPLINAR DO ESTUDO	23
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1 Fungos	25
3.1.1 Filo Basidiomycota	26
3.1.2 Fungos do gênero <i>Pleurotus</i>	30
3.1.2.1 Polissacarídeos do gênero <i>Pleurotus</i>	31
3.1.2.2 Atividade antimicrobiana de fungos do gênero <i>Pleurotus</i>	33
3.2 Microbiota intestinal	37
3.2.1 Bifidobactérias	40
3.2.2 Lactobacilos	42
3.2.3 Enterobactérias	44
3.2.4 Substâncias que afetam a microbiota intestinal – Prebióticos	45
3.2.5 Efeito prebiótico de fungos	47
4 METODOLOGIA	49
4.1 Produção de polissacarídeos por <i>Pleurotus sajor-caju</i>	49
4.1.1 Micro-organismo e manutenção	49
4.1.2 Preparo do pré-cultivo (inóculo)	49
4.1.3 Cultivo de <i>P. sajor-caju</i> em biorreator	50
4.1.4 Obtenção das substâncias bioativas de <i>P. sajor-caju</i>	51
4.1.4.1 Obtenção da fração extrativa do caldo de cultivo (S1)	51
4.1.4.2 Obtenção da fração extrativa do micélio (S2)	52
4.1.4.3 Método de remoção de proteínas das frações extrativas obtidas do micélio (S1) e do caldo do cultivo (S2) para obtenção das frações S3 e S4 respectivamente	53
4.2 Avaliação do efeito das diferentes frações extrativas obtidas (S1, S2, S3 e S4) sobre a microbiota intestinal de camundongos	53
4.2.1 Delineamento dos grupos, substâncias e doses	53
4.2.2 Animais e dieta	54

4.2.3 Massa corporal dos animais.....	55
4.2.4 Preparação das amostras do conteúdo fecal	56
4.2.5 Análise bacteriológica do conteúdo fecal	56
4.2.6 Cálculo de unidades formadoras de colônia por grama de fezes (UFC g ⁻¹)	57
4.2.7 Identificação de bactérias isoladas no meio EMB	58
4.2.8 Análise Estatística	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1 Evolução da massa corporal dos animais	61
5.2 Avaliação do efeito das diferentes frações extrativas obtidas (S1, S2, S3 e S4) sobre a microbiota intestinal de camundongos	65
5.3 Avaliação do efeito da fração extrativa da biomassa micelial (S2) na dosagem de 300 mg kg ⁻¹ sobre a massa corporal dos animais	80
5.4 Avaliação do efeito da fração extrativa da biomassa micelial (S2) na dosagem de 300 mg kg ⁻¹ sobre a microbiota intestinal de camundongos.....	80
6 CONCLUSÕES	84
7 PERSPECTIVAS.....	86
REFERÊNCIAS.....	87
APÊNDICES.....	118

INTRODUÇÃO

Fungos da classe dos Basidiomicetos têm sido amplamente usados na Ásia como parte da dieta tradicional e da medicina e, nas últimas décadas, têm sido o foco de várias pesquisas que buscam por suas propriedades medicinais com o intuito de utilizá-los para produção de fármacos naturais. Os corpos frutíferos (cogumelos) ou a biomassa micelial são considerados nutracêuticos. Estes são consumidos *in natura* ou na forma de cápsulas, comprimidos, pó, xaropes ou soluções com propriedades terapêuticas utilizadas como um suplemento dietético. A atividade medicinal destes fungos tem sido atribuída principalmente aos polissacarídeos que compõem a parede celular. Vários destes biopolímeros (principalmente beta-glucanas ou heteropolissacarídeos) já foram caracterizados e avaliados quanto as propriedades antitumoral, anti-inflamatória, antinociceptiva e imunoestimulante. Desta forma, os cogumelos comestíveis são candidatos à formulação de novos alimentos funcionais e nutracêuticos, com propriedades de promover a saúde, embora estudos em relação a sua bioatividade quando incorporada em alimentos ainda sejam muito limitados (CHO et al., 1999; FALCH et al., 2000; BAGGIO, 2010; WASSER, 2011; ZHANG et al., 2011; GIAVASIS, 2013; MAJI et al., 2013; GIAVASIS, 2014; KOMURA et al., 2014).

Dentre os principais cogumelos comercialmente cultivados, os do gênero *Pleurotus*, como por exemplo, *P. florida*, *P. tuber-regium*, *P. sajor-caju*, *P. pulmonarius*, *P. ostreatus* e *P. eryngii*, apresentam, além do seu valor gastronômico, diversas propriedades farmacológicas comprovadas (RAGUNATHAN et al., 1996), tais como antitumoral, anti-inflamatória, antiviral, imunomoduladora, antioxidante, hipocolesterolêmica e anti-diabética (TSAI, TSAI e MAU, 2007; PALACIOS et al., 2012). São ainda usados em indivíduos com artrite reumatoide e lúpus (SMITH, ROWAN e SULLIVAN, 2002) e na estimulação do crescimento de bactérias probióticas (XU, 2001; WASSER, 2002; STACHOWIAK e REGULA, 2012; GIAVASIS 2013).

Embora tradicionalmente, as pesquisas sobre a atividade biológica de cogumelos tenham enfoque nos compostos obtidos do corpo de frutificação (KURBANOGU, ALGUR e ZULKADIR, 2004; EL-KATTAN et al., 1991;

LITCHFIELD, 1967), o cultivo líquido tem gerado grande interesse pois pode-se obter substâncias com potencialidades terapêuticas (WISBECK et al., 2002).

Diversos estudos apontam que os fungos tanto podem estimular o crescimento de micro-organismos quanto atuar como antimicrobianos. Estudos *in vitro* realizado por Schott et al. (2013), sugeriram que o polissacarídeo extraído do corpo frutífero de *Pleurotus ostreatus* apresenta potencial prebiótico e o corpo frutífero deste fungo pode atuar como prebiótico ou como antimicrobiano, dependendo da concentração utilizada e do micro-organismo em questão. Nos testes *in vivo*, os resultados apontaram para um possível potencial prebiótico de polissacarídeos extraído do corpo frutífero de *Pleurotus ostreatus*.

Vários fatores associados à vida moderna, como a má alimentação, sedentarismo, estresse, poluição, álcool, tabagismo, desencadeiam um desequilíbrio da microbiota intestinal dos indivíduos, ocasionando disbiose intestinal. Esta disbiose favorece o aparecimento de doenças como câncer, diverticulite e alterações no sistema imunológico. A utilização de prebióticos na alimentação tem o intuito de favorecer o crescimento e o equilíbrio da microbiota intestinal (GUARNER et al., 2011).

A microbiota intestinal humana é altamente complexa e compreende várias centenas de espécies bacterianas. Ela está associada ao estado de saúde dos indivíduos, influenciando muitos aspectos na fisiologia do hospedeiro. A sua composição é influenciada por uma variedade de fatores que incluem as espécies microbianas adquiridas no nascimento, genética do hospedeiro, fatores imunológicos, uso de antibióticos (WALKER et al., 2011; RELMAN, 2012) e também efeitos dietéticos (DUNCAN et al., 2007; WALKER et al., 2011; RUSSELL et al., 2011). A microbiota intestinal é importante para o desenvolvimento e maturação do sistema imune, atuando na mediação da tolerância dietética. A dieta é um dos principais fatores que podem influenciar o sistema imunológico no trato gastrointestinal, bem como a composição microbiana intestinal (ROLLER, RECHKEMMER e WATZL, 2004).

Dentro deste contexto, há um interesse crescente na utilização de alimentos funcionais para modular o sistema imunológico com o objetivo de melhorar a saúde e bem-estar. A introdução de prebióticos na dieta tem sido cada vez mais utilizada, pois é reconhecido que a composição das espécies da microbiota, bem como muitas

das suas características fisiológicas, pode ser modificada por mudanças no consumo alimentar (FLINT et al., 2012; GIBSON et al., 2004).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de frações extrativas polissacarídicas da biomassa micelial e do caldo de cultivo obtidos por cultivo líquido de *Pleurotus sajor-caju* sobre o crescimento de lactobacilos, bifidobactérias e enterobactérias da microbiota intestinal de camundongos Albino Swiss, analisando o seu possível efeito prebiótico.

CONTEXTO INTERDISCIPLINAR DO ESTUDO

Atualmente, há uma crescente preocupação com a presença de fármacos em ambientes aquáticos e seus possíveis impactos ambientais. A literatura mostra que vários pesquisadores, em todo o mundo, detectaram muitos desses fármacos residuais em águas naturais e em efluentes de estações de tratamento de esgotos.

Em todo mundo, fármacos, tais como, antibióticos, anestésicos, antilipêmicos e anti-inflamatórios, foram detectados no esgoto doméstico, em águas superficiais e de subsolo.

A educação em saúde e meio ambiente deve ser entendida como uma importante vertente à prevenção, e que na prática deve estar preocupada com a melhoria das condições de vida e de saúde da população, minimizando os impactos ambientais.

Neste contexto uma microbiota intestinal saudável e microecologicamente equilibrada resulta em um desempenho normal das funções fisiológicas do hospedeiro, o que irá assegurar melhoria na qualidade de vida do indivíduo. Este resultado é de suma importância, particularmente nos dias de hoje, em que a expectativa de vida aumenta exponencialmente. O papel direto dos microrganismos probióticos e indireto dos ingredientes prebióticos, incluindo os polissacarídeos fúngicos, no sentido de propiciar, no campo da nutrição preventiva, essa microbiota intestinal saudável e equilibrada ao hospedeiro, está sendo alvo de diversos estudos.

Uma melhor compreensão sobre a interação entre os polissacarídeos fúngicos, seus metabólitos intestinais, a microbiota intestinal e o hospedeiro abrirá novas possibilidades de produzir novos ingredientes para produtos alimentícios nutricionalmente otimizados e suplementos alimentares a base de extratos de fungos, que promovam a saúde do hospedeiro, através da ativação microbiana benéfica no intestino, fazendo com que os indivíduos evitem a utilização de fármacos contribuindo desta forma com o meio ambiente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de frações extrativas da biomassa micelial e do caldo de cultivo de *Pleurotus sajor-caju* sobre a microbiota intestinal de camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito das frações extrativas (10, 30 e 60 mg kg⁻¹) obtidas do caldo de cultivo e da biomassa micelial de *P. sajor-caju* sobre a massa corporal dos camundongos.
- Avaliar o efeito de frações extrativas obtidas do caldo de cultivo e da biomassa micelial de *P. sajor-caju* sobre o crescimento de micro-organismos intestinais de camundongos (lactobacilos, bifidobactérias e enterobactérias) nas concentrações de 10, 30 e 60 mg kg⁻¹.
- Definir a fração extrativa que melhor favoreça o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos e testá-la na concentração de 300 mg kg⁻¹.
- Identificar enterobactérias cujo crescimento tenha sido favorecido pelas frações extrativas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fungos

Os fungos têm importância ecológica e econômica. Ecologicamente, degradam compostos orgânicos, independente da origem, convertendo-os em elementos aproveitáveis pelas plantas, portanto são considerados importantes decompositores de matéria orgânica no ecossistema. Economicamente, merecem destaque em várias áreas como a Medicina, Farmácia, Nutrição, Fitopatologia, Agricultura, Biotecnologia, entre outras (MORAES, ALMEIDA-PAES e HOLANDA, 2010).

São seres eucariontes, cosmopolitas (estão presentes em qualquer parte do planeta), heterótrofos e saprófagos (alimentam-se da matéria orgânica animal ou vegetal morta). São aclorofilados, sendo assim não realizam fotossíntese. Sua nutrição se dá por absorção com o auxílio de enzimas digestivas (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Os fungos resistem a grandes variações térmicas que, dependendo da espécie, varia de -6°C a 50°C ou mais. Se desenvolvem normalmente em meios com pH ácido, necessitando de alguns minerais, carbono e nitrogênio orgânico ou inorgânico para sobreviver. Algumas espécies necessitam ainda de vitaminas (PELCZAR, CHAN e KRIEG, 1996).

Hibbett et al. (2007) descrevem uma abrangente classificação filogenética do Reino Fungi, com base na análise filogenética molecular. Desta forma, correntemente, são propostos sete filos: Microsporidia, Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Glomeromycota, Ascomycota, e Basidiomycota. Neste último, encontram-se os fungos da podridão branca e os cogumelos comestíveis e medicinais.

Alguns dos fungos mais conhecidos são os comestíveis e os que agem como fermentadores de vinho, cerveja, pão, queijo etc., sendo importantes para a indústria alimentícia (KIRK et al., 2008).

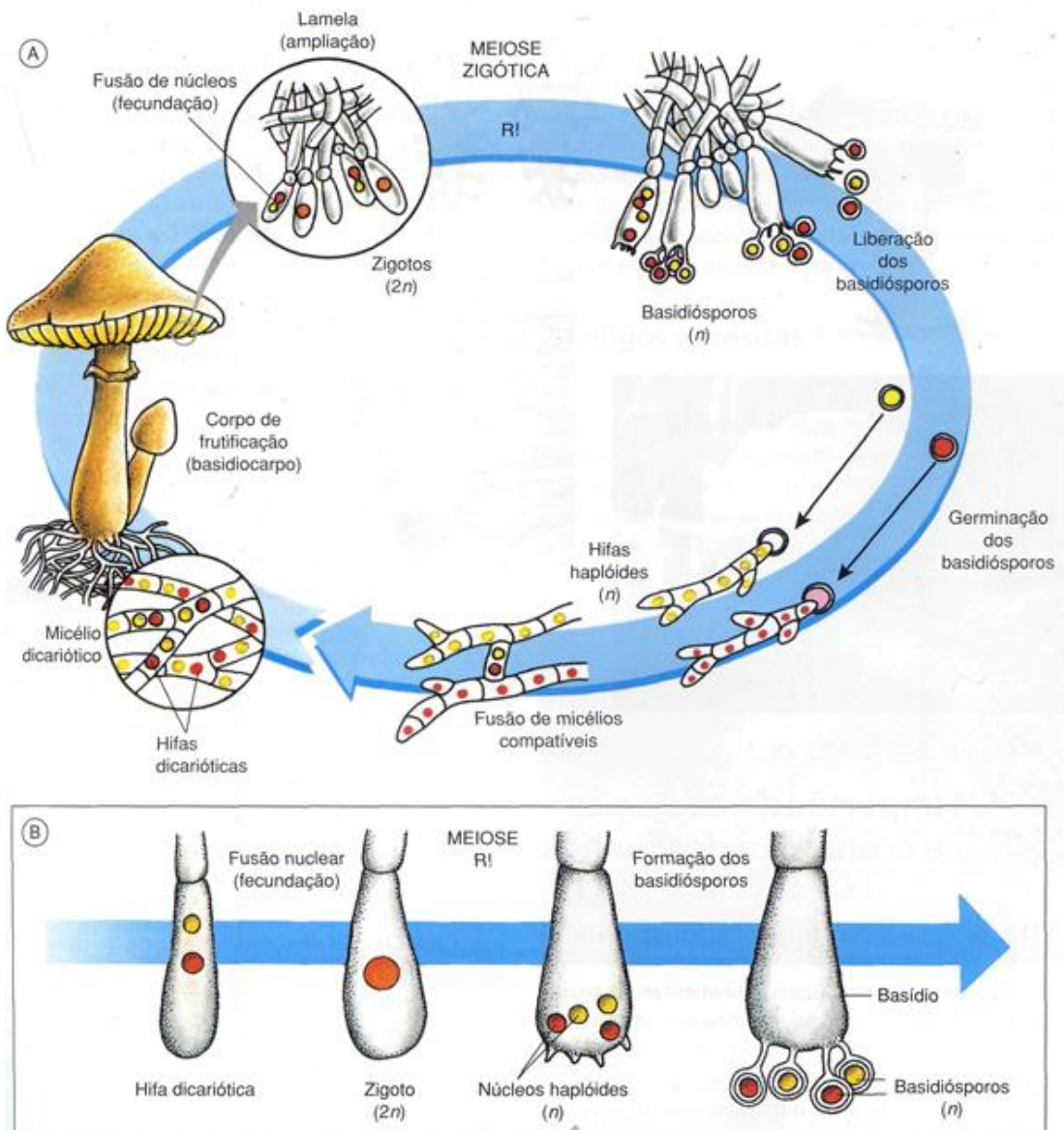
A maioria dos fungos que apresenta frutificação macroscópica, como *Agaricus bisporus* (Champignon de Paris), *Agaricus blazei* (cogumelo do sol), *Lentinus edodes* (shiitake) e os do gênero *Pleurotus*, está incluída no filo Basidiomycota (BRUNS, WHITE e TAYLOR, 1991; BRUNS e GARDES, 1993).

3.1.1 Filo Basidiomicota

De acordo com Kirk et al. (2008), os basidiomicetos possuem uma variedade de espécies conhecidas. Possuem estrutura reprodutiva denominada de basídio. Os basídios produzem esporos denominados basidiósporos. Quando o esporo germina são originadas as hifas monocarióticas. As hifas se unem por plasmogamia e formam hifas dicarióticas. O micélio formado por hifas dicarióticas pode desenvolver-se durante anos. Esta é a fase que predomina no ciclo de vida dos basidiomicetos (SILVA JÚNIOR e SASSON, 2005).

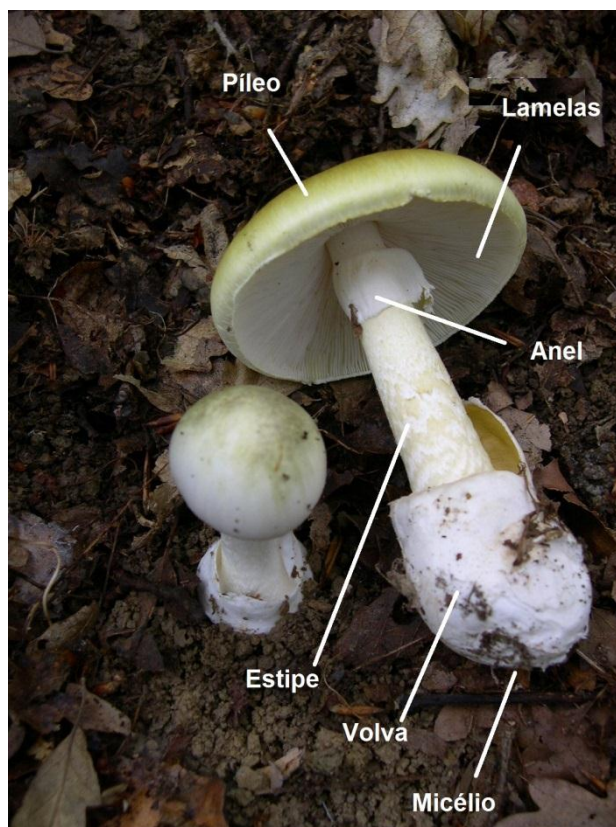
O ciclo de vida dos basidiomicetos que crescem no solo, representado na Figura 1, inicia com a germinação de um basidiósporo para produzir micélio monocariótico que cresce rapidamente e se espalha por todo o solo. O micélio representa a fase vegetativa dos basidiomicetos e é formado por filamentos septados, chamados de hifas. Este micélio primário ao encontrar outro micélio monocariótico se une e forma o micélio dicariótico, que é estimulado a desenvolver o basidiocarpo (corpo de frutificação), que contém os basídios alinhados sobre as lamelas. A cariogamia ocorre neste local, onde os núcleos se fundem para formar um núcleo diplóide, que imediatamente sofre meiose, formando quatro núcleos haplóides. Estes núcleos vão dar origem aos basidiósporos (haplóide), sendo liberados na maturidade, caindo no substrato e então o ciclo se reinicia (PRESCOTT, HARLEY e KLEIN, 2002). O corpo de frutificação, por sua vez, se diferencia em píleo, estipe, lamelas, anel e volva (bulbo basal) (Figura 2) (PUTZKE e PUTZKE, 2002).

Figura 1 - A. Representação esquemática do ciclo sexual de um fungo da classe dos basidiomicetos. B. Representação esquemática da formação do basídio.



Fonte: SILVA JÚNIOR e SASSON, 2005.

Figura 2 – Principais estruturas dos corpos frutíferos dos basidiomicetos



Fonte: Modificado de https://pt.wikipedia.org/wiki/Amanita_phalloides

A maior produção mundial (60%) de cogumelos ocorre na Ásia, correspondendo a 7,4 milhões de toneladas. A Europa é a segunda maior produtora (23,4%) seguida das Américas (5,8%), Oceania (0,7%) e África (0,2%). Na Coreia do Sul a produção anual atinge 26 mil toneladas e o consumo per capita, 8 quilos. O consumo per capita de fungos no Brasil (160 gramas) é muito inferior quando comparado à França (2 kg), Itália (1,3 kg) e Alemanha (4 kg) (EMBRAPA, 2013).

Devido ao conceito de possuir elevado valor medicinal e nutritivo, e ao preço mais acessível, a produção de fungos comestíveis vem aumentando no Brasil (FURLANI e GODOY, 2007). Dados do Censo Agropecuário de 2006 mostram que a produção de cogumelos no Brasil foi de 5.894 toneladas, sendo produzidos em 386 empresas agropecuárias. A maior produção foi no Sudeste e Sul do Brasil, somando um total de 95% da produção total brasileira nestes dois Estados (IBGE, 2006).

Os basidiomicetos podem ser cultivados em meio sólido, utilizando uma ampla variedade de substratos tais como folhas de bananeira (RAMPINELLI et al.,

2010), folhas de pupunheira, extratos da casca de mamona, casca de amendoim e palha de arroz (ALBUQUERQUE et al., 2013).

Do cultivo sólido obtêm-se corpos frutíferos dos quais podem ser extraídos compostos bioativos. O cultivo submerso em solução aquosa é o método mais empregado nas indústrias com o objetivo de obter-se uma variedade de metabólitos produzidos por fungos filamentosos e por sua facilidade de manuseio e de controle de parâmetros dos bioprocessos (GIBBS et al., 2000; NEE'NIGAM, 2009). Fungos cultivados em meio líquido não produzem os corpos de frutificação, mas sim o micélio (biomassa micelial) e também podem excretar metabólitos para o caldo de cultivo.

O cultivo submerso apresenta várias vantagens em relação ao cultivo em meio sólido, sendo que a mais importante delas é a redução do tempo gasto para produção dos compostos utilizados na terapia medicinal (TANG e ZHONG, 2003). Segundo Wagner et al. (2003), a produção de corpos de frutificação de *Ganoderma lucidum* leva pelo menos três meses, enquanto uma quantidade satisfatória de seus polissacarídeos, pode ser obtida em cultivo submerso em apenas duas ou três semanas. No cultivo submerso, há a possibilidade de controle do tipo de produto e as condições do processo, como temperatura, taxa de agitação, taxa de inoculação, fontes de carbono e nitrogênio, e pH (GHORASHI et al., 2003; GETHA et al., 2009). A possibilidade de manipular as condições de cultivo no processo submerso pode fazer com que os basidiomicetos produzam uma gama de compostos bioativos de importância terapêutica, como os polissacarídeos, num curto período de tempo (ZHONG e TANG, 2003).

Alguns estudos mostram que os corpos frutíferos e a biomassa micelial, bem como seus extratos, apresentam diversas atividades terapêuticas como potencial anti-inflamatório (SMIDERLE et al., 2008; YU et al., 2009; SILVEIRA et al., 2015), analgésico (SUSEEM et al., 2011), hipoglicêmico (MANZI e PIZZOFERRATO, 2000; KANAGASABAPATHY et al., 2012), antitumoral (SASAKI e TAKASURA, 1976; MIZUNO, 1999; WANG et al., 2000; LAVI et al., 2006; SARANGI et al., 2006; ZHANG et al., 2006; FURLAN et al., 2008; WOLFF et al., 2008; MAITI et al., 2008; TONG et al., 2009; DALONSO et al., 2010; TELLES et al., 2011; WONG et al., 2011; ZHANG et al., 2011; FINIMUNDY et al., 2013; ASSIS et al., 2013; FACCHINI et al., 2014), antimicrobiano (WISBECK et al., 2002), imunomodulador (WASSER, 2002; WONG et al., 2007; SUN e LIU, 2009; CARBONERO et al., 2012),

hipocolesterolêmico (DAVIDSON et al., 1991; LEADBETTER et al., 1991; BRAATEN et al., 1994; HECKER et al., 1998; BROWN et al., 1999; KALRA e JOOD, 2000; KERCKHOFFS et al., 2002; DELANEY et al., 2003; NAUMANN et al., 2006), controle da glicemia no sangue (BOURDON et al., 1999; JUNTUNEN et al., 2002; FRANK et al., 2004; HU et al., 2006), aumento da produção de colecistoquinina (ANDERSON e GUSTAFSON, 1988; DAVIDSON et al., 1991; BOURDON et al., 1999).

Dentre os polissacarídeos fúngicos com atividade medicinal, destacam-se as β -glucanas, sendo encontradas no basidiocarpo (SMIDERLE et al., 2008) e/ou micélio (KOMURA et al., 2014).

As β -glucanas são polissacarídeos que fazem parte da parede celular de leveduras, fungos e de alguns cereais. Eles apresentam diferenças no tipo de ligação entre as unidades de glicose da cadeia principal e nas ramificações que se conectam a essa cadeia (MAGNANI e CASTRO-GÓMEZ, 2008), possuindo diferentes atividades medicinais (ANGELI et al., 2009). Sendo assim, a estrutura química de cada macromolécula parece ser determinante para a aplicação terapêutica (COLLEONI-SIRGHIE, 2003).

Não está totalmente clara a função específica das β -glucanas na fisiologia do fungo. No entanto, acredita-se que a sua principal função seja estrutural, mantendo a rigidez e a integridade da parede celular. Os glucanos extracelulares de fungos lignocelulolíticos ajudam na degradação da lignina, como fonte indireta de peróxido de hidrogênio. Estes polissacarídeos extracelulares, especialmente em fungos que fazem a degradação da madeira, podem ainda servir como um suporte para adsorção das enzimas excretadas e, admite-se ainda, que os polissacarídeos extracelulares seriam capazes de proteger a hifa de desidratar-se, bem como, seriam responsáveis pela regulação da concentração de glicose extracelular (SILVA et al., 2006).

3.1.2 Fungos do gênero *Pleurotus*

Os fungos do gênero *Pleurotus* pertencem ao filo *Basidiomycota*, classe *Basidiomycetes*, ordem *Agaricales* e família *Pleurotaceae*. Encontram-se nesse gênero, as espécies *Pleurotus sajor-caju* (DONG, 1988; SODEN, CALLAGHAN e DOBSON, 2002), *Pleurotus ostreatus* (YOSHIOKA et al., 1985), *Pleurotus*

citrinopileatus (ZHANG et al., 1994), *Pleurotus djamor* (BORGES et al., 2013) e *Pleurotus florida* (ROUT et al., 2005), entre outras.

Estes fungos são conhecidos por ter um sabor agradável e alto teor de proteínas, vitaminas (tiamina, riboflavina e niacina), minerais (cálcio, fósforo, ferro etc.) e carboidratos e baixo teor de lipídeos (MANZI et al., 1999; MATTILA et al., 2000; MANZI et al., 2001; RAGUNATHAN e SWAMINATHAN, 2003; MDACHI et al., 2004; MANZI et al., 2004; BONATTI et al., 2004; DEL TORO et al., 2006; GHORAI et al., 2009; RAMPINELLI et al. 2010).

Seu habitat são as florestas temperadas, tropicais e subtropicais, podendo ser cultivado em meio sólido (ZADRAZIL, 1984; MAZIERO et al., 1995; SANTOS-NEVES, 2008; BONATTI, 2001; SÁNCHEZ, 2009; MOONMOON et al., 2010; SHER et al., 2010; ARORA et al., 2011) e em meio líquido (MAZIERO et al., 1999; WISBECK et al., 2005; CASTRO et al., 2007; CONFORTIN et al., 2008, GERN et al., 2008).

A origem da espécie *Pleurotus sajor-caju* (Figura 3) é asiática, especificamente da Índia, e cresce naturalmente sobre uma planta (*Euphorbia royleans*) na base do Himalaia. No Japão é conhecida como “Houbitake” (PRAMANIK et al., 2007).

Figura 3 - Corpos frutíferos de *Pleurotus sajor-caju*.



Fonte: <http://slnmushrooms.com/mushrooms>.

3.1.2.1 Polissacarídeos do gênero *Pleurotus*

Diferentes polissacarídeos têm sido extraídos e isolados da parede celular dos corpos frutíferos, do micélio e do caldo de cultivo (exopolissacarídeos) de fungos

do gênero *Pleurotus*. Dentre os polissacarídeos comumente produzidos por fungos *Pleurotus* estão as glucanas.

A partir dos basidiocarpos de *P. sajor-caju* foram isolados e caracterizados três carboidratos, um heteropolímero denominado manogalactana e duas glucanas. O heteropolissacarídeo, obtido via extração aquosa a frio, apresentou manose, galactose e 3-O-metil-galactose na sua composição, sugerindo a presença de uma manogalactana. A partir do extrato aquoso a quente, foram isoladas uma β e uma α -glucana, com ligações glicosídicas do tipo α -(1 \rightarrow 4) e α -(1 \rightarrow 6) (SILVA et al., 2011).

Carbonero et al. (2010) concluíram que os basidiocarpos de *P. sajor-caju* contêm similares manogalactanas, altamente ramificadas, com uma cadeia principal formada de unidades de α -Galp e 3-O-Me- α -Galp ligadas (1 \rightarrow 6), as quais encontram-se parcialmente substituídas em O-2 por terminais não redutores de β -D-Manp.

O Quadro 1 apresenta a estrutura e a atividade biológica de polissacarídeos extraídos de diferentes espécies do gênero *Pleurotus*.

Quadro 1- Polissacarídeos presentes em fungos do gênero *Pleurotus*.

Espécie	Características Estruturais	Atividade Biológica	Referência
<i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i>	α -glucana	Efeito antiproliferativo e pró-apoptótico de células cancerígenas	LAVI et al. (2006)
<i>P. pulmonarius</i>	β -D-glucana (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-ligada	Anti-inflamatório e analgésico	SMIDERLE et al. (2008)
<i>P. eryngii</i>	α -D-glucana(1 \rightarrow 3)-ligada	Efeito antiproliferativo	VELEBNY et al. (2008)
<i>P. ostreatus</i> e <i>Pleurotus eryngii</i>	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6); α -GlcP-(1 \rightarrow 3)	Efeito prebiótico	SYNYTSYA et al. (2009)
<i>P. var. florida</i>	α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana ramificada no O-3 e O-6 por β -D-glucose, β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-D-glucana	Inibição da adesão de células tumorais	SELVI et al. (2011)
<i>P. ostreatus</i>	D-glucana-(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)	Aumento da motilidade gastrintestinal	SELVI et al. (2011)
<i>P. sajor-caju</i>	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)	Imunoestimulador, hipoglicêmico e anti-obesidade	KANAGASABAPATHY et al. (2012)
<i>P. ostreatus</i>	Pleurana, heterogalactana, proteoglicana	Imunoestimulador	HOZOVA et al. (2004); BRENNAN et al. (2013)
<i>P.ostreatus</i> var. <i>florida</i>	α -Manp-(1 \rightarrow 6)-ligada e β -glucana-(1 \rightarrow 3)-ligada	Atividade antinociceptiva e antiinflamatória	KOMURA et al. (2014)

3.1.2.2 Atividade antimicrobiana de fungos do gênero *Pleurotus*

Dentre as diversas atividades biológicas atribuídas aos fungos do gênero *Pleurotus* está a atividade antimicrobiana, que pode afetar diretamente os micro-organismos do trato gastro-intestinal, foco deste trabalho.

As doenças infecciosas continuam sendo uma ameaça à saúde humana pois, mesmo com o desenvolvimento de medicamentos naturais e sintéticos, a resistência bacteriana causada pelo consumo exacerbado de antibióticos se tornou um

problema de saúde pública conduzindo os gestores de saúde a tomarem diferentes medidas a fim de amenizar a disseminação de bactérias multirresistentes aos antibióticos convencionais. O uso popular de algumas espécies de cogumelos possibilitou o seu uso como fonte de compostos antimicrobianos com ação similar aos antibióticos convencionais (AKYUZ et al., 2010).

A atividade antimicrobiana pode ser atribuída à presença de vários metabólitos bioativos secundários, compostos voláteis, alguns fenóis, ácidos gálico, ácidos graxos livres e seus derivados. A sensibilidade de algumas bactérias para extratos de cogumelos pode ser explicada pela estrutura hidrofílica que elas possuem em seu espaço periplasmático (espaço fluido entre a membrana plasmática e a membrana externa de bactérias gram-negativas), o que faz com que a parede celular seja mais permeável e, conseqüentemente, essas bactérias são vulneráveis ao ataque por metabólitos presentes em cogumelos (GYAWALI e IBRAHIM, 2014).

Garcia et al. (1998) detectaram a atividade antimicrobiana do extrato do micélio de *Pleurotus ostreatus* crescido sobre grãos de trigo, contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Bacillus subtilis*. Foi testada a adição de 3% (p/v) de farelo de trigo ao meio de cultivo, e esta pode ter sido a indutora de mecanismo de produção de agente antimicrobiano

Wisbeck et al. (2002), com linhagens de *Pleurotus* cultivadas em cultivo submerso, avaliaram a ação antimicrobiana do caldo fermentado pelos fungos. A linhagem *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Já a linhagem *Pleurotus ostreatus* CCB 001 apresentou atividade somente contra *B. subtilis*. *Pleurotus* sp inibiu em 100% a proliferação da bactéria *B. subtilis* e *Pleurotus sajor-caju* CCB 019 não apresentou atividade antimicrobiana contra nenhum dos micro-organismos testados. O efeito antimicrobiano do caldo de cultivo de *P. ostreatus* pode estar associado à presença de ácido benzóico, álcool benzílico, anisaldeído e terpenos, conhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas.

Coutinho et al. (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos (infusão aquosa a quente) do micélio desidratado de *P. ostreatus*, cultivado em meio contendo extrato de trigo e glicose. O extrato promoveu uma inibição de 57,5% no

crescimento de *E. coli* e de 87,21% no crescimento de *B. subtilis*, não apresentando atividade contra *C. albicans*.

Estudos de susceptibilidade antibacteriana de *Pleurotus ostreatus in vitro* foram realizados por Kunjadia et al. (2014), nos quais utilizou-se as bactérias Gram-positivas *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*; e as Gram-negativas *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para os estudos de susceptibilidade antifúngica *in vitro* foram utilizadas as estirpes *Aspergillus spp* , *Penicillium spp* e *Mucor luteus*. A atividade antibacteriana de todos os extratos e frações foram rastreadas utilizando o método de difusão em ágar. As atividades antifúngicas de todos os extratos e frações foram testadas usando o método de turbidimetria. A atividade dos extratos foi comparada com a dos antibióticos cloranfenicol e fluconazol para bactérias e fungos, respectivamente. O extrato etanólico da biomassa micelial obtida em cultivo submerso de *P. ostreatus* apresentou baixa atividade antibacteriana (halo de inibição menor que 6 mm) contra *B. megaterium*, *Enterobacter* e *P. aeruginosa*, enquanto o extrato etanólico de *P. ostreatus* cultivado em cultivo sólido mostrou boa atividade antibacteriana (halo maior que 18 mm) contra estes micro-organismos. O extrato etanólico de *P. ostreatus* cultivado em cultivo submerso mostrou pouca atividade antifúngica em relação ao do estado sólido. Os resultados obtidos com o extrato etanólico de *P. ostreatus* obtido em cultivo sólido foram comparáveis aos obtidos com o antibiótico padrão clorafenicol, contra *B. megaterium*, *Enterobacter* e *P. aeruginosa*.

Ahmad et al. (2014) estudaram a atividade antioxidante e o potencial antimicrobiano de extratos etanólicos de cogumelos comestíveis (*Pleurotus ostreatus*, *Morchella esculenta*, *P. ostreatus* (preto), *Pleurotus ostreatus* (amarelo) e *Pleurotus sajor-caju* em diferentes doses (200, 400, 600, 800 e 1000 mg). O potencial antimicrobiano foi investigado pela sua toxicidade contra cepas de bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumonia*, *Erwinia carotovora* e *Agrobacterium tumefaciens*), cepas bacterianas gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus atrophaeus* e *Staphylococcus aureus*) e uma cepa de fungo (*Candida albicans*) em comparação com antibióticos convencionais. Os resultados revelaram que o extrato etanólico do basidioma de *P. ostreatus*, apresentou atividade antimicrobiana contra todos os micro-organismos testados, exceto *E. coli*. *Pleurotus ostreatus* preto apresentou uma zona de inibição

máxima (13 mm) contra *Candida albicans* e *A. tumifaciens*. *Pleurotus sajor-caju* apresentou melhor atividade (12,5 mm) contra *B. subtilis*, *B. atrophaeus* e *K. pneumonia*. *Pleurotus ostreatus* (amarelo) mostrou melhor atividade contra *P. aeruginosa* (21,83 mm), *B. atrophaeus* (20 mm) e *C. albicans* (21 mm). *P. ostreatus* (preto) exibiu melhor atividade contra *C. albicans* (16 mm) e atividade ligeiramente inferior contra todos os outros micro-organismos exceto *S. typhi*.

Um estudo realizado por Cilerdzic et al. (2015) avaliou os potenciais antioxidante e antifúngico de extratos etanólicos do basidiocarpo e micélio cultivado em meio enriquecido com farelo de trigo de *Pleurotus ostreatus* e *Agrocybe cylindracea*. Os resultados demonstraram que apenas o extrato do basidiocarpo de *A. cylindracea*, em uma concentração de 1,33 mg mL⁻¹, inibiu o crescimento de *Microsporium gypseum* e *Aspergillus flavus*. A mesma substância na concentração de 1,67 mg mL⁻¹ apresentou efeito inibitório no crescimento do fungo *M. gypseum*.

Smolskaite et al. (2015) pesquisaram oito cogumelos selvagens como possível fonte dietética de antioxidantes naturais e agentes antimicrobianos. Foram utilizados os extratos isolados sequencialmente por ciclo-hexano, diclorometano, metanol e água dos seguintes cogumelos: *Phaeolus schweinitzii*, *Inonotus hispidus*, *Tricholoma columbetta*, *Tricholoma caligatum*, *Xerocomus chrysenteron*, *Hydnellum ferrugineum*, *Agaricus bisporus* e *Pleurotus ostreatus*. Os extratos foram preparados em várias concentrações (0,01; 0,1 ; 1 ; 10 e 20 mg mL⁻¹). Dez mililitros de cada concentração foram transferidos para o disco. Os discos, então, foram transferidos para as placas de Petri contendo as culturas da levedura *Candida albicans* e das bactérias *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*. As placas contendo as bactérias foram incubadas durante 24h, a 37°C. Verificou-se a zona de inibição em mm de cada placa. Nenhum dos extratos testados foi ativo na concentração de 0,01 mg mL⁻¹. Comparando-se os solventes, os extratos metanólicos foram, na maioria dos casos, os mais potentes agentes antimicrobianos, enquanto que as frações aquosas apresentaram a mais fraca atividade inibidora para todos os fungos. Todos os extratos de *P. schweinitzii* e *I. Hispidus* inibiram os micro-organismos testados. A fração metanólica de *T. columbetta* mostrou um forte efeito contra *C. albicans* (17 ± 2,0 mm), assim como as frações metanólicas de *T. caligatum*, *X. chrysenteron*, *A. bisporus* e *P. ostreatus* (14 a 15 mm). *H. ferrugineum* e *A. bisporus* também mostraram atividade antimicrobiana contra a bactéria *P. aeruginosa* (15 mm).

Chowdhury et al. (2015) revelaram a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos metanólicos de *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* e *Hypsizigus tessulatus*. Todos os cogumelos apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*. A determinação da atividade antimicrobiana indicou uma zona de inibição que variou de 7 a 20 mm contra todas as bactérias e fungos. Valores de inibição mínima dos extratos mostraram que eles também são ativos mesmo em concentrações menores, variando de 1 mg mL⁻¹ a 9 mg mL⁻¹. *Lentinula edodes* apresentou a melhor atividade antimicrobiana (17 ± 0,2 mm) contra *Bacillus subtilis*, seguido de *Pleurotus ostreatus* (14 ± 0,2 mm) e *Hypsizigus tessulatus* (16 ± 0,2 mm). *Lentinula edodes* também mostrou melhor atividade antimicrobiana (20 ± 0,1 mm) em comparação ao *Pleurotus ostreatus* (15 ± 0,2 mm) e *Hypsizigus tessulatus* (18 ± 0,2 mm), contra *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2 Microbiota intestinal

A microbiota intestinal refere-se a um conjunto de bactérias que habitam normalmente no intestino do homem. Começa a se formar ainda no canal de parto, adquirindo suas características principais em torno dos 2 anos de idade, quando encontramos a maior parte de bifidobactérias (LACERDA e PACHECO, 2006).

Cada indivíduo possui uma microbiota única, pois esta é desenvolvida a todo instante e é decorrente da dieta, de doenças, do contato com o ambiente e da interação destes com fatores genéticos (HOLZAPFEL, 1998).

A microbiota intestinal pode ser dividida em três grupos. O primeiro grupo é constituído pelas bactérias probióticas definidas pela FAO (FAO/WHO, 2002) como “micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem saúde ao hospedeiro”. Neste grupo encontram-se os lactobacilos, estreptococos lácticos e as bifidobactérias que colaboram para o bem-estar do homem por meio de mecanismos tais como aumento da resistência à colonização de patógenos, ativação do sistema imunológico, produção de vitaminas, inativação de substâncias cancerígenas e transformação de colesterol ao nível da mucosa intestinal. O segundo grupo é composto pelas enterobactérias e enterococos que geralmente ocasionam infecções intra ou extra-intestinais em indivíduos

imunocomprometidos. O terceiro grupo é composto pelas bactérias nocivas, representadas pelos clostrídeos e bactérias sulforredutoras que produzem toxinas e ácido sulfídrico, respectivamente (TRABULSI e CARNEIRO-SAMPAIO, 2000).

As bactérias probióticas beneficiam o trato gastrointestinal (esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso ou cólon) e propiciam o equilíbrio da microbiota à luz destes órgãos e, por isto, tornaram-se emergentes, com aplicações tanto na agroindústria quanto no uso profilático em humanos, com diferentes finalidades: prevenção de diarreias causadas por bactérias e vírus patogênicos; ação contra infecções e complicações provenientes da colonização de *Helicobacter pylori*, causador da gastrite tipo B, úlceras pépticas e câncer gástrico; prevenção de doenças inflamatórias e síndromes do intestino; prevenção de câncer de cólon; ativação do sistema imunológico; prevenção de doenças alérgicas; prevenção e terapia de doenças cardiovasculares, diminuição do colesterol e triglicérides e redução de doenças do trato urogenital (FAO/WHO, 2001; REID, 2001; HONG et al., 2004; FRAGA et al., 2005).

O reconhecimento da importância da microbiota intestinal para a saúde do indivíduo tem levado à elaboração de estratégias para manipular as populações bacterianas (BRANDT et al., 2006), sendo que o interesse por probióticos (bactérias benéficas) aumenta a partir da possibilidade de se modular benéficamente a microbiota intestinal, no sentido de diminuir bactérias associadas a doenças colônicas (BEDANI e ROSSI, 2009).

A microbiota intestinal desempenha um papel importante na manutenção da saúde humana, impedindo a colonização por micro-organismos patogênicos, produzindo nutrientes e mantendo a mucosa intestinal em um estado íntegro. Outras funções importantes começaram a ser reveladas nos últimos anos, sugerindo que os efeitos da microbiota do intestino podem ser mais profundos, influenciando processos complexos, tais como, o metabolismo de glicose e lipídios, predisposição a obesidade e doenças mediadas pelo sistema imunológico, incluindo a doença inflamatória intestinal, doenças autoimunes e reações alérgicas (KELLY et al., 2007; HOLMES et al., 2008).

Grupos microbianos específicos como *Lactobacillus* spp produzem vitaminas e podem, assim, contribuir para fornecer vitaminas para o hospedeiro humano. Além da vitamina K (WEBER e POLANCO, 2012), vitamina B12 (SANTOS et al., 2008), vitamina B1 (tiamina), B2 (riboflavina) e B6 (piridoxina) (FABIAN et al., 2008), outras

vitaminas, como vitamina B7 (biotina), vitamina B9 (ácido fólico) e vitamina B3 (ácido nicotínico) podem ser liberadas afetando positivamente a saúde do hospedeiro e fornecendo possíveis efeitos probióticos (VANDENPLAS et al., 2015).

Quando a microbiota normal é alterada, as condições de competição entre as bactérias desaparecem e modifica-se o ambiente, propiciando a proliferação de micro-organismos transitórios e outros patogênicos sobreviventes, os quais proliferam e podem provocar quadros patológicos diversos (SANTOS e VARAVALLO, 2011). Situações como alimentação inadequada, stress, envelhecimento, uso excessivo de alguns medicamentos, levam a uma predisposição para a disbiose intestinal. A alteração do ritmo intestinal, falta de concentração, eructações, acne, cansaço, flatulência e depressão sugerem o desequilíbrio da microbiota intestinal (BOTTARI, 2012).

A microbiota possui quantidades e espécie de bactérias diferentes em cada porção do trato gastrointestinal. Inicia-se com um menor número de bactérias no intestino delgado proximal, de 10^4 unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹), finalizando com um maior número no cólon, de 10^{11} UFC mL⁻¹, superando em quantidade o total de células do corpo humano (BRANDT et. al., 2006).

Encontramos em média 100 trilhões de bactérias no corpo humano, todas em constante processo de multiplicação e excreção no intestino, desempenhando funções de extrema importância para o organismo. No intestino grosso, existem cerca de 500 espécies de bactérias com predomínio de bactérias anaeróbicas na proporção 1000 anaeróbicas para 1 aeróbica (BRINGEL, 2005). O Quadro 2 apresenta os principais gêneros bacterianos presentes no sistema digestório humano.

Quadro 2 - Concentração e gêneros bacterianos presentes no sistema digestório humano

Estômago e duodeno	Jejuno e íleo	Cólon
10^1 a 10^3 UFC ml ⁻¹	10^4 a 10^8 UFC ml ⁻¹	10^{10} a 10^{12} UFC ml ⁻¹
Lactobacilos Estreptococos Leveduras	Lactobacilos Enterobactérias Estreptococos Bacterióides Bifidobactérias Fusobactérias	Bacterióides Bifidobactérias Estreptococos Fusobactérias Enterobactérias Clostrídios Veilonella Lactobacilos Proteus Estafilococos Pseudomonas Leveduras Protozoa

Fonte: Modificado de Holzapfel et al. (1998).

A microbiota de um indivíduo adulto sem problemas de saúde é composta predominantemente de micro-organismos probióticos, pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e, em menor número, as bactérias *Streptococcus thermophilus* e *Enterococcus faecium* (COLLINS, THORNTON e SULLIVAN, 1998; LEE et al., 1999; SANDERS e KLAENHAMMER, 2001).

Dentre a microbiota do intestino do camundongo estão as bactérias anaeróbias facultativas *Lactobacillus* spp, *Enterobacillus* spp e *Enterococcus* spp, além dos anaeróbios *Bacteróides* spp e *Clostridium* spp (SCHAEDLER et al., 1965; DUBOS et al., 1965).

3.2.1 Bifidobactérias

No ano de 1910, Metchnikoff foi o primeiro a disseminar a teoria de que o consumo regular de leites fermentados oferecia benefícios à saúde. Um pouco antes, no ano de 1899, Tissier isolou bifidobactérias a partir das fezes de um recém-

nascido e verificou que estas bactérias eram o componente predominante da microbiota intestinal de humanos (LOURENS-HATTINGH e VILJOEN, 2001).

Existem várias espécies de Bifidobactéria com função probiótica. Entre elas podemos citar *B. essencis*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. bifidus* e *B. lactis* (classificado como *Bifidobacterium animalis* subspécie *lactis*) (KALANTZOPOULOS, 1997; ANAL e SINGH, 2007; SHAH, 2007).

As bifidobactérias são micro-organismos gram-positivos, anaeróbios estritos, que habitam naturalmente o trato gastrintestinal dos humanos, compondo 25% do total da microbiota intestinal do adulto e 95% do recém-nascido. Não possuem motilidade, não formam esporos e apresentam-se em formas bifurcadas (forma de Y ou V) embora, em condições desfavoráveis, possam também apresentar outras formas (SOLANO-AGUILAR et al., 2008).

São micro-organismos sacarolíticos e conseguem fermentar glicose, galactose e frutose, gerando a produção de ácido acético e ácido láctico e, em concentrações menores, o ácido succínico e CO₂ (LEAHY et al., 2005; ANAL e SINGH, 2007).

O gênero *Bifidobacterium* é conhecido por promover efeitos benéficos à saúde do hospedeiro ao participar da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no intestino, reduzir o pH, desempenhar ação bactericida, diminuir a produção de amônia pela fermentação de proteínas, produzir vitaminas (GUARNER, 2005; VENTURA et al., 2009; PRETER, 2011) e modular a resposta imune, podendo auxiliar na melhora de doenças gastrointestinais (FEMIA et al., 2004; POOL-ZOBEL, 2005).

A eficácia de certos probióticos na diarreia baseia-se provavelmente na sua capacidade de proteger o hospedeiro contra as toxinas geradas pelas bactérias, resultando na inibição da expressão destas toxinas. *Bifidobacterium breve* Yakult e *Bifidobacterium pseudocatenulatum* DSM 20439 inibiram a toxina shiga em cepas de *E. coli* O157:H7 *in vitro* e *in vivo*. Neste estudo, todos os animais tratados com a cepa de *B. breve* Yakult sobreviveram após o desafio com *E. coli*, ao passo que 90% dos ratos no grupo de controle tiveram perda significativa de peso corporal e morreram após 16 dias. Em estudos *in vitro*, a elevada concentração de ácido acético produzido (56 mM) e a redução do pH (6,75) pela cepa *B. Breve* Yakult pode ser responsável pela inibição da expressão da toxina shiga (ASAHARA et al., 2004).

3.2.2 Lactobacilos

O gênero *Lactobacillus* é formado por micro-organismos gram-positivos, que não formam esporos e sobrevivem em microaerofilia, ou seja, em pouca quantidade de oxigênio. O pH ótimo de crescimento está na faixa de 5,5 a 6,0 e temperatura ótima entre 35 e 40°C, crescendo em temperaturas de até 45°C. Estes micro-organismos são tolerantes ao ácido clorídrico e a bile presente no trato gastrointestinal e são capazes de aderir às células do epitélio intestinal (GOMES e MALCATA, 1999).

Dentre as bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, destacam-se *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei* - subsp. *paracasei* e subsp. *tolerans*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. Salivarius*. As espécies *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri* e *L. rhamnosus* são os probióticos mais utilizados na produção de alimentos. (COLLINS, THORNTON e SULLIVAN, 1998; LEE et al., 1999; SANDERS e KLAENHAMMER, 2001).

Lactobacillus fazem parte da microbiota dominante do trato gastrointestinal de roedores, em especial *Lactobacillus murinus*, e de outros mamíferos. Exercem um papel importante na prevenção do crescimento exacerbado de bactérias patogênicas entéricas como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, *S. aureus* (NARDI et al., 2005; MATOS, 2007).

As primeiras bactérias a colonizar o trato gastrointestinal no primeiro ou segundo dia após o nascimento dos camundongos são os *Lactobacillus* e *Streptococcus* anaeróbios facultativos. Encontramos estas bactérias em todo o trato digestório, mas a principal localização é no estômago, formando uma camada no epitélio escamoso estratificado queratinizado (DAVIS et al., 1973).

Segundo Brandt et al. (2006), a maior parte da microbiota bacteriana intestinal é benéfica ao hospedeiro, exercendo funções digestiva, imunomoduladora e de inibição de patógenos. Em uma microbiota normal espera-se uma maior quantidade de lactobacilos (10 a 100x) do que de enterobactérias.

Alguns probióticos são capazes de proteger o organismo contra cianobactérias e toxinas fúngicas. A base do efeito protetor observado é a interação física entre toxina e probiótico de inativação metabólica. A micotoxina desoxinivalenol pode estar presente em cereais quando não houver um controle no seu armazenamento e esta poderá causar gastroenterite. *Lactobacillus rhamnosus*

GG vivo ou morto pode-se ligar ao desoxinivalenol e restringir a biodisponibilidade desta toxina (TURNER et al., 2008). A mesma cepa e o *L. rhamnosus* LC-705 são capazes de se ligar a outras micotoxinas, incluindo as aflatoxinas. Em ratos, *L. rhamnosus* GG foi capaz de modular a absorção intestinal e promover o aumento da excreção fecal de aflatoxina, resultando em toxicidade reduzida, expressa como lesão hepática diminuída (GRATZ et al., 2006). Dados obtidos também *in vitro* indicam que a cepa *Lactobacillus rhamnosus* GG reduz a absorção de aflatoxina B1 (GRATZ et al., 2007).

Muitos lactobacilos e algumas cepas de bifidobactérias mostraram uma atividade anti-mutagênica em estudos *in vitro*. A capacidade destes probióticos para metabolicamente inativar substâncias mutagênicas pode ser responsável por esta propriedade. Além disso, foi demonstrado que certos probióticos ligam compostos N-nitrosos e aminas aromáticas heterocíclicas, podendo levar à redução dos níveis de compostos cancerígenos e reduzir os danos do DNA (GEIER et al., 2006).

Forestier et al. (2001), utilizando linhagens de células intestinais Caco-2 em um modelo *in vitro*, demonstraram que a cepa probiótica de *Lactobacillus casei rhamnosus* Lcr35 exibiu propriedades de adesão às células epiteliais do intestino. Os autores verificaram ainda que as bactérias patogênicas *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Clostridium difficile* apresentaram multiplicação reduzida após 5 horas de incubação em meio Luria-Bertani ou ágar Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro contendo sobrenadante da cepa probiótica Lcr35 livre de células.

A aderência de microrganismos probióticos às células epiteliais do intestino e a subsequente colonização da mucosa são de fundamental importância para a ocorrência dos efeitos benéficos à saúde humana, adicionalmente, os probióticos do grupo *Lactobacillus casei* apresentam efeito protetor contra microrganismos patogênicos e estudos *in vitro* têm sido utilizados para avaliar tais efeitos, a atividade de diferentes cepas de *Lactobacillus* spp isoladas de fezes de recém-nascidos e de crianças com até dois anos de idade, sobre bactérias contaminantes de alimentos ou patógenos foi estudada por Arici et al. (2004). Os autores verificaram que 4 cepas de *Lactobacillus paracasei* (IF8, IF9, IF10 e IF11) exerceram efeito inibitório sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 28213 e 3 cepas (IF8, IF10 e IF11) inibiram a

multiplicação de *Staphylococcus aureus* ATCC 2392, em ensaios de difusão em ágar. A conclusão daquele estudo foi que tais cepas de *Lactobacillus paracasei* podem contribuir para a manutenção da microbiota intestinal normal daquelas crianças, por meio do controle da multiplicação de bactérias potencialmente patogênicas à saúde e, dessa forma, prevenir a ocorrência de doenças.

3.2.3 Enterobactérias

Após alguns dias do nascimento a microbiota intestinal é colonizada por coliformes e *Enterococcus*. As últimas bactérias correspondem às tolerantes e não tolerantes ao oxigênio (anaeróbias) que irão colonizar o trato digestivo durante a segunda semana após o nascimento. As aerotolerantes são, predominantemente, do gênero *Bacteroides* e as intolerantes são as formas fusiformes (bactérias de vários gêneros). Um ou mais tipos de bactérias fusiformes colonizam a mucina associada com o epitélio da mucosa do ceco e cólon de camundongos adultos (DAVIS et al., 1973).

O grupo de enterobactérias é representado principalmente por *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp e *Citrobacter* spp. São geralmente considerados patógenos oportunistas, ou seja, causam doença em hospedeiros com defesas comprometidas e tornaram-se uma séria causa de infecções nosocomiais (adquirida em meio hospitalar) (GALLAGHER, 1990; COLLINS et al., 1998; LEE et al., 1999).

Os bacilos gram-negativos que pertencem à família *Enterobacteriaceae*, cujo habitat natural é o cólon de humanos e animais, são os micro-organismos frequentemente isolados a partir de amostras clínicas, sendo responsáveis por qualquer tipo de doença infecciosa. Correspondem a, aproximadamente, 50% dos casos de sepse e a mais de 70% das infecções do trato urinário, além de responder por um percentual significativo das infecções intestinais. Atingem, principalmente, pacientes imunocomprometidos ou debilitados, altamente suscetíveis a infecções hospitalares, quer por colonização por cepas ambientais ou por procedimentos invasivos, como o cateterismo, broncoscopia ou biopsias cirúrgicas (KHAN et al., 2011; ALLGAYER et al., 2015).

Em estudo realizado por Minagawa (2007), com camundongos Swiss C57BL/6, BALB/c, C3H/HePas, C3H/HeJ, MDX e YCx43, objetivou-se analisar a

microbiota intestinal aeróbia bacteriana e fúngica e avaliar a resistência *in vitro* de cepas isoladas de *E. coli* aos antimicrobianos, identificando os micro-organismos presentes nos diferentes ambientes em que estes animais foram mantidos, verificando as diferenças entre eles. Verificou-se que as linhagens de camundongos estudadas apresentam microbiotas fecais diferentes. As cepas de *E. coli* foram diferentes em cada linhagem. Apresentaram resistência a múltiplos antibióticos e não se apresentaram como patogênicas. A *E.coli* pode ser encontrada no meio ambiente, como uma bactéria comensal no intestino de mamíferos (PICARD et al., 1999; CLARKE, 2001).

Os enterococos podem também ser encontrados em uma vasta gama de produtos probióticos. Neste grupo, *E. faecium* tem sido estudado por apresentar efeitos benéficos à saúde gastrintestinal, a despeito de o gênero *Enterococcus* ser um reconhecido causador de infecções no ser humano. Um grupo de pesquisadores iniciou estudos para a utilização de uma linhagem de *Escherichia coli* com características probióticas (KRUIS, 2004; SCHULTZ et al., 2004; UKENA, 2007; HENKER, 2007; SCHLEE, 2007).

3.2.4 Substâncias que afetam a microbiota intestinal – Probióticos

Os prebióticos são ingredientes nutricionais não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro e estimulam seletivamente o crescimento e atividade de uma ou mais bactérias benéficas do cólon, melhorando a saúde do seu hospedeiro (GIBSON e ROBERFROID, 1995).

Os prebióticos são nutrientes para as bactérias probióticas, estimulando o crescimento e ativando o metabolismo de bactérias benéficas do trato intestinal (SCHREZENMEIR e DE VRESE, 2001; BOUHNİK et al., 2006).

Os prebióticos incluem as fibras da dieta, tais como, a inulina e a oligofrutose, um produto da hidrólise (ácida ou enzimática) da inulina também designado de oligômeros de frutose, fruto-açúcar ou fruto-oligossacarídeos (FOS) (HAULY e MOSCATTO, 2002). Os seres humanos não conseguem digerir esses carboidratos de reserva das plantas, ou seja, os FOS não podem ser hidrolisados por enzimas do intestino delgado, de modo que passam para o intestino grosso e ali sofrem a fermentação (HAULY e MOSCATTO, 2002). Estes oligossacarídeos têm duas qualidades, resistência à ação das enzimas hidrolíticas e uma preferência por

bifidobactéria, ou seja, são bifidogênicos, por isso são considerados prebióticos. Alimentando as bactérias benéficas que habitam o intestino e provocando uma redução do pH, proporcionam também uma melhor absorção de minerais como cálcio e magnésio (CUMMINGS et al., 2001).

No cólon, os polissacarídeos não digeríveis no trato digestório anterior sofrem fermentação por micro-organismos deste local, gerando ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). O butirato, acetato e propionato são alguns dos AGCC produzidos. Estudos mostram que praticamente 70% da energia adquirida pelos colonócitos são provenientes da oxidação do butirato (CUMMINGS, 1997).

Os prebióticos estimulam o crescimento de alguns grupos de população microbiana, tais como as bifidobactérias e os lactobacilos, sendo considerados benéficos para a saúde humana (BLAUT, 2002). Os prebióticos mais eficientes reduzem a atividade de organismos potencialmente patogênicos (ROBERFROID, 2002). Atribui-se a essas moléculas a modulação do metabolismo lipídico e da composição da microbiota intestinal, a qual exerce um papel fundamental na fisiologia intestinal e a redução do risco de câncer de cólon (ROBERFROID, 2002). A alteração da microbiota intestinal causada pelo uso de prebióticos pode ocorrer por meio do fornecimento de nutrientes para as bactérias desejáveis ou por meio do reconhecimento, pelas bactérias patogênicas, de sítios de ligações nos oligossacarídeos como sendo da mucosa intestinal, reduzindo a colonização intestinal indesejável, resultando em menor incidência de infecções e melhor integridade da mucosa intestinal (IJI e TIVEY, 1998).

Uma classe de prebióticos que estão se tornando cada vez mais reconhecidos como ingredientes funcionais em produtos alimentares e bebidas são as β -glucanas, componentes da parede celular das plantas e fungos e abundantes no endosperma dos cereais, como cevada e aveia (ANGELOV et al., 2006; NAUMANN et al., 2006).

Estudos mostraram que a suplementação da dieta de ratos com β - glucana proveniente de aveia aumentou o número de lactobacilos e bifidobactérias na microbiota do ceco, sendo considerada um alimento prebiótico. Os produtos derivados de alimentos que estimulam a população de *Lactobacillus* autóctones no cólon humano são de grande interesse biotecnológico e médico (SNART et al., 2006).

3.2.5 Efeito prebiótico de fungos

Na busca de novas fontes de prebióticos, os cogumelos parecem ser um potencial candidato, pois contém carboidratos como quitina, hemicelulose, β e α -glucanas, mananas, xilanas e galactanas (AIDA et al., 2009).

Pesquisas têm indicado que polissacarídeos obtidos de cogumelos como *Pleurotus* sp. (SYNYTSYA et al., 2009), *Lentinus edodes*, *Tremella fuciformis* (GUO et al., 2004), e *Agaricus bisporus* (GIANNENAS et al., 2011) possuem atividade prebiótica. O componente ativo é a longa cadeia de β -glucanas, incluindo homo e heteroglucanas com ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 3), β (1 \rightarrow 4) e/ou β (1 \rightarrow 6) (MANZI e PIZZOFERRATO, 2000).

SYNYTSYA et al. (2009) avaliaram a atividade prebiótica dos extratos alcalino e solúvel em água de *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus eryngii*. O crescimento dos micro-organismos *Lactobacillus* ssp, *Bifidobacterium* ssp e *Enterococcus faecium* foi comparado em meio de cultivo na ausência e na presença dos extratos. A taxa de crescimento máxima, a concentração máxima de biomassa e a produção final de ácido (medida como a diminuição do pH), foram observados em quatro cultivos independentes. O extrato de corpos frutíferos de *P. ostreatus* e *P. eryngii* foram capazes de estimular o crescimento de *Lactobacillus* ssp, *Bifidobacterium* ssp e *Enterococcus faecium*, confirmando a atividade prebiótica.

β -glucanas derivadas da cevada, algas e esclerócios de cogumelos foram incubadas com culturas puras de *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium adolescentis* por 24h, para avaliar seu efeito bifidogênico. A inulina foi utilizada como controle positivo. Todas as β -glucanas propiciaram o crescimento das três bifidobactérias, com um crescimento relativamente maior nas cepas de *B. Infantis* (ZHAO e CHEUNG, 2011).

Polissacarídeos de *Ganoderma lucidum* (incluindo β -D-glucanos, heteropolissacarídeos e glicoproteínas foram usados como fontes de carbono em cultivo contendo *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4, *B. longum* BB536 e *B. braquía* ATCC 15700 por 24h a 37 °C. A glicose foi utilizada como controle. A mistura de polissacarídeos promoveu o crescimento de probióticos do gênero *Bifidobacterium* (aumento de 0,3 a 0,7 log¹⁰ de células mL⁻¹) e *Lactobacillus* (acrécimo de 0,7 a 1 log¹⁰ células mL⁻¹) em relação ao controle (YAMIN et al.,2012).

β -glucana de algas (*laminarina*), de cevada e de esclerócios de *Pleurotus tuber-regium* foram cultivadas através do método em batelada juntamente com cepas de *Bifidobacterium infantis* (JCM 1222) por 24h. Enzimas e transportadores que participaram foram elucidados e também açúcares, enolase e proteínas do sistema fosfotransferase. Propôs-se um modelo para o catabolismo de β -glucanas em *B. Infantis* (ZHAO e CHEUNG, 2013).

Polissacarídeos de cogumelos *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii* e *Flammulina velutipes* com concentrações diferentes, incubados com bactérias probióticas e verificação do crescimento após armazenagem frigorífica de 28 dias. Baixa concentração (0,1 – 0,5%) de polissacarídeos aumentaram a taxa de sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* durante armazenamento a frio (CHOU et al., 2013).

Schott et al. (2013) constataram que os polissacarídeos extraídos de *Agaricus blazei* estimularam em 772% o crescimento de *Lactobacillus* spp, quando usado em uma concentração de 30 mg kg⁻¹. Os polissacarídeos de *Pleurotus ostreatus* estimularam em 378% o crescimento de *Bifidobacterium* spp quando usados em uma concentração de 10 mg kg⁻¹. O crescimento de *Lactobacillus* também foi estimulado em 628% quando esta substância foi utilizada na dose de 30 mg kg⁻¹. Os resultados sugeriram um potencial prebiótico dos polissacarídeos de ambos os fungos.

Diante das informações coletadas na realização desta revisão bibliográfica, foi possível constatar que os fungos do gênero *Pleurotus* têm se destacado por seu potencial antimicrobiano e, mais recentemente, como nutrientes para bactérias probióticas, agindo como um prebiótico. Desta forma, com o intuito de elucidar o efeito das frações extrativas do caldo do cultivo e do micélio de *P. sajor-caju* sobre a microbiota intestinal de camundongos, são apresentados nos capítulos seguintes os métodos utilizados, os resultados e as conclusões obtidas.

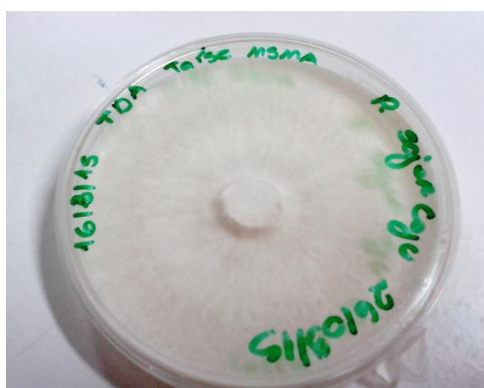
4 METODOLOGIA

4.1 Produção de polissacarídeos por *Pleurotus sajor-caju*

4.1.1 Micro-organismo e manutenção

Utilizou-se a linhagem *Pleurotus sajor-caju*, cedida da Coleção de Culturas de Basidiomicetos do Instituto de Botânica de São Paulo, sob o código de CCB 019 (Figura 4). A cultura foi mantida em meio sólido TDA (trigo, dextrose e ágar), composto por 1,0 L de extrato de trigo, 20 g de dextrose e 15 g de ágar, conforme proposto por Furlan et al. (1997), sob refrigeração (4°C) e os repiques foram feitos a cada três meses.

Figura 4 - Placa de Petri contendo *Pleurotus sajor-caju* em meio TDA



Fonte: Primária

4.1.2 Preparo do pré-cultivo (inóculo)

Os cultivos de *P. sajor-caju* para a obtenção da biomassa micelial e do caldo de cultivo foram realizados no laboratório de Biotecnologia II da Univille.

O inóculo foi preparado em frascos de Duran de 2,0 L com duas saídas laterais e composto por 400 mL de meio de cultivo para a produção de polissacarídeos extracelulares (POL) conforme adaptado do proposto por Cavazzoni e Adami (1992), em g L⁻¹: 5 de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), 0,2 de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄·7H₂O), 1,0 de fosfato dibásico de potássio (K₂HPO₄), 2,0 de extrato de levedura, 1,0 de peptona de soja e 1,0 L de água destilada. A concentração inicial de glicose foi de 20 g L⁻¹.

O meio foi esterilizado a 121°C por 20 minutos e inoculado com todo o micélio contido em uma placa de Petri, com 7 dias de cultivo. Após a inoculação, realizada em condições assépticas, os frascos Duran foram incubados a 30°C e mantidos em agitador B.BRAUN, modelo CERTOMAT U, com agitação recíproca de 120 min⁻¹, por seis dias (FURLAN et al., 2008).

A fração de inóculo utilizada para dar início ao cultivo em biorreator foi de 10%, ou seja, 400 mL para um volume total de trabalho de 4 L (WISBECK, 2003).

4.1.3 Cultivo de *P. sajor caju* em biorreator

Os cultivos foram realizados em biorreator de mistura completa B. BRAUN (modelo BIOSTAT B) (Figura 5) com dorna de vidro de capacidade útil de 5L e volume de trabalho de 4L. O meio utilizado foi o POL (CAVAZZONI e ADAMI, 1992), modificado por Bonatti-Chaves (2011), contendo (em gL⁻¹): 5 de (NH₄)₂SO₄; 0,2 de MgSO₄ 7H₂O; 1,0 de K₂HPO₄; 1,0 de peptona de soja; 1,0 de CaCO₃; 2,0 de extrato de levedura e 40 de glicose. O processo foi conduzido na forma de batelada. O pH foi controlado em 4,0 pela adição automática de soluções de NaOH 6M e H₃PO₄ 12N. A temperatura foi controlada em 30°C. O k_La (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio) inicial de 15 h⁻¹ foi mantido por uma vazão de ar de 0,25 L min⁻¹ e uma frequência de agitação de 300 min⁻¹ (WISBECK et al., 2005).

Figura 5 - Cultivo de *Pleurotus sajor-caju* em biorreator de mistura completa modelo Biostat B em processo descontínuo simples.



Fonte: Primária

4.1.4 Obtenção das substâncias bioativas de *P. sajor-caju*

O caldo de cultivo e a biomassa micelial obtidos após 7 dias de cultivo submerso, foram separados por filtração à vácuo, utilizando papel Whatmann nº1 (Figura 6).

Figura 6 - Filtração à vácuo para separação da biomassa e caldo de cultivo obtidos.



Fonte: Primária

4.1.4.1 Obtenção da fração extrativa do caldo de cultivo (S1)

Para a obtenção da fração extrativa do caldo de cultivo (Figura 7), o caldo de cultivo foi adicionado de etanol (96%) resfriado a 8°C, na proporção etanol:amostra 4:1 (v/v) (MAZIERO, 1996). Após 24h sob refrigeração (4°C) para a precipitação dos polissacarídeos, o gel formado contendo polissacarídeos insolúveis foi removido com auxílio de uma espátula e desprezado, a solução foi centrifugada a 2822 g (6000 rpm) por 15 minutos e lavada duas vezes com solução de etanol:água destilada, na proporção 1:1 (v/v). O precipitado foi nomeado S1, liofilizado e mantido em frasco vedado, em temperatura ambiente até sua utilização.

Figura 7 - Fração extrativa do caldo de cultivo (S1).

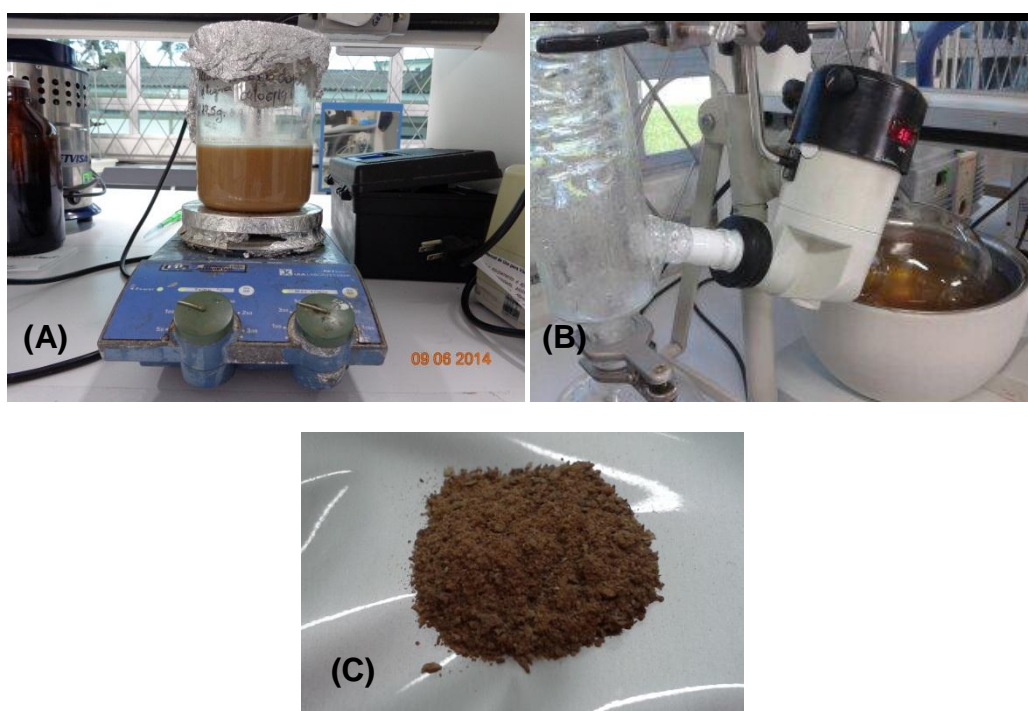


Fonte: Primária

4.1.4.2 Obtenção da fração extrativa do micélio (S2)

A fração extrativa do micélio foi obtida de acordo com a metodologia de Pokhrel e Ohga (2007) modificada. A biomassa micelial liofilizada foi adicionada de água deionizada na proporção de, aproximadamente, 1:13 (m/m), a fim de manter a biomassa recoberta com água, e aquecida a 100°C por 24 horas, sob agitação (100 rpm), por 4 vezes (Figura 8-A). Após este tempo, a mistura foi centrifugada a 2822 g (6000 rpm) por 15 minutos e o sobrenadante foi concentrado em rotavapor (Figura 8-B). O extrato concentrado foi adicionado de etanol na proporção 1:4 (extrato/etanol, v/v), mantida sob refrigeração (4°C) por 24h e centrifugada. O precipitado obtido (Figura 8-C) foi nomeado S2, liofilizado e mantido em frasco vedado até sua utilização.

Figura 8 – (A) Mistura de biomassa micelial e água em agitador magnético com aquecimento a 100°C, (B) Sobrenadante sendo concentrado em rotavapor, (C) Fração extrativa do micélio (S2).



Fonte: Primária

4.1.4.3 Método de remoção de proteínas das frações extrativas obtidas do micélio (S1) e do caldo do cultivo (S2) para obtenção das frações S3 e S4 respectivamente

A metodologia de precipitação de proteínas foi utilizada com a finalidade de purificar as frações extrativas obtidas nas etapas descritas nos itens 4.1.4.1 e 4.1.4.2.

A remoção de proteínas foi executada por meio de um tratamento alcalino que emprega soluções diluídas de hidróxido de sódio. Um grama da fração extrativa do micélio ou do caldo do cultivo foi adicionado a um reator de vidro contendo 10 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 4,4 M, a $65 \pm 2^\circ\text{C}$, sob agitação mecânica constante (350 rpm), durante 3 h. Ao fim da reação, o sólido suspenso foi lavado com água destilada até a neutralidade do sobrenadante, transferido para placas de Petri e seco em estufa com circulação e renovação de ar por 12 h, a 30°C (CARDOSO, 2008). O sólido resultante da desproteínização da fração extrativa do micélio foi nomeado S3 e o sólido resultante da desproteínização da fração extrativa do caldo de cultivo foi nomeado S4.

4.2 Avaliação do efeito das diferentes frações extrativas obtidas (S1, S2, S3 e S4) sobre a microbiota intestinal de camundongos

4.2.1 Delineamento dos grupos, substâncias e doses

A distribuição dos animais por grupos e os respectivos tratamentos estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3- Distribuição dos animais de acordo com as concentrações e as substâncias avaliadas

Substância	Grupos	Dose	Número de animais
Controle (Carboximetilcelulose 0,5%)	C	0,1 mL/10 g	4 + 4
Fração extrativa do caldo de cultivo – S1	S1 A	10 mg kg ⁻¹	4
	S1 B	30 mg kg ⁻¹	4
	S1 C	60 mg kg ⁻¹	4
Fração extrativa do micélio – S2	S2 A	10 mg kg ⁻¹	4
	S2 B	30 mg kg ⁻¹	4
	S2 C	60 mg kg ⁻¹	4
Fração extrativa do micélio desproteïnizada – S3	S3 A	10 mg kg ⁻¹	4
	S3 B	30 mg kg ⁻¹	4
	S3 C	60 mg kg ⁻¹	4
Fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada – S4	S4 A	10 mg kg ⁻¹	4
	S4 B	30 mg kg ⁻¹	4
	S4 C	60 mg kg ⁻¹	4
Fração extrativa selecionada	S	300 mg kg ⁻¹	6

4.2.2 Animais e dieta

Todos os experimentos realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIVILLE, conforme o ofício número 397/2012 – PRPPG/CEP emitido em 28 de agosto de 2012.

Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos (*Mus musculus*), com peso de 20 ± 5 g, obtidos do Biotério da UNIVALI (Universidade do Vale do Itajaí). Os animais foram mantidos no Biotério Central da UNIVILLE, durante todo o período de desenvolvimento do experimento, em caixas com cama de serragem, em grupos de quatro animais, à temperatura de $22^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Depois de uma semana de aclimação, os camundongos foram pesados e aleatoriamente divididos em 6 grupos de 4 camundongos por caixa sendo este o T0 (início do período experimental) para estes experimentos, conforme modelo proposto por Bedani et al. (2008). Todos os grupos foram alimentados normalmente com ração comercial para camundongos Nuvilab CR1 com a seguinte composição: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, vit. A, D3, E, K3, B1, B2, B6, B12, ácido fólico, biotina, sulfato de cobre, niacina, pantotenato de cálcio, cloreto de colina, sulfato de ferro, monóxido de manganês, óxido de zinco, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina, BHT (hidroxitolueno butilado) e água à vontade.

Os camundongos receberam a dieta por 28 dias. Os dois grupos controle de 4 animais cada foram tratados com uma dieta composta de Carboximetilcelulose (CMC) à 0,5% na dose de 0,1 mL/10 g por 28 dias. Os demais grupos, sempre de 4 animais, foram tratados com soluções das substâncias (S1, S2, S3 e S4) nas dosagens de 10, 30 e 60 mg kg⁻¹ para cada grupo. A substância que promoveu o maior estímulo no crescimento de bifidobactérias e lactobacilos, denominada S, foi avaliada na dose de 300 mg kg⁻¹, conforme dose proposta por De Lima (2008), em um grupo de 6 animais, de forma a observar uma ampla faixa de variação da alteração das bactérias em função de diferentes doses, analisando a dose dependência e/ou possível efeito tóxico da substância.

Todas as substâncias foram administradas por gavagem. No quinquagésimo sexto dia os camundongos foram eutanaziados por decapitação utilizando-se guilhotina apropriada à espécie.

4.2.3 Massa corporal dos animais

A massa corporal dos animais foi monitorada no 1^o (T0), 14^o (T14), 28^o (T28) e 56^o (T56) dia do experimento. Para a pesagem utilizou-se uma balança semi

analítica (Mettler Toledo PS7). Foram anotados os valores da massa de cada animal para análise e tratamento estatístico posterior.

A variação da massa corporal foi calculada diminuindo o valor da massa corporal encontrado para os camundongos alimentados com as diferentes doses das diferentes frações extrativas, da massa dos animais do grupo controle.

4.2.4 Preparação das amostras do conteúdo fecal

No primeiro (T0), décimo quarto (T14), vigésimo oitavo (T28) e quinquagésimo sexto (T56) dias da dieta, foram coletadas amostras de fezes (0,05g) de cada camundongo. O conteúdo fecal (0,05g) foi imediatamente adicionado a 5 mL de uma solução salina com cloreto de sódio a 85%, cisteína a 5% e água deionizada, a partir da qual foram feitas diluições de 1:10 (D1), 1:100 (D2), 1:1.000 (D3) e 1:10.000 (D4).

4.2.5 Análise bacteriológica do conteúdo fecal

O efeito das frações extrativas obtidas do caldo de cultivo e micélio sobre a microbiota intestinal dos camundongos foi avaliado por meio da detecção da proliferação das seguintes bactérias: *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp e *Enterobacteriaceae*. Para a detecção das bifidobactérias do conteúdo fecal foi utilizado o meio de cultivo LP-MRS contendo Agar MRS MERCK® com a seguinte composição em g L⁻¹: peptona de caseína (10,0), extrato de carne (10,0), extrato de levedura (4,0), glicose (20,0), di-potássio hidrogenofosfato (2,0), tween 80 (1,0), di-amônio hidrogenocitrato (2,0), sódio acetato (5,0), sulfato de magnésio (0,2), sulfato de manganês (0,04), ágar ágar (14,0), adicionado de água deionizada, cloreto de lítio (2,0) e propionato de sódio (3,0). Para a contagem de lactobacilos foi utilizado o meio de cultivo Lactobacillus Selection Agar (LBS) BD® contendo, em g L⁻¹: caseína pancreática (10,0), hidrato de acetato de sódio (25,0), extrato de levedura (5,0), fosfato monopotássico (6,0), sulfato de magnésio (0,575), citrato de amônio (2,0), sulfato de manganês (0,12), glicose (20,0), sulfato ferroso (0,034), polissorbató 80 (1,0) e agar (15,0), adicionado de ácido acético glacial (1,31) e água destilada. Para a contagem de enterobactérias (família *Enterobacteriaceae*) foi utilizado o meio de cultivo EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar) HIMEDIA® contendo em g L⁻¹: agar (15,0), digerido péptico de tecido animal (10,0), fosfato dipotássico (2,0), lactose

(10,0), eosina Y (0,40), azul de metileno (0,065) e adicionado de água deionizada. O crescimento dos micro-organismos foi detectado pelo método da contagem em placas. Este método consiste em fazer uma diluição seriada e plaquear uma alíquota de cada diluição pelo método de espalhamento em placa. 50 µL de cada diluição foram espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski em placas de Petri contendo os respectivos meios de cultivo. Todo o procedimento foi realizado em condições assépticas. As placas inoculadas contendo meio de cultura para lactobacilos foram incubadas a 37°C por 48 horas em microaerofilia (Microaerobac, marca Probac[®]), em aerobiose para as enterobactérias e em anaerobiose (Anaerobac, marca Probac[®]) por 72h para bifidobactérias. Após o tempo de incubação, as colônias bacterianas em cada placa foram contadas com auxílio de um contador de colônias modelo CP600, marca PHOENIX[®] e o resultado referido como unidades formadoras de colônias por grama de amostra de fezes (UFC g⁻¹) conforme metodologia adaptada de Li et al. (2008). Foram consideradas apenas as contagens que variaram de 30 a 300 colônias (CLARK, 1965; SCHORTEMAYER et al., 1996). Cada diluição foi realizada em duplicata e os resultados viáveis (entre 30 e 300 colônias) foram multiplicados pelo respectivo fator de diluição e contabilizados para compor a média de cada replicata animal. Ao final, a média de cada replicata foi avaliada quanto aos valores desviantes da média.

O percentual de inibição ou ativação do crescimento celular dos micro-organismos do conteúdo fecal foi calculado de acordo com a equação abaixo.

$$\% \text{Ativação/ Inibição} = (\text{UFC g}^{-1} \text{ Grupo Substância} * 100 / \text{UFC g}^{-1} \text{ Controle}) - 100$$

4.2.6 Cálculo de unidades formadoras de colônia por grama de fezes (UFC g⁻¹)

Considerando a adição de 0,05 g (50 mg) de fezes em 5 mL de solução, calculou-se a massa de fezes contida nos 0,05 mL (50 µL) que foram espalhados nas placas:

0,05 g - em 5 ml

X - em 0,05 mL

$X = 5 \times 10^{-4}$ g de fezes em 50 µL

O número de colônias contadas é aquele contido em 5×10^{-4} g de fezes que foram inoculados nas placas. Para o cálculo do n° de colônias contido em 1 grama temos:

n° colônias contadas - 5×10^{-4} g

X - 1 g

X = n° colônias contadas x 2000

Considerando a diluição utilizada, a fórmula para o cálculo do n° de UFC por grama de fezes é:

$X \text{ (UFC g}^{-1}\text{)} = \text{n}^\circ \text{ colônias contadas} \times 2000 \times D^*$

4.2.7 Identificação de bactérias isoladas no meio EMB

Dezoito colônias aparentemente diferentes, isoladas no meio EMB do experimento S4C no 56º dia, foram selecionadas para identificação. Esfregaços foram corados pelo método de Gram e as colônias foram reisoladas em Agar MacConkey contendo a seguinte composição em g L⁻¹: Digestão Péptica de Tecido Animal, 1,50; Caseína Enzimática Hidrolisada, 1,50; Digestão Pancreática de Gelatina, 17,00; Lactose, 10,00; Sais biliares, 1,50; Cloreto de sódio, 5,00; Violeta Cristal, 0,001; Vermelho neutro, 0,03; Agar, 15,00 com pH final de $7,1 \pm 0,2$. As colônias resultantes foram submetidas às seguintes provas bioquímicas: TSI (tríplice sugar and iron), citrato, indol, motilidade, urease e lisina (marca Newprov) (KONEMAN et al., 2001; MURRAY et al., 2007). Os tubos contendo os diferentes substratos foram semeados segundo as instruções do fabricante e avaliados de acordo com o descrito no Quadro 4.

Quadro 4 - Provas bioquímicas para identificação das bactérias isoladas no meio EMB.

Prova Bioquímica	Resultado	
	Positivo	Negativo
Prova da Desaminação do L-Triptofano (TRI)	Desenvolvimento de uma cor verde garrafa no ápice do tubo	Mantém-se a cor original do meio (verde azulado) no ápice do tubo
Fermentação da glicose (GLI)	Desenvolvimento de uma cor amarela no fundo do tubo TSI (esta cor pode estar mascarada no caso de bactérias que produzem H ₂ S)	O fundo do tubo mantém a cor original do meio (verde azulado)
Produção de gás a partir da glicose (GAS)	Desenvolvimento de bolhas com intensidade variável no interior do meio TSI	O meio mantém-se íntegro. Produção de gás sulfídrico (H ₂ S)
Produção de gás sulfídrico (H ₂ S)	Desenvolvimento de cor negra de intensidade variável no fundo do tubo TSI	O meio mantém coloração diferente da mencionada
Hidrólise da uréia	Desenvolvimento de coloração rosa intensa no tubo	O meio de cultura permanece com sua cor original
Descarboxilação da lisina (LIS)	Desenvolvimento de coloração que passa do amarelo à púrpura no meio	Desenvolvimento de coloração amarela no meio
Motilidade (MOT)	Crescimento difuso com turvação total ou parcial do meio	Crescimento restrito à linha de picada
Teste do Indol (IND): Adicionar 2-4 gotas do reativo de Kovac's sobre a superfície do meio e aguardar cerca de dois minutos	Surgimento de um anel vermelho	Não se desenvolve coloração no reagente
Teste do Citrato (CIT)	Observa-se crescimento no meio e/ou desenvolvimento de coloração azul	A coloração do meio se mantém inalterada e sem sinais de crescimento.

Fonte: KONEMAN et al. (2001).

Após a leitura das provas, os resultados foram comparados com tabelas de identificação segundo KONEMAN et al. (2001) e MURRAY et al. (2007).

A pesquisa da enzima urease foi realizada em Agar uréia base de Christensen. Os resultados positivos e negativos das provas foram comparados com tabela de identificação de enterobactérias.

4.2.8 Análise Estatística

Os dados obtidos foram avaliados através do teste estatístico para rejeição de valores desviantes denominado Teste Q de Dixon, com nível de confiança de 95%.

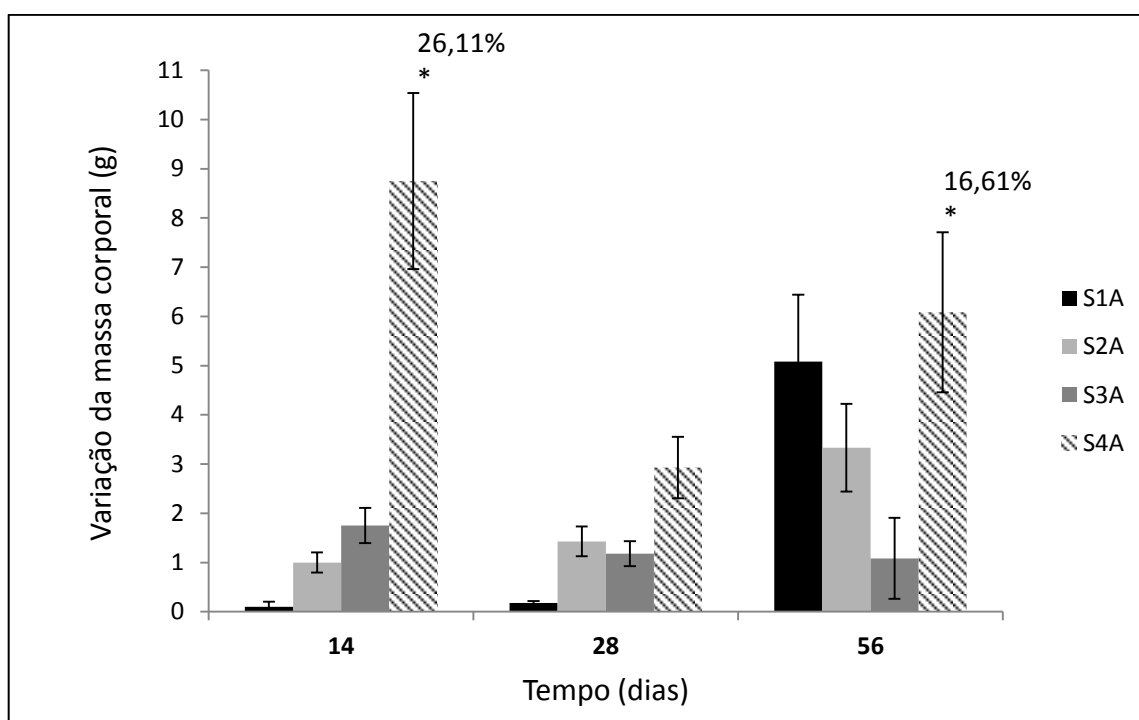
Os resultados foram, ainda, comparados pela análise de variância (ANOVA) por meio do Teste de Tukey para avaliar a diferença entre os tratamentos e o controle, sendo os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$, permitindo assim, estabelecer a diferença mínima significativa entre as médias, utilizando os programas Microsoft Office Excel 2010, Origin 8 e Bioestat 5.3.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Evolução da massa corporal dos animais

Nas Figuras 9,10 e 11 estão apresentados a variação da massa corporal (g) dos camundongos tratados com as substâncias S1, S2, S3 e S4 nas doses de 10 (A), 30 (B) e 60 (C) mg kg⁻¹, respectivamente, nos tempos 14, 28 e 56 dias de tratamento, em relação ao controle.

Figura 9 – Variação da massa corporal dos camundongos tratados com as substâncias S1, S2, S3 e S4 na dose de 10 mg kg⁻¹ em 14, 28 e 56 dias em relação ao controle. As barras representam o erro padrão.



(*) Valor significativo estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Figura 10 - Variação da massa corporal dos camundongos tratados com as substâncias S1, S2, S3 e S4 na dose de 30 mg kg⁻¹ em 14, 28 e 56 dias em relação ao controle. As barras representam o erro padrão.

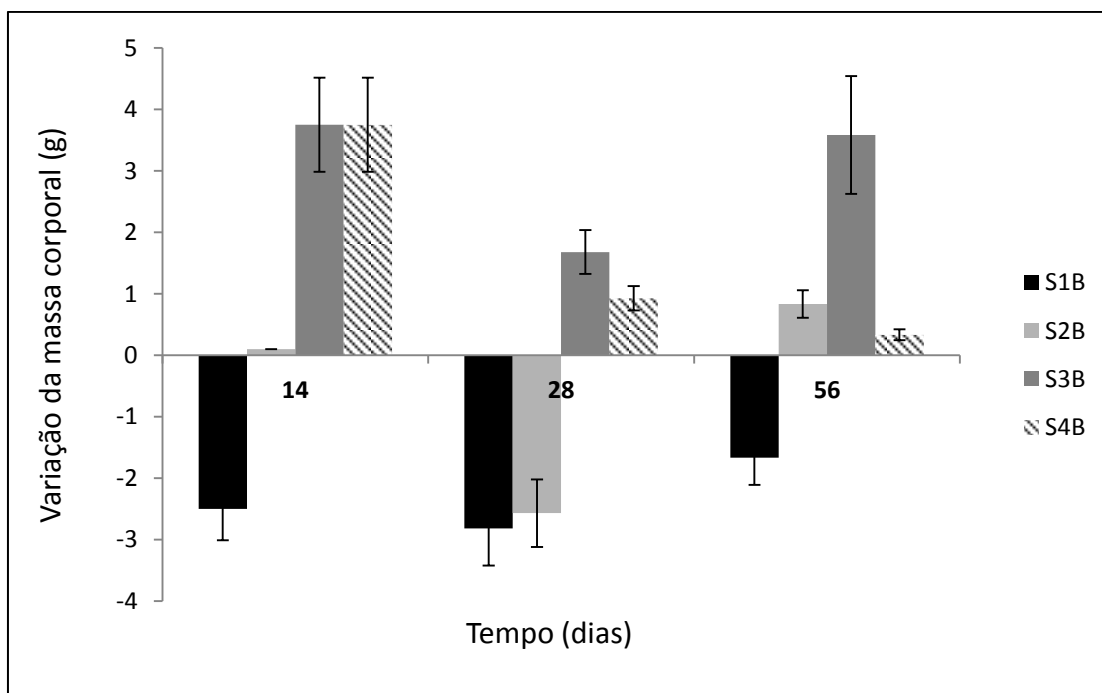
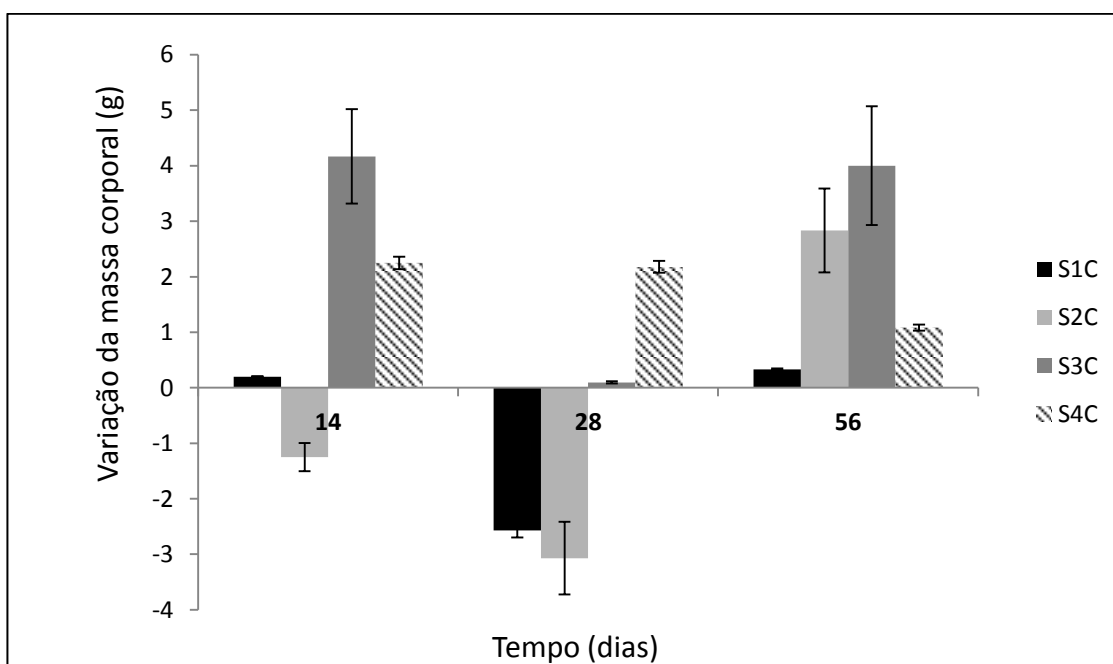


Figura 11 - Variação da massa corporal dos camundongos tratados com as substâncias S1, S2, S3 e S4 na dose de 60 mg kg⁻¹ em 14, 28 e 56 dias em relação ao controle. As barras representam o erro padrão.



Em relação à evolução da massa corporal dos camundongos (percentual de ganho ou perda de massa no tempo T em relação ao tempo T₀ no qual a dieta foi iniciada) os resultados mostraram que, apenas o grupo S4A (fração extrativa do caldo de cultivo desproteínizada na dose de 10 mg kg⁻¹) apresentou ganho de massa corporal estatisticamente significativo em 14 dias (26,11%) e em 56 dias (16,61%) em relação ao grupo controle nestes dias (Figura 9). Isto pode ser explicado pelo fato da substância S4A ser composta basicamente de polissacarídeos, supostamente não apresentando proteína em sua composição, uma vez que a mesma sofreu desproteínização. Dosagens mais altas da mesma substância (30 e 60 mg kg⁻¹) não causaram efeito estatisticamente significativo sobre a massa corporal dos camundongos. Pode-se sugerir que um aumento no conteúdo de fibras na dieta (polissacarídeos de alta massa molecular contidos nas frações extrativas) pode ter inibido o ganho de massa corporal dos animais.

Embora não tenha havido diferença estatística entre os outros grupos e o controle, pode-se observar na Figura 10, o comportamento do grupo que recebeu a substância S1 (fração extrativa do caldo de cultivo na dose de 30 mg kg⁻¹), no qual houve perda de massa corporal dos animais enquanto a substância estava sendo administrada. Essa tendência de redução de massa corporal pode ser atribuída à presença de proteína na substância. O peso corporal tende a diminuir ao aumentar a dose de 10 mg kg⁻¹ (Figura 9) para 30 mg kg⁻¹ da substância (Figura 10).

Observou-se que os grupos S1 (fração extrativa do caldo de cultivo) e S2 (fração extrativa do micélio) de maneira geral tiveram diminuição de massa corporal, provavelmente pela presença de proteína nestas frações. Os grupos S3 (fração extrativa do micélio desproteínizado) e S4 (fração extrativa do caldo de cultivo desproteínizado) tiveram aumento da massa corporal provavelmente pela ausência de proteína.

Não foi observado diarreia entre os animais tratados com as substâncias e doses utilizadas. Conclui-se que a fração extrativa S4 de *P. sajor-caju* utilizada nesse trabalho promoveu ganho de massa corpórea que tende a diminuir com o aumento da concentração do polissacarídeo, sem promover desordem intestinal.

Montagne et al. (2000), trabalhando com a concentração de 1% de fibras dietéticas em animais não ruminantes observaram também menor ganho de peso e pior conversão alimentar, atribuindo o resultado a efeitos antinutricionais e à maior quantidade de fibras alimentares presentes na dieta. Além disso, assim como o

conteúdo aumentado de fibras na dieta, existem algumas evidências de que uma maior proporção de proteína também promove maior perda de peso, maior redução de gordura corporal e diminuem a perda de massa magra durante o emagrecimento, quando comparadas a dietas com menos proteína e de mesmo valor energético (SKOV et al., 1999; LAYMAN et al., 2005).

No estudo realizado por Skov et al. (1999), a maior redução de peso promovida pela dieta rica em proteína foi atribuída ao maior efeito deste nutriente na saciedade, uma vez que a ingestão energética dos indivíduos que realizaram esta dieta foi 17% menor, quando comparada à dos indivíduos com dieta com menos proteína. Resultado semelhante foi encontrado em estudo realizado por Lacroix et al. (2004), onde submeteram dois grupos de ratos consumindo por seis meses uma ração com 14 ou 50% de proteína. Foi observado que o grupo de animais que consumiu a ração com maior percentual de proteína teve consumo de ração 18% menor, após os seis meses de experimento.

De Lima (2008) utilizou exopolissacarídeos (EPS) produzidos por *Agaricus brasiliensis* trabalhando com 4 diferentes grupos de animais: (GC) – grupo controle, que não recebeu nenhum tipo de EPS; (GAg) – grupo *Agaricus*, que recebeu EPS parcialmente purificado (desproteínizado) de *A. brasiliensis*; (GB7) – grupo B7, que recebeu EPS parcialmente purificado da bactéria láctica B7; (GAg+B7) – grupo *Agaricus* + B7, que recebeu EPS parcialmente purificado do co-cultivo de *A. brasiliensis* com a bactéria láctica. No experimento 1 os animais receberam a dose de 30 mg kg⁻¹ ao dia e no experimento 2, 300 mg kg⁻¹ ao dia. O principal incremento de peso (12%) foi verificado no grupo GAg e comparado ao grupo controle este foi o único grupo que possuiu diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). Os resultados deste estudo, muito semelhantes aos resultados encontrados neste trabalho, indicam uma tendência de ganho de peso, resultado de um bom aproveitamento dos nutrientes da dieta ou por influência do EPS desproteínizado. As cobaias alimentadas com EPS B7 tiveram um incremento de peso de 8,6% e para o GAg+B7 o aumento foi de 6,9%.

Dalla Santa (2006) observou que durante a ingestão *in natura* do cogumelo de *A. brasiliensis*, os animais tratados com ração acrescida de 14,5% de micélio (A50) apresentaram um aumento de peso superior nas últimas três semanas de alimentação quando comparado aos outros grupos; e o ganho de peso foi 15%

superior quando comparado com o controle, indicando uma tendência de ganho de peso que pode ser resultante do bom aproveitamento dos nutrientes da dieta.

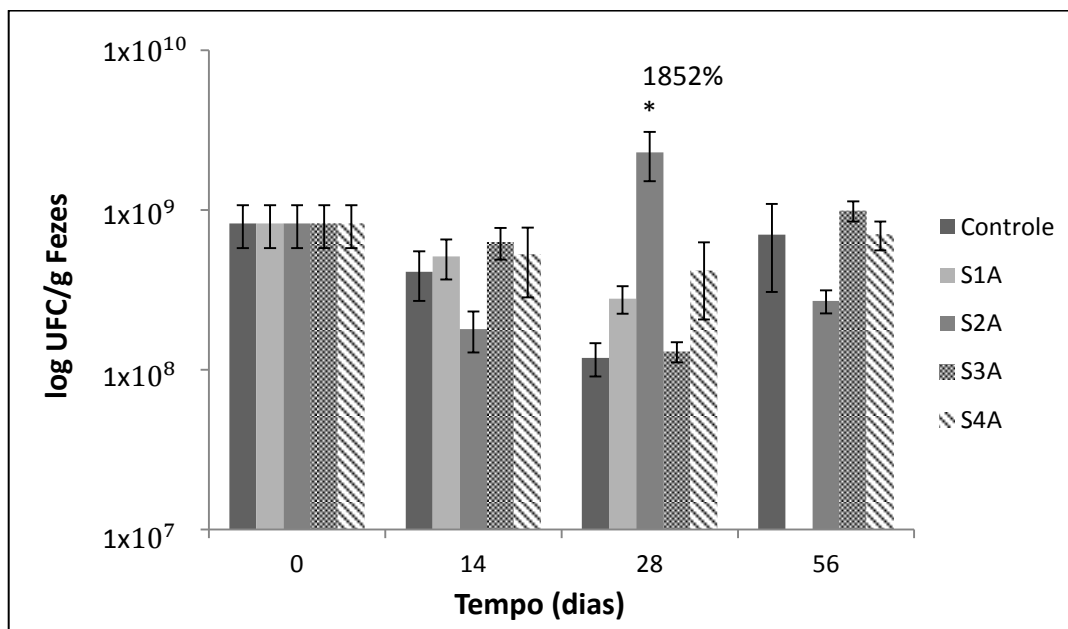
Os cogumelos do gênero *Pleurotus* são ricos em fibra, contém baixo teor de gordura, e isso têm sido citados como um potencial auxílio na perda de peso. As fibras dietéticas no cogumelo consistem de β -glucanas, mananas, hemiceluloses e quitina. A fermentação de β -glucanas e sua capacidade de formar soluções altamente viscosas no intestino humano pode constituir a base de seus benefícios anti-obesidade (KHOURY et al., 2012).

5.2 Avaliação do efeito das diferentes frações extrativas obtidas (S1, S2, S3 e S4) sobre a microbiota intestinal de camundongos

O número de unidades formadoras de colônias de *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Enterobacteriaceae* spp. por grama de fezes dos camundongos do grupo controle e tratados com as substâncias S1, S2, S3 e S4 nas concentrações de 10, 30, 60 e 300 mg kg⁻¹ está apresentado nas Figuras 12 a 20 e no Apêndice A, B e C (Tabelas 3, 4 e 5).

O efeito das frações extrativas do caldo do cultivo e do micélio de *P. sajor-caju* sobre os micro-organismos avaliados (lactobacilos, bifidobactérias e enterobactérias) foi verificado quando os valores de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) das substâncias testadas se apresentaram estatisticamente diferentes dos valores de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) dos controles, realizados pelo Teste de Tukey.

Figura 12 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Lactobacillus* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do caldo de cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteinizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteinizada (S4), na dose de 10 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.



(*) Valor significativo estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Figura 13 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Lactobacillus* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do caldo de cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteinizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteinizada (S4), na dose de 30 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.

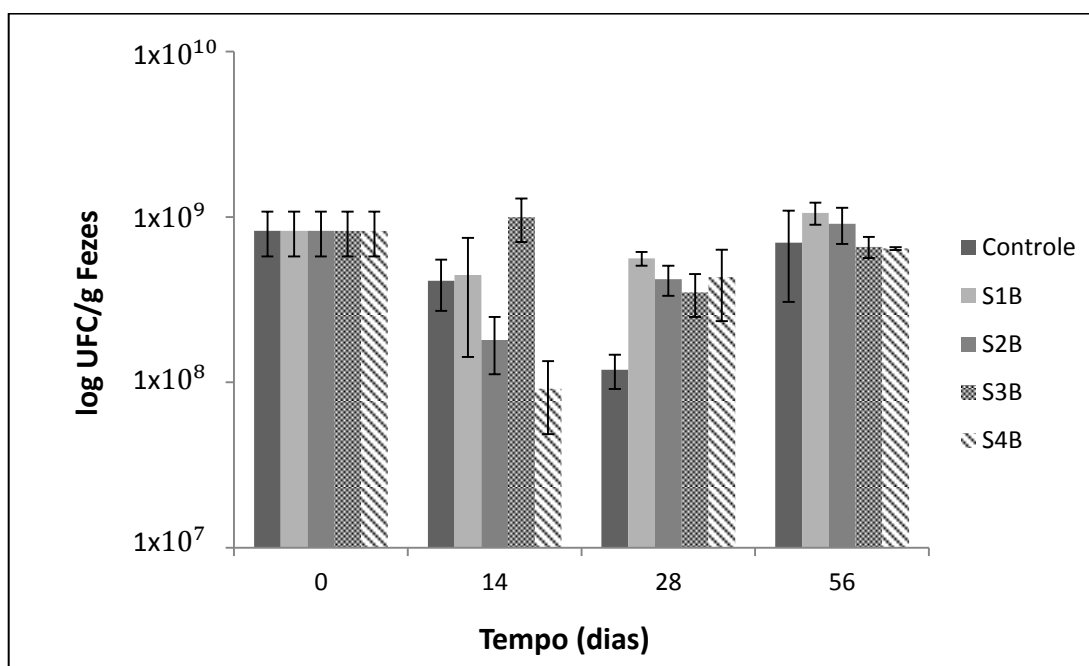
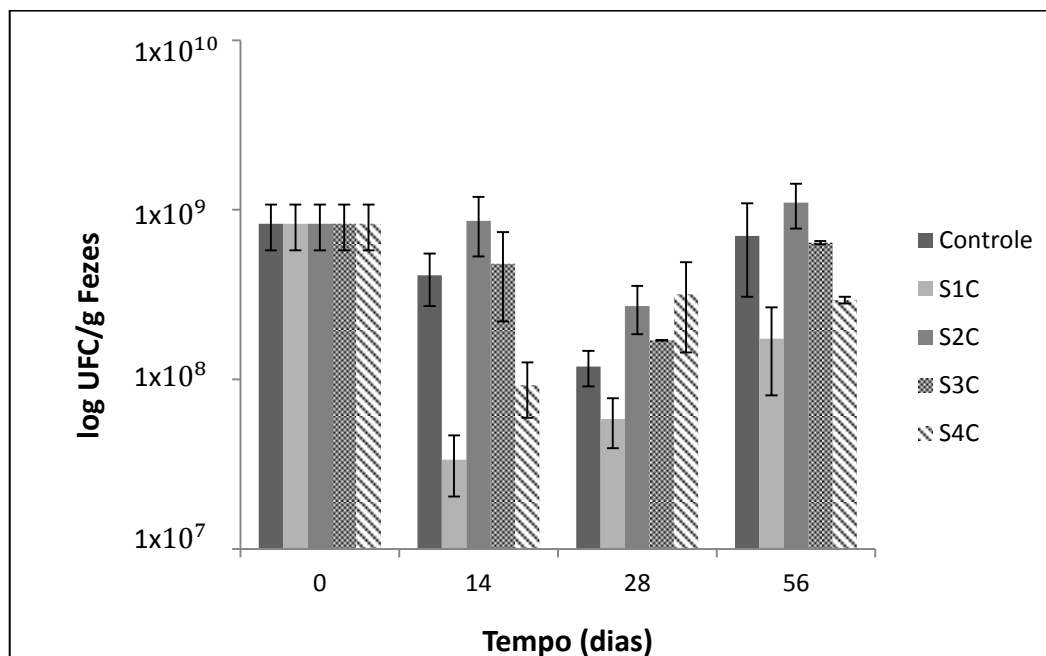


Figura 14 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Lactobacillus* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do caldo de cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteinizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteinizada (S4), na dose de 60 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.



Na Figura 12, pode-se perceber que não houve ativação pela substância S1A no crescimento de lactobacilos porque não foi detectado crescimento de colônias em 56 dias no grupo onde administrou-se esta substância.

Observou-se que a fração extrativa do micélio (S2) na concentração de 10 mg kg⁻¹, em 28 dias, promoveu a ativação do crescimento celular de lactobacilos em 1852%. As concentrações de 30 e 60 mg kg⁻¹ não promoveram efeito estatisticamente significativo ($p > 0,05$) sobre o crescimento de lactobacilos. Este efeito inibitório em relação ao aumento da dose também foi encontrado por Schott et al. (2013) onde utilizaram basidiomas de *A. blazei*. Estes só causaram ativação sobre o crescimento de *B. lactis* na concentração de 0,5 g L⁻¹. Os efeitos foram eliminados com o aumento da concentração para 1 e 2 g L⁻¹.

Estes resultados assemelham-se àqueles encontrados por Synytsya et al. (2009) que relataram ativação do crescimento de lactobacilos de até 70% quando extratos solúveis em água do corpo frutífero de *P. ostreatus* contendo polissacarídeos foram utilizados.

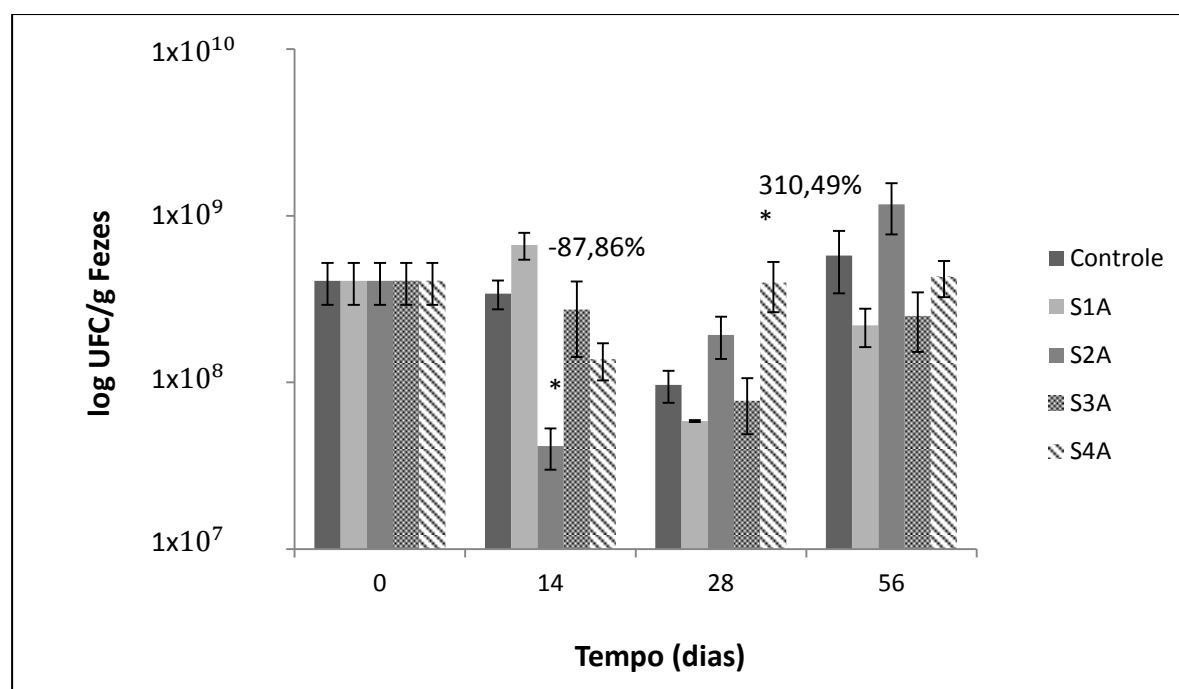
Da mesma forma, Schott et al. (2013) observaram 628% de ativação do crescimento de lactobacilos quando um extrato aquoso a quente do corpo frutífero de *P. ostreatus* na dose de 30 mg kg⁻¹ foi administrado a camundongos Swiss.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de lactobacilos presente nas fezes do grupo controle e dos grupos que receberam as substâncias S1, S3 e S4, nas dosagens de 10, 30 e 60 mg/kg.

Observando os resultados deste trabalho e os encontrados na literatura, pode-se concluir que tanto a espécie fúngica como a fonte do extrato (corpo frutífero, micélio ou caldo de cultivo) podem produzir diferentes compostos bioativos, com diferentes efeitos sobre o crescimento destas bactérias.

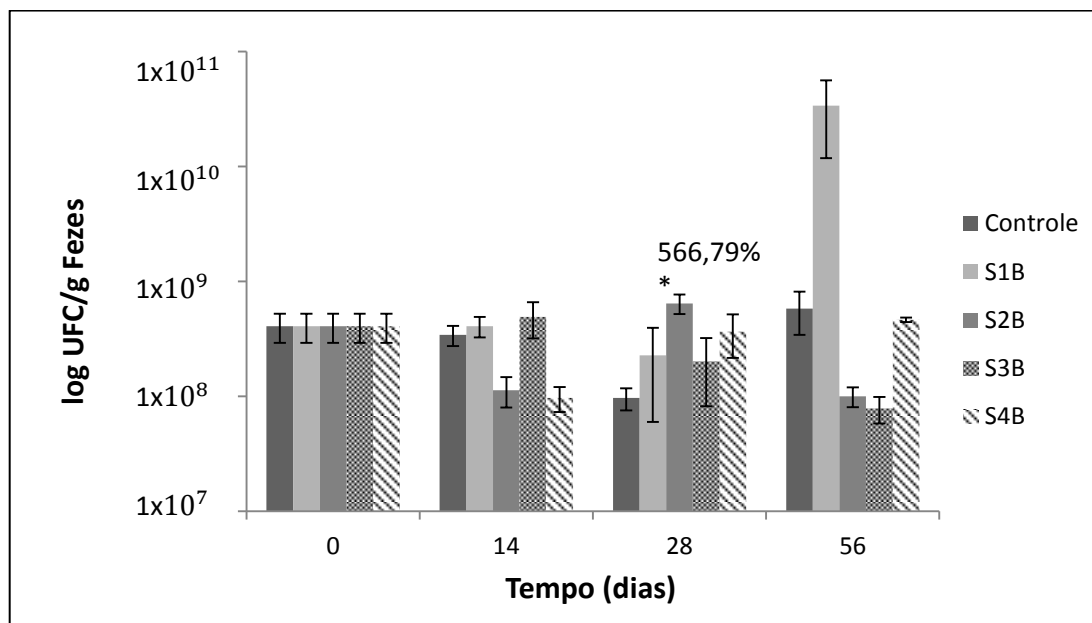
Os resultados das análises bacteriológicas para bifidobactérias presentes nas fezes dos camundongos do grupo controle e tratados com as substâncias S1, S2, S3 e S4, nas doses de 10, 30 e 60 mg kg⁻¹ podem ser observados nas Figuras 15 a 17.

Figura 15 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Bifidobacterium* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do caldo de cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada (S4), na dose de 10 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.



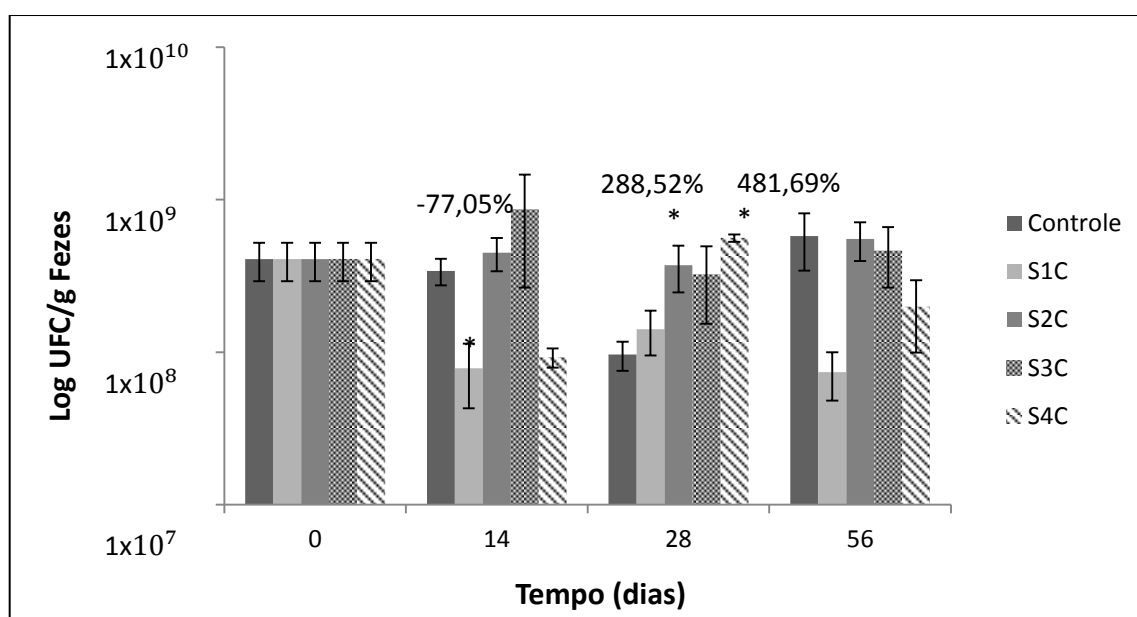
(*) Valor significativo estatisticamente (p<0,05) em relação ao controle.

Figura 16 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Bifidobacterium* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do caldo de cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteínizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteínizada (S4), na dose de 30 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.



(*) Valor significativo estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Figura 17 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Bifidobacterium* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do caldo de cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteínizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteínizada (S4), na dose de 60 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.



(*) Valor significativo estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle.

A fração extrativa do micélio (S2) em 28 dias promoveu o crescimento de bifidobactérias ativando-as em 566,79% e 288,52%, na concentração de 30 mg kg⁻¹ e 60 mg kg⁻¹, respectivamente (Figuras 16 e 17). Não foi observada, porém, a manutenção desta ativação até o 56º dia em nenhuma das concentrações. Houve também inibição desta bactéria em 87,86% quando administrada a substância S2 na concentração de 10 mg kg⁻¹.

A reversão dos efeitos de inibição para ativação do crescimento ou ativação para inibição pode ser explicada pelo fato de não se estar trabalhando com a substância pura, cuja composição pode ser formada por inibidores e ativadores cujos efeitos podem ser dose dependentes. Assim, por exemplo, em uma baixa concentração, o efeito inibitório de uma determinada substância presente nas frações extrativas do micélio poderia ser observado, mas, aumentando-se a concentração, outra substância com potencial ativador poderia apresentar seus efeitos, eliminando o efeito inibitório da primeira.

Em trabalho realizado por Kontula et al. (1998), os efeitos de farelo de aveia fermentado por *Lactobacillus*-GG sobre a atividade da microbiota intestinal, e a ação estimuladora/inibidora do sobrenadante do farelo de aveia sobre o crescimento de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus* GG), e *Bifidobacterium lactis* subsp. *lactis* foram avaliados através de um método *in vitro*. Os autores utilizaram um meio contendo 2,7g (30%) e 5,6g (60%) de farelo de aveia, adicionados de 10 ml de fermentado de *Lactobacillus rhamnosus* (10x10⁸ UFC). Os experimentos mostraram que o crescimento de *Lactobacillus* GG foi estimulado pela dosagem de 2,7g (30%) de farelo de aveia, mas ligeiramente inibido por 5,6g (60%) de farelo de aveia e pelo sobrenadante de farelo de aveia fermentada. Possivelmente, a quantidade de 30% do farelo de aveia aumenta a produção de estimulantes de *Lactobacillus* GG, enquanto a alimentação de 60% de farelo de aveia pode aumentar a quantidade de metabolitos bacterianos inibidores de *Lactobacillus* GG. O farelo de aveia também favoreceu o crescimento de bifidobactérias, isso provavelmente ocorre devido à presença de alguns fatores bifidogênicos do farelo. Embora os autores não relatem quais os estimuladores ou inibidores de *Lactobacillus* GG e nem os fatores bifidogênicos presentes no farelo de aveia, sabe-se que este cereal contém beta-glucanas (ANDERSSON e BÖRJESDOTTER, 2011) assim como as glucanas também são encontradas na parede celular de basidiomicetos.

Quando a fração extrativa do caldo do cultivo desproteínizado (S4) foi utilizada nas concentrações de 10 e 60 mg kg⁻¹, houve diferença significativa positiva ($p < 0,05$) no crescimento de bifidobactérias em relação ao grupo controle (Figura 15 e 17). Os resultados apontam para percentuais de ativação de 310,49% (S4A) e 481,69% (S4C), para 10 e 60 mg kg⁻¹, respectivamente, no 28º dia de dieta. Percebe-se com este resultado que enquanto houve administração da substância S4C as taxas de ativação apresentaram-se elevadas, porém esta taxa não se manteve estatisticamente significativa ($p > 0,05$) em 56 dias. Portanto, ao cessar a administração da substância em 28 dias, os valores de ativação tenderam a diminuir até o 56º dia, indicando que o aumento de *Bifidobacterium* spp só ocorreu enquanto a substância estava sendo administrada. A inatividade de S4B (30 mg/kg) sobre os micro-organismos testados, pode ser explicada pela variação da resposta interindividual das cobaias utilizadas nos testes. Walker et al. (2011) afirma que as influências de polissacarídeos não digeríveis na composição da microbiota do cólon estão sujeitas a variação interindividual.

Conforme o resultado do teste estatístico Anova, a fração extrativa do caldo do cultivo (S1) utilizada na concentração de 60 mg kg⁻¹ e a fração extrativa do micélio (S2) utilizada na concentração de 10 mg kg⁻¹, apresentaram efeito negativo estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no crescimento de *Bifidobacterium* spp. quando comparados ao grupo controle. Os resultados demonstram um percentual de inibição do crescimento destas bactérias de 77,05% e 87,86%, respectivamente para S1C e S2A, no 14º dia da dieta (Figuras 15 e 17). O efeito inibidor destas frações não foi observado no 28º dia de tratamento, como também após cessar a administração (56º dia) não houve taxa estatisticamente significativa de inibição. A substância S2, na concentração de 10 mg kg⁻¹, foi responsável pela ativação do crescimento de lactobacilos em 1852%. Como os lactobacilos estavam em maior número, pode ter ocorrido a concorrência pelo sítio de adesão e nutrientes com as bifidobactérias, fazendo com que o número dessas diminuíssem. Outra explicação para o resultado poderia ser o baixo número da população de *Bifidobacterium* spp na microbiota gastrointestinal inicial dos animais do grupo S1C e S2A. Garcia et al. (1998), Wisbeck et al. (2003) e Momose, Hirayama e Itoh (2008), confirmam os efeitos antimicrobianos ocasionados pela ingestão do gênero *Pleurotus*, dessa forma, o resultado encontrado pode estar relacionado a um possível potencial antimicrobiano das substâncias S1 e S2. Importante ressaltar que as frações em

questão não sofreram o processo de desproteíntização. A presença de proteínas bem como outras substâncias que não foram eliminadas pelo processo de desproteíntização pode ter sido determinante na inibição observada.

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

Resultado inibitório semelhante a este trabalho foi encontrado por Wisbeck et al. (2003), onde verificaram a existência de agentes antimicrobianos no caldo de cultivo fermentado de três linhagens do gênero *Pleurotus* (*Pleurotus ostreatus* DSM 1833, *Pleurotus ostreatus* CCB 001 e *Pleurotus sajor-caju* CCB019). Destas, a linhagem de *P. ostreatus* DSM 1833 apresentou atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* (80%), *Candida albicans* (99,6%) e *Bacillus subtilis* (60%), não apresentando diferença significativa no desenvolvimento de *Escherichia coli*. A linhagem *P. ostreatus* CCB 001 foi responsável pela inibição do *Bacillus subtilis* (100%) e *P. sajor-caju* CCB 019 não apresentou atividade antimicrobiana.

O efeito antimicrobiano foi demonstrado por Momose, Hirayama e Itoh (2008), quando inocularam diluições de fezes humanas em camundongos germ free, produzindo dois grupos de camundongos BFA (*baby flora associated*), BFA3 e BFA4. Nas fezes dos camundongos do primeiro grupo foram identificadas 24 espécies de bactérias e 16 espécies em BFA4. Ao inocular nesses dois grupos a *E. coli* 0157:H7, BFA3 eliminou a bactéria, enquanto BFA4 tornou-se carreador, resultado que demonstrou a importância da microbiota na proteção do animal contra a bactéria *E.coli* 0157:H7.

Os resultados das análises bacteriológicas para enterobactérias presentes nas fezes dos camundongos do grupo controle e tratados com as substâncias S1, S2, S3 e S4, nas doses de 10, 30 e 60 mg kg⁻¹ podem ser observados nas Figuras 18 a 20.

Figura 18 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Enterobacteriaceae* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do caldo de cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada (S4), na dose de 10 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.

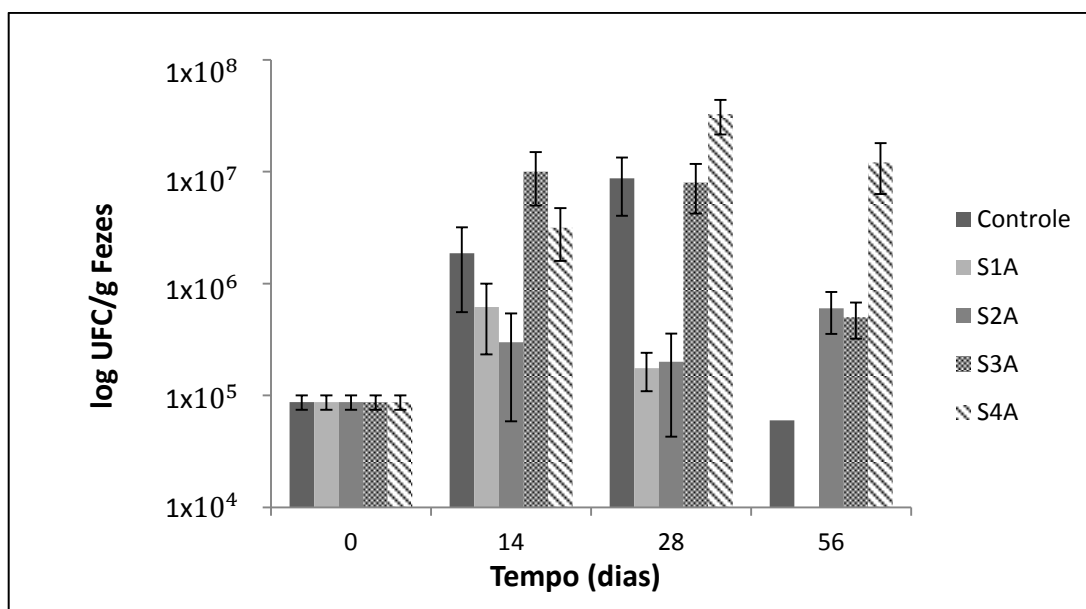
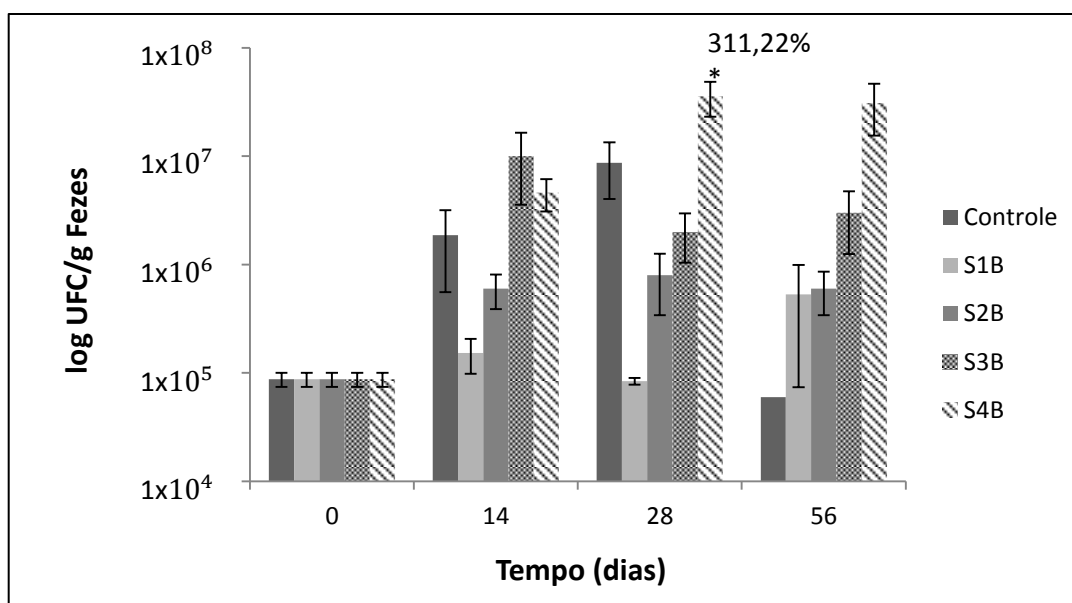
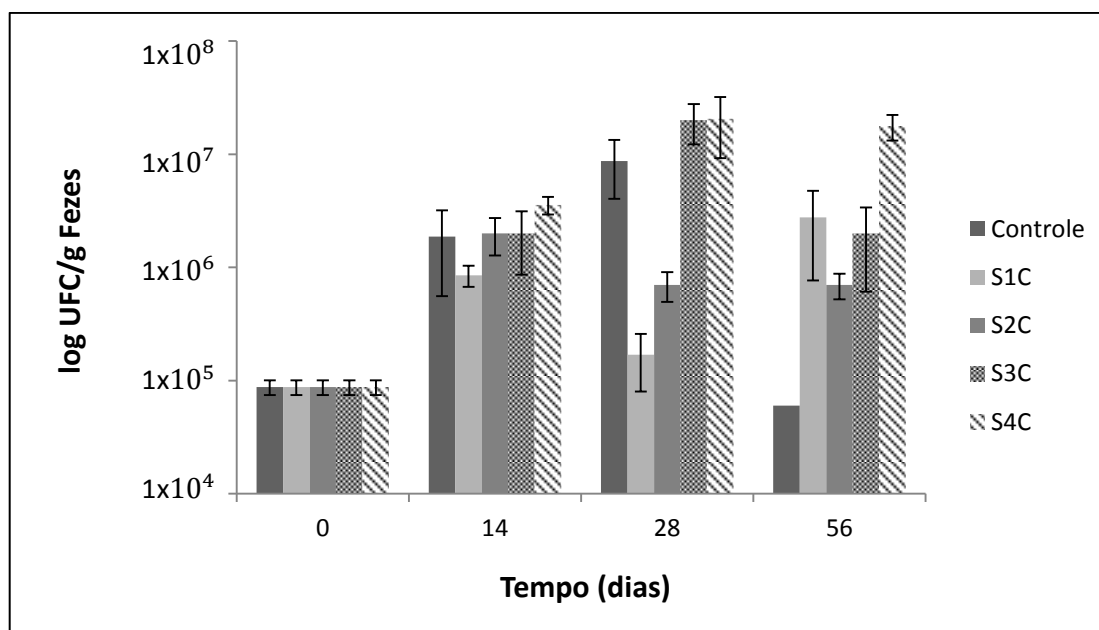


Figura 19 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Enterobacteriaceae* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do caldo de cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada (S4), na dose de 30 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.



(*) Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Figura 20 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Enterobacteriaceae* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do caldo de cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada (S4), na dose de 60 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.



Não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de enterobactérias presentes nas fezes do grupo controle e dos grupos que receberam as substâncias S1, S2 e S3, nas dosagens de 10, 30 e 60 mg kg⁻¹. No entanto, a substância S4, na dosagem de 30 mg kg⁻¹, promoveu um aumento de 311,22% no número de enterobactérias em relação ao grupo controle, no 28º dia da dieta. Percebe-se também que, com a ativação das enterobactérias, não houve crescimento significativo das outras bactérias probióticas. Este fato pode ser explicado pela competição que pode ter ocorrido entre elas. A análise destes resultados é de difícil interpretação, uma vez que o aumento de enterobactérias pode estar associado tanto a disfunções gastrointestinais como a um efeito probiótico.

As *Enterobacteriaceae* constituem a família maior e mais heterogênea de bacilos Gram negativos clinicamente importantes. A maioria das espécies pertence à flora comensal normal, e são responsáveis por infecções oportunistas, portanto o aumento das enterobactérias não é considerado benéfico, já que algumas dela estão sempre associadas a doença. Estes micro-organismos são responsáveis por 30-35%

de todas as septicemias e por 70 % das infecções do trato urinário (RAMOS, 2010). Por outro lado, o gênero *Enterococos*, que abriga micro-organismos colonizadores transitórios do trato gastrintestinal, também é utilizado no tratamento das diarreias, principalmente devido à invasão por rotavírus. Dentre o grupo das enterobactérias destacam-se algumas linhagens de *E. faecalis* e *E. faecium* usadas em preparações comerciais probióticas (SILVA, 2011).

Na tentativa de elucidar quais os principais gêneros de enterobactérias presentes nas fezes dos camundongos tratados com a substância S4, que promoveu o crescimento destas bactérias, procedeu-se a identificação das colônias bacterianas isoladas no meio EMB, provenientes das fezes do 56º dia do grupo S4C. Os resultados das provas bioquímicas indicaram a presença das seguintes bactérias: *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella* sp, *Edwardsiella tarda*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* e bacilos Gram-negativos não fermentadores, compondo as colônias. Este resultado aponta que bactérias potencialmente patogênicas foram encontradas entre os animais dos grupos em teste, sendo este resultado desfavorável para a substância S4, a qual ativou este grupo de bactérias.

Resultado semelhante foi observado no estudo realizado por Favoretto et al. (2009) ao analisar a microbiota entérica de *Rattus norvegicus* oferecido como alimentação de animais mantidos em zoológicos, relata o isolamento de cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp e *Enterobacter* spp, em percentual relativamente homogêneo para essas espécies e não relata nenhum isolamento de amostras de *Proteus* spp, o que parece ser um resultado discordante frente aos resultados obtidos por Paixão e Silva (2012), no qual foram identificadas 80 cepas. Destas, 68 (85%), apresentavam o mesmo padrão bioquímico característico das *Enterobacteriaceae*, sendo 29 (42,6%) recuperadas do cultivo direto e 39 (57,3%) do cultivo indireto e 12 amostras (15%) com padrão não fermentador. Comparando-se somente os isolados de enterobactérias, observou-se uma maior prevalência do gênero *Proteus* spp, sendo 20 (68,9%) cepas recuperadas por cultivo direto e 16 (41%) recuperadas das amostras oriundas do ceco.

Uma síntese dos resultados em termos de percentual de ativação e inibição do crescimento de lactobacilos, bifidobactérias e enterobactérias promovido pelas substâncias testadas nesse trabalho pode ser visualizada na Tabela 1.

Tabela 1 - Percentual de ativação e/ou inibição do crescimento de lactobacilos, bifidobactérias e enterobactérias promovido pelas substâncias S1 (fração extrativa do caldo de cultivo), S2 (fração extrativa do micélio) e S4 (fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada).

FRAÇÃO EXTRATIVA	DOSE (mg kg ⁻¹)	MICRO-ORGANISMO	ATIVAÇÃO/ INIBIÇÃO (%)	DIA
S1	60	<i>Bifidobacterium</i> spp	- 77,05	14 ^o
	10	<i>Lactobacillus</i> spp	1.852	28 ^o
S2	10	<i>Bifidobacterium</i> spp	- 87,86	14 ^o
	30	<i>Bifidobacterium</i> spp	566,79	28 ^o
	60	<i>Bifidobacterium</i> spp	288,52	28 ^o
	10	<i>Bifidobacterium</i> spp	310,49	28 ^o
S4	60	<i>Bifidobacterium</i> spp	481,69	28 ^o
	30	<i>Enterobacteriaceae</i> spp	311,22	28 ^o

Observando os resultados apresentados na Tabela 1 pode-se afirmar que, entre as substâncias utilizadas neste trabalho, S3 (fração extrativa do micélio desproteïnizada) não estimulou o crescimento dos gêneros bacterianos avaliados. S1 (fração extrativa do caldo de cultivo) também mostrou-se pouco ativa, apenas inibindo em 87,86% o crescimento de bifidobactérias, quando utilizada na dose de 60 mg kg⁻¹, sem afetar o crescimento dos demais micro-organismos testados. Por outro lado, a substância S2 (fração extrativa do micélio), foi capaz de, na menor dosagem utilizada (10 mg kg⁻¹), promover em 1852% o crescimento de lactobacilos, embora tenha, simultaneamente, inibido o crescimento de bifidobactérias. Em relação à substância S4 (fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada), houve o crescimento de bifidobactérias em 310,49% e 481, 69%, nas doses de 10 e 60 mg kg⁻¹, respectivamente, e quando utilizada na dose de 30 mg kg⁻¹, promoveu o crescimento (311%) de enterobactérias.

Diferentes tipos de polissacarídeos, como aqueles que podem estar presentes nas frações extrativas obtidas neste trabalho, têm diferentes impactos sobre as populações de bactérias e seus metabólitos no intestino.

β -glucanas de aveia promoveram o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos na microbiota intestinal de suínos levando ao aumento nas concentrações de butirato (REILLY et al., 2010; METZLER-ZEBELI et al., 2011). Aumento de bifidobactérias e Bacterioides também foi observado após a introdução de β -glucanas de cevada nas dietas de pessoas idosas saudáveis (MITSOU et al., 2010). Em um experimento com dietas ricas em amido resistente e com redução de carboidratos, a microbiota colônica humana foi comparada ao longo de 10 semanas. Houve um aumento das bactérias *Ruminococcus bromii*, *Oscillibacter* e *Eubacterium rectale* no grupo que recebeu a dieta rica em amido resistente. O número da *Oscillibacter* aumentou no grupo que recebeu a dieta com redução de carboidratos e, em contrapartida o número da *Eubacterium rectale* e *Collinsella aerofaciens* diminuiu. No entanto, as influências detalhadas de polissacarídeos não digeríveis na composição da microbiota do cólon estão sujeitas a variação inter-individual (WALKER et al., 2011).

Shen et al. (2012) determinaram os efeitos benéficos de β -glucana de aveia e cevada na saúde intestinal de 200 ratos Sprague-Dawley machos. Os animais foram divididos em 5 grupos de 40 ratos cada: um grupo controle, dois grupos de baixa dose administrada (BGL), dois grupos de elevada dose administrada (BGH). Em dois grupos foram administrados β -glucanas de aveia e nos outros dois grupos foram administrados β -glucanas de cevada por gavagem intragástrico nas doses de 0,35 e 0,70 g kg⁻¹ diariamente por 6 semanas. Índices intestinais de saúde foram analisados na 3^a, 6^a e 7^a semanas. β -glucanas de cereais promoveram o aumento de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. O número de *Enterobacteriaceae* diminuiu ($p < 0,05$) de uma forma dose dependente durante o período de administração. Estes resultados sugeriram que β -glucanas de cereais podem melhorar as funções intestinais e de saúde. Os efeitos das β -glucanas de aveia foram melhores do que as β -glucanas de cevada. No presente estudo percebeu-se a ativação de enterobactérias pela substância S4, diferindo do resultado do estudo realizado por Shen et al. (2012).

Um estudo *in vivo* mostrou que o tipo e a quantidade do polissacarídeo afetaram a microbiota intestinal. Altas quantidades de β -glucanas favorecem

seletivamente as bactérias produtoras de butirato (PIEPER et al., 2008). Os resultados *in vitro* e *in vivo* indicaram que o conteúdo de β -glucanas determina as quantidades totais de ácidos graxos de cadeia curta e ácido láctico. O alto teor de β -glucanas resultou em quantidades mais elevadas desses ácidos graxos e de ácido láctico. Como resultado, o aumento das populações de *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp foram observadas no cólon (PIEPER et al., 2009; O'SHEA et al., 2010; XU et al., 2013).

Synytsya et al. (2009) avaliaram o efeito prebiótico de frações solúveis em água (L1), semelhante ao S2 (fração extrativa do micélio) utilizada neste trabalho, e em álcali (L2) contendo polissacarídeos, principalmente β -glucanas e α -glucanas, extraídos de corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus* e de *Pleurotus eryngii* sobre nove linhagens diferentes de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*. Os resultados mostraram que, na maioria dos casos, os extratos de *P. ostreatus* e *P. eryngii* proporcionam crescimento bacteriano de *Lactobacillus*, semelhante ao resultado deste trabalho utilizando-se a substância S2 (fração extrativa do micélio), sendo que a máxima ativação foi de aproximadamente 70% com uso de L1 de *P. ostreatus*. Duas cepas de *Bifidobacterium* tiveram seu crescimento estimulado com ambos os extratos, com crescimento maior para L1 de *P. eryngii* em torno de 60%, semelhante a substância S2 (fração extrativa do micélio) nas doses de 30 e 60 mg Kg⁻¹ utilizadas neste trabalho. Uma cepa teve seu crescimento ligeiramente inibido com maior concentração dos extratos, cerca de 85% com a utilização de L1 de *P. ostreatus*, sendo que observou-se também uma inibição semelhante neste trabalho quando administrado a substância S2 na dose de 10mg Kg⁻¹. Os autores concluem que estes probióticos apresentam características diferentes de crescimento dependendo do extrato utilizado e da especificidade de cada cepa, devido à presença de compostos estruturalmente diversos.

Em outro estudo, β -glucanas derivadas de esclerócios de *P. tuber-regium* foram avaliados por seu efeito bifidogênico sobre *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium adolescentes* em culturas líquidas, usando inulina como um controle prebiótico. Foi demonstrado que após 24 horas de cultivo, o meio suplementado com glucanas fúngicas promoveu um aumento de 3 a 4 vezes na quantidade de bifidobactérias, que foi similar ao aumento alcançado pela adição de inulina (controle) (ZHAO e CHEUNG, 2011).

Chou et al. (2013) relataram que polissacarídeos de *Lentinus edodes*, *Pleurotus eryngii* e *Flamulina velutipes* podem aumentar a taxa de sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *B. longum* em iogurte refrigerado. Os autores observaram efeitos sinérgicos destes polissacarídeos com os peptídeos e aminoácidos de uma cultura de iogurte, que mantinha o probiótico acima de 10^7 UFCmL⁻¹ durante o armazenamento a frio. Também notaram que os polissacarídeos dos cogumelos tiveram um efeito protetor significativo (aumento de sobrevivência) das bactérias probióticas.

Schott et al. (2013) constataram que os polissacarídeos extraídos de *Agaricus blazei* estimularam em 772% o crescimento de *Lactobacillus* spp, quando usado em uma concentração de 30 mg kg⁻¹. Os polissacarídeos de *P. ostreatus* estimularam em 378% o crescimento de *Bifidobacterium* spp quando usados em uma concentração de 10 mg kg⁻¹. O crescimento de *Lactobacillus* também foi estimulado em 628% quando esta substância foi utilizada na dose de 30 mg kg⁻¹. Os resultados sugeriram um potencial prebiótico dos polissacarídeos de ambos os fungos. Os resultados encontrados neste trabalho foram semelhantes para o crescimento de lactobacilos mas observou-se o crescimento maior na dose de 10 mg kg⁻¹. Já para o crescimento de bifidobactérias a melhor concentração utilizada foi de 30 mg kg⁻¹.

Devido a ativação de enterobactérias somente pela substância S4 optou-se por não utilizar esta substância e também não utilizar mais esta bactéria na continuidade dos experimentos, já que na identificação das bactérias isoladas neste trabalho foram encontradas bactérias apontadas na literatura como pertencentes a família de bactérias que podem apresentar patogenicidade, dependendo do estado de saúde do indivíduo.

Tendo como alvo uma substância que fosse capaz de diminuir o crescimento de bactérias comensais e possivelmente maléficas (enterobactérias) e aumentar as bactérias probióticas (lactobacilos e bifidobactérias), é possível sugerir que a fração extrativa da biomassa micelial de *Pleurotus sajor-caju*, S2, foi a que apresentou os melhores resultados. Este extrato resultou no maior percentual de ativação de bifidobactérias (566,79%) e lactobacilos (1852%), não ativando as enterobactérias. Em virtude da ativação do crescimento destas bactérias probióticas promovido pela substância S2, optou-se por continuar os experimentos utilizando uma dosagem 5 vezes maior, 300 mg kg⁻¹, conforme dose proposta por De Lima (2008), do que a

maior concentração utilizada nos primeiros experimentos (60 mg kg^{-1}) e testar seus efeitos no crescimento de lactobacilos e bifidobactérias.

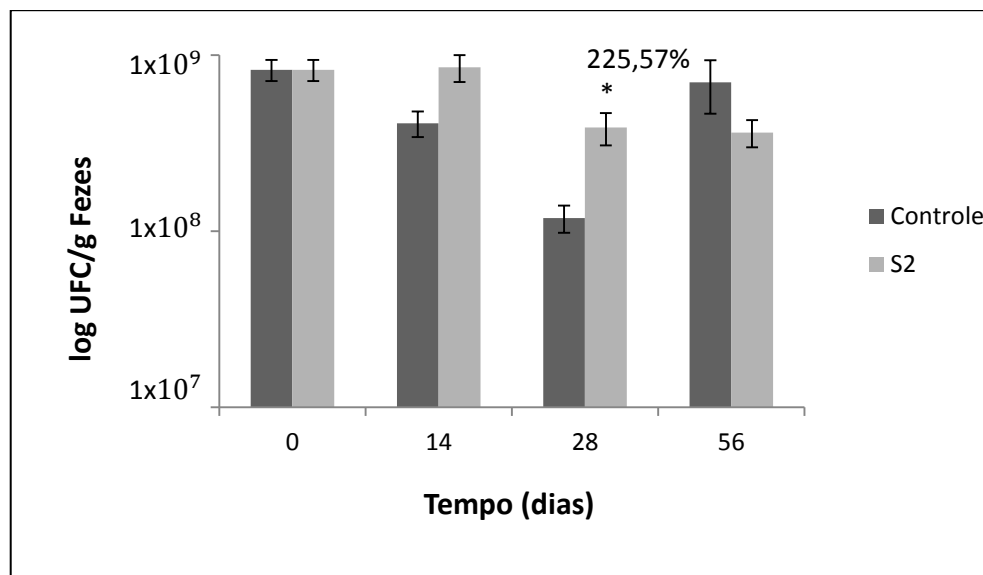
5.3 Avaliação do efeito da fração extrativa da biomassa micelial (S2) na dosagem de 300 mg kg^{-1} sobre a massa corporal dos animais

Em relação a variação da massa corporal dos camundongos tratados com a substância S2, na dose de 300 mg kg^{-1} , observou-se redução da massa corporal em 14 e 28 dias, de 0,17 e 4,27 g, respectivamente. Em 56 dias os camundongos apresentaram aumento da massa corporal de 3 g, indicando que a redução da massa foi dependente da administração da substância, porém estes resultados não foram estatisticamente significativos em relação ao controle. Pode-se sugerir que a presença de proteínas na substância e uma maior quantidade de fibras tenha inibido o ganho de massa corporal.

5.4 Avaliação do efeito da fração extrativa da biomassa micelial (S2) na dosagem de 300 mg kg^{-1} sobre a microbiota intestinal de camundongos

Os resultados das análises bacteriológicas para lactobacilos presentes nas fezes dos camundongos tratados com 300 mg kg^{-1} da substância S2 pode ser observado na Figura 21.

Figura 21 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Lactobacillus* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do micélio (S2), na dose de 300 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.



(*) Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle.

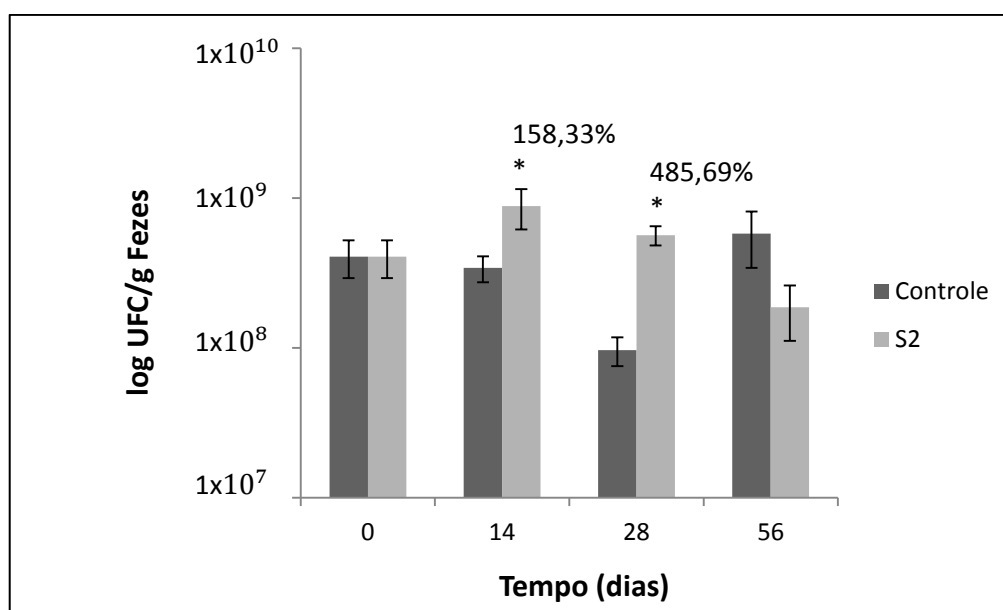
Apenas em 28 dias houve um aumento estatisticamente significativo (225,57%) na população de lactobacilos nas fezes dos camundongos do grupo S2 que receberam a dose de 300 mg kg⁻¹ em relação ao grupo controle.

Em 56 dias percebeu-se um aumento no crescimento de lactobacilos e bifidobactérias do grupo controle em relação ao crescimento até os 28 dias, mostrando ao longo do tempo o comportamento natural da microbiota dos animais.

Percebe-se que esta mesma substância S2, na dose de 10 mg kg⁻¹, em 28 dias, também promoveu o crescimento de lactobacilos, porém em uma ordem de grandeza maior (1852%). Este fato pode ser explicado pela hipótese de ter iniciado um processo de toxicidade em uma dose maior ou, por não se estar trabalhando com a substância pura, cuja composição pode ser formada por inibidores e ativadores. Assim, por exemplo, em uma baixa concentração, o efeito ativador de uma determinada substância presente nas frações extrativas do micélio poderia ser observado, mas, aumentando-se a concentração, outra substância com potencial inibidor poderia apresentar seus efeitos, eliminando o efeito ativador da primeira. Outra explicação poderia ser a possível diferença entre a microbiota inicial dos grupos testados.

Os resultados das análises bacteriológicas para bifidobactérias presentes nas fezes dos camundongos tratados com 300 mg kg^{-1} da substância S2 pode ser observado na Figura 22.

Figura 22 – Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Bifidubacterium* spp presentes nas fezes de camundongos tratados com a fração extrativa do micélio (S2), na dose de 300 mg kg^{-1} . Os valores representam a média de replicatas \pm o erro padrão.



(*) Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Verificou-se um aumento de 485,69% na população de bifidobactérias para o grupo experimental S2 em relação ao controle, em 28 dias. Em 14 dias, este aumento foi de 158,33%.

A ativação do crescimento das bactérias em 14 dias foi observada somente com a administração da dose de 300 mg kg^{-1} , proporcionando, portanto, um melhor resultado em relação às doses menores. Percebe-se que a substância S2 nesta dose (300 mg kg^{-1}) foi a única que promoveu uma ativação do crescimento de ambos os grupos de micro-organismos (lactobacilos e bifidobactérias) em 28 dias, em 225,57 e 485,69%, respectivamente. Porém não manteve-se até o 56^o dia, indicando que o efeito é dependente da administração da substância. Este fato também foi observado nas demais doses testadas.

Uma síntese dos resultados dos percentuais de ativação e inibição promovido pela substância S2 (fração extrativa do micélio) na dose de 300 mg kg⁻¹ sobre o crescimento de lactobacilos e bifidobactérias pode ser visualizado na Tabela 2.

Tabela 2 - Percentual de ativação e/ou inibição do crescimento de lactobacilos e bifidobactérias promovido pela substância S2 (fração extrativa do micélio) na dose de 300 mg kg⁻¹.

FRAÇÃO EXTRATIVA	DOSE (mg kg ⁻¹)	MICRO-ORGANISMO	ATIVAÇÃO/ INIBIÇÃO (%)	DIA
S2	300	<i>Lactobacillus</i> spp	225,57	28 ^o
		<i>Bifidobacterium</i> spp	158,33	14 ^o
		<i>Bifidobacterium</i> spp	485,69	28 ^o

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, com exceção do caldo do cultivo desproteínizado que, na dose de 10 mg kg^{-1} (S1A), promoveu um ganho de massa corporal da ordem de 26%, a ingestão das frações extrativas de *P. sajor-caju* nas doses de 10, 30 e 60 mg kg^{-1} não causou aumento ou perda, estatisticamente significativa, no ganho de massa dos grupos estudados e não ocasionou efeitos colaterais indesejáveis aparentes (diarreia), podendo, portanto, ser considerada segura.

Ainda, de acordo com os resultados deste trabalho, verificou-se que as bactérias testadas (*Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp e *Enterobacteriaceae*) apresentaram comportamentos diferentes na presença das substâncias avaliadas. Com exceção da fração extrativa do micélio desproteínizada que não apresentou atividade sobre o crescimento dos micro-organismos testados, as frações extrativas do caldo de cultivo (S1 e S4) e micélio (S2), podem ter função tanto prebiótica como antimicrobiana, dependendo da dose utilizada. No entanto, tendo como alvo uma substância capaz de diminuir o crescimento de bactérias comensais e possivelmente malélicas (enterobactérias) dependendo do estado fisiológico do hospedeiro e aumentar as bactérias probióticas (lactobacilos e bifidobactérias), a fração extrativa da biomassa micelial de *P. sajor-caju* (S2), foi a que apresentou os melhores resultados. Esta fração (S2) na dose de 300 mg kg^{-1} foi a única que ativou o crescimento tanto de lactobacilos quanto de bifidobactérias simultaneamente, demonstrando seu poder prebiótico. Os resultados mostram que esta substância, em 28 dias, apresentou o melhor resultado de todos os grupos testados neste trabalho. Além disso, o fato de tratar-se de uma fração extrativa obtida a partir da bioamassa micelial, que pode ser produzida em cultivo submerso em concentrações razoáveis, sem necessidade de processos complexos de purificação, pode tornar seu processo de produção industrial viável.

Em relação aos resultados das provas bioquímicas para identificação de bactérias isoladas no meio EMB do grupo S4C, estes indicaram a presença de bactérias potencialmente patogênicas, sendo este resultado desfavorável para a substância S4, a qual ativou este grupo de bactérias.

Vale ressaltar que as características intrínsecas de cada animal, bem como a idade, a adaptação e a seletividade da microbiota ao prebiótico, e também, ao nível

de estresse do animal podem ser considerados como fatores de interferência, ou mesmo de interação, nos resultados observados neste estudo.

7 PERSPECTIVAS

- Testar doses intermediárias (entre 60 e 300 mg kg⁻¹) da substância S2;
- Testar doses maiores do que 300 mg kg⁻¹ da substância S2, de forma a avaliar uma possível toxicidade da substância;
- Caracterizar as substâncias bioativas encontradas na fração extrativa S2;
- Identificar as espécies de micro-organismos predominantes nas fezes dos animais tratados ou não (controle) com a fração S2;
- Obter uma relação entre S2, o efeito prebiótico e o sistema imunológico com relação aos marcadores inflamatórios (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α);
- Testar o efeito do micélio bruto de *P. sajor-caju* sobre o crescimento de lactobacilos, bifidobactérias e enterobactérias.

REFERÊNCIAS

- ADEBAYO, E. A.; OLOKE, J. K.; MAJOLAGBE, O. N.; AJANI, R. A.; BORA, T. C. **Antimicrobial and anti-inflammatory potential of polysaccharide from *Pleurotus pulmonarius* LAU 09**. African Journal of Microbiology Research, v. 6, n. 13, p. 3315-3323, 2012.
- AGRIOS, G.N. **How plants defend themselves against pathogens**. In: AGRIOS, G.N. (Ed.). Plant Pathology. 4th ed. California: Academic Press, p.93-114, 1997.
- AHMAD, N.; MAHMOOD, F.; KHALIL, S. A.; ZAMIR, R.; FAZAL, H.; ABBASI, B. H. **Antioxidant activity via DPPH, gram-positive and gram-negative antimicrobial potential in edible mushrooms**. Toxicology and Industrial Health, v. 30, n. 9, p. 826-834, 2014.
- AIDA, F.M.N.A.; SHUHAIMI, M.; YAKID, M.; MAARUF, A.G. **Mushroom as a potential source of prebiotics: a review**. Trends in Food Science & Technology n.20, p. 567-575. 2009.
- AKYUZ, M.; ONGANER, A. N.; ERECEVIT, P.; E KIRBAG, S. **Antimicrobial activity of some edible mushrooms in the Eastern and Southeast Anatolia Region of Turkey**. Gazi University Journal of Science, v. 23, n. 2, p. 125-130, 2010.
- ALBUQUERQUE, M.P.; PEIL, R.M.N.; DO NASCIMENTO, J.S. **Capacidade de colonização micelial de *pleurotus ostreatoroseus*, *pleurotus pulmonarius* e *lentinus sajor-caju* em diferentes substratos**. Caderno de Pesquisa, v. 24, n. 2, p. 40-54, 2013.
- ALLGAYER, N.; SCHIRMER, H; CASTELAN, J.A. **Concordância dos resultados do sistema BD Phoenix com provas bioquímicas manuais na identificação de Enterobactérias em amostras clínicas**. Clinical & Biomedical Research, v. 35, n. 1, 2015.
- ANAL, A.K.; SINGH, H. **Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery**. Trends in Food Science & Technology, v. 18, n. 5, p. 240-251, 2007.
- ANDERSON, J. W.; GUSTAFSON, N. J. **Hypocholesterolemic effects of oat and bean products**. The American Journal of Clinical Nutrition, v. 48, n. 3, p. 749-753, 1988.
- ANDERSSON, A.A.M.; BÖRJESDOTTER, D. **Effects of environment and variety on content and molecular weight of β -glucan in oats**. Journal of Cereal Science, v. 54, n. 1, p. 122-128, 2011.
- ANGELI, J. P. F.; RIBEIRO, L. R.; BELLINI, M. F.; MANTOVANI, M. S. **β -Glucan extracted from the medicinal mushroom *Agaricus blazei* prevents the genotoxic effects of benzo [a] pyrene in the human hepatoma cell line HepG2**. Archives of Toxicology, v. 83, n. 1, p. 81-86, 2009.

ANGELOV, A.; GOTCHEVA, V.; KUNCHEVA, R.; HRISTOZOVA, T. **Development of a new oat-based probiotic drink**. International Journal of Food Microbiology, v. 112, n. 1, p. 75-80, 2006.

ARICI, M.; BILGIN, B.; SAGDIC, O.; OZDEMIR, C. **Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces**. Food Microbiology, v.21, n.1, p.19-24, 2004.

ARORA, D. S.; SHARMA, R. K.; CHANDRA, P. **Biodelignification of wheat straw and its effect on *in vitro* digestibility and antioxidant properties**. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 65, n. 2, p. 352-358, 2011.

ASADUZZAMAN, K.; MOUSUMI T. **Nutritional and medicinal importance of *Pleurotus* mushrooms: an overview**. Food Reviews International, v. 28, n. 3, p. 313-329, 2012.

ASAHARA, T.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; HAMABATA, T.; OZAWA, A.; TAKEDA, Y. **Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7**. Infection and Immunity, v. 72, n. 4, p. 2240-2247, 2004.

ASSIS, I. S.; BONATTI-CHAVES, M.; SILVEIRA, M. L. L.; GERN, R. M. M.; WISBECK, E.; FÚRIGO JÚNIOR, A.; FURLAN, S. A. **Production of bioactive compounds with antitumour activity against Sarcoma 180 by *Pleurotus sajor-caju***. Journal of Medicinal Food, v. 16, p. 1004-1012, 2013.

BAGGIO, C.H. Tese de Doutorado, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmacologia. **Mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da (1-3)(1-6) β -glucana isolada do *Pleurotus Pulmonarius* (Fr.) Quel.** 2010.

BARTOSCH, S.; WOODMANSEY, E. J.; PATERSON, J. C.; MCMURDO, M. E.; MACFARLANE, G. T. **Microbiological effects of consuming a synbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria**. Clinical Infectious Diseases, v. 40, n. 1, p. 28-37, 2005.

BEDANI, R. **Influência do consumo de logurte de soja fermentado com *Enterococcus faecium* na microbiota intestinal de animais e humanos**. 2008. 122 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2008. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/100872>>.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A. **Microbiota intestinal e probióticos: implicações sobre o câncer de cólon**. Jornal Português de Gastreenterologia, v. 16, n. 1, p. 19-28, 2009.

BEHALL, K.M.; SCHOLFIELD, D.J.; HALLFRISCH, J. **Effect of beta-glucan level in oat fiber extracts on blood lipids in men and women**. Journal of the American College of Nutrition, v. 16, n. 1, p. 46-51, 1997.

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

BLAUT, M. **Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora.** European Journal of Nutrition, v. 41, n. 1, p. i11-i16, 2002.

BOBEK P.; GALBAVY S. **Hypocholesteremic and antiatherogenic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rabbits.** Nahrung, v. 43, p. 339-342, 1999.

BOMHOF, M. R.; SAHA, D. C.; REID, D. T.; PAUL, H. A.; REIMER, R. A. **Combined effects of oligofructose and *Bifidobacterium animalis* on gut microbiota and glycemia in obese rats.** Obesity Journal, v. 22, n. 3, p. 763-771, 2014.

BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H.M.; FURLAN; S.A. **Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes.** Food Chemistry, v.88, n.3, p.425-428, 2004.

BORCHERS, A.T.; STERN, J. S.; HACKMAN, R. M.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. **Mushrooms, tumors, and immunity.** Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, v. 221, n. 4, p. 281-293, 1999.

BORGES, G. M.; DE BARBA, F. F. M.; SCHIEBELBEIN, A. P.; PEREIRA, B. P.; CHAVES, M. B.; SILVEIRA, M. L. L.; PINHO, M. S. L.; FURLAN, S. A.; WISBECK, E. **Extracellular polysaccharide production by a strain of *Pleurotus djamor* isolated in the south of Brazil and antitumor activity on Sarcoma 180.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 44, n. 4, p. 1059–1065, 2013.

BOTTARI, B.; GATTI, M.; NEVIANI, E. Culture independent approach for the evaluation of presence and activity of microorganisms in food. In: **The Second National Conference SIMTREA**, p.11, 2012.

BOUHNIK, Y.; RASKINE, L.; SIMONEAU, G.; PAINEAU, D.; BORNET, F. **The capacity of short-chain fructo-oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans.** Nutrition Journal, v. 5, n. 8, 2006.

BOURDON, I.; YOKOYAMA, W.; DAVIS, P.; HUDSON, C.; BACKUS, R.; RICHTER, D.; SCHNEEMAN, B. O. **Postprandial lipid, glucose, insulin, and cholecystokinin responses in men fed barley pasta enriched with β -glucan.** The American journal of Clinical Nutrition, v. 69, n. 1, p. 55-63, 1999.

BRAATEN, J.T.; WOOD, P.J.; SCOTT, F.W.; WOLYNETZ, M.S.; LOWE, M.K.; BRADLEY-WHITE, P.; COLLINS, M.W. **Oat beta-glucan reduces blood cholesterol concentration in hypercholesterolemic subjects.** European Journal of Clinical Nutrition, v. 48, n. 7, p. 465-474, 1994.

BRANDT K.G.; SAMPAIO M.M.S.; MIUKI C.I. **Importância da microflora intestinal.** *Pediatria, São Paulo*, v. 28, n.2, p.117-127, 2006.

BRENNAN, M.A.; DERBYSHIRE, E.; TIWARI, B. K.; BRENNAN, C. S. **Integration of β -glucan fibre rich fractions from barley and mushrooms to form healthy extruded snacks.** *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 68, n. 1, p. 78-82, 2013.

BRINGEL, A. **Simbióticos unem ação de alimentos funcionais.** *IMen – Instituto de Metabolismo e Nutrição, São Paulo*, ago. 2005. Disponível em: < <http://www.nutricaoclinica.com.br/content/view/420/16/>>. Acesso em: 27 de fev. 2014.

BROWN, G. D.; GORDON, S. **Fungal β -glucans and mammalian immunity.** *Immunity*, v.19, p. 311-315, 2003.

BROWN, L.; ROSNER, B.; WILLETT, W.W.; SACKS, F.M. **Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis.** *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 69, n. 1, p. 30-42, 1999.

BRUNS, T. D.; GARDES, M. **Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi—taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi.** *Molecular Ecology*, v. 2, n. 4, p. 233-242, 1993.

BRUNS, T.D.; WHITE, T.J.; TAYLOR, J.W. **Fungal molecular systematics.** *Annual Review of Ecology and Systematics*, p. 525-564, 1991.

BUB, A.; WATZL, B.; BLOCKHAUS, M.; BRIVIBA, K.; LIEGIBEL, U.; MÜLLER, H.; RECHKEMMER, G. **FRUIT JUICE consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage.** *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 14, n. 2, p. 90-98, 2003.

CAMELINI, C. M.; MARASCHIN, M.; MENDONÇA, M. M.; ZUCCO, C.; FERREIRA, A. G.; TAVARES, L. A. **Structural characterization of β -glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products.** *Biotechnology Letters*, v. 27, p. 1295-1299, 2005.

CARBONERO, E. R.; RUTHES, A. C.; FREITAS, C. S.; UTRILLA, P.; GÁLVEZ, J.; SILVA, E. V. D.; IACOMINI, M. **Chemical and biological properties of a highly branched β -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*.** *Carbohydrate Polymers*, v. 90, n. 2, p. 814-819, 2012.

CARBONERO, E. R.; SILVA, E. V. D.; RUTHES, A. C.; KOMURA, D. L.; GORIN, P. A.; IACOMINI, M. **Structural elucidation of manogalactans partially methylated isolated of basidiocarps of *Pleurotus sajor-caju* ('Houbitake').** *Annual Meeting of the Brazilian Chemical Society*, n.1, p. 33, 2010.

CARDOSO, M. B. **Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: Estudos da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência.** 2008. 96 f. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Físico-Química) -Departamento

de Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

CASTILHO A.C.; RAMOS S.C.; MAGNONI D.; CUKIER C.; ALVARENGA A. **A Importância das Fibras Alimentares para o Paciente Diabético**. Support, 2005.

CASTRO A.L.A.; PAIVA P.C.A.; BANYS V.L.; DIAS E.S.; SANTOS J. **Avaliação da produção de *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer utilizando resíduo do beneficiamento têxtil do algodão como substrato**. Ciência e Agrotecnologia, v.31, p.1286-1290, 2007.

CAVAZZONI, V.; ADAMI, A. **Exopolysaccharides produced by mycelial edible mushrooms**. Italian Journal of Food Science, v. 4, n. 1, p. 9-15, 1992.

CÉSAR, S.J.; SEZAR, S. **Biologia, vol 2: seres vivos: estrutura e função**. Ed. Saraiva, ed.8. São Paulo. 2005.

CHANG, Z. Q.; LEE, J. S.; HWANG, M. H.; HONG, J. H.; JUNG, H. K.; LEE, S. P.; PARK, S. C. **A novel β -glucan produced by *Paenibacillus polymyxa* JB115 induces nitric oxide production in RAW264.7 macrophages**. Journal of Veterinary Science, v. 10, p. 165–167, 2009.

CHAVES, M. B. **Estudo de diferentes formas de condução do processo de produção de polissacarídeos extracelulares por *Pleurotus* spp.** Tese de doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2011

CANAVILHAS, J.; SANTANA, D.C. **Jornalismo para plataformas móveis de 2008 a 2011: Da autonomia à emancipação**. Revista Líbero, v.14, n. 28, p. 53-66, 2011. Disponível no RCAAP: <http://ubithesis.ubi.pt/handle/10400.6/688>

CHEN P.X.; WANG S.; NIE S.; MARCONE M. **Properties of *Cordyceps sinensis*: a review**. The antitumor, immunostimulating and other therapeutic effects of the fungus *Cordyceps sinensis* are discussed with regard to its bioactive molecules. Journal of Functional Food, v. 5, p. 550-569, 2013.

CHO, Y. W.; CHO, Y. N.; CHUNG, S. H.; YOO, G.; KO, S. W. **Water-soluble chitin as a wound healing accelerator**. Biomaterials, v. 20, n. 22, p. 2139-2145, 1999.

CHORVATHOBA, V.; BOBEK, P.; GINTER, E.; KLVANOVA, J. **Effect of the oyster fungus on glycemia and cholesterolemia in rats with insulin depended diabetes**. Physiological Research, v. 42, p. 175–179, 1993.

CHOU, W.T.; SHEIH, I.; FANG, T.J. **The Applications of Polysaccharides from Various Mushroom Wastes as Prebiotics in Different Systems**. Journal of Food Science, v. 78, n. 7, p. M1041-M1048, 2013.

CHOWDHURY, M.M.H; KUBRA, K.; AHMED, S.R. **Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms**

cultivated in Bangladesh. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 14, n. 8, p. 1-6, 2015.

CILERDZIC, J.; STAJIC, M.; VUKOJEVIC, J.; MILOVANOVIC, I.; MUZGONJA, N. **Antioxidant and antifungal potential of *Pleurotus ostreatus* and *Agrocybe cylindracea* basidiocarps and mycelia.** *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 16, n. 2, p. 179-186, 2015.

CLARK, F.E. **Agarplate method for total microbial count.** In: BLACK, C.A.; EVANS, D.D.; ENSMINGER, L.E.; WHITE, J.L.; CLARK, F.E. *Methods of soil analysis.* Madison: American Society of Agronomy, v.2, p.14601466, 1965.

CLARKE, S.C. **Diarrhoeagenic *Escherichia coli* - an emerging problem?** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 41, n. 3, p. 93-98, 2001.

CLUNY, N.L.; ELLER, L. K.; KEENAN, C. M.; REIMER, R. A.; SHARKEY, K. **A. Interactive effects of oligofructose and obesity predisposition on gut hormones and microbiota in diet-induced obese rats.** *Obesity*, v. 23, n. 4, p. 769-778, 2015.

COLLEONI-SIRGHIE, M.; FULTON, D. B.; WHITE, P. J. **Structural features of water soluble (1, 3)(1, 4)- β -D-glucans from high- β -glucan and traditional oat lines.** *Carbohydrate Polymers*, v. 54, n. 2, p. 237-249, 2003.

COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. **Selection of probiotic strains for human applications.** *International Dairy Journal*, Amsterdam, v.8, p.487-490, 1998.

CONFORTIN, F. G.; MARCHETTO, R.; BETTIN, F.; CAMASSOLA, M.; SALVADOR, M.; DILLON, A. J. P. **Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 35, n. 10, p. 1149-1155, 2008

COPPINI, L. Z. **Fibra Alimentar.** In: Congresso Brasileiro de Nutrição e Câncer. São Paulo–2004. 2004.

CORR S.C.; LI Y.; C.U.; RIEDEL, P.W.; O'TOOLE, C.; HILL, C.G.M.; GAHAN, C.G. **Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 18, p. 7617-7621, 2007.

COUTINHO, P.B.N.; FURLAN, S.A.; WISBECK, E.; GERN, R.M.M. **Avaliação do potencial terapêutico de *Pleurotus ostreatus*.** *Caderno de Iniciação à Pesquisa*, v.6, p. 60-63, 2004.

CUMMINGS, J.H. **The large intestine in nutrition and disease.** Brussels, Belgium: Institut Danone, p.1-155, 1997.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T.; ENGLYST, H.N. **Prebiotic digestion and fermentation.** The American Journal of Clinical Nutrition, v. 73, n. 2, p. 415s-420s, 2001.

PAIXÃO D.C.; SILVA, M.F.S. **Comparação entre coletas de amostras fecais para análise microbiológica em camundongos oralmente tolerizados.** Revista Brasileira de Medicina Veterinária, v.34, n.3, p.165-168, jul/set 2012.

SILVA, A.C.; JORGE, N. **Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes.** UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde, v. 13, n. 1, 2014.

DALLA SANTA, H. S. **Efeitos no metabolismo e ação imunomoduladora em camundongos do micélio de *Agaricus brasiliensis* produzido por cultivo no estado sólido.** Tese de doutorado em Processos Biotecnológicos, UFPR: Saúde Humana e Animal; 2006.

DALONSO, N.; SOUZA, R.; SILVEIRA, M. L. L.; RUZZA, A. A.; WAGNER, T. M.; WISBECK, E.; FURLAN, S. **A. Characterization and antineoplastic effect of extracts obtained from *Pleurotus sajor-caju* fruiting bodies.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 160, n. 8, p. 2265-2274, 2010.

DAVIDSON, M. H.; DUGAN, L. D.; BURNS, J. H.; BOVA, J.; STORY, K.; DRENNAN, K. B. **The hypocholesterolemic effects of β -glucan in oatmeal and oat bran: a dose-controlled study.** The Journal of the American Medical Association, v. 265, n. 14, p. 1833-1839, 1991.

DAVIS, B.D.; DULBECCO, R.; EISEN, H.N.; GINSBERG, H.S.; WOOD, W.B. **Infecções Bacterianas e Micóticas.** São Paulo: EDART; 1973.

DE LIMA, L.F.O. **Caracterização parcial e avaliação da atividade biológica de exopolissacarídeos produzidos por *agaricus brasiliensis* e bactéria láctica em fermentação submersa de gêneros isolados e em co-cultivo.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. 2008.

DE MELO BARBOSA, A.; DA CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; DA SILVA, M. D. L. C. **Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos.** Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.

DEL TORO, G. V.; VEGA, R. C.; GARÍN-AGUILAR, M. E.; LARA, H. L. **Biological quality of proteins from three strains of *Pleurotus* spp.** Food Chemistry, v. 94, n. 4, p. 494-497, 2006.

DELANEY, B.; CARLSON, T.; FRAZER, S.; ZHENG, T.; HESS, R.; OSTERGREN, K.; JONKER, D. **Evaluation of the toxicity of concentrated barley β -glucan in a 28-day feeding study in Wistar rats.** Food and Chemical Toxicology, v. 41, n. 4, p. 477-487, 2003.

DELLINGER, E. P.; BABINEAU, T. J.; BLEICHER, P.; KAISER, A. B.; SEIBERT, G. B.; POSTIER, R. G.; CONDON, R. E. **Effect of PGG-glucan on the rate of serious**

postoperative infection or death observed after high-risk gastrointestinal operations. Archives of Surgery, v. 134, n. 9, p. 977-983, 1999.

DIN, A. R. J. M.; RAZAK, S. A.; SABARATNAM, V. **Effect of mushroom supplementation as a prebiotic compound in super worm based diet on growth performance of Red Tilapia Fingerlings.** Sains Malaysiana, v. 41, n. 10, p. 1197-1203, 2012.

DONG, Q.; YAO, J.; YANG, X.-T.; FANG, J.-N. **Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr.** Carbohydrate Research, v. 337, n. 15, p. 1417–1421, 2002.

DONG, Y.; POELLINGER, L.; GUSTAFSSON, J. Å.; OKRET, S. **Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms.** Molecular Endocrinology, v. 2, n. 12, p. 1256-1264, 1988.

DUBOS, R.; SCHAEGLER, R. W.; COSTELLO, R.; HOET, P. **Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract.** The Journal of Experimental Medicine, v. 122, n. 1, p. 67-76, 1965.

DUNCAN SH.; BELENGUER A.; HOLTROP G.; JOHNSTONE AM, FLINT HJ, LOBLEY GE. **Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces.** Applied and Environment Microbiology, v.73, p. 1073–1078, 2007.

EL-KATTAN, M. H.; HELMY, Z. A.; EL LEITHY, M. A.; ABDELKWAH, K. A. **Studies on cultivation techniques and chemical composition of oyster mushrooms.** Mushroom Journal for the Tropics, v. 11, p. 59-66, 1991.

EMBRAPA. **Brasil estreita cooperação com a Coreia para aumentar a produção de cogumelos no país.** Disponível em <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2013/julho/3a-semana/brasil-estreita-cooperacao-com-a-coreia-para-aumentar-a-producao-de-cogumelos-no-pais/>. Acesso em 22/04/2014.

FABIAN, E.; MAJCHRZAK, D.; DIEMINGER, B.; MEYER, E.; ELMADFA, I. **Influence of probiotic and conventional yoghurt on the status of vitamins B1 B2 and B6 in young healthy women.** Annals of Nutrition and Metabolism, v.52, p. 29–36, 2008.

FACCHINI, J. M.; ALVES, E. P.; AGUILERA, C.; GERN, R. M. M.; SILVEIRA, M. L. L.; WISBECK, E.; FURLAN, S. A. **Antitumor activity of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma 180.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 68, p. 72-77, 2014.

FALCH, B. H.; ESPEVIK, T.; RYAN, L.; STOKKE, B. T. **The cytokine stimulating activity of (1→ 3)- β -D-glucans is dependent on the triple helix conformation.** Carbohydrate Research, v. 329, n. 3, p. 587-596, 2000.

FAO/WHO Working Group. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food.** Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, 2002. Disponível em: <http://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Acessado em 21 de agosto de 2015.

FAO/WHO. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. Cordoba – Argentina, 2001.

FAVORETTO S.M., CHAGAS C.R.F., GONZALEZ I.H., MYLASHIRO S. NASSAR A.F.C. **Microbiota Entérica de Rattus norvegicus do Biotério da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.** 2009. Disponível em: <http://www.spzoo.org.br/anais2010/microbiota_rattus.pdf>. Acesso em: 05 de junho. 2015.

FEMIA, A.P.; DOLARA, P., CADERNI, G. **Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoximethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis.** Carcinogenesis, v. 25, n. 2, p. 277-81, nov 2004.

FILLIOS, L. C.; ANDRUS, S. B.; MANN, G. V.; STARE, F. J. **Experimental production of gross atherosclerosis in the rat.** The Journal of experimental medicine, v.104, p.539–554, 1956.

FINIMUNDY, T. C.; GAMBATO, G.; FONTANA, R.; CAMASSOLA, M.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; ROESCH-ELY, M. **Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising *in vitro* antitumor activity.** Nutrition Research, v. 33, n. 1, p. 76-84, 2013.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. **The medicinal mushroom *Agaricus blazei* murrill: review of literature and pharmaco-toxicological problems.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 5, n. 1, p. 3-15, 2008.

FLINT, H.J.; SCOTT, K.P.; DUNCAN, S.H.; LOUIS, P.; FORANO, E. **Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut.** Gut Microbes, v.3, p.289–306, 2012.

FORESTIER, C.; DE CHAMPS, C.; VATOUX, C.; JOLY, B. **Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties.** Research in Microbiology, v.152, n.2, p. 167-173, 2001.

FORLAND, D. T.; JOHNSON, E.; TRYGGESTAD, A. M. A.; LYBERG, T.; HETLAND, G. **An extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei murill* stimulates monocyte-derived dendritic cells to cytokine and chemokine production *in vitro*.** Cytokine, v. 49, n. 3, p. 245-250, 2010.

FORTES, R. C.; RECÔVA, V. L.; MELO, A.L.; NOVAES, M. R. C. G. **Alterações gastrointestinais em pacientes com câncer colorretal em ensaio clínico com fungos *Agaricus sylvaticus*.** Revista Brasileira de Coloproctologia, v. 30, p. 586-596, 2010.

FRAGA, M.; SCAVONE, P.; PABLO, Z. **Preventive and therapeutic administration of an indigenous *Lactobacillus* sp. strain against *Proteus mirabilis* ascending urinary tract infection in a mouse model.** *Antonie van Leeuwenhoek*, 88, 25–34, 2005.

FRANK, J.; SUNDBERG, B.; KAMAL-ELDIN, A.; VESSBY, B.; ÅMAN, P. **Yeast-leavened oat breads with high or low molecular weight β -glucan do not differ in their effects on blood concentrations of lipids, insulin, or glucose in humans.** *The Journal of Nutrition*, v. 134, n. 6, p. 1384-1388, 2004.

FUJIOKA T.; NARA F.; TSUJITA Y.; FUKUSHIGE J.; FUKAMI M.; KURODA M. **The mechanism of lack of hypocholesterolemic effects of pravastatin sodium, a 3-hydroxy-3-methyl reductase inhibitor in rats.** *Biochimica Biophysica Acta*, v. 1254, p.7–12, 1995.

FURLAN, S. A.; GERN, R. M. M.; WISBECK, B.; BONATTI, M.; SILVEIRA, M. L. L.; SILVA, H. H. **Possibilities of *Pleurotus* applications in food, health and environmental technologies.** In: *Current topics on Bioprocesses in Food Industry*. Nova Delhi: Asiatech, p. 482-495, 2008.

FURLAN, S.A., VIRMOND, L.J., MIERS, D.A., BONATTI, M., GERN, R.M.M., JONAS, R. **Mushroom strains able to grow at high temperatures and low pH values.** *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 13, p.689-692, 1997.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. **Nutritional value of edible mushrooms.** *Food Science and Technology (Campinas)*, v. 27, n. 1, p. 154-157, 2007.

GANESHPURKAR, A.; RAI, G. **Experimental evaluation of analgesic and anti-inflammatory potential of Oyster mushroom *Pleurotus florida*.** *Indian journal of pharmacology*, v. 45, n. 1, p. 66, 2013.

GARCIA I.; CISNEROS F.; SEDRÉS J M. **Estudio de la actividad antimicrobiana en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* HB 184.** *Alimentaria*, n. 292, p. 63-65, 1998.

GEIER M.S.; BUTLER R.N.; HOWARTH G.S. **Probiotics, prebiotics and synbiotics. A role in chemoprevention of colorectal cancer?** *Cancer biology & therapy*, v.5, p. 1265–1269, 2006.

GERN, R. M. M.; WISBEK, E.; RAMPINELLI, J. R.; NINOW, J. L.; FURLAN, S. A. **Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides.** *Bioresource Technology*, v. 99, p.76-82, 2008.

GETHA, K.; HATSU, M.; WONG, H. J.; LEE, S. S. **Submerged cultivation of basidiomycete fungi associated with root diseases for production of valuable bioactive metabolites.** *Journal of Tropical Forest Science*, p. 1-7, 2009.

GHORAI, S.; BANIK, S. P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. **Fungal biotechnology in food and feed processing.** *Food Research International*, v. 42, n. 5, p. 577-587, 2009.

GHORASHI, S.; BUCKE, C.; KESHAVARZ, T. **Isolation of biologically active compounds from *Ganoderma* sp.** In: Proceedings of the 2nd International Conference on Medicinal Mushroom and the International Conference on Biodiversity and Bioactive Compounds. p.17-19. 2003.

GIANNENAS, I.; TSALIE, E.; CHRONIS, E.; MAVRIDIS, S.; TONTIS, D.; KYRIAZAKIS, I. **Consumption of *Agaricus bisporus* mushroom affects the performance, intestinal microbiota composition and morphology, and antioxidant status of turkey poults.** Animal Feed Science and Technology, v. 165, n. 3, p. 218-229, 2011.

GIAVASIS, I. **Production of microbial polysaccharides for use in food.** In Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals. Edited by McNeil B, Archer D, Giavasis I, Harvey L. Woodhead Publishing, p.413-468, 2013.

GIAVASIS, I.; BILIADERIS C. **Microbial polysaccharides.** In Functional Food Carbohydrates. Edited by Biliaderis C, Izydorczyk M. CRC Press, p.167-214, 2006.

GIAVASIS, I. **Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals.** Current Opinion in Biotechnology, v. 26, p. 162-173, 2014.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. **Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions.** Critical reviews in biotechnology, v. 20, n. 1, p. 17-48, 2000.

GIBSON G. R.; PROBERT H.M.; VAN LOO J.; RASTALL R.A.; ROBERFROID M.B. **Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics.** Nutrition Research Reviews, v. 17, p.259–75, 2004.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. **Dietary modulation of the human colonic microbiota introducing the concept of prebiotics.** Journal Nutrition. v.125, p. 1401–1412, 1995.

GLAZER, A.; NIKAIDO, H. **Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology,** W.H. Freeman: New York, p. 50, 1995.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F. X. ***Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic.** Trends and food science & technology, v.10, p.139-158, 1999.

GRATZ S.; WU Q.K.; EI-NEZAMI H.; JUVONEN R.O.; MYKKÄNEN H.; Turner P.C. ***Lactobacillus rhamnosus* strain GG reduces aflatoxin B1 transport, metabolism, and toxicity in Caco-2 cells.** Applied and Environmental Microbiology, v.73, p. 3958–3964, 2007.

GRATZ, S. et al. **Lactobacillus rhamnosus strain GG modulates intestinal absorption, fecal excretion, and toxicity of aflatoxin B1 in rats.** Applied and Environmental Microbiology, v. 72, n. 11, p. 7398-7400, 2006.

GRUBBS, F.E. **Procedures for detecting outlying observations in samples.** Technometrics, v. 11, n. 1, p. 1-21, 1969.

GUARNER F.; KHAN A.G.; GARISCH J, et al. **Probiotics and prebiotics.** 2011. Disponível em: <http://www.worldgastroenterology.org/probiotics-prebiotics.html>. Acessado em 21 de agosto de 2015.

GUARNER, F. **Inulin and oligofructose: impact on intestinal diseases and disorders.** British Journal of Nutrition, v. 93, n. S1, p. S61-S65, 2005.

GUNDE-CIMERMAN, N.; CIMERMAN, A. **Pleurotus fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase lovastatin.** Experimental Mycology, v. 19, n. 1, p. 1-6, 1995.

GUO, F. C.; WILLIAMS, B. A.; KWAKKEL, R. P.; LI, H. S.; LI, X. P.; LUO, J. Y.; VERSTEGEN, M. W. **Effects of mushroom and herb polysaccharides, as alternatives for an antibiotic, on growth performance of broilers.** British Poultry Science, v. 45, n. 5, p. 684-694, 2004.

GUPTA, N. **Preliminary phytochemical screening of different extracts of Pleurotus florida.** Columbia Journal of Pharmaceutical Sciences, v.1, p.23- 26, 2014.

GUTIÉRREZ, A.; PIETRO, A.; MARTÍNEZ, A. T. **Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus Pleurotus.** Carbohydrate Research, Kidlington, v.281, p.143-154, 1996.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. **Natural products as antimicrobial agentes.** Journal of Food Control, v. 46, p. 412-429, dez. 2014.

HAULY, M. C. O.; MOSCATTO, J. A. **Inulina e Oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos.** Semina, v. 23, n. 1, p. 105-18, 2002.

HECKER, K.; MEIER, M.; NEWMAN, R.; NEWMAN, C. **Barley β -glucan is effective as a hypocholesterolaemic ingredient in foods.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 77, n. 2, p. 179-183, 1998.

HENKER, J.; LAASS, M.; BLOKHIN, B. M.; BOLBOT, Y. K.; MAYDANNIK, V. G.; ELZE, M.; WOLFF, C.; SCHULZE, J. **The probiotic Escherichia coli strain nissle 1917 (Ecn) stops acute diarrhoea in infants and toddlers.** European Journal of Pediatrics, Berlin, v. 166, n. 4, p. 311–318, 2007.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; REEB, V. **A higher level phylogenetic classification of the Fungi.** Mycological Research, v. 111, n. 5, p. 509–547, 2007.

HOLMES E.; LOO R.; STAMLER J.; BICTASH M.; YAP IK.; CHAN Q.; EBBELS T.; DE IORIO M.; BROWN I.J.; VESELKOV K.A.; DAVIGLUS M.L.; KESTELOOT H.; UESHIMA H.; ZHAO L.; NICHOLSON J.K.; ELLIOTT P. **Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure.** *Nature*, v. 453, n. 7193, p. 396-400, 2008.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL. **Overview of gut flora and probiotics.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 41, n. 2, p. 85-101, 1998.

HONG, H. A.; DUC, L. H.; CUTTING, S. M. **The use of bacterial spore formers as probiotics.** *FEMS, Microbiology Reviews*, 29, 815-835, 2004.

HOZOVA, B.; KUNIAK, L.; KELEMENOVA, B. **Application of β -d-glucans isolated from mushrooms *Pleurotus ostreatus* (Pleuran) and *Lentinus edodes* (Lentinan) for increasing the bioactivity of yoghurts.** *Czech Journal of Food Sciences*, v. 22, n. 6, p. 204-214, 2004.

HU, S. H.; WANG, J. C.; LIEN, J. L.; LIAW, E. T.; LEE, M. Y. **Antihyperglycemic effect of polysaccharide from fermented broth of *Pleurotus citrinopileatus*.** *Applied Microbiology And Biotechnology*, v. 70, n. 1, p. 107-113, 2006.

HUGHES, S. A.; SHEWRY, P. R.; GIBSON, G. R.; MCCLEARY, B. V.; RASTALL, R. A. ***In vitro* fermentation of oat and barley derived β -glucans by human faecal microbiota.** *FEMS Microbiology Ecology*, v. 64, n. 3, p. 482-493, 2008.

IJI P.A; TIVEY D.R. **Natural and synthetic oligosaccharides in broiler chicken diets.** *Word's Poultry Science Journal*. v.54, p. 129-143, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA; ESTATÍSTICA. **Censo agropecuário 2006: resultados preliminares.** IBGE, 2006.

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

JASKARI, J.; KONTULA, P.; SIITONEN, A.; JOUSIMIES-SOMER, H.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POUTANEN, K. **Oat β -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 49, n. 2, p. 175-181, 1998.

JUNTUNEN, K. S.; NISKANEN, L. K.; LIUKKONEN, K. H.; POUTANEN, K. S.; HOLST, J. J.; MYKKÄNEN, H. M. **Postprandial glucose, insulin, and incretin responses to grain products in healthy subjects.** *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 75, n. 2, p. 254-262, 2002.

KALANTZOPOULOS, G. **Fermented products with probiotic qualities.** *Anaerobe*, v. 3, p. 185–190, 1997.

KALRA, S.; JOOD, S. **Effect of dietary barley β -glucan on cholesterol and lipoprotein fractions in rat.** Journal of Cereal Science, v. 31, n. 2, p. 141-145, 2000.

KANAGASABAPATHY, G.; KUPPUSAMY, U. R.; MALEK, S. N. A.; ABDULLA, M. A.; CHUA, K.H.; SABARATNAM, V. **Glucan-rich polysaccharides from *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer prevents glucose intolerance, insulin resistance and inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet.** BMC complementary and alternative medicine, v. 12, n. 1, p. 261, 2012.

KANAGASABAPATHY, G.; MALEK, S. N. A.; MAHMOOD, A. A.; CHUA, K. H.; VIKINESWARY, S.; KUPPUSAMY, U. R. **Beta-glucan-rich extract from *Peurotus sajor-caju* (Fr.) singer prevents obesity and oxidative stress in C57BL/6J mice fed on a high-fat diet.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2013, 2013.

KANG, K.S.; COTTRELL, I.W. **Polysaccharides in Microbial Technology.** Peppler, H. J.; Perlman, D., eds.; Academic Press: New York, p. 417, 1979.

KELLY, D.; KING, T.; AMINOV, R. **Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity.** Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 622, n. 1, p. 58-69, 2007.

KERCKHOFFS, D.; BROUNS, F.; HORNSTRA, G.; MENSINK R **Effects on the human serum lipoprotein profile of β -glucan, soy protein and isoflavones, plant sterols and stanols, garlic and tocotrienols.** The Journal of Nutrition, v. 132, n. 9, p. 2494-2505, 2002.

KHAN F.; RIZVI M.; SHUKLA I.; MALIK A. **A novel approach for identification of members of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical samples.** Biology and Medicine, v.3, n.2, p.313-319, 2011.

KHOURY D.; CUDA, C.; LUHOVYY, B.L.; ANDERSON. G.H. **"Beta Glucan: health benefits in obesity and metabolic syndrome"**. Journal of Nutrition and Metabolism, vol. 2012, Article ID 851362, 28 pages, 2012.

KIM, S. W.; XU, C. P.; HWANG, H. J.; CHOI, J. W.; KIM,C. W.; YUN, J.W. **Production and characterization of exopolyasaccharides from an entomopathogenic fungus *Cordyceps militaris* NG3.** Biotechnology Progress, New York, v. 19, n. 2, p. 428-435, 2003.

KIRK, P.M.; CANON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the fungi.** Wallingford. CAB International, 2008.

KOMURA, D.L.; RUTHES, A.C.; CARBONERO, E.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. **Water-soluble polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* var. *florida* mycelial biomass.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 70, p. 354-359, 2014.

KONEMAN, E.W.; ALLEN S.D.; JANDA W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **The *Enterobacteriaceae*.** In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic

Microbiology, Baltimore, L.W.W. (Ed.). 5th Edn., JB Lippincott Co., Philadelphia, p. 171-230, 1997.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. Texto e Atlas Colorido. 5. Ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

KRUIS, W.; FRIC, P.; POKROTNIKES, J.; LUKAS, M.; FIXA, B.; KASCAK, M.; KAMM, M. A.; WEISMUELLER, J.; BEGLINGER, C.; STOLTE, M.; WOLFF, C.; SCHULZE, J. **Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine**. Gut, London, v. 53, n. 11, p. 1617–1623, 2004.

KUNJADIA, P. D.; NAGEE, A., PANDYA, P. Y.; MUKHOPADHYAYA, P. N.; SANGHVI, G. V.; DAVE, G. S. **Medicinal and Antimicrobial Role of the Oyster Culinary-Medicinal Mushroom *Pleurotus ostreatus* (Higher Basidiomycetes) Cultivated on Banana Agrowastes in India**. International Journal of Medicinal Mushrooms, v.16, n. 3, p. 227-238, 2014.

KURBANOGU, E. B.; ALGUR, O. F.; ZULKADIR, A. **Submerged production of edible mushroom *Agaricus bisporus* mycelium in ram horn hydrolysate**. Industrial Crops and Products, v. 19, n. 3, p. 225-230, 2004.

LACERDA, F. V.; PACHECO, M. T. T. **A ação das fibras alimentares na prevenção da constipação intestinal**. Universidade do Vale do Paraíba, p. 2466-2469, 2006.

LACROIX, M.; GAUDICHON. C.; MARTIN A.; MORENS C.; MATHÉ V.; TOMÉ D. **A long-term high-protein diet markedly reduces adipose tissue without major side effects in Wistar male rats**. American Journal of Physiology, v. 287, n. 4, p.934-942, 2004.

LAKHANPAL, T. N.; RANA, M. **Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms**. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization, v. 3, n. 02, p. 288-303, 2005.

LANGLANDS, S. J.; HOPKINS, M. J.; COLEMAN, N.; CUMMINGS, J. H. **Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel**. Gut, v. 53, n. 11, p. 1610-1616, 2004.

LAVI, I.; FRIESEM, D.; GERESH, S.; HADAR, Y.; SCHWARTZ, B. **An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells**. Cancer Letters, v.244, p.61-70, 2006.

LAYMAN, D.K.; EVANS, E.; BAUM, J.I.; SEYLER, J.; ERICKSON, D.J.; BOILEAU, RA. **Dietary protein and exercise have additive effects on body composition during weight loss in adult women**. Journal of Nutrition, v. 135, n. 8, p. 1903-1910, 2005.

LEADBETTER, J.; BALL, M.J.; MANN, J.I. **Effects of increasing quantities of oat bran in hypercholesterolemic people.** The American Journal of Clinical Nutrition, v. 54, n. 5, p. 841-845, 1991.

LEAHY, S. C.; HIGGINS, D. G.; FITZGERALD, G. F.; SINDEREN, D. V. **Getting better with *Bifidobacteria*.** Journal of Applied Microbiology, v. 98, n. 6, p. 1303-1315, 2005.

LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics.** New York: Wiley, p. 211, 1999.

LI Y.R.; LIU Q.H.; WANG H.X, **A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*.** Biochimica Biophysica Acta v.1780, p.51–57, 2008.

LI, S.; SHAH, N.P. **Effects of *Pleurotus eryngii* polysaccharides on bacterial growth, texture properties, proteolytic capacity, and angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory activities of fermented milk.** Journal of Dairy Science, v. 98, n.5, p. 2949-2961, 2015.

LINDEQUIST U.; NIEDERMAYER T.H.; JU LICH W.D. **The pharmacological potential of mushrooms.** Evidence based Complementary and Alternative Medicine, v.2, p.285-299, 2005.

LITCHFIELD, J. H. **Morel mushroom mycelium as a food-flavoring material.** Biotechnology and Bioengineering, v. 9, n. 3, p. 289-304, 1967.

LIU, C.; LIN, Q.; GAO, Y.; YE, L.; XING, Y.; XI, T. **Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nuduseggs*.** Carbohydrate Polymers, v.67, p. 313–318, 2007.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. **Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products.** Food Research International, v. 34, n. 9, p. 791-796, 2001.

LOVEGROVE, J. A.; CLOHESSY, A.; MILON, H.; WILLIAMS, C. M. **Modest doses of β -glucan do not reduce concentrations of potentially atherogenic lipoproteins.** The American journal of clinical nutrition, v. 72, n. 1, p. 49-55, 2000.

MACFARLANE, G. T.; STEED, H.; MACFARLANE, S. **Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics.** Journal of Applied Microbiology, v. 104, n. 2, p. 305-344, 2008.

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. **Beta-glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção.** Semina: Ciências Agrárias, v. 29, n. 3, p. 631-650, 2008.

MAITI, S.; BHUTIA, S. K.; MALLICK, S. K.; KUMAR, A.; KHADGI, N.; MAITI, T. K. **Antiproliferative and immunostimulatory protein fraction from edible mushrooms.** Environmental Toxicology and Pharmacology, v.26, p.187-191, 2008.

MAJI, P. K.; SEN, I. K.; DEVI, K. S. P.; MAITI, T. K.; SIKDAR, S. R.; ISLAM, S. S. **Structural elucidation of a biologically active heteroglycan isolated from a hybrid mushroom of *Pleurotus florida* and *Lentinula edodes***. Carbohydrate Research, v. 368, p. 22-28, 2013.

MANZI, P.; GAMBELLI, L.; MARCONI, S.; VIVANTI, V.; PIZZOFERRATO, L. **Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study**. Food Chemistry, v.65, p. 477–482, 1999.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. **Beta-glucans in edible mushrooms**. Food Chemistry, v. 68, n. 3, p. 315-318, 2000.

MARGARITIS, A.; PACE, G. W. **Comprehensive Biotechnology: the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**; Blanch, H. W.; Drew, S.; Wang, D. I. C., eds.; Pergamon Press: New York, p. 1005, 1985.

MATOS, A.M. **Pesquisa e caracterização de substância(s) antagonista(s) do tipo Bacteriocina produzida(s) por amostras de *Lactobacillus murinus***. Departamento de microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, (Dissertação de Mestrado), 2007.

MATTILA, P.; SUONPÄÄ, K.; PIIRONEN, V. **Functional properties of edible mushrooms**. Nutrition, v. 16, n. 7, p. 694-696, 2000.

MAZIERO, R. **Produção de exopolissacarídeos por basidiomicetos em cultura submersa: “Screening”, caracterização química preliminar e estudo de produção utilizando *Irpex lacteus* (Fr.:Fr)**. Tese de Doutorado - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, v.112, 2000.

MAZIERO, R.; BONONI, V. L.; ADAMI, A.; CAVAZZONI, V. **Exopolysaccharide and biomass production in submerged culture by edible mushrooms**. Mushroom Science, v. 14, p. 887-892, 1995.

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

MDACHI, Stephen JM et al. **Amino acid composition of some Tanzanian wild mushrooms**. Food Chemistry, v. 86, n. 2, p. 179-182, 2004.

MENG, TIAN-XIAO; ISHIKAWA, HIROYA; SHIMIZU, KUNIYOSHI. **A glucosylceramide with antimicrobial activity from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus***. Journal of Wood Science, v. 58, n.1, p. 81-86, 2012.

METZLER-ZEBELI, Barbara U. et al. **Dietary calcium phosphate content and oat β -glucan influence gastrointestinal microbiota, butyrate-producing bacteria and butyrate fermentation in weaned pigs**. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology, v. 75, n. 3, p. 402-413, 2011.

MIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARCON, R.; IACOMINI, M. **Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→ 3),(1→ 6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*.** European Journal of Pharmacology, v. 597, n. 1, p. 86-91, 2008.

MINAGAWA, C.Y. **Estudo microbiológico fecal de linhagens de camundongos, de estirpes de *E. coli* e do meio ambiente em biotérios.** 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MITSOU, E. K.; PANOPOULOU, N.; TURUNEN, K.; SPILLOTIS, V.; KYRIACOU, A. **Prebiotic potential of barley derived β -glucan at low intake levels: A randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical study.** Food Research International, v. 43, n. 4, p. 1086-1092, 2010.

MIZUNO T. **The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review).** International Journal of Medicinal Mushrooms, v. 1, p. 9-29, 1999.

MOMOSE, Y.; HIRAYAMA, K.; ITOH, Kikuji. **Effect of organic acids on inhibition of *Escherichia coli* O157: H7 colonization in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota.** Antonie Van Leeuwenhoek, v. 93, n. 1-2, p. 141-149, 2008.

MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; PRAMANIK, M.; ROUT, D.; SYED, S.; ISLAM, S. S. **Structural studies of water-soluble polysaccharides of an edible mushroom, *Termitomyces eurhizus*.** A Reinvestigation Carbohydrate Research, Amsterdam, v. 339, n. 6, p. 1135–1140, 2004.

MONTAGNE, L.; TOULLEC, R.; LALLES, J. P. **Calf intestinal mucin: isolation, partial characterization, and measurement in ileal digesta with an enzyme-linked immunosorbent assay.** Journal of Dairy Science, Champaign, n. 3, v. 83, p.507-517, 2000.

MONTEIRO, C.M.A.; WISBECK, E.; FURLAN, S.A. **Obtenção do melhor tempo para produção de exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor caju* em frascos agitados.** Caderno de Iniciação à Pesquisa, v. 8, p.719-722, 2006.

MOONMOON, M.; UDDIN, M. N.; AHMED, S.; SHELLY, N. J.; KHAN, M. A. **Cultivation of different strains of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) on saw dust and rice straw in Bangladesh.** Saudi Journal of Biological Sciences, v. 17, n. 4, p. 341-345, 2010.

MORADALI, M.F.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S.; HEDJAROUDE, G. A. **Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi).** International Immunopharmacology, v.7, p. 701–724, 2007.

MORAES, A. M. L.; ALMEIDA-PAES, R.; HOLANDA, V. L. Micologia. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Assis: Triunfal Gráfica e Editora, p. 399-496, 2010.

MÜELLER, G.M.; BILLS, G. **Introduction**. In: **Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods**. (ed.). Elsevier Academic Press, p. 1-4, 2004.

MURPHYA, P.; DAL BELLO, F.; O'DOHERTY, J.; ARENDT, E. K.; SWEENEY, T.; COFFEY, A. **The effects of liquid versus spray-dried *Laminaria digitata* extract on selected bacterial groups in the piglet gastrointestinal tract (GIT) microbiota**. Anaerobe, v. 21, p. 1-8, 2013.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. **Manual of clinical microbiology**. Washington: ASM Press, p. 649-69, 2007.

NARDI R.M.D.; SANTORO M.M.; OLIVEIRA J.S.; PIMENTA A.M.C.; FERRAZ V.P.; BENCHETRIT L.C.; NICOLI JR. **Purification and molecular characterization of antibacterial compounds produced by *Lactobacillus murinus* strain L1**. Applied and Environmental Microbiology, v.99, p.649 -656, 2005.

NAUMANN, E.; VAN REES, A. B.; ÖNNING, G.; ÖSTE, R.; WYDRA, M., MENSINK, R. P. **β -Glucan incorporated into a fruit drink effectively lowers serum LDL-cholesterol concentrations**. The American Journal of Clinical Nutrition, v. 83, n. 3, p. 601-605, 2006.

NEE'NIGAM, P.S. **Production of bioactive secondary metabolites**. In: Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation. Springer Netherlands, 2009. p. 129-145.

NOVAES M.R.C.G.; FORTES R.C. **Efeitos antitumorais de cogumelos comestíveis da família *Agaricaceae***. Revista de Nutrição do Brasil, v.4, n.4, p.207-217, 2005.

NOVAES M.R.C.G.; NOVAES L.C.G. **Fármaco-nutrientes em cogumelos comestíveis *Agaricales* e outros basidiomicetos**. Revista Brasileira de Nutrição Clínica, v.20, n.3, p.181-187, 2005.

O'SHEA, C. J. et al. **Effect of β -glucans contained in barley-and oat-based diets and exogenous enzyme supplementation on gastrointestinal fermentation of finisher pigs and subsequent manure odor and ammonia emissions**. Journal of animal science, v. 88, n. 4, p. 1411-1420, 2010.

PALACIOS, I.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A. **Novel isolation of water-soluble polysaccharides from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms**. Carbohydrate Research, v. 358, p. 72-77, 2012.

PANG, Z.; OTAKA, K.; MAOKA, T.; HIDAKA, K.; ISHIJIMA, S.; ODA, M.; OHNISHI, M. **Structure of β -glucan oligomer from laminarin and its effect on human monocytes to inhibit the proliferation of U937 cells**. Bioscience and Biotechnology Biochemistry, Tokyo, v. 69, n. 3, p. 553-558, 2005.

PATEL, A.K.; MICHAUD, P.; SINGHANIA, R.R.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. **Polysaccharides from probiotics: new developments as food additives**. Food Technology and Biotechnology, v. 48, n. 4, p. 451-463, 2010.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia**. São Paulo: Makron Books, v.2, p.22-40, 1996.

PICARD, B.; SEVALI-GARCIA, J.; GOURIOU, S.; DURIEZ, P.; BRAHIMI, N.; BINGEN, E.; ELION, J.; DENAMUR, E. **The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection**. Infection and Immunity, v.67, p.546–553, 1999.

PIEPER, R. et al. **Effect of barley and oat cultivars with different carbohydrate compositions on the intestinal bacterial communities in weaned piglets**. FEMS microbiology ecology, v. 66, n. 3, p. 556-566, 2008.

PIEPER, R. et al. **Effect of carbohydrate composition in barley and oat cultivars on microbial ecophysiology and proliferation of *Salmonella enterica* in an *in vitro* model of the porcine gastrointestinal tract**. Applied and Environmental Microbiology, v. 75, n. 22, p. 7006-7016, 2009.

POKHREL, C. P.; OHGA, S. **Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes***. Food Chemistry, v.105, p.641-646, 2007.

POOL-ZOBEL, B.L. **Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data**. British Journal of Nutrition., v. 93, n. 1, p. S73–S90, 2005.

PRADO, F. C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de bebida probiótica a base de Água de coco**. Tese Doutorado, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, 2007.

PRAMANIK, M.; MONDAL, S.; CHAKRABORT, I.; ROUT, D.; ISLAM, S.S. **Structural investigation of a polysaccharide (Fr. II) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju***. Carbohydrate Research, v.340, p.629–636. 2007.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **The Fungi (*Eumycota*) Slime molds and water molds**. Microbiology, 5th Ed. McGraw-Hill New York, p. 554-569, 2002.

PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. **Microbiology**.5.ed. McGraw Hill, 2002.

PRETER, V.; HAMER, H. M.; WINDEY, K.; VERBEKE, K. **The impact of pre-and/or probiotics on human colonic metabolism: Does it affect human health?** Molecular Nutrition & Food Research, v. 55, n. 1, p. 46-57, 2011.

PROBERT H.M.; GIBSON G.R. **Investigating the prebiotic and gas-generating effects of selected carbohydrates on the human colonic microflora.** Letters to Applied Microbiology, v.35, p.473–480, 2002.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos.** Santa Cruz do Sul: EDUNISC, v. 2, 2002.

RAGUNATHAN, R.; GURUSAMY, R.; PALANISWAMY, M., SWAMINATHAN, K. **Cultivation of *Pleurotus* spp. on various agro-residues.** Food Chemistry, v. 55, n. 2, p. 139-144, 1996.

RAGUNATHAN, R.; SWAMINATHAN, K. **Nutritional status of *Pleurotus* spp. grown on various agro-wastes.** Food Chemistry, London, v. 80, n.3, p. 371-375, 2003.

RAMOS, M.H.D.S.S. **Resistência em bactérias de Gram-negativo.** Cadernos de Saude Publica, Universidade Católica Portuguesa. v. 3, p. 93, 2010.

RAKOFF-NAHOUM, S.; PAGLINO, J.; ESLAMI-VARZANEH, F.; EDBERG, S.; MEDZHITOV, R. **Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis.** Cell, v.118, n. 2, p. 229-241, 2004.

RAMPINELLI, J.R.; SILVEIRA, M. L. L.; GERN, R. M. M.; FURLAN, S. A.; NINOW, J. L.; WISBECK, E. **Valor nutricional de *Pleurotus djamor* cultivado em palha de bananeira.** Revista de alimentos e nutrição, v. 21, n. 2, p. 197-202, 2010.

REID, G. **The scientific basis for Probiotic strains of *Lactobacillus*.** Applied and Environmental Microbiology, n.65, p.3763–3766, 2001.

REILLY, P. et al. **The effects of cereal-derived β -glucans and enzyme supplementation on intestinal microbiota, nutrient digestibility and mineral metabolism in pigs.** Livestock Science, v. 133, n. 1, p. 144-147, 2010.

RELMAN, D.A. **Microbiology: learning about who we are.** Nature, v. 486, n. 7402, p. 194-195, 2012.

RIBEIRO, CAGNONI, M. **Microbiologia prática:roteiro e manual: bactérias e fungos,** São Paulo: Atheneu, 2005.

ROACH P.D.; BALASUBRAMANIAM S.; HIRATA F. **The low density lipoprotein receptor and cholesterol synthesis are affected differently by dietary cholesterol in the rat.** Biochimica et Biophysica Acta., v.1170, p.165–172, 1993.

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

ROBERFROID, Marcel. **Functional food concept and its application to prebiotics.** Digestive and Liver Disease, v. 34, p. S105-S110, 2002.

ROLLER, M.; RECHKEMMER, G.; WATZL, B. **Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune function in rats.** Journal Nutrition, v.134, p. 153–156, 2004.

ROSS, G. D.; VĚTVIČKA, V.; YAN, J.; XIA, Y.; VĚTVIČKOVÁ, J. **Therapeutic intervention with complement and β -glucan in cancer.** Immunopharmacology, v. 42, n. 1, p. 61-74, 1999.

ROUT, D.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; PRAMANIK, M.; ISLAM, S. S. **Chemical analysis of a new (1 \rightarrow 3)-,(1 \rightarrow 6)-branched glucan from an edible mushroom, *Pleurotus florida*.** Carbohydrate Research, v. 340, n. 16, p. 2533-2539, 2005.

RUSSELL W.R.; GRATZ S.W.; DUNCAN S.H.; HOLTROP G.; INCE J.; SCOBIE L. **High protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health.** American Journal of Clinical Nutrition, v.93, p.1062–1072, 2011.

RUTHES, A.C.; SMIDERLE, F.R.; IACOMINI, M. **D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches.** Carbohydrate polymers, v. 117, p. 753-761, 2015.

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

SANCHÉS, A.; YSUNZA, F.; BELTÁN-GARCIA, M. J.; ESQUEDA, M. **Biodegradation of viticulture wates by *Pleurotus*: a source of microbial and human food and its potential use in animal feeding.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v.50, n.9, p.2537-2542, 2002.

SÁNCHEZ, C. **Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi.** Biotechnology Advances, v. 27, p. 185–194, 2009.

SANDERS, M.E., KLAENHAMMER, T.R. **Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic.** Journal of Dairy Science, v.84, p.319-331, 2001.

SANTOS T.T.; VARAVALLO M.A. **A importância de probióticos para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal.** Revista científica ITPAC, v.4;n.1, p. 40-49, 2011.

SANTOS, F.; VERA, J. L.; VAN DER HEIJDEN, R.; VALDEZ, G.; DE VOS, W. M.; SESMA, F.; HUGENHOLTZ, J. **The complete coenzyme B12 biosynthesis gene cluster of *Lactobacillus reuteri* CRL1098.** Microbiology, v.154, p. 81–93, 2008.

SANTOS-NEVES, J. C.; PEREIRA, M. I.; CARBONERO E. R.; GRACHER, A. H. P.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. **A gel-forming b-glucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida*.** Carbohydrate Research, v. 343, p.1456-1462, 2008.

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

SARANGI, I.; DIPANJAN, G.; SUJIT, K. B.; MALLICK, S. K.; MAITI, T. K. **Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans**. International Immunopharmacology, v.6, p.1287-1297, 2006.

SASAKI, Y.; TAKASURA, N. **Further study of the structure of lentinan, an anti-tumor polysaccharide from *Lentinus edodes***. Carbohydrate Research, v. 47, p. 99-104, 1976.

SCHAEDLER, R. W.; DUBOS, R.; COSTELLO, R. **The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice**. The Journal of Experimental Medicine, v. 122, p. 59–66, 1965.

SCHILLACI, D.; ARIZZA, V.; GARGANO, M. L.; VENTURELLA, G. **Antibacterial Activity of Mediterranean Oyster Mushrooms, Species of Genus *Pleurotus* (Higher Basidiomycetes)**. International Journal of Medicinal Mushrooms, v.15, n. 6, p. 591-594, 2013.

SCHLEE, M.; WEHKAMP, J.; ALTENHOEFER, A.; OELSCHLAEGER, T. A.; STANGE, E. F.; FELLERMANN, K. **Induction of human defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* nissle 1917 is mediated through flagellin**. Infection and Immunity, v. 75, n. 5, p. 2399–2407, 2007.

SCHORTEMAYER, M.; HARTWIG, U.A.; HENDREY, G.R.; SADOWSKY, M.J. **Microbial community changes in the rhizospheres of white clover and perennial ryegrass exposed to free air carbon dioxide enrichment (face)**. Soil Biology and Biochemistry, v.28, p.1717-1724, 1996.

SCHOTT, E.; HEYDER, C.D.T.; PEREIRA, E.M.; OURIQUES, M.M.; ROSA, H.H.; FURLAN, S.A.; GERN, R.M.M. **Effect of polysaccharides extracted from *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus blazei* on growth of probiotic bacteria**. Journal of International Scientific Publications: Agriculture Food, Bulgaria (EU), v.1, 2013.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. **Probiotics, prebiotics, and synbiotics approaching a definition**. The American Journal of Clinical Nutrition, v. 73, n. 2, p. 361s-364s, 2001.

SCHULTZ, M.; STRAUCH, U. G.; LINDE, H.; WATZL, S.; OBERMEIER, F.; GÖTTL, C.; DUNGER, N.; GRUNWALD, N.; SCHÖLMERICH, J.; RATH, H. C. **Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis**. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, v. 11, n. 2, p. 372-378, 2004.

SELVI, S.; UMADEVI, P.; MURUGAN, S.; SENAPATHY, G.J. **Anticancer potential evoked by *Pleurotus florida* and *Calocybe indica* using T24 urinary bladder cancer cell line**. African Journal of Biotechnology, n.10, p.7279–7285, 2011.

SHAH, N.P. **Functional cultures and health benefits**. International Dairy Journal, v. 17, n. 11, p. 1262-1277, 2007.

SHANG, H. M.; SONG, H.; SHEN, S. J.; YAO, X.; WU, B.; WANG, L. N.; DING, G. D. **Effects of dietary polysaccharides from the submerged fermentation concentrate of *Hericium caput-medusae* (Bull.: Fr.) Pers. on fat deposition in broilers**. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 95, n. 2, p. 267-274, 2015.

SHARIF, S; SHAHID, M.; SHEIKH, M.A. **Antimicrobial Evaluation of Different Wild and Commercial Mushroom Species**. Journal of Pure and Applied Microbiology, v. 8, n. 6, p. 4565-4571, 2014.

SHEN, R. L.; DANG, X. Y.; DONG, J. L.; HU, X. Z. **Effects of oat β -glucan and barley β -glucan on fecal characteristics, intestinal microflora, and intestinal bacterial metabolites in rats**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 60, n. 45, p. 11301-11308, 2012.

SHER, H.; AL-YEMENI, M.; BAHKALI, A. H.; SHER, H. **Effect of environmental factors on the yield of selected mushroom species growing in two different agro ecological zones of Pakistan**. Saudi Journal of Biological Sciences, v. 17, n. 4, p. 321-326, 2010.

SHOBA, F.G.; THOMAS, M. **Study of antidiarrhoeal activity of four medicinal plants in castor oil induced diarrhoea**. Journal of Ethnopharmacology, v. 76, p. 73-76, 2001.

SHRINIVAS, S.; LAKSHMI, K. S.; RAJESH, T. **Evaluation of antidiarrhoeal potentials of ethanolic extract of leaves of *Holoptelea integrifolia* in mice model**. International Journal of Pharmaceutical Research, v. 1, n. 3, p. 832-836, 2009.

SILVA JÚNIOR, C.; SASSON, S. **Biologia**. São Paulo: Ed Saraiva. 8ª edição, p. 55, 2005.

SILVA, E. V. D.; CARBONERO, E. R.; RUTHES, A. C.; GORIN, P. A.; IACOMINI, M. **Structural elucidation of polysaccharides isolated of comestible mushroom *Pleurotus sajor-cashew* ('Houbitake')**. Annual meeting of the Brazilian Chemical Society. Chemistry for a better world, Florianópolis, 2011.

SILVA, E.R.; SOUZA, A.S. **Introdução ao Estudo da Microbiologia: teoria e prática**. EDITORA IFB, Brasília. n. 12, 2014.

SILVA, M. L. C.; MARTINEZ, P F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S. **Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas**. Química Nova, v.29, p.85-92, 2006.

SILVEIRA, M. L. L.; SMIDERLE, F. R.; AGOSTIN, F.; PEREIRA, E. M.; BONATTI-CHAVES, M.; WISBECK, E.; RUTHES, A. C.; SASSAKI, G. L.; CIPRIANI, T. R.; FURLAN, S. A.; IACOMINI, M. **Exopolysaccharide produced by *Pleurotus sajor-***

caju: Its chemical structure and anti-inflammatory activity. International Journal of Biological Macromolecules, v. 75 p. 90-96, 2015.

SKOV, A.R.; TOUBRO, S.; RONN, B.; HOLM, L.; ASTRUP, A. **Randomized trial on protein vs carbohydrate in ad libitum fat reduced diet for the treatment of obesity.** The International Journal of Obesity. v. 23, n. 5, p. 558-36, 1999.

SMIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARCON, F.; SANTOS, A. R. S.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. **Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3),(1→6)-linked β-glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*.** European Journal of Pharmacology, v.597, p.86-91, 2008.

SMIDERLE, F. R.; SASSAKI, G. L.; VAN GRIENSVEN, L. J.; IACOMINI, M. **Isolation and chemical characterization of a glucogalactomannan of the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*.** Carbohydrate Polymers, v.97, n.1, p.74-80, 2013.

SMITH, J.; ROWAN, N. J.; SULLIVAN, R. **Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments.** Cancer Research UK. University of Strathclyde, Maio, 2002.

SMOLSKAITE, L.; VENSKUTONIS, P.R.; TALOU, T. **Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species.** Lwt-Food Science and Technology, v.60, n.1, p. 462-471, 2015.

SNART, J.; BIBILONI, R.; GRAYSON, T.; LAY, C.; ZHANG, H.; ALLISON, G. E.; TANNOCK, G. W. **Supplementation of the diet with high-viscosity beta-glucan results in enrichment for lactobacilli in the rat cecum.** Applied and Environmental Microbiology, v. 72, n. 3, p. 1925-1931, 2006.

SODEN, D. M.; O'CALLAGHAN, J.; DOBSON, A. D. W. **Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host.** Microbiology, v. 148, n. 12, p. 4003-4014, 2002.

SOLANO-AGUILAR, G.; DAWSON, H.; RESTREPO, M.; ANDREWS, K.; VINYARD, B.; URBAN, J. F. **Detection of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis (Bb12) in the intestine after feeding of sows and their piglets.** Applied and Environmental Microbiology, v. 74, n. 20, p. 6338-6347, 2008.

SOLOMKO, E. F. **The physiology-biochemical properties and biosynthetic activities of higher Basidiomycetes mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. In submerged culture: Dr. Sci. Tese de Doutorado. Thesis, NG Kholodny Inst. Of Botany Acad. Sci. Ukraine-Kiev (Russ.), 49e63, 1992.**

SPADY D.K.; CUTHBERT J.A. **Regulation of hepatic sterol metabolism in the rat: parallel regulation of activity and mRNA for 7α-hydroxylase but not 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzymeA reductase or low density lipoprotein receptor.** The Journal of Biological Chemistry, v.267, p.5584–5591, 1992.

STACHOWIAK, B.; REGUŁA, J. **Health-promoting potential of edible macromycetes under special consideration of polysaccharides: a review**. *European Food Research and Technology*, v. 234, n. 3, p. 369-380, 2012.

STEER, T.; CARPENTER, H.; TUOHY, K.; GIBSON, G. R. **Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro-and prebiotics**. *Nutrition Research Reviews*, v. 13, n. 02, p. 229-254, 2000.

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

SUSEEM, S. R.; SARAL, M.; GREGORY, M. **Evaluation of the analgesic activity of ethyl acetate, methanol and aqueous extracts of *Pleurotus eous* mushroom**. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 4, n. 2, p. 117-120, 2011.

SYNYTSYA, A.; MÍČKOVÁ, K. SYNYTSYA, A.; JABLONSKÝ, I.; SPEVÁČEK, J.; ERBAN, V.; KOVÁŘÍKOVÁ, E.; ČOPÍKOVÁ, J. **Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity**. *Carbohydrate Polymers*, v.76, n.4, p. 548-556, 2009.

SYNYTSYA, A.; MÍČKOVÁ, K.; JABLONSKÝ, I.; SLUKOVÁ, M.; ČOPÍKOVÁ, J. **Mushrooms of genus *Pleurotus* as a source of dietary fibres and glucans for food supplements**. *Czech. The Journal of Food Science*, v. 26, n. 6, p. 441-446, 2008.

TAKEDA K., T.; SUZUKI, S.-I.; SHIMADA, K.; SHIDA, M.; NANNO, K.; OKUMURA. **Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota**. *Expert Review of Clinical Immunology*, v.146, p.109–115, 2006.

TANG, Y. J., ZHONG, J. J. **Scale-Up of a liquid static culture process for hyperproduction of ganoderic acid by the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum***. *Biotechnology Progress*, v. 19, n. 6, p. 1842-1846, 2003.

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

TELLES, C.B.S.; SABRY, D.A.; ALMEIDA-LIMA, J.; COSTA, M.S.S.P.; MELO-SILVEIRA, R.F.; TRINDADE, E.S.; SASSAKI, G.L.; WISBECK, E.; FURLAN, S.A.; LEITE, E.; ROCHA, H.A.O. **Sulfation of the extracellular polysaccharide produced by the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* alters its antioxidant, anticoagulant and antiproliferative properties *in vitro***. *Carbohydrate Polymers*, v. 85, n. 3, p. 514-521, 2011.

TOEWS, V.D. **Power your immunity with mushrooms**. *Better Nutrition*, v. 61, n. 4, p. 58-60, 1999.

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

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

TRABULSI, L. R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. **A composição e papel da microflora intestinal na saúde e proteção do organismo.** In: TRABULSI, L. R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Os probióticos e a saúde infantil. São Paulo: Nestlé, 2000.

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

TSAI, S.Y.; TSAI, H.L.; MAU, J.L. **Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*.** LWT - Food Science and Technology, v.40, p.1392–1402. 2007.

TURNER P.C.; WU Q.K.; PIEKKOLA S.; S. GRATZ, H. ; MYKKÄNEN, H. EINZAMI. ***Lactobacillus rhamnosus* strain GG restores alkaline phosphatase activity in differentiating Caco-2 cells dosed with the potent mycotoxin deoxynivalenol.** Food and Chemical Toxicology, v.46, p. 2118–2123, 2008.

UDDIN, S. J.; SHILPI, J. A.; ALAM, S. M. S.; ALAMGIR, M.; RAHMAN, M. T.; SARKER, S. D. **Antidiarrhoeal activity of the methanol extract of the barks of *Xylocarpus moluccensis* in castor oil-and magnesium sulphate-induced diarrhoea models in mice.** Journal of Ethnopharmacology, v. 101, n. 1, p. 139-143, 2005.

UKAWA A.Y.; ITO H.; HISAMATSU M. **Antitumor effects of (1→3)-β-d-glucan and (1→6)-β-d-glucan purified from newly cultivated mushroom, Hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes* Sing.)** Journal of Bioscience and Bioengineering, v.90, p.98–104, 2000.

UKENA, S. N.; SINGH, A.; DRINGENBERG, U.; ENGELHARDT, R.; SEIDLER, U.; HANSEN, W.; BLEICH, A.; BRUDER, D.; FRANZKE, A.; ROGLER, G.; SUERBAUM, S.; BUER, J.; GUNZER, F.; WESTENDORF, A. M. **Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity.** Public Library of Science ONE, Cambridge, v. 2, n. 12, p. 1-9, 2007.

VAMANU, E. ***In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of ethanolic extract of lyophilized mycelium of *Pleurotus ostreatus* PQMZ91109.** Molecules, v.17, n. 4, p. 3653-3671, 2012.

VAMANU, E. ***In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of two edible mushroom mycelia obtained in the presence of different nitrogen sources.** Journal of Medicinal Food, v. 16, n. 2, p. 155-166, 2013.

VAMANU, E. **Studies on the antioxidant and antimicrobial activities of *Pleurotus ostreatus* psi101109 mycelium.** Pakistan Journal of Botany, v.45, n.1, p.311-317, 2013.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. **"Probiotics: an update."** Journal de Pediatria, v. 91, n. 1, p. 6-21, 2015.

VARZANEH, F.; EDBERG, S.; MEDZHITOV, R. **Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis.** Cell, v. 118, n. 2, p. 229-241, 2004.

VELEBNY, S.; HRCKOVA, G.; KOGAN, G. **Impact of treatment with praziquantel, silymarin and/or-glucan on pathophysiological markers of liver damage and fibrosis in mice infected with *Mesocestoides vogae* (Cestoda) tetrathyridia.** Journal of Helminthology, v. 82, n. 3, p. 211-220, 2008.

VENTURA A.; JACKS T. **Micro RNAs and cancer: Short RNAs go a long way.** Cell. v.136, p. 586–591. 2009.

VIS, R. B.; LORENZ, K. **β -Glucans: Importance in brewing and methods of analysis.** LWT-Food Science and Technology, v. 30, n. 4, p. 331-336, 1997.

WAGNER, R.; MITCHELL, D. A.; LANZI SASSAKI, G.; LOPES DE ALMEIDA AMAZONAS, M. A.; BEROVIČ, M. **Current techniques for the cultivation of *Ganoderma lucidum* for the production of biomass, ganoderic acid and polysaccharides.** Food Technology and Biotechnology, v. 41, n. 4, p. 371-382, 2003.

WALKER, A.W.; INCE, J.; DUNCAN, S.H.; WEBSTER, L.M.; HOLTROP, G.; ZE, X. **Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota.** Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology, v.5, p. 220–230, 2011.

WAN R.W. I.; SOLIHAN, M. A.; AISHAH, M.; FAKURUDIN, N. A.; MOHSIN, S. S. J. **Colour, texture properties, cooking characteristics and fibre content of chicken patty added with oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*).** Food Research International, v. 18, p. 621-7, 2011.

WANG, H.; GAO, J.; NG, T. B. **A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v.275, p.810-816, 2000.

WANG, Y.; McNEIL, **Production of the fungal exopolysaccharide scleroglucan by cultivation of *Sclerotium glaucanicum* in an airlift reactor with an external loop.** Journal Chemical Technology and Biotechnology, London, v. 63, n. 3, p. 215-222, 1995.

WASHINGTON, W.J.A.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SHRECKENBERGER, P.; KONEMAN, S. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**, 6th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2006.

WASSER, S. **Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 60, n. 3, p. 258-274, 2002.

WASSER, S.P. **Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 89, n. 5, p. 1323-1332, 2011.

WASZKIEWICZ-ROBAK, B. **Spent Brewer's yeast and beta-glucans isolated from them as diet components modifying blood lipid metabolism disturbed by an atherogenic Diet**. In Lipid Metabolism. Edited by Baez RV. Intech; p. 261-290, 2013.

WEBER, T.K.; POLANCO, I. **Gastrointestinal microbiota and some children diseases: a review**. Gastroenterology Research and Practice, p. 676585, 2012.

WISBECK, E. **Estudo do cultivo submerso de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 para a produção de biomassa e de exopolissacarídeos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

WISBECK, E.; FURLAN, S. A.; NINOW, J. **Efeito da concentração inicial de glicose e do pH na produção de exopolissacarídeos de potencial antitumoral por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833**. Revista Saúde e Ambiente, v. 6, n. 2, p. 19-22, 2005.

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

WISSIER, R.W.; EILERT M.L.; SCHROEDER M.A.; COHEN L. **Production of lipomatous and atheromatous arterial lesions in the albino rat**. American Medical Association , v.57, p. 333–351, 1954.

WOLFF, E. R. S.; WISBECK, E.; SILVEIRA, M. L. L.; GERN, R. M. M.; PINHO, M. S. L.; FURLAN, S. A. **Antimicrobial and antineoplastic activity of *Pleurotus ostreatus***. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.151, p. 402-412, 2008.

WONG S.M.; WONG K.K.; CHIU L.C.M.; CHEUNG P.C.K. **Non-starch polysaccharides from different developmental stages of *Pleurotus tuber-reginum* inhibited the growth of human acute promy-elocytic leukemia HL-60 cells by cell-cycle arrest and/or apoptotic induction**. Carbohydrate Polymers, v. 68, p.206–217, 2007.

WONG, KA-HING; LAI, C.K.M.; CHEUNG, P.C.K. **Immunomodulatory activities of mushroom sclerotial polysaccharides**. Food Hydrocolloids, v. 25, p. 150 – 158, 2011.

WU, D.; PAE, M.; REN, Z.; GUO, Z.; SMITH, D.; MEYDANI, S. N. **Dietary supplementation with white button mushroom enhances natural killer cell activity in C57BL/6 mice.** *The Journal of Nutrition*, v. 137, n. 6, p. 1472-1477, 2007.

XU, Y. **Perspectives on the 21st century development of functional foods: bridging Chinese medicated diet and functional foods.** *International Journal of Food Science & Technology*, v. 36, n. 3, p. 229-242, 2001.

XU, X.; XU, P.; MA, C.; TANG, J.; ZHANG, X. **Gut microbiota, host health, and polysaccharides.** *Biotechnology Advances*, v. 31, n. 2, p. 318-337, 2013.

YAMIN, S.; SHUHAIMI, M.; ARBAKARIYA, A.; FATIMAH, A. B.; KHALILAH, A. K.; ANAS, O.; YAZID, A. **Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the growth of *Bifidobacterium* spp. as assessed using real-time PCR.** *International Food Research Journal*, v. 19, n. 3, p. 1199-1205, 2012.

YOSHIOKA, Y.; TABETA, R.; SAITÔ, H.; UEHARA, N.; FUKUOKA, F. **Antitumor polysaccharides from *P. ostreatus* (Fr.) Qué. isolation and structure of a β -glucan.** *Carbohydrate Research*, v. 140, n. 1, p. 93-100, 1985.

YU, S.; WEAVER, V.; MARTIN, K.; CANTORNA, M. T. **The effects of whole mushrooms during inflammation.** *BMC immunology*, v. 10, n. 1, p. 12, 2009.

YU, Z. T.; LIU, B.; MUKHERJEE, P.; NEWBURG, D. S. ***Trametes versicolor* extract modifies human fecal microbiota composition *in vitro*.** *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 68, n. 2, p. 107-112, 2013.

ZADRAZIL, F. **Microbial conversion of lignocellulose into fees.** In: Sundtal S. and Owen E, editors. **Development in animal and veterinary sciences.** Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1984.

ZAIMAN, B. Z.; YASSIN, M.; MAHAJNA, J.; WASSER, S. P. **Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 67, n. 4, p. 453-468, 2005.

ZHANG M.; CHEUNG P.C.K.; ZHANG L. **Evaluation of mushroom dietary fiber (nonstarch polysaccharides) from sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fries) Singer as a potential antitumor agent.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.5059-5062, 2001.

ZHANG, J.; TANG, O.; ZIMMERMAN -KORDMANN, M.; REUTTER, W.; FAN, H. **Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum*.** *Life Sciences*, Elmsford, v. 71, n. 6, p. 623-638, 2002.

ZHANG, J.; WANG, G., LI, H.; ZHUANG, C.; MIZUNO, T., ITO, H.; LI, J. **Antitumor polysaccharides from a Chinese mushroom, "yuhuangmo" the fruiting body of *Pleurotus citrinopileatus*.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 58, n. 7, p. 1195-1201, 1994.

ZHANG, L.; ZHANG, M.; ZHOU, Q.; CHEN, J.; ZENG, F. **Solution properties of antitumor sulfated derivative of α -(1 \rightarrow 3)-D-glucan from *Ganoderma lucidum*.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 64, n. 10, p. 2172-2178, 2000.

ZHANG, M.; CHEUNG, P. C. K.; CHIU, L. C. M.; WONG, E. Y. L.; OOI, V. E. C. **Cell-cycle arrest and apoptosis induction in human breast carcinoma MCF-7 cells by carboxymethylated β -glucan from the mushroom sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*.** *Carbohydrate Polymers*, v.66, p.455-462, 2006.

ZHANG, M.; ZHU, L.; CUI, S.W.; WANG, Q.; ZHOU, T.; SHEN, H. **Fractionation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides and polysaccharide–protein complexes from *Pleurotus geesteranus*.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 48, n. 1, p. 5-12, 2011.

ZHAO, J.; CHEUNG, P.C.K. **Comparative proteome analysis of *Bifidobacterium longum* subsp. infantis grown on β -glucans from different sources and a model for their utilization.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n. 18, p. 4360-4370, 2013.

ZHAO, J.; CHEUNG, P.C.K. **Fermentation of β -Glucans derived from different sources by bifidobacteria: evaluation of their bifidogenic effect.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 11, p. 5986-5992, 2011.

ZHONG, J. J.; TANG, Y. J. **Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites.** In: *Biomanufacturing*. Springer Berlin Heidelberg, p. 25-59, 2004.

ZHU, J.S. **Stimulating in-vitro *Paecilomyces hepiali* or *Hirsutella sinensis* growth; include providing an effective amount of a *H. sinensis* fungus to a culture medium to stimulate the *P. hepiali* growth.** United States Patent, v. 718, n. 7, p. 416, 2010.

ZIMMERMAN, J.W.; LINDERMU-TH, J.; FISH, P.A.; PALACE, G.P.; STEVENSON, T.T.; De-MONG, D.E. **A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a β - (1 \rightarrow 3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 22014-22020, 1998.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Tabela 3- Crescimento celular de *Lactobacillus* spp presentes nas fezes de camundongos alimentados com a fração extrativa do caldo do cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada (S4), nas concentrações de 10 (A), 30 (B) e 60 (C) mg kg⁻¹ e fração extrativa do micélio (S) na concentração de 300 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.

SUBSTÂNCIA	UFC/g de fezes			
	0 dia	14º dia	28º dia	56º dia
Controle	8,2x10 ⁸ ± 2,4x10 ⁸	4,1x10 ⁸ ± 1,7x10 ⁸	1,2x10 ⁸ ± 2,7x10 ⁷	7x10 ⁸ ± 3,9x10 ⁸
S1 A	8,2x10 ⁸ ± 2,4x10 ⁸	6,1x10 ⁵ ± 3,8x10 ⁵	1,7x10 ⁵ ± 6,6x10 ⁴	- ²
S2 A	8,2x10 ⁸ ± 2,4x10 ⁸	1,8x10 ⁸ ± 5,1x10 ⁷	2,3x10 ⁹ ± 7,8x10 ^{8*}	2,7x10 ⁸ ± 4,4x10 ⁷
S3 A	8,2x10 ⁸ ± 2,4x10 ⁸	6,3x10 ⁸ ± 1,4x10 ⁸	1,3x10 ⁸ ± 1,8x10 ⁷	9,9x10 ⁸ ± 1,4x10 ⁸
S4 A	8,2x10 ⁸ ± 2,4x10 ⁸	5,3x10 ⁸ ± 2,4x10 ⁸	4,1x10 ⁸ ± 2,1x10 ⁸	7x10 ⁸ ± 1,4x10 ⁸
S1 B	8,2x10 ⁸ ± 2,4x10 ⁸	4,5x10 ⁸ ± 3,1x10 ⁸	5,5x10 ⁸ ± 5,3x10 ⁸	1,1x10 ⁹ ± 1,5x10 ⁸
S2 B	8,2x10 ⁸ ± 2,4x10 ⁸	1,8x10 ⁸ ± 6,7x10 ⁷	4,2x10 ⁸ ± 8,6x10 ⁷	9,1x10 ⁸ ± 2,2x10 ⁸
S3 B	8,2x10 ⁸ ± 2,4x10 ⁸	1x10 ⁹ ± 2,9x10 ⁸	3,5x10 ⁸ ± 1x10 ⁸	6,6x10 ⁸ ± 9,5x10 ⁷
S4 B	8,2x10 ⁸ ± 2,4x10 ⁸	9,1x10 ⁷ ± 4,3x10 ⁷	4,3x10 ⁸ ± 1,9x10 ⁸	6,4x10 ⁸ ± 1,3x10 ⁷
S1 C	8,2x10 ⁸ ± 2,4x10 ⁸	3,3x10 ⁷ ± 1,3x10 ⁷	5,8x10 ⁷ ± 1,9x10 ⁷	1,7x10 ⁸ ± 9,2x10 ⁷
S2 C	8,2x10 ⁸ ± 2,4x10 ⁸	8,6x10 ⁸ ± 3,2x10 ⁸	2,7x10 ⁸ ± 8,5x10 ⁷	1,1x10 ⁹ ± 3,2x10 ⁸
S3 C	8,2x10 ⁸ ± 2,4x10 ⁸	4,8x10 ⁸ ± 2,6x10 ⁸	1,7x10 ⁸ ± 5,7x10 ⁵	6,4x10 ⁷ ± 1,3x10 ⁶
S4 C	8,2x10 ⁸ ± 2,4x10 ⁸	9,2x10 ⁷ ± 3,3x10 ⁷	3,1x10 ⁸ ± 1,7x10 ⁸	2,8x10 ⁸ ± 1,3x10 ⁷
S	8,2x10 ⁸ ± 2,4x10 ⁸	8,5x10 ⁸ ± 1,4x10 ⁸	3,8x10 ⁸ ± 8x10 ^{7*}	3,6x10 ⁸ ± 6,3x10 ⁷

² Não foi detectado crescimento de colônias.

(*) Valor estatisticamente significativo (p<0,05).

APÊNDICE B - Tabela 4- Crescimento celular de *Bifidobacterium* spp presentes nas fezes de camundongos alimentados com a fração extrativa do caldo do cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada (S4), nas concentrações de 10 (A), 30 (B) e 60 (C) mg kg⁻¹ e fração extrativa do micélio (S) na concentração de 300 mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.

SUBSTÂNCIA	UFC/g de fezes			
	0 dia	14 ^o dia	28 ^o dia	56 ^o dia
Controle	4,1x10 ⁸ ±1,1x10 ⁸	3,4x10 ⁸ ± 6,7x10 ⁷	9,6x10 ⁷ ± 2,1x10 ⁷	5,7x10 ⁸ ± 2,3x10 ⁸
S1 A	4,1x10 ⁸ ±1,1x10 ⁸	6,6x10 ⁸ ± 1,2x10 ⁸	5,8x10 ⁷ ± 1,2x10 ⁶	2,2x10 ⁸ ± 5,7x10 ⁷
S2 A	4,1x10 ⁸ ±1,1x10 ⁸	4,1x10 ⁷ ±1,1x10 ⁷ *	1,9x10 ⁸ ± 5,4x10 ⁷	1,1x10 ⁹ ± 3,9x10 ⁸
S3 A	4,1x10 ⁸ ±1,1x10 ⁸	2,7x10 ⁸ ± 1,3x10 ⁸	7,7x10 ⁷ ± 2,8x10 ⁷	2,5x10 ⁸ ± 9,7x10 ⁷
S4 A	4,1x10 ⁸ ±1,1x10 ⁸	1,3x10 ⁸ ± 3,4x10 ⁷	3,9x10 ⁸ ± 1,3x10 ⁸ *	4,3x10 ⁸ ± 1,1x10 ⁸
S1 B	4,1x10 ⁸ ±1,1x10 ⁸	4,1x10 ⁸ ± 7,1x10 ⁷	2,2x10 ⁸ ± 1,6x10 ⁸	3,3x10 ¹⁰ ±2,2x10 ¹⁰
S2 B	4,1x10 ⁸ ±1,1x10 ⁸	1,1x10 ⁸ ± 3,3x10 ⁷	6,4x10 ⁸ ± 1,2x10 ⁸ *	1x10 ⁸ ± 1,9x10 ⁷
S3 B	4,1x10 ⁸ ±1,1x10 ⁸	4,8x10 ⁸ ± 1,7x10 ⁸	2,1x10 ⁸ ± 1,1x10 ⁸	7,8x10 ⁷ ± 2x10 ⁷
S4 B	4,1x10 ⁸ ±1,1x10 ⁸	9,6x10 ⁷ ± 2,3x10 ⁷	3,6x10 ⁸ ± 1,5x10 ⁸	4,6x10 ⁸ ± 1,9x10 ⁸
S1 C	4,1x10 ⁸ ±1,1x10 ⁸	7,8x10 ⁷ ± 3,5x10 ⁷ *	1,4x10 ⁸ ± 4,6x10 ⁷	7,4x10 ⁷ ± 2,5x10 ⁷
S2 C	4,1x10 ⁸ ±1,1x10 ⁸	4,5x10 ⁸ ± 1,1x10 ⁸	3,7x10 ⁸ ± 1,2x10 ⁸ *	5,5x10 ⁸ ± 1,5x10 ⁸
S3 C	4,1x10 ⁸ ±1,1x10 ⁸	8,6x10 ⁸ ± 5,9x10 ⁸	3,2x10 ⁸ ± 1,7x10 ⁸	4,6x10 ⁸ ± 1,9x10 ⁸
S4 C	4,1x10 ⁸ ±1,1x10 ⁸	9,2x10 ⁷ ± 0 ¹	5,6x10 ⁸ ± 3,1x10 ⁷ *	1,9x10 ⁸ ± 9,8x10 ⁷
S	4,1x10 ⁸ ±1,1x10 ⁸	8,8x10 ⁸ ± 2,6x10 ⁸ *	5,6x10 ⁸ ± 8,3x10 ⁷ *	1,8x10 ⁸ ± 7,5x10 ⁷

¹ Apenas uma placa apresentou crescimento microbiano dentro dos limites confiáveis (30 e 300 UFC).

(*) Valor estatisticamente significativo (p<0,05).

APÊNDICE C - Tabela 5- Crescimento celular de *Enterobacteriaceae* spp presentes nas fezes de camundongos alimentados com a fração extrativa do caldo do cultivo (S1), fração extrativa do micélio (S2), fração extrativa do micélio desproteïnizada (S3) e fração extrativa do caldo de cultivo desproteïnizada (S4), nas concentrações de 10 (A), 30 (B) e 60 (C) mg kg⁻¹. Os valores representam a média de replicatas ± o erro padrão.

SUBSTÂNCIA	UFC/g de fezes			
	0 dia	14º dia	28º dia	56º dia
Controle	8,7x10 ⁴ ± 1,2x10 ⁴	1,8x10 ⁶ ± 1,3x10 ⁶	8,7x10 ⁶ ± 4,6x10 ⁶	6x10 ⁴ ± 0 ¹
S1 A	8,7x10 ⁴ ± 1,2x10 ⁴	6,1x10 ⁵ ± 3,8x10 ⁵	1,7x10 ⁵ ± 6,6x10 ⁴	- ²
S2 A	8,7x10 ⁴ ± 1,2x10 ⁴	3x10 ⁵ ± 2,4x10 ⁵	2x10 ⁵ ± 1,5x10 ⁵	6x10 ⁵ ± 2,4x10 ⁵
S3 A	8,7x10 ⁴ ± 1,2x10 ⁴	1x10 ⁷ ± 5,2x10 ⁶	8x10 ⁶ ± 3,7x10 ⁶	5x10 ⁵ ± 1,7x10 ⁵
S4 A	8,7x10 ⁴ ± 1,2x10 ⁴	3,1x10 ⁶ ± 1,5x10 ⁶	3,2x10 ⁷ ± 1,1x10 ⁷	1,2x10 ⁷ ± 5,8x10 ⁶
S1 B	8,7x10 ⁴ ± 1,2x10 ⁴	1,5x10 ⁵ ± 5,4x10 ⁴	8,4x10 ⁴ ± 6x10 ³	5,3x10 ⁵ ± 4,5x10 ⁵
S2 B	8,7x10 ⁴ ± 1,2x10 ⁴	6x10 ⁵ ± 2,1x10 ⁵	8x10 ⁵ ± 4,6x10 ⁵	6x10 ⁵ ± 2,5x10 ⁵
S3 B	8,7x10 ⁴ ± 1,2x10 ⁴	1x10 ⁷ ± 6,4x10 ⁶	2x10 ⁶ ± 9,5x10 ⁵	3x10 ⁶ ± 1,7x10 ⁶
S4 B	8,7x10 ⁴ ± 1,2x10 ⁴	4,6x10 ⁶ ± 1,5x10 ⁶	3,5x10 ⁷ ± 1,2x10 ⁷ *	3,1x10 ⁷ ± 1,5x10 ⁷
S1 C	8,7x10 ⁴ ± 1,2x10 ⁴	8,5x10 ⁵ ± 1,8x10 ⁵	1,6x10 ⁵ ± 8,9x10 ⁴	2,7x10 ⁶ ± 1,9x10 ⁶
S2 C	8,7x10 ⁴ ± 1,2x10 ⁴	2x10 ⁶ ± 7,2x10 ⁵	7x10 ⁵ ± 2x10 ⁵	7x10 ⁵ ± 1,7x10 ⁵
S3 C	8,7x10 ⁴ ± 1,2x10 ⁴	2x10 ⁶ ± 1,1x10 ⁶	2x10 ⁷ ± 7,8x10 ⁶	2x10 ⁶ ± 1,3x10 ⁶
S4 C	8,7x10 ⁴ ± 1,2x10 ⁴	3,5x10 ⁶ ± 6,2x10 ⁵	2x10 ⁷ ± 1,1x10 ⁷	1,7x10 ⁷ ± 4,5x10 ⁶

¹ Apenas uma placa apresentou crescimento microbiano dentro dos limites confiáveis (30 e 300 UFC).

² Não foi detectado crescimento de colônias.

(*) Valor estatisticamente significativo (p<0,05).