



Bruna Gazolla Batalha

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXOPOLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR *Agaricus brasiliensis*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Banca Examinadora da
Universidade Presidente Antônio Carlos,
como exigência parcial para obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Juiz de Fora
2019

Bruna Gazolla Batalha

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DO EXOPOLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR *Agaricus brasiliensis***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Banca Examinadora da
Universidade Presidente Antônio Carlos,
como exigência parcial para obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.
Orientador: Nathália Barbosa do E. Santo
Mendes
Co-orientador: Juliana Carine Gern

Juiz de Fora
2019

Bruna Gazolla Batalha

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DO EXOPOLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR *Agaricus brasiliensis***

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anna Marcella Neves Dias

Prof. Ms. Nathália Barbosa do E. Santo Mendes

Prof. Ms. Juliana Carine Gern

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXOPOLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR *Agaricus brasiliensis*

PRODUCTION CHARACTERIZATION AND STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF EXOPOLOSSACARIDE PRODUCED BY *Agaricos brasiliensis*

BRUNA GAZOLLA BATALHA¹, JULIANA CARINE GERN², NATHÁLIA BARBOSA DO E. SANTO MENDES³.

Resumo:

Introdução: Para garantir o bem estar do gado de leite acredita-se que o cogumelo comestível *Agaricus brasiliensis*, possua propriedades medicinais. São ricos em polissacarídeos que podem ser extraídos de corpos de frutificação de cogumelos, micélio e/ou caldo de cultura submersa. O desenvolvimento de adjuvantes mais eficientes e seguros, que permitam uma resposta imune elevada e duradoura, é de extrema importância. **Objetivo:** Produzir, purificar, avaliar as características e analisar a toxicidade e imunoestimulação do exopolissacarídeo (EPS) produzido pelo *A. brasiliensis in vitro*. **Métodos:** Para fermentação foi utilizado um meio enriquecido e o fungo *Agaricus brasiliensis*. Os Erlenmeyers foram inoculados, a 30°C. Após este período, o micélio foi filtrado e liofilizado no qual foram feitas as imagens deste material e os testes *in vitro*. **Resultados:** As Frações de *A. brasiliensis* e *A. bruto* por 24 horas não afetaram a viabilidade celular e a proliferação nas concentrações 10, 50, 150, 300, 500 mg/mL. Quanto ao ensaio de SOD, os polímeros de *A. brasiliensis*, em todas as concentrações não tiveram alterações. **Conclusão:** A exposição aos EPS bruto e frações de *A. brasiliensis* por 24 horas, não apresentaram toxicidade e aumentaram a proliferação de forma significativa no ensaio de *Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue*, *Sigma* (MTT). No ensaio de SOD as amostras não apresentaram alterações nas atividades imunomoduladoras.

Descritores: *Agaricus brasiliensis*. Exopolissacarídeo. Toxicidade. Imunomodulação.

Abstract

Introduction: To ensure the welfare of dairy cattle it is believed that the edible mushroom *Agaricus brasiliensis* has medicinal properties. They are rich in polysaccharides, which can be extracted from fruiting bodies of mushrooms, mycelium and / or submerged broth. The development of more efficient and safer adjuvants that enable a high and lasting immune response is of utmost importance. **Objective:** To produce, purify, evaluate the characteristics and analyze the toxicity and immunostimulation of exopolysaccharide (EPS) produced by *A. brasiliensis in vitro*. **Methods:** For fermentation, an enriched

¹ Acadêmico do Curso de Biomedicina da Universidade Presidente Antônio Carlos – UNIPAC – Juiz de Fora – MG

² Pesquisadora Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite, Mestrado

³ Bióloga, Professora do curso de Biomedicina da Universidade Presidente Antônio Carlos – UNIPAC, Mestrado.

medium and the fungus *A. brasiliensis* were used. Erlenmeyers were inoculated at 30° C. After this period, the mycelium was filtered and lyophilized in which images of this material were made and in vitro tests. **Results:** Fraction of *A. brasiliensis* and crude A. for 24 hours did not affect cell viability and proliferation at concentrations 10, 50, 150, 300, 500 mg / mL. As for the SOD assay, the *A. brasiliensis* polymer at all concentrations did not change. **Conclusion:** Exposure to crude EPS and fractions of *A. brasiliensis* for 24 hours showed no toxicity and significantly increased proliferation in the Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue, Sigma (MTT) assay. In the SOD assay, the samples showed no changes in immunomodulatory activities.

Keywords: *Agaricus brasiliensis*. Exopolysaccharide. Toxicity. Immunomodulation.

INTRODUÇÃO

É de conhecimento geral que são necessárias melhorias na segurança do sistema imunológico do gado de leite, pois vem sendo administradas cada vez mais drogas para tratamento destes animais, os quais são utilizados na alimentação da população.

A segurança do consumidor depende da saúde dos animais e os fármacos e polímeros aplicados nos animais vão ser encontrados nos tecidos podendo causar uma intoxicação tanto neles, quanto nos consumidores, afetando também o meio ambiente.²

Para a melhoria na qualidade e na eficiência de produtos decorrentes do animal, é necessário mantê-los em condições adequadas de saúde, tanto para evitar um grande impacto financeiro quanto produtivo. Os animais são criados em espaços cada vez menores, aumentando o risco de contaminações, doenças transmissíveis que são causadas por microrganismos de linhagens mais resistentes.³

Para garantir o bem estar destes animais acredita-se que o cogumelo comestível *Agaricus brasiliensis*, também conhecido como *Agaricus blazei* Murill (*AbM*), possua propriedades medicinais, que exibem *in vitro* atividade antitumoral, baseada principalmente na modulação do sistema imunológico regulador crítico da resposta imune contra patógenos e tumores, pois é o promotor mais potente do linfócito TCD₄ tipo 1.⁴⁻⁸

Os cogumelos também são conhecidos por apresentarem eficazes propriedades antifúngicas, antiinflamatórias, antivirais, antibacterianas, hepatoprotetoras, antidiabéticas, além de atividades hipolipidêmica, antitrombótica e hipotensiva.¹⁻⁴

O *A. brasiliensis* é rico em polissacarídeos, que podem ser extraídos de corpos de frutificação de cogumelos, micélio e/ou caldo de cultura submersa.

Os principais efeitos imunomoduladores desses polissacarídeos incluem mitogenicidade e ativação de células imunes, como linfócitos, macrófagos, células dendríticas e células *natural killer* (NK), resultando na produção de citocinas.⁴

Esses polímeros diferenciam-se, principalmente, pelos monômeros constituintes, tipo de ligação, comprimento da cadeia e número de ramificações. Essas macromoléculas sintetizadas pelos seres vivos em geral, exercem diversas funções no organismo como: armazenamento de energia (amido e glicogênio), estruturação (celulose, quitina e peptideoglicano), além de atuarem como portadores de informações, servindo como indicadores de endereçamento para algumas proteínas e como mediadores para interações específicas entre as células e/ou matriz extracelular.¹⁻⁵

O *A. brasiliensis* reduz consideravelmente o colesterol total e frações aterogênicas do colesterol (LDL + VLDL), pois promove efeito hipocolesterolemiaante significativo similar ao encontrado em administrações de algumas drogas hipolipemiantes.²

Este estudo teve como objetivo produzir, purificar, avaliar as características e analisar a toxicidade e imunoestimulação do exopolissacarídeo produzido pelo *A. brasiliensis* *in vitro*.

MÉTODOS

As cepas de *A. brasiliensis* foram fornecidas pelo Centro de Pesquisa da Embrapa Floresta, enviadas pelo Correio em embalagem de isopor, na temperatura ambiente em placas de Petri contendo o meio BDA (Batata Dextrose Ágar) (Figura 1). A partir deste inóculo, o cogumelo foi cultivado em laboratório para a extração do exopolissacarídeo. As pesquisas foram realizadas na Embrapa Gado de Leite, no laboratório de Nanotecnologia, no município de Juiz de Fora – MG.



Figura 1. *A. brasiliensis* em meio BDA

A presente pesquisa foi composta pelas seguintes etapas: fermentação, filtragem, extração, centrifugação, purificação, liofilização, cultivo celular, exposição, Microscopia de Força Atômica (AFM), Espectroscopia Raman, Testes de expressão gênica *in vitro*.

Para fermentação foi utilizado um meio de enriquecimento que consiste em glicose, extrato de levedura, K_2HPO_4 , $MgSO_4$, em que este foi um meio de enriquecimento utilizado para expansão do fungo (*A. brasiliensis*) (Figuras 1 e 2), os mesmos ficaram no *shaker* por aproximadamente sete dias a 30°C.⁶



Figura 2. Fermentação do *A. brasiliensis* no 3º dia.



Figura 3. *A. brasiliensis* no 7º dia de fermentação.

Para filtragem foi retirado o material do *shaker*, não houve contaminação bacteriana, o micélio foi filtrado com um auxílio de um filtro e de um funil o qual retirou apenas o líquido com as proteínas, liberados pelo fundo, posteriormente o micélio foi descartado.

Para a extração o sobrenadante foi levado para o rotaevaporizador para sua concentração. Após foi adicionado na amostra concentrada álcool absoluto, numa proporção de 4:1 v/v para a precipitação do exopolissacarídeo (Figura 3 e 4), que posteriormente foi levado para a centrifuga.



Figura 4. Precipitação com Álcool 70%

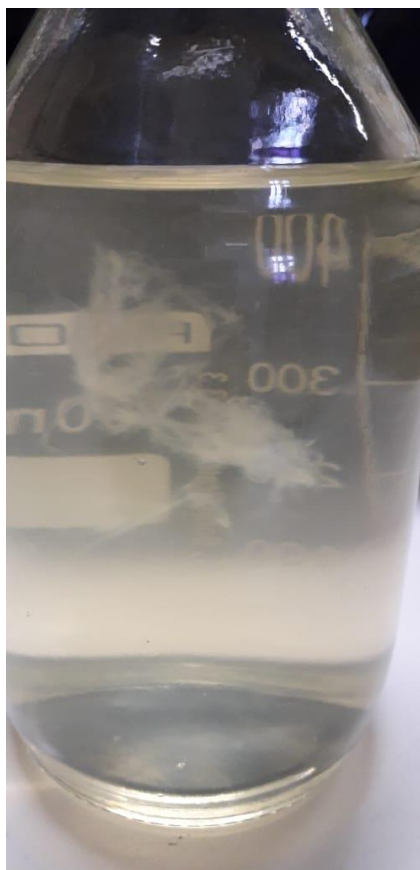


Figura 5. Precipitação com Álcool 70% após 1º dia na geladeira

Para a centrifugação a amostra foi levada para a centrífuga durante um período de dez minutos a 10.000 RPM. O precipitado retirado da centrifuga foi diluído em água Mili-Q para posteriormente ser dissolvido novamente em uma solução salina 1M.

Para a purificação a amostra dissolvida na solução salina 1M foi passada em uma coluna de cromatografia de exclusão por tamanho (Sephacryl 300R).

Na etapa de liofilização foi obtida uma fração principal da amostra retirada da coluna de cromatografia. Procedeu-se a análise de duas amostras, o exopolissacarídeo bruto e a fração.

Para a Microscopia de Força Atômica (Figura 6) foi utilizado o material liofilizado e a partir do mesmo foram feitas imagens no AFM, que são imagens realizadas em modo intermitente em um Nanosurf easyScan 2 (Nanosurf Instruments), no ar.



Figura 6. Aparelho de Microscopia de Força Atômica (AFM)

As amplitudes de oscilação livres do cantilever foram tipicamente de 80mV e o tamanho de varrimento da sonda de microscópio foi de $2 \times 2 \mu\text{m}$, $5 \times 5 \mu\text{m}$ e $10 \times 10 \mu\text{m}$. A resolução do AFM foi de 512×512 pixels. O comprimento e o raio da ponta foram de 225 μm e $<10 \text{ nm}$, respectivamente. A amostra foi adicionada em água ultrapura e/ou meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Uma gota da suspensão foi colocada sobre a mica, em seguida, a amostra foi desidratada sob atmosfera de nitrogênio.

A etapa seguinte foi a espectroscopia Raman que é uma técnica fotônica de alta resolução que pode proporcionar, em poucos segundos, informação química e estrutural de quase qualquer material, composto orgânico ou inorgânico permitindo assim sua identificação.¹¹

As medidas Raman foram realizadas com um espectroscópio Bruker RFS 100 excitado com um laser Nd + 3/YAG operando a 1064 nm, equipado com um detector InGaAs arrefecido com nitrogênio líquido. Os espectros foram adquiridos com uma resolução de 4 cm^{-1} . Uma média de 1024 varreduras foram coletadas com uma potência de 100 mW.¹¹

Para o cultivo celular foram cultivadas as células da linhagem de macrófagos de *Mus musculus* J774.⁵ As células foram cultivadas em sete garrafas de 75 mL, para obter uma quantidade necessária dessas células para a exposição ao polímero. O cultivo foi

realizado em um meio composto por *Dulbecco MEM* (DMEM), 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico. Após a expansão celular foi feita a exposição das células aos polímeros nas concentrações 10, 50, 150, 300, 500 mg/mL, em triplicatas. Foram incubadas em estufa de CO₂ a 36 °C por aproximadamente uma semana.⁵

Para o ensaio de viabilidade celular os polímeros EPS fração, EPS bruto foram suspensos em meio de cultura Meio *Dulbecco MEM* (DMEM, Sigma) na concentração de 1000 µg/mL e em seguida colocado no ultrassom (USC 700 *UltraSonic Cleaner Unique*), por três minutos, à 40 kHz e 100 W. A partir dessa suspensão de 1000 µg/mL foram preparadas as concentrações a serem testadas de 10, 50, 150, 300 e 500 µg/mL para cada polímero, além do grupo controle.⁵

Como modelo experimental foram utilizadas células J774A.1 cultivadas em Meio *Dulbecco MEM* (DMEM) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB, Sigma) e 1% de antibiótico (Penicilina G Sódica, Sigma e Estreptomicina Sal Sulfanato, Sigma) em estufa com atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37° C. Em placas de 96 poços foram plaqueados 5 x 10³ células por poço, onde ficaram expostas aos polímeros por 24 h, em seguida o meio de cultivo foi trocado pelo meio *Dulbecco MEM* (DMEM) com 10% volume/volume (v/v) de MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue*, Sigma) onde permaneceu por 4 h em estufa com atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37° C no escuro. Logo após, esse meio foi removido para que o 200 µL de isopropanol-ácido (0,04N HCL em isopropanol) fosse adicionado a cada poço. Após uma hora em estufa foi realizada a leitura em espectrofotômetro (*Varioskan Flash Thermo Fisher*) a 570 nm.

Para o ensaio de *Superoxide Dismutase* (SOD) as células J774A.1 foram cultivadas em Meio *Dulbecco MEM* (DMEM) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB, Sigma) e 1% de antibiótico (Penicilina G Sódica, Sigma e Estreptomicina Sal Sulfanato, Sigma) em estufa com atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37° C. Foram plaqueadas 15 x 10³ de células por poço em placas de 96 poços no qual foram expostas por 24 horas aos polímeros nas concentrações de 0, 10, 50, 150, 300 e 500 µg/mL para cada polímero. Em seguida foi realizado o ensaio de SOD *Kit Sigma-Aldrich* (19160), conforme o protocolo para análise do SOD intracelular disponibilizado pela *Sigma-Aldrich*. As células foram desprendidas da placa utilizando PBS (1x, LGC Biotecnologia) gelado e em meio de cultivo *Dulbecco MEM* (DMEM) a 37° C, em seguida, centrifugadas a 5000 RPM por dez minutos a 4° C, por duas vezes, e o sobrenadante descartado. Seguidamente, o processo de lise foi realizado congelando a -20° C por vinte minutos e a descongelando 37° C por dez minutos, três vezes, ao final desse processo 100 µL de

PBS foi adicionado a células e centrifugadas novamente a 5000 rpm a 4° C, por quinze minutos.^{5,8,17}

Logo após a centrifugação, 20 µL do sobrenadante de cada amostra foi colocado em placas de 96 poços, mais 200 µL de *WST working solution* e 20 µL de *Enzyme Working Solution*, além disso foram preparadas as soluções branco, de acordo com o protocolo *SOD Kit Sigma-Aldrich*. Os poços foram lidos no espectrofotômetro (*Varioskan Flash Thermo Fisher*) a 450 nm afim de conhecermos a taxa da atividade do SOD a partir dos valores da leitura que foram aplicadas em uma fórmula disponibilizada pelo *SOD Kit Sigma-Aldrich*.

Para as análises estatísticas os dados provenientes dos ensaios de viabilidade celular MTT e SOD foram tabulados e analisados pelo teste de ANOVA e as médias comparadas pelo teste de *Tukey*, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Espectroscopia de Raman foi utilizada para que pudesse descobrir a composição química do EPS *A. brasiliensis*. Esta técnica consiste em observar pelos gráficos os componentes que reagiram significando assim elementos que constituem esta possível cadeia podem ser descobertos grupos de alcano e galactomanano, esta técnica consiste em observar para poder descobrir a cadeia química completa do polímero necessitando de mais estudos e pesquisas.^{10-13,15}

Os grupos orgânicos da fração de EPS *A. brasiliensis* e o EPS bruto foram analisados por espectroscopia FTIR, o espectro do FT-Raman mostrou que bandas da faixa de 500 a 1500 cm^{-1} podem ser atribuídas às vibrações: flexão de CH dentro e fora do plano em 1458-1465 cm^{-1} , vibrações de flexão no plano CH₃, CH₂ em 1342 –1344 cm^{-1} , alongamento CC e CO em 1263-1266 cm^{-1} , grupos hidroxila de vibrações no plano do anel piranóide em 1089-1094 cm^{-1} , COC de alongamento assimétrico na faixa de 984–968 cm^{-1} , CH flexão fora do plano na faixa de 831 a 829 cm^{-1} e vibrações do anel piranóide na faixa de 605 a 625 cm^{-1} . Além disso, possuíam bandas entre 605–625 cm^{-1} da ligação glicosídica da vibração dobrada (C-O-C). Representadas no gráfico figura 7.

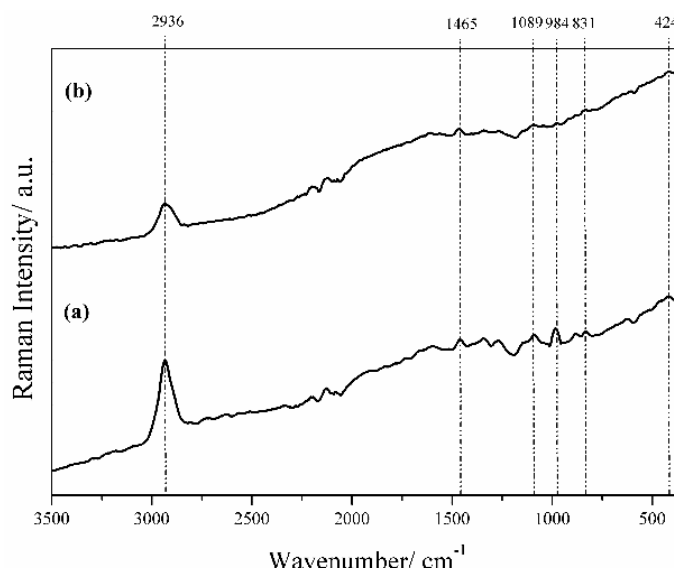


Figura 7. Resultado da Espectroscopia de Ramam para o EPS bruto e fração de *A. brasiliensis*.

O resultado do IR mostrou que o EPS bruto e a fração (Figura 7) apresentaram bandas de absorção relativa aos grupos hidroxila em 3220-3237 cm⁻¹; grupos alcano em 2920-2923 cm⁻¹; Grupos C-O e C-O-H em 1022-1024 cm⁻¹ e unidades de galactomanano 799-808 cm⁻¹.

As técnicas espectroscópicas são constantemente utilizadas na identificação, caracterização de estruturas de moléculas e compostos, bem como no monitoramento e controle de reações químicas.¹³⁻¹⁶

Elas estão fundamentadas na propriedade que átomos e moléculas têm de absorver ou emitir energia em uma determinada região do espectro eletromagnético, com isso pode ser descoberto que o polímero *A. brasiliensis* contém grupos de alcano e unidades de galactomanano.^{10,11,13}

As imagens AFM (Figuras 8, 9 e 10) foram gravadas no modo de toque em um Nanosurf easyScan 2 (Nanosurf Instruments) no ar. As amplitudes de oscilação livre do cantilever eram tipicamente de 80 mV e o tamanho de varredura da sonda de microscópio era de 2,5x2,5 µm, 5x5 µm e 10x10 µm. A resolução do AFM era de 512x512 pixels. O comprimento e o raio da ponta foram 225 mm e <10 nm, respectivamente.

Os polímeros foram adicionados em água ultrapura e colocados em uma mica. Em seguida, a amostra foi desidratada sob atmosfera de nitrogênio, segundo a técnica de Paulo S. P. Herrmann.¹⁵

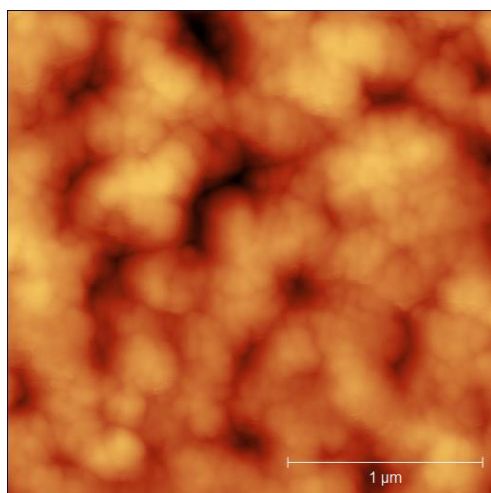


Figura 8. Imagem AFM *Agaricus brasiliensis* fração em 1 μm

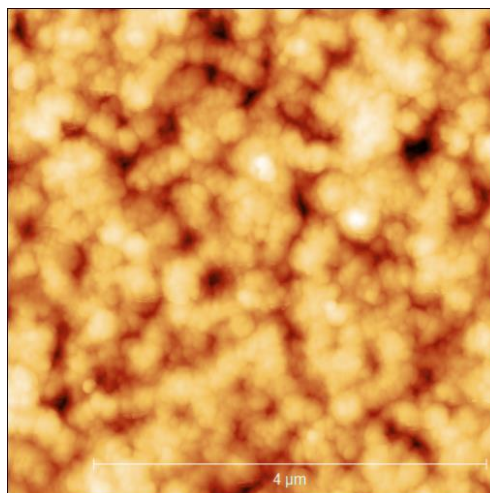


Figura 9. Imagem AFM *A. brasiliensis* fração em 4 μm

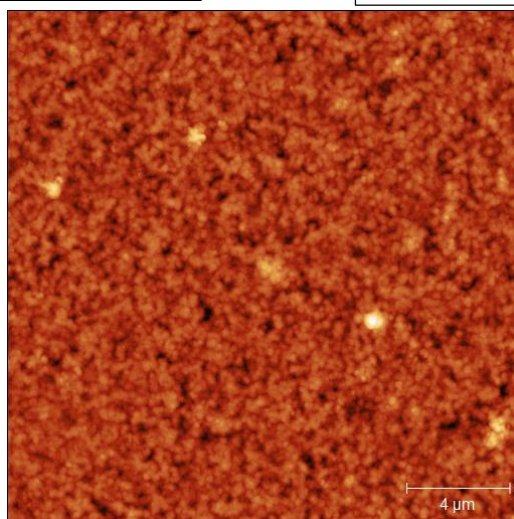


Figura 10. Imagem AFM *A. brasiliensis* bruto em 4 μm

Os poços foram lidos no espectrofotômetro (*Varioskan Flash Thermo Fisher*) a 450 nm afim de conhecermos a taxa da atividade do SOD e a viabilidade celular MTT, – para que pudesse observar quais foram as reações das células Macrófagos de *Muss Musculus* em cultivo junto ao polímero.

As análises mostraram que tanto o EPS bruto, quanto as frações não apresentaram efeito citotóxico (Figura 11 e 12), inclusive o EPS fração de *A. brasiliensis* nas maiores concentrações causou um aumento significativo da proliferação celular (Figura 13 e 14), corroborando a literatura sobre as propriedades imunomoduladoras dos mesmos.^{1-4,7-9}.

As figuras 11 e 12 puderam demonstrar que as células macrófagos de *Muss Musculus* J774 tiveram uma resposta favorável aos polímeros de *A. brasiliensis* produzidos e purificados no laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite, pois as células mantiveram vivas comprovada com a alteração da coloração para roxa provando a sobrevivência das mesmas.

Se a coloração se mantivesse translúcida afirmaria que o polímero seria tóxico pois significaria que as células não teriam resistido a nenhuma das concentrações.

Além da mudança da coloração pode ser observado o tom de roxo mais escuro podendo afirmar que além das mesmas terem sobrevivido elas se multiplicaram na presença do EPS *A. brasiliensis* bruto e fração nos testes de MTT.¹⁴

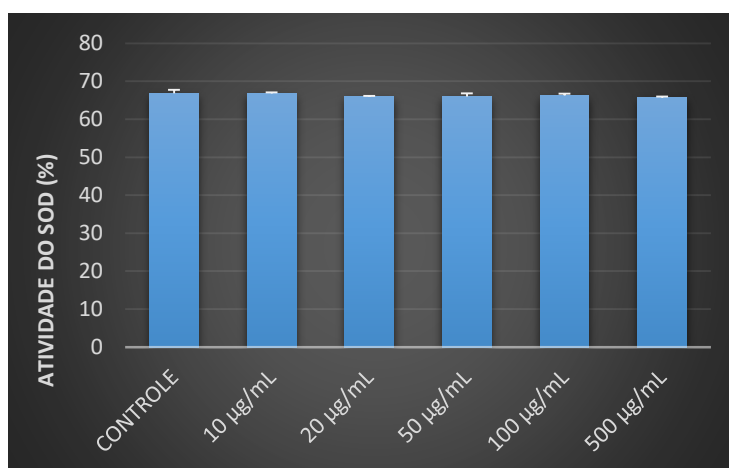


Figura 11. Resultado do ensaio SOD de EPS de *A. brasiliensis* bruto.

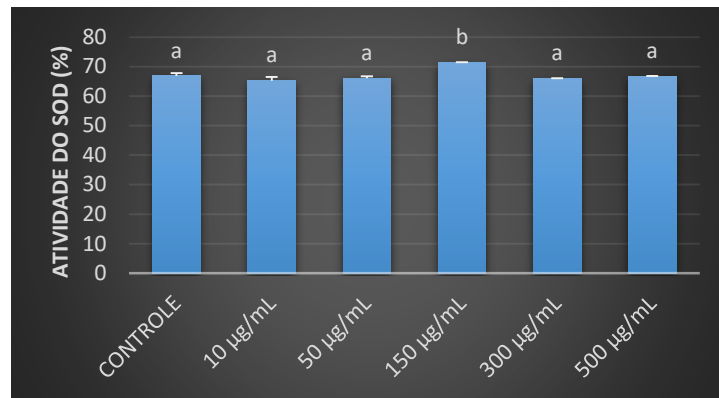


Figura 12. EPS *A. brasiliensis* resultado do ensaio SOD.

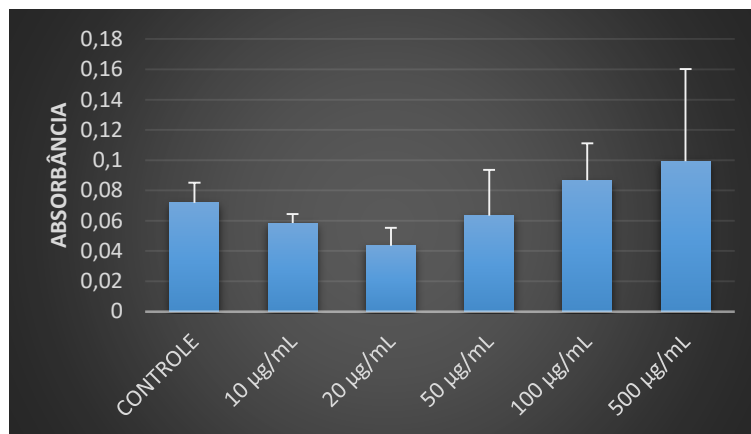


Figura 13. *A. brasiliensis* (bruto) resultado do ensaio de viabilidade celular MTT.

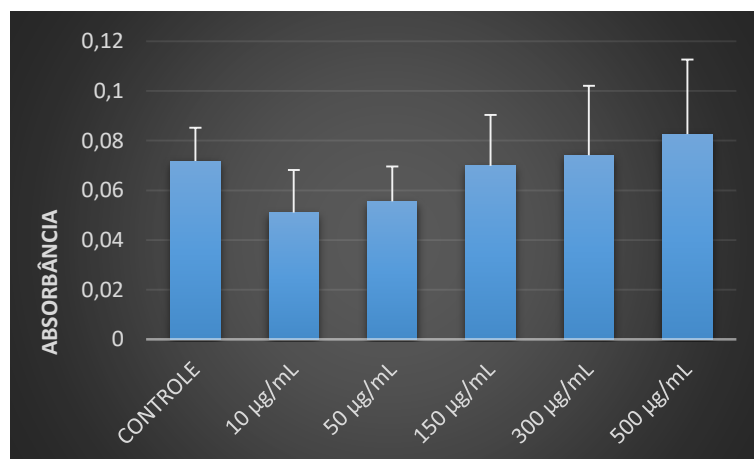


Figura 14. Resultado ensaio de viabilidade celular MTT de EPS de *A. brasiliensis* fração.

CONCLUSÃO

Produziu-se, a partir da fermentação de *Agaricus brasiliensis*, o exopolissacarídeo (EPS) que foi parcialmente purificado, obtendo-se uma fração majoritária mais pura, o EPS fração. Estas amostras foram caracterizadas com as técnicas de espectroscopia Raman, além de imagens de microscopia de força atômica, que confirmaram que a estrutura dos mesmos correspondia a de polissacarídeos conhecidos como glucanas, que podem apresentar efeitos imunomoduladores.

A exposição ao EPS bruto e ao EPS fração por 24h não afetou a viabilidade celular nas concentrações de 10, 50, 150, 300 e 500 µg/mL ($p>0,05$), portanto, não apresentando citotoxicidade. Contudo, quando em contato com a fração nas concentrações de 300 µg/mL e 500 µg/mL, a proliferação celular foi maior quando comparada ao grupo controle e aos demais tratamentos ($p<0,05$), indicando uma função imunomoduladora.

O polímero bruto e a fração não apresentaram alterações nas atividades de SOD ($p>0,05$), que se mantiveram em torno de 65% a 67%.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil, por disponibilizar uma bolsa de iniciação científica onde pude acompanhar e realizar as atividades deste trabalho.

A Ms. Juliana Carine Gern, Dr. Humberto de Mello Brandão, Michelle Daiane de Almeida Loures, Camila Guimarães de Almeida, pela orientação, apoio, confiança e por todas as lições aprendidas ao longo desses anos.

A professora Ms. Nathalia Barbosa do E. Santo Mendes, pela dedicação em suas orientações prestadas na elaboração deste trabalho, me incentivando e colaborando no desenvolvimento.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho: muito obrigada!

REFERÊNCIAS

1. Bermudez JM, Cid AG, Ramírez-Rigo MV, Quinteros D, Simonazzi A, Sánchez Bruni S et al. Challenges and opportunities in polymer technology applied to veterinary medicine. J. Vet. Pharmacol. Therap [periódico na Internet]. 2013 [citado 16 mar 19]; [cerca de 19 p.]. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jvp.12079>.
2. Miranda AM. *Agaricus brasiliensis* (Cogumelo do Sol): caracterização química e efeitos sobre o perfil de genes relacionados à homeostase do colesterol em ratos [tese]. Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto; 2015.
3. de Almeida AC, dos Santos CA, Menezes IR, Teixeira LM, Costa JPR, de Souza RM. Perfil Sanitário de Unidades Agrícolas Familiares Produtoras de Leite Cru e Adequação à Legislação Vigente. Produção Animal. 2016; 17(3): 303-15.
4. Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G. The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of Literature and Pharmacological Problems. Advance Access Publication. 2007; 5(1). 3-15.
5. Manassas VA. TIB-67. [texto na internet]. S.d. [citado 2019 Set 26]. Disponível em: www.atcc.org
6. Gern, JC. Production and characterization of exopolysaccharide from submerged fermentation by *Agaricus brasiliensis*. [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.
7. Sandula J, Kogog G, Kacurakova, et al. (1999) Microbiana (1 → 3) -β-D-glucanos, sua preparação, caracterização físico-química e atividade imunomoduladora. Carbohydr Polym 1999; 38: 247-53.
8. Dnini L, Bernardi E, do Nascimento JS. Desenvolvimento de *Agaricus brasiliensis* em meio suplementados com diferentes farelos. 2006;41(6): 995-9.
9. Kozarski M, Klaus A, Niksic M, Jakovljevic D, Helsper JPF, Griensven. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus Bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma Lucidum* and *Phellinus Linteus*. 2011; 129(4): 1667-75.
10. Asser S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002; 60: 258-74.

11. Noothalapati H, Sasaki T, Kaino T, Kawamukai M, Ando M, Hamaguchi H et al. Label-free Chemical Imaging of Fungal Spore Walls by Raman Microscopy and Multivariate Curve Resolution Analysis. Scientific Reports [periódico na internet]. 2016; [citado 2016 Mai 23]; 6: [cerca de 10p]. Disponível em: www.nature.com/scientificreports
12. Santos AR, Menezes DB, Ellena J, Andrade MB. Aplicação da Espectroscopia Raman na Caracterização de Minerais pertencentes a uma Geocoleção. 2019; 42(5): 489-96.
13. Peres LAB, Delfino VDA, Mocelin AJ, Tutida LA, Favero ME, Matsuo T. Padronização do Teste do MTT em Modelo de Preservação a Frio como Instrumento de Avaliação da Viabilidade Celular Renal. 2008; 30(1): 48-53.
14. Herrmann PSP, da Silva MAP, Fº RB, Job AE, Colnago LA, Frommer JE et al. Microscopia de Varredura por Força: uma Ferramenta Poderosa no estudo de Polímeros. Polímeros: Ciência e Tecnologia. 1997.
15. Alcantara P. Espectroscopia Molecular. Universidade Federal do Pará. Centro de Ciências Exatas e Naturais. 2002.