

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

MARIA LUÍSA CERRI

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE *Cordyceps militaris* EM MEIO A
BASE DE MELAÇO DE CANA E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS**

DISSERTAÇÃO

PONTA GROSSA

2021

MARIA LUÍSA CERRI

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE *Cordyceps militaris* EM MEIO A
BASE DE MELAÇO DE CANA E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS**

***Cordyceps militaris* production optimization in sugarcane
molasses-based medium and bioactive compounds quantification**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Eduardo Bittencourt Sydney

PONTA GROSSA

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



MARIA LUISA CERRI

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CORDYCEPS MILITARIS EM MEIO A BASE DE MELAÇO DE CANA E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Biotecnologia.

Data de aprovação: 25 de março de 2021

Prof Eduardo Bittencourt Sydney, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do

Paraná Prof Alessandro Nogueira, Doutorado – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof.a Sabrina Avila Rodrigues, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 25/03/2021.

Dedico este trabalho à minha família que tanto me oferece amor e paciência e às minhas tias Diva e Ana (*in memoriam*) na espera de que a ciência possa salvar cada vez mais vidas.

AGRADECIMENTOS

Início este seguimento prestando meus agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pesquisa de suma importância para realização deste estudo. É necessário investir em ciência e cientistas no intento do desenvolvimento e soberania nacional.

É impossível estimar o crescimento profissional e pessoal proporcionado pelo meu orientador Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney, que ultrapassa as linhas desta dissertação. Foram aulas, desafios, experimentos e vivências de laboratório que fizeram de mim hoje uma pesquisadora e futuramente professora, levarei todos os ensinamentos para todas as próximas fases da minha vida. E por isso sou muito grata.

Agradeço à Coordenação, secretaria e todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UTFPR - Ponta Grossa por toda a ajuda de prontidão, paciência e ensinamentos.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, meus sinceros agradecimentos pela possibilidade de utilização de equipamentos e oportunidade de aprendizado com os mais qualificados professores e profissionais, principalmente a Dr^a. Traudi Klein, Dr^a. Janaína Emiliano e Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame.

Aos meus colegas de mestrado, Sabrina Vieira, Bárbara Barretti, Alberto Mestre e Isadora Ikeda, pelos ensinamentos e técnicas trocados, pelo apoio emocional e amizade.

Às alunas de iniciação científica e extensão Karine Machado, Sofia Maniezzi e Iane Fonseca agradeço pelo trabalho e tempo dedicado, pelo apoio e pelas importantes observações e questionamentos.

Aproveito também para agradecer o importante trabalho da equipe de limpeza da UTFPR, que mesmo durante o isolamento social permitiu que este trabalho pudesse ser desenvolvido, ajudando a manter a assepsia dos laboratórios.

Science and everyday life cannot and should not be separated. Science, for me, gives a partial explanation of life. In so far as it goes, it is based on fact, experience, and experiment. I agree that faith is essential to success in life, but I do not accept your definition of faith, i.e., belief in life after death. In my view, all that is necessary for faith is the belief that by doing our best we shall come nearer to success and that success in our aims (the improvement of the lot of mankind, present and future) is worth attaining.

(FRANKLIN, Rosalind, 1940)

RESUMO

CERRI, Maria Luísa. **Otimização da produção de *Cordyceps militaris* em meio a base de melão de cana e quantificação de compostos bioativos**. 2021. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2021.

O *Cordyceps militaris* é um fungo de crescente interesse popular e científico por sua complexa composição bioativa que lhe confere funções de relevância farmacológica. É composto por moléculas como ergosterol, manitol, adenosina, cordicepina e exopolissacarídeos. Essas moléculas bioativas são tradicionalmente produzidas a partir da frutificação do *Cordyceps militaris*, um processo longo e trabalhoso que sofre impacto da perda de produtividade em um curto espaço de tempo. Compostos bioativos estão também presentes no micélio deste fungo, mas em menor concentração, porém a produção de micélio permite fácil escalonamento e pode ser vantajoso para a produção em larga escala. Este trabalho propõe a utilização do melão (subproduto da indústria açucareira) como principal fonte de carbono para a produção de micélio de *Cordyceps militaris*. A otimização do meio de cultivo se deu a partir da análise estatística de arranjo composto central (CCD) e o meio otimizado determinado foi capaz de produzir 25,1 g.L⁻¹ de biomassa. Ensaio com a adição de azeite e sulfato de magnésio foram realizados para testar sua eficácia na produção de compostos bioativos. Para avaliação de compostos fenólicos e atividade antioxidante foram utilizados os métodos de Folin-ciocalteau e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), respectivamente. Ademais foram realizadas análises iniciais em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrometria de massas (LC/MS-MS), com objetivo de identificar possíveis massas nos extratos, comparar e otimizar métodos de extração visando a melhor detecção de cordicepina. O extrato produzido a partir do meio líquido apresentou concentrações mais elevadas de compostos fenólicos e atividade antioxidante em relação ao extrato micelial. A produção de compostos fenólicos em 60 dias em meio otimizado é 50% maior que em 10 dias. Em comparação ao meio de manutenção o meio otimizado tem 14% mais compostos fenólicos (ambos com 60 dias de cultivo). Para o DPPH, o melhor resultado foi do extrato do meio líquido otimizado com EC50 de 9,98 ml/L. Em relação às extrações, o melhor método se mostrou ser 15 partições com acetato de etila, por ser mais seletivo à cordicepina, composto de maior interesse, e diminuir a presença de outros compostos que atrapalham sua determinação e podem acarretar em entupimento da coluna. O uso do melão como fonte de carbono para *C. militaris* foi validado neste estudo, assim como sua concentração ideal e a produção ampliada de compostos fenólicos em detrimento ao meio de manutenção.

Palavras Chave: Antioxidante. Compostos Fenólicos. Cogumelo. Micélio. Cromatografia.

ABSTRACT

CERRI, Maria Luísa. ***Cordyceps militaris* production optimization in sugarcane molasses-based medium and bioactive compounds quantification**. 2021. 60 p. Dissertation (Master Degree in Biotechnology). Federal Technology University - Paraná. Ponta Grossa, 2021.

Cordyceps militaris is a fungus of growing popular and scientific interest due to its complex bioactive composition that gives it functions of pharmacological relevance. It is composed of molecules such as ergosterol, mannitol, adenosine, cordycepin and exopolysaccharides. Such bioactive molecules are traditionally produced with *Cordyceps militaris* frutification, a long and demanding process affected by productivity loss in a short period of time. This fungus mycelium also contains bioactive compounds although in a lower concentration. Even though, the mycelium production allows an easier upscale and therefore might show an advantage. This research proposes the use of sugarcane molasses (a by-product of the sugar industry) as main carbon source for *Cordyceps militaris* mycelium production. The optimization of the culture medium was based on the statistical analysis of the central composite arrangement (CCD) and the optimized medium determined was capable of producing 25.1 g.L⁻¹ of biomass. Tests with the addition of olive oil and magnesium sulfate were carried out to test its effectiveness in the production of bioactive compounds. Folin-ciocalteau and DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil) methods were used to evaluate phenolic compounds and antioxidant activity, respectively. Initial analyzes were performed in high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC / MS-MS), to identify possible masses in the extracts, compare and optimizing extraction methods aiming at the better detection of cordycepin. The extract produced from the liquid medium showed higher concentrations of phenolic compounds and antioxidant activity compared to the mycelial extract. The production of phenolic compounds in 60 days in an optimized medium is 50% higher than in 10 days. In comparison to the maintenance medium, the optimized medium has 14% more phenolic compounds (both with 60 days of cultivation). For DPPH, the best result was the extract from the liquid medium optimized with EC₅₀ of 9.98 ml / L. Regarding the extractions, the best method was shown to be 15 partitions with ethyl acetate, as it is more selective to cordycepin, a compound of greatest interest, and to reduce the presence of other compounds that hinder its determination and may cause clogging of the spine. The use of molasses as a carbon source for *C. militaris* was validated in this study, as well as its ideal concentration and the increased production of phenolic compounds to the detriment of the maintenance medium.

Keywords: Antioxidant. Phenolic Compounds. Mushroom. Mycelium. Chromatography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Equação 1. Equação resposta do meio otimizado.....	36
Figura 1. <i>Cordyceps militaris</i> em lagarta pupa.	15
Figura 2. Estrutura molecular da cordicepina e da adenosina com destaque para ausência da hidroxila no carbono 3 da ribose na cordicepina.	18
Figura 3. Curvas de superfície de resposta da produção de biomassa de acordo com as variáveis avaliadas.	40
Figura 4. Espectro de massas do extrato bruto diluído com metanol 1:10.....	45
Figura 5. Espectro de massas da extração pelo método de Sari et al. (2016) com n-hexano	46
Figura 6. Espectro de massas da extração com 5 partições de acetato de etila.....	46
Figura 7. Espectro de massas do líquido restante após a retirada das 5 partições. .	47
Figura 8. Espectro de massas do extrato após 10 partições.....	48
Figura 9. Espectro de massas do líquido restante após a retirada das 10 partições.	48
Figura 10. Espectro de massas do extrato após 15 partições.....	49
Figura 11. Espectro de massas do líquido restante após a retirada das 15 partições	49
Fluxograma 1. Processos integrantes da metodologia do presente estudo	29
Fotografia 1. Micélio úmido do <i>Cordyceps militaris</i> após filtração a vácuo.....	30
Gráfico 1. Curva analítica do método Folin-Ciocalteu para determinação da concentração do equivalente de Ácido Gálico em mg/L.....	33
Gráfico 2. Curvas de porcentagem de inibição de radicais livres pelos extratos em meio líquido fermentado em meio base, com adição de azeite, magnésio e sem adições.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de preços médio por grama de cogumelo seco em março de 2021	13
Tabela 2. Estudos avaliativos do teor de Cordicepina sob diferentes métodos de cultivo	21
Tabela 3. Composição do meio de manutenção.	26
Tabela 4. Planejamento estatístico para otimização de meio contendo melão.	27
Tabela 5. Dados para construção da curva analítica para o método de Folin-Ciocalteu	32
Tabela 6. Preparo das diluições de amostras para curva de DPPH.....	33
Tabela 7. Peso seco do micélio filtrado após fermentação de 10 dias pelos métodos de cultivo submerso e líquido de superfície	37
Tabela 8. Desenho experimental e resultados do CCD	39
Tabela 9. Produção de biomassa em meio otimizado em diferentes cepas de <i>C. militaris</i>	42
Tabela 10. Resultados de Folin-Ciocalteu nos extratos advindos do meio líquido e do micélio dos cultivos de 10 e 60 dias do meio otimizado e meio de manutenção em cultivo estático.....	43
Quadro 1. Principais funções atribuídas aos compostos encontrados no fungo <i>C. militaris</i>	16

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 GÊNERO <i>Cordyceps</i>	13
2.1.1 <i>Cordyceps militaris</i>	14
2.1.2 Compostos bioativos do <i>Cordyceps militaris</i>	16
2.2 CORDICEPINA	17
2.3 MÉTODOS DE CULTIVO DO <i>Cordyceps militaris</i>	22
2.3.1 Cultura sólida	22
2.3.2 Meio Líquido	23
2.4 MELAÇO	24
2.5 TESTES DE INDUÇÃO DE PRODUÇÃO DE BIOATIVOS E CORDICEPINA	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 CEPAS DE <i>Cordyceps militaris</i> E MÉTODO PARA MANUTENÇÃO	26
3.2 OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE CULTIVO CONTENDO MELAÇO.....	27
3.2.1 Peso seco	30
3.3 TESTE DE INDUÇÃO DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	30
3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	31
3.5 TESTE DE FOLIN-CIOCALTEAU	31
3.6 TESTE DE DPPH	33
3.7 TESTE DE PURIFICAÇÃO DO EXTRATO PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS	34
4 RESULTADOS.....	36
4.1 OTIMIZAÇÃO DE MEIO CULTIVO CONTENDO MELAÇO.....	36
4.2 RESULTADOS DO TESTE DE FOLIN-CIOCALTEAU	42
4.3 RESULTADOS DO TESTE DE DPPH	44
4.4 TESTE DE MELHORAMENTO DE EXTRAÇÃO PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	45
5 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

Uma parcela crescente de consumidores vem buscando alternativas que proponham saudabilidade em alimentos e bebidas e que forneçam funcionalidade à sua alimentação. Neste mesmo princípio as indústrias lançam produtos com alegações funcionais e melhores e mais equilibrados nutrientes, inclusive com novos ingredientes com o apelo ao consumidor de novidade e sabor.

Um novo grupo que aos poucos tem entrado em território nacional em diversas formas, como fresco, tinturas, seco, misturado à bebidas e que antes predominava como conserva são os cogumelos.

Entre diferentes cogumelos existem várias funcionalidades bioativas descritas, como: antitumoral, imunomoduladora, antioxidante, diminuição de radicais livres, diminuição de colesterol, antiviral, antibacteriano, antiparasita, antifúngico, hepatoprotetor, antidiabético, antiobesidade, neuro protetor e analgésicos.

No grupo dos cogumelos com propriedades medicinais o *Cordyceps* spp. é de grande uso na medicina popular Chinesa, Coreana, Indiana e Japonesa pela sua reconhecida bioatividade. Porém, com disponibilidade baixa de espécies como *O. sinensis* e baixa adaptabilidade em laboratório, outras espécies prevaleceram, como *C. militaris*, utilizado neste trabalho.

A frutificação deste cogumelo, exige um longo tempo, luz e diferentes fases (escura e iluminada e diferentes temperaturas), isso é custoso para os produtores, em produtividade, em espaço e investimento. Como alternativa, este trabalho propõe utilizar o cultivo líquido para obter, de forma mais rápida e simples, uma quantidade aumentada de compostos bioativos. Para isso, a produção de biomassa deste fungo em meio contendo melaço como fonte de carbono foi otimizada e seus compostos fenólicos e atividade antioxidante medidos.

A cordicepina é o composto de mais destaque neste fungo por ser responsável por proporcionar ação anti-fadiga, antioxidante, antifúngico, antibacteriano, antitumoral e efeito apoptótico. Este composto é produzido de forma parcialmente associada ao crescimento, de modo que otimizar um meio de cultivo voltado ao melhor crescimento de biomassa fúngica resulta também em maior produção de cordicepina. Geralmente a cordicepina é extraída de corpos de frutificação do fungo, que leva em média 60 dias para ser produzido. Apesar de ser produzido em menor concentração

no micélio, a escalabilidade e menor tempo de produção podem ser vantajosos. A literatura carece de dados de produção de compostos bioativos de *C. militaris* a partir do cultivo líquido (micélio) do fungo, área em que este trabalho pretende contribuir

O melaço é um subproduto da indústria açucareira passível de aproveitamento e valorização como parte de um meio de cultivo justamente por sua composição rica em carboidratos (sacarose), vitaminas e minerais, além de não possuir em sua composição metais pesados. Neste estudo o melaço de cana de açúcar foi avaliado como fonte alternativa de nutrientes para a produção de compostos bioativos de *Cordyceps militaris*, em condições otimizadas. A proposta de utilizar melaço na produção de biomassa e compostos ativos de *C. militaris* é inédita na literatura científica.

Este trabalho também promoveu uma comparação entre diferentes extrações para cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massas (UHPLC-MS/MS) visando definir o método mais adequado para determinação de cordicepina.

Em linhas gerais, este trabalho beneficia pequenos e grandes produtores de cogumelos que possam obter melhores produtividades, e também o público consumidor ou potencial consumidor, por identificar o teor de compostos bioativos deste tipo de produção.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GÊNERO *Cordyceps*

O *Cordyceps* é um gênero de fungos de maioria endoparasítica de insetos e artrópodes, pertencentes ao filo Ascomycota, o que significa que eles produzem seus esporos em estruturas reprodutoras chamadas ascos. Segundo Sung *et al.* (2010) mais de 400 espécies de *Cordyceps* já foram descritas.

Esses endoparasitas geralmente infectam insetos com seus esporos, vivem e crescem dentro deles; o micélio mantém o hospedeiro vivo até ocasionar a sua morte e então o cogumelo do *Cordyceps* spp. frutifica (CUI, 2015).

Uma das espécies mais famosas na medicina tradicional chinesa, japonesa, coreana e indiana é o *Ophiocordyceps sinensis*, cuja incidência natural é limitada à lugares como o Platô Tibetano da China, que tem um clima e bioma específico para seu crescimento.

Segundo Shrestha *et al.* (2010), existem literaturas médicas chinesas que datam de 3000 anos e citam o *O. sinensis*. Nos últimos 300 anos a retirada do fungo naturalmente encontrado neste platô tem crescido devido à exploração por religiosos, entomologistas, viajantes e farmacêuticos. Pela sua grande exploração o preço comercial do *O. sinensis* selvagem é elevado, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Relação de preços médio por grama de cogumelo seco em março de 2021

Cogumelo	Dólares/g (X±DP)*
<i>Cordyceps militaris</i>	0,56 ± 0,35
<i>Cordyceps sinensis</i>	28,08 ± 27,40
<i>Inonotus obliquus</i> (cogumelo Chaga)	0,26 ± 0,24
<i>Ganoderma lucidum</i> (cogumelo Reishi)	0,13 ± 0,02

Fonte: autoria própria.

*X corresponde a média e DP ao desvio padrão

O corpo frutificado do *C. sinensis* é de cor marrom escura e projeta-se aproximadamente 3 a 6 cm do chão ou de troncos caídos e tem de 0,4 a 0,7 cm de

espessura (MCKENNA *et al.*, 2012). Abaixo da superfície do solo ou dentro do tronco é possível achar o corpo frutificado com seu micélio distribuído em uma larva, no caso do *O. sinensis*, geralmente de mariposas (*Hepialis* sp.).

Culturalmente na China esta espécie é vendida em pacotes contendo o corpo frutificado e a larva. Ele é geralmente consumido em sopas, cozido com porco, frutos do mar, carne e para chá e seu consumo é indicado para atletas, idosos em recuperação de doenças diversas, para tratar anemia, impotência e como antídoto para envenenamento com ópio (MCKENNA *et al.*, 2012).

Devido a alta demanda de mercado, dificuldade de cultivo em laboratório e periodicidade limitada deste fungo na natureza, houve um grande extrativismo desta espécie, o que levou ao governo chinês a declarar o *O. sinensis* como uma espécie ameaçada de extinção (CHINA, 1999). Em 2017, o governo do Butão implementou um sistema de manejo controlado deste fungo (BUTÃO, 2017).

Segundo estudo de Chen *et al.* (2018), em que foi performada uma comparação metabólica entre os fungos *O. sinensis* selvagem e *Cordyceps militaris* cultivado em laboratório, o primeiro se mostrou um fungo com mais compostos bioativos presentes, em sua maioria, sendo então uma fonte mais rica. Porém, segundo Zhou *et al.* (2014) não é possível, com a tecnologia disponível, cultivar o *O. sinensis* em larga escala e condições artificiais. Surge então a necessidade de uma espécie que se adapte melhor ao cultivo laboratorial e que possa ter bioatividades similares. Chen *et al.* (2018) ainda elucidou que grande parte dos compostos bioativos estão presentes no *C. militaris* cultivado em laboratório e portanto ele é um candidato adequado para uma substituição na tentativa de produção destas biomoléculas em maior escala.

2.1.1 *Cordyceps militaris*

Esta espécie, comumente conhecida como ‘fungo laranja da lagarta’, de nome sugestivo como observado na Figura 2, se adaptou mais facilmente aos cultivos laboratoriais e por este motivo se popularizou e propagou no mercado internacional. Ele pode ser cultivado tanto em meio líquido quanto em meio sólido e se adapta em uma variedade de fontes de carbono e nitrogênio. Diferentemente do *O. sinensis*, o

Cordyceps militaris tem uma distribuição mundial natural, porém menos significativa em número populacional, além de seu estroma silvestre ser reduzido em tamanho (Shrestha *et al.*, 2012).

Figura 1. *Cordyceps militaris* em lagarta pupa.



Fonte: Zheng *et al.* (2011)

Zheng *et al.* (2011) sequenciou o genoma do *C. militaris*, com um total de 9.684 genes. Nenhum ortólogo de micotoxina humana foi identificado, o que justifica e valida seu uso tradicional como medicamento. Um método utilizado por produtores amadores e profissionais deste fungo é o cruzamento de esporos de diferentes linhagens na tentativa de produzir linhagens mais fortes, que produzam mais biomassa, mais cordicepina ou mais compostos bioativos. Cui (2015) afirma que linhagens naturais de diferentes localizações tem características morfológicas e farmacológicas diferentes, porém as diferenças genéticas entre as linhagens são pequenas e não estão correlacionadas com a localização geográfica.

No estudo de Hur (2010) a composição química do corpo de frutificação do *C. militaris* foi avaliada, tendo descoberto os seguintes resultados: 69,32 mg/g de aminoácidos, sendo os mais abundantes a lisina, o ácido glutâmico a prolina e a treonina. Sobre os lipídeos, 70% dos ácidos graxos são de cadeia insaturada, sendo o mais abundante o ácido linoleico.

2.1.2 Compostos bioativos do *Cordyceps militaris*

As análises de transcriptoma e proteoma realizadas por Yin *et al.* (2012) mostraram que 2.113 genes são regulados positivamente (ativados) no micélio e 599 no corpo de frutificação. No micélio, as funções mais ativas segundo o estudo supracitado são o metabolismo intracelular de nucleotídeos, a regulação transcricional e a tradução de genes; enquanto no corpo frutificado uma das principais funções dos genes ativados é o metabolismo de carboidratos.

Os principais compostos bioativos do *C. militaris*, segundo Wong *et al.* (2011) e Yang *et al.* (2000) são a cordicepina, a Adenosina e seus polissacarídeos. Um destes polissacarídeos é o CPS-1, isolado por Yu *et al.* (2004) a partir de um extrato aquoso do corpo de frutificação, que após foi precipitado com etanol, desproteinado e o gel filtrado em cromatografia. Neste mesmo estudo, confirmou-se a atividade antiinflamatória deste polissacarídeo em ratos. Yu *et al.* (2009) também isolou e elucidou a estrutura da CBP-1, a partir de uma extração alcalina do corpo frutificado do *C. militaris*. Este novo polissacarídeo, a partir de testes *in vitro* demonstrou uma atividade de eliminação de radicais hidroxila. Na tabela 1 há um compilado dos estudos mais recentes com os compostos bioativos e suas respectivas funções.

No estudo metabolômico de Chen *et al.* (2018) foram encontrados ácido linoleico e oleico, lipídeos de cadeia insaturada de importância para o consumo humano e normalmente encontrados em fontes vegetais como, azeite de oliva, óleo de coco e abacate. O ácido linoleico é um ácido graxo essencial não produzido pelo corpo humano, por isso a importância do seu consumo na alimentação. Neste mesmo estudo também foi apontada a presença de manitol no *C. militaris*; o manitol é um poliol utilizado como diurético.

Quadro 1. Principais funções atribuídas aos compostos encontrados no fungo *C. militaris*

(continua)

Autor	Composto	Ação	Meio utilizado
Ahn <i>et al.</i> (2000)	Cordicepina	Antimicrobiana contra <i>Clostridium paraputrificum</i> e <i>C. perfringens</i>	Cultivo Líquido. Fração ativa particionada com acetato de etila e separada em coluna

Quadro 2. Principais funções atribuídas aos compostos encontrados no fungo *C. militaris*

			(conclusão)
Hu, <i>et al.</i> (2019)	CM1 e CMS (polissacarídeos)	Melhora da saída do colesterol das células (teste <i>in vitro</i>)	Extrato aquoso, centrifugado e precipitado com etanol
Kim <i>et al.</i> (2006)	Enzima fibrinolítica	Serina protease semelhante à quimiotripsina	Extrato aquoso a partir dos cogumelos descongelados, precipitado em baixa temperaturas
Bai; Sheu (2018)	CMP (Proteína)	Apoptótica	Extração a partir de cogumelos secos com 5% (v/v) de ácido acético, 0,1% (v/v) de 2-mercaptoetanol e 0,308M de cloreto de sódio, posterior purificação da proteína
Song <i>et al.</i> (2015)	Extrato aquoso	Anti-fadiga	Extrato aquoso a partir dos cogumelos
Aramwit <i>et al.</i> (2014)	Cordicepina	Antitumoral (câncer pulmonar NCI-H460)	Extrato aquoso a partir do micélio
Jeong <i>et al.</i> (2010)	Cordicepina	Anti-inflamatória	Cordicepina padrão
Reis <i>et al.</i> (2013)	Extrato metanólico	Antimicrobiana contra <i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Aspergillus species</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> , <i>Penicillium ochrochloron</i> e <i>Trichoderma viride</i> Antitumoral em câncer de mama (MCF-7), pulmão (NCI-H460), cólon (HCT-15) e cervical (HeLa)	Extração metanólica a partir dos cogumelos liofilizados
Wang <i>et al.</i> (2012)	Extrato aquoso	Hepatoprotetor	Extrato aquoso (extraído à 60°C)
Yu <i>et al.</i> (2009)	CBP-1 (polissacarídeo)	Antioxidante	Extrato alcalino

Fonte: Autoria própria

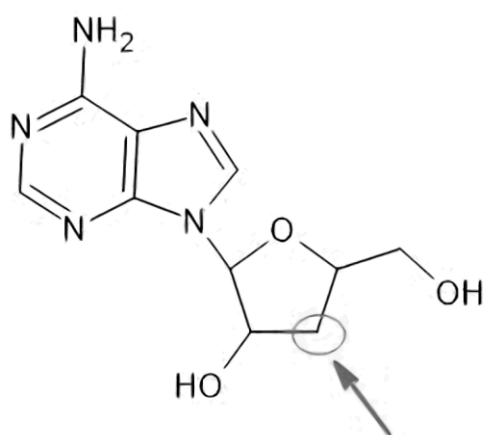
2.2 CORDICEPINA

A cordicepina (C₁₀H₁₃N₅O₃), também conhecida como 3'-desoxiadenosina, é um nucleosídeo de purina primeiramente isolado por Cunningham *et al.* (1951) a partir de uma colônia de *Cordyceps militaris*. Também conhecida por 3'-Desoxiadenosina, seu peso molecular é de 251,24 g/mol.

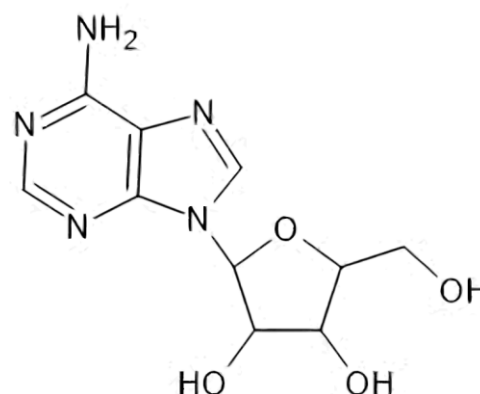
Por ser muito similar à adenosina, é considerada um antimetabólito, o que significa que por ser análogo à um metabólito necessário ela o inibe por competição. No corpo humano, ela tem similaridade para ser reconhecida, mas não o suficiente para manter as funções normais celulares, como a replicação celular, ou então forçando a apoptose (morte celular). A diferença entre adenosina e cordicepina está na ausência da hidroxila no carbono 3 da ribose da segunda.

Figura 2. Estrutura molecular da cordicepina e da adenosina com destaque para ausência da hidroxila no carbono 3 da ribose na cordicepina.

Cordicepina



Adenosina



Fonte: autoria própria.

Existem estudos do uso da cordicepina para diversas finalidades, Aramwit *et al.* (2014) avaliou sua aplicação em células de câncer de pulmão e adenocarcinoma epitelial de pulmão e obteve como resultado que o IC50 da cordicepina (0,7 μM) foi aproximadamente 114 vezes menor que o IC50 da cisplatina (80 μM), uma droga anti cancerígena comercial. Como efeito secundário, a droga cisplatina pode causar nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, náuseas e vômitos. No estudo supracitado ficou provado que as células sofreram ruptura da membrana celular, impedindo sua proliferação.

Um estudo de toxicidade e mutagenicidade foi conduzido com a cordicepina por Aramwit *et al.* (2015), *in vitro* foi realizado o teste de Ames, com *Salmonella typhimurium* para testar a mutagenicidade a curto prazo. O uso dessas linhagens indicadoras é utilizado pois elas são sensíveis à substâncias capazes de induzir

diversas mutações; na presença destas substâncias essa linhagem deixa de ser auxotrófica (dependente estrita de histidina) e cresce em meios sem a presença deste aminoácido. Assim, através de uma contagem de colônias é possível estabelecer a ação mutagênica do composto em teste (MOREIRA *et al.*, 2002).

Como resultado do teste, observou-se que em relação ao controle negativo (tampão fosfato) a cordicepina teve de 1,19 a 1,81 vezes mais colônias revertentes, enquanto o controle positivo (azida de sódio), apresentou 19,29 vezes o valor de colônia revertentes do controle negativo. Não foram observados aumentos de colônias com aumento das concentrações de cordicepina testadas. Isso a configura como um provável agente não mutagênico.

No mesmo estudo de Aramwit *et al.* (2015) realizou-se um teste *in vivo* de toxicidade, com ratos por administração oral de 0,25 e 1 mg/mL e grupo controle. Cada rato recebeu 1 mL da solução durante 30 dias. De acordo com testes de sangue e avaliação de órgãos pós-morte, não houveram mudanças significativas em células ou nos compostos químicos do sangue. Todos os exames ficaram dentro da normalidade. Houve uma diferença na creatinina e ácido úrico dos ratos alimentados com cordicepina para os não alimentados, no entanto a quantificação de nitrogênio da uréia no sangue apontaram uma função normal dos rins. Os órgãos analisados também mostraram similaridade com o grupo controle e normalidade nos padrões esperados, apontando a não toxicidade da cordicepina em ratos.

Este estudo também testou a citotoxicidade da cordicepina inserida em um sistema de liberação por nanopartículas de gelatina em células não-cancerígenas SAEC (células epiteliais das vias aéreas pequenas) e células A549 de câncer de pulmão. Em 24 horas de teste a viabilidade celular em células não-cancerígenas se manteve de 95% a 100%; nas células cancerígenas ao final das mesmas 24h a viabilidade estava entre 60 e 80%, confirmando a não citotoxicidade da cordicepina e seu potencial uso como tratamento auxiliar de câncer.

No estudo de Lee *et al.* (2011) a cordicepina foi testada em duas linhagens de células de carcinoma oral de células escamosas (KB e HSC3) e apresentou efeito anti-proliferativo e apoptótico nos testes *in vitro*; nos testes *in vivo* teve um bom efeito apoptótico, porém não houve uma redução do tamanho do tumor. Segundo os autores, para este tipo de câncer, a molécula apresenta efeito limitado como droga quimioterápica.

Importante efeito anti-inflamatório foi estudado por Jeong *et al.* (2010) sobre a microglia, células do tipo macrófago no cérebro que participam da defesa e reparo de tecido do sistema nervoso central (SNC), onde a cordicepina apresentou efeito inibitório nesta microglia, suprimindo algumas vias de sinalização e podendo ser útil no tratamento de doenças neurodegenerativas.

No estudo de Ahn *et al.* (2000) com nove bactérias intestinais humanas, a cordicepina inibiu o crescimento de *Clostridium* spp, em discos com 10 µg. Neste mesmo estudo foi avaliado o desempenho contra a *Escherichia coli*, porém, nas concentrações utilizadas (0,1 a 200 µg/disco) não houve inibição do crescimento.

Sugar; Caffrey (1998) testaram a ação antifúngica contra *Candida albicans* e *Candida krusei*, dois tipos invasivos de candidíase. Este estudo foi feito com murinos e o grupo controle morria ao 14° dia. Com tratamento com a Cordicepina ou deoxicoformicina separados, a taxa de sobrevivência era de 25%. E com a combinação das duas substâncias, 88% dos murinos sobreviviam até o fim do experimento, no 30° dia. Isso acontece porque existe uma enzima adenosina deaminase (ADA) que é capaz de inativar a cordicepina *in vivo*, porém com a associação das duas drogas a deoxicoformicina é capaz de proteger a cordicepina da deaminação.

Esforços para a elucidação da rota metabólica da cordicepina são feitos desde Lennon; Suhadolnik (1976), porém foi no estudo de Xia *et al.* (2017) que os genes envolvidos na biossíntese e a possível rota foram desvendados. Já era conhecido que este composto de alguma forma derivava da Adenosina através de uma dehidroxilação, porém este estudo descobriu que partindo da Adenosina, ocorre primeiramente uma fosforilação da hidroxila do carbono 3, produzindo adenosina-3'-monofosfato (3'AMP), essa reação é catalisada por uma quinase regulada pelo gene Cns3, para depois, regulada pelo gene Cns2, ser desfosforilada e como resultado obter 2'-carbonil-3'-desoxiadenosina. Esse composto é então transformado em cordicepina por uma Oxidorredutase Cns1.

Em geral, assume-se que o teor de cordicepina é maior no corpo de frutificação de *C. militaris* do que no micélio, porém a literatura científica está longe da unanimidade. Os estudos existentes não comparam as diferenças de concentração de cordicepina entre meio sólido e líquido sob as mesmas condições de meio e extração e normalmente os valores têm incorporado suplementações de nutrientes ou

micronutrientes para melhoramento do meio, que não permitem a justa comparação. O estudo de Huang *et al.* (2009) faz este comparativo entre cordicepina extraída do corpo frutificado ou do micélio em uma cepa de *C. militaris*, e concluiu que há mais cordicepina no corpo frutificado e mais Adenosina no micélio, e vice-versa, sendo este micélio tendo sido cultivado por uma semana. Mesmo que a quantidade no cogumelo seja maior em cordicepina, não é possível descartar a hipótese que a cordicepina ainda esteja sendo produzida no meio líquido, porém extracelular, ou seja, esteja sendo excretada da célula e, portanto, se encontra em menor quantidade no micélio, porém isso tem sido objeto de poucos estudos.

Tabela 2. Estudos avaliativos do teor de Cordicepina sob diferentes métodos de cultivo

Estudo	Método	Teor de cordicepina
Huang <i>et al.</i> (2009)	Cultura sólida – corpo frutificado	2,654 ± 0,02 mg/g
Huang <i>et al.</i> (2009)	Cultura líquida submersa – micélio	0,9040 ± mg/g
Masuda <i>et al.</i> (2014)	Cultura líquida de superfície	14.300 mg/L
Wen <i>et al.</i> (2014)	Cultura sólida – CF	9,17 ± 0,09 mg/g
Hu <i>et al.</i> (2019)	Cultura sólida – CF	69,3 mg/g
Masuda <i>et al.</i> (2007)	Cultura líquida de superfície	2.500 mg/L
Mao <i>et al.</i> (2005)	Cultura líquida submersa	345,4 ± 8,5 mg/L

Fonte: autoria própria.

Em Sari *et al.* (2016) um cultivo em placas foi conduzido em diferentes cepas de *C. militaris*. Ao selecionar a cepa de maior produção de cordicepina, esta foi testada também em meio líquido de superfície e submerso e como resultado conclui-se que o cultivo de superfície foi mais apropriado para a produção de cordicepina, produzindo o dobro no 13º dia de cultivo (16 mg e 8 mg respectivamente).

O estudo de Sari *et al.* (2016) também trouxe uma nova informação importante quanto ao efeito da área de superfície, em Erlenmeyers de 500ml foram testadas diferentes áreas de superfície por quantidade de meio. Descobriu-se então que meios com maior razão de área de superfície produziram mais cordicepina, sendo o meio com 50 ml o maior produtor (120,9 mg).

É possível observar de acordo com estudos como Mao *et al.* (2005) um comportamento da produção de cordicepina pelo fungo como um produto

parcialmente associado ao crescimento, isso justifica a escolha deste trabalho de otimizar a produção de biomassa como indicativo da produção de cordicepina.

2.3 MÉTODOS DE CULTIVO DO *Cordyceps militaris*

Apesar de encontrado naturalmente, a extração do *C. militaris* da natureza não é viável devido à sua necessidade de um hospedeiro específico, ciclo de vida e ambientes estritos para o crescimento (CUI, 2015), porém diversos estudos comprovaram que os componentes dos fungos encontrados naturalmente e cultivados em laboratório são equivalentes, como no estudo de Wang *et al.* (2012).

Os principais métodos encontrados nas pesquisas científicas para este fungo são a cultura sólida, a cultura líquida (submersa ou de superfície) e a cultura em dois estágios.

2.3.1 Cultura sólida

Na natureza, o *C. militaris* se desenvolve a partir do corpo de larvas e pupas e utiliza de seus componentes corporais para crescer; em laboratório é possível inocular o fungo em larvas e monitorar o crescimento (CHEN; ICHIDA, 2002 E SATO; SHIMAZU, 2002) porém o corpo de frutificação é mais instável em termos de tamanho e padronização, o que dificulta a produção em larga escala. O meio sólido é o cultivo mais tradicional para este fungo e também o mais demorado, de 45 a 70 dias (CERRI *et al.*, 2019).

O meio mais comumente utilizado tanto no meio científico quando por produtores de *C. militaris* é o meio de arroz integral como fonte principalmente de carbono (HU *et al.*, 2019; OH *et al.*, 2019; WEN *et al.*, 2014). O arroz integral, além de uma fonte de carbono, possui de 6-8% de proteínas, 2-3% de lipídeos (conteúdo maior que de outros tipos de arroz em que existe um processo de retirada do farelo) e um conteúdo de cinzas entre 1 e 2% (também maior que os similares mais processados), 78% de carboidratos e 5% de fibras (HEINEMANN *et al.*, 2005 e TACO, 2004).

2.3.2 Meio Líquido

A cultura em meio líquido tem algumas vantagens em relação ao meio sólido; pela formação do micélio ser mais rápida, é possível aumentar a produtividade (célula/tempo) dos cultivos, é um método que exige menos espaço (o que aumenta sua vantagem para produção em grande escala) e tem menos chance de contaminação (CUI, 2015).

Portanto, vários estudos elegem este método na tentativa de produzir moléculas de interesse tanto intra quanto extracelulares e otimizar sua produção para obter a maior produtividade por tempo e por quantidade de substrato (CUI; YUAN, 2011, MAO *et al.*, 2005 e MASUDA *et al.*, 2007, 2014).

Dentro do cultivo líquido existem duas modalidades de destaque para o *C. militaris*, o cultivo líquido submerso e o cultivo líquido de superfície. O primeiro é caracterizado por uma aeração vigorosa por meio de agitadores, que podem variar de 110 a 300 rpm, segundo Tuli e Sharma (2014). Porém existe uma tendência entre os estudos em manter a agitação mais baixa, entre 110 e 150 (WANG *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2019). A metodologia do cultivo líquido de superfície consiste em manter o cultivo estático em incubadora de demanda bioquímica de oxigênio. Este método também pode ser utilizado para obtenção de cordicepina, como no estudo de Wongsu *et al.* (2019)

Na metodologia submersa existem estudos recentes utilizando batelada repetida para aumentar a produtividade de células ou compostos bioativos. A batelada repetida consiste em depois de uma quantidade determinada de dias de crescimento do fungo (determinada de acordo com o tempo que biomolécula de interesse leva para atingir sua produção máxima), retirada do fungo e do meio de cultura em que os nutrientes já foram esgotados e troca por um novo meio (de mesma composição), para que a colônia que se fixa às paredes do biorreator continue seu crescimento com mais nutrientes (WANG *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2019).

Por fim, existe ainda um método chamado cultura em dois estágios, estudado por Zheng *et al.* (2019) que consiste em utilizar primeiramente um estágio submerso seguido de um cultivo de superfície, o primeiro com duração de 4 dias e o segundo durando 10 dias, com objetivo de aumentar a produção de carotenoides.

2.4 MELAÇO

O melaço de cana é um líquido viscoso, escuro, subproduto da indústria de sacarose. Por ter um baixo valor agregado, alta disponibilidade (por ser de grande produção), e ter uma alta quantidade de açúcares disponíveis, o melaço se tornou uma matéria prima de grande uso na biotecnologia. Pode-se citar o estudo de Anjos (2013), em que se utilizou o melaço de cana de açúcar como parte de um meio para produção de carotenoides por *Mucor circinelloides*. É possível citar também a produção de biomassa de *Saccharomyces boulardii* desenvolvida por Kitamura (2013) com objetivo de ser um probiótico enriquecido de selênio e que em seu meio de cultivo utiliza melaço de cana de açúcar. Rocha (2017) desenvolveu um biossurfactante a partir de uma fermentação com *Bacillus subtilis* utilizando o melaço de cana de açúcar como fonte de carbono.

A sacarose é o principal e mais abundante açúcar constituinte do melaço, tendo uma proporção de 1,5-2,5:1 de sacarose para açúcares redutores. O processo de retirada do açúcar do caldo de cana, mantém as vitaminas que são resistentes ao calor e processo alcalino, como a niacina, o ácido pantotênico e a riboflavina.

De acordo com Woiciechowski *et al.* (2013) os melaços de cana contêm uma média de compostos nitrogenados que varia entre 2,5 a 4,5 % de sua composição. Os compostos mais comumente encontrados são ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina, guanina, xantina, asparagina, alanina, glicina, leucina ou isoleucina; e valina.

Usualmente encontram-se outros ácidos não nitrogenados no melaço, como ácido málico, cítrico, láctico, fórmico, acético e propiônico, seja por serem constituintes naturais, resultado de processos ou ações biológicas. Alguns taninos e antocianinas sobrevivem ao tratamento térmico e à exposição prolongada ao oxigênio formando complexos férricos (BINKLEY; WOLFROM, 1953). A concentração de gorduras, lipídeos e ceras no melaço é baixa, em análise cromatográfica foram identificados álcool melissílico (uma fração do fitoesterol), clorofila A e uma fração de gordura contendo ácido linoleico.

Existem estudos de Hsieh *et al.* (2005) e Cha *et al.* (2007) que fizeram otimizações em meio contendo melaço para uma fermentação com *Cordyceps sinensis* visando a produção de polissacarídeos e exo-biopolímeros. O primeiro

trabalho tem na composição de seu meio 25 g/L de sacarose, 4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1 g/L de KH_2PO_4 , 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g/L de CSP, 4 g/L de cloreto de amônio e 1 mL/dL de solução de elementos traço. O meio de Cha *et al.* (2007) contém 2% de melaço, 0,9% de extrato de levedura, 0,3% K_2HPO_4 , e 0,4% CaCl_2 . Não foram encontradas otimizações de meios contendo melaço fermentados pelo *Cordyceps militaris*, ou visando a otimização de biomassa ou cordicepina.

2.5 TESTES DE INDUÇÃO DE PRODUÇÃO DE BIOATIVOS E CORDICEPINA

A indução é um mecanismo de regulação de genes, também chamada de desrepressão, isso porque, em presença de um substrato indutor, os genes que codificam a síntese de enzimas induzidas para a produção de uma determinada substância (por exemplo, a cordicepina) são desreprimidos (Borzani *et al.*, 2001).

Em relação ao *C. militaris*, Sari *et al.* (2016) testou a indução a partir da inserção de glicina e adenina, tendo um melhor resultado com a segunda (quando adicionada na concentração de 6,75 g/L) e alcançando a produção de 312,2 mg (aproximadamente 6,5 g/L) de cordicepina, melhorando em quase 5 vezes a cordicepina do que o cultivo sem indução.

No estudo de Masuda *et al.* (2007) diversos indutores foram testados, como compostos relacionados a biossíntese de purinas, coenzimas e surfactantes no meio líquido de superfície. Os melhores resultados foram obtidos com glicina, ácido l-aspártico, l-glutamina, adenina e adenosina. A melhor condição foi na combinação de 1 g/L de adenina e 16 g/L de glicina, que chegou a um máximo de 2,5 g/L de cordicepina.

Fan *et al.* (2012) testou a adição de sulfato ferroso em cultura submersa e atingiu uma produção de $596,59 \pm 85,5$ mg/L (70% maior que no meio base utilizado pelo estudo). Levando em consideração o estudo de Sari *et al.* (2016) em que se verificou uma produção maior de cordicepina e que isso se reproduziu em estudos como o de Masuda *et al.* (2007), existe a possibilidade de o sulfato ferroso aumentar ainda mais a produção de cordicepina se em cultivo líquido de superfície.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CEPAS DE *Cordyceps militaris* E MÉTODO PARA MANUTENÇÃO

A Cepa CMIB-202 encontra-se depositada na Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico da UTFPR/Ponta Grossa (CMIB-UTFPR).

As Cepas C1 (92B3CZ3316#3 x 92B6CZ1316#5), C2 (CDRTPLOXCH3#ZLCTCST117), C3 (DR3XDX2AB5WLCCCP1118) e C4 (CUB292BBC21316#55WL6COMB8D1118), utilizadas para comparar a produção de biomassa no meio otimizado foram adquiridas de *Terrestrial Fungi* (Warren, MI, Estados Unidos da América).

A manutenção do fungo foi realizada a 25°C em ágar dextrose de batata (PDA) e em meio de cultivo descrito na tabela (Tabela 4). O cultivo em PDA também foi utilizado como inóculo para o meio líquido com base de melaço, como será descrito no item 4.2. O *C. militaris* foi cultivado em Erlenmeyer, mantido durante 15 dias em estufa incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (Tecnal/TE-391, Piracicaba, SP, Brasil), sob a temperatura de 25 °C, sem agitação e aeração (cultivo estático).

Tabela 3. Composição do meio de manutenção.

REAGENTE	FÓRMULA	CONCENTRAÇÃO (g/L)
Glicose Anidra	C ₆ H ₁₂ O ₆	10
Nitrato de Sódio*	NaNO ₃	2
Fosfato de Potássio Bibásico	K ₂ HPO ₄	1
Fosfato de Sódio Monobásico	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,4
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Extrato de Levedura	-	2

Fonte: Adaptado de Milovanović *et al.* (2014)

*Substituiu o Nitrato de Amônio (NH₄NO₃) do meio original

Os materiais e os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave (Phoenix/AV75, Araraquara, SP, Brasil) durante 15 minutos a 121 °C e os procedimentos foram conduzidos em câmara de fluxo laminar.

3.2 OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE CULTIVO CONTENDO MELAÇO

Para a otimização, realizou-se um planejamento estatístico do tipo arranjo composto central (*central composite design*) com quatro fatores e três repetições no ponto central. As variáveis independentes foram °Brix, concentração de extrato de levedura, concentração de peptona e concentração de fosfato de potássio dibásico. O modelo utilizado foi o modelo quadrático com 15 termos, o que resultou em 27 experimentos (tabela 5). O melaço de cana foi doado pela empresa Raízen (Piracicaba, São Paulo, Brasil).

Tabela 4. Planejamento estatístico para otimização de meio contendo melaço.

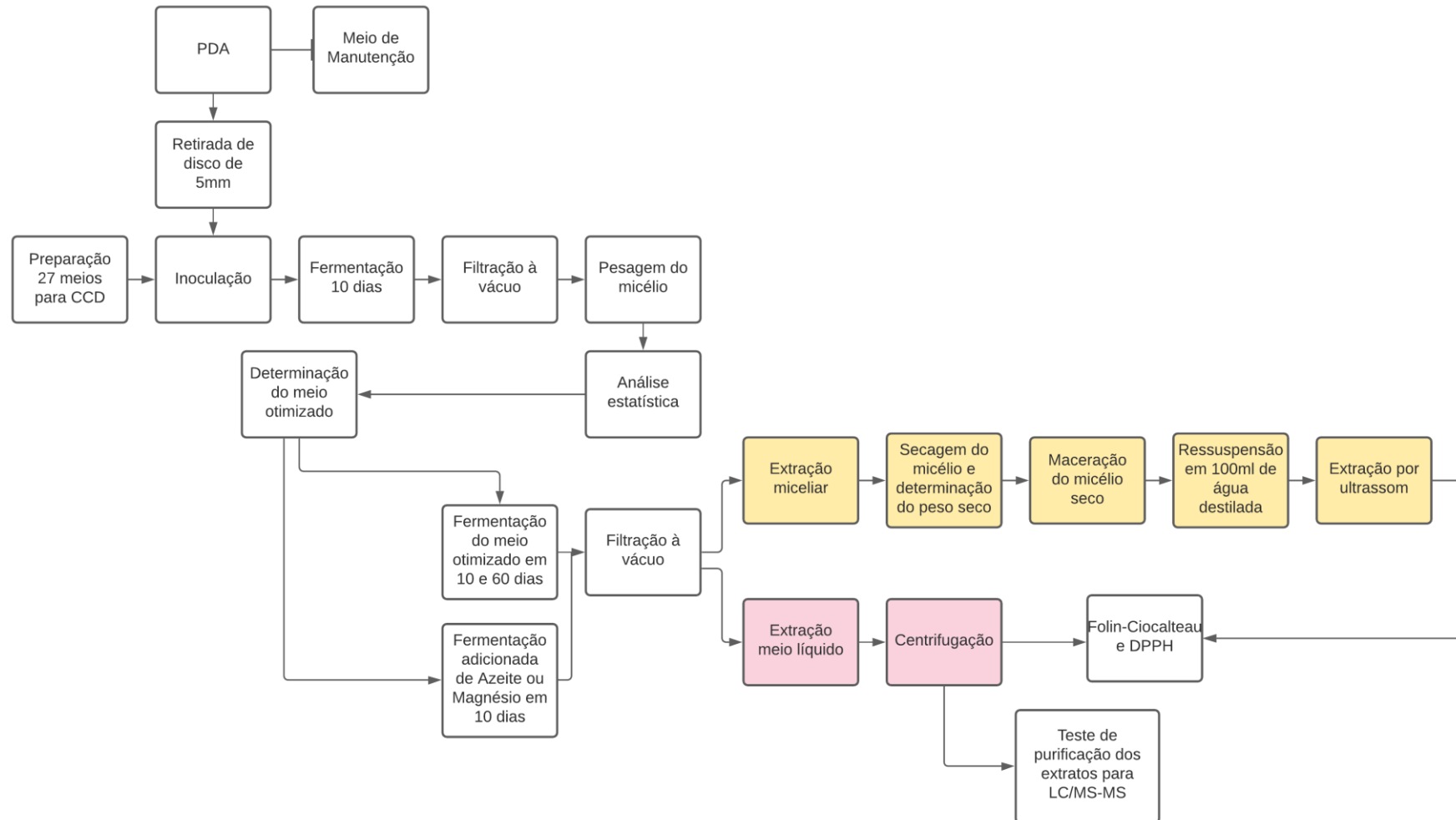
Experimento	° Brix	Extrato de		
		Levedura g/L	Peptona g/L	K ₂ HPO ₄ g/L
1	3,25	16,25	8	4
2	2,5	12,5	6	3
3	2,5	12,5	6	3
4	4	12,5	6	3
5	2,5	20	6	3
6	1,75	16,25	4	4
7	1	12,5	6	3
8	1,75	8,75	4	2
9	2,5	12,5	6	1
10	3,25	8,75	8	4
11	2,5	12,5	10	3
12	1,75	16,25	8	2
13	2,5	12,5	6	5
14	2,5	5,0	6	3
15	1,75	8,75	4	4
16	2,5	12,5	2	3
17	3,25	16,25	4	2
18	1,75	16,25	4	2
19	2,5	12,5	6	3
20	3,25	16,25	4	4
21	1,75	8,75	8	2
22	3,25	8,75	8	2
23	1,75	8,75	8	4
24	3,25	8,75	4	2
25	3,25	16,25	8	2
26	3,25	8,75	4	4
27	1,75	16,25	8	4

Fonte: autoria própria.

Esses experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio, para preparação do meio o melaço foi inicialmente pesado considerando uma proporção aproximada de 10g/L de sacarose para cada 1°B de melaço, diluído em água e então acertado o grau Brix em refratômetro (marca refratômetro), o extrato de levedura, fosfato de potássio e peptona foram pesados e adicionados ao Erlen. O pH foi ajustado para 7 com ácido fosfórico, esterilizado em autoclave por 30 minutos a 121°C. O meio foi inoculado com um disco de 5 mm de diâmetro retirado de uma placa de ágar batata dextrose (PDA) contendo o fungo com uma semana de crescimento. As amostras permaneceram então em incubadora de bancada com agitação orbital (Tecnal, TE- 420) durante 10 dias, sem iluminação, a 110 rpm e 25°C (condições adaptadas de Mao *et al.* (2005)).

Após os resultados desta primeira otimização (apresentados em peso seco na Tabela 8 no presente estudo), decidiu-se pela comparação com o método sem agitação (cultivo de superfície). O estudo foi repetido, porém sem agitação, sendo mantido em estufa incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a 25°C, por 10 dias. Para melhor visualização das metodologias utilizadas, o Fluxograma 1 sintetiza os processos realizados neste estudo.

Fluxograma 1. Processos integrantes da metodologia do presente estudo.



Fonte: autoria própria.

3.2.1 Peso seco

Finalizado o experimento, forma-se o micélio. Para quantificação da biomassa foi realizada filtração a vácuo com filtro Qualy, de gramatura 80g/m² e espessura de 205 µm; e este filtro foi então encaminhado à estufa (SolidSteel, SSD-110L, Piracicaba, São Paulo, Brasil) de 40°C para secagem durante 24 h, em seguida o filtro foi mantido por 15 minutos em dessecador com sílica e pesado em balança analítica (Edutec, JC-22OAB), sendo a biomassa obtida pela diferença de peso entre o filtro com e sem biomassa.

Fotografia 1. Micélio úmido do *Cordyceps militaris* cultivado em condições estáticas após filtração a vácuo.



Fonte: autoria própria.

3.3 TESTE DE INDUÇÃO DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Para avaliar a indução da produção de compostos bioativos, foi realizado o enriquecimento do meio otimizado com adição de azeite de oliva (0,5 mL/L) e sulfato de magnésio (0,5 g/L) com a cepa CMIB-202 (fermentação de 10 e 60 dias em meio de manutenção e meio máximo).

A quantidade de azeite de oliva foi adaptada de Moonjai *et al.* (2002) e Hsieh *et al.* (2006), que utilizaram, respectivamente, 0,60 mg/L de ácido linoleico (para restaurar a membrana de leveduras, promovendo assim uma estrutura mais robusta) e 1% de azeite de oliva (aumentando a produção de biomassa de *Grifola frondosa*).

O azeite foi adicionado na câmara de fluxo laminar após esterilização por filtração (Sartorius, Minisart® Syringe Filter), pois trata-se de uma substância termosensível.

A escolha da concentração de sulfato de magnésio fundamentou-se no meio de cultivo de Milovanović *et al.* (2014).

3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Para obtenção dos extratos seguiram-se duas metodologias. A partir de cultivos de 10 e 60 dias do meio otimizado e do meio de manutenção (para comparação) foi realizada uma filtração à vácuo em filtro de gramatura 80 g/m², separando assim o micélio do meio líquido. Logo após, uma separação por centrifugação (Heraeus, Megafuge 8, Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América) foi realizada a 17.105,6 g por 5 minutos. O meio líquido filtrado será designado de extrato 1.

O extrato miceliar (extrato 2) foi obtido a partir da secagem do micélio à 40°C por 24h (SolidSteel, SSD-110L, Piracicaba, São Paulo, Brasil), seguido de trituração em graal com uso de pistilo e ressuspensão em 100 mL de água destilada. O extrato 2 foi submetido ao banho de ultrassom (Schuster, L200, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil) por 30 minutos em 45kHz e 100W. A metodologia de ambas as extrações foi adaptada de Masuda *et al.* (2007). Os dois extratos foram congelados à -5°C até a realização das análises.

3.5 TESTE DE FOLIN-CIOCALTEAU

As amostras dos extratos miceliar e do meio líquido em 10 e 60 dias de cultivo foram analisadas em relação ao conteúdo de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu. A mistura reacional foi preparada em tubo de vidro com capacidade de

15mL, contendo 150 μ L de extrato, acrescidos de 2400 μ L de água destilada e 150 μ L da solução de Folin-Ciocalteu 0,25N, espera-se 3 minutos e é adicionado 300 μ L de solução de carbonato de sódio 10% (volume total: 3000 μ L). As soluções foram agitadas em agitador tipo vortex (Global trade technology, XH-CV) e então mantidas em 25°C no escuro por 1 hora. Após este período o meio reacional foi transferido para cubeta e realizada leitura em espectrômetro UV/VIS (Engineering S.R.L, WV-MS VISIBLE Spectrometer) em 725 nm.

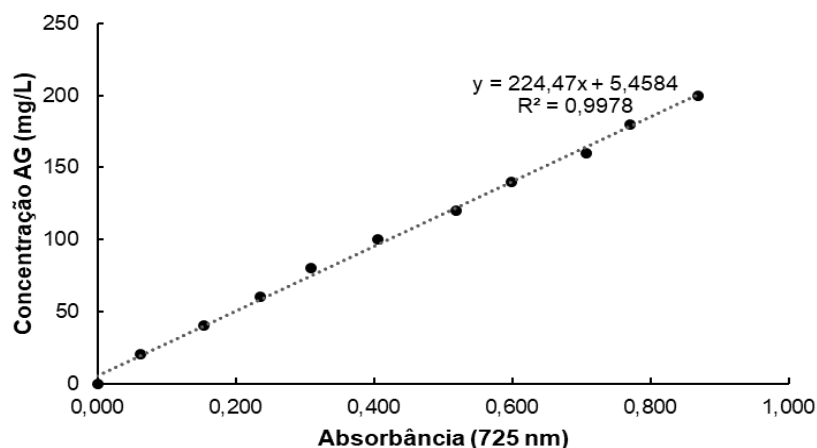
Para a construção da curva analítica prepara-se uma solução de ácido gálico 200mg/L e a partir desta solução-mãe foram preparadas diluições presentes na Tabela 6. Os resultados são expressos em equivalentes de ácido gálico (mgGAE)

Tabela 5. Dados para construção da curva analítica para o método de Folin-Ciocalteu

ÁCIDO GÁLICO			
Concentração (mg/L)	Abs1	Abs2	Abs
0	0	0	0
20	0,063	0,061	0,062
40	0,154	0,154	0,154
60	0,233	0,239	0,236
80	0,309	0,309	0,309
100	0,402	0,409	0,406
120	0,522	0,517	0,520
140	0,604	0,595	0,600
160	0,716	0,700	0,708
180	0,778	0,762	0,770
200	0,845	0,894	0,870

Fonte: autoria própria.

Gráfico 1. Curva analítica do método Folin-Ciocalteu para determinação da concentração do equivalente de Ácido Gálico em mg/L.



Fonte: autoria própria

3.6 TESTE DE DPPH

Para a análise de DPPH cada extrato é diluído em 5 concentrações não ultrapassando um total de 0,1ml de amostra (extrato e metanol), mostrados na Tabela 7. O branco contém 3,9 mL de solução de DPPH e 0,1 mL de metanol puro. Todas as amostras continham a mesma quantidade de DPPH (3,9 mL), a diferenciação entre elas se dá pela quantidade de metanol e extrato, sendo as mais concentradas com mais amostra e as mais diluídas com mais metanol, variando de 20 em 20 μ L. As soluções foram agitadas em tubo vortex e acondicionadas no escuro por 30 minutos. A leitura foi feita em espectrômetro UV/VIS (Engineering S.R.L, WV-MS) em 515 nm (Reis *et al.*, 2013).

Tabela 6. Preparo das diluições de amostras para curva de DPPH

	Amostra (μ L)	Metanol (μ L)
Branco	0	100
1	20	80
2	40	60
3	60	40
4	80	20
5	100	0

Fonte: autoria própria.

3.7 TESTE DE PURIFICAÇÃO DO EXTRATO PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Todos os reagentes utilizados nesta sessão são de grau HPLC a não ser que seja afirmado o contrário. Os extratos (sessão 3.4) foram descongelados, aliqüotados em 1 mL e particionados com 2mL de acetato de etila por 5, 10 e 15 vezes, primeiramente sem adição de ácido e posteriormente com adição de ácido fórmico grau HPLC (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania). Para efeito de comparação, foi também performado um teste com uma purificação parcial da cordicepina como descrito em Sari *et al.* (2016).

“O meio fermentado (161 mL) foi fervido por 30 min e depois centrifugado a 8.000g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi misturado com 1L de etanol gelado e deixado em repouso a 4°C durante a noite. O precipitado resultante foi removido por centrifugação a 8.000g durante 30 min. Em seguida, o sobrenadante foi misturado com 10% (p/v) de pó de carvão ativado e mantido a 60°C. Após 6 h a amostra foi filtrada, o sobrenadante foi seco em um evaporador rotativo. A cordicepina bruta foi obtida e então adicionada com 350 mL de água e 350 mL de n-hexano. O cristal de cordicepina foi formado e obtido como um precipitado”. Sari *et al.* (2016)

Todas as extrações foram rota-evaporadas à 60°C (Fisatom, 801, São Paulo, São Paulo, Brasil), ressuspendidas com o mesmo solvente (acetato de etila ou hexano) para retirada do balão e secas em estufa (SolidSteel, SSD-110L, Piracicaba, São Paulo, Brasil) à 40°C. A massa restante foi pesada e ressuspendida em metanol (Riedel-de Haën, Seelze, Alemanha) até a concentração padrão de 500 µg/mL. Foi preparada uma solução de diluição de metanol e água 1:1 com adição de 0,1% de ácido fórmico. Foram pipetados em um eppendorf 200µL da solução 500µg/ml e adicionados 1,8mL de solução de diluição, restando uma solução de concentração 50µL/mL. Essa solução foi então filtrada em filtro Politetrafluoretileno (PTFE) de 0,22µm e 13mm (Filtrilo, Colombo, PR, Brasil). A infusão desta solução foi realizada em LC/MS-MS (Xevo Tdq Triplo quadrupolo, Waters, Milford, MA, Estados Unidos da América).

A metodologia para análise de espectrometria de massas foi adaptada de Chua *et al.* (2018), os parâmetros usados foram: ionização positiva, voltagem capilar 3,5kV, voltagem do cone 35V, temperatura de desolvatação 350°C, desolvatação 550L/h, cone 50L/h, energia de colisão 20, o volume de injeção foi de 10µL e a vazão 0,3µL/min. O íon precursor para a cordicepina foi m/z 252.

Após teste em cromatógrafo com padrão de cordicepina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos da América), pode-se perceber que nestas condições de amostra este equipamento teve dois sinais para a cordicepina: m/z 252 e m/z 251, confirmou-se tratar do mesmo composto por terem exatamente o mesmo tempo de retenção.

4 RESULTADOS

4.1 OTIMIZAÇÃO DE MEIO CULTIVO CONTENDO MELAÇO

A otimização foi realizada em cultivo submerso com agitação e estático. Apresentaram produção de biomassa diferentes, com vantagem para os cultivos estáticos (Tabela 8), com uma média de produção de biomassa pouco mais de oito vezes maior do que com agitação.

Portanto decidiu-se seguir com os experimentos utilizando os cultivos estáticos, já que mesmo sem medir os compostos bioativos, uma produção tão mais baixa de células certamente resultaria em uma produção bem baixa dos compostos-alvo.

A partir das respostas obtidas com o planejamento experimental em condição estática apresentados na Tabela 8, a equação 1 foi obtida onde y é a resposta variável (quantidade de biomassa), Brix é a quantidade de melaço em graus Brix, EL significa extrato de levedura e K_2HPO_4 é o Fosfato de Potássio bibásico utilizado no meio de cultivo.

Equação 1. Equação resposta do meio otimizado

$$y = b_0 + b_1 * \text{Brix,}^\circ * \text{EL, g/L} + b_2 * \text{Peptona, g/L} * K_2HPO_4, \text{ g/L} + b_3 * \text{EL, g/L} * \text{Peptona, g/L} + b_4 * \text{Brix,}^\circ * \text{Brix,}^\circ + b_5 * \text{Brix,}^\circ + b_6 * \text{EL, g/L} + b_7 * \text{EL, g/L} * \text{EL, g/L} + b_8 * \text{EL, g/L} * K_2HPO_4, \text{ g/L} + b_9 * \text{Peptona, g/L} * \text{Peptona, g/L} + b_{10} * \text{Peptona, g/L} + b_{11} * \text{Brix,}^\circ * K_2HPO_4, \text{ g/L} + b_{12} * K_2HPO_4, \text{ g/L} * K_2HPO_4, \text{ g/L} + b_{13} * K_2HPO_4, \text{ g/L} + b_{14} * \text{Brix,}^\circ * \text{Peptona, g/L}$$

Fonte: autoria própria.

EL= extrato de levedura

Considerando o valor de P com precisão de 95%, pode-se observar que os termos associados a b_3 (extrato de levedura), b_4 ($^\circ\text{Brix}^2$), b_6 (extrato de levedura²) e b_8 (peptona²) são significativos, ou seja variáveis que ao serem alteradas trazem mudanças significativas na produção de biomassa (tabela 9).

Tabela 7. Peso seco do micélio filtrado após fermentação de 10 dias pelos métodos de cultivo submerso e líquido de superfície

(continua)

Experimento	° Brix	Extrato de Levedura g/L	Peptona g/L	K ₂ HPO ₄ g/L	Peso seco do micélio cultivado com agitação (g)	Peso seco do micélio cultivado sem agitação (g)	Diferença bruta (g)	Diferença percentual (%)
1	3,25	16,25	8	4	0,23	1,85	1,62	87,57
2	2,5	12,5	6	3	0,11	1,19	1,08	90,76
3	2,5	12,5	6	3	0,19	0,98	0,79	80,61
4	4	12,5	6	3	0,18	0,58	0,40	68,97
5	2,5	20	6	3	0,19	1,52	1,33	87,50
6	1,75	16,25	4	4	0,05	1,20	1,15	98,89
7	1	12,5	6	3	0,36	0,68	0,32	47,06
8	1,75	8,75	4	2	0,03	0,87	0,84	96,55
9	2,5	12,5	6	1	0,06	1,12	1,06	94,64
10	3,25	8,75	8	4	0,11	1,39	1,28	92,09
11	2,5	12,5	10	3	0,12	1,47	1,35	91,84
12	1,75	16,25	8	2	0,05	0,99	0,94	94,95
13	2,5	12,5	6	5	0,11	1,21	1,10	90,91
14	2,5	5,0	6	3	0,14	1,33	1,19	89,47
15	1,75	8,75	4	4	0,08	1,20	1,12	93,33
16	2,5	12,5	2	3	0,04	1,35	1,31	97,04
17	3,25	16,25	4	2	0,07	1,50	1,43	95,33
18	1,75	16,25	4	2	0,12	0,74	0,62	83,78

Tabela 7. Peso seco do micélio filtrado após fermentação de 10 dias pelos métodos de cultivo submerso e líquido de superfície

(conclusão)

Experimento	° Brix	Extrato de Levedura g/L	Peptona g/L	K ₂ HPO ₄ g/L	Peso seco do micélio cultivado com agitação (g)	Peso seco do micélio cultivado sem agitação (g)	Diferença bruta (g)	Diferença percentual (%)
19	2,5	12,5	6	3	0,04	1,37	1,33	97,08
20	3,25	16,25	4	4	0,08	1,37	1,29	94,16
21	1,75	8,75	8	2	0,25	1,02	0,77	75,49
22	3,25	8,75	8	2	0,15	1,15	1,00	86,96
23	1,75	8,75	8	4	0,36	1,03	0,67	65,05
24	3,25	8,75	4	2	0,07	1,13	1,06	93,81
25	3,25	16,25	8	2	0,16	1,31	1,15	87,79
26	3,25	8,75	4	4	0,17	1,20	1,03	85,83
27	1,75	16,25	8	4	0,14	1,22	1,08	88,52

Fonte: autoria propria.

A partir do teste de Durbin-Watson foi obtido um valor de 2,008; este é um teste que varia de 0 a 4, sendo valores abaixo de 2 indicando uma autocorrelação positiva e valores maiores que 2 uma autocorrelação negativa. No caso deste estudo, o valor de 2,008 significa que não há nenhum tipo de correlação entre os resíduos. O valor de R^2 encontrado neste estudo estatístico é de 0,828, significando que é possível adequar este modelo matemático com 82,8% de precisão. O índice de precisão é uma medida da magnitude dos erros aleatórios, o número obtido neste estudo (15,369) significa uma baixa magnitude. O valor de F (4,136) é maior que o valor do F crítico (0,00919), ou seja, existe significância de pelo menos uma das variáveis independentes na produção de biomassa.

Tabela 8. Desenho experimental e resultados do CCD

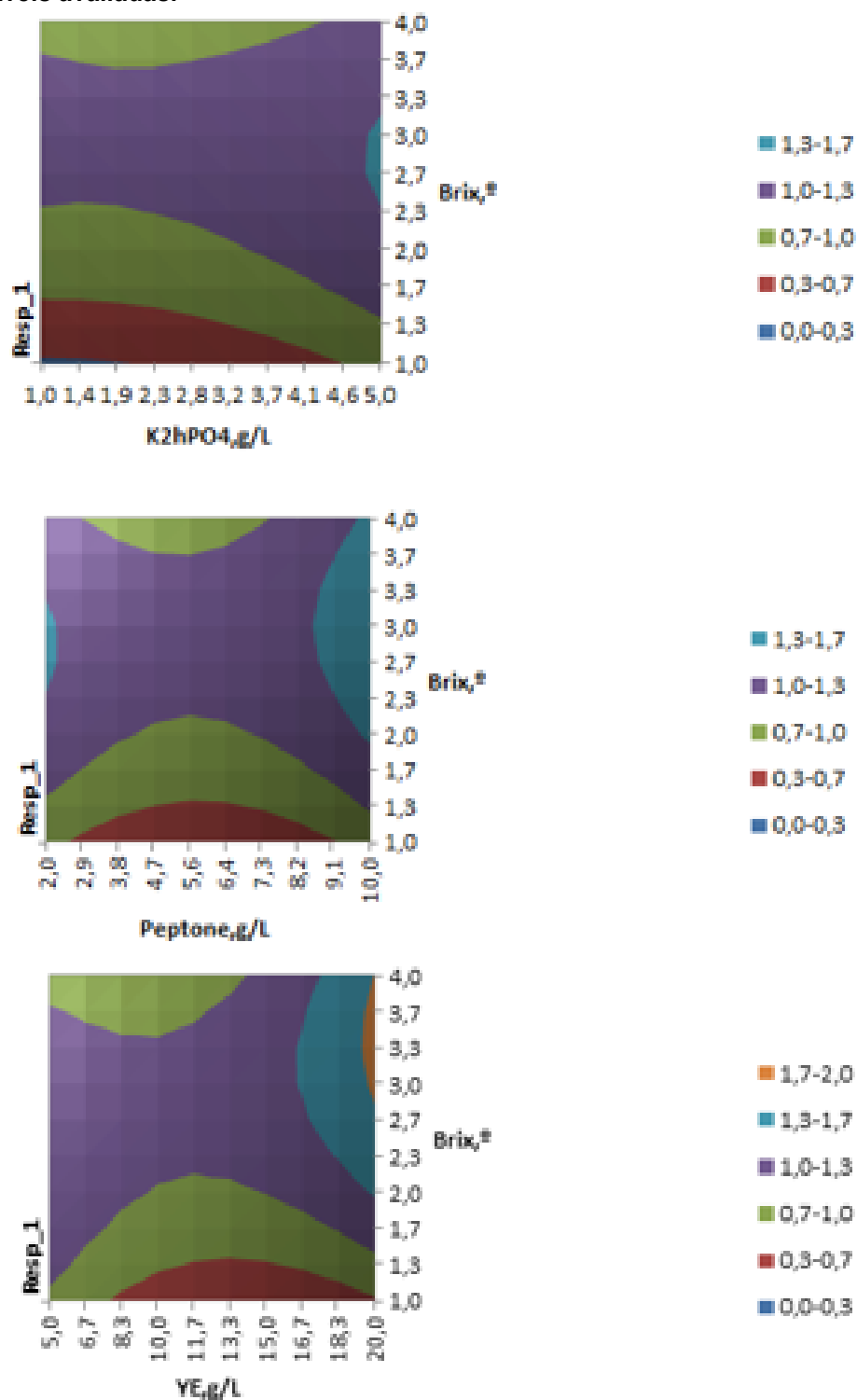
		P value	Std Error	-95%	95%	t Stat	VIF
b0	2,403	0,113	1,407	-0,664	5,469	1,707	
°Brix * EL	0,02511	0,116	0,01483	-0,00721	0,05742	1,693	34,33
Peptona * K₂HPO₄	0,00882	0,680	0,02086	-0,03663	0,05426	0,423	28,00
EL	-0,250	0,01523	0,08837	-0,442	-0,05738	-2,828	94,67
°Brix²	-0,189	0,01215	0,06422	-0,329	-0,04952	-2,950	51,25
°Brix	0,807	0,09271	0,442	-0,156	1,770	1,827	94,67
EL²	0,00660	0,02459	0,00257	0,00100	0,01220	2,569	51,25
EL * K₂HPO₄	0,00733	0,522	0,01112	-0,01690	0,03157	0,659	31,17
Peptona²	0,02233	0,02935	0,00903	0,00265	0,04201	2,473	41,75
Peptona * °Brix	-0,335	0,05851	0,160	0,683	0,01411	-2,091	88,33
°Brix * K₂HPO₄	-0,02477	0,664	0,05562	-0,146	0,09642	-0,445	31,17
(K₂HPO₄)²	0,02793	0,454	0,03613	-0,05078	0,107	0,773	41,75
K₂HPO₄	-0,170	0,605	0,320	-0,867	0,528	-0,530	88,33
EL * Peptona	0,00291	0,610	0,00556	-0,00921	0,01503	0,523	31,17
°Brix * Peptona	0,00983	0,730	0,02781	-0,05076	0,07043	0,354	31,17

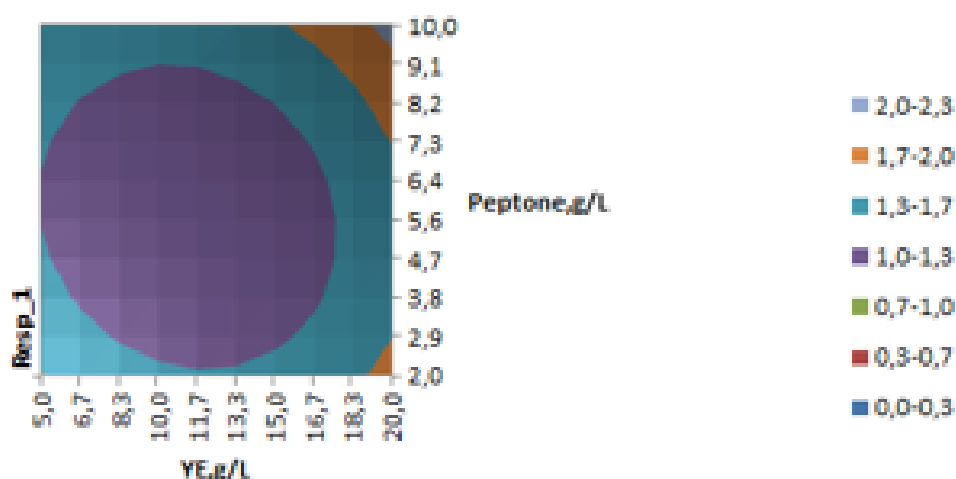
Fonte: autoria própria.

A partir deste estudo estatístico foi possível calcular a composição ótima de produção de biomassa (máximo da equação). Na condição de 3,38°B de melado, 5 g de K₂HPO₄, 10 g de Peptona e 20 g de Extrato de levedura estimou-se uma produção de 27,1 g/L de biomassa de *Cordyceps militaris*. A Figura 4 apresenta as superfícies de resposta combinando as variáveis independentes duas a duas. A condição máxima

de produção foi validada em cultivo realizado em triplicata e teve como resultado $24,08 \text{ g/L} \pm 0,67$. Esse valor está muito próximo do valor predito ($27,1 \text{ g/L}$) o que comprova a veracidade do estudo realizado.

Figura 3. Curvas de superfície de resposta da produção de biomassa de acordo com as variáveis avaliadas.





Fonte: autoria própria.

Em comparação com os experimentos de Mao *et al.* (2005), que obteve um meio otimizado com 40 g/L de glicose e 15g/L de peptona e razão C/N de 2,66, a produção de biomassa do presente estudo foi mais alta (24,08 g/L). O meio de Mao *et al.* (2005) foi escolhido como ótimo pela maior produção de cordicepina, porém o meio com maior produção de biomassa tinha em sua composição 50 g/L de glicose e 20 g/L de peptona, produzindo 23 g/L de peso seco em uma razão C/N 2,5. O meio com maior biomassa continha 285,2 mg/L de cordicepina e o meio otimizado 339,8 mg/L, uma diferença de aproximadamente 19%. Apesar de a cordicepina ter sua produção parcialmente associada ao crescimento celular, outros fatores podem interferir na sua produção, como por exemplo quantidade de nutrientes e oxigênio disponível (KANG *et al.*, 2014) e fonte de carbono (MAO *et al.*, 2005 e RAETHONG *et al.*, 2018). No estudo de Mao *et al.* (2005) chegou-se à conclusão de que a glicose era a melhor fonte de carbono para a produção de cordicepina seguido pela sacarose. Já para crescimento celular, a melhor fonte avaliada foi a lactose.

No estudo de Raethong *et al.* (2018) comparou-se a produção de biomassa utilizando sacarose, glicose e xilose, sendo a sacarose a que atingiu melhores resultados também em relação à velocidade específica de crescimento (μ_{max}). O crescimento observado em meio com glicose foi diminuído em relação ao de sacarose. O meio com xilose teve a maior produção de cordicepina bruta ao final do cultivo, porém em termos de produtividade (mg/L/dia) o cultivo com a sacarose apresentou o melhor resultado (sacarose: $5,97 \pm 0,70$; glicose: $5,46 \pm 0,41$; xilose $2,49 \pm 0,21$).

Estes resultados em comparativos com a literatura corroboram para a escolha do melaço como fonte de carbono no meio de cultivo, visto que sua composição majoritária é de sacarose e é um subproduto industrial. Outra vantagem de usar o melaço é a sua composição de minerais, vitaminas e proteínas, que podem promover o crescimento de biomassa e a formação de moléculas bioativas e/ou metabólitos secundários.

Os estudos científicos de *C. militaris* no estado atual da arte apresentam características de cultivo de linhagens específicas com meios muito distintos um dos outros, o que dificulta a comparação entre resultados. Neste sentido, ainda se necessita de um estudo colaborativo para uniformizar as variáveis e chegar a conclusões mais sistemáticas.

Neste contexto, a produção de biomassa de outras cepas de *C. militaris* foi avaliada no meio otimizado para a cepa CMIB-202. Os resultados de biomassa estão apresentados na Tabela 10 e mostram outras cepas potenciais para o cultivo em melaço: C1 e C2, com produção de biomassa 15 e 30% maiores do que o obtido com a cepa CMIB-202.

Tabela 9. Produção de biomassa em meio otimizado em diferentes cepas de *C. militaris*

Cepa	Biomassa em g/L
CMIB-202	24,08
C1	27,64
C2	33,52
C3	21,92
C4	19,3

Fonte: autoria própria.

4.2 RESULTADOS DO TESTE DE FOLIN-CIOCALTEAU

Os testes de Folin-Ciocalteu, apresentados na Tabela 11, mostram uma grande discrepância entre o conteúdo de compostos fenólicos presentes no meio líquido e no micélio do fungo, o que mostra uma maior concentração de compostos extracelulares do que intracelulares. Essa é uma observação interessante, já que a atenção dos pesquisadores tem sido em sua totalidade voltado para a biomassa.

Tabela 10. Resultados de Folin-Ciocalteu nos extratos advindos do meio líquido e do micélio dos cultivos de 10 e 60 dias do meio otimizado e meio de manutenção em cultivo estático

Tempo	Meio	Extrato 1 - meio líquido (mgGAE.L ⁻¹ /g.L ⁻¹)	Extrato 2 – Micélio (mgGAE/L)
10 dias	Meio otimizado CMIB-202	431,8692	11,6935
	Adição de Magnésio (0,5 g/L) CMIB-202	520,0859	9,5118
	Adição de Azeite (0,5 ml/L) – CMIB-202	533,5541	10,2625
	Meio de Manutenção – CMIB-202	546,25	*
60 dias	Meio de Manutenção – CMIB -202	563,4375	*
	Meio otimizado – CMIB-202	647,8125	*

Fonte: autoria própria.

*não testado

O estudo de Reis *et al.* (2013) feito com o corpo frutificado do *C. militaris* e extraído com metanol e água obteve 15mg GAE/g. No estudo de Wang *et al.* (2015) o máximo valor encontrado no corpo frutificado extraído com água destilada fervente foi de 17,07mg GAE/g. Considerando apenas a fração miceliar do presente estudo, os resultados obtidos foram mais baixos, porém como pode-se observar na Tabela 10, o conteúdo da fração líquida é eminentemente superior.

Dados de análise de Folin-Ciocalteu para a fração líquida não foram encontrados na literatura, e esta fração é pouco explorada, porém, como demonstrado nos dados (Tabela 11) existe um grande potencial de exploração desta fração pelo seu conteúdo fenólico.

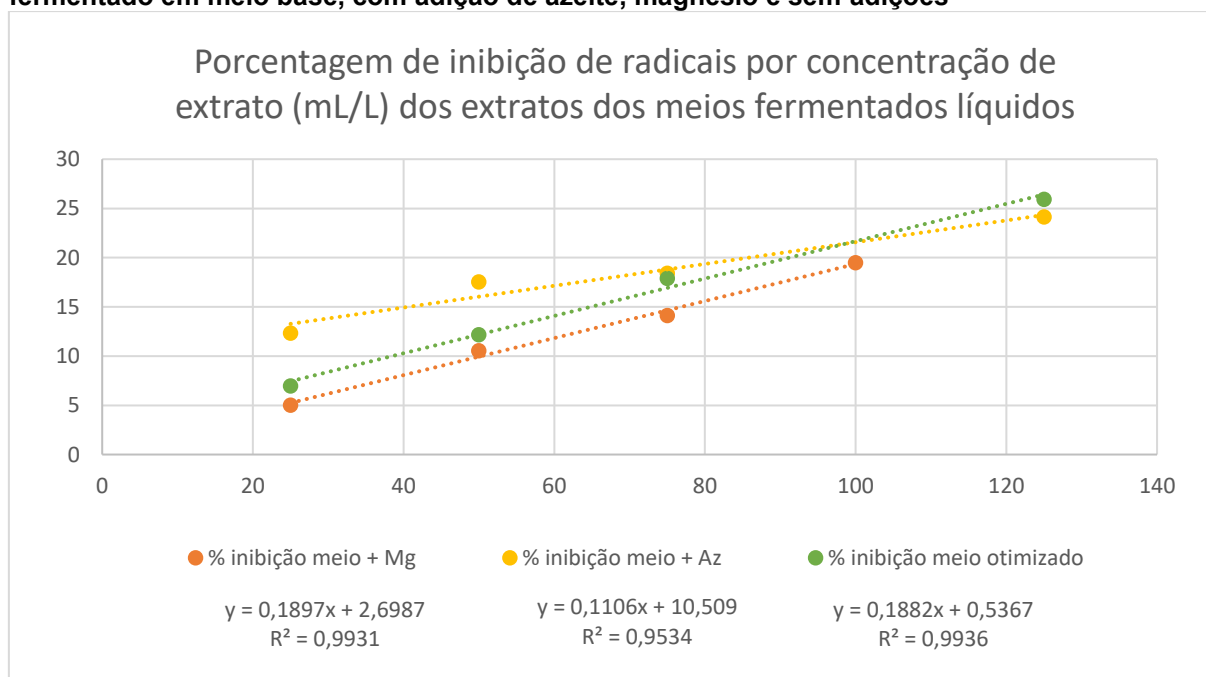
O meio de manutenção apresentou maior quantidade de compostos fenólicos do que os meios otimizados após 10 dias de cultivo, mesmo com adição de azeite e magnésio no meio máximo. Isso pode ser explicado pela composição do meio de manutenção que tem um conteúdo mineral maior que pode ter contribuído na produção de compostos fenólicos nos primeiros dias. Porém, como é possível observar na Tabela 11, o aumento do conteúdo fenólico ao longo de mais 50 dias de fermentação no meio de manutenção não foi significativo, enquanto no meio otimizado foi observado um aumento de 50% no mesmo período e ultrapassado o conteúdo observado no meio de manutenção.

4.3 RESULTADOS DO TESTE DE DPPH

Para determinação de atividade antioxidante (Gráfico 1), as amostras advindas do extrato 1 (meio líquido fermentado) tiveram os seguintes resultados para EC50: 9,98 ml/L para o extrato originado do meio otimizado, 10,52 ml/L para o extrato obtido da fermentação contendo de sulfato de magnésio e 14,26 ml/L para o extrato originado da fermentação adicionada de Azeite. Nesta análise, quanto menor o EC50, mais antioxidante é o extrato, significando então que o extrato advindo do meio base é o que apresenta o melhor resultado. O extrato 2 (micélio) não mostrou atividade antioxidante suficiente para detecção por este método.

O estudo de Won; Park (2005) obteve um resultado de DPPH para micélio extraído com etanol 70% de 0,026 g/mL (EC50). Nas análises de Reis *et al.* (2013) foi obtido um EC50 de 12,17 mg/mL no extrato metanólico do cogumelo, valor mais próximo do obtido neste estudo. Dados de estudo de atividade antioxidante do meio líquido não foram encontrados na literatura.

Gráfico 2. Curvas de porcentagem de inibição de radicais livres pelos extratos em meio líquido fermentado em meio base, com adição de azeite, magnésio e sem adições



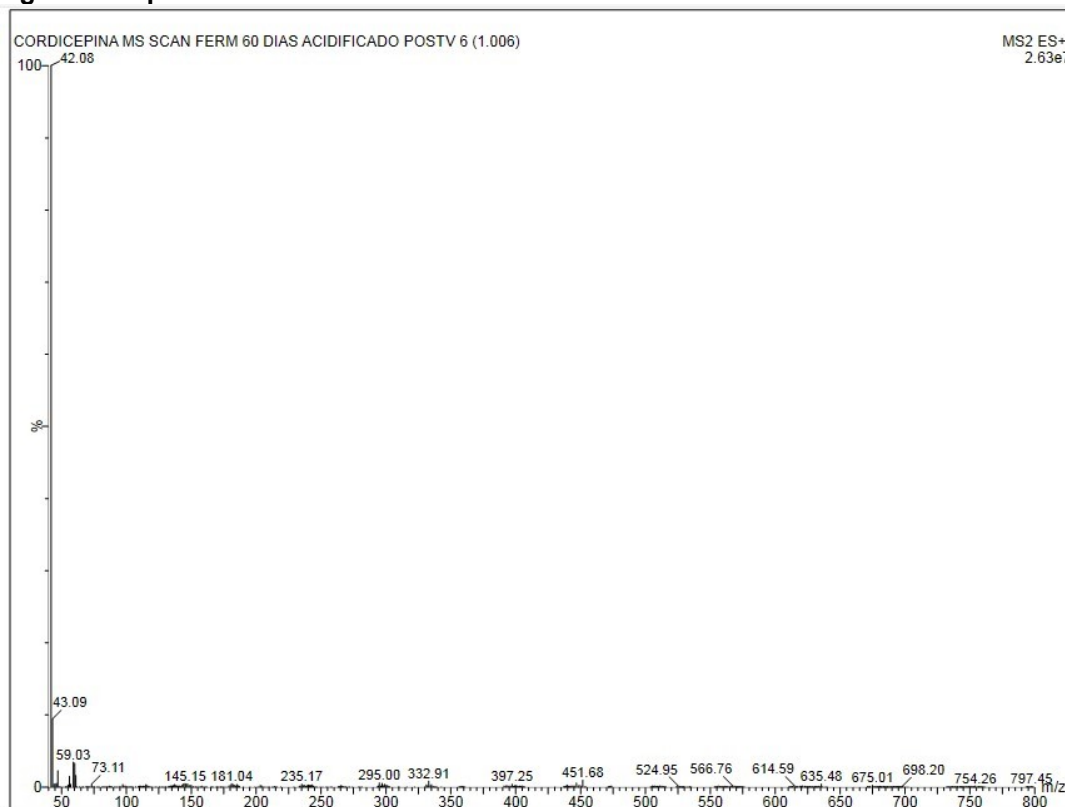
Fonte: autoria própria.

4.4 TESTE DE MELHORAMENTO DE EXTRAÇÃO PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os testes para verificar a melhor extração visando a quantificação de cordicepina, foram conduzidos utilizando a extração de Sari *et al.* (2016) (ver seção 3.7), intitulada neste trabalho de “extração n-hexano”. Foi também realizado um teste com extração com metanol e o outro com extrações sequenciais com acetato de etila (5, 10 e 15 partições). Os espectros de massa mostrados abaixo mostram as massas encontradas nos extratos após as extrações específicas.

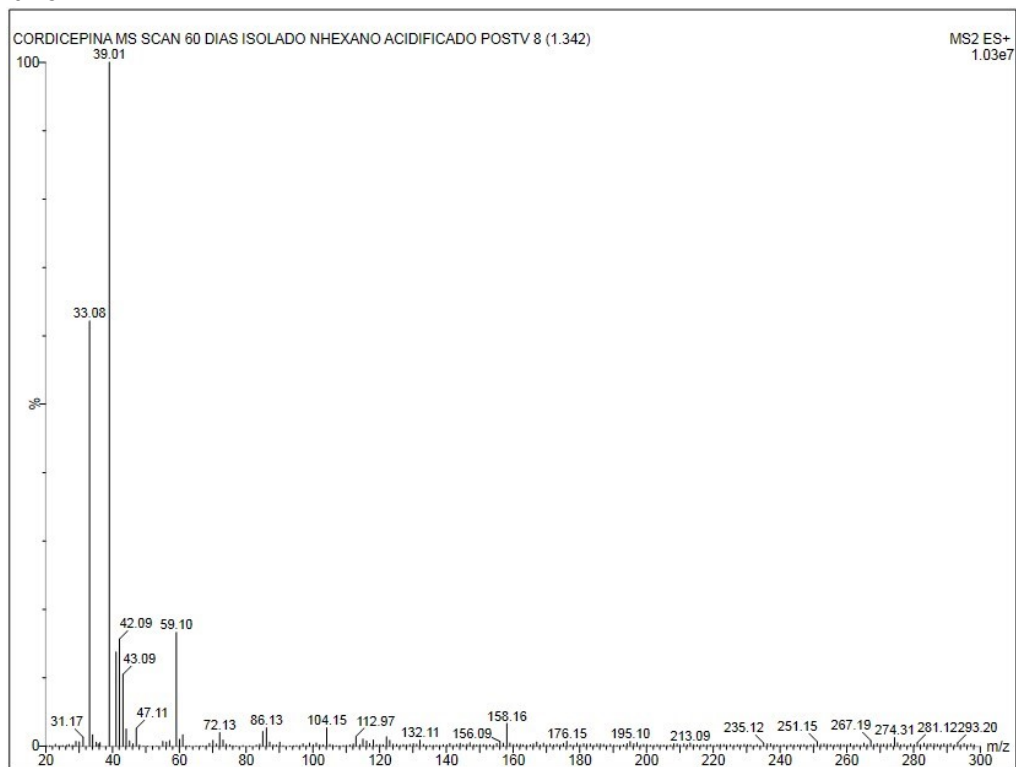
As Figuras 5 e 6 contêm os métodos de extração com metanol e n-hexano, nestas figuras, observa-se que muitos compostos além do composto desejado foram extraídos, dificultando sua visualização e, se levado desta forma para a coluna, poderia causar entupimento. É possível também observar que entre o metanol e o n-hexano o segundo apresenta uma leve melhora, mas ainda com muitos compostos contaminantes.

Figura 4. Espectro de massas do extrato bruto diluído com metanol 1:10



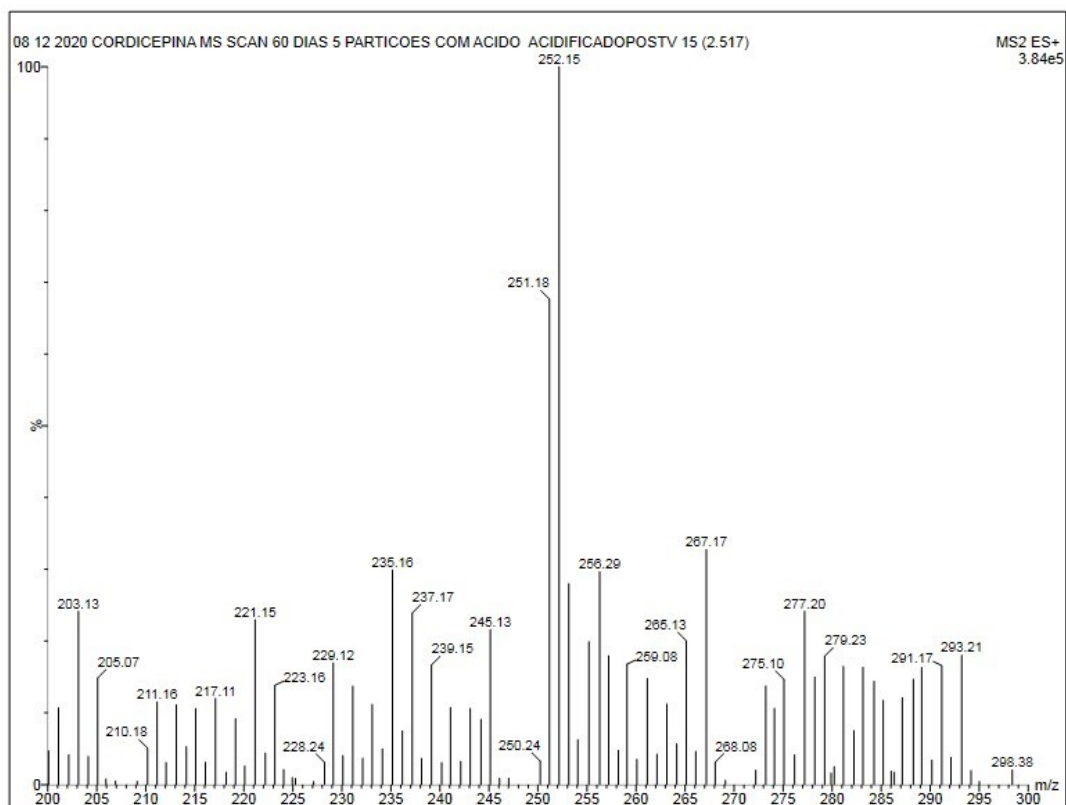
Fonte: autoria própria

Figura 5. Espectro de massas da extração pelo método de Sari *et al.* (2016) com n-hexano



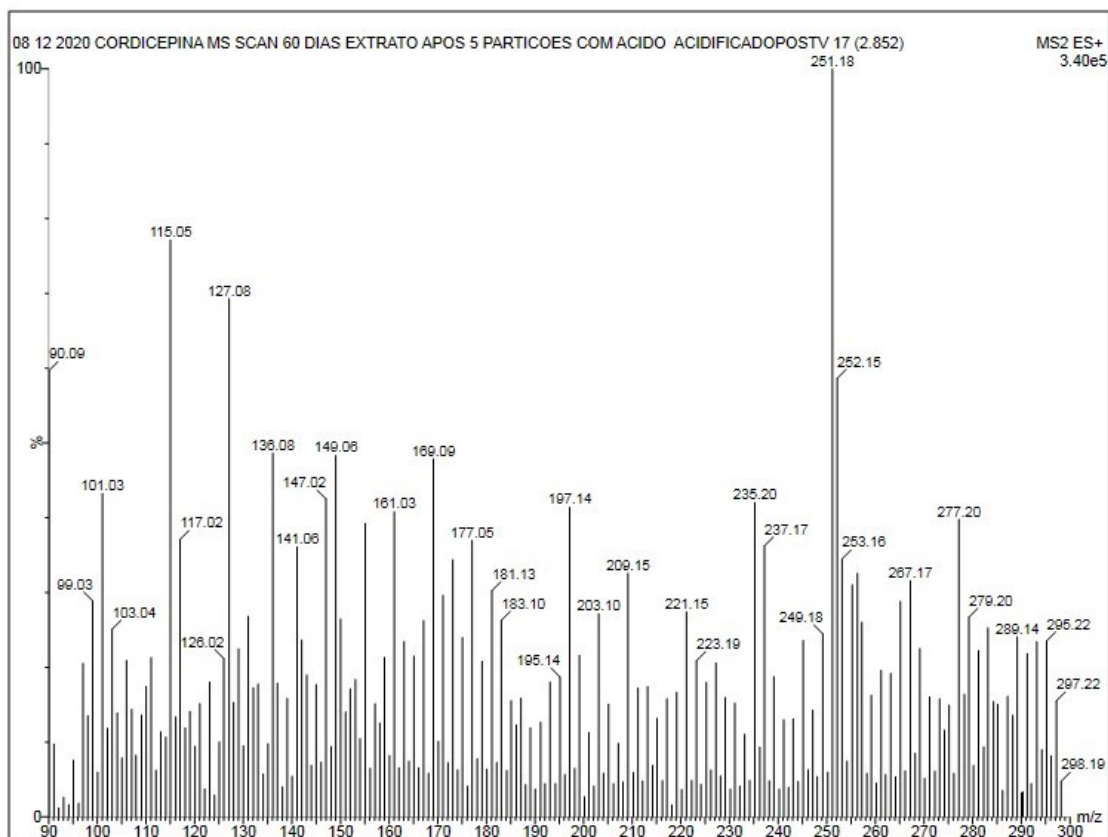
Fonte: autoria própria.

Figura 6. Espectro de massas da extração com 5 partições de acetato de etila



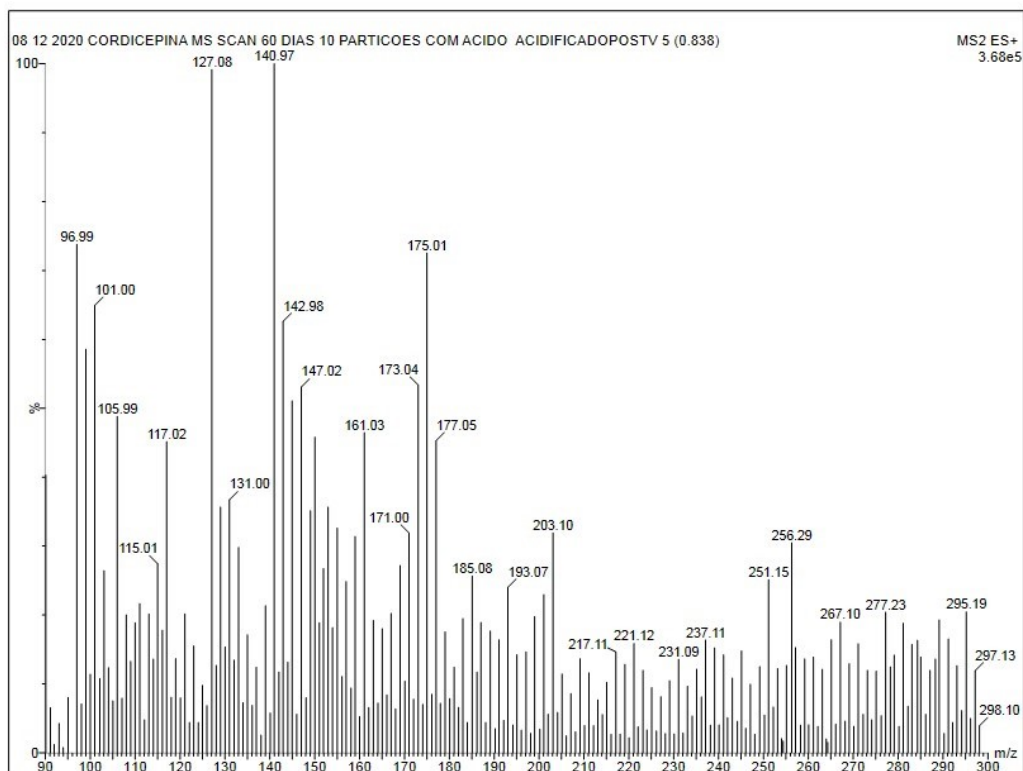
Fonte: autoria própria.

Figura 7. Espectro de massas do líquido restante após a retirada das 5 partições.

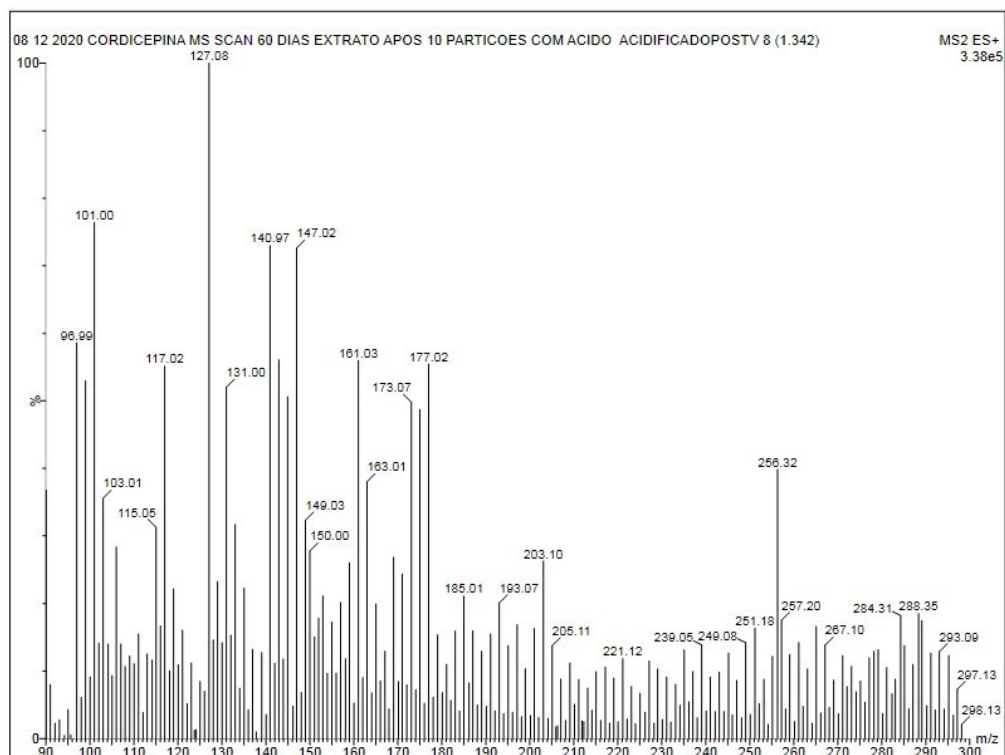


Fonte: autoria própria.

Nos testes com 5 partições (Figura 7), é possível observar menor presença de contaminantes do pico de cordicepina (m/z 252 e m/z 251), porém ainda existe um restante considerável de cordicepina no líquido residual após as 5 partições (Figura 8). Por isso foram conduzidas extrações com maior número de passos (10 partições, apresentados nas figuras 9 e 10, e 15 partições, figuras 11 e 12). Na espectrometria de massas não é possível saber a concentração de cordicepina, porém é possível fazer uma avaliação parcial pela intensidade dos íons (TIC), disponível na parte superior direita das imagens.

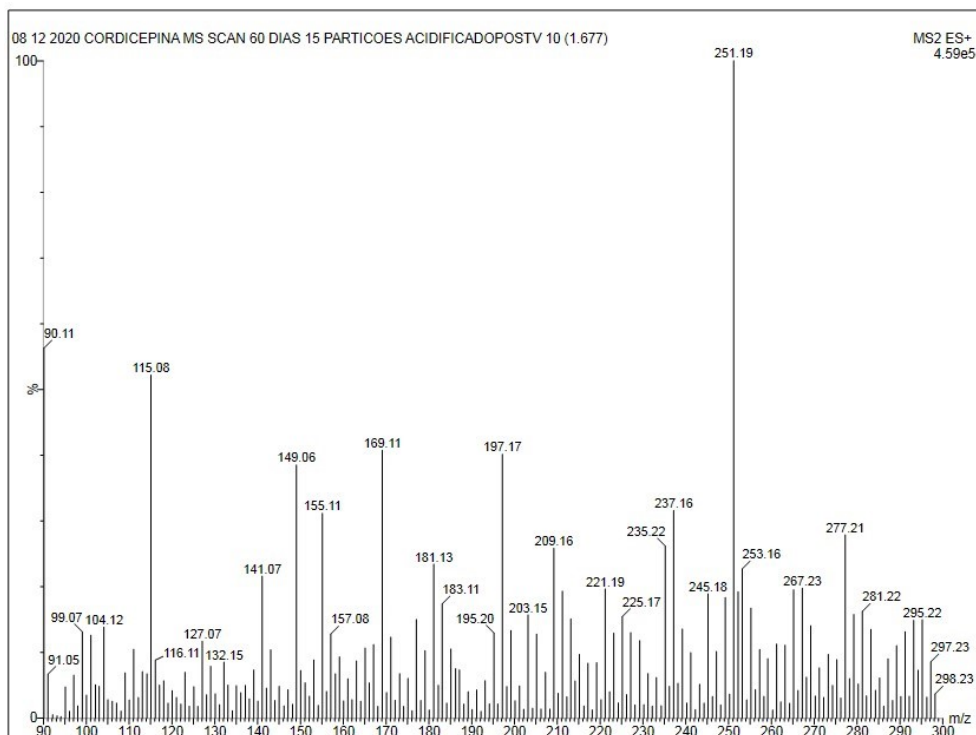
Figura 8. Espectro de massas do extrato após 10 partições.

Fonte: autoria própria.

Figura 9. Espectro de massas do líquido restante após a retirada das 10 partições.

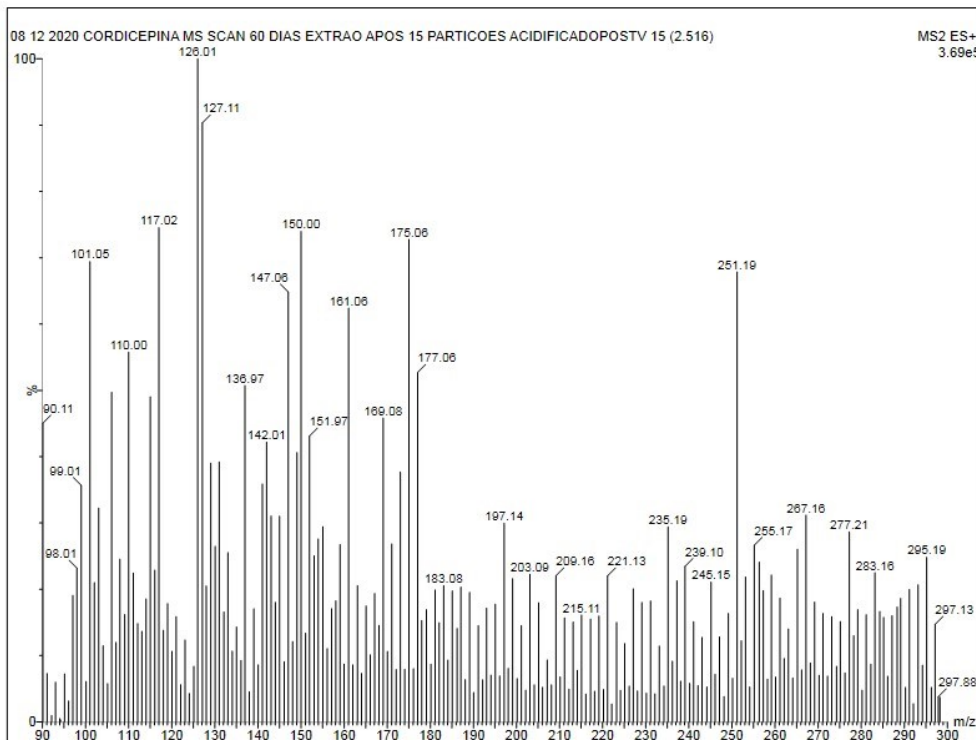
Fonte: autoria própria.

Figura 10. Espectro de massas do extrato após 15 partições.



Fonte: autoria própria.

Figura 11. Espectro de massas do líquido restante após a retirada das 15 partições.



Fonte: autoria própria.

Entre as extrações de partição 10 e 15 é possível notar que a extração de 15 partições foi mais seletiva em relação à cordicepina e comparativamente a extração de 5 e 10 partições, foi capaz de melhorar a quantidade extraída, restando menos no líquido residual.

Na sequência, o objetivo deste estudo era quantificar a cordicepina presente nos extratos e em diferentes tempos, porém esta pesquisa foi afetada pela pandemia do Coronavírus e a impossibilidade de dar sequência aos experimentos por conta de decretos estaduais e municipais.

Não obstante, este primeiro passo de purificação foi de suma importância pela dificuldade de lidar com um extrato natural em um meio complexo que necessita quantificação por um equipamento de alta sensibilidade. O melão é extremamente favorável para o crescimento do fungo pela quantidade de nutrientes que lhe fornece, mas pelo mesmo motivo dificulta sua leitura em equipamentos de alta precisão, por isso este passo de purificação de extrato se faz necessário neste tipo de amostra. Para o melão, a recomendação é de 15 partições, pois se mostrou mais eficiente em deixar o extrato sem muitas sujidades e mantendo um alto TIC de cordicepina.

5 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou pela primeira vez que o melaço de cana de açúcar é um componente viável como meio de cultura para a produção de biomassa de *C. militaris*. O sistema de cultivo em superfície se mostrou mais promissor para a produção de biomassa do que o cultivo sob agitação para a cepa avaliada.

Os compostos bioativos estiveram presentes em maior quantidade de forma extracelular, em comparação com o extrato obtido a partir do micélio. O tempo de cultivo foi um fator significativo para o aumento de compostos bioativos, tendo o cultivo de 60 dias apresentado 50% mais compostos fenólicos que o de 10 dias. A possibilidade de explorar o meio fermentado como importante fonte de compostos antioxidantes e fenólicos é uma das importantes contribuições deste trabalho para a literatura científica.

A comparação de métodos para purificação de cordicepina do extrato originado do meio fermentado visando sua quantificação por LC/MS-MS mostram que a metodologia que utiliza 15 partições de acetato de etila é mais apropriada por conter menos compostos que possam causar entupimento da coluna ou erros da quantificação.

REFERÊNCIAS

AHN, Y. J.; PARK, S. J.; LEE, S. G.; SHIN, S. C.; CHOI, D. H. Cordycepin: Selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2744–2748, 2000.

ANJOS, M. N. V. **Produção de astaxatina por *Mucor circinelloides* utilizando melão de cana-de-açúcar como substrato alternativo sob a influência de luz azul**, 2013. Universidade Federal de Pernambuco.

ARAMWIT, P.; BANG, N.; RATANAVARAPORN, J.; NAKPHENG, T.; SRICHANA, T. An Anti-Cancer Cordycepin Produced by *Cordyceps militaris* Growing on the Dead Larva of *Bombyx mori* Silkworm. **Journal of Agricultural Science**, v. 6, n. 6, p. 41–53, 2014.

ARAMWIT, P.; PORASUPHATANA, S.; SRICHANA, T.; NAKPHENG, T. Toxicity evaluation of cordycepin and its delivery system for sustained in vitro anti-lung cancer activity. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2015.

BAI, K. C.; SHEU, F. A novel protein from edible fungi *Cordyceps militaris* that induces apoptosis. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 21–30, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.013>>. .

BINKLEY, W. W.; WOLFROM, M. L. **Composition of Cane Juice and Cane Final Molasses**. New York: Academic Press Inc., 1953.

BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. 2º ed. Editora Edgard Blücher Ltda., 2001.

BUTÃO. **FOREST AND NATURE CONSERVATION RULES AND REGULATIONS OF BHUTAN**. Buthan, 2017.

CERRI, M. L.; MACHADO, K.; FÁVERO, M.; SYDNEY, E. Comparação Entre Métodos de Fermentação Para Crescimento do Fungo *Cordyceps militaris*. VII SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA. **Anais...** . v. 2, 2019. Londrina, PR: Galoá. Disponível em: <<https://proceedings.science/simbbtec-2019/papers/comparacao-entre-metodos-de-fermentacao-para-crescimento-do-fungo-cordyceps-militaris>>. .

CHA, S. H.; LIM, J. S.; YOON, C. S.; et al. Production of mycelia and exo-biopolymer from molasses by *Cordyceps sinensis* 16 in submerged culture. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 165–168, 2007.

CHEN, L.; LIU, Y.; GUO, Q.; ZHENG, Q.; ZHANG, W. Metabolomic comparison between wild *Ophiocordyceps sinensis* and artificial cultured *Cordyceps militaris*. **Biomedical Chromatography**, v. 32, n. 9, p. 1–10, 2018.

CHEN, R.; ICHIDA, M. Infection of the Silkworm, *Bombyx mori*, with *Cordyceps militaris*. **Journal of Insect Biotechnology and Sericology**, v. 71, n. 1, p. 61–63, 200

CHINA. **State Council of the People's Republic of China**. Order No. 4 of the State Forestry Administration and Ministry of Agriculture: the list of the wild plants under the state emphasized protection. 1999; Consultado em: <http://www.gov.cn/gongb2>.

CHUA, L. S.; LATIFF, N. A.; WARE, I. A fast, sensitive and validated technique for eurycomanone and cordycepin quantitation using UPLC–MS/MS. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 167–175, 2018.

CUI, J. D. Biotechnological production and applications of *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 475–484, 2015.

CUI, J. D.; YUAN, L. Q. Optimization of culture conditions on mycelial grown in submerged culture of *Cordyceps militaris*. **International Journal of Food Engineering**, v. 7, n. 1, 2011.

CUNNINGHAM, K. G.; HUTCHINSON, S. A.; WILLIAM, M.; SPRING, F. Cordycepin, a Metabolic Product from Cultures of *Cordyceps*. **Journal of the Chemical Society**, p. 2299–2300, 1951. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/1951/jr/jr9510002299>>.

FAN, D. D.; WANG, W.; ZHONG, J. J. Enhancement of cordycepin production in submerged cultures of *Cordyceps militaris* by addition of ferrous sulfate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 30–35, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2011.09.014>>.

HEINEMANN, R. J. B.; FAGUNDES, P. L.; PINTO, E. A.; PENTEADO, M. V. C.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Comparative study of nutrient composition of commercial

brown, parboiled and milled rice from Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 4, p. 287–296, 2005.

HSIEH, C.; LIU, C. J.; TSENG, M. H.; LO, C. T.; YANG, Y. C. Effect of olive oil on the production of mycelial biomass and polysaccharides of *Grifola frondosa* under high oxygen concentration aeration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 3, p. 434–439, 2006.

HSIEH, C.; TSAI, M.; HSU, T.; CHANG, D.; LO, C. Medium optimization for polysaccharide production of *Cordyceps sinensis*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 120, n. 1, 2005.

HU, S.; WANG, J.; LI, F.; et al. Structural characterisation and cholesterol efflux improving capacity of the novel polysaccharides from *Cordyceps militaris*. **International journal of biological macromolecules**, v. 131, p. 264–272, 2019. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.078>>. .

HU, T.; LIANG, Y.; ZHAO, G.; et al. Selenium Biofortification and Antioxidant Activity in *Cordyceps militaris* Supplied with Selenate , Selenite , or Selenomethionine. , p. 553–561, 2019. Biological Trace Element Research.

HUANG, L.; LI, Q.; CHEN, Y.; WANG, X.; ZHOU, X. Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 12, p. 957–961, 2009.

HUR, H. Chemical Ingredients of *Cordyceps militaris* . **Mycobiology**, v. 36, n. 4, p. 233, 2010.

JEONG, J. W.; JIN, C. Y.; KIM, G. Y.; et al. Anti-inflammatory effects of cordycepin via suppression of inflammatory mediators in BV2 microglial cells. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 12, p. 1580–1586, 2010.

KANG, C.; WEN, T. C.; KANG, J. C.; et al. Optimization of large-scale culture conditions for the production of cordycepin with *cordyceps militaris* by liquid static culture. **Scientific World Journal**, v. 2014, p. 20–24, 2014.

KIM, J. S.; SAPKOTA, K.; PARK, S. E.; et al. A fibrinolytic enzyme from the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. **Journal of Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 622–631, 2006.

KITAMURA, D. H. **PRODUÇÃO DE BIOMASSA PROBIÓTICA E ENRIQUECIDA COM SELÊNIO DE *Saccharomyces boulardii* UTILIZANDO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**, 2013. Universidade Federal do Paraná.

LEE, J.-H.; YOON, J.-Y.; MYOUNG, H.; et al. P5. Anti-cancer effects of cordycepin on oral squamous cell carcinoma proliferation and apoptosis in vitro. **Oral Oncology**, v. 47, p. S75, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.06.248>>. .

LENNON, M. B.; SUHADOLNIK, R. J. Biosynthesis of 3'-deoxyadenosine by *Cordyceps militaris*. Mechanism of reduction. **BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis**, v. 425, n. 4, p. 532–536, 1976.

MAO, X. B.; EKSRIWONG, T.; CHAUVATCHARIN, S.; ZHONG, J. J. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1667–1672, 2005.

MASUDA, M.; DAS, S. K.; HATASHITA, M.; FUJIHARA, S.; SAKURAI, A. Efficient production of cordycepin by the *Cordyceps militaris* mutant G81-3 for practical use. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 181–187, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.10.017>>. .

MASUDA, M.; URABE, E.; HONDA, H.; SAKURAI, A.; SAKAKIBARA, M. Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1199–1205, 2007.

MCKENNA, D. J.; JONES, K.; HUGHES, K. **Botanical Medicines: The Desk Reference for Major Herbal Supplements**. Routledge, 2012.

MILOVANOVIĆ, I.; BRČESKI, I.; STAJIĆ, M.; et al. Potential of *pleurotus ostreatus* mycelium for selenium absorption. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

MOONJAI, N.; VERSTREPEN, K. J.; DELVAUX, F. R.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H. The Effects of Linoleic Acid Supplementation of Cropped Yeast on its Subsequent Fermentation Performance and Acetate Ester Synthesis. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, n. 2, p. 227–235, 2002. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=13856473>>. .

MOREIRA, R. R. D.; SANTOS, L. E.; VARELLA, S. D.; VARANDA, E. A.; VILEGAS, W. Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoídicos 7-metoxilados relacionados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 11–19, 2002.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO – NEPA; UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO Versão 1. , p. 43, 2004. Disponível em: <http://189.28.128.100/nutricao/docs/taco/tab_bras_de_comp_de_alim_doc.pdf>. .

OH, J.; YOON, D.; SHRESTHA, B.; CHOI, H.; SUNG, G. Metabolomic profiling reveals enrichment of cordycepin in senescence process of *Cordyceps militaris* fruit bodies §. **Journal of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 54–63, 2019.

RAETHONG, N.; LAOTENG, K.; VONGSANGNAK, W. Uncovering global metabolic response to cordycepin production in *Cordyceps militaris* through transcriptome and genome-scale network-driven analysis. , , n. January, p. 1–13, 2018.

REIS, F. S.; BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; et al. The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant, antibacterial, antifungal and antihuman tumor cell lines properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 91–98, 2013.

ROCHA, M. P. **Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melão de cana como substrato**, 2017. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

SARI, N.; SUPARMIN, A.; KATO, T.; PARK, E. Y. Improved cordycepin production in a liquid surface culture of *Cordyceps militaris* isolated from wild strain. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 5, p. 595–600, 2016.

SATO, H.; SHIMAZU, M. Stromata production for *Cordyceps militaris* (Clavicipitales: Clavicipitaceae) by injection of hyphal bodies to alternative host insects. **Applied Entomology and Zoology**, v. 37, n. 1, p. 85–92, 2002.

SHRESTHA, B.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; LIU, X. What is the Chinese caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* (Ophiocordycipitaceae)? **Mycology**, v. 1, n. 4, p. 228–236, 2010.

SHRESTHA, B.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; LIU, X. The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: Research and development. **Mycological Progress**, v. 11, n. 3, p. 599–614, 2012.

SONG, J.; WANG, Y.; TENG, M.; et al. Studies on the Antifatigue Activities of *Cordyceps militaris* Fruit Body Extract in Mouse Model . **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–15, 2015.

SUGAR, A. M.; CAFFREY, R. P. M. C. Antifungal Activity of 3'-Deoxyadenosine (*Cordycepin*). **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 42, n. 6, p. 1424–1427, 1998.

SUNG, J.-M.; LUANGSA-ARD, J. J.; HYWEL-JONES, N. L.; et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**, 2010.

TULI, H. S.; SHARMA, A. Optimization of fermentation conditions for cordycepin production using *Cordyceps militaris* 3936. **Journal of Biological and Chemical Sciences (JBACS)**, v. 1, n. 1, p. 35–47, 2014.

WANG, C.-C., WU, J.-Y., CHANG, C.-Y., YU, S.-T., & LIU, Y.-C. Enhanced exopolysaccharide production by *Cordyceps militaris* using repeated batch cultivation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. xx, n. xx, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.09.006>>. .

WANG, B. SEN; LEE, C. P.; CHEN, Z. T.; YU, H. M.; DUH, P. DER. Comparison of the hepatoprotective activity between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis*. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 2, p. 489–495, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2012.02.009>>. .

WANG, J.; KAN, L.; NIE, S.; et al. A comparison of chemical composition, bioactive components and antioxidant activity of natural and cultured *Cordyceps sinensis*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 2–7, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.109>>. .

WEN, T. C.; LI, G. R.; KANG, J. C.; KANG, C.; HYDE, K. D. Optimization of solid-state fermentation for fruiting body growth and cordycepin production by *Cordyceps militaris*. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 41, n. 4, p. 858–872, 2014.

WOICIECHOWSKI, A. L.; CARVALHO, J. C.; SPIER, M. R.; et al. Emprego de

resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares. **Biotecnologia de alimentos**, v. 12, p.143–172, 2013.

WON, S. Y.; PARK, E. H. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 555–561, 2005.

WONG, J. H.; NG, T. B.; WANG, H.; et al. Cordymin, an antifungal peptide from the medicinal fungus *Cordyceps militaris*. **Phytomedicine**, v. 18, n. 5, p. 387–392, 2011.

WONGSA, B.; RAETHONG, N.; CHUMNANPUEN, P.; WONG-EKKABUT, J. Alternative metabolic routes in channeling xylose to cordycepin production of *Cordyceps militaris* identified by comparative transcriptome analysis. **Genomics**, , n. January, p. 0–1, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.04.015>>. .

XIA, Y.; LUO, F.; SHANG, Y.; et al. Fungal Cordycepin Biosynthesis Is Coupled with the Production of the Safeguard Molecule Pentostatin Article Fungal Cordycepin Biosynthesis Is Coupled with the Production of the Safeguard Molecule Pentostatin. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 12, p. 1479- 1489.e4, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.09.001>>. .

YANG, B. K.; HA, J. Y.; JEONG, S. C.; et al. Production of exo-polymers by submerged mycelial culture of *Cordyceps militaris* and its hypolipidemic effect. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 784–788, 2000.

YIN, Y.; YU, G.; CHEN, Y.; et al. Genome-Wide Transcriptome and Proteome Analysis on Different Developmental Stages of *Cordyceps militaris*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

YU, R.; SONG, L.; ZHAO, Y.; et al. Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 5, p. 465–472, 2004.

YU, R.; YIN, Y.; YANG, W.; et al. Structural elucidation and biological activity of a novel polysaccharide by alkaline extraction from cultured *Cordyceps militaris*. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 1, p. 166–171, 2009.

ZHENG, H.; HAO, M.; LIU, W.; ZHENG, W.; FAN, S. Foam fractionation for the concentration of exopolysaccharides produced by repeated batch fermentation of

cordyceps militaris. **Separation and Purification Technology**, v. 210, p. 682–689, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.08.063>>. .

ZHENG, P.; XIA, Y.; XIAO, G.; et al. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional chinese medicine. **Genome Biology**, v. 12, n. 11, 2011.

ZHOU, X. W.; LI, L. J.; TIAN, E. W. Advances in research of the artificial cultivation of *Ophiocordyceps sinensis* in China. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 233–243, 2014.