

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**IANE MARIA FONSECA**

**ESTUDO DO MEIO DE CULTIVO PARA ESTABILIDADE GENÉTICA DO FUNGO  
PARASITA *Cordyceps militaris* CULTIVADO EM *Tenebrio molitor***

**PONTA GROSSA**

**2022**

**IANE MARIA FONSECA**

**ESTUDO DO MEIO DE CULTIVO PARA ESTABILIDADE GENÉTICA DO FUNGO  
PARASITA *Cordyceps militaris* CULTIVADO EM *Tenebrio molitor***

***CULTURE MEDIUM STUDY FOR GENETIC STABILITY OF THE PARASITIC  
FUNGUS *Cordyceps militaris* CULTIVATED IN *Tenebrio molitor****

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).  
Orientadora: Prof. Dra. Elisabete Hiromi Hashimoto  
Coorientadora: MSc. Maria Luísa Cerri

**PONTA GROSSA**

**2022**



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

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**IANE MARIA FONSECA**

**ESTUDO DO MEIO DE CULTIVO PARA ESTABILIDADE GENÉTICA DO FUNGO  
PARASITA *Cordyceps militaris* CULTIVADO EM *Tenebrio molitor***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado  
como requisito para obtenção do título de Bacharel de Curso  
de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 29 de Novembro de 2022

---

Elisabete Hiromi Hashimoto  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Eduardo Bittencourt Sydney  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Luis Alberto Chavez Ayala  
Mestrado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**PONTA GROSSA**

**2022**

Dedico este trabalho à minha família, meus amigos e meus queridos mentores durante toda minha graduação.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo meus pais Eliane e Ivaldo por todo apoio, incentivo e suporte durante todos esses anos, aos meus irmãos Eviana e Ivano por sempre me apoiarem, e minha sobrinha Anne Isabelle por sempre deixar meus dias mais alegres, aos meus amigos, especialmente Rafaela Goltz, Raquel Nobre e Maria Cerri que sempre estiveram do meu lado e acreditaram em mim, aos meus queridos professores, que me fizeram crescer e me tornar a aluna e profissional que sou hoje, em especial ao Prof. Dr. Eduardo B. Sydney por ser meu orientador durante minha graduação e um exemplo ao longo desses últimos 4 anos. Certamente minha graduação e minha vida não seriam a mesma sem vocês.

Agradeço a minha orientadora Professora Dra. Elisabete Hiromi Hashimoto, por aceitar esse desafio, como também meus queridos coorientadores Dr. Eduardo Bittencourt Sydney e MSc. Maria Luísa Cerri por trilharem esse caminho junto comigo e acreditarem nas minhas ideias para este projeto, bem como minha banca avaliadora pela disponibilidade e cooperação.

Agradeço também ao Prof. Dr. Igor Paiva por toda cooperação e fornecimento dos *Tenebrios*, esse trabalho não seria possível sem seu apoio.

Aos meus colegas de sala, a Secretaria do Curso e todos na UTFPR-PG.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

“Science is much more than a body of knowledge. It’s a way of thinking.”

- Carl Sagan, 1996.

## RESUMO

*Cordyceps militaris* é um fungo de crescente interesse comercial e medicinal, devido aos compostos bioativos por ele produzido, como a cordicepina, cordicerebrosídeo, cordimina, polissacarídeos e ergosteróis. Entretanto, o cultivo laboratorial e industrial deste fungo possui desafios em relação a conservação e propagação da cepa, visto que esta sofre uma rápida degeneração genética ao longo dos repiques. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar se diferentes formas de cultivo de *C. militaris* utilizando como substrato larvas e pupas de *Tenebrio molitor* contribuem para geração de cepas mais resistentes contra a degradação genética do fungo. Dentre as diferentes metodologias testadas, o cultivo que obteve o melhor resultado foi feito realizando uma pequena incisão no inseto e posterior imersão (cerca de 10 segundos) em cultivo basal do fungo (composto por dextrose, de nitrato de sódio, fosfato de potássio, fosfato de sódio, sulfato de magnésio e extrato de levedura) e incubado em 21 °C e sob umidade constante de 75%. Após a cobertura total do micélio, o cultivo seguiu para fotoperíodo de 12h/d até a frutificação dos cogumelos. Por meio deste estudo, pode-se considerar que a cepa avaliada demonstrou potencial para o desenvolvimento do cogumelo nas pupas do inseto após 59 dias da inoculação, entretanto não houve progressão e prolongamento do corpo frutificado, que pode ser devido a algum fator essencial faltante na mimetização do ambiente do fungo. Assim, se faz necessário a utilização de novas cepas para se consolidar uma metodologia que possibilite a conservação das características biológicas e produtivas de cepas de *Cordyceps militaris* utilizando o *Tenebrio molitor* como meio de manutenção.

Palavras-chave: cogumelo; degeneração genética; produção.

## ABSTRACT

*Cordyceps militaris* is a fungus of growing commercial and medicinal interest, due to its bioactive compounds, such as cordycepin, cordycerebroside, cordymine, polysaccharides and ergosterols. However, the laboratory and industrial cultivation of this fungus presents difficulties in conservation and propagation of the strain, since it has a rapid genetic degeneration along the peaks. Therefore, this work aims to evaluate whether different forms of cultivation of *C. militaris* using larvae and pupae of *Tenebrio molitor* as substrate contribute to the generation of more resistant strains against the genetic degradation of the fungus. Among the different methodologies tested, the culture that obtained the best result was performed by making a small incision in the insect and subsequent immersion (10 seconds) in basal culture of the fungus (composed of dextrose, sodium nitrate, potassium phosphate, phosphate of sodium, magnesium sulfate and yeast extract) and incubated at 21 °C and constant humidity of 75%. After total coverage of the mycelium, the cultivation proceeded to a photoperiod of 12 h/d until the fruiting of the mushrooms. Furthermore, the evaluated strain showed potential for the development of the mushroom in the insect pupae after 59 days of inoculation, however there was no progression and prolongation of the fruiting body, which may be due to some missing essential factor in mimicking the fungus environment. Therefore, it is necessary to use new strains to consolidate this methodology that allows the conservation of the biological and productive characteristics of strains of *Cordyceps militaris* using *Tenebrio molitor* as a medium for maintenance.

Keywords: mushroom; genetic degeneration; production.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Cepas de <i>C. militaris</i> após repiques .....	18
Figura 2 – Ciclo de vida do <i>Tenebrio molitor</i> .....	19
Figura 3 – Estroma em pupas de <i>Tenebrio molitor</i> . Barra de escala: 10 mm. ....	31
Fluxograma 1 – Metodologia de preparo e inoculação em meio líquido.....	21
Fluxograma 2 – Metodologia de preparo e inoculação em meio sólido ABD .....	21
Fotografia 1 – Corpo frutificado <i>C. militaris</i> cultivado em laboratório .....	16
Fotografia 2 – Proliferação do micélio nos corpos frutificados de <i>C. militaris</i> .....	22
Fotografia 3 – Larvas e pupas de <i>T. molitor</i> .....	23
Fotografia 4 – Aplicação de <i>Cordyceps militaris</i> na pupa de <i>T. molitor</i> .....	23
Fotografia 5 – Béquer com contendo com uma camada de musgo <i>Sphagnum</i> sp.....	24
Fotografia 6 – Meios de cultivo de <i>C. militaris</i> .....	25
Fotografia 7– Diferentes cepas de <i>C. militaris</i> após indução de frutificação por luz .....	26
Fotografia 8 – Meios de cultivo após 10 dias de inoculação .....	27
Fotografia 9 – Larvas com presença de micélio de <i>C. militaris</i> .....	27
Fotografia 10 – Crescimento do micélio após 10 dias de incubação na pupa (A) e em larva (B) de <i>T. molitor</i> .....	28
Fotografia 11 – Pupas tomadas pelo micélio após 15 dias de inoculação .....	28
Fotografia 12 – Crescimento do micélio nas pupas após (A) 9 dias e (B) 12 dias .....	29
Fotografia 13 – Crescimento do corpo frutificado de <i>C. militaris</i> em besouro e em pupa de <i>T. molitor</i> .....	30
Fotografia 14 – Larvas de <i>T. molitor</i> comerciais (Vitale) .....	31
Fotografia 15 – Meio enriquecido com farinha de <i>T. molitor</i> .....	32
Fotografia 16 – Meios enriquecidos com <i>T. molitor</i> após 6 dias de inoculação .....	32
Tabela 1 – Composição da larva comercial Vitale de <i>Tenebrio molitor</i> .....	19
Tabela 2 – Quantidade dos reagentes para o meio líquido adaptado de Milovanović <i>et al.</i> , (2014) .....	20
Tabela 3 – Formulações dos meios utilizados .....	24

## LISTA DE SÍMBOLOS

C	Carbono
Mg	Magnésio
Na	Sódio
H	Hidrogênio
SO <sub>4</sub>	Sulfato
O	Oxigênio
NO <sub>3</sub>	Nitrato
K	Potássio

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	OBJETIVO .....	14
2.1	Objetivo geral.....	14
2.2	Objetivos específicos .....	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
3.1	Cogumelos medicinais.....	15
3.2	<i>Cordyceps militaris</i> .....	16
3.3	Cultivo do <i>Cordyceps militaris</i> .....	17
3.4	Degeneração do <i>Cordyceps militaris</i> .....	17
3.5	<i>Tenebrio molitor</i> .....	18
4	METODOLOGIA.....	20
4.1	Materiais biológicos .....	20
4.2	Cultivo do <i>Cordyceps militaris</i> .....	20
4.3	Cultivo no <i>Tenebrio molitor</i> .....	22
4.4	Meio constituído por <i>T. molitor</i> .....	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	25
5.1	Meios padrões .....	25
5.2	Cultivo em larvas e pupas.....	27
5.3	Meios enriquecidos com <i>Tenebrio molitor</i> .....	31
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
	REFERÊNCIA	35

## 1 INTRODUÇÃO

*Cordyceps militaris* é um cogumelo popular na medicina tradicional chinesa, sendo consumido pelo homem há vários séculos, e por ser o principal substituto de *Cordyceps sinensis* (GUI *et al.*, 2008). O *C. militaris* é um fungo do gênero ascomiceto que parasita artrópodes, capaz de produzir diversos compostos bioativos, como cordicepina (Kang *et al.*, 2014), cordicerebrosídeo (CHIU *et al.*, 2016), cordimina (WONG *et al.*, 2011), polissacarídeos (SUN *et al.*, 2018) e ergosteróis (NALLATHAMBY *et al.*, 2015), que lhe conferem propriedades farmacológicas como anti-inflamatória (JEONG *et al.*, 2010; SMIDERLE *et al.*, 2014), antitumoral (LIM *et al.*, 2004; DONG *et al.*, 2013), antioxidante (YU *et al.*, 2007) e imunomodulatória (LIU *et al.*, 2016).

O interesse da população pelas propriedades farmacológicas aumentou a demanda por este fungo. Porém, o *Cordyceps militaris* sofre uma rápida perda de sua atividade metabólica em escala laboratorial a cada repique realizado o que dificulta sua utilização em escala industrial (YIN *et al.*, 2017 apud HAN *et al.*, 2009; LOU *et al.*, 2019).

Yin *et al.*, (2017), revelaram que cepas in natura apresentam taxas de degeneração genética significativamente menores que as cultivadas em laboratório. Tendo em vista que os insetos são o hospedeiro original deste fungo, o presente estudo visa entender e minimizar a degeneração que as cepas sofrem durante sucessivos repiques, utilizando de artrópodes como meio para manutenção genética, com possibilidade de apresentar uma melhora da cepa ao retornar ao meio de cultivo natural (inseto).

O inseto *Tenebrio molitor*, conhecido comumente como bicho-da-farinha, é rico em nutrientes e muito utilizado para nutrição animal, e nos últimos 10 anos avaliado para nutrição humana (RAVZANAADII *et al.*, 2012; HEIDARI-PARSA *et al.*, 2018).

Por este motivo, é propício para utilização como meio de cultivo para o *C. militaris*. O estudo de Sato *et al.*, (2002) e as patentes CN108184540 e CN105557312A, apresentaram resultados satisfatórios do crescimento de *Cordyceps* sp., porém sem a realização de um estudo genético para avaliação do desempenho da cepa, quanto à degeneração durante seu sucessivos repiques.

Portanto, o objetivo deste estudo consistiu em desenvolver uma metodologia de cultivo de *Cordyceps militaris* em *Tenebrio molitor*, que evite a perda de suas funções biológicas básicas e industriais, apresentando características de cor e frutificação esperados para esta cepa. Objetiva-se que esta metodologia possa promover mais resistência à degeneração durante os repiques feitos em laboratório, gerando cepas mais estáveis.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia de cultivo de *Cordyceps militaris* utilizando como substrato larvas e pupas de *Tenebrio molitor* para geração de cepas mais resistentes contra a degeneração genética do fungo.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver uma metodologia de inoculação de *C. militaris* em larvas e pupas de *T. molitor*;
- Avaliar diferentes metodologias de incubação;
- Testar a suplementação do meio basal de *C. militaris* com farinha de *Tenebrio molitor*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Cogumelos medicinais

A busca por produtos naturais e de origem sustentável tem crescido exponencialmente, (REDAÇÃO ECONOMIA SC, 2021; ABERJE, 2022), hoje o consumidor tem uma maior preocupação em consumir e utilizar produtos naturais, devido seus inúmeros benefícios. E cogumelos são um ótimo exemplo desses produtos, já que são altamente ricos em nutrientes, tais como antioxidantes, como carotenoides, compostos fenólicos, vitaminas do complexo B (B1, B2, B12), ácido ascórbico (vitamina C), vitamina D e tocoferóis (vitamina E), aminoácidos, sendo os mais abundantes, ácido glutâmico, ácido aspártico, arginina, valina, leucina e lisina, polissacarídeos e lipídeos, além de produzirem compostos bioativos que em sua maioria são metabólitos secundários (MANZI *et al.*, 1999; REIS *et al.*, 2012; MARÇAL *et al.*, 2021).

Assim, o consumo dos mesmos na última década tem sido bastante difundido não somente no mundo ocidental como também no Brasil (GUIMARÃES, 2017); mas principalmente por possuírem glucanas em suas paredes celulares, como respostas biológicas de defesa, colaboram para melhorar a resistência do nosso organismo, como evitar o crescimento de tumores, induzir a produção de interferon e destruir células tumorais (EMBRAPA, 2003; SILVA, 2006). E mais recentemente, em formas de suplementação alimentar, por produzir compostos de interesse farmacológico, devido suas propriedades medicinais (KAKON *et al.*, 2012).

Podemos citar outros cogumelos medicinais que são utilizados para promover o sistema imunológico e cofatores a drogas fitoterápicas como o *Reishi (Ganoderma lucidum)*, *Turkey Tail (Trametes versicolor)*, *Maitaka (Grifola fondosa)*, *Chaga (Inonotus obliquus)* e o gênero *Cordyceps* (TORRES, 2021; JONG *et al.*, 1992; ABASCAL *et al.*, 2007; MAYELL, 2001; JAYACHANDRAN *et al.*, 2017). Uma das principais espécies do gênero *Cordyceps* estudados é o *Cordyceps militaris* por ser o principal substituto para o *Cordyceps sinensis*; ele é conhecido na medicina tradicional chinesa devido suas características bioquímicas e propriedades medicinais semelhantes ao *C. sinensis*. (Gao e Wang 2008; Yue *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2012).

### 3.2 *Cordyceps militaris*

Os fungos do gênero *Cordyceps*, pertencem a classe dos ascomicetos, possuindo mais de 500 espécies descritas como patógenos de artrópodes, popularmente conhecidos como fungos zumbis. O *Cordyceps militaris* (Figura 1) é caracterizado por possuir corpos de frutificação sexual que se formam em seus hospedeiros, gerando estruturas de coloração alaranjada que dão ao fungo o comum nome de “pupa grass” na China, possui tamanho varável de 1 – 8 cm, sendo um fungo filamentososo (ZHENG *et al.*, 2011). Este cogumelo, apresenta diversas propriedades farmacológicas como anti-inflamatória (JEONG *et al.*, 2010; SMIDERLE *et al.*, 2014), antitumoral (LIM *et al.*, 2004; DONG *et al.*, 2013), antioxidante (YU *et al.*, 2007) e imunomodulatória (LIU *et al.*, 2016). Na Ásia pode-se encontrar a comercialização do grama do cogumelo em suplementos alimentares por volta de 5,8 dólares (CHIU *et al.*, 2016).

**Fotografia 1 – Corpo frutificado *C. militaris* cultivado em laboratório**



Fonte: A autoria própria (2021).

### 3.3 Cultivo do *Cordyceps militaris*

O cultivo em laboratório do *C. militaris* pode ser realizado em meio líquido, a exemplo do meio adaptado de Milovanović *et al.*, (2014). A composição deste meio utiliza 10 g de dextrose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), 2 g de nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>), 1 g de fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 1 g de fosfato de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0,5 g de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) e 2 g de extrato de levedura (Tabela 2), para o preparo de 1 L de meio.

Outro meio utilizado neste estudo, baseou-se no estudo de Cerri (2021), no qual utiliza-se 3,25° Brix de melão de cana-de-açúcar, como fonte de carbono, 16,25 g de extrato de levedura, 8 g de peptona e 4 g de fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) para preparo de 1 L de meio. Para cultivo sólido é utilizado o meio Ágar Batata Dextrose (ABD).

### 3.4 Degeneração do *Cordyceps militaris*

No estudo de Lou *et al.*, (2019) foi realizada uma revisão da literatura com objetivo de ilustrar mudanças fenotípicas após a degeneração do fungo, focando em fatores ambientais e genéticos. No estudo de Yin *et al.*, (2017), identificou-se que as cepas perderam a capacidade de produzir corpos frutificados (cogumelo) gradativamente, a partir da terceira replicação ou produziram corpos deformados a partir da quarta replicação (Figura 2). Os autores também sugeriram que a degeneração das cepas de *C. militaris* estudadas podem estar associadas a um gene envolvido na biossíntese de toxinas, no metabolismo energético, metilação do DNA e na remodelação cromossômica.

A predição é que o tamanho total do genoma de *C. militaris* tenha um tamanho total de 32,2 Mb e mais de 9.684 genes. Nesse mesmo trabalho o autor relata que mutações aconteceram em regiões do gene *mating-type* (MAT), infraregulando níveis de expressão gênica, que possuem papel importante na degeneração do fungo.



Figura 1 – Cepas de *C. militaris* após repiques



a – Normal, b – Capacidade fraca de produzir cogumelos, c – Corpos deformados, d – Com perda da capacidade de produzir cogumelos

Fonte: Lou *et al.*, (2019).

### 3.5 *Tenebrio molitor*

O *Tenebrio molitor* é um artrópode do gênero *Tenebrio*, comumente conhecido como bicho-da-farinha, pois afeta culturas de trigo e milho (AGRO LINK, 2022). Assim como os demais insetos holometabólicos passa pelo processo de metamorfose, sendo seus estágios: ovo, larva, pupa e o besouro (adulto), como mostra a Figura 3. A duração total do seu ciclo é em torno de 168 dias (podendo variar de acordo com a temperatura e disponibilidade de alimento).

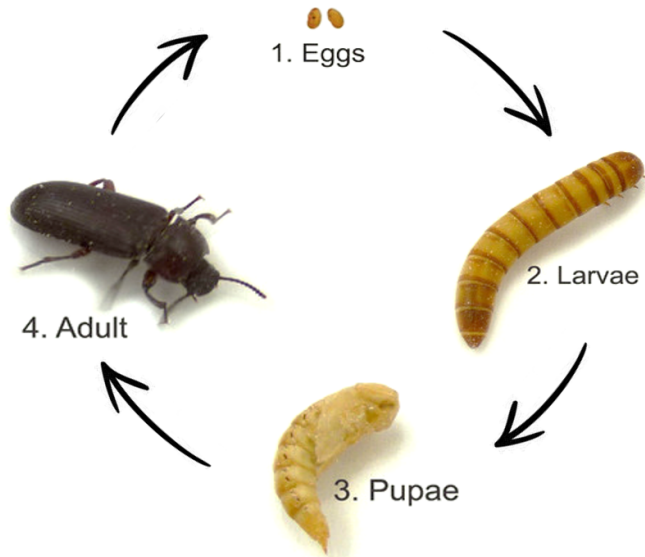
O *T. molitor* é rico em diversos nutrientes como carboidratos, proteínas, ácidos graxos e minerais essenciais (RAVZANAADII *et al.*, 2012; SIEMIANOWSKA *et al.*, 2013; HEIDARI-PARSA *et al.*, 2018). Como já descrito na literatura e em patentes (SATO *et al.*, 2002; CN108184540; CN105557312A) a utilização do *Tenebrio molitor* como substrato para o crescimento do *C. militaris* é viável justamente por sua composição de macro e micronutrientes.

Sua criação e manutenção pode ser realizada em recipientes plásticos (tamanho sugerido: 40 × 30 × 25 cm) à 25°C, sendo alimentados com farelo de trigo com adição de vegetais como fonte de água (SIEMIANOWSKA *et al.*, 2013). Na Tabela 1 estão descritas as quantidades mínimas e máximas presentes na composição centesimal do *T. molitor* comercial.

**Tabela 1 – Composição da larva comercial Vitale de *Tenebrio molitor***

	Mínimo (g/kg)	Máximo (g/kg)
Umidade	-	50
Proteína bruta	550	-
Extrato etéreo	240	-
Matéria fibrosa	-	44
Matéria mineral	-	33
Cálcio	0,3	0,5
Fósforo	6	-

Fonte: Vitale (2022).

**Figura 2 – Ciclo de vida do *Tenebrio molitor***

Fonte: Adaptado de Home Science Tools (2022).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Materiais biológicos

Os materiais biológicos utilizados no presente estudo foram compostos pelas cepas de *Cordyceps militaris*: EST (CMIB - 202) da Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico – UTFPR/PG, C1 (92B3CZ3316#3 x 92B6CZ1316#5), C2 (CDRTPLOXCH3# ZLCTCST117), C3 (DR3XDX2AB5WLCCCP1118) e C4 (CUB292BBC21316# 55WL6COMB8D1118), adquiridas do *Terrestrial Fungi* (Warren, MI, Estados Unidos da América).

### 4.2 Cultivo do *Cordyceps militaris*

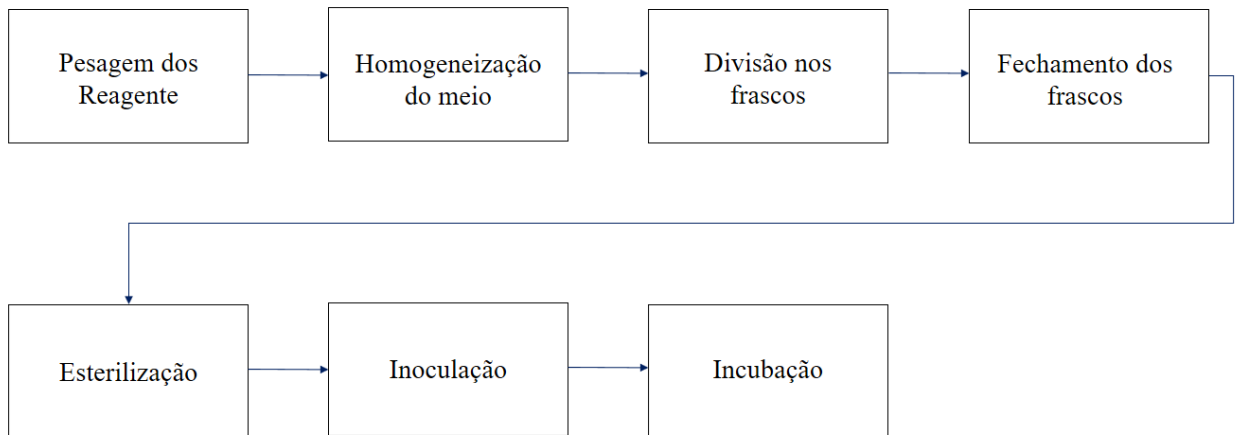
O cultivo do fungo foi realizado em meio adaptado de Milovanović *et al.*, (2014), para o meio líquido (Tabela 2), primeiramente, todos os reagentes são pesados em balança analítica (Eduotec, JC-22OAB), e posteriormente são homogeneizados com água destilada, após, o meio é distribuído em erlenmeyers de 500 mL, sendo 200 mL de meio em cada, os bocais são fechados e leva-se os mesmos para a autoclave (Phoenix/AV75, Araraquara, SP, Brasil) por 121 °C durante 15 minutos a 1 ATM, logo após o resfriamento, inocula-se, em fluxo laminar, e depois leva-se para a câmara de germinação (Tecnal/TE-391, Piracicaba, SP, Brasil) por 15 dias, à 21 °C, sem luz, para o desenvolvimento e crescimento do micélio do fungo (Fluxograma 1).

**Tabela 2 – Quantidade dos reagentes para o meio líquido adaptado de Milovanović *et al.*, (2014)**

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	10,0
Nitrato de Sódio	2,0
Fosfato de Potássio	1,0
Fosfato de Sódio	0,4
Sulfato de Magnésio	0,5

Fonte: Autoria própria (2021).

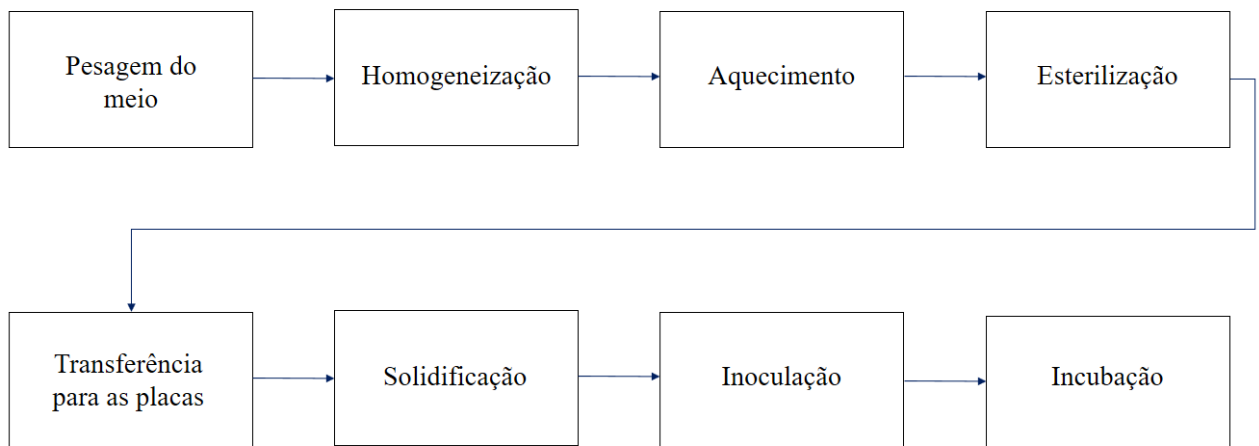
**Fluxograma 1 – Metodologia de preparo e inoculação em meio líquido**



Fonte: Autoria própria (2021).

Já para o meio sólido, o ABD (Ágar Batata Dextrose) é preparado conforme as instruções do fabricante e assim autoclava-se (Phoenix/AV75, Araraquara, SP, Brasil) por 121 °C durante 15 minutos a 1 ATM, posteriormente, no fluxo laminar, transfere-se para as placas de Petri, espera-se a solidificação e é feita a inoculação das cepas, depois leva-se para a câmara de germinação, por 15 dias, à 21 °C, sem luz, para o desenvolvimento e crescimento do micélio do fungo (Fluxograma 2).

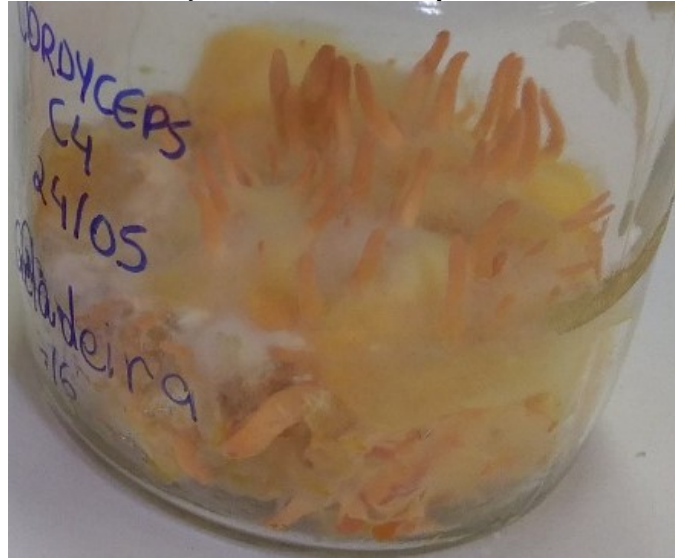
**Fluxograma 2 – Metodologia de preparo e inoculação em meio sólido ABD**



Fonte: Autoria própria (2021).

Em paralelo, foi realizado o cultivo do *C. militaris* em meio sólido contendo arroz integral como substrato para garantir a manutenção da cepa por meio de esporos e para verificação da funcionalidade desse meio. O meio é preparado pesando-se 13,2 g de arroz integral, 0,9 g de sacarose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>), 0,25 g de amido de milho, 0,094 g de extrato de levedura e 60 mL de água destilada, após é homogeneizado, vedados com tampão de algodão e fechados com papel Kraft, e assim foram levados para esterilização em autoclave (Phoenix/AV75, Araraquara, SP, Brasil) por 20 minutos à 121°C e 1 ATM, após o resfriamento foi realizada a inoculação a partir de discos de 5 mm de diâmetro retirados de meio ABD completamente colonizados pelo fungo. O tampão foi novamente inserido no frasco e os mesmos foram encaminhados para câmara germinação à 21 °C, sem iluminação até que o micélio colonizasse todo substrato. Após esse período a iluminação foi ligada por 12h por dia até o ápice da frutificação (quando o micélio reaparece na base do cogumelo, como apresentado na Figura 4).

**Fotografia 2 – Proliferação do micélio nos corpos frutificados de *C. militaris***



Fonte: A autoria própria (2021).

### **4.3 Cultivo no *Tenebrio molitor***

A metodologia para cultivo no *T. molitor*, foi adaptada do estudo de Sato *et al.*, (2002), que consiste na inoculação *in vivo* do micélio do fungo na larva e na pupa do inseto. Primeiramente, foram separadas as larvas das pupas do *Tenebrio*, colocando-os em placa de Petri (Figura 5).

**Fotografia 3 – Larvas e pupas de *T. molitor***



Fonte: Autoria própria (2021).

Posteriormente, com auxílio de uma seringa de 1 mL, foi aplicado cerca de 0,1 mL do cultivo líquido de *Cordyceps militaris* nos mesmos, entre a primeira e segunda homocela (Figura 6) e assim, foram colocados dentro de um recipiente com papel toalha úmido e levados para a câmara de germinação para incubação por 10 dias, à 25 ° C, para o desenvolvimento do micélio. Após 10 dias, transferiu-se para um béquer com uma camada de musgo *Sphagnum* sp. (Figura 7). O meio deve ser úmido e fechado com parafilme para nova incubação, entretanto com fotoperíodo por 12 horas de luz no dia, na mesma temperatura por cerca de 45 dias.

**Fotografia 4 – Aplicação de *Cordyceps militaris* na pupa de *T. molitor***



Fonte: Autoria própria (2021).

Fotografia 5 – Béquero com conteúdo com uma camada de musgo *Sphagnum* sp.



Fonte: Autoria própria (2021).

#### 4.4 Meio constituído por *T. molitor*

Primeiramente, as larvas, pupas e besouros de *Tenebrio molitor* já esterilizados foram triturados, em moinho de facas e a partir do pó obtido é preparado um total de 9 formulações de meios de cultivo líquido, adaptado de Milovanović *et al.*, (2014), adaptado de Cerri (2021) e um meio apenas com *Tenebrio molitor*, sem suplementação. Nesses três meios foram realizadas três formulações em cada, alterando a concentração de farinha de *T. molitor* (10 g, 15 g e 20 g) (Tabela 3). O mesmo processo de preparo, esterilização, inoculação e incubação foram realizados como já descritos anteriormente.

Tabela 3 – Formulações dos meios utilizados

Reagentes	Meio adaptado Milovanović (2014)			Meio adaptado Cerri (2021)			Meio <i>T. molitor</i>		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Glicose	10	10	10	-	-	-	-	-	-
Nitrato de sódio	2	2	2	-	-	-	2	2	2
Fosfato de potássio	1	1	1	4	4	4	1	1	1
Fosfato de sódio	0,4	0,4	0,4	-	-	-	0,4	0,4	0,4
Sulfato de magnésio	0,5	0,5	0,5	-	-	-	0,5	0,5	0,5
Melaço de cana-de-açúcar	-	-	-	32,5	32,5	32,5	-	-	-
Extrato de levedura	-	-	-	16,25	16,25	16,25	-	-	-
Peptona	-	-	-	8	8	8	-	-	-
Farinha de <i>T. molitor</i>	10	15	20	10	15	20	10	15	20

Fonte: Autoria própria (2022).

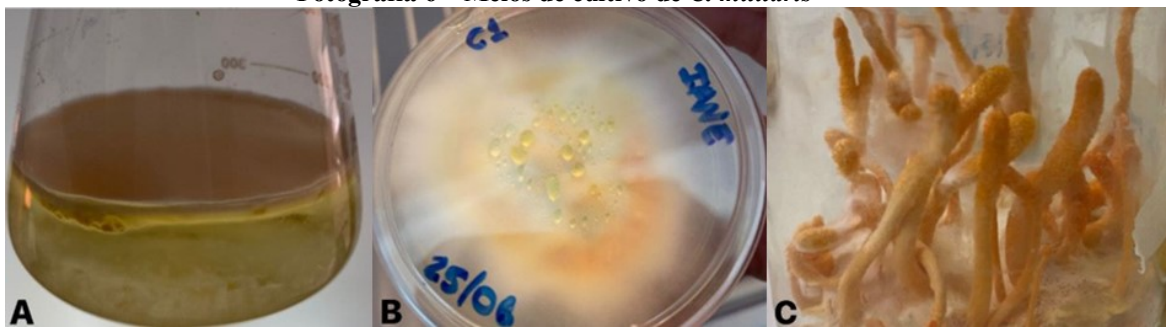


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Meios padrões

Nos meios de *Cordyceps militaris*, na Figura 8, temos os resultados do cultivo em meio líquido (A), o cultivo em meio sólido de ADB (B) e o cultivo em meio sólido composto por arroz (C). Onde todos tiveram crescimento como esperado, servindo como meios de manutenção e padrões para os demais experimentos.

Fotografia 6 – Meios de cultivo de *C. militaris*



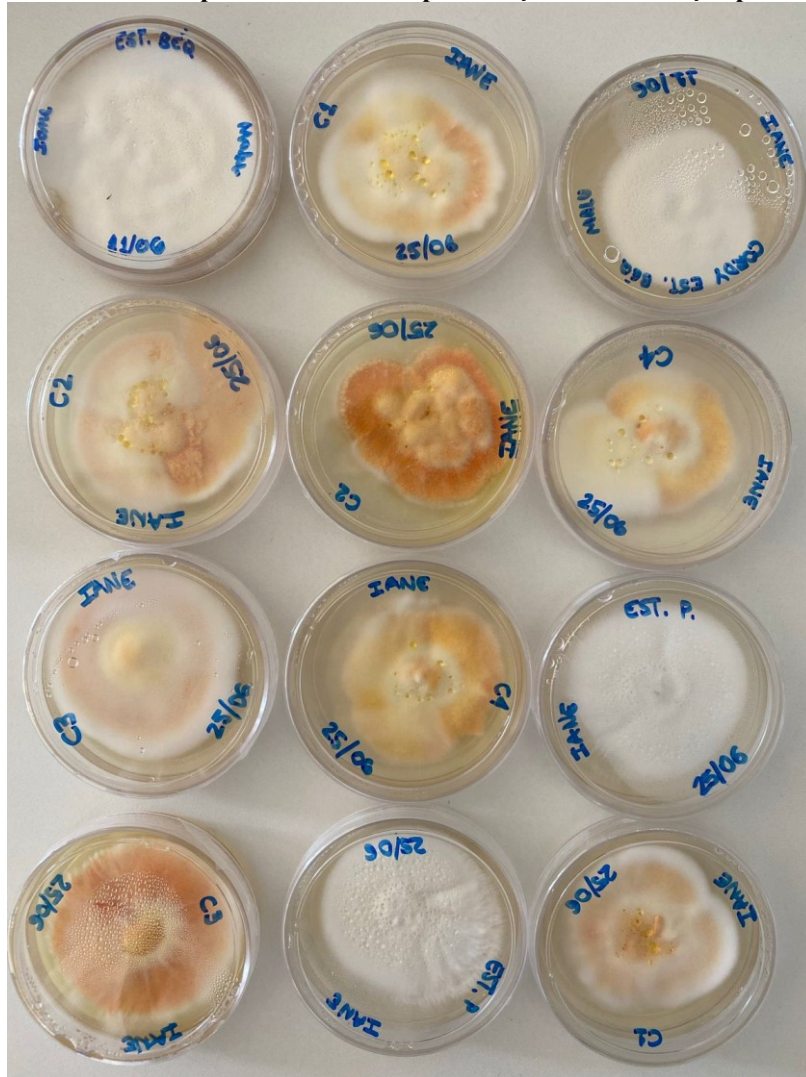
Fonte: Autoria própria (2022).

Em meio ADB foi observado um envelhecimento da cepa após cerca de 40 dias, onde as bordas formadas pelo conjunto de hifas perceptivelmente perdiam a intensidade e formavam-se orifícios, como bordado de renda, o que indicava o enfraquecimento da cepa.

Outro indicativo da degeneração da cepa utilizada nesse estudo era a permanência da coloração branca quando colocada em 12 horas de luz por dia e umidificação constante. Isso foi percebido pois a cepa quando não se tornava alaranjada demonstrava mais dificuldades de frutificação (Figura 9).



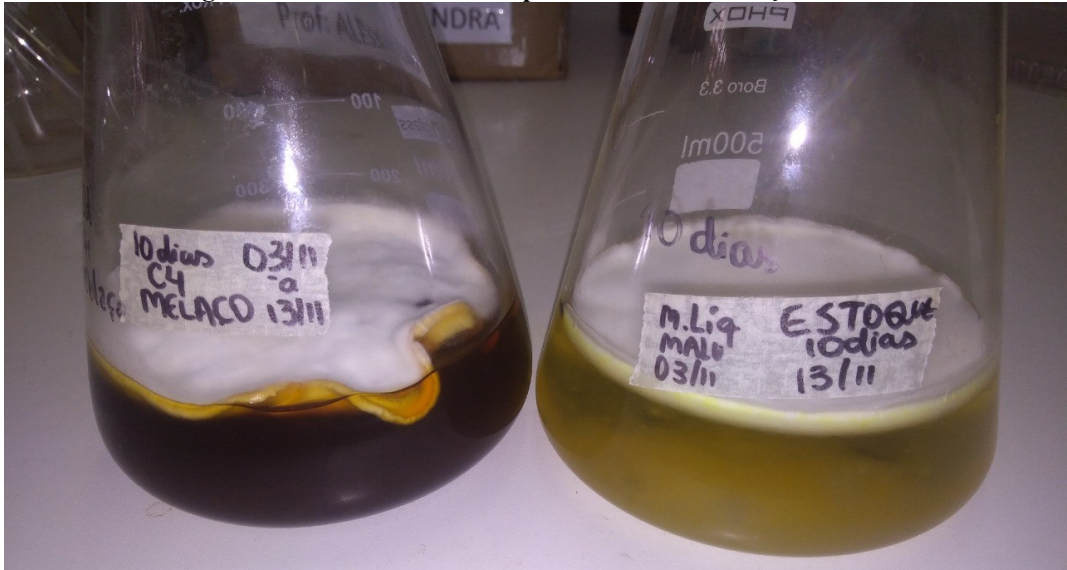
Fotografia 7– Diferentes cepas de *C. militaris* após indução de frutificação por luz



Fonte: Aatoria própria (2021).

Em relação aos cultivos em meio líquido, foi possível observar que o meio adaptado de Milovanović *et al.*, (2014), apresentava menor contaminação por sua composição sintética, porém como na Figura 10, o micélio obteve crescimento menor ainda que possuísse o mesmo tempo de cultivo que o meio otimizado de Cerri (2021), que é um meio complexo por conter melação de cana de açúcar (subproduto da indústria sucroalcooleira). A desvantagem do segundo é que pelo mesmo motivo, a riqueza de nutrientes o torna propício a proliferação de diversos microrganismos, sendo necessário investigar uma otimização dos parâmetros de esterilização.

**Fotografia 8 – Meios de cultivo após 10 dias de inoculação**



Fonte: Autoria própria (2020).

## 5.2 Cultivo em larvas e pupas

Primeiramente, realizou-se a reprodução das metodologias das patentes CN108184540 e CN105557312A, onde foi necessário a adaptação da aspersão utilizada na patente CN105557312A, pelo gotejamento superficial nas larvas.

Após o período de incubação determinado pelas patentes, apenas em uma das larvas, inoculadas pela adaptação da patente CN105557312A, observou-se o crescimento do micélio (Figura 11), porém após cerca de 60 dias o desenvolvimento do corpo frutificado não aconteceu.

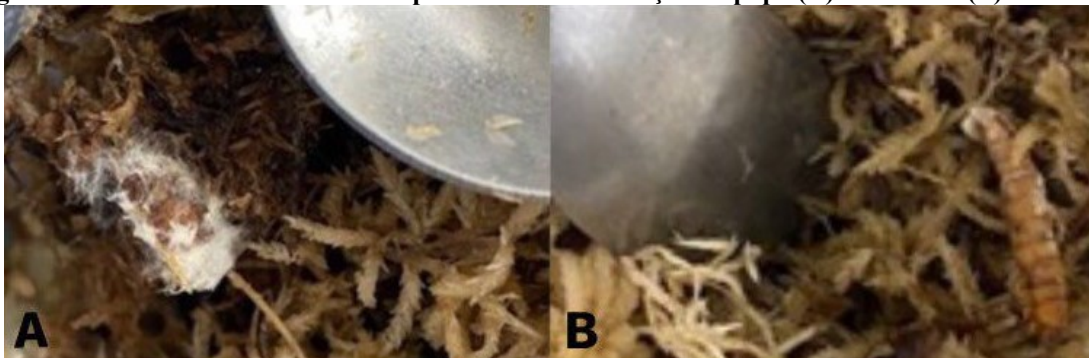
**Fotografia 9 – Larvas com presença de micélio de *C. militaris***



Fonte: Autoria própria (2021).

Assim, uma nova metodologia foi testada a partir da pesquisa advinda de *Sato et al.*, (2002), inoculando pupas e larvas, pela injeção do meio basal do fungo entre a primeira e a segunda homocela do artrópode. Foi observado que o fungo se propagou em 6 dias, em contrapartida neste presente estudo observou-se o crescimento do micélio apenas nas pupas após 10 dias (Figura 12). Após 23 dias de incubação, um enfraquecimento do crescimento foi notado, podendo indicar que as condições utilizadas por *Sato et al.*, (2002) não sejam ideais para cepa (CUB292BBC21316# 55WL6COMB8D1118) utilizada, como também, podendo ser pela própria degeneração da cepa, que passou por repiques ao longo dos experimentos.

**Fotografia 10 – Crescimento do micélio após 10 dias de incubação na pupa (A) e em larva (B) de *T. molitor***



Fonte: Autorial própria (2021).

Assim, pela resposta anterior, decidiu-se realizar as aplicações apenas em pupas, realizando o mesmo processo de inoculação, mas adaptando a temperatura da metodologia de *Sato et al.*, (2002) para 21 °C, tendo após 15 dias uma maior proliferação do micélio (Figura 13) comparado aos primeiros testes, indicando que para a cepa em questão a temperatura foi um fator decisivo para o crescimento.

**Fotografia 11 – Pupas tomadas pelo micélio após 15 dias de inoculação**



Fonte: Autorial própria (2021).



Após 40 dias sem sinal de crescimento e prolongamento do fungo, teorizou-se a possibilidade que o líquido do interior da homocela pudesse não estar se propagando de forma eficiente, por isso foi desenvolvida uma metodologia alternativa baseando-se no estudo de Sato *et al.*, (2002). Substituiu-se a injeção por uma incisão no inseto com agulha e realizado a imersão na cultura líquida contendo o fungo por cerca de 10 segundos, e os insetos expostos foram colocados em papel toalha úmido e após 10 dias não se realizou a mudança de recipiente, transferindo-os apenas para a câmara de germinação ajustada com fotoperíodo nas mesmas condições que as demais. Assim, após 9 dias, (Figura 14 **A**) e 12 dias, (Figura 14 **B**), se pode observar uma proliferação e desenvolvimento superior comparado com a metodologia anterior.

**Fotografia 12 – Crescimento do micélio nas pupas após (A) 9 dias e (B) 12 dias**



Fonte: Autoria própria (2021).

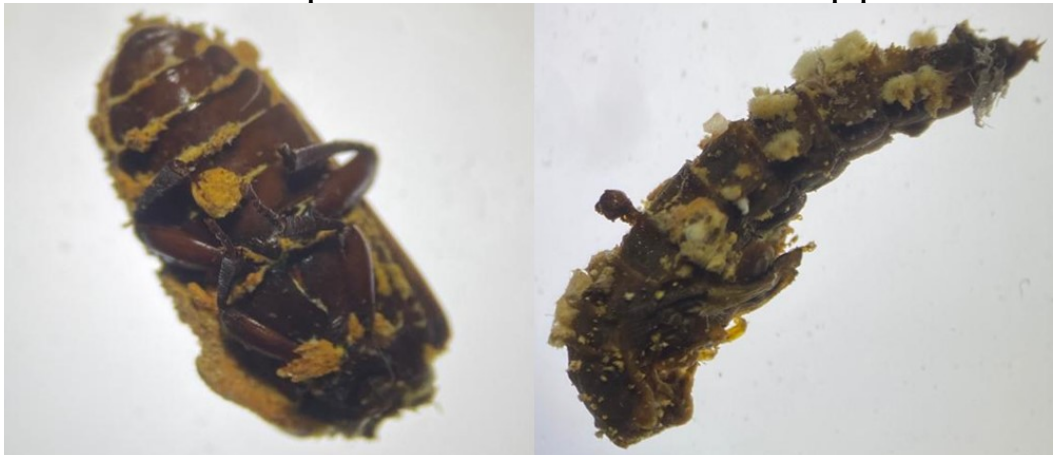
A partir disto, pode-se gerar a hipótese de que o corte e imersão no líquido contendo fungo pode ter melhorado o acesso e fixação no inseto. Seguindo essa metodologia, após 59 dias de incubação, obteve-se o seguinte resultado, (Figura 15), onde ocorreram a proliferação e início do brotamento do cogumelo, tendo algumas das pupas inoculadas, finalizado seu ciclo de desenvolvimento (besouro) e as demais completaram a proliferação de *C. militaris* ainda como pupas. Isso pode ter se dado pelo fato das pupas, quando inoculadas, se encontrarem em diferentes fases do ciclo de vida de *Tenebrio molitor* e esse não foi um dos parâmetros avaliados durante o estudo.

No entanto, segundo a pesquisa de Morales-Ramos *et al.*, (2016), as pupas de *Tenebrio molitor* possuem o teor de proteína de 60,2 % e o teor de proteína solúvel de 23% significativamente maiores do que em larvas que são 53,1% e 14,4%, respectivamente.

Entretanto, o conteúdo lipídico é 32,1% menor em pupas do que em larvas (35,9%), e as larvas têm mais ácidos graxos poli-insaturados (83,6 mg/g) enquanto pupas têm 56,6 mg/g mas têm um teor menor de ácidos oleicos (0,1 mg/g) e ácidos estéricos (6,1 mg/g) do que pupas (37,3 e 12,3 mg/g, respectivamente). O teor de açúcar total não foi significativamente diferente entre pupas e larvas, com larvas possuindo uma maior concentração de frutose e as pupas uma maior concentração de galactose, glucosamina, glicose, manose e trealose.

Ademais, no estudo de Dreassi *et al.*, (2017), identificou que o teor de gordura, e a composição de ácidos graxos do *Tenebrio*, pode variar de acordo com a composição da alimentação e das condições de criação. Como também, variar de acordo com o estágio de desenvolvimento do artrópode, indicando que larvas e pupas têm um maior teor de gordura do que nos estágios adultos. Assim, a diferença da composição de cada estágio pode interferir no crescimento e conseqüentemente no desenvolvimento do fungo, podendo ser uma possibilidade avaliada em estudos futuros para o cultivo de *Cordyceps militaris*.

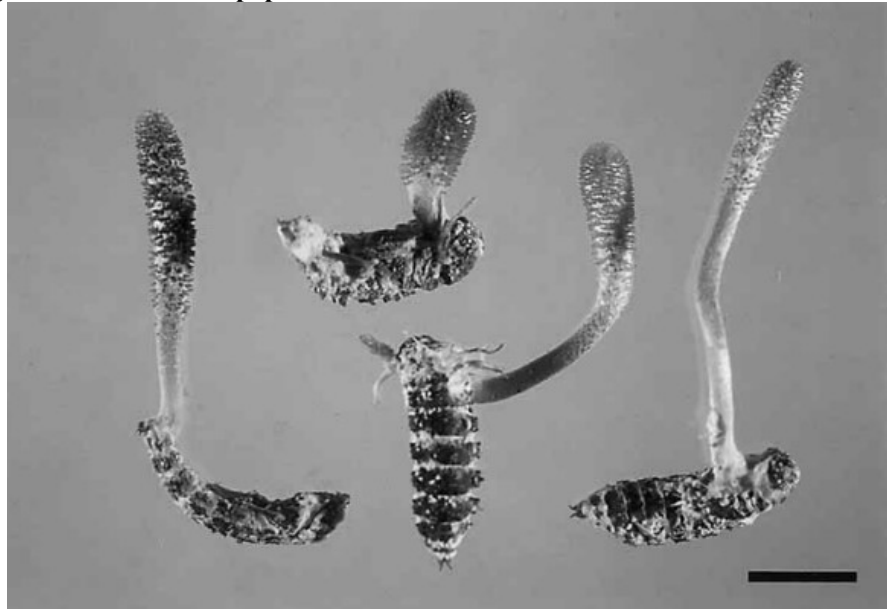
**Fotografia 13 – Crescimento do corpo frutificado de *C. militaris* em besouro e em pupa de *T. molitor***



Fonte: Autoria própria (2022).

Além disso, essa metodologia foi a única que resultou no alaranjamento do micélio em fotoperíodo e aparecimento de pequenos corpos frutificados até o final do tempo deste estudo, não foi possível verificar o crescimento esperado para esse fungo como obtido por Sato *et al.*, (2002) (Figura 16).

**Figura 3 – Estroma em pupas de *Tenebrio molitor*. Barra de escala: 10 mm.**



Fonte: Sato *et al.*, (2002).

### **5.3 Meios enriquecidos com *Tenebrio molitor***

Visto a dificuldade de frutificação em *T. molitor* vivos decidiu-se por avaliar a possibilidade de um enriquecimento com farinha em meio líquido. Para as formulações dos meios enriquecidos com *Tenebrio molitor*, optou-se por usar larvas desidratadas comerciais (Vitale, Brotas – SP) (Figura 17), para maior controle e padronização dos ensaios.

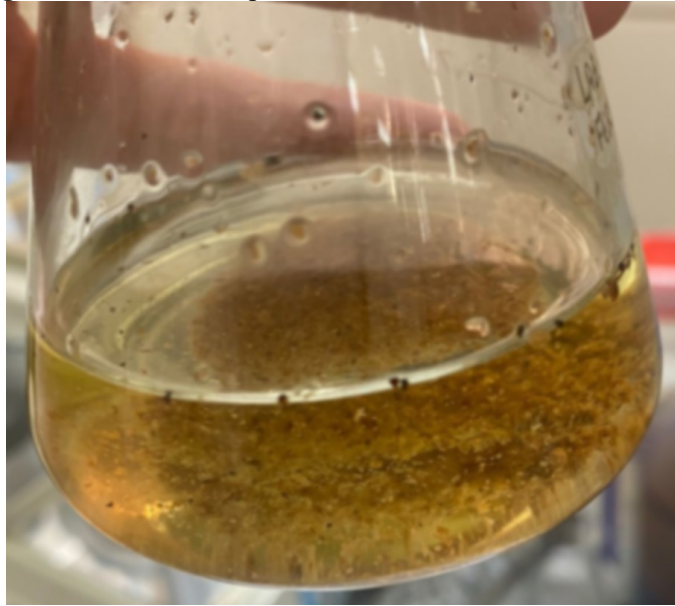
**Fotografia 14 – Larvas de *T. molitor* comerciais (Vitale)**



Fonte: Autoria própria (2022).

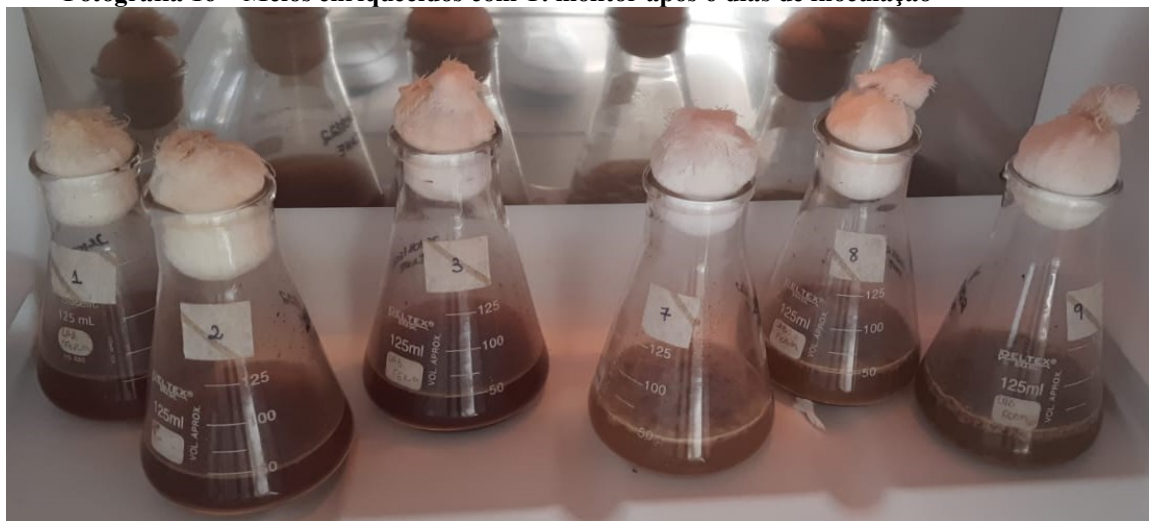
Durante a preparação dos meios, notou-se que apesar da solubilização de grande parte da farinha de *T. molitor* a partir de agitação, ainda houve a formação de pequenos aglomerados do pó (Figura 18), o que pode ter influenciado na esterilização do meio, visto que 6 dias após a inoculação, foi necessário parar o experimento, pois houve a mudança da coloração e forte odor em todas as formulações, indicando provável contaminação e competição pelos nutrientes levando ao não desenvolvimento do micélio (Figura 19).

**Fotografia 15 – Meio enriquecido com farinha de *T. molitor***



Fonte: Autoria própria (2022).

**Fotografia 16 – Meios enriquecidos com *T. molitor* após 6 dias de inoculação**



Fonte: Autoria própria (2022).

Contudo, os resultados acima ainda se demonstram inconclusivos, sendo necessário a repetição e adaptação das metodologias, podendo citar a utilização de um banho de ultrassom visando resolver a formação dos aglomerados formados durante a homogeneização do pó e a quebra da quitina do exoesqueleto do *T. molitor*, assim liberando os compostos necessários para o Cordyceps de forma facilitada. Outra sugestão é otimizar a relação entre tempo e temperatura na esterilização, visando a diminuir a microbiota inicial da farinha do inseto, visto sua composição centesimal é rica em nutrientes e possui cerca de 12% de umidade, 3 % de cinzas, 34 % de lipídeos, 33 % de proteínas, 11 % de fibras e 5 % de carboidratos (CASTRO, 2021)



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio do trabalho desenvolvido, podemos considerar que a cepa estudada demonstrou potencial para o desenvolvimento do cogumelo, entretanto não houve progressão e prolongamento do corpo frutificado, que pode ser devido a algum fator essencial faltante na mimetização do ambiente do fungo, como temperatura, método de inoculação e contato do fungo ou forma de apresentação (esporulação). Portanto, torna-se necessário a realização de testes com novas cepas para o cultivo de *Cordyceps militaris* em pupas e em larvas no inseto *Tenebrio molitor*, para confirmação da metodologia desenvolvida, como também dar continuidade a realização do sequenciamento genético, visando os marcadores referentes a degeneração do fungo, durante sua reprodução, ou seja, assim como proposto por Lou *et al.*, (2019), realizar o *screening* e a identificação dos genes chaves envolvidos na degeneração de *C. militaris*, e fazendo o uso da engenharia genética para a modificação do genoma deste fungo, pode levar a construção de cepas de alta qualidade que serão fundamentais para a resolução deste problema bem como o desenvolvimento do mercado e escalonamento da produção de *Cordyceps militaris*.

## REFERÊNCIA

- ABASCAL, Kathy; YARNELL, Eric. A turkey tails polysaccharide as an immunochemotherapy agent in cancer. **Alternative & Complementary Therapies**, v. 13, n. 4, p. 178-182, 2007.
- ABERJE (Brasil). **Pesquisa identifica maior interesse do consumidor brasileiro em sustentabilidade**: Nova edição da FATitudes™ aponta aumento da busca por origem e recursos naturais durante decisão de compra. [S. l.], 7 fev. 2022. Disponível em: <https://www.aberje.com.br/pesquisa-identifica-maior-interesse-do-consumidor-brasileiro-em-sustentabilidade/>. Acesso em: 2 de maio de 2022.
- AGRO LINK (Brasil). **Besouro: *Tenebrio molitor***. [S. l.], 2022. Disponível em: [https://www.agrolink.com.br/problemas/besouro\\_2963.html](https://www.agrolink.com.br/problemas/besouro_2963.html). Acesso em: 5 jun. 2022.
- CASTRO, Thalison de. **Obtenção e análise da composição centesimal de farinha de larvas de *Tenebrio molitor***. 2021. 29 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) - Universidade Federal do Amazonas, [S. l.], 2021. Disponível em: [https://riu.ufam.edu.br/bitstream/prefix/5957/7/TCC\\_ThalisonCastro.pdf](https://riu.ufam.edu.br/bitstream/prefix/5957/7/TCC_ThalisonCastro.pdf). Acesso em: 12 nov. 2022.
- 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 do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, [S. l.], 2021.
- CHI, Myoung Hwan; PARK, Sook Young; LEE, Yong Hwan. A quick and safe method for fungal DNA extraction. **The Plant Pathology Journal**, v. 25, n. 1, p. 108-111, 2009.
- CHIU, Ching-Peng *et al.* Anti-inflammatory cerebroside from cultivated *Cordyceps militaris*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 7, p. 1540-1548, 2016.
- CHIU, Ching-Peng *et al.* Research and development of *Cordyceps* in Taiwan. **Food Science and Human Wellness**, [s. l.], n. 5, p. 1-9, 2016. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2213453016300416?token=AFDAC77EFF044EF4824B6F4800AF95D1AF4853D499F18F4A81CD07E82885905C235E1D33F388D92F534DFCF492953F86&originRegion=us-east-1&originCreation=20220607041725>. Acesso em: 10 de maio de 2022.
- DONG, Jing Z. *et al.* Composition and characterization of cordyxanthins from *Cordyceps militaris* fruit bodies. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1450-1455, 2013.
- DREASSI, Elena *et al.* Dietary fatty acids influence the growth and fatty acid composition of the yellow mealworm *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Lipids**, v. 52, n. 3, p. 285-294, 2017.
- EMBRAPA (Brasil). Cogumelos: Aspectos Nutricionais e Medicinais. **Notícias**, [S. l.], p. 1, 1 mar. 2003. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/17936771/cogumelos-aspectos-nutricionais-e-medicinais>. Acesso em: 18 abr. 2022.
- GUI, Zhong-Zheng; ZHU, Ya-Hong. Advance on cultivation, bioactive compound and pharmacological mechanism of *Cordyceps militaris*. **Sci Seri**, v. 34, p. 178-184, 2008.

GUIMARÃES, Elian. Saiba por que consumo de cogumelo tem aumentado entre brasileiros. **Agropecuário**, [S. l.], p. 1, 28 dez. 2017. Disponível em: [https://www.em.com.br/app/noticia/agropecuaria/2017/12/25/interna\\_agropecuaria,926874/saiba-por-que-consumo-de-cogumelo-tem-aumentado-entre-brasileiros.shtml](https://www.em.com.br/app/noticia/agropecuaria/2017/12/25/interna_agropecuaria,926874/saiba-por-que-consumo-de-cogumelo-tem-aumentado-entre-brasileiros.shtml). Acesso em: 2 de maio de 2022.

HEIDARI-PARSA, Shokooh. Determination of yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) nutritional value as an animal and human food supplementation. **Arthropods**, v. 7, n. 4, p. 94, 2018.

HOME SCIENCE TOOLS (Carbon St, Billings, MT). **Beetle Life Cycle Kit**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.homesciencetools.com/product/darkling-beetle-life-cycle-kit/>. Acesso em: 8 jun. 2022.

JAYACHANDRAN, Muthukumaran; XIAO, Jianbo; XU, Baojun. A critical review on health promoting benefits of edible mushrooms through gut microbiota. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 9, p. 1934, 2017.

JEONG, Jin-Woo *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.

JILIN UNIVERSITY (China). **Method for cultivating *Cordyceps* products by taking *Tenebrio molitor* (L.) larvae as carriers** 105557312A. Depósito: 13 jan. 2016. Concessão: 5 nov. 2016. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/CN105557312A/en>. Acesso em: 20 maio 2021.

JONG, S. C.; BIRMINGHAM, J. M. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. **Advances in applied microbiology**, v. 37, p. 101-134, 1992.

KAKON, A.J. *et al.* Mushroom is an Ideal Food Supplement. **J. Dhaka National Med. Coll. Hos.** 2012, [s. l.], p. 58-62, 2012. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/296820563\\_Mushroom\\_is\\_an\\_Ideal\\_Food\\_Supplement](https://www.researchgate.net/publication/296820563_Mushroom_is_an_Ideal_Food_Supplement). Acesso em: 8 maio 2022.

KANG, Chao *et al.* Optimization of large-scale culture conditions for the production of cordycepin with *Cordyceps militaris* by liquid static culture. **The scientific world journal**, v. 2014, 2014.

LIM, Hyun-Woo *et al.* Antitumor activity of *Cordyceps militaris* on human cancer cell line. **Korean Journal of Pharmacognosy**, v. 35, n. 4, p. 364-367, 2004.

LIU, Jing-yu *et al.* Immunomodulatory and antioxidative activity of *Cordyceps militaris* polysaccharides in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 594-598, 2016.

LOU, Haiwei *et al.* Advances in research on *Cordyceps militaris* degeneration. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 19, p. 7835-7841, 2019.

MANZI, Pamela *et al.* Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. **Food chemistry**, v. 65, n. 4, p. 477-482, 1999.

MARÇAL, Sara *et al.* Impact of postharvest preservation methods on nutritional value and bioactive properties of mushrooms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 418-431, 2021.

MAYELL, Mark. Maitake extracts and their therapeutic potential-a review. **Alternative Medicine Review**, v. 6, n. 1, p. 48-60, 2001.

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

MORALES-RAMOS, Juan A. *et al.* Nutritional value of pupae versus larvae of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as food for rearing *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 109, n. 2, p. 564-571, 2016.

NALLATHAMBY, Neeranjeni *et al.* Ergosterol of *Cordyceps militaris* attenuates LPS induced inflammation in BV2 microglia cells. **Natural product communications**, v. 10, n. 6, p. 1934578X1501000623, 2015.

RAVZANAADII, Nergui *et al.* Nutritional value of mealworm, *Tenebrio molitor* as food source. **International Journal of Industrial Entomology**, v. 25, n. 1, p. 93-98, 2012.

REDAÇÃO ECONOMIA SC. **Marca de produtos naturais cresce 47% e planeja ampliar área de produção para atender crescente demanda do mercado.** [S. l.], 20 maio 2021. Disponível em: <https://economiasc.com/2021/05/20/marca-de-produtos-naturais-cresce-47-e-planeja-ampliar-area-de-producao-para-atender-crescente-demanda-do-mercado/#:~:text=A%20busca%20por%20uma%20alimenta%C3%A7%C3%A3o,211%2C3%20bilh%C3%B5es%20de%20d%C3%B3lares>. Acesso em: 25 abr. 2022.

REIS, Filipa S. *et al.* Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 191-197, 2012.

SATO, Hiroki; SHIMAZU, Mitsuaki. 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.

SIEMIANOWSKA, Ewa *et al.* Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food. 2013.

SILVA, Maria de Lourdes Corradi da *et al.* Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 85-92, 2006.

SMIDERLE, Fernanda R. *et al.* Anti-inflammatory properties of the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* might be related to its linear (1→3)-β-D-glucan. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110266, 2014.

SUN, Jingbo *et al.* Extraction methods and sedative–hypnotic effects of polysaccharide and total flavonoids of *Cordyceps militaris*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 32, n. 2, p. 498-505, 2018.

TAI'AN INSTITUTE OF AGRICULTURAL SCIENCES (China). **A kind of method that *Cordyceps militaris* is cultivated using live body yellow meal worm larva as host** 108184540. Depósito: 29 jan. 2018. Concessão: 03 abr. 2020. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/CN108184540A/en?q=cn108184540>. Acesso em: 20 maio 2021.

TORRES, Andreia. **Conheça os cogumelos medicinais.** [S. l.], 11 ago. 2021. Disponível em: <https://andriatorres.com/blog/2021/8/11/como-usar-cogumelos>. Acesso em: 26 abr. 2022.

VITALE, Alimentos para pássaros. **Tabela de níveis de garantia.** Brotas, São Paulo, 2022.

- WINKLER, Daniel. Yartsa Gunbu (*Cordyceps sinensis*) and the fungal commodification of Tibet's rural economy. **Economic botany**, v. 62, n. 3, p. 291-305, 2008.
- WONG, Jack H. *et al.* Cordymin, an antifungal peptide from the medicinal fungus *Cordyceps militaris*. **Phytomedicine**, v. 18, n. 5, p. 387-392, 2011.
- YIN, Juan *et al.* Transcriptome-wide analysis reveals the progress of *Cordyceps militaris* subculture degeneration. **PLoS One**, v. 12, n. 10, p. e0186279, 2017.
- YU, Rongmin *et al.* Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris*. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 4, p. 430-436, 2007.
- ZHENG, Peng *et al.* Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. **Genome biology**, v. 12, n. 11, p. 1-22, 2012.