



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



GIOVANNA LIMA DA SILVA

**PROSPECÇÃO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EXPRESSAS POR
BASIDIOMICETOS, COM VISTAS À FUTURAS APLICAÇÕES
BIOTECNOLÓGICAS**

MANAUS
2022

GIOVANNA LIMA DA SILVA

**PROSPECÇÃO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EXPRESSAS POR
BASIDIOMICETOS, COM VISTAS À FUTURAS APLICAÇÕES
BIOTECNOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Ceci Sales Campos
Coorientadora: Larissa Ramos Chevreuil

MANAUS
2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586p Silva, Giovanna Lima da
Prospecção de enzimas proteolíticas expressas por
basidiomicetos, com vistas à futuras aplicações biotecnológicas /
Giovanna Lima da Silva . 2022
100 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Ceci Sales Campos
Coorientadora: Larissa Ramos Chevreuil
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Macrofungos. 2. Cultivo sólido. 3. Compostos bioativos. 4.
Enzimas fibrinolíticas. I. Campos, Ceci Sales. II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, por permitir a conclusão de mais uma etapa dos meus propósitos de vida rodeados de pessoas especiais.

À UFAM e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Amazonas, pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio ao longo da minha jornada.

À Dra. Larissa Chevreuil, que, em meio às adversidades que ocorreram durante o mestrado, ofereceu toda sua empatia, carinho e amparo. Muito obrigada por cada lição, levo cada aprendizado que tive para ser aplicado nos meus próximos passos, pois se conseguir ser metade da profissional que és, estarei realizada. Que um dia todo seu esforço seja recompensado. Nesse dia, estarei assistindo muito feliz.

À Dra. Ceci Sales Campos, pois mesmo sem recurso ou “em cima da bucha” procurava ajudar os seus alunos, inclusive eu, sempre pedindo algo. Obrigada por me permitir fazer parte da equipe do laboratório.

À minha melhor amiga, Daiane Barão, que está comigo em todos os momentos da minha vida, sejam eles bons ou ruins, desde 2016. Obrigada por me levar desde ao pronto-socorro até a shows maravilhosos. Espero que um dia possa retribuir.

Ao Vítor Alves, um amigo genuinamente incrível, você foi uma das pessoas fundamentais para meu ingresso e finalização do mestrado. Obrigada por sempre estar disponível, seja para me explicar um protocolo ou escutar minhas lamentações. Tenho muito orgulho de você.

Ao Paulo Cardoso, um amigo com um coração gigante que nunca disse não pra qualquer pedido meu, um profissional excelente, um grande pai e grande amigo.

Aos meus amigos Aldenora, Danielle, Jefte, Larissa, Laura, Lorena, Melanie e Victor, pessoas que tem todo o meu carinho e gratidão. Pessoas que nunca me deixaram desistir e sempre me apoiaram em tudo. Cada parte de vocês me compõe e isso torna a amizade de vocês muito especial.

Aos colegas de laboratório, Sérgio Dantas e Paula Romenya, que muitas vezes iam ao laboratório aos finais de semana para resolver algo relacionado ao meu experimento. Obrigada por toda ajuda e contribuição.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram para que esse ciclo acontecesse em minha vida.

Você foi sempre um orgulho
Tão forte e especial
Que ama o mar e seu povo
De um jeito tão natural

O mundo parece injusto
E a história vai te marcar
Mas essas marcas revelam
Teu lugar

Encontros vão te moldando
Aos poucos te transformando
E nada no mundo cala
A voz que vem num encanto
E te pergunta baixinho
Moana, quem é você
Moana tente, você vai se encontrar

Quem eu sou?
Eu sou a filha de uma ilha
E o mar chama por mim, de longe
E o meu povo eu devo conduzir
Com o passado eu aprendi
Esse legado mora aqui, me invade

Tanta coisa eu tive que enfrentar
Encarei meus medos
E o que eu tinha mesmo que aprender, na verdade
O que sou, esse instinto
Essa voz, já faz parte
Do que me atrai nessa minha vontade

Com você junto a mim posso ir bem mais longe
Eu me encontrei, agora eu sei
Eu sou Moana!

RESUMO

O uso de macrofungos (cogumelos) como alimentos e/ou medicamentos apresenta longa tradição pelos povos asiáticos, devido às suas propriedades nutricionais e medicinais. Nos últimos anos, com a ascensão tecnológica, muitas moléculas biologicamente ativas isoladas de macrofungos têm sido avaliadas quanto à sua eficiência sobre o tratamento de algumas doenças e/ou outras aplicações biotecnológicas. Contudo, no cenário Amazônico, pouco se conhece acerca dos macrofungos, bem como seu potencial em produzir moléculas bioativas. Assim, esse trabalho objetivou prospectar proteases e enzimas fibrinolíticas nos micélios de macrofungos, quando cultivados em diferentes meios de cultura, de modo a verificar qual espécie e/ou linhagem apresenta maior potencial de síntese dessas proteínas, visando futuros estudos envolvendo produção e aplicação dessas moléculas na área da saúde. Os macrofungos *Auricularia* sp., *Ganoderma lucidum*, *G. tropicum*, *Grifola frondosa*, *Lentinus strigosus*, *Macrocybe* sp. e linhagens de *Pleurotus ostreatus* (474, 542 e 885) foram cultivados em meio ágar-aveia (AA), ágar batata dextrose (BDA), ágar caseína (AC), ágar Czapek Dox (ACD), ágar farinha de soja (AFS), ágar malte (AM), MFI, MILK e MYSA. As hifas fúngicas foram submetidas à extração proteica e, posteriormente, realizados ensaios de determinação de atividades proteolíticas e fibrinolíticas. AA foi o meio de cultivo mais favorável ao crescimento da maioria das espécies fúngicas estudadas, principalmente, *Pleurotus ostreatus* 474 e *Lentinus strigosus*, atingindo crescimento máximo após quatro e cinco dias de cultivo, respectivamente. *Auricularia* sp. quando cultivada em AFS apresentou as maiores atividades de serino-proteases e proteases totais. Enquanto, *P. ostreatus* 885 exibiu maior atividade de proteases cisteínicas. O extrato de *Macrocybe* sp. em AFS exibiu a maior atividade fibrinolítica. Diante dos resultados obtidos, sugere-se que o meio AA foi o mais favorável para crescimento das espécies. Adicionalmente, todos os meios induziram a produção de enzimas proteolíticas, contudo, a produção de proteases fibrinolíticas foi promissora nos meios AFS, AM e MFI. Enquanto as espécies *Lentinus strigosus* e *Macrocybe* sp. destacaram-se pela produção de enzimas fibrinolíticas.

Palavras-chave: Macrofungos. Cultivo sólido. Compostos bioativos. Enzimas fibrinolíticas.

ABSTRACT

The use of macrofungi (mushrooms) as food and/or medicine has a long tradition by Asian peoples, due to their nutritional and medicinal properties. In recent years, with the rise of technology, many biologically active molecules isolated from macrofungi have been evaluated for their efficiency in the treatment of some diseases and/or other biotechnological applications. However, in the Amazon scenario, little is known about macrofungi, as well as their potential to produce bioactive molecules. Thus, this work aimed to prospect proteases and fibrinolytic enzymes in macrofungal mycelia, when cultivated in different culture media, in order to verify which species and/or strain has the greatest potential for synthesis of these proteins, aiming at future studies involving production and application of these molecules in the health area. The macrofungi *Auricularia* sp., *Ganoderma lucidum*, *G. tropicum*, *Grifola frondosa*, *Lentinus strigosus*, *Macrocybe* sp., and *Pleurotus ostreatus* strains (474, 542 and 885) were cultivated in oat agar (AA), potato dextrose agar (BDA), casein agar (AC), Czapek Dox agar (ACD), soy flour agar (AFS), malt agar (AM), MFI, MILK and MYSA. The fungal hyphae were submitted to protein extraction and assays were performed to determine proteolytic and fibrinolytic activities. MA was the most favorable culture medium for the growth of the fungal species studied, mainly *Pleurotus ostreatus* 474 and *Lentinus strigosus*, reaching maximum growth after four and five days of cultivation, respectively. *Auricularia* sp. when cultivated in AFS it showed the highest serine proteases and total proteases activities. While, *P. ostreatus* 542 exhibited higher activity of cysteine proteases. *Macrocybe* sp. in AFS exhibited the highest fibrinolytic activity. Therefore, it is suggested that the AA medium was the most favorable for the growth of the species. In addition, all media induced the production of proteolytic enzymes, however, the production of fibrinolytic proteases was promising in AFS, AM and MFI. While the species *Lentinus strigosus* and *Macrocybe* sp. stood out for the production of fibrinolytic enzymes.

Keywords: Macrofungi. Solid culture. Bioactive compounds. Fibrinolytic enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Inibidores atuantes no processo de fibrinólise. Inibidor do plasminogênio tecidual (t-PA), inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI)	29
Figura 2 - Cascata de coagulação sanguínea clássica com a via extrínseca e intrínseca.....	31
Figura 3 - Cascata de coagulação baseada em superfícies celulares.....	32
Figura 4 - Representação dos pontos de medição do crescimento fúngico em placas de Petri..	35
Figura 5 - Técnica de microcultivo utilizando papel-filtro, lâminas cruzadas, meio BDA e lamínulas	36
Figura 6 - Crescimento micelial de <i>Auricularia</i> sp., <i>G. lucidum</i> , <i>G. tropicum</i> , <i>G. frondosa</i> , <i>L. strigosus</i> , <i>Macrocybe</i> sp. e linhagens de <i>P. ostreatus</i> 474, 542 e 885 em diferentes meios de cultura, incubados à 25°C, durante 15 dias	44
Figura 7 - Velocidade de Crescimento Micelial (VCM) de <i>Auricularia</i> sp., <i>G. lucidum</i> , <i>G. tropicum</i> , <i>G. frondosa</i> , <i>L. strigosus</i> , <i>Macrocybe</i> sp. e linhagens de <i>P. ostreatus</i> 474, 542 e 885 em diferentes meios de cultura, incubados à 25°C, durante 15 dias	47
Figura 8 - Análise de Componentes Principais (PCA) a partir do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) das espécies em diferentes meios de cultura	51
Figura 9 - Correlação entre os teores de carbono, nitrogênio e índice de velocidade de crescimento micelial, após 15 dias de cultivo de diferentes macrofungos.....	54
Figura 10 - Características morfológicas dos micélios de <i>Auricularia</i> sp. cultivado em diferentes meios de cultura	55
Figura 11 - Características morfológicas dos micélios de <i>G. lucidum</i> cultivado em diferentes meios de cultura	55
Figura 12 - Características morfológicas dos micélios de <i>G. tropicum</i> cultivado em diferentes meios de cultura	56
Figura 13 - Características morfológicas dos micélios de <i>Grifola frondosa</i> cultivado em diferentes meios de cultura.....	57
Figura 14 - Características morfológicas dos micélios de <i>Lentinus strigosus</i> cultivado em diferentes meios de cultura.....	58
Figura 15 - Características morfológicas dos micélios de <i>P. ostreatus</i> 474 cultivado em diferentes meios de cultura	59
Figura 16 - Características morfológicas dos micélios de <i>P. ostreatus</i> 542 cultivado em diferentes meios de cultura	60
Figura 17 - Características morfológicas dos micélios de <i>P. ostreatus</i> 885 cultivado em diferentes meios de cultura	60
Figura 18 - Características morfológicas dos micélios de <i>Macrocybe</i> sp. cultivado em diferentes meios de cultura	61
Figura 19 - Análise de comparação de médias por agrupamento de crescimento micelial, índice de velocidade de crescimento e vigor micelial.....	62
Figura 20 - Micromorfologia dos micélios das espécies de <i>Auricularia</i> sp., <i>G. lucidum</i> , <i>G. tropicum</i> , <i>G. frondosa</i> , <i>L. strigosus</i> , <i>P. ostreatus</i> 474, 542 e 885, e <i>Macrocybe</i> sp. em diferentes meios de cultura. <i>Auricularia</i> sp. – AC (a, 100x); <i>G. lucidum</i> – MYSA (b, 40x); <i>G. tropicum</i> – ACD e MYSA (c, d, 40x); <i>G. frondosa</i> – BDA (e, 40x); <i>L. strigosus</i> – MYSA (f, 100x); <i>P. ostreatus</i> 474 – MFI (g, 100x); <i>P. ostreatus</i> 542 – AA e AFS (h, i, 40x); <i>P. ostreatus</i> 885 – AA, MYSA (j, k, 40x); <i>Macrocybe</i> sp. – MILK (l, 40x).....	63
Figura 21 - Comparação entre a quantificação de proteínas das amostras no meio de cultura pelo método de (a) Bradford e (b) Lowry	68

Figura 22 – Atividade proteolítica em placa observada em 16 e 24 horas de incubação, de extratos proteicos proveniente da biomassa micelial de basidiomicetos cultivados em diferentes condições de meios de cultura.....	74
Figura 23 - Correlação Linear de Pearson dos extratos proteicos das espécies com atividade fibrinolítica. (a) <i>Auricularia</i> sp., (b) <i>G. tropicum</i> , (c) <i>L. strigosus</i> , (d) <i>Macrocybe</i> sp. e (e) <i>P. ostreatus</i> 542.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Moléculas bioativas oriundas de diferentes espécies de macrofungos basidiomicetos	23
Tabela 2 - Meios de cultura utilizados na avaliação do crescimento micelial de macrofungos	34
Tabela 3 - Teores de carbono, nitrogênio e relação C/N dos meios de cultura	52
Tabela 4 - Teor proteico dos extratos provenientes da biomassa micelial de basidiomicetos, cultivados em diferentes meios de cultura, a partir da quantificação pelo método de Bradford	66
Tabela 5 - Teor proteico dos extratos provenientes da biomassa micelial de basidiomicetos, cultivados em diferentes meios de cultura, a partir da quantificação pelo método de Lowry	67
Tabela 6 - Atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato, em extratos proteicos da biomassa micelial de basidiomicetos cultivados em diferentes condições de meios de cultura	72
Tabela 7 - Atividade proteolítica utilizando caseína como substrato, em extratos proteicos da biomassa micelial de basidiomicetos cultivados em diferentes condições de meios de cultura	73
Tabela 8 - Atividade de serino-proteases utilizando N-benzoil-arginina p-nitroanilida (BApNA) nos extratos proteicos provenientes da biomassa micelial de basidiomicetos, cultivados em diferentes condições de meios de cultura	77
Tabela 9 - Atividade de serino-proteases utilizando benzoil-tirosina p-nitroanilida (BTpNA) nos extratos proteicos provenientes da biomassa micelial de basidiomicetos, cultivados em diferentes condições de meios de cultura	78
Tabela 10 - Atividade de cisteíno-proteases utilizando N α -benzoil-DL-arginina- β -naftilamida (BANA) nos extratos proteicos provenientes da biomassa micelial de basidiomicetos, cultivados em diferentes condições de meios de cultura	79
Tabela 11 - Atividade fibrinolítica após 24 h de incubação dos extratos proteicos provenientes da biomassa micelial de basidiomicetos, cultivados em diferentes meios de cultura	81

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo Geral.....	16
3.2. Objetivos Específicos	16
4. REFERENCIAL TEÓRICO	17
4.1. Macrofungos	17
4.1.1. Cultivo de macrofungos	18
4.1.2. Potencial farmacológico dos macrofungos	21
4.2. Atividade enzimática	25
4.2.1. Enzimas proteolíticas	26
4.2.2. Enzimas fibrinolíticas e fibrinólise	28
4.2.2.3. Coagulação sanguínea	30
5. METODOLOGIA	34
5.1. Material biológico.....	34
5.2. Cultivo em placa	34
5.2.1. Avaliação do crescimento fúngico	35
5.2.2. Caracterização morfológica dos fungos	35
5.3. Avaliação da composição de carbono e nitrogênio dos meios de cultura.....	36
5.3.1. Carbono (Walkley-Black)	36
5.3.2. Nitrogênio total (Kjeldahl).....	37
5.4. Obtenção dos extratos proteicos e quantificação de proteínas.....	37
5.4.1. Bradford	37
5.4.2. Lowry	38
5.5. Determinação das atividades proteolíticas.....	38
5.5.1. Proteases totais utilizando azocaseína.....	38
5.5.2. Proteases totais utilizando caseína	39
5.5.3. Proteases totais em placas de caseína.....	39
5.5.4. Serino-proteases	39
5.5.5. Cisteino-proteases	40
5.5.6. Enzimas fibrinolíticas.....	40
5.6. Delineamento experimental e análise estatística.....	40
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42

6.1.	Crescimento fúngico	42
6.1.1.	Quantificação de carbono e nitrogênio nos meios de cultura.....	51
6.1.2.	Análise da caracterização morfológica	54
6.2.	Quantificação de proteínas.....	64
6.3.	Atividades enzimáticas	69
6.3.1.	Atividade proteolítica total.....	69
6.3.2.	Atividade de serino e cisteíno-proteases	75
6.3.3.	Atividade fibrinolítica	80
7.	CONCLUSÃO	85
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1. INTRODUÇÃO

Pertencente aos filos Basidiomycota e Ascomycota os macrofungos, também conhecidos como cogumelos, atuam como parasitas em plantas e animais para absorção de nutrientes necessários para o seu desenvolvimento (EL-MARADNY *et al.*, 2021). Atualmente, aproximadamente 15.000 espécies já foram catalogadas, dentre estas, 2.000 são comestíveis e destacam-se por serem ricas em micronutrientes, proteínas, vitaminas e fibras (GOVORUSHKO *et al.*, 2019; BLUMFIELD *et al.*, 2020).

Os macrofungos são considerados um dos principais alimentos saudáveis utilizados pela próxima geração, pois oferecem alto teor de fibra dietética, baixo nível de gordura e similaridade com produtos cárneos (DAS *et al.*, 2021). Esses fatores promovem a procura por macrofungos, principalmente, pelo aumento na busca de alimentos com alto valor nutricional e funcional disponíveis no mercado, sendo considerados iguarias nutritivas e saborosas (MA *et al.*, 2018; SALES-CAMPOS, 2021).

A demanda por macrofungos requer um aumento na sua produção, contudo, o cultivo desses fungos é uma etapa crítica, uma vez que diversos fatores podem afetar esse processo, como umidade, temperatura, luminosidade, tipo de substrato, fontes de carbono e nitrogênio, resultando em impactos significativos no seu desenvolvimento e rendimento (ZERVAKIS *et al.*, 2001; NGUYEN; RANAMUKHAARACHCHI, 2020). Adicionalmente, o substrato ideal, além de favorecer a produção do fungo, pode estimular a produção de moléculas específicas (JASIŃSKA *et al.*, 2012).

Neste contexto, os macrofungos apresentam diversas aplicações, principalmente pela sua capacidade de produção enzimática durante a bioconversão do substrato de crescimento fúngico (KAŁA *et al.*, 2020). Tais enzimas são amplamente exploradas pela indústria, com previsão de crescimento entre 4,7% – 5,7% ao ano, sendo aplicadas na produção de fármacos, alimentos, ração, detergente, tecidos e couro (ANTONIO *et al.*, 2018; GONÇALVES; FONSECA, 2018).

As enzimas provenientes de fontes microbianas destacam-se em relação às enzimas obtidas a partir de fontes vegetais e animais, devido à sua alta capacidade de produção, principalmente quando produzidas por macrofungos, uma vez que estes organismos apresentam elevado potencial de degradação de resíduos ligninolíticos (SURENDRAN *et al.*, 2021). Dentre as enzimas sintetizadas pelos macrofungos, as

hidrolases estão em maior número, sendo as proteases as mais exploradas, em razão da sua ampla aplicação em diferentes setores industriais (DELMASCHIO, 2018).

As proteases, em particular, atuam na hidrólise das ligações peptídicas de proteínas, apresentando especificidade e seletividade na interação com essas macromoléculas e, podem ser classificadas com base nos principais resíduos de aminoácidos que compõe o seu sítio ativo, onde as cisteíno-, serino-, aspártico-, metalo-proteases são consideradas as principais classes (AGBOWURO *et al.*, 2018). Essas enzimas atuam no metabolismo, crescimento celular, diferenciação e sinalização celular, e podem agir como anti-hipertensivo, antimicrobiano, anticancerígeno, anti-inflamatório (DOS SANTOS; SATO, 2018).

Dentre as proteases, destacam-se àquelas que apresentam potencial fibrinolítico, uma vez que possuem a capacidade de degradar coágulos de fibrina (CLEMENTINO *et al.*, 2017). Logo, são capazes de desfazer coágulos a partir da fibrinólise dos trombos sendo, portanto, compostos fundamentais no tratamento de trombose (ROVATI *et al.*, 2010). Neste caso, quando a cascata de coagulação é ativada, zimogênios também são ativados, resultando no coágulo de fibrina e, havendo um desequilíbrio na hemostasia corporal, a ativação é prolongada, resultando na trombose patológica, uma vez que o trombo possui excesso de fibrina, impedindo o fluxo sanguíneo no local (TUZOVIC *et al.*, 2018). Dessa forma, as enzimas fibrinolíticas irão atuar na dissolução do coágulo sanguíneo (MINE; KWAN WONG; JIANG, 2005).

Nesse sentido, considerando o potencial de produção de proteases por macrofungos, o presente trabalho objetivou avaliar o crescimento micelial de macrofungos comestíveis e medicinais quando cultivados em diferentes meios de cultura, bem como avaliar o potencial de produção de proteases, com ênfase nas enzimas fibrinolíticas, por esses fungos, a fim de otimizar a produção dessas enzimas, com vistas futuras ao tratamento de doenças cardiovasculares.

2. JUSTIFICATIVA

Os processos biológicos e químicos envolvidos na degradação da matéria orgânica pelos fungos são fundamentais para as indústrias, seja na produção de medicamentos, alimentos ou até mesmo em sistemas agrofloretais, isso porque possibilitam a utilização de resíduos em sua forma natural e, a partir da bioconversão desses materiais pelos fungos, há a geração de produtos de valor agregado, empregando processos biotecnológicos de baixo custo de produção. Dentre esses processos biológicos têm-se a utilização de fungos pertencentes ao filo Basidiomycota, visto serem eficientes produtores de metabólitos bioativos com amplas aplicações, sendo esta produção diretamente influenciada pelas condições de cultivo. Assim, com a otimização do processo de cultivo é possível maximizar o rendimento da produção de metabólitos específicos, reduzindo custos de produção.

No que diz respeito aos compostos bioativos produzidos por macrofungos, destacam-se as proteínas, incluindo proteases (enzimas proteolíticas) e seus inibidores. As proteases, em particular, são utilizadas pelas indústrias de detergentes, tecidos, alimentos e fármacos, como uma alternativa a catalizadores sintéticos e, representam 90% do mercado global de enzimas hidrolíticas. Como exemplo de aplicação na indústria farmacêutica, tem-se a utilização de enzimas fibrinolíticas, que atuam na degradação de coágulos sanguíneos, sendo uma alternativa potencial para o tratamento de distúrbios como trombose e hemofilia, uma vez que os fármacos utilizados atualmente possuem diversos efeitos colaterais. Diante do exposto, estudos envolvendo a prospecção de proteases totais e enzimas fibrinolíticas, produzidas por diferentes basidiomicetos torna-se essencial, de modo a verificar a influência da utilização de diferentes meios de cultura no crescimento micelial e rendimento destas moléculas alvo, para futuros estudos envolvendo aplicações farmacológicas dessas enzimas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Prospectar enzimas proteolíticas e fibrinolíticas em biomassas miceliais de macrofungos comestíveis e/ou medicinais, quando cultivados em diferentes meios de cultura.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento micelial de macrofungos em diferentes meios de cultura;
- Avaliar a velocidade de crescimento micelial dos macrofungos em diferentes meios de cultura;
- Determinar os teores de carbono e nitrogênio dos meios de cultura;
- Descrever as características morfológicas dos micélios dos macrofungos cultivados em diferentes meios de cultura;
- Extrair e quantificar proteínas dos micélios;
- Detectar a atividade proteolítica utilizando azocaseína, caseína e leite desnatado como substratos;
- Detectar a atividade de serino- e cisteíno-proteases nos extratos proteicos;
- Detectar a atividade fibrinolítica nos extratos proteicos.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. Macrofungos

Os macrofungos, conhecidos popularmente como cogumelos, pertencem aos filos Ascomycota e Basidiomycota e apresentam basidiocarpo distinto, o qual pode ser classificado de acordo com o seu local de desenvolvimento em: epígeo (acima do solo) ou hipógeno (subterrâneo) (ABDELSHAFY *et al.*, 2021). De forma geral, são organismos incapazes de sintetizar seu próprio alimento devido à ausência de clorofila e celulose e, por isso, necessitam atuar como parasitas de plantas e animais para a absorção dos nutrientes necessários para o seu desenvolvimento. Dada essa característica, são considerados organismos decompositores da natureza, tornando-os um potencial biodegradador e bioconversor de resíduos agroindustriais (EL-MARADNY *et al.*, 2021).

O uso de macrofungos remonta há mais de 5 mil anos e, até o momento, já foram catalogadas em todo mundo, aproximadamente, 15.000 espécies, dentre estas, 650 são categorizados como medicinais e 2.000 como comestíveis (GOVORUSHKO *et al.*, 2019; EL-MARADNY *et al.*, 2021). Adicionalmente, para que seja considerado um macrofungo comestível, precisa cumprir alguns critérios como sabor, aroma esperado e ausência de efeitos tóxicos aos humanos. Devido a isso, apenas 100 espécies de macrofungos comestíveis são aptas para serem cultivadas visando retorno econômico, no entanto, somente 10 espécies são produzidas em escala industrial (ISLAM; GANESAN; XU, 2019).

No âmbito econômico, a previsão para o mercado global do cultivo de cogumelos é que deverá atingir mais de US\$ 20,4 bilhões em 2026. Neste cenário, é importante destacar que sistemas agroecológicos associam a produtividade agrícola às perspectivas ecológicas, visando a produção de alimentos com baixo impacto ambiental, além de envolver a participação da comunidade de forma assídua em sistemas globais e cadeias de suprimentos pela interação humana com o mundo natural (JASINSKA; SIWULSKI, 2021).

Desta forma, o cultivo de cogumelos insere-se no contexto de sistemas agroecológicos, visto que, comumente utiliza-se resíduos agroindustriais como substrato de cultivo, contribuindo para a redução de possíveis impactos ambientais promovidos pelo descarte inadequado desses resíduos, além de resultar em um produto de alto valor

agregado e alto valor nutritivo (LEAL *et al.*, 2021). Ainda nessa temática, na Amazônia há uma vasta biodiversidade, incluindo de macrofungos, que por sua adaptabilidade às condições de crescimento tornam-se promissores para integrar a cadeia produtiva, promovendo desenvolvimento econômico para os residentes da região (AGUIAR *et al.*, 2022; FRANÇA *et al.*, 2018).

No que diz respeito à produção mundial de macrofungos comestíveis no mundo, 85% se referem a 5 gêneros: *Lentinus* (22%), *Pleurotus* (19%), *Auricularia* (18%), *Agaricus* (15%) e *Flammulina* (11%) (JABŁOŃSKA-RYŚ *et al.*, 2019). Dentre essas espécies, *Lentinus crinitus* apresenta distribuição neotropical e produz enzimas como celulase, lacase e xilanase em condições de cultivo e substratos variáveis, permitindo que essa espécie atue como biorremediador, degradando corantes e compostos organoclorados (SANTANA *et al.*, 2018). *Lentinus squarrosulus*, por sua vez, foi relatado que seus extratos possuem atividade frente às células de câncer de pulmão humano, evidenciando o potencial anticancerígeno dessa espécie (PRATEEP *et al.*, 2017). Além disso, pesquisas indicam que moléculas obtidas a partir de *Auricularia* sp. apresentam benefícios à saúde como antitumoral, antioxidante, hipoglicemiante e imunoestimulante (PAK *et al.*, 2021).

Pleurotus spp. apresentam como principais características a capacidade de degradar resíduos lignocelulósicos, permitindo seu crescimento em uma grande diversidade de resíduos agrícolas, além da adaptabilidade a ambientes variados (KAPAHI; SACHDEVA, 2017). Essa propriedade está associada às concentrações elevadas de enzimas como manganês-peroxidase (MnP) e lacase, como, também, às enzimas ativadas por carboidratos, que irão disponibilizar os carboidratos resultantes da reação de degradação dos resíduos lignocelulósicos, para que sejam utilizados no desenvolvimento e reprodução do macrofungo (XIE *et al.*, 2018).

4.1.1. Cultivo de macrofungos

O cultivo sólido de cogumelos, normalmente, envolve substratos lignocelulósicos provenientes de práticas agroindustriais. Contudo, é possível estabelecer o cultivo *in vitro* de macrofungos em laboratório, através de material nutriente chamado meio de cultura, cujo objetivo é fornecer carbono, enxofre, nitrogênio e fósforo e outros compostos orgânicos para o crescimento do microrganismo (TORTORA; CASE; FUNKE, 2016).

O cultivo de micélios em meio sintético é uma abordagem favorável para a obtenção de biomassa fúngica. Além da presença de polímeros como quitina, celulose e proteína nos micélios, a capacidade dos fungos em biocatalisar o substrato, promovendo a liberação de compostos bioativos, os tornam atraentes como suplementos alimentares, nutracêuticos ou biofortificados pela bioacumulação de micronutrientes, além de atuarem na modulação do sistema imunológico e equilíbrio nos níveis de açúcar no sangue (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022; RATHORE *et al.*, 2019).

Em cultivos sólidos utilizando resíduos agroindustriais, estudos investigam as propriedades mecânicas dos micélios fúngicos, como resistência e rigidez, relevantes para uma variedade de aplicações dos compósitos para a produção de materiais ecologicamente corretos e economicamente sustentáveis, fornecendo insumos para produção de calçados, embalagens, isolamento térmico, além de áreas médicas e biotecnológicas (SILVERMAN; CAO; COBB, 2020; SCHRITT; VIDI; PLEISSNER, 2021; VELEZ *et al.*, 2019).

O crescimento do micélio fúngico consiste em uma estrutura porosa com uma rede de biopolímeros, desenvolvido a partir da simbiose com o substrato, no qual seu comportamento é determinado pelos filamentos tubulares formados dentro de redes, chamados de hifas. A expansão apical das hifas ocorre a partir de um esporo ou inóculo, em seguida ocorre sua fase isotrópica, que leva a ramificações aleatórias formando colônias. Também, há a fusão das hifas, formando uma estrutura de rede complexa em que a superfície externa é rica em beta-glucanas, e a camada interna composta por microfibrilas de quitina (HANEEF; *et al.*, 2017; ISLAM *et al.*, 2017).

Desta forma, a escolha do substrato para o crescimento do fungo é de extrema importância para o seu desenvolvimento, pois as trocas gasosas afetam a atividade enzimática, com implicações diretas sobre a velocidade de crescimento micelial e produção de biomoléculas (ROSSI; MONTEIRO; MACHADO, 2001). Além disso, quanto maior o tempo de incubação para atingir o crescimento da espécie, maior a chance de contaminação do cultivo (ATHAYDE *et al.*, 2010).

Assim, o melhor meio para produção do fungo é aquele em que o mesmo cresce mais rápido e as hifas se desenvolvem a ponto de formar o micélio, visto que, o substrato ideal pode otimizar a produção e rendimento do microrganismo (JASIŃSKA *et al.*, 2012). Assim, para o cultivo de diferentes espécies de fungos em meio sólido em placas de Petri,

é necessário avaliar diferentes tipos de substratos, vigor, crescimento radial e velocidade de crescimento (KHAN *et al.*, 2012).

Considerando que cada microrganismo apresenta exigências diferentes às condições de cultivo, ainda não foi possível estabelecer um meio de cultura ideal para a produção máxima de proteases microbiana, logo, desenvolver processos otimizados de cultivo, através da manipulação de fatores físico-químicos é importante para aumentar o rendimento enzimático (LADEIRA *et al.*, 2010). Adicionalmente, o meio de cultura é um fator importante a ser destacado, uma vez que, a partir da penetração do micélio no substrato por pressão física e secreção enzimática, ocorre a decomposição de polímeros biológicos em nutrientes de fácil absorção e transporte, gerando metabólitos com diversas aplicações biotecnológicas. Por conseguinte, os fungos são capazes de controlar a produção enzimática de acordo com as suas necessidades e disponibilidade de substratos. Assim, relatos na literatura indicam quatro mecanismos que podem regular a síntese e a secreção de proteases (GEISSELER; HORWATH, 2008):

1. Substrato específico presente no meio de crescimento pode induzir a secreção de proteases;
2. A produção enzimática pode ocorrer permitindo que as enzimas sejam secretadas, independente do substrato;
3. A alta concentração dos produtos finais como NH_4^+ , aminoácidos e fontes de carbono podem inibir a produção de proteases;
4. Baixas concentrações de nitrogênio, carbono ou enxofre no meio de crescimento podem aumentar a produção enzimática.

Além da influência da composição do substrato no crescimento microbiano, também é possível citar o pH, que ao se encontrar fora da faixa de crescimento ideal para a espécie pode resultar em um “*spawn*” (inóculo adaptado ao meio de cultivo sólido) pouco vigoroso ou mesmo sem desenvolvimento do basidiocarpo; temperatura elevada, podendo ocasionar desidratação rápida do macrofungo; luminosidade, que está associada à modulação de genes relacionados ao estresse fúngico, tornando-os mais tolerantes às diversas condições de estresse celular e osmótico; e radiação UV-B, na qual a luz é utilizada como fonte de informação alertando o organismo sobre as condições de estresse (DIAS *et al.*, 2020; HANEED; *et al.*, 2017; KUMAR; MISHRA; KAUR, 2019; RATHORE *et al.*, 2019; TORTORA; CASE; FUNKE, 2016).

É importante ressaltar que, a taxa de crescimento lenta está entre um dos principais problemas no aumento do custo de produção, tornando-se promissor estudar e desenvolver novos substratos, seja sintético ou não, visando aumentar a taxa e a

velocidade de crescimento, além da densidade micelial dos macrofungos (BAE *et al.*, 2021; RÓZSA; MĂNIUȚIU; EGYED 2021).

4.1.2. Potencial farmacológico dos macrofungos

Os macrofungos se destacam por serem ricos em micronutrientes, proteínas, vitaminas e fibras, além de serem uma das raras fontes naturais de vitamina B12 (BLUMFIELD *et al.*, 2020). Dentre esses, as espécies selvagens, em particular, são exploradas por países asiáticos há tempos, seja para fins alimentícios ou medicinais (BUTKHUP; SAMAPPITO; JORJONG, 2018). Ademais, estudos demonstram que os macrofungos selvagens representam uma fonte maior de proteínas e baixo teor de gordura, quando comparados aos cogumelos comerciais (AO; DEB, 2019).

Segundo Das *et al.* (2021), os macrofungos são considerados um dos alimentos saudáveis da próxima geração, principalmente pela compatibilidade com produtos cárneos, sabor umami, textura fibrosa, alto teor de fibra dietética e baixo nível de gordura. Vale ressaltar que, o número de consumidores interessados em alimentos saudáveis, com baixo teor de sal e gordura, alto valor nutricional e que promovem bem-estar é crescente, incentivando o consumo de fungos (MA *et al.*, 2018).

Além do potencial nutricional, indústrias farmacêuticas e alimentícias exploram os extratos de macrofungos devido às suas propriedades biológicas, incluindo atividades imunomoduladoras, antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e antioxidantes (tabela 1) (KAŁA *et al.*, 2020). Pesquisas indicam que diversas dessas atividades estão relacionadas às altas concentrações de compostos fenólicos, contudo, os macrofungos também possuem compostos orgânicos com alto valor medicinal, como lectinas, terpenóides, polissacarídeos e ergosteróis (ABDELSHAFY *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2021b).

A literatura científica relata diversas aplicações de espécies do gênero *Pleurotus* na área da saúde, evidenciando o seu potencial como imunomodulador, anticancerígeno, antioxidante e antiviral (KRAKOWSKA *et al.*, 2020). *Pleurotus ostreatus* é uma das espécies mais estudadas e, pesquisas recentes, demonstram a produção de grandes quantidades de β -glucano, um polissacarídeo capaz de prevenir a resistência à insulina, hipertensão e obesidade (DICKS; ELLINGER, 2020). Do mesmo modo, há relatos de que

espécies desse gênero sintetizam peptídeos, proteínas, terpenóides, ésteres de ácidos graxos e polifenóis com atividade biológica (GOLAK-SIWULSKA *et al.*, 2018).

Tabela 1: Moléculas bioativas oriundas de diferentes espécies de macrofungos basidiomicetos

Espécie	Molécula bioativa	Atividade Biológica	Referência
<i>Agaricus bisporus</i>	Lectinas	Facilita a secreção de insulina	Lakhanpal; Rana (2005)
<i>Auricularia auricularia</i>	Polissacarídeos	Atividade antitumoral	Lakhanpal; Rana (2005)
<i>Flammulina velutipes</i>	Enoquipodina	Antimicrobiana	Duru; Çayan (2015)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Triterpenóides	Supressão da hiperglicemia pós-prandial	Ma; Hsieh; Chen (2015)
<i>Grifola frondosa</i>	Polissacarídeos e lectinas	Atuam como agente anticancerígeno e reduzem o colesterol	Lakhanpal; Rana (2005)
<i>Hericiium erinaceus</i>	Erinacina A	Antibacteriana	Duru; Çayan (2015)
<i>Lentinus edodes</i>	Lentinana	Atividade anticancerígena	Zhang <i>et al.</i> (2011)
<i>Macrocybe lobayensis</i>	Compostos fenólicos	Atividade antibacteriana	Khatua <i>et al.</i> (2017)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Polissacarídeos	Atividade imunomoduladora	Sun; Liu (2009)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Ergosterol	Atividade contra amastigotas de <i>Leishmania</i> sp.	Correa <i>et al.</i> , (2006)
<i>Trametes versicolor</i>	Ácido trametenólico	Atividade antileishmania	Leliebre-Lara <i>et al.</i> (2016)

Pleurotus ostreatus também é bastante relatado quanto à produção de nanopartículas ecológicas, não tóxicas e biosseguras, sendo as nanopartículas de prata (AgNPs) as mais sintetizadas e com diversas aplicações farmacológicas, incluindo encapsulamento de moléculas de antibióticos (OWAID, 2019). Além da aplicação na saúde, esse fungo apresenta potencial de micorremediação de metais pesados, devido à alta tolerância a metais e propriedade de bioacumulação em seu basidiocarpo (KAPAH; SACHDEVA, 2017). *Pleurotus eryngii*, por sua vez, apresenta propriedades medicinais, incluindo atividades antivirais, antitumorais, antioxidantes e imunomoduladora (VETVICKA *et al.*, 2019; DU *et al.*, 2020)

Espécies pertencentes ao gênero *Lentinus* são conhecidas na medicina tradicional por seus efeitos terapêuticos abrangendo atividades imunomoduladoras, antibacterianas, antitumorais, antivirais e antioxidantes (LAU; ABDULLAH, 2017; LÓPEZ *et al.*, 2020). Essas atividades remetem à uma variedade de biomoléculas, incluindo os polissacarídeos que, normalmente, são usados como fibras solúveis com funções medicinais sendo úteis na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (LÓPEZ *et al.*, 2020).

Relatos na literatura demonstram o efeito supressor do apetite em camundongos sob efeito de extratos etanólicos provenientes do basidiocarpo de *Lentinus strigosus*, confirmando seu potencial fitoterápico na prevenção da obesidade (AQUINO; DULAY; KALAW, 2020). Adicionalmente, extratos metanólicos de *L. strigosus* apresentaram atividade inibitória frente ao crescimento de *Aspergillus flavus* (SRIKRAM; PHALAKHUN, 2019).

Dentre as espécies exploradas quanto ao potencial medicinal destaca-se *Ganoderma lucidum*, sendo bastante utilizada como fitoterápico em países asiáticos há mais de 2 mil anos, produzindo compostos bioativos como triterpenóide, polissacarídeos, esteróis e peptídeos (LU *et al.*, 2020). Evidências na literatura indicam que seus triterpenóides são capazes de inibir, *in vitro*, a infecção viral da dengue, além da atividade antiviral frente a outros patógenos, incluindo o vírus da imunodeficiência humana (BHARADWAJ *et al.*, 2019).

Suwannarach *et al.* (2020), ao analisarem extratos de *Ganoderma lucidum*, encontraram compostos como ácido β -ganodérico, ganodermanodiol, ganodermanontriol e lucidomol B, que apresentaram efeitos inibitórios frente à protease do HIV. Além disso, os polissacarídeos dessa espécie possuem atividade antiproteolítica contra *Pseudomonas*

aeruginosa, uma bactéria de espectro estendido e multirresistente a drogas, assim como, regulam a expressão de proteínas associadas à apoptose, através da inibição do apoptose neuronal (EL ZAWAWY; ALI, 2016).

4.2. Atividade enzimática

Todas as células vivas possuem enzimas que resultam da junção de resíduos de aminoácidos e atuam como catalisadores de processos bioquímicos, desempenhando funções essenciais no metabolismo celular, principalmente nas vias catabólicas e anabólicas (NELSON; COX, 2018). Adicionalmente, as enzimas possuem a capacidade de degradar matéria orgânica formando novos produtos, o que as torna um biocatalisador alternativo aos processos químicos convencionais, particularmente, pela propriedade de catalisar reações com alta especificidade, baixa formação de subproduto indesejável e atuação em temperaturas amenas, levando à redução do custo do processo (FLORENCIO; BADINO; FARINAS, 2017; QUEIROZ; SOUSA, 2020).

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), as enzimas são classificadas de acordo com a reação que catalisam, estando divididas em oxirredutase, transferase, hidrolase, liase, isomerase, ligase e translocase (AMIDI *et al.*, 2018). Do mesmo modo, são classificadas em uma série de quatro números, onde o primeiro número corresponde à categoria da enzima; o segundo é relacionado às informações sobre o substrato que catalisa; o terceiro indica o tipo de reação específica; e o quarto corresponde ao número de série específico para cada enzima (ANN, 2019).

Com alta aplicabilidade biotecnológica, a previsão para o mercado de enzimas em 2021 era que atingisse 6,3 bilhões de dólares, um crescimento entre 4,7%-5,7% ao ano, englobando diversos campos da indústria, variando desde a produção de tecidos até medicamentos. Contudo, houve prejuízo quanto à produção de enzimas durante a pandemia da COVID-19, assim, projeta-se que o crescimento do mercado de enzimas melhore em 6% entre 2022 a 2027 (GONÇALVES; FONSECA, 2018). Um exemplo do uso de enzimas comercializadas são suas aplicações na indústria de rações, como as enzimas fibrolíticas que podem atuar como complemento no rúmen, auxiliando enzimas endógenas de ruminantes na quebra de frações fibrosas de alimentos, tornando-os mais disponíveis ao animal (ANTONIO *et al.*, 2018).

As enzimas podem ser obtidas a partir de fontes vegetais, animais e microbianas, sendo que os basidiomicetos destacam-se pela alta capacidade de produção,

principalmente através da degradação de resíduos (SURENDRAN *et al.*, 2021). Atualmente, as hidrolases correspondem a 75% das enzimas produzidas por indústrias e, dentre estas, 40% compreendem as proteases, que representam cerca de 60% da venda total de enzimas (DELMASCHIO, 2018; INÁCIO *et al.*, 2013). Dessa forma, as proteases fazem parte do grupo de enzimas mais exploradas pelas indústrias, com ampla aplicação, principalmente na indústria farmacêutica, biorremediação, alimentícia, detergente e de couro (CAMPOS *et al.*, 2011).

4.2.1. Enzimas proteolíticas

As proteases, também conhecidas como enzimas proteolíticas, correspondem às enzimas biocatalisadoras, responsáveis por hidrolisar ligações peptídicas em polipeptídeos e proteínas, apresentando especificidade e seletividade na modificação destas macromoléculas. Essas enzimas pertencem ao grupo 3 das hidrolases e correspondem à, aproximadamente, 6% das proteínas do genoma humano. Uma das formas de sua classificação é com base nos principais resíduos de aminoácidos que compõe seu sítio ativo, onde as cisteíno-, serino-, aspártico-, metalo-proteases são consideradas as principais classes (AGBOWURO *et al.*, 2018). Contudo, também podem ser classificadas de acordo com a sua ação catalítica (exo ou endopeptidase), carga, fonte de isolamento (microbiana, animal ou vegetal), especificidade e tamanho molecular (PIRES *et al.*, 2019).

As proteases são fundamentais para o metabolismo dos organismos vivos, estando envolvidas no crescimento, diferenciação e sinalização celular e, portanto, podem ser obtidas a partir de fonte animal, vegetal e microbiana. A prática de obtenção das proteases de origem animal necessita do seu abate, o que envolve legislações e políticas públicas rigorosas, enquanto a obtenção a partir de vegetais depende de grandes áreas para cultivo e condições climáticas adequadas, tornando o processo demorado. Dessa forma, os microrganismos tornam-se uma fonte promissora, uma vez que sintetizam proteases extracelulares estáveis em diferentes faixas de pH e temperatura (BRITO *et al.*, 2019).

Atualmente, as proteases de origem fúngica são amplamente exploradas, representando aproximadamente dois terços do mercado global. Isto é explicado pelo menor custo na obtenção da enzima, alta taxa de produção, fácil separação do micélio por filtração, além de serem ativas em pH neutro e alcalino. Vale ressaltar que, a partir de fontes nutricionais orgânicas oriundas da Amazônia, a espécie *Pleurotus djamor*

apresentou atividade proteolítica significativa, demonstrando que resíduos ligninocelulósicos podem atuar como indutores na síntese dessas enzimas (BRITO *et al.*, 2021). Assim, cresce o interesse por parte das indústrias pela obtenção de proteases fúngicas, uma vez que apresentam amplo espectro de aplicação, principalmente no setor médico-farmacêutico e indústria de detergentes (BANERJEE; RAY, 2017).

Estimativas indicam que as proteases representam cerca de 60% da venda total de enzimas industriais no mundo, sendo a classe das serino-proteases a mais comum (BANERJEE; RAY, 2017). Desta maneira, para produção dessas enzimas a partir de fontes microbiológicas, faz-se necessário o desenvolvimento de meios otimizados (substratos de crescimento) e o entendimento das condições favoráveis para o desenvolvimento do fungo, incluindo resíduos agroindustriais que possam ser utilizados como substrato de crescimento fúngico, tendo em vista que grande parte do custo de produção de proteases é devido ao substrato utilizado para o crescimento do microrganismo (BANERJEE; RAY, 2017).

No que diz respeito às suas funcionalidades, as proteases regulam a atividade, localização e destino de diversas proteínas, ao contrário disso, em um metabolismo desregulado, as proteases podem estar envolvidas em processos infecciosos como a protease aspártica retroviral do HIV-1, essencial para a maturação do vírus da Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS) (BOND, 2019). Nesse contexto, tecnologias aplicadas à saúde têm sido desenvolvidas para auxiliar o monitoramento dessas enzimas, principalmente sobre as serino-proteases ativas em doenças (JABLAOUI *et al.*, 2020). Além disso, podem se tornar alvo terapêutico como a protease Mpro ou cisteína-protease semelhante à 3-quimotripsina (3CLpro), que possuem papel importante no processamento de proteínas (GOYAL; GOYAL, 2020).

No que diz respeito à sua importância clínica, as proteases possuem alta capacidade metabólica, que variam desde a promoção da microangiogênese pelas aminopeptidases que decompõem proteínas da matriz extracelular, até à contribuição para formação de tumores e metástase, pela perda da regulação da expressão de serino-proteases ancoradas na superfície celular (MARTIM *et al.*, 2017). Adicionalmente, há relatos na literatura sobre o potencial de degradação da fibrina por enzimas fibrinolíticas alcalinas, sugerindo o seu uso como fármaco atuante no tratamento do câncer e terapia trombolítica (AGBOWURO *et al.*, 2018).

Já com relação à sua importância industrial, as proteases podem ser utilizadas nos setores têxtil, couro, detergente, rações, farmacêutico, entre outros. Na indústria alimentícia são empregadas para aumentar as características sensoriais dos alimentos como sabor e textura, melhorar a digestibilidade, ou até mesmo diminuir a alergenicidade (MORELLON *et al.*, 2020).

4.2.2. Enzimas fibrinolíticas e fibrinólise

As enzimas fibrinolíticas correspondem à uma classe de proteases, que se destacam quanto à atuação na degradação de coágulos de fibrina (CLEMENTINO *et al.*, 2017). Essas enzimas são capazes de tratar os coágulos a partir da fibrinólise dos trombos sendo, portanto, compostos fundamentais no tratamento de trombose (ROVATI *et al.*, 2010), visto que estimativas indicam cerca de 17,7 milhões de mortes no mundo em 2017, por consequência de doenças cardiovasculares (DCVs) (ROVATI *et al.*, 2010; YUSUF *et al.*, 2020).

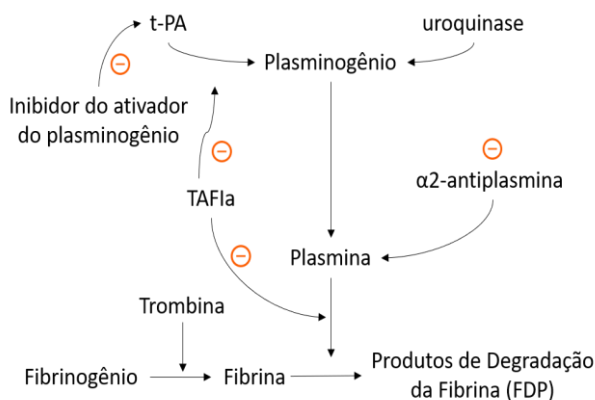
As metalo- e serino-proteases são as principais famílias de enzimas proteolíticas que atuam sobre a fibrina ou fibrinogênio, sendo responsáveis pela redução do fibrinogênio no sangue e hidrólise dos coágulos de fibrina e, assim, são consideradas anticoagulantes (SANCHEZ *et al.*, 2017). Fármacos desse tipo são importantes, pois perturbações na rede de fibrina e a coagulação do sangue levam à trombose, ocasionando doenças que podem levar à morte como infarto no miocárdio, doenças cerebrais e pulmonares (AGRAWAL; SANDHU, 2020).

O processo de coagulação inicia-se no local da ferida a partir da agregação plaquetária e da cascata de coagulação para polimerização da fibrina. O fibrinogênio, por sua vez, é um zimogênio produzido e liberado pelo fígado, e convertido em fibrina pela trombina, após danos vasculares. Normalmente, em hemostasia, o organismo é capaz de hidrolisar os coágulos de fibrina através da plasmina, contudo, há casos de hiperfibrinogenemia onde a cascata de coagulação forma trombos capazes de causar morte tecidual (SOROKIN; SHAMTSYAN; PETRISHCHEV, 2020).

A fibrinólise é um processo contrário à cascata de coagulação, pois atua na dissolução dos coágulos sanguíneos através de enzimas fibrinolíticas. A enzima de maior destaque dessa cascata é a plasmina, ativada através da clivagem da arginina-valina do plasminogênio, catalisada pelo ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) e ativador do plasminogênio uroquinase (u-PA). Além disso, proteínas podem exercer ações inibitórias

sobre a fibrinólise, como o inibidor do ativador do plasminogênio, inibidor da fibrinólise ativável por trombina (TAFIa) e α 2-antiplasmina (figura 1) (MINE; KWAN WONG; JIANG, 2005; PENG; YANG; ZHANG, 2005).

Figura 1 - Inibidores atuantes no processo de fibrinólise. Inibidor do plasminogênio tecidual (t-PA), inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI)



(Fonte: MINE; KWAN WONG; JIANG, 2005)

Os fibrinolíticos são uma classe de medicamentos que atuam na dissolução do trombo através da conversão do plasminogênio em plasmina, sendo classificados de acordo com a especificidade à fibrina e o período de geração (quadro 1). Os agentes trombolíticos utilizados há mais de 30 anos no tratamento da trombose são o ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) e uroquinase (CLEMENTINO *et al.*, 2019). Contudo, os medicamentos utilizados até o momento apresentam baixa especificidade, meia-vida curta, respostas alérgicas, alto custo e, principalmente, estão associados à hemorragia. Conseqüentemente, é necessária a busca por agentes fibrinolíticos mais eficientes e com menores efeitos colaterais, sendo os microrganismos uma fonte potencial de obtenção desses compostos, com baixo custo e alto rendimento (AGRAWAL; SANDHU, 2020).

Quadro 1: Características e principais agentes fibrinolíticos utilizados na terapia trombolítica

Geração	Agente	Característica
Primeira	Uroquinase (Streptase®)	Ativa o plasminogênio circulante e o plasminogênio da fibrina. É responsável por hidrolisar fatores de coagulação. É um agente não fibrino-específico
Segunda	Alteplase (Actilyse®)	É um ativador do plasminogênio tecidual, sintetizado via tecnologia de DNA recombinante. É um agente fibrino-específico e não antigênico
Terceira	(Metalyse®)	Fator do ativador do plasminogênio tecidual recombinante modificado com maior meia-vida e alta afinidade à fibrina

Fonte: BARUZZI; STEFANINI; MANZO, 2018.

Há diversos estudos focados na produção e análise de enzimas fibrinolíticas provenientes de macrofungos. Como, por exemplo, as enzimas fibrinolíticas extraídas dos basidiocarpos de *Boletus pseudocalopus*, que são capazes de degradar a fibrina e os coágulos sanguíneos, ativar o fator X e alterar a densidade e estrutura dos coágulos (CHOI; KIM, 2021). A ACase é uma nova enzima fibrinolítica isolada de basidiocarpos de *Agrocybe aegerita* (LI *et al.*, 2021a). Além disso, outras proteases fibrinolíticas isoladas de macrofungos, como *Pleurotus ferulae* e *Cordyceps militaris*, apresentam potencial no tratamento e prevenção de doenças relacionadas à trombose (CHOI *et al.*, 2017).

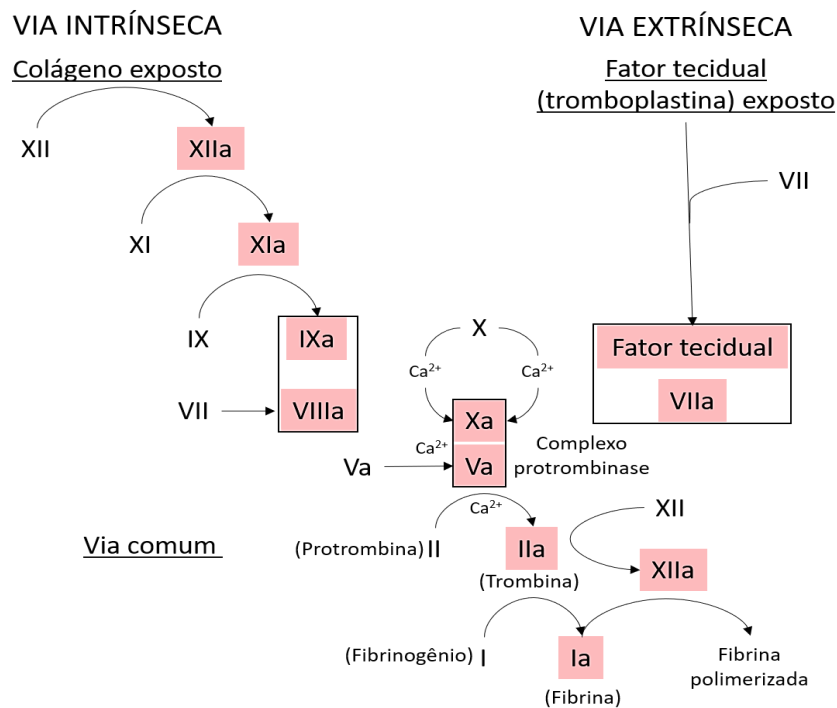
4.2.2.3. Coagulação sanguínea

O coágulo sanguíneo é uma resposta natural do organismo para minimizar a perda de sangue ocasionada por uma lesão vascular, proporcionando a hemostasia. Essa cascata de coagulação envolve uma série de reações, levando à ativação de zimogênios (precursores enzimáticos/pró-enzimas), tendo como resultado a produção de um coágulo de fibrina. Contudo, a ativação prolongada dessa cascata leva à formação da trombose patológica, condição em que, dentro do lúmen do vaso sanguíneo é formado o trombo (coágulo), devido à presença excessiva de fibrina, impedindo o fluxo sanguíneo nesse local, sendo os fatores facilitadores dessa circunstância normalmente explicados pela Tríade de Virchow. Ademais, dependendo da gravidade da trombose, o fluxo sanguíneo para os tecidos pode ser bloqueado levando à isquemia ou morte tecidual (TUZOVIC *et al.*, 2018).

O modelo clássico da cascata de coagulação envolve duas vias metabólicas, a via extrínseca (via do Fator Tecidual - FT), que se torna ativa quando as células que expressam o fator tecidual (tromboplastina tecidual) entram em contato com o sangue, e a via intrínseca, a qual é ativada quando o plasma entra em contato com superfícies contendo carga elétrica negativa. Na via extrínseca (figura 2), a primeira serino-protease é o fator de coagulação VIIa que, através da proteólise, ativa os fatores IX e X em IXa e Xa, respectivamente. A união das enzimas e seus cofatores ativam a protrombina (II) em trombina (IIa), para a conversão do fibrinogênio em fibrina que, quando polimerizada, pode formar um trombo (ativação patológica da cascata de coagulação) ou tampão hemostático (hemostasia normal) (SMITH; TRAVERS; MORRISSEY, 2015).

A via de contato (intrínseca) (figura 2) envolve, inicialmente, a ativação do fator XII em XIIa, com a participação do cininogênio e a pré-caliceína plasmática (PK). O sangue em contato com o colágeno da parede vascular altera a conformação do fator XII, formando pequenas quantidades do fator XIIa, permitindo a ativação do PK em caliceína, gerando, assim, um feedback positivo, responsável por aumentar a produção do fator XIIa que, por sua vez, ativa o fator XI em XIa. A proteólise do fator XIa no fator IX produz IXa, permitindo a formação do complexo tenase intrínseca (complexo de superfície celular formado pelos fatores IXa e VIIIa). Ao final dessa via comum é gerado trombina, para formação do coágulo sanguíneo (SMITH; TRAVERS; MORRISSEY, 2015).

Figura 2 - Cascata de coagulação sanguínea clássica com a via extrínseca e intrínseca

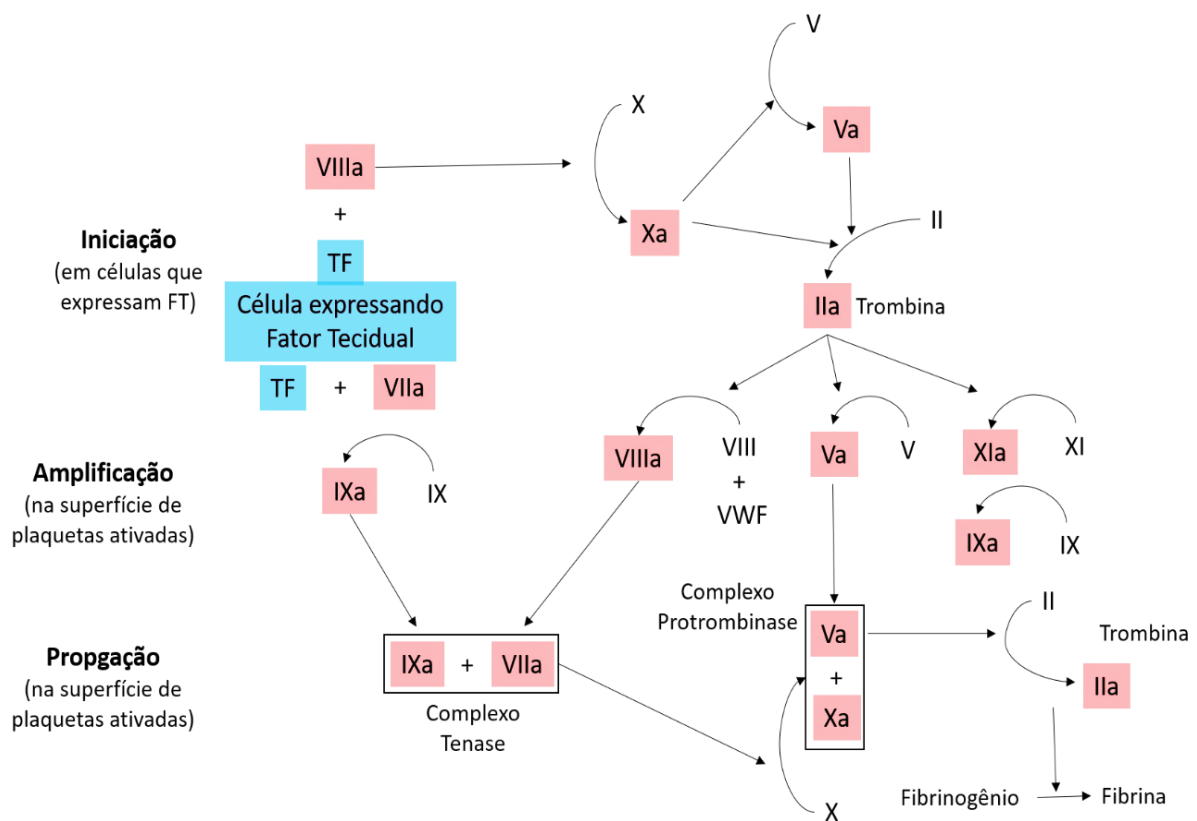


Fonte: MINE; KWAN WONG; JIANG, 2005; SMITH; TRAVERS; MORRISSEY, 2015

É importante ressaltar que, a cascata de coagulação clássica não descreve interações bioquímicas no processo hemostático *in vivo*. Dessa forma, surge um novo modelo de controle da coagulação, baseado em reações pró-coagulantes em superfícies celulares capazes de explicar trombozes *in vivo*. Esse novo processo possui 4 fases sobrepostas: iniciação, amplificação, propagação e finalização (figura 3). Nesse modelo, a hemostasia utiliza substâncias pró-coagulantes ativas, que se mantêm localizadas no sítio da lesão, para a formação do tampão plaquetário (ALTAF; WU; KASIM, 2021; SOROKIN; SHAMTSYAN; PETRISHCHEV, 2020).

Esse modelo inicia com a expressão do fator tecidual (FT), onde a exposição ao FT ocorre por lesões endoteliais ou ativação de células endoteliais, levando à interação do fator VIIa com o fator tecidual, ativando os fatores IX e X em IXa e Xa, respectivamente. Adicionalmente, ocorre a formação do complexo protrombinase formado pelos fatores Xa e Va. Na amplificação, a trombina ativa as plaquetas, uma vez que, os cofatores V e VIII e fator XI são ativados na superfície das mesmas. Na propagação, ocorre alta produção de trombina, culminando na formação de um tampão estável no local da lesão, levando à hemostasia. Enquanto na finalização, a coagulação é concluída para que não ocorra a formação de trombos nos locais íntegros (figura 3) (FERREIRA *et al.*, 2010; ALTAF; WU; KASIM, 2021).

Figura 3 - Cascata de coagulação baseada em superfícies celulares



Dentre as coagulopatias destacam-se a trombose venosa e arterial e a embolia pulmonar, onde as alterações mais comuns, em decorrência da trombose, são a ativação plaquetária e disfunção endotelial (LIMA *et al.*, 2021). A trombose arterial está relacionada às lesões ateroscleróticas, com formação de coágulos ricos em plaquetas,

enquanto a trombose venosa possui coágulos ricos em fibrina e glóbulos vermelhos (BYRNES; WOLBERG, 2017). Ainda nesse sentido, estudos indicam que a aterosclerose arterial pode induzir a trombose venosa ou a inflamação, sendo um ponto comum pelo qual os fatores de risco desencadeiam a formação de trombos nas veias e artérias (POREDOŠ, 2017).

Devido à inflamação, o equilíbrio hemostático é perturbado, resultando no aumento de fatores pró-coagulantes, regulação negativa de mecanismos anticoagulantes e inibição da atividade fibrinolítica (POREDOŠ, 2017). Dessa forma, algumas condições patológicas estão associadas à trombose, como o câncer, uma vez que se faz necessária a utilização de quimioterápicos específicos, responsáveis por aumentar o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, principalmente, pelas características pró-trombóticas das células cancerosas, supressão da atividade fibrinolítica e ativação plaquetária, associando o câncer às patologias causadas pela hipercoagulabilidade (ARONSON; BRENNER, 2018; TUZOVIC *et al.*, 2018).

Atualmente, alterações pró-trombóticas foram identificadas em pacientes com COVID-19, contudo, os parâmetros fisiopatológicos para tais fatores ainda não foram identificados. Estudos recentes indicam que a infecção pelo SARS-COV-2 (COVID-19) resulta em alterações específicas no que diz respeito ao tromboembolismo, completamente diferente de outras infecções respiratórias (PIAZZA; MORROW, 2020). Pacientes com casos graves de COVID-19 apresentam recorrente coagulopatia, pelo fato de a infecção induzir uma alta produção de citocinas que ativam a cascata de coagulação, levando a eventos trombóticos. Além disso, as terapias para pacientes com trombose por COVID-19 com antiplaquetários e anticoagulantes aumentam as chances do estado pró-trombótico (BARBOSA *et al.*, 2021).

Alterações morfológicas que afetam a qualidade das hemácias também estão associadas à trombose, onde ao se ligarem ao fibrinogênio, são determinantes para o aumento da viscosidade sanguínea, indicando um fator de risco para o desencadeamento da trombose. Adicionalmente, a quantidade de eritrócitos no trombo está forte e positivamente associada ao tamanho do trombo, além de reduzirem a permeabilidade do coágulo e retardarem o acesso das enzimas trombolíticas ao coágulo (BYRNES; WOLBERG, 2017). Dessa forma, o potencial fibrinolítico e trombogenicidade sistêmica determinam o nível de formação do trombo (ARONSON; BRENNER, 2018).

5. METODOLOGIA

5.1. Material biológico

As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis (LCFC), pertencente à Coordenação de Tecnologia e Inovação (COTEI), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Para tal estudo foram selecionadas os macrofungos *Auricularia* sp.; *Ganoderma tropicum*; *G. lucidum*; *Grifola frondosa*; *Lentinus strigosus*; *Macrocybe* sp. e diferentes linhagens de *Pleurotus ostreatus* (542, 474, 885), provenientes da Coleção de Culturas de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA.

5.2. Cultivo em placa

Inicialmente, os fungos foram reativados em meio ágar batata dextrose (BDA). Após o crescimento do micélio, foram transferidos inóculos de 7 mm de diâmetro de cada fungos para placas de Petri contendo diferentes meios de cultura (tabela 2), para avaliação do crescimento micelial, à 25 °C, durante 15 dias, em Biochemical Oxygen Demand (BOD).

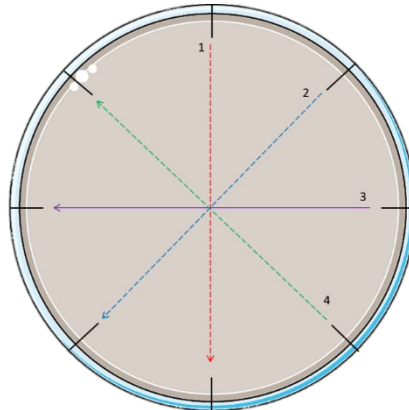
Tabela 2 - Meios de cultura utilizados na avaliação do crescimento micelial de macrofungos

Meios de cultura	Composição
Ágar Aveia (AA)	Aveia (30 g/L); ágar (15 g/L)
Ágar Batata Dextrose (BDA)	Infusão de batata (200 g/L); glicose (20 g/L); ágar (17 g/L)
Ágar Caseína (AC)	Extrato de levedura (1,5 g/L); NaCl (5 g/L); caseína (10 g/L); ágar (15 g/L);
Ágar Czapek Dox (ACD)	NaNO ₃ (2 g/L); (NH ₄) ₂ SO ₄ (0,5 g/L); KCl (0,5 g/L); FeSO ₄ (0,01 g/L); K ₂ HPO ₄ (1,0 g/L); sacarose (30 g/L); ágar (15 g/L)
Ágar Farinha de Soja (AFS)	Farinha de soja (30 g/L); ágar (15 g/L)
Ágar Malte (AM)	Extrato de malte (30 g/L); ágar (15 g/L);
Meio para proteases fibrinolíticas (MFI)	Glicose (30 g/L); peptona de soja (20 g/L); NaCl (2 g/L); KH ₂ PO ₄ (0,5 g/L); MgSO ₄ .7H ₂ O (0,5 g/L)
Meio específico para proteases (MILK)	K ₂ HPO ₄ (2 g/L); glicose (1 g/L); peptona bacteriológica (5 g/L); leite desnatado (10 g/L); ágar (15 g/L)
Ágar malte sacarose levedura com leite desnatado (MYSA)	Sacarose (3 g/L); malte (15 g/L); extrato de levedura (5 g/L); triptona (2 g/L); bacto oxgall (2g/L); NaNO ₃ (0,5 g/L); ágar (20 g/L); leite desnatado (30 g/L)

5.2.1. Avaliação do crescimento fúngico

O crescimento fúngico foi avaliado a partir de medições diárias do diâmetro da colônia, tomando-se as medidas a partir de diferentes pontos da placa de Petri, ao longo de 15 dias (figura 5). Para cada meio de cultura e para cada fungo foram realizadas 5 repetições.

Figura 4 - Representação dos pontos de medição do crescimento fúngico em placas de Petri



A partir das medições dos diâmetros foi calculada a média de crescimento micelial (CM) e a velocidade de crescimento micelial (VCM) para cada dia avaliado e, então, determinado o índice de velocidade de crescimento micelial, calculado através da equação abaixo:

$$IVCM = \Sigma \frac{(D - Da)}{N}$$

Sendo:

IVCM: Índice de velocidade de crescimento micelial

D: Diâmetro médio atual da colônia

Da: Diâmetro médio da colônia do dia anterior

N: Número de dias após a inoculação

Após o crescimento micelial foi realizada a análise de densidade micelial, onde os micélios foram observados e categorizados em 5 classes, de acordo com seu vigor, compreendendo: muito baixo (1), baixo (2), médio (3), alto (4) e extra alto (5).

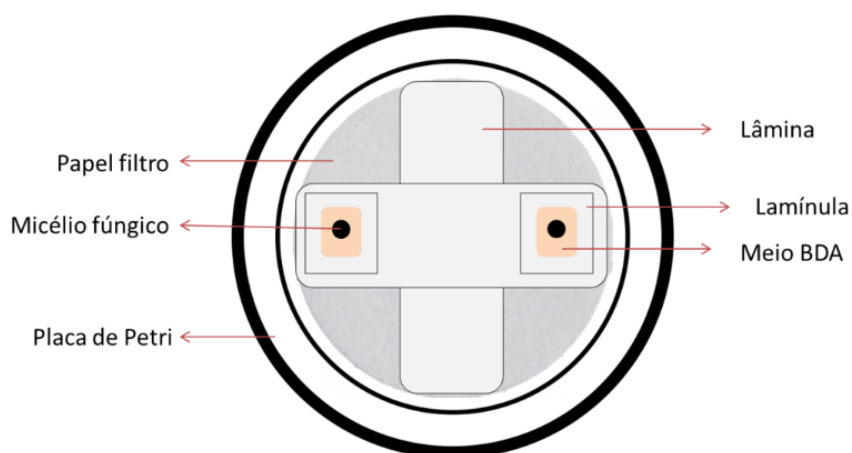
5.2.2. Caracterização morfológica dos fungos

Após o crescimento em placa, as colônias fúngicas foram identificadas e descritas morfológicamente a partir das características visíveis à vista desarmada das colônias

fúngicas, como por exemplo superfície, cor do micélio e do verso da colônia, textura, pigmentação, estrutura da borda e consistência (SOBAL *et al.*, 2007).

A micromorfologia foi realizada a partir da análise microscópica das estruturas reprodutivas, estruturas de resistência ou morfologia das hifas, através do microcultivo. Para a preparação do microcultivo, foi utilizado placas de Petri estéreis com duas lâminas cruzadas e papel em seu interior. Em seguida, foi incluído dois cubos de 1 cm³ de meio BDA por placa, dispostos em posições opostas à lâmina. Pequenas porções do micélio de cada fungo foram colocadas equidistantes entre si, sobre os cubos de BDA e, então, adicionadas lamínulas sobre cada cubo de meio (figura 6), sendo as placas de microcultivo incubadas a 28 °C. As estruturas fúngicas fixadas nas lamínulas foram coradas com azul de algodão e observadas na objetiva de 40X (aumento total de 400X), em microscópio Labomed Lx 400, procurando-se identificar septações das hifas, cor, esporos, presença de estrutura de resistência e ramificações (QUEVEDO *et al.*, 2012).

Figura 5 - Técnica de microcultivo utilizando papel-filtro, lâminas cruzadas, meio BDA e lamínulas



5.3. Avaliação da composição de carbono e nitrogênio dos meios de cultura

5.3.1. Carbono (Walkley-Black)

A determinação de carbono orgânico foi realizada a partir do aquecimento de cada amostra (10 mg) a 60 °C, em erlenmeyer contendo dicromato de potássio e ácido sulfúrico. Após resfriamento, foram adicionados indicadores e, então, realizada a titulação das amostras e de um branco com e sem aquecimento, utilizando uma solução de sulfato ferroso amoniacal (Tedesco *et al.*, 1995). O teor de carbono foi obtido através das fórmulas:

$$A = \frac{[(V_{ba} - V_{bn}) \times (V_{bn} - V_{ba})]}{V_{bn} + (V_{ba} - V_{am})}$$

Onde:

V_{ba} - volume gasto na titulação do branco com aquecimento;

V_{bn} - volume gasto na titulação do branco sem aquecimento;

V_{am} - volume gasto na titulação da amostra.

$$C(\%) = \frac{(A) \times \text{molaridade do sulfato ferroso} \times 3}{\text{massa da amostra (mg)}} \times 100$$

Onde:

“3” - número de mols de dicromato que reage com o ferro × número de mols de dicromato que reage com o carbono × massa atômica do carbono.

5.3.2. Nitrogênio total (Kjeldahl)

Na determinação de nitrogênio total, inicialmente, as amostras foram digeridas em bloco digestor com uma mistura catalítica contendo Na₂SO₄, CuSO₄ e H₂SO₄, até a obtenção de uma coloração azul. Após esse processo, procedeu-se a destilação em destilador de nitrogênio com solução de NaOH 35%, com recolhimento das amostras em solução de ácido bórico acrescida dos indicadores verde de bromocresol e vermelho de metila. Posteriormente, realizou-se a titulação com HCl 0,05N (IAL, 2008). O conteúdo de proteína de cada meio de cultura foi obtido a partir da multiplicação do valor do nitrogênio total pelo fator de conversão correspondente ao meio de cultura, sendo utilizado o fator 6,25 (FURLANI; GODOY, 2005).

5.4. Obtenção dos extratos proteicos e quantificação de proteínas

Após o crescimento micelial máximo dos fungos em cada meio de cultura, estes foram congelados por 4 horas a -20°C. Posteriormente, foram centrifugados a 15000 x g, 10 °C, durante 10 minutos, sendo os sobrenadantes correspondente aos extratos proteicos.

5.4.1. Bradford

A concentração de proteínas nos extratos foi determinada a partir do método de Bradford (1976), com adaptações para microplacas de 96 poços, onde 5 µL das amostras foram incubadas com 250 µL do reagente de Bradford (Sigma-Aldrich), durante 10 minutos a 22 ± 2 °C. As absorbâncias foram medidas a λ=595 nm e as concentrações de

proteínas determinadas a partir de uma curva de calibração utilizando a albumina sérica bovina como padrão.

5.4.2. Lowry

A determinação da concentração de proteínas nos extratos também foi realizada a partir do método de Lowry *et al.* (1951), com adaptações para microplacas de 96 poços. O princípio do método baseia-se na redução do reagente Folin-Ciocalteu ao reagir com proteínas em meio alcalino e na presença do catalisador Cu^{+2} .

Para a realização do ensaio foi adicionado em microplaca, 20 μL das amostras e 200 μL da mistura reativa composta de 1 mL da solução A (carbonato de sódio anidro 20 g/L + hidróxido de sódio 4 g/L); 1 mL da solução B (sulfato de cobre 2 g/L) e 100 mL da solução C (tartarato de sódio 4 g/L), na qual, foram incubadas por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 20 μL do reagente Folin Ciocalteu (1 N), incubados por 20 minutos no escuro. Posteriormente, as absorbâncias das amostras foram medidas a $\lambda=660$ nm e as concentrações de proteínas determinadas a partir de uma curva de calibração utilizando a albumina sérica bovina como padrão. A partir dos resultados da quantificação proteica de cada amostra pelo método de Bradford e Lowry, foi realizado a média dos resultados para determinar qual meio de cultura expressava maior quantidade de proteína.

5.5.Determinação das atividades proteolíticas

5.5.1. Proteases totais utilizando azocaseína

A atividade proteolítica total nos extratos foi determinada a partir da metodologia proposta por Hamada *et al.* (2017), com modificações para placa de 96 poços, utilizando o substrato azocaseína. As amostras foram incubadas com 12 μL de DTT (ditiotreitól, 3 mM) e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético, 2 mM) e 108 μL de tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0) por 10 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 60 μL de azocaseína (1%, m:v), com incubação durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, a reação foi interrompida pela adição de 90 μL de TCA 20% (ácido tricloroacético). O produto da reação foi centrifugado a 8.680 xg por 10 minutos. Os sobrenadantes foram alcalinizados adicionando-se NaOH 2 M (hidróxido de sódio) e lidos em espectrofotômetro a $\lambda=420$ nm. Os resultados foram expressos em UA/mg de proteína, onde uma unidade de atividade (UA) é definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar 0,01 unidade de absorbância a 420 nm.

5.5.2. Proteases totais utilizando caseína

A atividade proteolítica foi investigada de acordo com Sumantha, Larroche, Pandey (2006) com modificações, utilizando caseína (1%, m:v) como substrato, em tampão Tris-HCl, 0,1 M, pH 7,0. As amostras (100 µL) foram incubadas com 100 µL da solução de caseína, por 20 minutos a 37 °C. Posteriormente, a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 0,6 M. Após repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente, o produto da reação foi centrifugado a 10.000 xg, por 10 minutos. Em seguida, 50 µL do sobrenadante foi homogeneizado com 130 µL de Na₂CO₃ 0,5 M e 25 µL de Folin-Ciocalteu (1:4). Após 30 minutos de incubação no escuro, em temperatura ambiente, foram realizadas leituras em espectrofotômetro a $\lambda = 660$ nm. Os resultados foram expressos em UA, onde uma unidade de atividade (UA) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 nmol de tirosina por minuto.

5.5.3. Proteases totais em placas de caseína

A determinação da atividade caseinolítica em placas de Petri foi realizada conforme Rovati *et al.* (2010). Para isso, foi preparado meio de cultura contendo leite desnatado (1%, m:v) (Molico®, Nestlé, Brazil) e agarose (1%, m:v), dissolvidos em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,8) autoclavado. Após a solidificação do meio em placa de Petri, foram realizados furos circulares (7 mm) e adicionados 10 µL dos extratos. As placas foram incubadas por 16 e 24 h à 37 °C e a atividade proteolítica foi expressa em mm², calculando a área dos halos translúcidos produzidos pela degradação da caseína.

5.5.4. Serino-proteases

Para a determinação da atividade de serinoproteases foram utilizados os substratos cromogênicos BAPNA (cloridrato de N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida) e BTPNA (benzoil-L-tirosina-p-nitroanilida), específicos para tripsina e quimotripsina, respectivamente, conforme metodologia adaptada de Menon e Rao (2012). Para isso, as amostras (35,3 µL) foram incubadas com 141,2 µL tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) e 70,6 µL do substrato (BAPNA ou BTPNA, 1,25 mM) à 37 °C, durante 30 minutos. A reação enzimática foi paralisada pela adição de 53 µL de ácido acético (30% v:v) e o produto da reação foi lido em espectrofotômetro a $\lambda = 405$ nm. Os resultados foram expressos em UA, onde uma unidade de atividade (UA) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 nmol de p-nitroanilida por minuto.

5.5.5. Cisteino-proteases

Para a determinação da atividade de proteases cisteínicas foi utilizado o substrato sintético BANA (cloridrato de N-benzoil-DL-arginina β -naftilamida) e o reagente DMACA (p-dimetilaminocinamaldeído) para conferir cor à reação, conforme metodologia adaptada de Cruz e colaboradores (2013). Inicialmente, 17,65 μ L de extrato foi incubado com solução contendo EDTA 2 mM e DTT 3 mM e 58,2 μ L de tampão acetato de sódio (50 mM, pH 6,0) por 30 minutos à 37 °C. Posteriormente, adicionou-se o substrato N α -benzoil-DL-arginina- β -naftilamida (BANA) (1 mM), prosseguindo-se a incubação por mais 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 88,23 μ L de ácido clorídrico (2% em etanol), seguida da adição de 88,23 μ L de DMACA (0,06% em etanol). A reação foi deixada em repouso durante 40 minutos e, após esse período, o produto da reação foi lido a $\lambda=540$ nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em UA, onde uma unidade de atividade (UA) é definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar 0,01 unidade de absorbância a 540 nm.

5.5.6. Enzimas fibrinolíticas

A atividade de enzimas fibrinolíticas foi avaliada conforme Rovati *et al.* (2010). Em placas de Petri foram adicionados 5 mL da solução de fibrinogênio (0,5% p/v), 5 mL de agarose (2%) e 0,1 mL de trombina (100 NIH U/mL). Posteriormente, as placas foram deixadas em repouso por 30 minutos. Após a solidificação da fina camada de fibrina, foram feitos furos circulares (7 mm) e adicionados 10 μ L dos extratos. As placas foram incubadas por 24 h à 37 °C, e a atividade fibrinolítica foi determinada a partir da área dos halos formados pela degradação da fibrina em peptídeos solúveis de baixo peso molecular.

5.6. Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram arranjados seguindo um delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema 9 (meios de cultivo) x 9 (espécies fúngicas), com cinco repetições cada, correspondendo a uma placa de Petri, totalizando 405 placas.

Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA), bem como as médias foram comparadas através do Teste de Tukey ($p \geq 0,05$). Os resultados de atividade fibrinolítica foram submetidos à análise de Correlação Linear de Pearson, para verificar alguma associação entre a quantificação de proteínas e atividades

proteolíticas. Para a elaboração dos gráficos de coordenadas de dispersão utilizou-se o software Prism 8.0.1.6.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Crescimento fúngico

Durante o processo de consumo do substrato pelo fungo, a velocidade de formação de micélio (miceliação ou colonização) é alterada em decorrência dos nutrientes presentes no meio de crescimento (ROSSI; MONTEIRO; MACHADO, 2001). Esse processo está associado à relação carbono/nitrogênio, principalmente durante o crescimento anaeróbico, sendo necessário altos teores de carbono e baixos teores de nitrogênio (DÁVILA *et al.*, 2020; KLAUS *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2021; YIASMIN *et al.*, 2020).

Auricularia sp. apresentou crescimento máximo (80 mm) apenas em meio batata dextrose ágar (BDA), aos 15 dias de cultivo. Nos demais meios, como em ágar caseína (AC), ágar farinha de soja (AFS), ágar malte (AM) e meio para proteases fibrinolíticas (MFI) observou-se crescimento em torno de 62 mm, aos 15 dias, ao passo que, em meio ágar malte sacarose levedura (MYSA) o crescimento máximo alcançado foi de 20,4 mm (Figura 6).

Jo e colaboradores (2014) avaliaram o crescimento micelial de *Auricularia auricularia-judae* em diferentes meios e verificaram que em BDA o crescimento foi superior em relação aos meios ágar Czapek Dox (ACD), AM e substratos suplementados com peptona e extrato de levedura. Além disso, observaram que temperaturas superiores a 30 °C suprimiram o crescimento da espécie fúngica.

Zhang e colaboradores (2018) avaliaram a influência de diferentes substratos no crescimento de *Auricularia vollosula* e detectaram que os meios contendo glicose, frutose e maltose, ou farelo de soja e extrato de levedura, apresentaram as melhores taxas de crescimento após 32 dias de cultivo. Dessa forma, é possível inferir que um período de tempo maior de incubação promovesse altas taxas de crescimento, contudo, poderia resultar em uma redução da velocidade de colonização.

A temperatura é um importante fator de influência no crescimento fúngico, conforme destacado por Kim *et al.* (2018), ao cultivar *Auricularia auricularia-judae* em substrato suplementado com extrato de malte. Essa espécie necessita de temperatura em torno de 16 a 22 °C para atingir crescimento máximo, com supressão do seu crescimento em temperaturas superiores a 30 °C. Assim, é importante destacar que, no presente

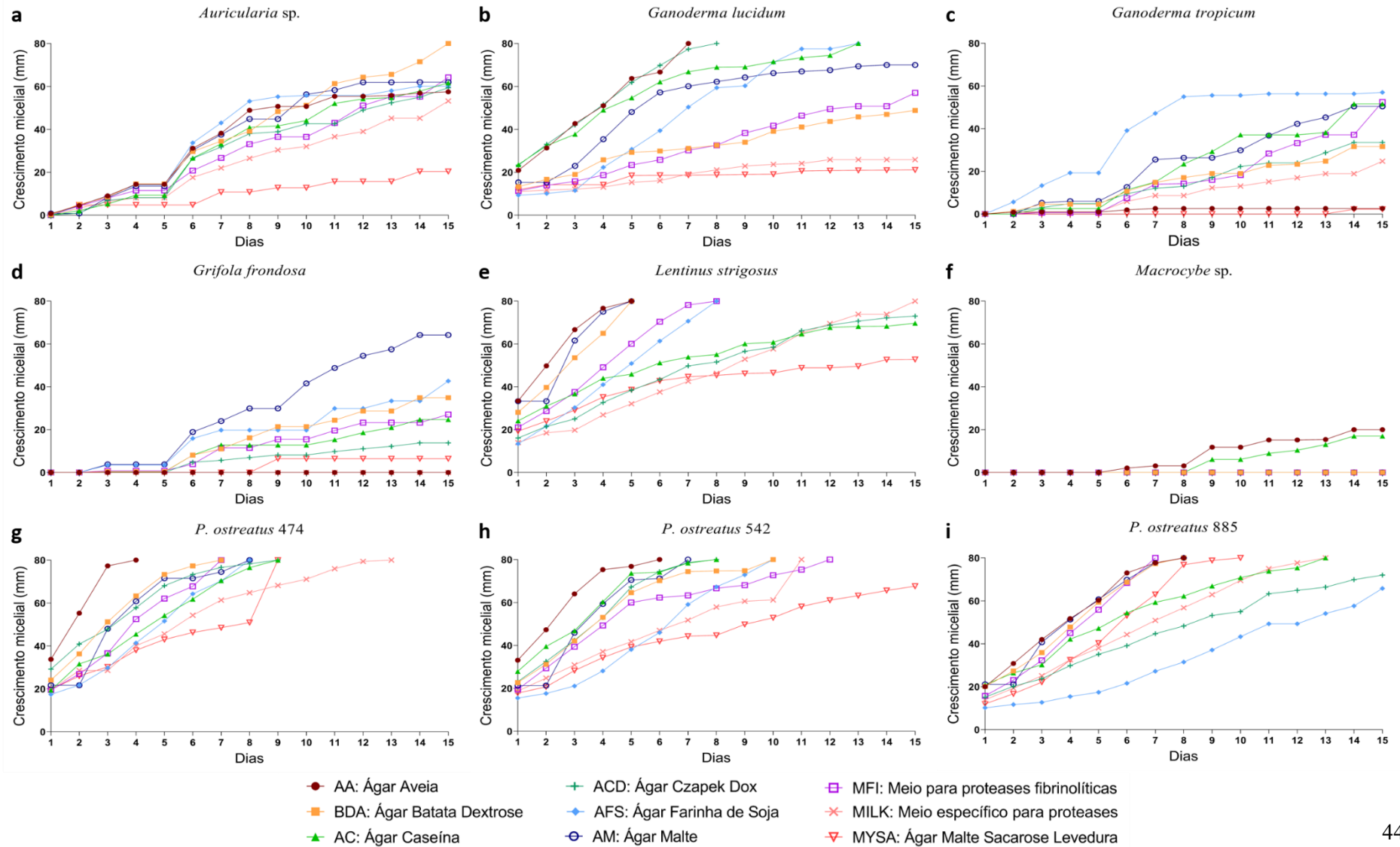
trabalho, o cultivo realizado na temperatura de 25 °C não foi suficiente para que a espécie atingisse crescimento máximo em todos os meios.

Auricularia spp. são consideradas saprófitas, isto é, decompõe a matéria orgânica complexa durante o processo de colonização em nutrientes que propiciam seu crescimento, como carboidratos, substâncias que contêm nitrogênio e compostos inorgânicos. Além disso, a faixa de temperatura ideal para o crescimento micelial das espécies pertencentes a esse gênero varia entre 22 °C à 32 °C (LIU *et al.*, 2021).

Em estudo realizado por Zou e colaboradores (2013), houve aumento na taxa de crescimento de *Auricularia auricula* quando cultivada em meio suplementado com caseína, além de ter promovido acréscimo na produção de tirosinase. Adicionalmente, ocorreu melhora nas taxas de atividade celulolítica com a suplementação com farelo de milho (SHRIKHANDIA; DEVI; SUMBALI, 2022). Resultados similares foram obtidos no cultivo de *A. polytricha* em serragem de *Pennisetum purpurem*, no qual foi alcançado colonização completa da espécie em menor tempo, comparado às outras condições experimentais do estudo (LIANG *et al.*, 2019).

A velocidade de crescimento de *Auricularia* sp. apresentou oscilação em relação ao meio de crescimento e tempo de incubação, onde, quando cultivada nos meios ágar aveia (AA), BDA, AC, ACD, AFS e AM a velocidade máxima de crescimento foi observada aos 6 dias de cultivo. Enquanto, nos meios MFI, meio específico para proteases (MILK), e MYSA a velocidade máxima foi verificada aos 2 dias de cultivo (Figura 7). Assim, pode-se inferir que não houve correlação entre a maior taxa de crescimento e a velocidade micelial, uma vez que, a maior velocidade ocorreu no meio AFS, enquanto, o crescimento foi mais eficiente em meio BDA. Resultado similar foi obtido por Rodríguez e colaboradores (2018), no qual verificaram que em meio BDA a espécie *Auricularia fuscovaccinea* apresentou maior velocidade de crescimento.

Figura 6 - Crescimento micelial de *Auricularia* sp., *G. lucidum*, *G. tropicum*, *G. frondosa*, *L. strigosus*, *Macrocybe* sp. e linhagens de *P. ostreatus* 474, 542 e 885 em diferentes meios de cultura, incubados à 25°C, durante 15 dias



Ganoderma lucidum apresentou taxa máxima de crescimento nos diferentes meios avaliados, com variação nos dias de cultivo. Assim, em meio AA e ACD exibiu crescimento máximo de 80 mm aos 7 e 8 dias, respectivamente, enquanto em meio AC e AFS, o crescimento máximo foi observado aos 13 dias. Dentre os meios com menor crescimento micelial tem-se MILK e MYSA, com cerca de 23,5 mm aos 15 dias (Figura 6). No que diz respeito à velocidade de crescimento, *G. lucidum*, em geral, apresentou expressivo crescimento nos primeiros dias de cultivo, com decréscimo significativo a partir do segundo dia de cultivo, principalmente nos meios AA, AC e ACD (Figura 7).

Ganoderma tropicum, por sua vez, não atingiu crescimento máximo em nenhum dos meios avaliados, sendo os maiores valores observados em AC, AFS e AM aos 14 dias de cultivo, com crescimento na ordem de 53 mm. MYSA e AA correspondem aos meios com menor crescimento de *G. tropicum*, com 2,4 mm aos 15 dias de cultivo (Figura 6), divergindo de *G. lucidum*, que obteve crescimento máximo no sétimo de incubação em meio AA.

Quanto à velocidade de crescimento micelial de *G. tropicum*, foi possível observar alguns picos de crescimento no 2º, 3º, 4º, 6º e 7º dias de cultivo, com destaque para BDA e AM ao 3º dia e, AFS, AC e MFI ao 6º dia (Figura 7). A variação da velocidade de crescimento foi evidente ao longo do período de incubação, sendo sugerido o 6º dia o mais favorável para o crescimento dessa espécie, uma vez que nesse período observou-se as maiores velocidades de crescimento, nos diferentes meios avaliados.

Estudos avaliando o crescimento micelial de *Ganoderma applanatum* indicaram supressão da colonização em temperaturas superiores a 30 °C e inferiores a 20 °C. Além disso, minerais como MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄ e NaCl, e vitaminas como tiamina-HCl e biotina, promoveram maiores taxas de crescimento (JO *et al.*, 2009; RAMAN *et al.*, 2018). No presente estudo, os minerais influenciaram de forma positiva o crescimento de *G. lucidum*, uma vez que, o crescimento máximo ocorreu no 8º dia, em meio ACD. Enquanto, *G. tropicum* demonstrou melhores taxas em meios contendo fontes de carbono e nitrogênio orgânicas.

Yang *et al.* (2000) verificaram que em substrato suplementado com ácido oleico houve aumento significativo nas taxas de crescimento de *Ganoderma* sp., sugerindo o efeito estimulador desse composto no crescimento. Enquanto, Song e colaboradores

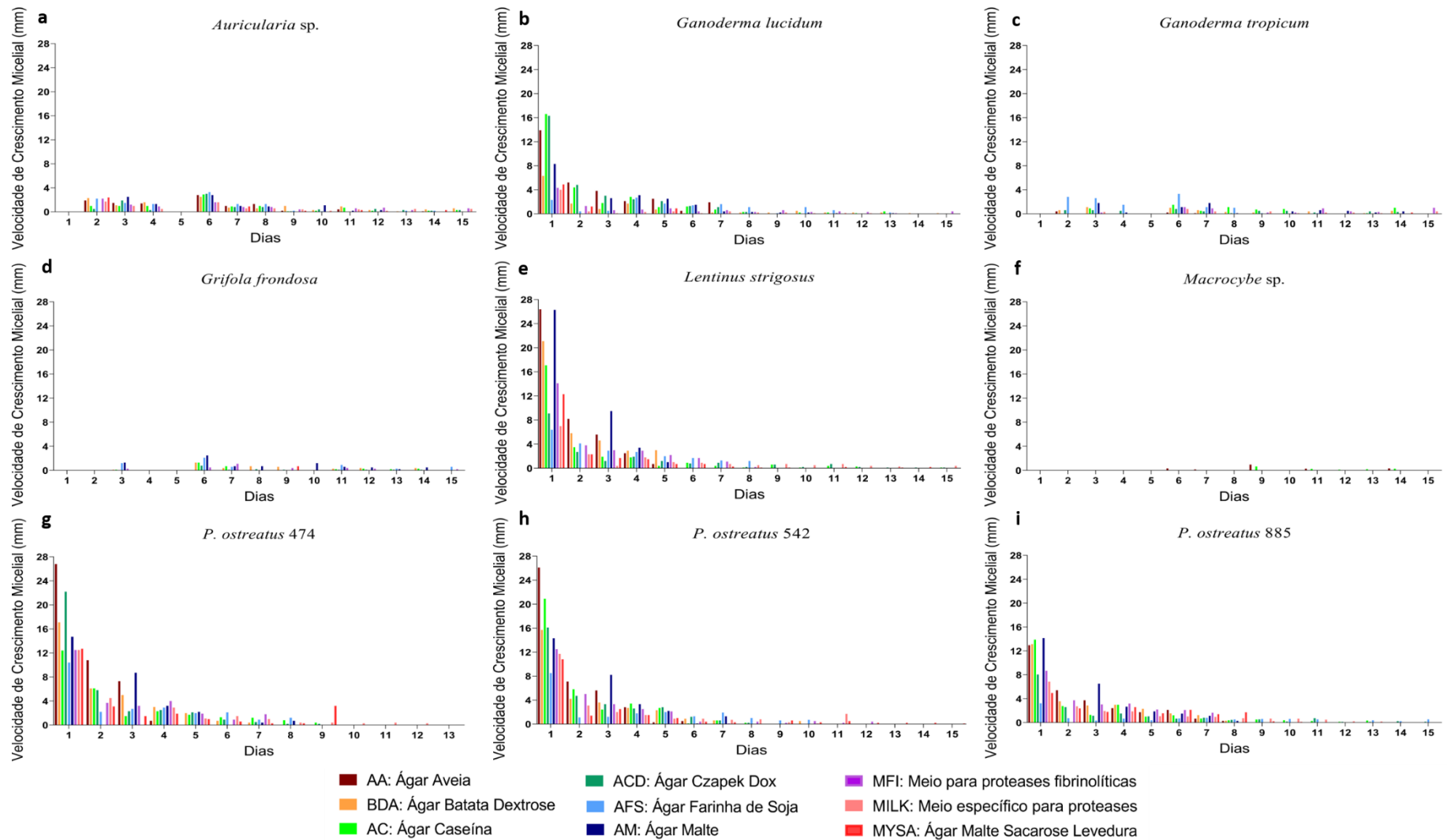
(2018) relatam que o ácido salicílico apresenta efeito inibidor, suprimindo o crescimento de *Ganoderma boniense*.

Jayasinghe e colaboradores (2008), indicaram que o crescimento de *G. lucidum* ocorre em uma ampla faixa de pH (5~9), sendo o pH 5 o ideal. Contudo, mesmo os meios avaliados no presente estudo estarem dentro da faixa de pH aceitável para o crescimento de *G. lucidum*, o mesmo não exibiu crescimento máximo em todos os substratos. Logo, o crescimento lento de ambas as espécies, principalmente de *G. tropicum*, pode estar relacionado ao fato de as espécies serem lignocelulolíticas, apresentando preferência por substratos contendo alta quantidade de celulose e lignina. Assim, resíduos madeireiros suplementados com farelo de arroz, algodão e girassol e, palha de trigo, soja e feijão surgem como alternativa aos substratos basais (ATILA, 2020; NGUYEN *et al.*, 2019).

Grifola frondosa, assim como *G. tropicum*, não atingiu crescimento máximo (80,0 mm) em nenhum dos meios avaliados, com ausência de crescimento nos meios AA e MILK, enquanto em meio MYSA foi observado crescimento de 6,37 mm ao 9º dia de cultivo. Em contrapartida, AM corresponde ao meio com maior crescimento micelial, com máximo de 64,23 mm no 14º dia (Figura 6). Quanto à velocidade de crescimento de *G. frondosa*, para a maioria dos meios de cultura (BDA, AC, ACD, AFS, AM) observou-se maiores valores aos 6 dias de cultivo, enquanto em MFI e MYSA as maiores velocidades de crescimento foram no 7º e 9º dia (Figura 7).

Estudos avaliando o crescimento micelial de *G. frondosa* indicam que a colonização é favorável em meio BDA à 25 °C, quando comparado a substratos contendo extrato de levedura e malte. Além disso, a literatura relata que o melhor crescimento de *G. frondosa* ocorre quando frutose e peptona são utilizadas como fonte de carbono e nitrogênio (CHI *et al.*, 2007; JEON *et al.*, 2018; KHANDAKAR *et al.*, 2009; QUAN, CHENGJIN, 2004). Adicionalmente, é sugerido a suplementação de meios basais para maximizar as taxas de crescimento, onde a adição de ácido succínico a 0,5% e sabugo de milho a meios basais levaram a períodos de cultivos mais curtos e rendimentos maiores (KIM, JANG, 2019; SONG *et al.*, 2018).

Figura 7 - Velocidade de Crescimento Micelial (VCM) de *Auricularia* sp., *G. lucidum*, *G. tropicum*, *G. frondosa*, *L. strigosus*, *Macrocybe* sp. e linhagens de *P. ostreatus* 474, 542 e 885 em diferentes meios de cultura, incubados à 25°C, durante 15 dias



L. strigosus está dentre as espécies fúngicas avaliadas com maior crescimento micelial nos diferentes meios de cultura, atingindo crescimento máximo de 80,0 mm em AA, BDA, AFS, AM e MFI, ao passo que, em AC (69,7 mm), ACD (73,0 mm) e MYSA (53,0 mm) o crescimento máximo foi observado no 15º dia de cultivo (Figura 6). É importante ressaltar que em todos os meios avaliados, *L. strigosus* exibiu velocidade de crescimento significativa a partir do primeiro dia de incubação, com sucessivas reduções ao longo do período de incubação (Figura 7).

Macrocybe sp., por sua vez, corresponde à espécie com o menor crescimento micelial, dentre os meios avaliados, com crescimento apenas nos meios AA e AC, atingindo máximo de 20 e 17 mm aos 14 dias de cultivo, respectivamente (Figura 6). Adicionalmente, aos 9 dias, foi observado pico máximo de velocidade de crescimento nestes dois meios (Figura 7).

Em um estudo avaliando o crescimento micelial de *Macrocybe gigantea* em diferentes meios de cultura, foi observado que em ágar-Saboraud e ACD o micélio exibiu maior tempo para atingir o crescimento máximo, com velocidade de crescimento de 2 mm/dia e 1 mm/dia, respectivamente. Enquanto, em meio BDA, esse fungo apresentou maior taxa de crescimento micelial, seguido do meio composto de extrato de malte, com crescimento a partir do sexto dia de incubação e, velocidades de 12 mm/dia e 10 mm/dia, respectivamente. Complementarmente, determinaram pH entre 5 e 6 como ideal para o crescimento dessa espécie (WANG *et al.*, 2021; YIASMIN *et al.*, 2020).

Relatos na literatura também incentivam a utilização de resíduos agroindustriais como suplemento em meios de cultura para *Macrocybe gigantea*, como por exemplo espigas de milho, grãos de *Pennisetum glaucum* e farelo de soja. Evidências demonstram que tais resíduos resultam em uma maior velocidade de crescimento fúngico, sugerindo que a alta concentração de nitrogênio influencie de forma positiva o crescimento micelial (DEVI; SUMBALI, 2021; WISNIEWSKI *et al.*, 2010).

As linhagens de *Pleurotus ostreatus*, de modo geral, apresentaram máximo crescimento (80 mm) para todos os meios avaliados, no tempo máximo de 13 dias de cultivo, exceto 542 em MYSA (67,6 mm) e 885 em ACD (72 mm) e AFS (66 mm). Dentre as linhagens de *P. ostreatus*, 474 se destaca por exibir crescimento máximo em menor tempo (Figura 6). No que diz respeito aos meios de cultura, AA proporcionou maiores velocidades de crescimento para as linhagens 474 e 542, ao passo que 885 apresentou

maior velocidade de crescimento em AM. Adicionalmente, as maiores velocidades de crescimento para as 3 linhagens, em todos os meios, foram observadas no 1º dia de cultivo, com decréscimo exponencial ao longo dos dias (Figura 7).

Cada linhagem corresponde a um isolado geneticamente diferente, o que impacta na capacidade de desenvolvimento das mesmas, além da influência do preparo e qualidade dos substratos (DONINI *et al.*, 2022). Dessa forma, é importante destacar que a linhagem 474 (linhagem isolada na região amazônica) apresentou crescimento máximo em todos os meios, demonstrando maior adaptabilidade às condições de cultivo.

Edo (2021), ao avaliar diferentes concentrações de glicose no crescimento de *P. ostreatus*, verificou que os meios contendo entre 5 e 10 g/L de glicose exibiram crescimento máximo a partir do 7º dia. Enquanto, em concentração mais baixa (2 g/L) de glicose, o crescimento máximo ocorreu no 3º dia. No mesmo estudo, ao comparar as concentrações de peptona, verificou-se que 6 g/L era o ideal, apresentando crescimento completo da colônia a partir do 6º dia, enquanto, no presente estudo, os meios contendo peptona obtiveram crescimento máximo a partir do 7º dia de incubação. No presente trabalho, os meios BDA e MFI apresentavam 20 e 30 g/L de glicose, respectivamente, e as linhagens exibiram crescimento variado entre 7, 8, 10 e 12 dias, sendo os maiores dias para a linhagem 542. No meio MILK, contendo 1 g/L de glicose, o período de incubação foi maior, sendo 11 e 13 dias.

O cultivo em AM apresentou crescimento máximo para todas as linhagens a partir do 7º e 8º dia, sugerindo ser um meio promissor para cultivo de *P. ostreatus*. Em estudo comparativo, que buscava avaliar o crescimento de espécies de *Pleurotus* em diferentes meios de cultura a 25 °C, foi observado que *P. ostreatus* apresentou crescimento mais rápido quando cultivado em malte, enquanto os meios contendo extrato de levedura e BDA apresentaram crescimento lento. Contrariamente, no presente estudo, o meio BDA proporcionou crescimento máximo em 7 e 8 dias para as linhagens 474 e 885, respectivamente (SIDDIQ; ASIF ALI; MAQSOOD, 2018). Ao comparar o crescimento de *P. ostreatus* em meios contendo ágar, Mahadevan e Shanmugasundaram (2018) identificaram que o crescimento micelial nos meios BDA e ágar extrato de malte exibiram as maiores taxas de crescimento, quando comparadas ao meio ágar Czapek Dox.

Donini e colaboradores (2022) demonstraram que o meio de cultura suplementado com 20% de farelo de soja proporcionou aumento do crescimento micelial

de duas linhagens de *P. ostreatus*, quando comparado ao meio à base de farelo de arroz. No presente trabalho, a linhagem regional 474 exibiu o melhor crescimento em AFS, contrapondo a linhagem 885 que não atingiu 65,8 mm em 15 dias.

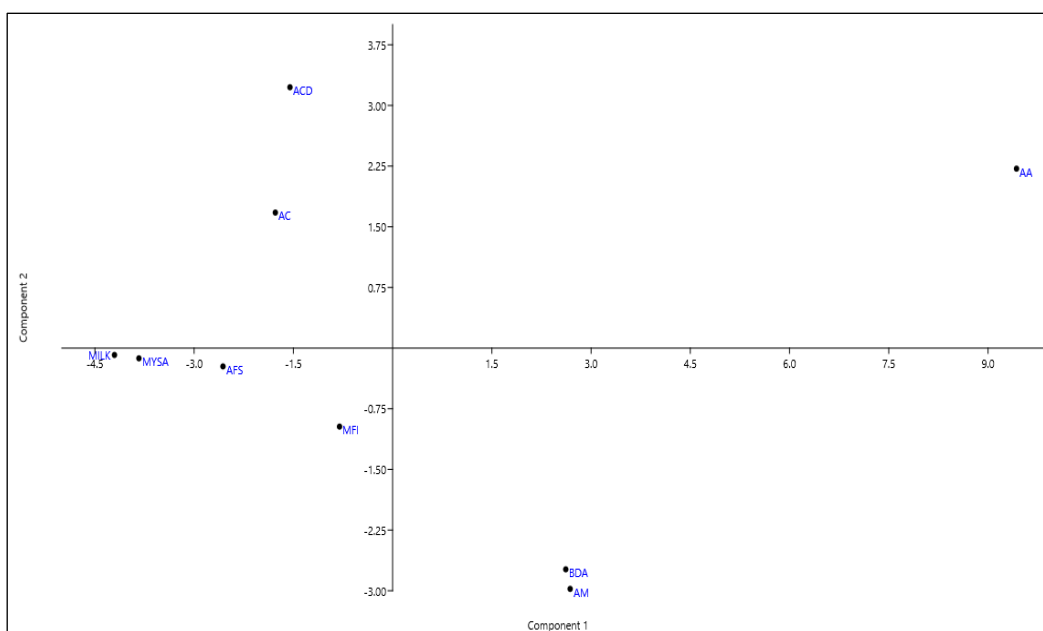
A exposição à altas temperaturas pode causar inativação de importantes moléculas que atuam nos processos metabólicos relacionados à colonização do fungo no substrato. Relatos na literatura indicam que *P. ostreatus* é capaz de crescer em ampla faixa de temperatura e variadas condições nutricionais (YANG *et al.*, 2013). Shruti e colaboradores (2022) demonstraram que *P. eryngii* apresentou menor tempo de crescimento quando cultivado a 25 °C, correspondendo à mesma temperatura utilizada no presente trabalho, a qual também se mostrou eficiente para o crescimento das diferentes linhagens de *P. ostreatus*.

A velocidade de crescimento micelial, em geral, é influenciada pelo tipo de substrato utilizado, incluindo qualidade e modo de preparo (PEDRA; MARINO, 2006). Assim, através do IVC (fig. 8) é possível observar que em AA houve maior velocidade de crescimento, demonstrando ser promissor para o crescimento da maioria das espécies estudadas, com ênfase para *G. lucidum*, *L. strigosus*, *P. ostreatus* (447, 542 e 885). Ao passo que *Auricularia* sp., *G. tropicum*, *G. frondosa* e *Macrocybe* sp. não apresentaram boas taxas de crescimento, comparada às demais.

A partir da Análise de Componentes Principais (PCA), foi possível comparar a similaridade de crescimento das espécies fúngicas nos diferentes meios de cultura, onde AA apresentou diferença significativa em relação aos demais meios. Em contrapartida, em BDA e AM o crescimento micelial das espécies foram semelhantes, assim como entre ACD e AC e, entre MYSA, MILK, MFI e AFS (Fig. 8).

Dessa forma, definir os nutrientes essenciais para o cultivo de macrofungos é fundamental, pois garante a reprodutibilidade das espécies, além de preservar a produção de biomassa fúngica e metabólitos. Assim, os meios de cultura utilizados, com ênfase em AA, AM, AC, e ACD, são os mais recomendados para o cultivo de *G. lucidum*, *L. strigosus* e *P. ostreatus*, uma vez que apresentaram as maiores taxas de crescimento.

Figura 8 - Análise de Componentes Principais (PCA) a partir do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) das espécies em diferentes meios de cultura



6.1.1. Quantificação de carbono e nitrogênio nos meios de cultura

A composição do meio nutricional é fundamental ao controle fisiológico e regulação do metabolismo celular dos macrofungos. Dentre os principais nutrientes, o nitrogênio está associado à síntese de compostos nitrogenados, como as proteínas, enquanto as fontes de carbono desempenham papéis importantes fornecendo energia no metabolismo celular. Assim, a razão C/N indica o nível nutricional do substrato e, o desequilíbrio entre esses fatores afeta, por exemplo, a colonização fúngica do substrato (FLETCHER *et al.*, 2019).

Os teores de carbono nos meios variaram de 44,79 a 53,62%, sendo os maiores valores observados para o meio BDA e os menores para AC. Ao passo que, os teores de nitrogênio variaram de 0,11 a 3,78%, com os maiores percentuais encontrados em MILK e os menores em ACD, AM e BDA, influenciando significativamente a relação C/N nesses meios, com destaque para ACD (tabela 3).

Em relação à influência desses elementos químicos nos meios de cultura e o crescimento fúngico, o meio AA foi o mais favorável para o crescimento das espécies. Entre as espécies estudadas, *Auricularia* sp. exibiu taxa de crescimento máximo apenas em BDA, mesmo com relação C/N sendo duas vezes superior ao indicado para essa espécie (WU *et al.*, 2020).

Tabela 3 - Teores de carbono, nitrogênio e relação C/N dos meios de cultura

Meios de cultura	Carbono (%)	Nitrogênio (%)	C/N
Ágar Aveia (AA)	51,15 ± 0,00 ^c	0,85 ± 0,00 ^f	60,18
Ágar Caseína (AC)	44,79 ± 0,27 ^g	1,96 ± 0,00 ^c	22,85
Ágar Batata Dextrose (BDA)	53,62 ± 0,00 ^a	0,56 ± 0,00 ^g	95,76
Ágar Czapek Dox (ACD)	49,92 ± 0,00 ^e	0,11 ± 0,00 ⁱ	453,9
Ágar Farinha de Soja (AFS)	49,72 ± 0,27 ^e	2,97 ± 0,00 ^b	16,75
Ágar Malte (AM)	52,19 ± 0,27 ^b	0,42 ± 0,00 ^h	124,26
*MFI	50,54 ± 0,00 ^d	1,84 ± 0,00 ^d	27,48
**MILK	51,77 ± 0,00 ^b	3,78 ± 0,00 ^a	13,7
***MYSA	47,46 ± 0,00 ^f	1,48 ± 0,00 ^e	32,06

*MFI: Meio para proteases fibrinolíticas

**MILK: Meio específico para proteases

***MYSA: Ágar Malte Sacarose Levedura

L. strigosus apresentou crescimento máximo aos cinco dias, nos meios BDA, AM e AA, demonstrando exigência de teor de carbono na faixa de 52% e de 0,42 a 0,85% de nitrogênio (figura 6e e tabela 3). Estudos indicam a glicose como fonte de carbono favorável para o cultivo de espécies de *Lentinus*, além de baixa concentração de nitrogênio, onde teores acima de 1,8% podem inibir o crescimento micelial (COLLA *et al.*, 2022). No presente estudo, nos meios AFS e MFI, com valores superiores a 1,8%, foi observado crescimento micelial de *L. strigosus* aos oito dias de cultivo, sugerindo que em concentrações mais baixas de nitrogênio, o crescimento máximo poderia ocorrer em menor tempo (KIM *et al.*, 2020).

No meio AA, com C/N na faixa de 60, observou-se crescimento máximo de *L. strigosus* (5 dias, figura 6e), *G. lucidum* (7 dias, figura 6b), *P. ostreatus* 542 (6 dias, figura 6h), *P. ostreatus* 885 (8 dias, figura 6i) e *P. ostreatus* 474 (4 dias, figura 6g). Estudos indicam maior crescimento de *P. ostreatus* nas razões C/N 30:1, 39:1, 42:1, demonstrando uma ampla faixa de crescimento desta espécie fúngica (NARVÁEZ *et al.*, 2021, ZHOU, PARAWIRA, 2022).

Em contrapartida, o meio MFI, com baixa relação C/N, proporcionou crescimento máximo de *L. strigosus* (8 dias, figura 6e), *P. ostreatus* 474 e 885 (7 dias, figura 6g e 6i) e *P. ostreatus* 542 (12 dias, figura 6h). Contudo, *P. ostreatus* 542 apresentou crescimento máximo nesse meio apenas no 12º dia de cultivo, sendo pouco favorável para o crescimento dessa linhagem quando comparado aos outros meios, uma

vez que, um maior período de incubação contribui para o aumento no índice de contaminação (JONATHAN *et al.*, 2008).

No meio AFS, correspondente à segunda menor razão C/N, foi verificado crescimento máximo apenas de *G. trocipum* (13 dias, figura 6c), *L. strigosus* (8 dias, figura 6e), *P. ostreatus* 474 (8 dias, figura 6g) e *P. ostreatus* 542 (10 dias, figura 6h). Enquanto, a maior taxa de crescimento de *G. frondosa* foi observada no meio AM (C/N 124,27), aos 14 dias de cultivo (figura 6d). Song e colaboradores (2018) verificaram crescimento favorável de *G. frondosa* em meio com C/N de 48,40. É importante ressaltar que, diferentes fontes de nitrogênio afetam a produção de micélios e de biomoléculas e, o extrato de malte está entre as fontes de nitrogênio mais promissoras para o crescimento dessa espécie (LIU *et al.*, 2018).

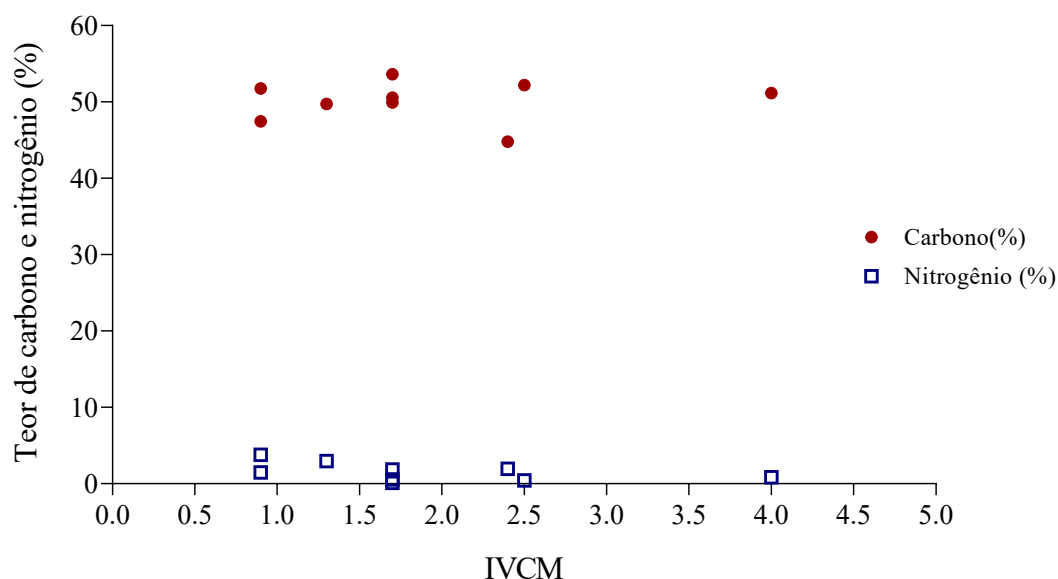
O meio ACD, que corresponde ao meio com a maior relação C/N, proporcionou crescimento máximo apenas de *G. lucidum*, aos 8 dias de cultivo, demonstrando a capacidade desse fungo em utilizar fontes de carbono inorgânicas, em meios ácidos. Os fungos *P. ostreatus* 474 e 542 apresentaram crescimento máximo em todos os meios, incluindo MILK e MYSA, que apresentaram baixas relações C/N. Ao passo que as espécies *G. trocipum*, *G. frondosa* e *Macrocybe* sp. não exibiram crescimento máximo nestes meios, demonstrando baixa flexibilidade quanto às fontes de carbono e nitrogênio disponíveis nos meios.

Ao comparar os teores de carbono e nitrogênio com o IVCM de todos os fungos avaliados, foi possível observar que não existe uma correlação entre esses parâmetros (fig. 9). Adicionalmente, dentre os meios com maior IVCM, destaca-se AA, com 54,15% de carbono e 0,85% de nitrogênio, sugerindo que AA teve as melhores taxas de crescimento e velocidade. Dessa forma, a aveia pode ser considerada uma fonte promissora de carbono e nitrogênio para a maioria das espécies estudadas, devido à capacidade que as cepas possuem em metabolizá-la de forma eficiente.

Relatos na literatura indicam que o envelhecimento da colônia e condições reduzidas de nitrogênio, em alguns casos, podem aumentar a atividade proteolítica, provavelmente devido à renovação de proteínas dos micélios (SESSOMS; LILLY, 1986). Ainda, Campos *et al.* (2011), ao avaliarem a depleção de nitrogênio para a produção de proteases por *Lentinus edodes*, indicaram que a menor disponibilidade desse componente induziu a maior atividade proteolítica desse fungo. É importante ressaltar que, dentre as

fontes de nitrogênio dos meios de cultura comumente utilizados para produção de enzimas proteolíticas, têm-se farelo de soja, caseína, gelatina e solúveis de destilação (SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006).

Figura 9 - Correlação entre os teores de carbono, nitrogênio e índice de velocidade de crescimento micelial, após 15 dias de cultivo de diferentes macrofungos



6.1.2. Análise da caracterização morfológica

O crescimento e vigor micelial são dependentes do conteúdo nutricional do substrato de crescimento do fungo. Dessa forma, a caracterização morfológica foi realizada a partir da observação do micélio, que consiste na parte vegetativa do fungo, formado por uma rede de hifas ramificadas e filiformes (SOBAL, 2007).

A partir do cultivo de *Auricularia* sp. foi observado diferentes padrões de formação micelial, nos diferentes meios avaliados. O micélio variou entre rasteiro e algodonoso com forma circular ou filamentosa. A formação da superfície da colônia concêntrica evidenciou um gradiente de coloração, com a região interna possuindo pigmentos mais escuros, de tons marrons, enquanto a região apical apresentou cores claras. Em contrapartida, o micélio formado no meio MFI (figura 10h) não segue o padrão de coloração observada nos demais, além de exibir a formação um halo escuro. No meio ACD (figura 10d) o micélio apresentou-se pouco vigoroso, enquanto em BDA (figura 10b), há exsudação de compostos após a completa colonização da placa, deixando o meio mais escuro.

Quanto às características macromorfológicas de *G. lucidum*, nos meios AC e ACD verificou-se a presença de micélios rasteiros (figura 11b e 11c). Adicionalmente, nos demais meios, a superfície micelial apresentou-se algodonosa com borda ondulada, filamentosa ou inteira (figura 11). Enquanto, no meio AM, o micélio exibiu forma de crescimento radial, com crescimento mais vigoroso (figura 11e). Quanto à coloração, houve variação entre branca e bege, contudo, no meio MYSA observou-se formação de exsudados pigmentos, com micélios de coloração castanho intenso (figura 11h).

Figura 10 - Características morfológicas dos micélios de *Auricularia* sp. cultivado em diferentes meios de cultura

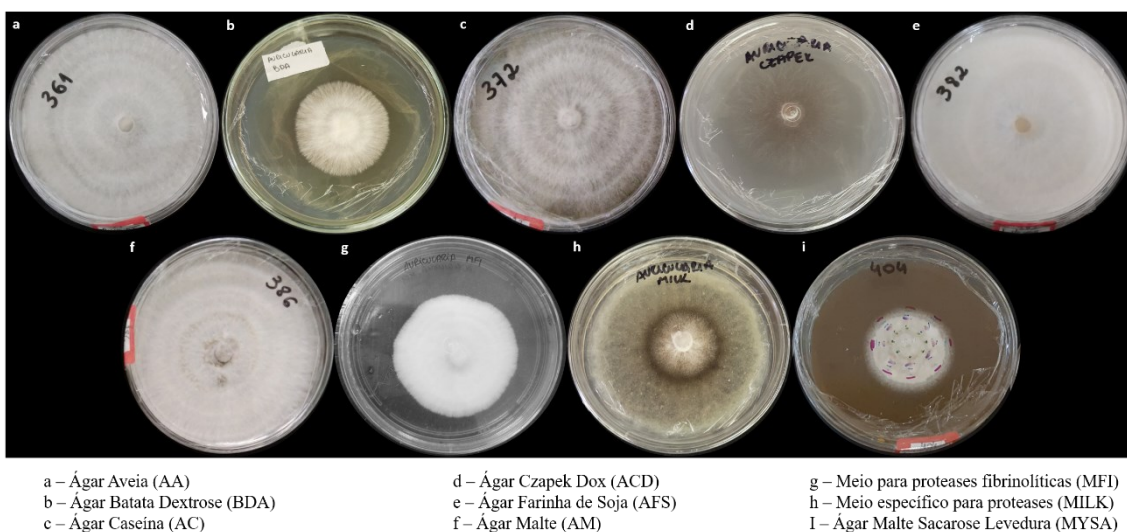
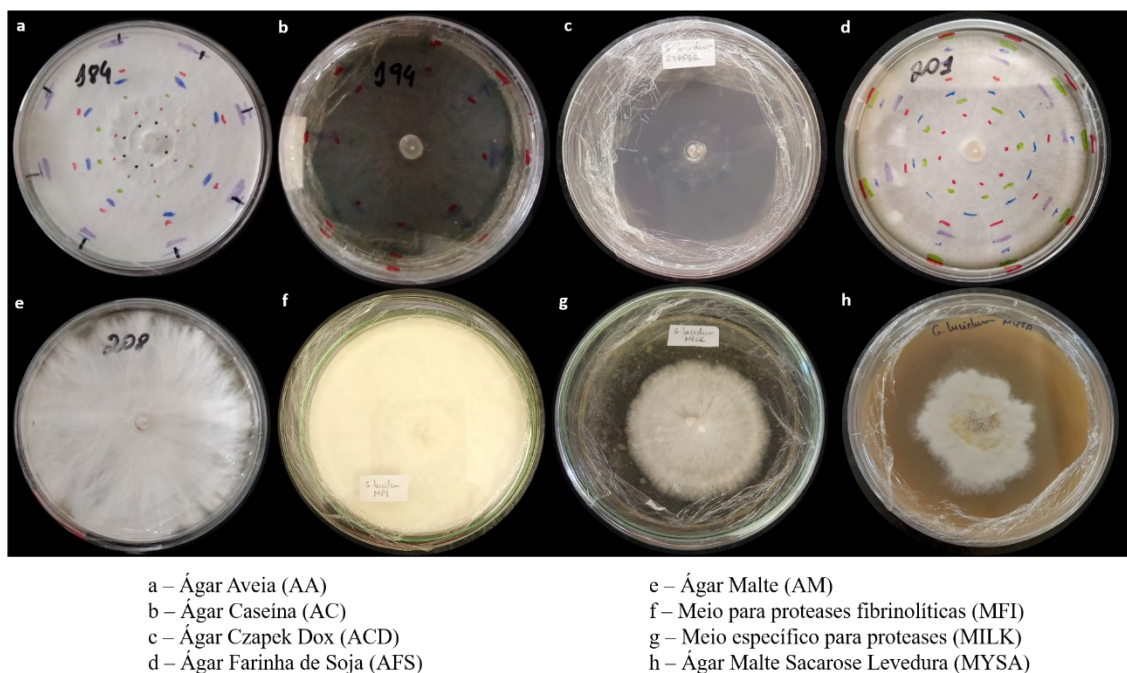
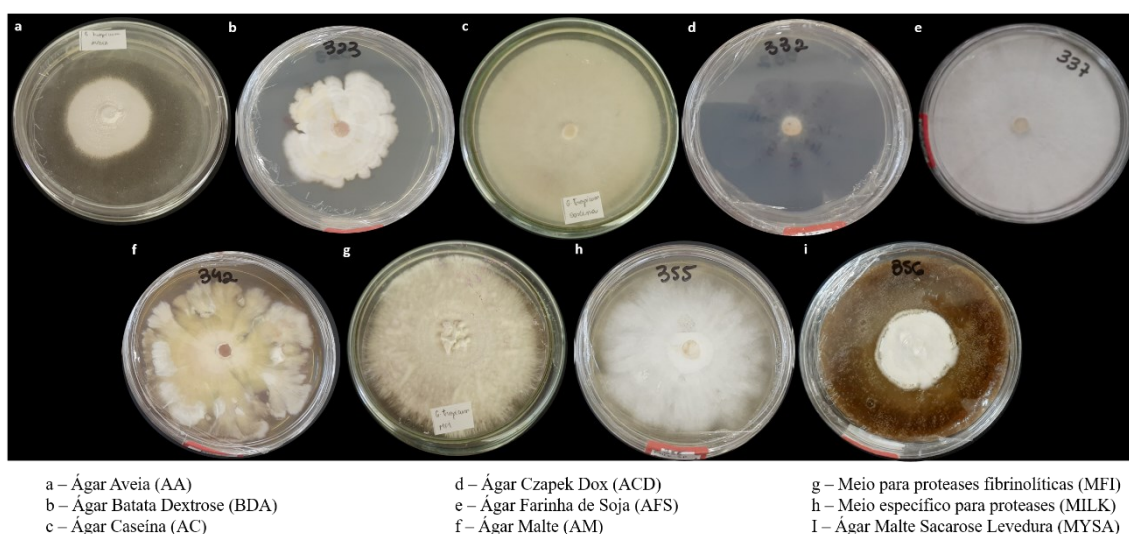


Figura 11 - Características morfológicas dos micélios de *G. lucidum*, cultivado em diferentes meios de cultura



Os micélios de *G. tropicum*, nos diferentes meios de cultura, apresentaram variações, com predominância de micélio rasteiro rígido, com borda irregular (figura 12). Além disso, os micélios formados nos meios AC, MFI e MYSA apresentaram aspecto algodinoso. A maior diferença morfológica foi observada quando a espécie foi cultivada em meio AM, na qual a forma da colônia foi irregular, com borda lobada e superfície concêntrica de coloração branca, verde e amarela.

Figura 12 – Características morfológicas dos micélios de *G. tropicum*, cultivado em diferentes meios de cultura



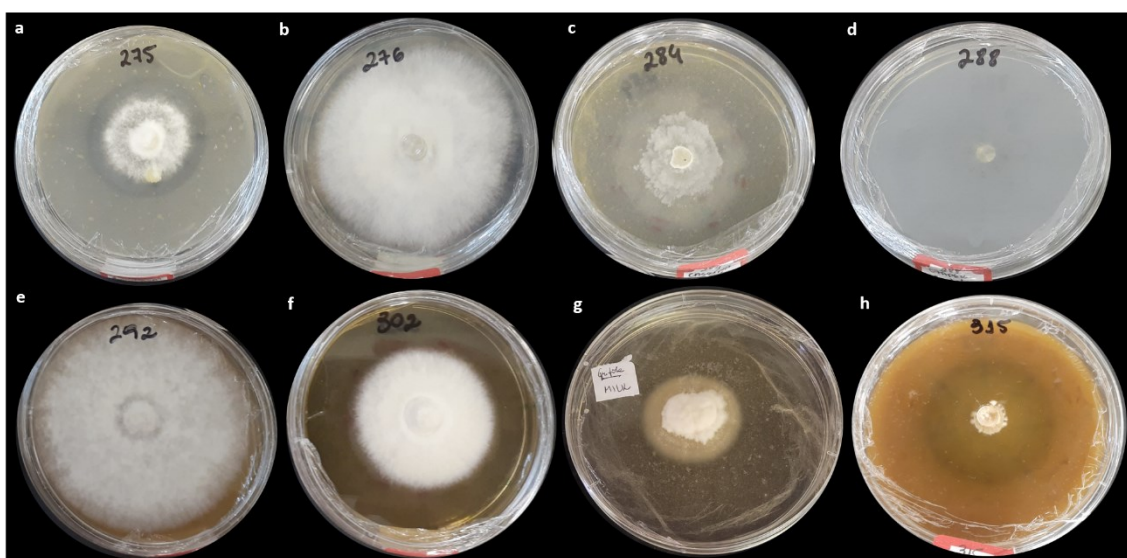
Fletcher *et al.* (2019), ao avaliarem a morfologia de *G. lucidum* quando cultivado em BDA, verificaram que o micélio apresentava textura flocosa e baixa densidade, contudo, ao suplementar o meio com extrato de levedura, observaram modificações morfológicas, tornando a densidade micelial alta. No presente estudo, *G. lucidum* e *G. tropicum*, quando cultivados em meio BDA, apresentaram alta densidade micelial. Além disso, nos meios contendo extrato de levedura verificou-se características morfológicas divergentes, com baixa densidade micelial e hifas pouco aparentes no meio AC, ao passo que no meio MYSA observou-se micélios mais densos (figuras 11 e 12).

Bettin *et al.*, (2009), ao cultivarem *G. lucidum* em meio BDA, observaram aspectos pulverulentos e bordas filamentosas, corroborando com os resultados visualizados no cultivo nos meios AFS e AC (figura 11a, 11b, 12a, 12b e 12c). Outros estudos também demonstram que colônias de *G. lucidum* e *G. applanatum* apresentaram coloração branca na região apical e marrom na região interna, micélio rasteiro, com formação irregular ou filamentosa (BADALYAN; BORHANI, 2019; JO *et al.*, 2009).

Peng *et al.* (2019), constataram que o crescimento de *G. boninense* em diferentes faixas de pH (3, 11, 12, 13 e 14) resultaram na variação da coloração do micélio, com tons de amarelo a marrom, além das fontes de carbono, glicose e sacarose, que também influenciaram quanto à densidade e coloração dos micélios. Tais fontes estão presentes nos meios BDA, AC, AM e MYSA, desse estudo, contudo, essa diferença foi mais perceptível no cultivo de *G. tropicum* em BDA e AM (figura 12b e 12f) e *G. lucidum* em MYSA (figura 11i).

A morfologia do micélio de *G. frondosa* apresentou-se, em sua maioria, como algodinoso aéreo, variando na forma circular e irregular, enquanto a superfície foi caracterizada em pulverulenta e algodonosa, com coloração branca. É importante ressaltar que houve formação de halo nos meios AA e MYSA, com destaque para este último (figura 13).

Figura 13 - Características morfológicas dos micélios de *Grifola frondosa*, cultivado em diferentes meios de cultura



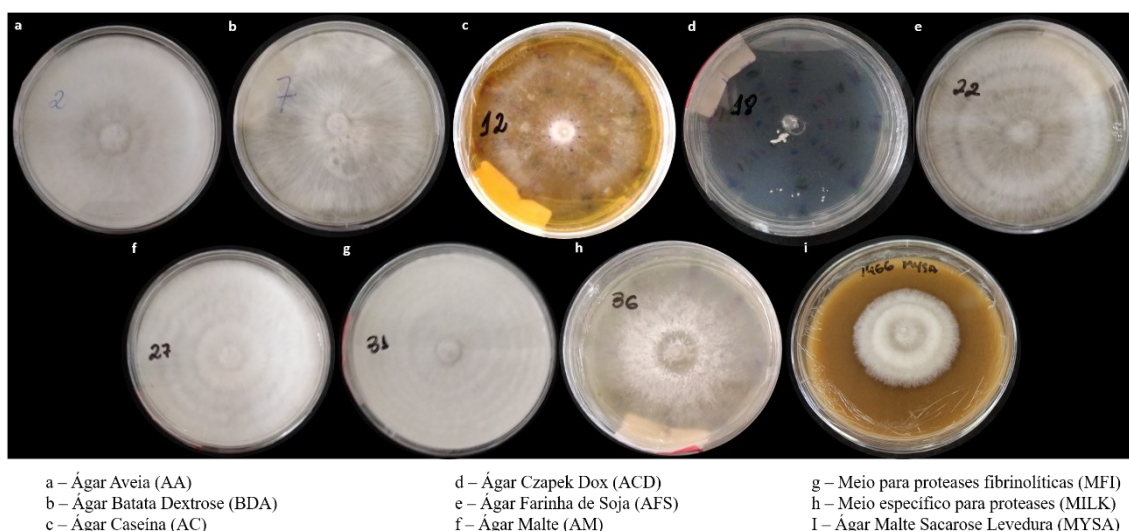
- | | |
|--------------------------------|--|
| a – Ágar Aveia (AA) | e – Ágar Farinha de Soja (AFS) |
| b – Ágar Batata Dextrose (BDA) | f – Meio para proteases fibrinolíticas (MFI) |
| c – Ágar Caseína (AC) | g – Meio específico para proteases (MILK) |
| d – Ágar Czapek Dox (ACD) | h – Ágar Malte Sacarose Levedura (MYSA) |

Gargano *et al.* (2020), ao coletarem *G. frondosa* de uma floresta do mediterrâneo e inocularem em meio BDA, observaram formação de micélio com superfície algodonosa, coloração bege e pigmentos marrons, com bordas e formas circulares. Zan *et al.* (2020) obtiveram resultados similares ao deste estudo, ao comparar a morfologia de uma linhagem selvagem e mutante de *G. frondosa*, apresentando micélios com aspecto

algodonoso, circular e branco, conforme observados nos meios BDA, AC e MFI (Figura 13).

Quanto às características macroscópicas de *L. strigosus*, de modo geral, observou-se micélio aéreo algodonoso, exceto nos meios BDA e caseína, que apresentaram micélio rasteiro e plano. A forma predominante das colônias foram circulares, superfície algodonosa concêntrica e elevação variando entre lenticular e umbilicada, com consistência da massa de crescimento variando entre úmida e seca. As colônias apresentaram colorações em branco, levemente amarelado – acinzentado. Adicionalmente, quando cultivado em meio ACD, *L. strigosus* apresentou as maiores diferenças morfológicas, exibindo formações mais finas e pouco aparentes, bordas filamentosas e pequenas protuberâncias (figura 14).

Figura 14 - Características morfológicas dos micélios de *Lentinus strigosus*, cultivado em diferentes meios de cultura



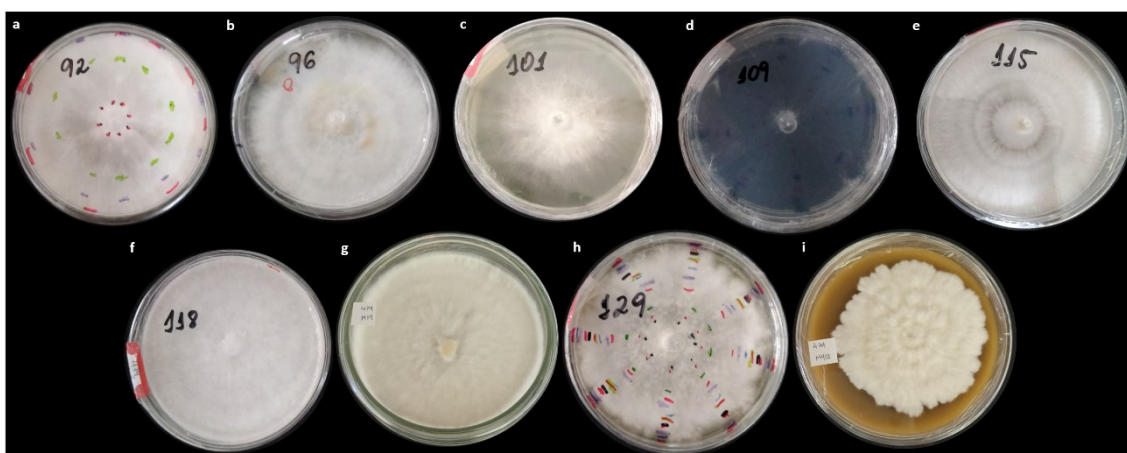
Estudos apontam que minerais como KH_2PO_4 e K_2HPO_4 influenciam no crescimento dos macrofungos e na densidade micelial, corroborando com este trabalho, uma vez que o micélio de *L. strigosus* em MFI exibiu alta densidade. Enquanto, a glicose está entre as fontes de carbono mais adequadas para o crescimento de *Lentinus*, pois promove aceleração de processos metabólicos, assim como as fontes de nitrogênio orgânicas (DULAY *et al.*, 2020).

Jo e colaboradores (2006), ao avaliarem o cultivo em placa de *Phellinus linteus*, verificaram que os meios contendo peptona e extrato de malte exibiram maior densidade micelial e crescimento acelerado, enquanto o meio ACD apresentou densidade micelial

mais baixa, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho. Contudo, Dulay e colaboradores (2020) compararam a densidade micelial de espécies de *Lentinus* em meios contendo diferentes fontes de nitrogênio e aferiram que não houve diferença significativa entre as fontes orgânicas e inorgânicas. Ainda, os meios suplementados com leite apresentaram crescimento micelial inferior aos demais, porém, estudos indicam que são capazes de produzir moléculas pró-saúde, aumentando suas propriedades benéficas (ZAJAÇ *et al.*, 2021).

P. ostreatus 474 manteve a macromorfologia mais homogênea entre os diferentes meios de cultura, apresentando micélio algodonoso, superfície concêntrica algodonosa ou pulverulenta e coloração branca (figura 15). Enquanto *P. ostreatus* 542 apresentou, predominantemente, forma irregular e colorações variando entre branco, bege e ocre (figura 16). Além disso, os micélios formados nos meios AC e ACD (figura 16c e 16d) apresentaram aspecto rasteiro e algodonoso, com borda irregular. O micélio da linhagem *P. ostreatus* 885 variou entre rasteiro e algodonoso, com forma circular, borda filamentosa, coloração branca com tons marrom e superfície majoritariamente concêntrica, variando em pulverulenta e algodonosa (figura 17). É importante destacar que nos meios BDA e AFS foi observada a produção de pigmentos.

Figura 15 - Características morfológicas dos micélios de *P. ostreatus* 474, cultivado em diferentes meios de cultura

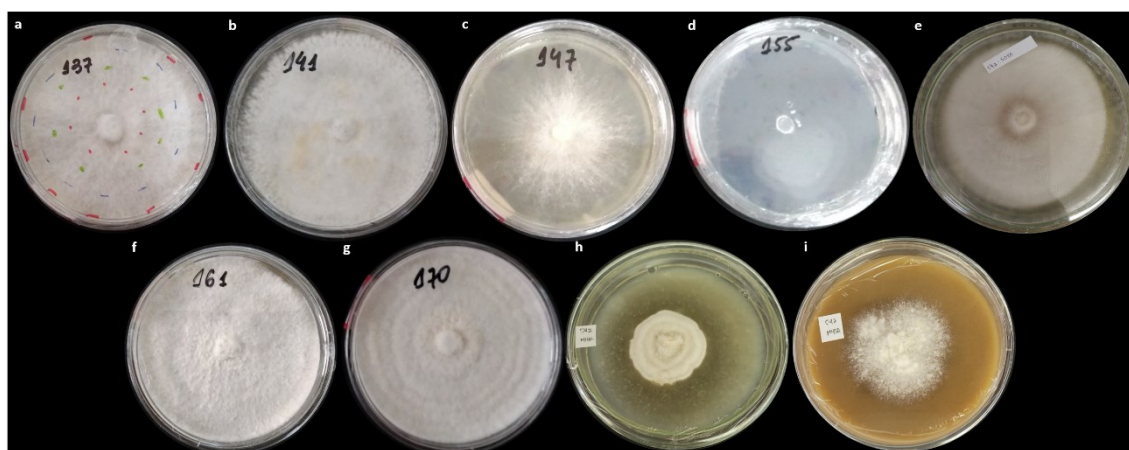


a – Ágar Aveia (AA)
b – Ágar Batata Dextrose (BDA)
c – Ágar Caseína (AC)

d – Ágar Czapek Dox (ACD)
e – Ágar Farinha de Soja (AFS)
f – Ágar Malte (AM)

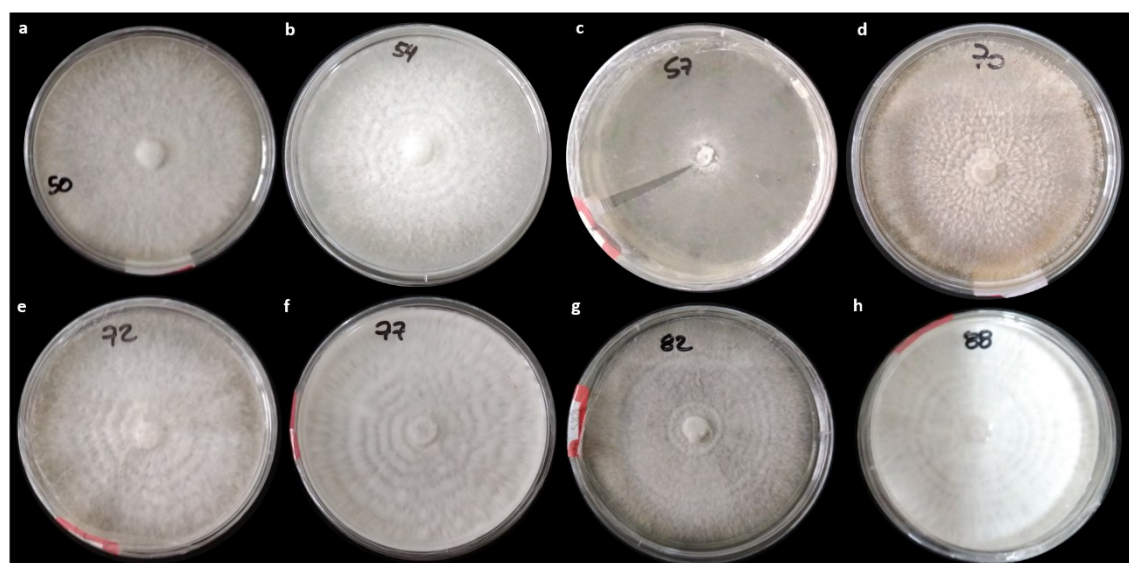
g – Meio para proteases fibrinolíticas (MFI)
h – Meio específico para proteases (MILK)
i – Ágar Malte Sacarose Levedura (MYSA)

Figura 16 - Características morfológicas dos micélios de *P. ostreatus* 542, cultivado em diferentes meios de cultura



- a – Ágar Aveia (AA)
 b – Ágar Batata Dextrose (BDA)
 c – Ágar Caseína (AC)
 d – Ágar Czapek Dox (ACD)
 e – Ágar Farinha de Soja (AFS)
 f – Ágar Malte (AM)
 g – Meio para proteases fibrinolíticas (MFI)
 h – Meio específico para proteases (MILK)
 i – Ágar Malte Sacarose Levedura (MYSA)

Figura 17 - Características morfológicas dos micélios de *P. ostreatus* 885, cultivado em diferentes meios de cultura



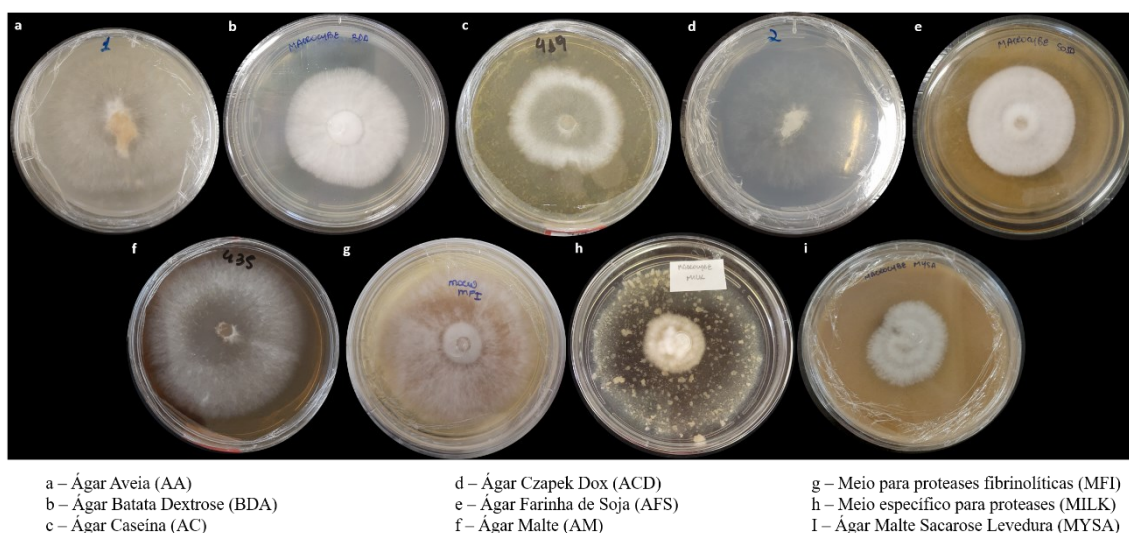
- a – Ágar Aveia (AA)
 b – Ágar Batata Dextrose (BDA)
 c – Ágar Caseína (AC)
 d – Ágar Farinha de Soja (AFS)
 e – Ágar Malte (AM)
 f – Meio para proteases fibrinolíticas (MFI)
 g – Meio específico para proteases (MILK)
 h – Ágar Malte Sacarose Levedura (MYSA)

A superfície algodonosa em micélios de *P. ostreatus* também foi relatada quando cultivado em BDA, AM e Ágar Sabouraud (ROY; KRISHNAPPA, 2018). Adicionalmente, estudos demonstraram que em meios de cultura contendo concentrações de glicose entre 5 e 10 g/L, o micélio apresentou textura algodonosa e coloração branca, com alta densidade. Essas características também foram observadas em meios contendo peptona, extrato de levedura e malte. Em meio ACD, houve baixa densidade micelial,

superfícies menos aparentes e hifas pouco vigorosas (BADALYAN; BORHANI, 2019; EDO, 2021; MAHADEVAN; SHANMUGASUNDARAM, 2018).

Macrocybe sp. apresentou características macromorfológicas dos micélios mais diversificadas entre os meios de cultura. De modo geral, em todos os meios, os micélios apresentaram superfície algodonosa. Nos meios BDA, AFS, MFI, MILK e MYSA (figura 18b, 18e, 18g, 18h e 18i) exibiu micélios aéreos e mais vigorosos. Enquanto, nos meios AA, AC, ACD e AM (figura 18a, 18c, 18d e 18f) apresentou crescimento plano e pouco vigoroso.

Figura 18 – Características morfológicas dos micélios de *Macrocybe* sp., cultivado em diferentes meios de cultura

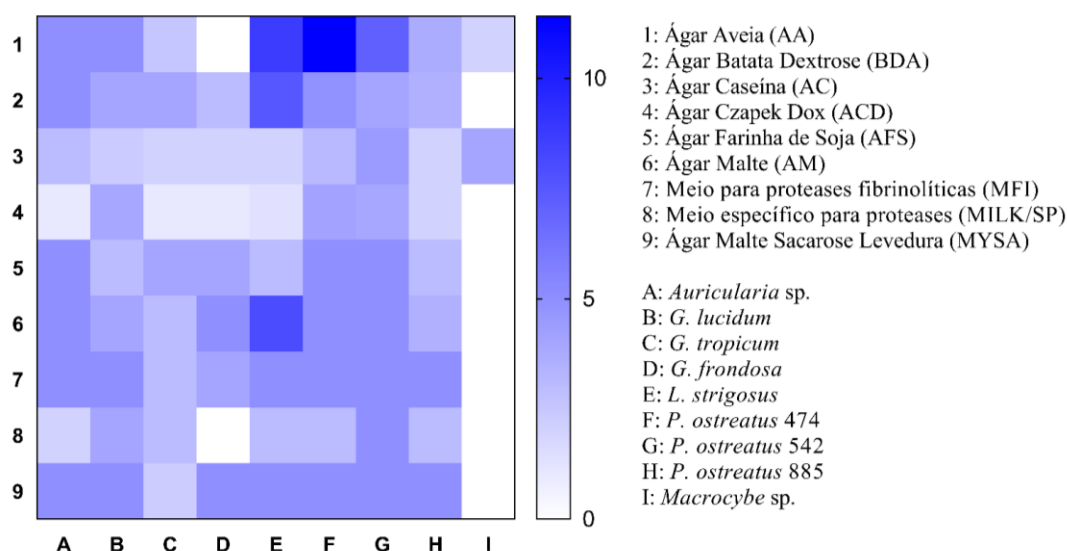


Inyod e colaboradores (2017) verificaram alterações morfológicas nos micélios de diferentes linhagens de *Macrocybe crassa*, quando cultivadas em meio BDA, AM, ágar farinha de milho e ágar água de coco, descrevendo coloração branca, bordas irregulares ou circulares e aparência espessa ou densa. Além disso, notaram que em pHs diferentes houve alterações na formação dos micélios. Outro relato na literatura também descreve as mesmas características encontradas no presente trabalho, para o micélio de *Macrocybe* sp. quando cultivado em meio BDA (SERBENT *et al.*, 2020).

No que diz respeito à análise de comparação de médias por agrupamento, é possível observar que *P. ostreatus* 474, cultivado em AA, apresentou diferença significativa comparada aos demais meios, fato provavelmente associado aos *outliers* obtidos para as variáveis crescimento micelial e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). Quando cultivados em meio MYSA, os fungos apresentaram correlação

mais homogêna, exceto *G. tropicum* e *Macrocybe* sp. Em contrapartida, quando cultivados no meio AA, os fungos exibiram correlação mais heterogêna, com ênfase para *L. strigosus*, *P. ostreatus* 474 e *P. ostreatus* 542 (Figura 19).

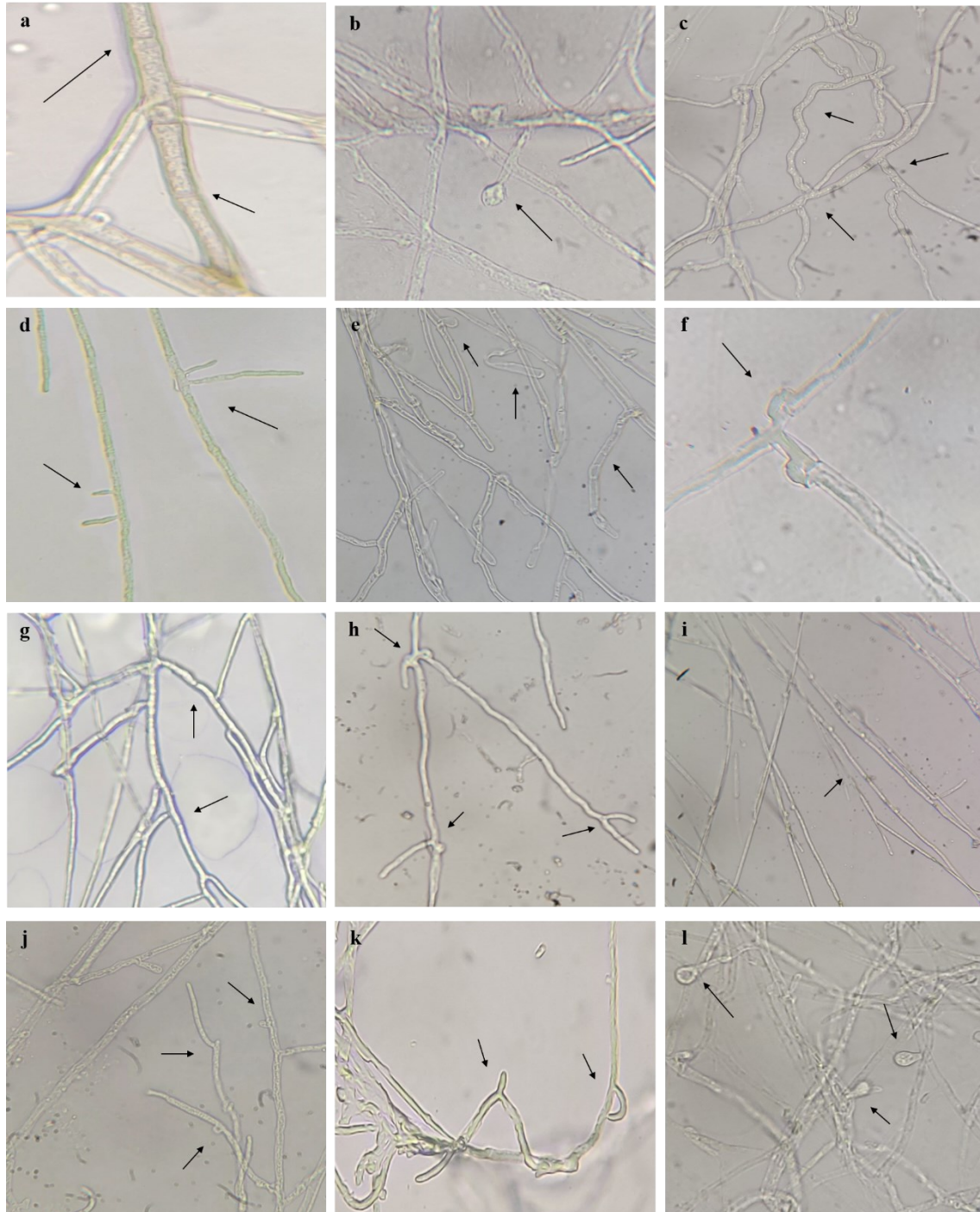
Figura 19 – Análise de comparação de médias por agrupamento de crescimento micelial, índice de velocidade de crescimento e vigor micelial



A partir da técnica de microcultivo, foi possível observar estruturas relacionadas ao micélio vegetativo dos macrofungos estudados. De modo geral, os micélios apresentaram característica trimítica, contendo hifas hialinas generativas totipotentes, com fíbulas septadas com ramificações (figura 20a, 20d, 20e e 20i), esqueléticas com parede espessa hialina ou colorida (figura 20b, 20c, 20j), conectadas com parede mais espessas e ramificadas (figura 20g, 20h, 20k) (ESCOBAR *et al.*, 2020; ZMITROVICH *et al.*, 2006).

Os grampos de conexão correspondem às estruturas de hifas formadas para garantir o estado dicariótico do micélio. Essas estruturas são comumente relatadas e identificadas para as espécies *L. strigosus* (figura 20f), *P. ostreatus* 885 (figura 20k) e *Macrocybe* sp. (figura 20l) (BADALYAN; BORHANI, 2019; BHUPATHI; SUBBAIAH, 2019). Adicionalmente, foi observado na região apical das hifas de *G. lucidum*, quando cultivado em MYS, estrutura similar a clamidósporo (figura 20b) e, em *Macrocybe* sp., crescido em MILK, estrutura semelhante a pleistocídio (figura 20b) (BHUPATHI; SUBBAIAH, 2019).

Figura 20 - Micromorfologia dos micélios das espécies de *Auricularia* sp., *G. lucidum*, *G. tropicum*, *G. frondosa*, *L. strigosus*, *P. ostreatus* 474, 542 e 885, e *Macrocybe* sp. em diferentes meios de cultura. *Auricularia* sp. – AC (a, 100x); *G. lucidum* – MYSA (b, 40x); *G. tropicum* – ACD e MYSA (c, d, 40x); *G. frondosa* – BDA (e, 40x); *L. strigosus* – MYSA (f, 100x); *P. ostreatus* 474 – MFI (g, 100x); *P. ostreatus* 542 – AA e AFS (h, i, 40x); *P. ostreatus* 885 – AA, MYSA (j, k, 40x); *Macrocybe* sp. – MILK (l, 40x).



6.2. Quantificação de proteínas

O teor de proteínas a partir do método de Bradford apresentou variações entre os diferentes meios e espécies avaliadas. A espécie *Auricularia* sp. exibiu maiores teores proteicos quando cultivada em ACD e AFS. Grande parte das espécies pertencentes a esse gênero são exploradas por serem consideradas uma das fontes mais abundantes de proteínas (YANG *et al.*, 2022). Contudo, poucos estudos se concentram na obtenção dessas moléculas a partir do cultivo em meios de cultura como ACD e AFS (Tabela 4).

A literatura relata que o teor de proteínas produzidos por *L. sajor-caju* em meio ACD é baixo, enquanto o mesmo meio suplementado com leite integral promove aumento de até 3,5 vezes na produção de proteínas (ZAJAÇ *et al.*, 2021). Controversamente, no presente estudo, a espécie *L. strigosus* exibiu baixos teores proteicos em meio ACD e MILK, com altos teores de proteínas apenas quando cultivado em meio AC (Tabela 4).

De modo geral, os meios que proporcionaram maiores concentrações de proteínas dentre as espécies fúngicas foram AC, AFS, MFI, MILK e MYSA, com ênfase para as diferentes linhagens de *P. ostreatus* cultivadas nos meios MILK e MYSA, que apresentaram os maiores teores proteicos comparadas às outras espécies. *G. lucidum* exibiu maiores concentrações em meio MFI, ao passo que, *G. tropicum* foi maior em meio MYSA. *G. frondosa*, por sua vez, apresentou maiores teores proteicos quando cultivado nos meios AC, AFS e MILK. Enquanto, *Macrocybe* sp. exibiu maiores teores apenas em MILK (Tabela 4).

Morales e Juarez (2019) ao compararem a suplementação de caseína e glicose no cultivo de *P. ostreatus*, verificaram que o consumo da caseína refletia na concentração de proteína solúvel total, indicando que a adição da caseína era mais importante para a produção enzimática em comparação à fonte de carbono. Contudo, foi relatado que o micélio de cepas de *P. ostreatus* obtiveram entre 0,6 e 3 vezes maior teor de proteínas em meios contendo 0,01 g de glicose, justificando o resultado superior observado em AC, no presente estudo, para as linhagens de *P. ostreatus* 474, 542 e 885. Adicionalmente, Chaiyadit e Chairin (2022), descrevem que meios enriquecidos com caseína e leite estimulam a produção de proteínas e proteases.

Na literatura, há relatos de que a disponibilidade de nitrogênio no meio pode influenciar a produção de polímeros pelos fungos. Dessa forma, sugere-se que as fontes de nitrogênio disponíveis no meio MYSA influenciaram a produção de proteínas pela

maioria das espécies estudadas. Contudo, é importante destacar que, apesar dos nutrientes do meio modularem a síntese de proteínas, as rotas geradas pelas fontes de nitrogênio presentes em MYSA não estão relacionadas à síntese de mais moléculas com atividade enzimática, uma vez que a alta produção ocorre através da repressão catabólica do nitrogênio (OH *et al.*, 2017; REDDY; KANWAL, 2022; TUDZYNSKI, 2014).

Quanto aos extratos fúngicos quantificados pelo método de Lowry, semelhante ao encontrado na quantificação por Bradford, apresentaram variações quanto aos teores de proteínas nos diferentes meios de cultura. *Auricularia* sp. exibiu maiores teores proteicos nos meios AFS e MFI, sendo cerca de 7 e 23 vezes superiores, comparados ao detectado pelo método de Bradford, respectivamente. *G. lucidum* também apresentou altos teores quando cultivado em MFI, contudo, nos meios BDA e AM também foram detectadas concentrações elevadas de proteínas. *G. tropicum*, por sua vez, apresentou baixos de teores de proteínas em todos os meios de cultura, comparado à *G. lucidum*, exibindo valor máximo de 1,64 mg (Tabela 5).

MFI corresponde ao meio que proporcionou maiores concentrações de proteínas nos extratos dos fungos estudados, exceto para *G. tropicum*. Em *P. ostreatus* 542 observou-se altos teores proteicos nos extratos provenientes dos cultivos em AM, MFI e MYSA (Tabela 5).

Ao comparar, de modo geral, os dois métodos de quantificação, observou-se que as concentrações proteicas pelo método de Lowry foram cerca de 7 vezes superiores, em relação a Bradford. Adicionalmente, o meio ACD foi o menos favorável para a produção de proteínas pelos fungos estudados (Figura 21).

Tabela 4 - Teor proteico dos extratos provenientes da biomassa micelial de basidiomicetos, cultivados em diferentes meios de cultura, a partir da quantificação pelo método de Bradford

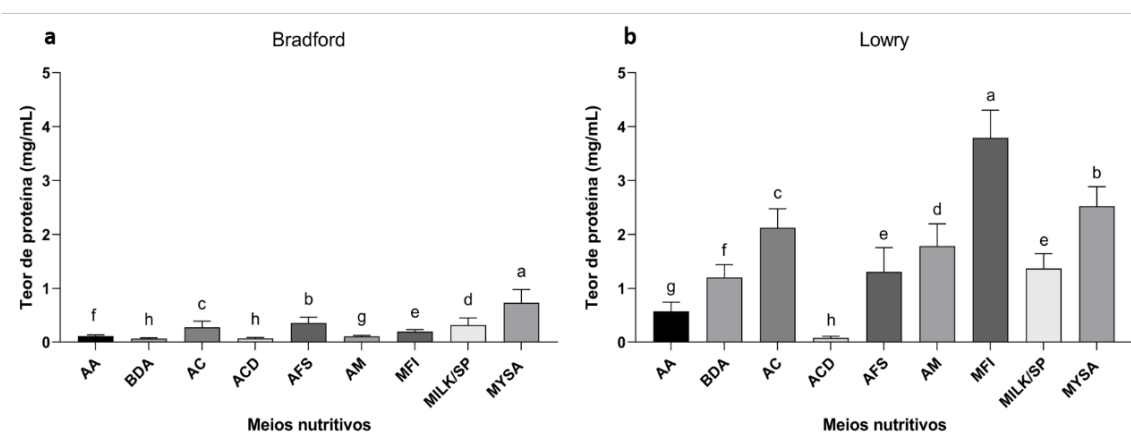
Meios de cultura	Concentração de proteínas (mg/mL)								
	<i>Auricularia</i> sp.	<i>G. lucidum</i>	<i>G. tropicum</i>	<i>G. frondosa</i>	<i>L. strigosus</i>	<i>P. ostreatus</i> 474	<i>P. ostreatus</i> 542	<i>P. ostreatus</i> 885	<i>Macrocybe</i> sp.
AA	0,126 ± 0,01	0,171 ± 0,01	0,021 ± 0,00	0,198 ± 0,01	0,058 ± 0,00	0,189 ± 0,01	0,116 ± 0,00	0,024 ± 0,00	0,117 ± 0,00
BDA	0,100 ± 0,02	0,021 ± 0,00	0,055 ± 0,00	0,061 ± 0,01	0,078 ± 0,01	0,052 ± 0,01	0,086 ± 0,01	0,076 ± 0,00	0,131 ± 0,01
AC	0,107 ± 0,03	0,044 ± 0,00	0,029 ± 0,00	0,423 ± 0,01	0,455 ± 0,04	0,136 ± 0,00	1,074 ± 0,03	0,081 ± 0,00	0,142 ± 0,00
ACD	0,163 ± 0,00	0,083 ± 0,01	0,007 ± 0,00	0,017 ± 0,01	0,054 ± 0,00	0,076 ± 0,01	0,096 ± 0,00	0,069 ± 0,01	0,096 ± 0,01
AFS	1,061 ± 0,02	0,299 ± 0,01	0,166 ± 0,01	0,422 ± 0,00	0,100 ± 0,00	0,067 ± 0,00	0,390 ± 0,00	0,091 ± 0,01	0,615 ± 0,00
AM	0,186 ± 0,01	0,111 ± 0,01	0,055 ± 0,00	0,199 ± 0,00	0,093 ± 0,02	0,097 ± 0,01	0,166 ± 0,00	0,087 ± 0,00	0,112 ± 0,00
MFI	0,238 ± 0,03	0,362 ± 0,03	0,098 ± 0,01	0,072 ± 0,02	0,067 ± 0,01	0,214 ± 0,01	0,301 ± 0,01	0,122 ± 0,00	0,298 ± 0,01
MILK	0,155 ± 0,01	0,184 ± 0,01	0,056 ± 0,00	0,399 ± 0,01	0,104 ± 0,00	0,068 ± 0,01	1,122 ± 0,02	0,876 ± 0,07	0,204 ± 0,01
MYSA	0,177 ± 0,01	0,223 ± 0,02	0,316 ± 0,02	0,199 ± 0,01	0,124 ± 0,00	0,863 ± 0,07	1,830 ± 0,11	2,003 ± 0,28	0,894 ± 0,00

Tabela 5 - Teor proteico dos extratos provenientes da biomassa micelial de basidiomicetos, cultivados em diferentes meios de cultura, a partir da quantificação pelo método de Lowry

Meios de cultura	Concentração de proteínas (mg/mL)								
	<i>Auricularia</i> sp.	<i>G. lucidum</i>	<i>G. tropicum</i>	<i>G. frondosa</i>	<i>L. strigosus</i>	<i>P. ostreatus</i> 474	<i>P. ostreatus</i> 542	<i>P. ostreatus</i> 885	<i>Macrocybe</i> sp.
AA	0,356 ± 0,02	1,473 ± 0,03	0,200 ± 0,02	0,299 ± 0,02	0,410 ± 0,01	1,295 ± 0,02	0,062 ± 0,05	0,827 ± 0,00	0,240 ± 0,02
BDA	0,363 ± 0,00	2,400 ± 0,17	0,057 ± 0,01	1,606 ± 0,01	1,216 ± 0,06	0,953 ± 0,03	0,826 ± 0,01	1,120 ± 0,17	1,997 ± 0,02
AC	0,780 ± 0,02	1,611 ± 0,11	1,640 ± 0,12	3,938 ± 0,18	2,512 ± 0,05	1,843 ± 0,15	2,950 ± 0,02	0,855 ± 0,02	2,992 ± 0,26
ACD	0,500 ± 0,00	0,231 ± 0,03	0,068 ± 0,02	0,043 ± 0,00	0,053 ± 0,01	0,018 ± 0,00	0,121 ± 0,01	0,201 ± 0,04	0,005 ± 0,00
AFS	4,723 ± 0,06	1,612 ± 0,09	0,288 ± 0,01	0,588 ± 0,01	0,811 ± 0,03	0,985 ± 0,03	0,763 ± 0,04	1,282 ± 0,01	0,720 ± 0,06
AM	1,939 ± 0,22	2,660 ± 0,15	0,823 ± 0,05	1,147 ± 0,12	2,178 ± 0,08	1,516 ± 0,03	4,406 ± 0,30	1,285 ± 0,03	0,112 ± 0,01
MFI	5,467 ± 0,07	4,396 ± 0,09	0,046 ± 0,02	4,399 ± 0,50	3,053 ± 0,23	4,702 ± 0,13	3,837 ± 0,07	4,315 ± 0,30	4,086 ± 0,64
MILK	2,343 ± 0,03	0,840 ± 0,10	0,481 ± 0,02	1,042 ± 0,07	1,782 ± 0,03	2,127 ± 0,03	2,373 ± 0,08	1,341 ± 0,03	0,821 ± 0,00
MYSA	1,988 ± 0,06	1,654 ± 0,03	0,595 ± 0,00	3,390 ± 0,64	1,879 ± 0,00	4,134 ± 0,24	3,052 ± 0,39	2,982 ± 0,32	3,091 ± 0,20

Na quantificação por Bradford, os meios MYSA, AFS e AC proporcionaram maior aporte para a síntese proteica pelos fungos. Ao passo que, pelo método de Lowry destacam-se MFI, MYSA e AC (Figura 21). O substrato proteico pode inibir ou estimular a síntese proteica, dessa forma, é importante destacar que o meio MYSA se mostrou promissor para produção de proteínas em ambos os métodos de quantificação proteica. A produção por esse meio, pode estar relacionada às fontes de nitrogênio orgânica da sua composição, além disso, a presença do leite estimula a hidrólise da caseína, promovendo a secreção de proteases. Contudo, a clivagem dos substratos proteicos presentes no meio está relacionada à presença de sítios de clivagem específicos nas proteínas utilizadas (PRADO *et al.*, 2021).

Figura 21 – Comparação entre a quantificação de proteínas dos extratos proteicos fúngicos, nos diferentes meios de cultura, determinados pelo método de (a) Bradford e (b) Lowry



Os métodos amplamente utilizados para quantificação de proteínas solúveis incluem Bradford e Lowry, ambas sensíveis a alguns fatores, como açúcares, detergentes, compostos fenólicos e lipídeos (SHEN *et al.*, 2013). Dessa forma, o método mais preciso para determinar a concentração de proteínas está associado à hidrólise ácida seguida da análise de aminoácidos, pois a maioria dos métodos são sensíveis à composição de aminoácidos da proteína, não sendo possível determinar concentrações absolutas (WATERBORG; MATTHEWS, 1994).

O método de Lowry é baseado na reação do biureto, na qual as ligações peptídicas das proteínas reagem com o cobre, liberando-o em condições alcalinas. O cobre liberado irá reagir com o reagente de Folin, produzindo coloração amarela em sua forma oxidada. Posteriormente, o fosfomolibdotungstato é reduzido a azul de heteropolibdênio pela oxidação catalisada pelo cobre a partir de aminoácidos aromáticos.

As reações geradas resultam em uma coloração azul, que ocorre devido à redução do Folin, provavelmente pelos grupos hidroxila da tirosina, sendo a primeira cor formada com espectro de absorção diferente do final, provavelmente pela rápida formação de um complexo inicial reduzido, seguido de rearranjo para o complexo final (LARSON *et al.*, 1986; WATERBORG, 2009).

Dentre as desvantagens do método Lowry, destaca-se a estreita faixa de pH para a realização do ensaio, assim como a variedade de substâncias que causam interferências no ensaio, como ácidos nucleicos, açúcares, compostos fenólicos, detergentes, sais, íons de amônio, lipídeos e compostos de tiol. Contudo, é mais sensível a baixas concentrações de proteínas nos extratos (UPRETI *et al.*, 1988; WATERBORG, 2009).

O método de Bradford, por sua vez, baseia-se na mudança do espectro de cor de um corante para azul intenso, ao se ligar à várias concentrações de proteína, a partir da absorvância máxima na solução ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250, mudando de 465 nm para 595 nm a partir da interação eletrostática não covalente e de Van der Waals com proteínas. Assim, considerando que o corante apresenta característica aniônica, torna-se mais sensível às proteínas contendo resíduos de aminoácidos arginina e lisina e também, em menor grau, histidina e resíduos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) (UPRETI *et al.*, 1988).

Dentre os fatores que interferem no método de Bradford, podemos citar a presença de compostos fenólicos, lipídeos, detergentes, carboidratos, cálcio e magnésio nas amostras. Adicionalmente, este método detecta apenas proteínas com estrutura macromolecular contendo acima de 8-9 ligações peptídicas, além de o corante não se ligar à arginina ou lisina livre, nem a peptídeos menores que 3.000 Da, subestimando, desta forma, a concentração de proteínas na amostra (KRUGER, 2009; LEMBONG *et al.*, 2020; MIWA, FALCO, CALIJURI, 2008).

6.3. Atividades enzimáticas

6.3.1. Atividade proteolítica total

A atividade proteolítica determinada a partir do substrato azocaseína, de modo geral, foi superior no meio AM, exceto para *Auricularia* sp., *G. tropicum* e *Macrocybe*, sendo observado maiores atividades proteolíticas em AFS, AA e MYSA, respectivamente (Tabela 6). Estudos indicam que, quando os fungos utilizam o mesmo nutriente como fonte de carbono e nitrogênio, há maior expressão de protease extracelular (HUI *et al.*,

2019). Assim, pode-se inferir que os macrofungos estudados possuem atividade proteolítica acentuada quando cultivados em meios contendo teores de carbono entre 47.46 e 52.19% e 0.42 e 2.97% de nitrogênio.

Em meio contendo triptona, é necessário a produção de proteases para que ocorra a hidrólise das proteínas, levando à liberação de aminoácidos. Esse processo é chamado de amonificação, no qual os aminoácidos são metabolizados com liberação de cátion amônio (HUI *et al.*, 2019). Apesar disso, no presente estudo, a produção de proteases pelos fungos cultivados em meio MYSA (contém triptona em sua composição) não foi tão expressiva comparado ao encontrado em AM, com ênfase para as espécies do gênero *Ganoderma*, que apresentaram menores atividades (Tabela 6).

Nos meios específicos para produção de enzimas proteolíticas, MFI, MILK e MYSA, foi observado atividade de proteases, contudo, não foram as maiores atividades encontradas para os fungos avaliados, exceto *Macrocybe* sp., que apresentou maior atividade proteolítica em MYSA (Tabela 6). Em estudos avaliando a produção de proteases por *Aspergillus niger* e *Bacillus subtilis*, quando cultivados em meios similares ao MFI, foi verificado aumento significativo na expressão de proteases, sendo identificado valores superiores ao encontrado no presente trabalho. Adicionalmente, a presença de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ aumentou significativamente a atividade proteolítica (ABDEL; AHMED, 2018; HE *et al.*, 2022).

Dentre os fatores que influenciam a produção de proteases por fungos têm-se o tempo de cultivo (ABDULLAH *et al.*, 2020). Contudo, no presente trabalho, não foi observada uma relação direta entre o tempo de cultivo e a atividade proteolítica, uma vez que, *L. strigosus* atingiu crescimento máximo aos cinco dias de cultivo, nos meios AA, AM e BDA, entretanto, apresentou menor atividade proteolítica nos meios AA e BDA, comparado aos outros meios em que o crescimento micelial ultrapassou 15 dias. Por outro lado, as fontes de carbono e nitrogênio afetaram diretamente a atividade proteolítica.

Além do tempo de cultivo, a secreção de enzimas hidrolíticas pelos fungos pode ser afetada pela temperatura, umidade, concentração de O_2 e CO_2 e pH. É importante ressaltar que as reações catalisadas por enzimas se desenvolvem em condições brandas, e a temperatura ideal pode otimizar a produção enzimática (MARTÍNEZ *et al.*, 2019). Ademais, a produção de proteases é fortemente influenciada pela limitação de nitrogênio, carbono ou enxofre. Dessa forma, é possível incrementar a produção de proteases

manipulando as condições de cultivo, como disponibilidade de carbono e nitrogênio, pois ambos exercem efeitos regulatórios sobre a síntese da enzima, além disso, regem o custo de qualquer processo de síntese de enzimas microbianas.

No que diz respeito à atividade proteolítica utilizando-se caseína como substrato, observou-se maior variação de atividade de proteases entre os meios de culturas e os fungos avaliados. Os meios indicados como indutores da síntese de proteases apresentaram as maiores atividades, sendo estes MFI para *G. lucidum* e *P. ostreatus* 474, e MYSA para *G. tropicum*, *L. strigosus* e *G. frondosa*. Adicionalmente, ao comparar os resultados obtidos a partir de ambos os ensaios, verificou-se que *Auricularia* sp. exibiu maior atividade proteolítica quando cultivada em AFS (tabela 7).

Tabela 6 - Atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato, em extratos proteicos da biomassa micelial de basidiomicetos cultivados em diferentes condições de meios de cultura

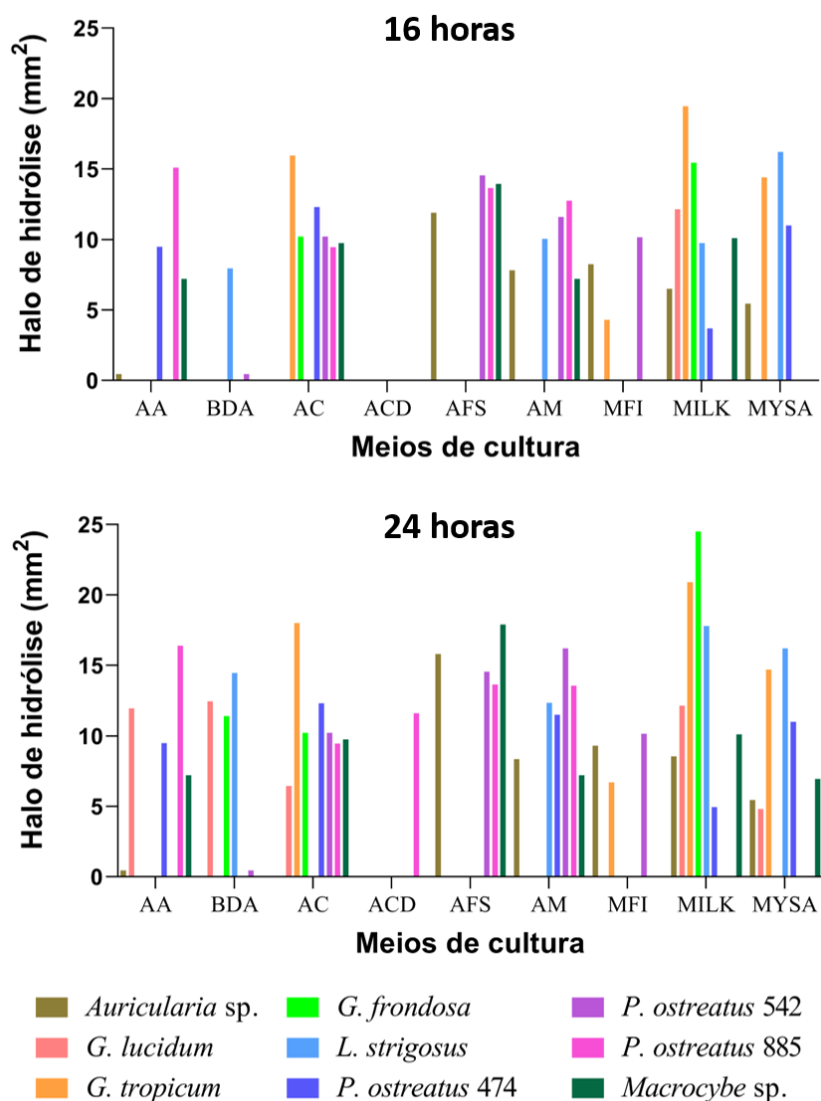
Meios de cultura	Atividade proteolítica (UA/mL)								
	<i>Auricularia</i> sp.	<i>G. lucidum</i>	<i>G. tropicum</i>	<i>G. frondosa</i>	<i>L. strigosus</i>	<i>P. ostreatus</i> 474	<i>P. ostreatus</i> 542	<i>P. ostreatus</i> 885	<i>Macrocybe</i> sp.
AA	15,80 ± 0,30	24,70 ± 0,50	30,93 ± 0,55	1,10 ± 0,10	7,15 ± 0,35	17,10 ± 0,70	2,55 ± 0,25	6,55 ± 0,35	16,13 ± 0,55
BDA	7,17 ± 0,06	4,90 ± 0,20	12,60 ± 0,61	11,90 ± 0,95	9,75 ± 0,15	8,50 ± 0,30	2,20 ± 0,10	3,35 ± 0,15	0,05 ± 0,00
AC	16,37 ± 0,95	6,93 ± 0,35	7,97 ± 0,97	3,95 ± 0,75	1,63 ± 0,06	21,93 ± 0,51	4,0 ± 0,40	15,95 ± 0,05	9,10 ± 1,00
ACD	1,53 ± 0,15	2,65 ± 0,15	5,50 ± 0,70	0,20 ± 0,00	3,25 ± 0,05	2,37 ± 0,25	0,02 ± 0,00	0,65 ± 0,05	2,30 ± 0,10
AFS	41,95 ± 0,15	28,77 ± 1,59	24,40 ± 1,20	27,43 ± 0,65	9,50 ± 0,30	21,67 ± 0,15	9,60 ± 0,90	3,35 ± 0,65	18,75 ± 1,25
AM	25,33 ± 0,06	36,50 ± 0,40	2,07 ± 0,55	39,70 ± 3,90	36,35 ± 0,65	65,45 ± 0,35	77,53 ± 0,67	27,20 ± 0,90	29,60 ± 0,40
MFI	21,10 ± 0,60	24,20 ± 0,20	14,90 ± 0,00	25,25 ± 0,75	3,50 ± 0,00	0,10 ± 0,00	2,65 ± 0,05	9,0 ± 0,44	5,70 ± 1,00
MILK	10,80 ± 0,36	21,30 ± 1,10	21,75 ± 0,55	27,13 ± 1,30	10,6 ± 0,60	10,50 ± 0,00	1,35 ± 0,15	3,43 ± 0,06	0,02 ± 0,00
MYSA	30,65 ± 1,45	0,05 ± 0,00	1,65 ± 0,15	21,75 ± 1,85	19,85 ± 0,35	48,03 ± 0,85	2,75 ± 0,55	23,0 ± 1,80	29,87 ± 0,50

Tabela 7 - Atividade proteolítica utilizando caseína como substrato, em extratos proteicos da biomassa micelial de basidiomicetos cultivados em diferentes condições de meios de cultura

Meios de cultura	Atividade proteolítica (UA/mL)								
	<i>Auricularia</i> sp.	<i>G. lucidum</i>	<i>G. tropicum</i>	<i>G. frondosa</i>	<i>L. strigosus</i>	<i>P. ostreatus</i> 474	<i>P. ostreatus</i> 542	<i>P. ostreatus</i> 885	<i>Macrocybe</i> sp.
AA	1,57 ± 0,21	1,93 ± 0,35	-	4,73 ± 0,12	-	1,63 ± 0,06	0,70 ± 0,00	2,43 ± 0,25	7,40 ± 0,20
BDA	1,60 ± 0,20	-	4,17 ± 0,06	0,10 ± 0,00	1,43 ± 0,06	-	2,77 ± 0,12	2,17 ± 0,25	7,50 ± 0,25
AC	3,90 ± 0,30	-	1,0 ± 0,00	7,27 ± 0,21	4,43 ± 0,06	5,63 ± 0,35	3,53 ± 0,35	3,33 ± 0,15	10,73 ± 0,21
ACD	0,57 ± 0,06	1,70 ± 0,00	-	0,27 ± 0,06	-	1,60 ± 0,10	19,43 ± 0,35	-	1,93 ± 0,15
AFS	69,40 ± 0,00	-	2,70 ± 0,20	26,13 ± 0,31	0,23 ± 0,06	-	34,03 ± 0,65	7,40 ± 0,20	20,93 ± 0,35
AM	4,23 ± 0,25	-	3,50 ± 0,20	3,17 ± 0,06	-	5,93 ± 0,55	1,07 ± 0,06	-	3,97 ± 0,06
MFI	9,23 ± 0,25	26,60 ± 0,30	4,17 ± 0,06	28,03 ± 0,31	-	14,73 ± 0,15	-	-	3,10 ± 0,20
MILK	1,87 ± 0,06	6,30 ± 0,10	-	-	-	-	-	-	4,51 ± 0,19
MYSA	0,40 ± 0,00	13,10 ± 0,30	10,37 ± 0,06	34,27 ± 0,25	5,33 ± 0,35	-	-	2,90 ± 0,20	0,10 ± 0,00

A atividade proteolítica dos extratos fúngicos cultivados em diferentes meios também foi determinada a partir do método em placas contendo leite desnatado, no qual avalia a atividade de protease extracelulares a partir da formação de halo de hidrólise (PERWENDHA; OETARI; SJAMSURIDZAL, 2020). A partir desse ensaio, de modo geral, houve aumento da atividade proteolítica entre o intervalo de 16 h e 24 h de incubação. Dentre os meios de cultura avaliados, os extratos provenientes dos cultivos em AFS apresentaram maiores halos de hidrólise para *P. ostreatus* 542, *Auricularia* sp. e *Macrocybe* sp. (Figura 22).

Figura 22 – Atividade proteolítica em placa de extratos proteicos proveniente da biomassa micelial de basidiomicetos, cultivados em diferentes condições de meios de cultura, observada após 16 e 24 horas de incubação



O presente trabalho apresentou resultados superiores aos relatados na literatura, ao avaliarem a atividade proteolítica de *Ganoderma* sp., *Lentinus* sp. e *P. florida* (DEVI *et al.*, 2020; VIDHYA, 2019). É importante ressaltar que, em todos os ensaios realizados para avaliar a atividade proteolítica, a espécie *Auricularia* sp. quando cultivada em AFS apresentou altas atividades. Adicionalmente, pode-se observar que nos diferentes ensaios proteolíticos, as amostras apresentaram comportamentos variados, uma vez que, cada método é baseado em um princípio específico.

6.3.2. Atividade de serino e cisteíno-proteases

A atividade de serino-proteases utilizando *N*-benzoil-arginina *p*-nitroanilida (BAPNA) como substrato revela a atividade de proteases do tipo tripsina. Assim, os extratos fúngicos apresentaram baixa atividade de tripsina nos diferentes meios cultivo avaliados, exceto para *Auricularia* sp. em AFS, confirmando os dados obtidos nas atividades proteolíticas com substratos inespecíficos. Adicionalmente, *Macrocybe* sp. não exibiu atividade de tripsina em todos os meios de cultura estudados, ao passo que, *G. tropicum* exibiu atividade apenas nos meios MILK e MYSA e, *G. frondosa* em AC e MYSA (Tabela 8).

Estudos apontam que a expressão de proteases do tipo tripsina por fungos pode estar associada à colonização em tecidos vivos, como árvores, uma vez que a maior parte do nitrogênio da madeira está na forma de proteínas. Dessa forma, as proteases são sintetizadas com a finalidade de metabolizar essas proteínas (INACIO *et al.*, 2015; KUDRYAVTSEVA *et al.*, 2008). Logo, é possível inferir que, pela natureza saprofítica de *Macrocybe* sp., pode ser que o mesmo não produza proteases do tipo tripsina de forma significativa para ser quantificada pelo ensaio. Enquanto, *Auricularia* sp., que é capaz de colonizar árvores vivas, apresentou a melhor atividade, indicando maior produção de serinoproteases do tipo tripsina.

Quanto à atividade de serino-proteases utilizando-se benzoil-tirosina *p*-nitroanilida (BTpNA), para determinação de proteases do tipo quimotripsina, observou-se que a maioria das amostras fúngicas, nos diferentes meios de cultura, apresentaram alguma atividade de quimotripsina, com ênfase para *P. ostreatus* 542 no meio AM; *G. frondosa* em MFI e *Auricularia* sp., *G. lucidum* e *L. strigosus* em AFS. Adicionalmente, verificou-se a mesma tendência obtida para proteases do tipo tripsina quanto às espécies

G. tropicum e *P. ostreatus* 474 e 885, em que permaneceram apresentando baixos valores enzimáticos (Tabela 9).

Dentre a classe das cisteíno-proteases, detectadas a partir do substrato *N*α-benzoil-DL-arginina-β-naftilamida (BANA), verificou-se potencial atividade de proteases do tipo papaína apenas nos extratos provenientes de *Auricularia* sp., quando cultivada nos meios AFS, MFI e MILK. Enquanto, para as outras espécies, as atividades máximas observadas variaram de 3,00 a 8,05 UA/mL (Tabela 10).

Tabela 8 - Atividade de serino-proteases utilizando N-benzoil-arginina p-nitroanilida (BAPNA) nos extratos proteicos provenientes da biomassa micelial de basidiomicetos, cultivados em diferentes condições de meios de cultura

Meios de cultura	Atividade de serino-proteases (UA/mL)								
	<i>Auricularia</i> sp.	<i>G. lucidum</i>	<i>G. tropicum</i>	<i>G. frondosa</i>	<i>L. strigosus</i>	<i>P. ostreatus</i> 474	<i>P. ostreatus</i> 542	<i>P. ostreatus</i> 885	<i>Macrocybe</i> sp.
AA	2,15 ± 0,55	-	-	-	0,95 ± 0,05	2,75 ± 0,05	1,25 ± 0,05	4,60 ± 1,00	-
BDA	-	0,13 ± 0,07	-	-	-	0,65 ± 0,15	0,55 ± 0,05	-	-
AC	-	0,95 ± 0,05	-	1,55 ± 0,05	0,15 ± 0,05	1,50 ± 0,20	-	4,85 ± 0,05	-
ACD	-	-	-	-	1,20 ± 0,50	-	0,62 ± 0,08	0,25 ± 0,05	-
AFS	79,87 ± 0,06	1,15 ± 0,30	-	-	-	1,08 ± 0,13	3,50 ± 0,20	1,25 ± 0,35	-
AM	2,50 ± 0,30	1,3 ± 0,65	-	-	6,50 ± 0,30	-	22,25 ± 0,55	4,45 ± 0,15	-
MFI	4,33 ± 0,48	-	-	-	-	-	2,65 ± 0,55	4,40 ± 0,20	-
MILK	2,15 ± 0,05	-	0,10 ± 0,00	-	-	0,20 ± 0,00	11,75 ± 0,35	0,35 ± 0,05	-
MYSA	3,2 ± 0,30	-	1,33 ± 0,28	1,95 ± 0,15	2,58 ± 0,03	-	21,90 ± 0,70	16,0 ± 0,90	-

Tabela 9 - Atividade de serino-proteases utilizando benzoil-tirosina p-nitroanilida (BTpNA) nos extratos proteicos provenientes da biomassa micelial de basidiomicetos, cultivados em diferentes condições de meios de cultura

Meios de cultura	Atividade de serino-proteases (UA/mL)								
	<i>Auricularia</i> sp.	<i>G. lucidum</i>	<i>G. tropicum</i>	<i>G. frondosa</i>	<i>L. strigosus</i>	<i>P. ostreatus</i> 474	<i>P. ostreatus</i> 542	<i>P. ostreatus</i> 885	<i>Macrocybe</i> sp.
AA	1,75 ± 0,35	2,25 ± 0,45	0,75 ± 0,15	2,05 ± 0,15	1,25 ± 0,05	4,45 ± 0,25	-	1,45 ± 0,15	3,45 ± 0,55
BDA	3,20 ± 0,50	2,20 ± 0,30	1,30 ± 0,30	9,15 ± 0,65	3,00 ± 0,50	-	0,70 ± 0,00	0,65 ± 0,05	4,60 ± 0,70
AC	0,80 ± 0,00	1,10 ± 0,10	0,80 ± 0,20	3,65 ± 0,45	-	0,35 ± 0,35	-	3,25 ± 0,05	1,65 ± 0,15
ACD	-	2,85 ± 0,05	0,40 ± 0,20	2,45 ± 0,05	1,10 ± 0,10	0,55 ± 0,25	0,60 ± 0,00	5,90 ± 0,30	4,00 ± 0,80
AFS	14,45 ± 0,05	18,30 ± 0,30	0,25 ± 0,25	15,15 ± 0,35	21,35 ± 0,75	2,50 ± 0,00	8,50 ± 0,30	2,75 ± 0,05	2,85 ± 0,15
AM	0,55 ± 0,05	2,50 ± 0,30	-	9,85 ± 0,85	4,05 ± 0,55	-	50,45 ± 0,15	4,85 ± 0,75	4,40 ± 0,10
MFI	4,15 ± 0,05	0,35 ± 0,05	0,20 ± 0,10	21,50 ± 0,90	0,85 ± 0,35	3,10 ± 0,20	5,55 ± 0,25	-	2,30 ± 0,00
MILK	4,60 ± 0,30	1,45 ± 0,45	5,80 ± 0,90	-	-	-	6,00 ± 0,60	7,50 ± 0,80	-
MYSA	0,95 ± 0,15	-	1,10 ± 0,40	2,80 ± 0,50	-	4,60 ± 0,00	7,15 ± 0,25	-	-

Tabela 10 - Atividade de cisteíno-proteases utilizando N α -benzoil-DL-arginina- β -naftilamida (BANA) nos extratos proteicos provenientes da biomassa micelial de basidiomicetos, cultivados em diferentes condições de meios de cultura

Meios de cultura	Atividade de cisteíno-proteases (UA/mL)								
	<i>Auricularia</i> sp.	<i>G. lucidum</i>	<i>G. tropicum</i>	<i>G. frondosa</i>	<i>L. strigosus</i>	<i>P. ostreatus</i> 474	<i>P. ostreatus</i> 542	<i>P. ostreatus</i> 885	<i>Macrocybe</i> sp.
AA	0,17 \pm 0,13	2,15 \pm 0,45	0,45 \pm 0,05	0,45 \pm 0,05	0,40 \pm 0,00	0,55 \pm 0,05	-	1,28 \pm 0,13	0,85 \pm 0,05
BDA	1,20 \pm 0,00	2,65 \pm 0,05	-	5,73 \pm 0,88	0,60 \pm 0,00	-	0,68 \pm 0,13	0,30 \pm 0,10	2,25 \pm 0,35
AC	0,70 \pm 0,10	-	3,40 \pm 0,90	3,65 \pm 0,25	0,05 \pm 0,05	4,55 \pm 0,55	-	1,30 \pm 0,10	6,20 \pm 0,60
ACD	-	0,23 \pm 0,08	-	0,10 \pm 0,00	-	-	-	0,40 \pm 0,10	0,90 \pm 0,30
AFS	32,85 \pm 0,05	1,20 \pm 0,20	0,60 \pm 0,40	1,15 \pm 0,05	1,45 \pm 0,35	0,20 \pm 0,00	2,75 \pm 0,35	-	2,15 \pm 0,15
AM	5,28 \pm 0,33	2,90 \pm 0,10	-	0,45 \pm 0,25	2,20 \pm 0,50	1,05 \pm 0,15	-	5,40 \pm 0,20	0,55 \pm 0,05
MFI	21,0 \pm 0,20	5,65 \pm 0,05	0,35 \pm 0,15	1,25 \pm 0,35	4,25 \pm 0,45	2,60 \pm 0,30	3,00 \pm 0,70	-	4,75 \pm 0,85
MILK	16,90 \pm 0,00	0,60 \pm 0,10	0,60 \pm 0,20	-	0,75 \pm 0,05	2,25 \pm 0,15	0,95 \pm 0,15	1,60 \pm 0,20	1,50 \pm 0,50
MYSA	2,75 \pm 0,45	-	0,90 \pm 0,40	2,20 \pm 0,00	1,50 \pm 0,00	0,43 \pm 0,18	3,15 \pm 0,55	8,05 \pm 0,15	-

6.3.3. Atividade fibrinolítica

A atividade fibrinolítica dos extratos proteicos foi avaliada de acordo com a formação de halos de clarificação (clareza dos círculos líticos), produzidos a partir da ação fibrinolítica na dissolução de coágulos. Assim, apenas alguns fungos apresentaram atividade fibrinolítica, com tendência ao aumento dessa atividade em um período de 24 horas de incubação (Tabelas 11).

A espécie *Auricularia* sp., apesar de não ter obtido crescimento máximo em 15 dias de cultivo, nos meios avaliados, apresentou atividade fibrinolítica quando cultivado em AFS, AM e MFI, sendo este último, o meio em que a espécie exibiu maior taxa de crescimento e atividade caseinolítica em placa. Além disso, quando cultivada em AFS, *Auricularia* sp. apresentou as maiores atividades de serino e cisteíno-proteases, utilizando os substratos BApNA e BANA, respectivamente. As atividades de proteases fibrinolíticas observadas no presente trabalho para *Auricularia* sp. corroboram com dados da literatura, em que descrevem a presença dessas enzimas no micélio e basidiocarpo de *Auricularia polytricha* (CHUGH *et al.*, 2022).

Macrocybe sp. foi a espécie fúngica que apresentou maiores atividades fibrinolíticas, com destaque para o cultivo em AFS. Ao passo que, *L. strigosus* exibiu maior atividade fibrinolítica em MYSA (Tabelas 11). É importante ressaltar que, dentre os artigos que avaliam enzimas fibrinolíticas a partir de fungos, grande parte refere-se aos organismos pertencentes ao filo Ascomycota ou Basidiomycota, representando 98% das espécies terrestres (BATISTA *et al.*, 2020; MARTÍNEZ *et al.*, 2019).

É importante destacar que as enzimas fibrinolíticas atuam direta ou indiretamente na degradação da fibrina e, sua produção a partir de microrganismos é influenciada pela composição do meio de fermentação, principalmente fontes de carbono e nitrogênio, assim como tempo de crescimento, pH e temperatura. Dessa forma, cada organismo é capaz de atingir a produção enzimática máxima em condições específicas, sendo os componentes do meio e parâmetros de cultura essenciais no processo biológico (CARDOSO *et al.*, 2022).

Tabela 11 - Atividade fibrinolítica após 24 h de incubação dos extratos proteicos provenientes da biomassa micelial de basidiomicetos, cultivados em diferentes meios de cultura

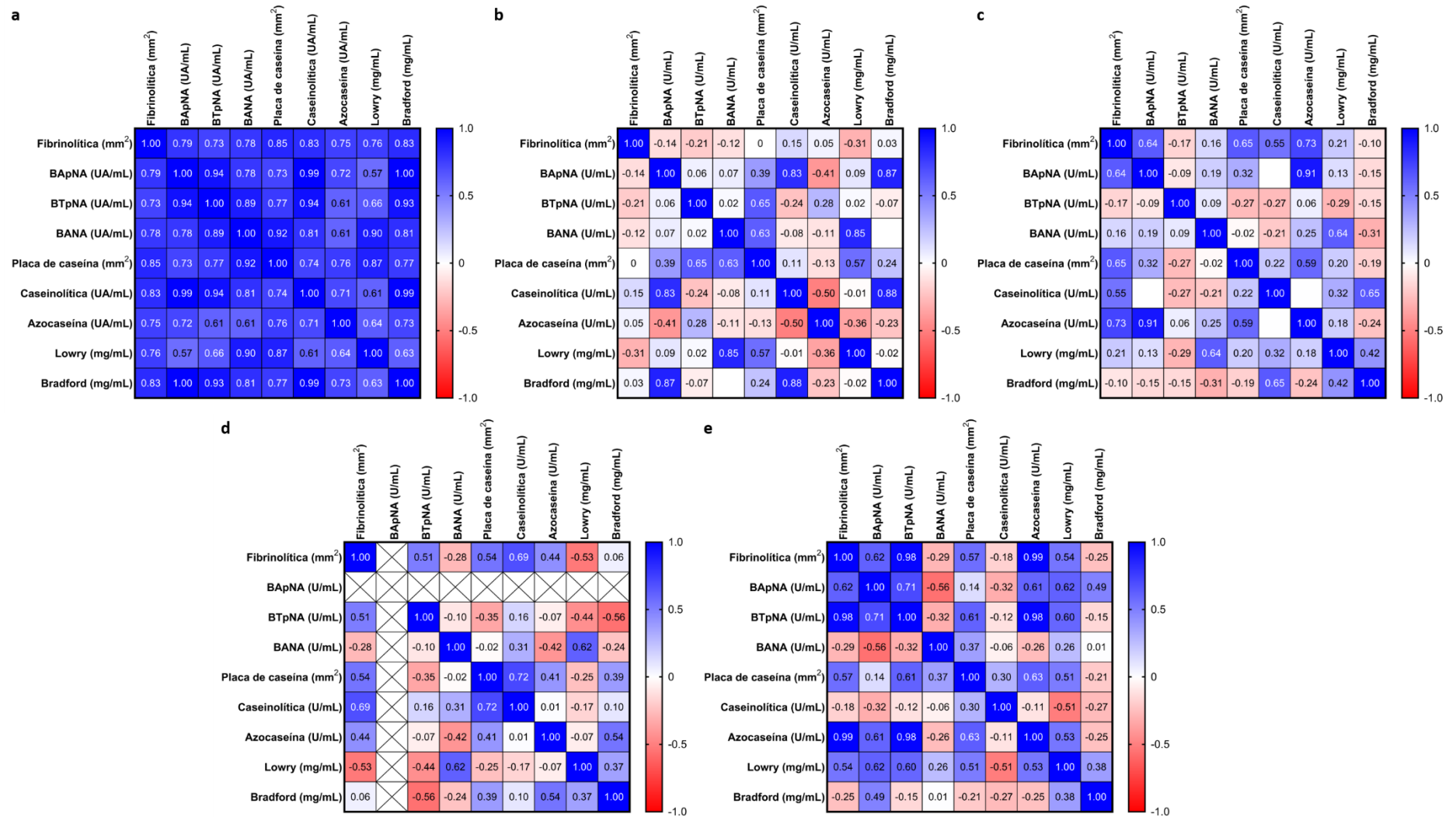
Meios de cultura	Atividade fibrinolítica (mm ²)								
	<i>Auricularia</i> sp.	<i>G. lucidum</i>	<i>G. tropicum</i>	<i>G. frondosa</i>	<i>L. strigosus</i>	<i>P. ostreatus</i> 474	<i>P. ostreatus</i> 542	<i>P. ostreatus</i> 885	<i>Macrocybe</i> sp.
AA	-	-	-	-	-	-	-	-	11,70 ± 0,64
BDA	-	-	-	-	6,75 ± 0,00	-	-	-	7,05 ± 0,21
AC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACD	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AFS	13,65 ± 0,00	-	-	-	-	-	-	-	19,95 ± 0,00
AM	8,10 ± 0,21	-	-	-	11,85 ± 0,00	-	6,45 ± 0,00	-	13,50 ± 0,00
MFI	6,70 ± 0,07	-	6,45 ± 0,00	-	-	-	-	-	-
MILK	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MYSA	-	-	-	-	19,75 ± 0,07	-	-	-	-

A Correlação Linear de Pearson foi realizada apenas para espécies que apresentaram atividade fibrinolítica e, de acordo com esta análise, observou-se que *Auricularia* sp. apresentou uma relação diretamente proporcional entre o teor proteico (Bradford) e a atividade caseinolítica e de serino-proteases (quantificadas a partir dos substratos BAPNA e BTPNA). Adicionalmente, é possível verificar alta correlação entre a atividade caseinolítica em placa e a atividade fibrinolítica e de cisteíno-proteases (determinadas com o substrato enzimático BANA), sugerindo ser um método, de baixo custo, a ser levado em consideração na triagem de atividade fibrinolítica (Figura 23a).

Dentre as espécies do gênero *Ganoderma* analisadas, somente *G. tropicum* cultivado em MFI apresentou atividade fibrinolítica. Adicionalmente, apesar de essa espécie ter exibido atividade caseinolítica em placa de caseína, observou-se apenas atividade de proteases do tipo quimotripsina. Quanto à correlação linear de Pearson, verificou-se maiores correlações apenas entre a quantidade de proteína (Bradford) e atividade caseinolítica e serino-proteases do tipo tripsina (BAPNA), assim como entre a quantidade de proteínas (Lowry) e de cisteíno-proteases (BANA) (Figura 23b).

L. strigosus exibiu atividade fibrinolítica quando cultivado em BDA, AM e MYSA. Nos dois primeiros meios, a espécie atingiu crescimento máximo em cinco dias. Ambos os extratos apresentaram atividade caseinolítica em placa, e também maiores atividades de serino-proteases. Além disso, a relação mais forte estabelecida entre os ensaios foi entre a atividade de serino-proteases do tipo tripsina e proteases totais (azocaseína) (figura 23c). É importante destacar que há relatos da ação fibrinolítica de serinoproteases provenientes de *L. edodes*, na qual foi possível sintetizar nanopartículas de selênio usando proteína precipitada (ALI *et al.*, 2018).

Figura 23 - Correlação Linear de Pearson dos extratos proteicos das espécies com atividade fibrinolítica. (a) *Auricularia* sp., (b) *G. tropicum*, (c) *L. strigosus*, (d) *Macrocybe* sp. e (e) *P. ostreatus* 542.



Macrocybe sp., cultivado nos meios AA, AFS, AM e BDA, apesar de ter apresentado atividade fibrinolítica e de serino-proteases do tipo quimotripsina (BTPNA), não exibiu atividade proteolítica em placa. Adicionalmente, nos extratos provenientes desses meios não foi observada relação direta com nenhuma das variáveis em estudo (Figura 23d). A literatura relata a presença de proteases fibrinolíticas termotolerantes em extratos metanólicos de *Macrocybe crassa*. Por ser amplamente consumido por povos tailandeses, é sugerido que o consumo de *M. crassa* seja cru para obter atividade máxima, e quando necessário o aquecimento, que este não ultrapasse um minuto (GHOSH; ACHARYA, 2022).

Dentre as linhagens de *P. ostreatus* investigadas, somente *P. ostreatus* 542 cultivada em AM exibiu halo de hidrólise no ensaio fibrinolítico. Adicionalmente, esse extrato apresentou apenas atividade específica para serinoproteases, com ênfase em quimotripsina (BTPNA). Nesse contexto, a maior correlação estabelecida ocorreu entre a atividade fibrinolítica e de quimotripsina (BTNA) e protease total (azocaseína) (Figura 23e). Stohnii *et al.* (2020) identificaram uma protease fibrinolítica com características similares às serinoproteases, capazes de clivar preferencialmente o fragmento C-terminal de 25 kDa das cadeias alfa, indicando o papel fundamental da ação dessa enzima na agregação plaquetária.

Rovati *et al.* (2010), ao manterem culturas de *Bionectria* sp. em meio MYSA e Czapek – Malte para produção de proteases fibrinolíticas, obtiveram atividades de 100,2 e 107,9 U/mL em unidades equivalentes de plasmina. Além disso, espécies de macrofungos também são relatadas por apresentarem altas atividades fibrinolíticas e inibidoras da trombina, conforme relatado para as espécies *P. ferulae*, *G. frondosa* e *Agrocybe aegerita* (CHOI *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2021a; SEOK *et al.*, 2019).

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, pode-se inferir que o meio ágar aveia é o mais favorável ao crescimento da maioria das espécies estudadas, destacando *P. ostreatus* 474, *L. strigosus* e *G. lucidum*, sugerindo-se os teores de carbono em 51.15%, nitrogênio em 0,85% e relação C/N de 60,18.

Os métodos de quantificação proteica, Lowry e Bradford, demonstraram ampla variação, contudo, ambos indicaram que a expressão de proteínas ocorreu de forma acentuada no meio MYSA. Além disso, a atividade proteolítica total variou de acordo com o método utilizado. Contudo, as espécies *Auricularia* sp. e *P. ostreatus* 474 apresentaram alta produção de proteases, principalmente quando cultivadas nos meios AFS e AM.

A maior produção de serino- e cisteíno-proteases foi observada para *Auricularia* sp., cultivado nos meios AFS e AM. Adicionalmente, a atividade fibrinolítica foi expressiva em *Macrocybe* sp., cultivado em AFS, e *L. strigosus* em meio MYSA. No geral, somente os meios AA, BDA, AFS, AM, MFI e MYSA estimularam a produção de proteases fibrinolíticas, destacando AFS, AM e MYSA

À vista do exposto, a realização de mais estudos que visem avaliar a influência de fatores que estimulam a produção de enzimas fibrinolíticas por basidiomicetos, principalmente de origem amazônica, são fundamentais a fim de garantir a maximização na obtenção dessas enzimas, bem como para aplicação industrial e/ou farmacológica dessas moléculas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL, W. A.; AHMED, S. A. Response surface methodology for production, characterization and application of solvent, salt and alkali-tolerant alkaline protease from isolated fungal strain *Aspergillus niger*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 447–458. 2018.

ABDELSHAFY, A. M. *et al.* A comprehensive review on phenolic compounds from edible mushrooms: Occurrence, biological activity, application and future prospective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-21. 2021.

ABDULLAH A. N. *et al.* Characterization and fermentation optimization of novel thermo stable alkaline protease from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-82 from the Saudi Arabian environment for eco-friendly and industrial applications. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 1, p. 1258–1264, 2020.

AGUIAR, L. V. B. *et al.* Production of commercial and Amazonian strains of *Pleurotus ostreatus* in plant waste. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 6, p. 47299-47321, 2022.

AGBOWURO, A. A. *et al.* Proteases and protease inhibitors in infectious diseases. **Medicinal Research Reviews**, v. 38, n. 4, p. 1295–1331, 2018.

AGRAWAL, D. G.; SANDHU, S. S. Antibacterial and fibrinolytic potential of Himalayan soft gold mushroom *Cordyceps sinensis*. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 38–44, 2020.

AHMAD *et al.* Impact of sawdust using various woods for effective cultivation of oyster mushroom. **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, n. 1, p. 399-402, 2012.

ALI, S. M. *et al.* Surface decoration of selenium nanoparticles by proteins from the culinary-medicinal shiitake mushroom, *Lentinus edodes* (agaricomycetes), for enhanced fibrinolytic activity. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 20, n. 11, p. 1021–1030, 2018.

ALTAF, F.; WU, S.; KASIM, V. Role of fibrinolytic enzymes in anti-thrombosis therapy. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, p. 680397, 2021.

AMIDI, A. *et al.* EnzyNet: Enzyme classification using 3D convolutional neural networks on spatial representation. **Peer Journal Bioinformatics and Genomics**, v. 2018, n. 5, p. 1–18, 2018.

ANN B. M. What is in a name? (Or a number?): The updated enzyme classifications. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 47, n. 4, p. 481-483. 2019.

ANTONIO *et al.* Efeitos de enzimas fibrolíticas sobre a degradação *in situ* da matéria seca e da fibra de forrageiras. **Agrarian**, v. 11, n. 42, p. 363-370, 2018.

AO, T.; DEB, C. R. Nutritional and antioxidant potential of some wild edible mushrooms of Nagaland, India. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 1084–1089, 2019.

AQUINO, Y. K.; DULAY, R. M.; KALAW, S. Effect of *Lentinus strigosus* extract on the food intake and locomotion of N2 wild strain *Caenorhabditis elegans* as model for obesity. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 10, n. 12, p. 023–028, 2020.

ARONSON, D.; BRENNER, B. Arterial thrombosis and cancer. **Thrombosis Research**, v. 164, p. S23–S28, 2018.

ATHAYDE *et al.* Temperature influence on the mycelial growth of *Lentinula edodes* strains. **Ambiência**, v. 6, n. 3, p. 503-509, 2010.

ATILA, F. Comparative study on the mycelial growth and yield of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) Karst. on different lignocellulosic wastes. **Acta Ecologica Sinica**, v. 40, n. 2, p. 153–157, 1 abr. 2020.

BADALYAN, S. M.; BORHANI, A. Morphological and growth characteristics of mycelial collections of medicinal xylophilic mushrooms (Agaricomycetes) distributed in forests of Northern Iran. **Chemistry and Biology**, v. 53, n. 2, p. 97-106, 2019.

BAE, B. *et al.* Growth Characteristics of polyporales mushrooms for the mycelial mat formation. **Mycobiology**, v. 49, p. 280–284, 2021.

BANERJEE, G.; RAY, A. K. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 33, n. 2, p. 119–143, 2017.

BARBOSA, J. V. C. *et al.* Trombose arterial em microcirculação pós-Covid 19: Relato de caso. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e50410413857, 2021.

BARUZZI, A. C.; STEFANINI, E.; MANZO, G. Fibrinolíticos: indicações e tratamento das complicações hemorrágicas. **Revista Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo** p. 421-427, 2018.

BATISTA, J. M. S. *et al.* Purification and biochemical characterization of an extracellular fructosyltransferase-rich extract produced by *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, p. 101647, 2020.

BETTIN, F. *et al.* Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 1–9, 2009.

BHARADWAJ, S. *et al.* Discovery of *Ganoderma lucidum* triterpenoids as potential inhibitors against Dengue virus NS2B-NS3 protease. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

BLUMFIELD, M. *et al.* Examining the health effects and bioactive components in *Agaricus bisporus* mushrooms: a scoping review. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 84, p. 108453, 2020.

BOND, J. S. Proteases: History, discovery, and roles in health and disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 5, p. 1643–1651, 2019.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRITO, A. K. P. DE *et al.* Avaliação de substratos de floresta tropical para cultivo e produção de proteases por *Pleurotus djamor*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e31810313385, 2021.
- BRITO, C. E. *et al.* Production and partial characterization of aspartic proteases synthesized by *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 (Polyporaceae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 14, p. 463-472, 2019.
- BUTKHUP, L.; SAMAPPITO, W.; JORJONG, S. Evaluation of bioactivities and phenolic contents of wild edible mushrooms from northeastern Thailand. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 193–202, 2018.
- BHUPATHI, P.; SUBBAIAH, K. A. Comparison of colony morphology, sporophore characters and yield performance of wild and cultivated milky mushroom isolates. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 2405-2420, 2019.
- BYRNES, James R.; WOLBERG, Alisa S. Red blood cells in thrombosis. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 130, n. 16, p. 1795-1799, 2017.
- CAMPOS, C. *et al.* Seleção de basidiomicetos proteolíticos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 14, n. 1, p. 45–49, 2011.
- CARDOSO, K. B. B. *et al.* View of Systematic analysis on the obtaining of fibrinolytic fungi enzymes. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, 2022.
- CHAIYADIT, K.; CHAIRIN, T. Potential of edible mushroom *Pleurotus* spp. for controlling root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and their cuticle degrading enzyme production. **Songklanakarin Journal of Science & Technology**, p. 60–65, 2022.
- CHI, J. H. *et al.* Optimal condition of mycelial growth of *Grifola frondosa*. **The Korean Journal of Mycology**, v. 35, n. 2, p. 76-80, 2007.
- CHOI, J. H. *et al.* Purification and partial characterization of a fibrinolytic enzyme from the fruiting body of the medicinal and edible mushroom *Pleurotus ferulae*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 6, p. 539–546, 2017.
- CHOI, J.; KIM, S. Fibrinolytic and Thrombolytic Effects of an Enzyme Purified from the Fruiting Bodies of *Boletus pseudocalopus* (Agaricomycetes) from Korea. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 23, n. 4, 2021.
- CHUGH, R. M. *et al.* Fungal mushrooms: A natural compound with therapeutic applications. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 2022.
- CLEMENTINO, E. L. *et al.* Produção e caracterização de protease fibrinolítica de *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 1, p. 123–129, 2017.

- CLEMENTINO, E. L. *et al.* Integrated production and purification of fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 2, p. 553–562, 1 mar. 2019.
- COLLA, I. M. *et al.* Carbon-to-nitrogen ratios on laccase and mushroom production of *Lentinus crinitus*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, p. 1-12, 2022.
- CORREA, E. *et al.* Leishmanicidal activity of *Pycnoporus sanguineus*. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 20, n. 6, p. 497-499, 2006.
- CRUZ, A. C. B. *et al.* Bioinsecticidal activity of a novel Kunitz trypsin inhibitor from Catanduva (*Piptadenia moniliformis*) seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 61-68, 2013.
- DAS, A. K. *et al.* Edible mushrooms as functional ingredients for development of healthier and more sustainable muscle foods: A flexitarian approach. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2463, 2021.
- DAS, A. K. *et al.* Edible mushrooms as functional ingredients for development of healthier and more sustainable muscle foods: A flexitarian approach. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2463, 2021.
- DÁVILA G, L. R. *et al.* Evaluation of nutritional values of wild mushrooms and spent substrate of *Lentinus crinitus* (L.) Fr. **Heliyon**, v. 6, n. 3, 2020.
- DE OLIVEIRA J. S. D. *et al.* Production of lignocellulolytic enzymes and phenolic compounds by *Lentinus strigosus* from the amazon using solid-state fermentation (SSF) of guarana (*Paullinia cupana*) residue. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 7, p. 2882–2900, 2022.
- DELMASCHIO, I. B. Enzimas na alimentação de animais monogástricos. **Revista Científica de Medicina Veterinária-UNORP**, v. 2, n. 1, p. 6–20, 2018.
- DEVI, S. K. *et al.* Sequestration and purification of essential enzyme from *Pleurotus florida* compost waste and its application studies. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 6-8, 2020.
- DEVI, S; SUMBALI, G. Suitability of three different cereal grains for spawn development and their impact on the growth and yield of *Macrocybe gigantea* (Massee) Pegler & Lod. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 13, n. 1, p. 204-209, 2021.
- DIAS, L. P. *et al.* Outcome of blue, green, red, and white light on *Metarhizium robertsii* during mycelial growth on conidial stress tolerance and gene expression. **Fungal Biology**, v. 124, n. 5, p. 263–272, 2020.
- DICKS, L.; ELLINGER, S. Effect of the intake of oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) on cardiometabolic parameters. **A systematic review of clinical trials. Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1134, 2020.

DONINI, L. P. *et al.* Efeito da suplementação com farelos no crescimento *in vitro* de *Pleurotus ostreatus* em meios à base de capim-elefante (*Pennisetum* spp.). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, p. 303-309, 2022.

DOS SANTOS A. J. G.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, n. October 2017, p. 253–262, 2018.

DU, F. *et al.* Comparative transcriptomic analysis reveals molecular processes involved in pileus morphogenesis in *Pleurotus eryngii* under different light conditions. **Genomics**, v. 112, n. 2, p. 1707–1715, 2020.

DULAY, R. M. R. *et al.* Nutritional requirements for mycelial growth of three *Lentinus* species from the Philippines. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, 2020.

DURU, M. E.; ÇAYAN, G. T. Biologically active terpenoids from mushroom origin: a review. **Records of Natural Products**, v. 9, n. 4, p. 456, 2015.

EDO, N. Influence of glucose and peptone on the mycelial growth of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). **The Journal of The University of Duhok**, v. 24, n. 2, p. 11–18, 2021.

EL-MARADNY, Y. A. *et al.* Lectins purified from medicinal and edible mushrooms: Insights into their antiviral activity against pathogenic viruses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 179, p. 239–258, 2021.

EL ZAWAWY, N. A.; ALI, S. S. Anti-proteolytic activity of *Ganoderma lucidum* methanol extract against *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 9, p. 1020–1024, 2016.

ESCOBAR, L. P. B. *et al.* Effect of culture preservation methods in the stability and nutritional characteristics of *Pleurotus ostreatus*. **Asian Journal Microbiology Biotech Environ Science**, v. 22, n. 2, p. 359-368, 2020.

FERREIRA, C. N. *et al.* O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 416-421, 2010.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Current challenges on the production and use of cellulolytic enzymes in the hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1082–1093, 2017.

FLETCHER, I. *et al.* Effect of temperature and growth media on mycelium growth of *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma lucidum* strains. **Cohesive Journal of Microbiology and Infectious Disease**, v. 2, 2019.

FRANÇA, K. R. S. *et al.* *In vitro* effect of essential oil of peppermint (*Mentha x piperita* L.) on the mycelial growth of *Alternaria alternata*. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 26, n. 5, p. 1-7, 2018.

FURLANI R. P. Z., GODOY H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 149-154, 2005.

GARGANO, M. L. *et al.* Ecology, phylogeny, and potential nutritional and medicinal value of a rare white “Maitake” collected in a mediterranean forest. **Diversity**, v. 12, p. 230, 2020.

GEISSELER, D.; HORWATH, W. R. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. **Soil Biology Biochemistry**, v.40, n.1, p.3040-3048, 2008.

GHOSH, S.; ACHARYA, K. Milky mushroom: a healthy nutritious diet. **Food Research International**, p. 111113, 2022.

GOLAK-SIWULSKA, I. *et al.* Bioactive compounds and medicinal properties of Oyster mushrooms (*Pleurotus* sp.). **Folia Horticulturae**, v. 30, n. 2, p. 191–201, 2018.

GONÇALVES, C. C. S.; FONSECA, F. S. A. Enzyme-catalyzed redox reactions. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 4, p. 778–797, 2018.

GOVORUSHKO, S. *et al.* Poisoning associated with the use of mushrooms: A review of the global pattern and main characteristics. **Food and chemical toxicology**, v. 128, p. 267-279, 2019.

GOYAL, B.; GOYAL, D. Targeting the Dimerization of the Main Protease of Coronaviruses: A Potential Broad-Spectrum Therapeutic Strategy. **ACS Combinatorial Science**, v. 22, n. 6, p. 297–305, 2020.

HAMADA, S.; KUBOTA, K.; SAGISAKA, M. Purification and characterization of a novel extracellular neutral metalloprotease from *Cerrena albocinnamomea*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 51-57, 2017.

HANEEF, M.; *et al.* Advanced materials from fungal mycelium fabrication and tuning of physical properties. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–11, 2017.

HE, F. *et al.* Optimization of fermentation conditions for production of neutral metalloprotease by *Bacillus subtilis* SCK6 and its application in goatskin-dehairing. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 52, n. 7, p. 789-799, 2022.

HUI, C. *et al.* Characterization of the ammonification, the relevant protease production and activity in a high-efficiency ammonifier *Bacillus amyloliquefaciens* DT. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 142, p. 11–17, 2019.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos** – São Paulo: 4ª Edição. 1ª Edição Digital, 1020 p., 2008.

INÁCIO, F. D. *et al.* Produção de protease e lacase por basidiomicetos. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3esp, p. 359, 2013.

INACIO, F. D. *et al.* Proteases of wood rot fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

INYOD, T. *et al.* Morphological characteristics and molecular identification of a wild thai isolate of the tropical mushroom hed taen rad (*Macrocybe crassa*). **Biodiversitas**, v. 18, n. 1, p. 221–228, 2017.

- ISLAM, M. R. *et al.* Morphology and mechanics of fungal mycelium. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.
- ISLAM, T.; GANESAN, K.; XU, B. New insight into mycochemical profiles and antioxidant potential of edible and medicinal mushrooms: A review. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 21, n. 3, p. 237–251, 2019.
- JABLAOUI, A. *et al.* Fecal Serine Protease Profiling in Inflammatory Bowel Diseases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 21, 2020.
- JABŁOŃSKA-RYŚ, E. *et al.* Lactic Acid Fermentation of Edible Mushrooms: Tradition, Technology, Current State of Research: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 3, p. 655–669, 2019.
- JASINSKA, A.; SIWULSKI, M. Impact of substrate supplemented with CaCO₃ on mycelial growth, yield, morphological features and storability of fruiting bodies of black poplar mushroom *Agrocybe cylindracea* (DC.) Marie. **International Journal of Horticultural Science**, v. 27, 2021.
- JAYASINGHE, C. *et al.* Favorable culture conditions for mycelial growth of Korean wild strains in *Ganoderma lucidum*. **Mycobiology**, v. 36, n. 1, p. 28, 2008.
- JEON, D. H. *et al.* Characteristics of a new *Grifola frondosa* Cultivar. **Journal of Mushroom**, v. 16, n. 3, p. 203-207, 2018.
- JO, W.-S. *et al.* Culture conditions for the mycelial growth of *Ganoderma applanatum*. **Mycobiology**, v. 37, n. 2, p. 94, 2009.
- JO, W.-S. *et al.* The culture conditions for the mycelial growth of *Auricularia auricula-judae*. **Journal of Mushroom**, v. 12, n. 2, p. 88–95, 2014.
- JONATHAN, S. G. *et al.* Biodegradation of Nigerian wood wastes by *Pleurotus tuberregium* (Fries) Singer. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 4, p. 807-811, 2008.
- KAŁA, K. *et al.* Fruiting bodies of selected edible mushrooms as a potential source of lovastatin. **European Food Research and Technology**, v. 246, n. 4, p. 713–722, 2020.
- KAPAHI, M.; SACHDEVA, S. Mycoremediation potential of *Pleurotus* species for heavy metals: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, 2017.
- KHAN, N. A. *et al.* Impact of sawdust using various woods for effective cultivation of oyster mushroom. **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, n. 1, p. 399-402, 2012.
- KHANDAKAR, J. *et al.* Effect of culture media and environmental factors on the mycelial growth of *Grifola frondosa*. **Bangladesh Journal of Mushroom**, v. 3, n. 1, p. 15-20, 2009.
- KHATUA, S.; GHOSH, S.; ACHARYA, K. Chemical composition and biological activities of methanol extract from *Macrocybe lobayensis*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 10, p. 144-151, 2017.
- KIM, K. J. *et al.* Characterization of a new cultivar of *Auricularia auricula-judae* 'Yong-A'. **Journal of Mushroom**, v. 16, n. 3, p. 198-202, 2018.

KIM, J. H.; JANG, M. J. Effects of Organic Acid Addition on Fruiting Productivity and Primordium Formation in *Grifola frondosa*. **The Korean Journal of Mycology**, v. 47, n. 3, p. 233-240, 2019.

KIM, D. *et al.* Growth and storage characteristics of fruiting body by nitrogen content of sawdust media and restriction stage temperature during *Flammulina velutipes* cultivation. **Journal of Mushroom**, v. 18, n. 4, p. 311-316, 2020.

KLAUS, A. *et al.* Pink oyster mushroom *Pleurotus flabellatus* mycelium produced by an airlift bioreactor—the evidence of potent in vitro biological activities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 1–14, 2021.

KRAKOWSKA, A. *et al.* Selected edible medicinal mushrooms from *Pleurotus* genus as an answer for human civilization diseases. **Food Chemistry**, v. 327 2020.

KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantitation. **The protein protocols handbook**, p. 17-24, 2009.

KUDRYAVTSEVA, O. A. *et al.* Fungal proteolytic enzymes: Features of the extracellular proteases of xylotrophic basidiomycetes. **Microbiology**, 77:6, v. 77, n. 6, p. 643–653, 2008.

KUMAR, V.; MISHRA, S. K.; KAUR, M. Effect of different media, temperature and pH on radial mycelial growth of *Lentinula edodes* strain Le-17-04. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 1, p. 345-348, 2019.

LADEIRA, S. A. *et al.* Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp. em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. **Química Nova**, v. 33, p. 324-328, 2010.

LAKHANPAL, T. N.; RANA, M. Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. **Plant Genetic Resources**, v. 3, n. 2, p. 288-303, 2005.

LARSON, E. *et al.* Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination. **Analytical biochemistry**, v. 155, n. 2, p. 243-248, 1986.

LAU, B. F.; ABDULLAH, N. Bioprospecting of *Lentinus squarrosulus* Mont., an underutilized wild edible mushroom, as a potential source of functional ingredients: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 61, p. 116–131, 2017.

LEAL, D. C. *et al.* Digital technology at the edge of capitalism: Experiences from the Brazilian Amazon rainforest. **ACM Transactions on Computer-Human Interaction (TOCHI)**, v. 28, n. 3, p. 1-39, 2021.

LELIEBRE-LARA, V. *et al.* In vitro antileishmanial activity of sterols from *Trametes versicolor* (Bres. Rivarden). **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1045, 2016.

LIANG, C. H. *et al.* Biological efficiency and nutritional value of the culinary-medicinal mushroom *Auricularia* cultivated on a sawdust basal substrate supplement with different proportions of grass plants. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 263–269, 2019.

- LI, G. *et al.* A novel serine protease with anticoagulant and fibrinolytic activities from the fruiting bodies of mushroom *Agrocybe aegerita*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 631–639, 2021a.
- LI, M. *et al.* Role of dietary edible mushrooms in the modulation of gut microbiota. **Journal of Functional Foods**, v. 83, p. 104538, 2021b.
- LIMA, L. H. DE *et al.* Dados epidemiológicos sobre embolia e trombose arterial no Paraná em tempo de COVID-19. **Revista UNINGÁ**, v. 57, n. S1, p. 025–026, 2021.
- LIU, E. *et al.* Review on *Auricularia auricula-judae* as a functional food: growth, chemical composition, and biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 6, p. 1739-1750, 2021.
- LIU, S. *et al.* Study on the optimum culture condition for the mother spawn and liquid spawn of Taishan *Grifola frondosa*. **Food Research and Development**, v. 39, n. 14, p. 177-181, 2018.
- LÓPEZ, L. X. *et al.* Biotechnological production, characterization and in vitro antitumor activity of polysaccharides from a native strain of *Lentinus crinitus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3133–3144, 2020.
- LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biology Chemical**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LU, J. *et al.* Molecular mechanisms of bioactive polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (Lingzhi), a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 765–774, 2020.
- MA, H. T.; HSIEH, J. F.; CHEN, S. T. Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v. 114, p. 109-113, 2015.
- MA, G. *et al.* A critical review on the health promoting effects of mushrooms nutraceuticals. **Food Science and Human Wellness**, v. 7, n. 2, p. 125–133, 2018.
- MAHADEVAN, K.; SHANMUGASUNDARAM, K. Comparative effect of different culture media on mycelial growth performance of *Pleurotus sapidus*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 4, 2018.
- MARTIM, S. R. *et al.* Acid proteases from Amazonian edible mushroom for industrial applications. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, v. 12, n. 3, p. 353–362, 2017.
- MARTÍNEZ M. G. A. *et al.* Fungal proteases and production of bioactive peptides for the food industry. **Enzymes in food biotechnology: production, applications, and future prospects**, p. 221–246, 2019.
- MENON, V.; RAO, M. A low-molecular-mass aspartic protease inhibitor from a novel *Penicillium* sp.: implications in combating fungal infections. **Microbiology**, v. 158, n. 7, p. 1897-1907, 2012.
- MINE, Y.; WONG, A. H. K.; JIANG, B. Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods. **Food Research International**, v. 38, n. 3, p. 243-250, 2005.

MIWA, A. C. P.; FALCO, P. B.; CALIJURI, M. C. Evaluation of spectrophotometric methods for protein determination in waste stabilization ponds sample. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 13, p. 236-242, 2008.

MORALES J. A. G. *et al.* Efecto del ácido salicílico y la zeolita en la inducción de las enzimas lacasas, como estrategia para incrementar los rendimientos en hongos comestibles, funcionales y medicinales. Dissertação (Mestre em Ciências) - Colegio de Postgraduados, Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Puebla, p. 104, 2017.

MORELLON S. R. *et al.* Ficin: A protease extract with relevance in biotechnology and biocatalysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 394–404, 2020.

NARVÁEZ, L. *et al.* Changes in macronutrients and physical properties during the growth of *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus* in a compost based on sugarcane bagasse agricultural waste. **Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences**, v. 37, n. 3, p. 301-312, 2021.

NELSON, David L.; COX, Michael M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger-7*. Artmed Editora, 2018.

NGUYEN, H. H. *et al.* Immobilized enzymes in biosensor applications. **Materials**, v. 12, n. 1, p. 121, 2019.

NGUYEN, T. M.; RANAMUKHAARACHCHI, S. L. Effect of different culture media, grain sources and alternate substrates on the mycelial growth of *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 3, p. 223–230, 2020.

OH, Y. *et al.* Comparative proteomic analysis between nitrogen supplemented and starved conditions in *Magnaporthe oryzae*. **Proteome Science**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2017.

OWAID, M. N. Green synthesis of silver nanoparticles by *Pleurotus* (oyster mushroom) and their bioactivity: Review. **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 12, p. 100256, 2019.

PAK, S. *et al.* Functional perspective of black fungi (*Auricularia auricula*): Major bioactive components, health benefits and potential mechanisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, p. 245-261, 2021.

PEDRA, W. N.; MARINO, R. H. Cultivo axênico de *Pleurotus* spp. em serragem da casca de coco (*Cocos nucifera* Linn.) suplementada com farelo de arroz e/ou de trigo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 219–225, 2006

PENG, S. H. T. *et al.* Effects of environment and nutritional conditions on mycelial growth of *Ganoderma boninense*. **International Journal of Oil Palm**, v. 2, n. 3, p. 95-107, 2019.

PENG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Y. Microbial fibrinolytic enzymes: An overview of source, production, properties, and thrombolytic activity *in vivo*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 2, p. 126-132, 2005.

- PERWENDHA, R.; OETARI, A.; SJAMSURIDZAL, W. Skimmed milk-degrading ability of *Rhizopus azygosporus* UICC 539 at various temperatures. **AIP Conference Proceedings**, v. 2242, n. 1, p. 050006, 2020.
- PIAZZA, G.; MORROW, D. A. Diagnosis, management, and pathophysiology of arterial and venous thrombosis in COVID-19. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 324, n. 24, p. 2548-2549, 2020.
- PIRES, C. B. A.; FONSECA, J. S.; SERUDO, R. L. Proteases produzidas por microorganismos na região amazônica. **Scientia Amazonia**, v. 8, n1, n. 2238.1910, p. B15–B33, 2019.
- POREDOŠ, P. Interrelationship between venous and arterial thrombosis. **International angiology: a journal of the International Union of Angiology**, v. 36, n. 4, p. 295-298, 2017.
- PRADO, Fabiano Brito *et al.* Viabilidade da produção de proteases por espécies de Aspergillaceae e triagem de coagulantes do leite bovino. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 16356-16373, 2021.
- PRATEEP, A. *et al.* Peptides extracted from edible mushroom: *Lentinus squarrosulus* induces apoptosis in human lung cancer cells. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1792–1799, 2017.
- QUAN, Z.; CHENGJIN, G. Effect of different pH an protein peptone on mycelial growth rate of *Grifola frondosa* (Fr.) SF Gray. **Journal of Tianjin Normal University (natural Science Edition)**, v. 24, n. 2, p. 22-24, 2004.
- QUEIROZ, C.; SOUSA, A. C. B. Produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos em diferentes substratos sólidos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 51849-51860, 2020.
- QUEVEDO, J. R. *et al.* Agaricomycetes (Basidiomycota) em um fragmento florestal urbano na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, não. 4, pág. 430, 2012.
- RAMAN, J. *et al.* Cultivation and nutritional value of prominent *Pleurotus* spp.: An overview. **Mycobiology**, v. 49, n. 1, p. 1-14, 2021.
- RATHORE, H. *et al.* Medicinal importance of mushroom mycelium: Mechanisms and applications. **Journal of functional foods**, v. 56, p. 182-193, 2019.
- REDDY, M. S.; KANWAL, H. K. Influence of carbon, nitrogen sources, inducers, and substrates on lignocellulolytic enzyme activities of *Morchella spongiosa*. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 7, p. 100271, 2022.
- RODRÍGUEZ, O. J. E.; INSUASTI, P. A. J.; TRUJILO, D. S. A. *Auricularia fuscusuccinea* una cepa nativa ecuatoriana para hacer frente a la crisis alimentaria. **Biorrefineria**, v. 1, 2018.
- ROSSI, I. H.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, J. O. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 887–891, 2001.

RÓZSA, M; MĂNIUȚIU, D.; EGYED, E. Influence of magnesium (Mg) source on the *Cordyceps militaris* (L.) mushroom mycelium growth. **Current Trends in Natural Sciences**, v. 10, p. 333-340, 2021.

ROVATI, J. I. *et al.* A novel source of fibrinolytic activity: *Bionectria* sp., an unconventional enzyme-producing fungus isolated from Las Yungas rainforest (Tucumán, Argentina). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 55–62, 2010.

ROY, D. R.; KRISHNAPPA, M. Influence of solid media on growth of mycelia and antibacterial activity of wild macrofungi, *Macrocybe gigantea*. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 9, n. 9, p. 177–181, 2018.

SALES-CAMPOS, C. *et al.* Nutritional and Bioactive Properties of an Amazon Wild Oyster Culinary-Medicinal Mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes): Contributions to Functional Food and Human Health. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 23, n. 7, 2021.

SANCHEZ, E. F. *et al.* Direct fibrinolytic snake venom metalloproteinases affecting hemostasis: Structural, biochemical features and therapeutic potential. **Toxins**, v. 9, n. 12, 2017.

SANTANA, T. T. *et al.* Metallic-aromatic compounds synergistically induce *Lentinus crinitus* laccase production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, n. October, p. 625–630, 2018.

SCHRITT, H.; VIDI, S.; PLEISSNER, D. Spent mushroom substrate and sawdust to produce mycelium-based thermal insulation composites. **Journal of Cleaner Production**, v. 313, p. 127910, 2021.

SEOK, S. J. *et al.* Studies on the biological activity of water extract and solvent fractions of wild *Grifola frondosa*. **Journal of Mushroom**, v. 17, n. 4, p. 241–246, 2019.

SERBENT, M. P. *et al.* Growth, enzymatic production and morphology of the white-rot fungi *Lentinus crinitus* (L.) Fr. upon 2, 4-D herbicide exposition. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 17, p. 2995–3012, 2020.

SESSOMS, D. B.; LILLY, W. W. Derepressible proteolytic activity in homokaryotic hyphae of *Schizophyllum commune*. **Experimental Mycology** 10: 294–300. 1986.

SHEN, Y. X. *et al.* Improvement on the modified Lowry method against interference of divalent cations in soluble protein measurement. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 9, p. 4167–4178, 2013.

SHRIKHANDIA, S. P.; DEVI, S.; SUMBALI, G. Lignocellulosic Waste Management Through Cultivation of Certain Commercially Useful and Medicinal Mushrooms: Recent Scenario. In: **Biology, Cultivation and Applications of Mushrooms**. Springer, Singapore, 2022. p. 497-534.

SHRUTI, T. M.; RAMAMOORTHY V; VELLAIKUMAR S. Effect of different culture media, temperature and pH on the mycelial growth of *Pleurotus eryngii* (King Oyster Mushroom). **The Pharma Innovation Journal**, v. 11, n. 7, p. 2519–2522, 2022.

- SIDDIQ, M.; ALI, M. A.; MAQSOOD, M. Mycelial growth performance of various wild and exotic strains of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) On different growing media. **J. Agric. Res**, v. 56, n. 3, p. 187-191, 2018.
- SILVERMAN, J.; CAO, H.; COBB, K.. Development of mushroom mycelium composites for footwear products. **Clothing and Textiles Research Journal**, v. 38, n. 2, p. 119-133, 2020.
- SMITH, S. A.; TRAVERS, R. J.; MORRISSEY, J. H. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 50, n. 4, p. 326-336, 2015.
- SOBAL, M. *et al.* Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of Mexico. **Micología Aplicada Internacional**, v. 19, n. 1, p. 15-23, 2007.
- SONG, B. *et al.* Assessing the effects of different agro-residue as substrates on growth cycle and yield of *Grifola frondosa* and statistical optimization of substrate components using simplex-lattice design. **AMB Express**, v. 8, n. 1, 2018.
- SOROKIN, S.; SHAMTSYAN, M.; PETRISHCHEV, N. Modern concepts of the fibrinolytic system. **In: E3S Web of Conferences. EDP Sciences**, p. 05002. 2020.
- SRIKRAM, A. *et al.* Screening of anti-aspergillus activities of edible wild and cultivated mushrooms from Northeast Thailand. **Kaen Kaset Khon Kaen Agriculture Journal**, v. 47, n. Suppl. 1, p. 1639-1644, 2019.
- STOHNII, Y. M. *et al.* Fibrinogenolytic activity of protease from the culture fluid of *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Biological Research - Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale**, v. 93, n. 2, p. 85–90, 2020.
- SUBROTO, E. *et al.* The analysis techniques of amino acid and protein in food and agricultural products. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v. 9, n. 10, p. 29-36, 2020.
- SUMANTHA A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technol Biotech** 44:211–220, 2006.
- SUN, Y.; LIU, J. Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus*. **Bioresource Technology**, 100: 983, 2009.
- SURENDRAN, G. *et al.* Sequestration of Potential Enzymes from Mushrooms compost waste. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 1145, n. 1, p. 012116, 2021.
- SUWANNARACH, N. *et al.* Natural bioactive compounds from fungi as potential candidates for protease inhibitors and immunomodulators to apply for coronaviruses. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1800, 2020.

- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. Análises de solo, plantas e outros materiais. 2ª ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 174, 1995.
- TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia-12ª Edição**. Artmed Editora, 2016.
- TUDZYNSKI, B. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.
- TUZOVIC, M. *et al.* Arterial thrombosis in patients with cancer. **Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine**, v. 20, n. 5, p. 1-17, 2018.
- UPRETI, G. C.; RATCLIFF, R. A.; RICHES, P. C. Protein estimation in tissues containing high levels of lipid: modifications to Lowry's method of protein determination. **Analytical Biochemistry**, v. 168, n. 2, p. 421-427, 1988.
- VELEZ, M. E. V. *et al.* Production of bioactive compounds by the mycelial growth of *Pleurotus djamor* in whey powder enriched with selenium. **LWT**, v. 114, p. 108376, 2019.
- VETVICKA, V. *et al.* Immune-modulating activities of glucans extracted from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*. **Journal of Functional Foods**, v. 54, n. January, p. 81–91, 2019.
- VIDHYA, C. V. Production and optimization of extra-cellular protease from *Ganoderma* sp. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 12, n. 4, p. 1832–1838, 2019.
- WANG, X. LI *et al.* The effects of quorum sensing molecule farnesol on the yield and activity of extracellular polysaccharide from *Grifola frondosa* in liquid fermentation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 191, p. 377–384, 2021.
- WATERBORG, J. H. The Lowry method for protein quantitation. In: **The protein protocols handbook**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 7-10. 2009.
- WATERBORG, J. H.; MATTHEWS, H. R. The Lowry method for protein quantitation. **Basic Protein and Peptide pPotocols**, p. 1-4, 1994.
- WISNIEWSKI, A. C. *et al.* Produção de enzimas amilolíticas por *Macrocybe titans* em resíduo do processamento de cerveja. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 3, 2010.
- WU, Z. *et al.* Production, physico-chemical characterization and antioxidant activity of natural melanin from submerged cultures of the mushroom *Auricularia auricula*. **Food bioscience**, v. 26, p. 49-56, 2018.
- XIE, C. *et al.* Comparative transcriptomics of *Pleurotus eryngii* reveals blue-light regulation of carbohydrate-active enzymes (CAZymes) expression at primordium differentiated into fruiting body stage. **Genomics**, v. 110, n. 3, p. 201–209, 2018.
- YANG, F. C.; KE, Y F.; KUO, S. S. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 3-5, p. 295-301, 2000.
- YANG, Z. *et al.* Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal cancer. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 2, p. 615-620, 2013.

YANG, M. *et al.* Application of definitive screening design to optimization of the protein extraction and functional properties of proteins in *Auricularia auricula*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2022.

YIASMIN, M. N. *et al.* Purification, isolation, and structure characterization of water soluble and insoluble polysaccharides from maitake fruiting body. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1879–1888, 2020.

YUSUF, S. *et al.* Modifiable risk factors, cardiovascular disease, and mortality in 155 722 individuals from 21 high-income, middle-income, and low-income countries (PURE): a prospective cohort study. **The Lancet**, v. 395, n. 10226, p. 795–808, 2020.

ZAJAĆ, A. *et al.* Pro-health and anti-cancer activity of fungal fractions isolated from milk-supplemented cultures of *Lentinus (Pleurotus) sajor-caju*. **Biomolecules**, v. 11, 2021.

ZAN, X. Y. *et al.* UDP-glucose pyrophosphorylase gene affects mycelia growth and polysaccharide synthesis of *Grifola frondosa*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1161–1170, 2020.

ZERVAKIS, G. *et al.* Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. **Folia Microbiologica**, v. 46, n. 3, p. 231-234, 2001.

ZHANG, X. Y.; BAU, T.; OHGA, S. Biological characteristics and cultivation of fruit body of wild edible mushroom *Auricularia villosula*. **Journal of the Faculty of Agriculture**, v. 63, n. 1, p. 5–14, 2018.

ZHANG, Y. *et al.* Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 196-206, 2011.

ZHOU, G.; PARAWIRA, W. The effect of different substrates found in Zimbabwe on the growth and yield of oyster mushroom *Pleurotus Ostreatus*. **Southern Africa Journal of Education, Science and Technology**, v. 5, n. 2, p. 73-86, 2022.

ZMITROVICH, I V. *et al.* Variability of *Byssomerulius corium* in the Mediterranean. **Mycotaxon**, v. 97, p. 83-90, 2006.

ZOU, Y. *et al.* Production of tyrosinase by *Auricularia auricula* using low-cost fermentation medium. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 699–705, 2013.