



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC



PAULA ROMENYA DOS SANTOS GOUVÊA

**ESTUDO COMPARATIVO DO CULTIVO DE *GANODERMA* spp. EM RESÍDUOS
LIGNOCELULÓSICOS AMAZÔNICOS VISANDO A OBTENÇÃO DE INIBIDORES
DE PROTEASES**

MANAUS
2023

PAULA ROMENYA DOS SANTOS GOUVÊA

**ESTUDO COMPARATIVO DO CULTIVO DE *GANODERMA* spp. EM RESÍDUOS
LIGNOCELULÓSICOS AMAZÔNICOS VISANDO A OBTENÇÃO DE INIBIDORES
DE PROTEASES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, para a realização da defesa, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Ceci Sales-Campos
Coorientadora: Dra. Larissa Ramos Chevreuil
Coorientador: Dr. Sérgio Dantas de Oliveira Júnior

MANAUS
2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Gouvêa, Paula Romenya dos Santos

G719e Estudo comparativo do cultivo *Ganoderma* spp. em resíduos lignocelulósicos amazônicos visando a obtenção de inibidores de proteases. / Paula Romenya dos Santos Gouvêa. - Manaus: [s. n.], 2023.

139 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, 2023.

Orientadora: Dr^a. Ceci Sales-Campos.

Coorientadora: Dr^a. Larissa Ramos Chevreuil.

Coorientador: Dr. Sérgio Dantas de Oliveira Júnior.

1. Cultivo de macrofungos 2. Gênero *Ganoderma* spp. - espécies 3. Amazônia - resíduos lignocelulósicos 4. Fungicultura 5. Inibidores de proteases 6. Cogumelos 7. Biotecnologia I. Sales-Campos, Ceci (orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDD – 635.89

A Deus, sem ele eu nada sou, minha fonte de fé e força (Estou convencido de que aquele que começou boa obra em mim, vai completá-la até o dia de Cristo Jesus. Filipenses 1:6)

**Ao meu esposo Sylvio que sempre esteve ao meu lado,
A minha amada filha Emanuelle, que é a minha maior alegria,
A minha mãe Marivalda que sem suas orações e persistência eu não teria
continuado na ciência.**

Dedico

Agradecimentos

A minha orientadora, Ceci Sales meu muito obrigada por tudo, pelo apoio, pela amizade, confiança e por todo apoio financeiro, sempre disposta a ajudar;

A minha amiga e orientadora Larissa Chevreuil, ao longo desse doutorado passou de orientadora a amiga, sempre muito correta, puxando orelha quando tinha que puxar e abraçando quando necessário, desde o início sempre muito competente, direcionando e orientando com todo seu profissionalismo impecável, mulher que admiro muito, meu muito obrigada por tudo;

Ao Dr. Sergio Dantas, minha eterna gratidão, nos momentos em que pensei em desistir, e com seu incentivo continuei, um amigo para todas as horas;

Aos queridos do LCFC, Lorena, Larissa, Vitor, Giovana, Aldenora, sem vocês esses anos seriam mais difíceis, muito obrigada por cada análise ensinada, por cada ajuda recebida, por cada texto corrigido, por cada memória afetiva vivida no laboratório, as festas de aniversário, entre outros momentos de descontração, vocês são maravilhosos;

A minha amiga Dina, que sempre me incentivou e acreditou e acredita mais em mim do que eu mesma;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, representado pelos professores e funcionários agradeço todo o apoio e oportunidade, agradeço em especial Dra Rosany Picolloto pela paciência.

A todos, que, de forma direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho tenha sido realizado, muito obrigada!

RESUMO

O cultivo de macrofungos apresenta uma longa tradição nos países asiáticos. Dentre as espécies cultivadas, destacam-se àquelas pertencentes ao gênero *Ganoderma*, devido às suas propriedades medicinais. Este gênero ainda apresenta ambiguidades na classificação taxonômica, além do conteúdo de substâncias ativas nesses fungos muitas vezes serem variáveis conforme as condições de cultivo, tipo de substrato e linhagem. O objetivo desse estudo foi comparar uma linhagem de *Ganoderma* isolada na Amazônia e uma linhagem comercial quanto às características moleculares, aos aspectos produtivos, de transformação dos resíduos lignocelulósicos, composição nutricional dos basidiomas e síntese de moléculas bioativas. Os fungos *Ganoderma lingzhi* (linhagem comercial) e *Ganoderma sp* (isolada na região amazônica), inicialmente, foram identificados molecularmente e, após a confirmação das espécies, foram cultivados em resíduos de sementes de açaí e serragens de guaruba-cedro e marupá (marupá I, marupá II e marupá III). Os resíduos foram submetidos às análises de caracterização físico-química e estrutural, antes e após o cultivo dos macrofungos. Como parâmetros produtivos, avaliou-se a eficiência biológica (EB), rendimento e perda de matéria orgânica (PMO). Os basidiomas produzidos foram submetidos à análise de composição centesimal, diferentes extrações de proteínas e de detecção da atividade de inibidores de proteases, atividade fibrinolítica, FTIR-ATR e análise de terpenos. Após o crescimento dos fungos, observou-se redução significativa dos teores de umidade, cinzas, nitrogênio e proteínas totais nos substratos de cultivo. Em termos estruturais, os fungos promoveram uma desorganização do arranjo microfibrilar dos resíduos lignocelulolíticos. Quanto aos parâmetros produtivos, *G. lingzhi* e *Ganoderma sp.* apresentaram maiores EB e PMO quando cultivados nos substratos à base de marupá I e II, guaruba-cedro proporcionou maiores rendimentos, com destaque para *G. lingzhi* (3,81%). A composição nutricional dos basidiomas, *G. lingzhi* apresentou maiores teores de carboidratos totais (valor médio de 72%) e valor energético (média de $388,1 \pm 58$ kcal/100 g), comparado à *Ganoderma sp.*, com média de 53% de carboidratos totais e $242 \pm 1,6$ kcal/100 g. Ao passo que, *Ganoderma sp.* apresentou maiores teores de proteínas (36%) e fibras totais (valor médio de 48%). Quanto as atividades proteicas, a extração em Tris-HCl proporcionou maiores níveis de proteínas e proteases para *Ganoderma sp.*, e maior atividade fibrinolítica para *G. lingzhi* cultivado em açaí ($132,67 \text{ mm}^2$). Extratos aquosos de *Ganoderma sp.* em marupá III e marupá II exibiram maiores atividades inibitórias de tripsina (390,09 UI/mg de proteína) e papaína (255,67 UI/mg de proteína), respectivamente. *G. lingzhi* cultivado em guaruba-cedro mostrou maior inibição de quimotripsina. Os espectros FTIR confirmaram variações no perfil químico de acordo com o substrato e o extrator, mas todos mostraram impressões digitais para proteínas. Comparando a linhagem comercial com o isolado amazônico de *Ganoderma sp.*, este último apresentou grande potencial na obtenção de inibidores proteolíticos.

Palavras-chaves: Macrofungos. Cultivo Sólido de Cogumelos. Moléculas Bioativas.

ABSTRACT

The cultivation of macrofungi has a long tradition in Asian countries. Among the cultivated species, those belonging to the *Ganoderma* genus stand out due to their medicinal properties. However, this genus still presents taxonomic classification ambiguities, and the content of active substances in these fungi is often variable depending on the cultivation conditions, substrate type, and lineage. The objective of this study was to compare a strain of *Ganoderma* isolated in the Amazon and a commercial strain regarding molecular characteristics, productive aspects, transformation of lignocellulosic residues, nutritional composition of basidiomata, and the synthesis of bioactive molecules. The fungi *Ganoderma lingzhi* (commercial strain) and *Ganoderma* sp. (isolated in the Amazon region) were initially molecularly identified. After species confirmation, they were cultivated in residues from acai seeds and sawdust from guaruba-cedro and marupa (marupa I, marupa II, and marupa III). The residues underwent physical-chemical and structural characterization analyses before and after the fungi cultivation. Biological efficiency (BE), yield, and loss of organic matter (LOM) were evaluated as productive parameters. The produced basidiomata were subjected to proximate composition analysis, different protein extractions, detection of protease inhibitors' activity, fibrinolytic activity, FTIR-ATR, and terpene analysis. Following the fungi's growth, a significant reduction in moisture, ash, nitrogen, and total protein levels in the cultivation substrates was observed. Structurally, the fungi caused a disorganization of the microfibrillar arrangement of the lignocellulosic residues. Regarding productive parameters, *G. lingzhi* and *Ganoderma* sp. showed higher BE and LOM when cultivated in marupa I and II-based substrates. Guaruba-cedro provided higher yields, particularly for *G. lingzhi* (3.81%). In terms of nutritional composition of the basidiomata, *G. lingzhi* presented higher levels of total carbohydrates (average value of 72%) and energy value (average of 388.1 ± 0.58 kcal/100 g) compared to *Ganoderma* sp., with an average of 53% of total carbohydrates and 242 ± 1.6 kcal/100 g. Conversely, *Ganoderma* sp. exhibited higher levels of proteins (36%) and total fibers (average of 48%). For protein activities, the extraction in Tris-HCl provided higher protein and protease levels for *Ganoderma* sp., while *G. lingzhi* cultivated in acai displayed higher fibrinolytic activity (132.67 mm²). Aqueous extracts of *Ganoderma* sp. in marupa III and marupa II exhibited higher inhibitory activities against trypsin (390.09 UI/mg protein) and papain (255.67 UI/mg protein), respectively. *G. lingzhi* cultivated in guaruba-cedro showed higher chymotrypsin inhibition. The FTIR spectra confirmed variations in the chemical profile according to the substrate and the extractor, yet all exhibited protein fingerprints. Comparing the commercial strain with the Amazonian isolate of *Ganoderma* sp., the latter showed significant potential in obtaining proteolytic inhibitors.

Keywords: Macrofungi. Solid Mushroom Cultivation. Bioactive Molecules.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Proteases e posições de clivagens hidrolíticas nas proteínas	26
Figura 2: Face superior (A), face inferior (B), corte longitudinal do píleo (C), poros (D), estipe (E), borda superior (F) e borda inferior (G) do basidiocarpo de <i>Ganoderma</i> sp. (linhagem amazônica), proveniente de um cultivo sólido.....	50
Figura 3: Basidiocarpo em ambiente natural (A), basidiocarpo de cultivo axênico (B), poros (C) e corte transversal de <i>Ganoderma</i> sp. (linhagem amazônica)	51
Figura 4: Superfície superior (A), inferior (B) e corte transversal (C) do basidiocarpo de <i>G. lingzhi</i> (linhagem comercial), obtido por cultivo sólido	52
Figura 5: Basidiósporos de <i>Ganoderma</i> sp. (linhagem amazônica)	53
Figura 6: Basidiósporo de <i>Ganoderma lingzhi</i> (linhagem comercial)	53
Figura 7: Crescimento micelial de <i>Ganoderma lingzhi</i> (A-B) e <i>Ganoderma</i> sp. (C-D) crescidos em meio BDA. A e C: Frente da colônia. B e D: Verso da colônia.....	54
Figura 8: Micrografia eletrônica de varredura (MEV) dos micélios de <i>Ganoderma lingzhi</i> (A) e <i>Ganoderma</i> sp. (B), crescidos em meio BDA	55
Figura 9: Micrografia eletrônica de varredura (MEV) dos clamidósporos de <i>Ganoderma</i> sp. (A), medida de largura das hifas de <i>G. lingzhi</i> e <i>Ganoderma</i> sp. (B) e medidas dos clamidósporos de <i>Ganoderma</i> sp. (C)	56
Figura 10: Micrografia eletrônica de varredura (MEV) dos basidiósporos de <i>G. lingzhi</i> (A, B) e <i>Ganoderma</i> sp. (C, D)	57
Figura 11: Cromatografia em camada delgada de extratos apolares de <i>Ganoderma lingzhi</i> e <i>Ganoderma</i> sp. A e C: extrato de <i>G. lingzhi</i> revelado com anisaldeído e sulfato cérico, respectivamente; B e D: extrato de <i>Ganoderma</i> sp. revelado com anisaldeído e sulfato cérico, respectivamente	58
Figura 12: Gel de agarose das amostras amplificadas de <i>Ganoderma lingzhi</i> (A) e <i>Ganoderma</i> sp. (B)	59
Figura 13: Árvore filogenética de espécies do gênero <i>Ganoderma</i> , construída com a região gênica ITS1-5.8S-ITS2 pelo método de máxima verossimilhança e modelo de Kimura 2-parâmetros	62
Figura 14: Determinação do teor de taninos totais em diferentes resíduos lignocelulósicos.....	77
Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos substratos iniciais (SI) e após o cultivo dos cogumelos (SAC) de <i>Ganoderma lingzhi</i> e <i>Ganoderma</i> sp., com ampliação de 100x.....	84
Figura 16: Difratogramas dos substratos iniciais - SI (A) e após o cultivo dos cogumelos (SAC) de <i>Ganoderma lingzhi</i> (B) e <i>Ganoderma</i> sp. (C). (a) Açai; (b)	86

Guaruba-cedro; (c) Marupá I; (d) Marupá II; (e) Marupá III.....

Figura 17: Teores de proteínas nos diferentes extratos proteicos provenientes dos basidiomas de *Ganoderma lingzhi* e *Ganoderma* sp., cultivados em diferentes resíduos lignocelulolíticos..... 125

Figura 18: Atividade proteolítica total nos diferentes extratos proteicos provenientes dos basidiomas de *Ganoderma lingzhi* e *Ganoderma* sp., cultivados em diferentes resíduos lignocelulolíticos..... 126

Figura 19: Atividade de inibidores de tripsina nos diferentes extratos proteicos provenientes dos basidiomas de *Ganoderma lingzhi* (A) e *Ganoderma* sp. (B), cultivados em diferentes resíduos lignocelulolíticos..... 129

Figura 20: Atividade de inibidores de quimotripsina nos diferentes extratos proteicos provenientes dos basidiomas de *Ganoderma lingzhi* (A) e *Ganoderma* sp. (B), cultivados em resíduos lignocelulolíticos..... 130

Figura 21: Atividade de inibidores de papaína nos diferentes extratos proteicos provenientes dos basidiomas de *Ganoderma lingzhi* (A) e *Ganoderma* sp. (B), cultivados em diferentes resíduos lignocelulolíticos..... 131

Figura 22: Espectros de FTIR-ATR dos extratos proteicos provenientes dos basidiomas de *Ganoderma lingzhi* e *Ganoderma* sp. cultivados em diferentes resíduos lignocelulolíticos e extraídos em água (A, D), tampão Tris-HCl (B, E) e fosfato de sódio (C, F) 134

Figura 23: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) dos extratos proteicos dos basidiomas de *Ganoderma lingzhi* e *Ganoderma* sp. cultivados em resíduos lignocelulolíticos da Amazônia 136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação e mecanismos de ação de proteases	26
Tabela 2: Características das endopeptidases e proteases	28
Tabela 3: Informações das espécies de <i>Ganoderma</i> utilizadas para a construção da árvore filogenética	47
Tabela 4: Caracteres morfológicos de <i>Ganoderma</i> sp. e <i>G. lingzhi</i>	57
Tabela 5: Sequências referentes a região ITS montadas para <i>G. lingzhi</i> e <i>Ganoderma</i> sp.....	60
Tabela 6: Caracterização físico-química dos substratos iniciais (SI) e após o cultivo dos cogumelos (SAC) <i>Ganoderma lingzhi</i> e <i>Ganoderma</i> sp.....	80
Tabela 7: Índice de Cristalinidade (ICr) por Difração de Raios-X dos substratos iniciais (SI) e após o cultivo dos cogumelos (SAC) <i>Ganoderma lingzhi</i> e <i>Ganoderma</i> sp.....	87
Tabela 8: Parâmetros produtivos de <i>Ganoderma lingzhi</i> e <i>Ganoderma</i> sp. cultivados em diferentes substratos lignocelulósicos	104
Tabela 9: Caracterização físico-química e centesimal dos basidiomas de <i>Ganoderma lingzhi</i> e <i>Ganoderma</i> sp. quando cultivados em diferentes substratos lignocelulósicos.....	107
Tabela 10: Composição elementar dos basidiomas de <i>Ganoderma lingzhi</i> e <i>Ganoderma</i> sp. cultivados em diferentes substratos lignocelulósicos, determinado por espectroscopia de raios X (EDS) de energia dispersiva.....	108
Tabela 11: Atividade proteolítica medida por ensaios caseinolíticos, caseinolíticos + gelatinolíticos e fibrinolíticos nos diferentes extratos dos basidiomas de <i>Ganoderma lingzhi</i> e <i>Ganoderma</i> sp., cultivados em resíduos lignocelulósicos amazônicos.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BANA	Cloridrato de N-benzoil-DL-arginina β -naftilamida
BDA	Ágar Batata Dextrose
B.O.D.	Biochemical Oxygen Demand
BAPNA	Cloridrato de N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
BSA	Albumina Sérica Bovina
BTPNA	Benzoil-L-tirosina-p-nitroanilida
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
CT	Carboidratos Totais
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DXR	Difração de Raio-X
EAT	Equivalência de Ácido Tânico
EB	Eficiência Biológica
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICr	Índice de Cristalinidade Relativa
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
pH	Potencial Hidrogeniônico
PAGE	Gel de Poliacrilamida
PMO	Perda de Matéria Orgânica
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SI	Substratos Iniciais
SAC	Substratos Após o Cultivo do Cogumelo
UI	Unidades de Inibição
UIP	Unidades de Inibição de Papaína

UIQ	Unidades de Inibição de Quimotripsina
UV	Ultravioleta
Mev	Microscopia Eletrônica de Varredura
NCBI	National Center for Biotechnology Information
TTT	Teor Total De Taninos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2. OBJETIVO.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
4. REFERENCIAL TEÓRICO	19
4.1 Resíduos lignocelulósicos	19
4.1.1 Açaí (<i>Euterpe</i> sp.).....	20
4.1.2 Marupá (<i>Simarouba amara</i>)	20
4.1.3 Guaruba-cedro (<i>Vochysia maxima</i>).....	21
4.2 Gênero Ganoderma.....	22
4.3 Produção de biomoléculas por macrofungos.....	23
4.3.1 Proteases.....	23
4.3.2 Classificação das proteases.....	24
4.3.3. Inibidores de proteases.....	29
REFERÊNCIAS	31
5. Capítulo 1 Caracterização de <i>Ganoderma</i> sp. isolado da região Amazônica em comparação à uma linhagem comercial de <i>Ganoderma lucidum</i>	40
5.1 RESUMO	40
5.2 ABSTRACT	41
5.3 INTRODUÇÃO.....	42
5.4. METODOLOGIA.....	43
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.6 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64
6. Capítulo 2 Comparação do potencial de bioconversão de um isolado Amazônico de <i>Ganoderma</i> sp. e uma linhagem comercial de <i>G. lingzhi</i>.....	70
6.1 RESUMO	70
6.2 ABSTRACT	71
6.3 INTRODUÇÃO	71
6.4 METODOLOGIA	72

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
6.6 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	88
7. Capítulo 3 O efeito de resíduos Amazônicos na produção e composição centesimal de espécies de <i>Ganoderma</i>.....	94
7.1 RESUMO	94
7.2 ABSTRACT	95
7.3 INTRODUÇÃO	96
7.4 METODOLOGIA	97
7.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
7.7 CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS	110
8. Capítulo 4 Produção de proteínas bioativas por <i>Ganoderma</i> spp. cultivados em resíduos lignocelulósicos Amazônicos	115
8.1 RESUMO	115
8.2 ABSTRACT	116
8.3 INTRODUÇÃO	117
8.4 METODOLOGIA	119
8.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	122
8.6 CONCLUSÃO	136
REFERÊNCIAS	137

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os macrofungos constituem uma reserva inesgotável de diversidade genética e funcional, acumulada durante milhões de anos de evolução adaptativa e de inúmeras pressões seletivas (Goldbeck; Maugeri Filho, 2013). Contudo, apenas 200 espécies têm sido usadas como alimento ou fármaco (Martim et al., 2017; Rahman et al., 2021).

De acordo com dados recentes, o mercado global de cogumelos, que estava avaliado em USD 50,3 bilhões em 2021, tem previsão de crescimento a uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 9,7% de 2022 a 2030, conforme reportado em um relatório de análise de mercado em 2022 (Giusti et al., 2023), resultando na produção de cerca de 140.000 toneladas de basidiomas a cada ano (Wu et al., 2020). Até o momento, estima-se que existam entre 2,2 e 3,8 milhões de espécies de cogumelos em todo o mundo (Cannon et al., 2018; Sales-Campos et al., 2022), com apenas cerca de 14 mil delas sendo conhecidas como seguras para consumo (Ahmed et al., 2023).

O cultivo de macrofungos apresenta uma longa tradição, principalmente nos países asiáticos. Dentre as espécies cultivadas, cerca de 35 são produzidas em escala comercial e 20 em escala industrial (Cruz et al., 2016). *Ganoderma* spp. correspondem a um dos macrofungos mais populares, devido às suas propriedades medicinais, sendo foco de pesquisas bioquímicas e farmacológicas nos últimos 30 anos, no qual tem sido descrito o isolamento de várias moléculas bioativas, incluindo polissacarídeos, proteínas, enzimas e complexos polissacarídeos-enzimas (Zhou et al., 2012; Rzymski et al., 2016;).

Normalmente, *Ganoderma* spp. são cultivadas em serragens e toras de madeiras, utilizando grãos ou materiais lignocelulósicos (palha, farelos, cascas de arroz, fibra de coco, sorgo, bagaço de cana) como suplemento nutricional no substrato de cultivo (Seephueak, 2019; Bijalwan et al., 2021). Assim, o cultivo sólido, muitas vezes, torna-se mais vantajoso em comparação às outras técnicas, uma vez que o “produto” (moléculas bioativas) pode ser obtido utilizando-se substratos mais baratos (Erkel, 2009).

O cultivo de macrofungos, em particular, consiste em um processo biológico de bioconversão de resíduos em produtos de alto valor agregado, incluindo

compostos bioativos (Silva, 2013; Economou et al., 2017) e desempenham um importante papel como decompositores orgânicos, contribuindo na ciclagem de nutrientes (Hawksworth; Lücking, 2017). Outra questão que afeta o mundo moderno e que deve ser levada em consideração diz respeito ao aproveitamento maximizado da matéria-prima, de modo a gerar o mínimo de resíduo possível. Nesta temática, os macrofungos também fazem parte deste panorama, uma vez que são organismos capazes de promover a bioconversão de resíduos lignocelulósicos (provenientes da agroindústria, indústria madeireira e outros resíduos orgânicos) em produto de importância funcional, além da possibilidade de uso do substrato de crescimento residual (após o cultivo) na elaboração de ração animal, biorremediação, adubação orgânica etc (Economou et al., 2017).

Dentre as moléculas produzidas pelos macrofungos, ressaltam-se as proteínas e/ou glicoproteínas, metabólitos secundários (ácidos, terpenoides, polifenóis, sesquiterpenos, alcalóides, esteróis, agentes quelantes de íons metálicos e vitaminas) e polissacarídeos (Erjavec et al., 2012; Evidente et al., 2014; Choi et al., 2017). No caso das proteínas, além da importância farmacológica, também têm sido aplicadas na área de proteção vegetal, visando o aumento da produção agrícola. Como exemplo, a tamavidina que tem sido expressa em arroz transgênico, proporcionando resistência ao fungo *Magnaporthe oryzae* (Erjavec et al., 2012; Takakura et al., 2014). Adicionalmente, inibidores de proteases provenientes de fungos têm demonstrado atividade inseticida, bactericida e antifúngica em plantas geneticamente modificadas, como as micocipinas (inibidores de cisteínoproteases provenientes de cogumelos basidiomicetos) (Erjavec et al., 2012; Smid et al., 2017).

Os inibidores de proteases compreendem proteínas responsáveis por regular a atividade de proteases, a partir da competição com o substrato pelo sítio ativo da enzima alvo, formando um complexo estável de interação (Popova et al., 2012; Sabotic; Kos, 2015). Essas proteínas são classificadas de acordo com a sua origem (microbiana ou vegetal), mecanismo de ação (reversível ou irreversível), similaridade estrutural ou conforme à classe de protease a qual inibem (serino, cisteíno, aspártico ou metaloproteases) (Dunaevsky et al., 2014). Elas apresentam grande versatilidade, muitos fatores únicos e mecanismos de inibição distintos de inibidores de proteases isolados de outras fontes (Sabotic; Kos, 2016). Inibidores de serinoprotease como a tripsina e a trombina têm sido detectados em extratos

proteicos de várias espécies de ascomicetos e basidiomicetos, ao passo que inibidores de cisteínoproteases estão, aparentemente, menos distribuídos nos fungos (Dunaevsky et al., 2014).

No que diz respeito à função, a ação dos inibidores está intimamente relacionada à protease a qual inibem. Desta forma, podem ser usados no controle da atividade proteolítica desregulada em várias doenças e de fatores de virulência microbiana, inibir proteases digestivas de predadores e parasitas ou, ainda, inibir proteases virais na área da medicina e agricultura (Sabotic; Kos, 2015).

Assim, essas proteínas têm sido apontadas com potencial aplicação nos tratamentos de inflamação, câncer, HIV, malária, artrite reumatológica e esclerose múltipla, além de seu uso na defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos, insetos (Ali et al., 2014; Popova et al., 2015). Essas proteínas também têm sido selecionadas como candidatas contra proteases do agente viral que causa COVID-19 (Ortega et al., 2020; Rangsinth et al., 2021).

Nesse sentido, o cultivo de *Ganoderma* spp. em resíduos madeireiros e/ou agroindustriais da Amazônia torna-se pertinente, tanto para efeito do entendimento e/ou estabelecimento do cultivo de cogumelos, quanto de comparação entre diferentes linhagens (comercial e isolada na Amazônia), visando a otimização da produção de cogumelos e de suas potencialidades, incluindo a síntese de moléculas bioativas com importantes aplicações biotecnológicas e farmacológicas.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de duas espécies de *Ganoderma* (uma espécie comercial e uma isolada da floresta amazônica) quando cultivadas em diferentes resíduos agroindustriais da Amazônia, visando avaliar a degradação dos substratos de cultivo, bem como comparar a produção de basidiomas e compostos bioativos, com ênfase nos inibidores de proteases.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar morfológicamente e molecularmente as espécies de *Ganoderma*;
- Realizar o cultivo sólido das duas espécies de *Ganoderma*, utilizando diferentes resíduos lignocelulósicos;
- Caracterizar a composição físico-química e centesimal dos substratos iniciais e após o cultivo dos macrofungos, e dos basidiomas produzidos;
- Caracterizar estruturalmente os substratos iniciais e após o cultivo dos macrofungos;
- Comparar os parâmetros produtivos (eficiência biológica, rendimento e perda de matéria orgânica) das duas espécies de *Ganoderma*;
- Avaliar o efeito dos diferentes substratos de cultivo e das diferentes espécies de *Ganoderma* sobre a produção de proteínas;
- Detectar a atividade de proteases e inibidores de proteases (serinoproteases, cisteínoproteases) nos basidiomas
- Comparar o perfil proteico dos extratos, por meio de eletroforese em géis de poliacrilamida.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Resíduos lignocelulósicos

Os resíduos vegetais como palha/farelo de arroz e trigo, bagaço de cana-de-açúcar, serragens, espiga e palha de milho e cascas de café têm sido utilizados como substratos de baixo custo para cultivar cogumelos (Otieno et al., 2022). Junto a esses resíduos, outros materiais como os farelos, são usualmente incorporados na formulação dos substratos, visando equilibrar as concentrações de nitrogênio, micro e macronutrientes, além de aminoácidos e proteínas no meio de crescimento fúngico. Contudo, as concentrações requeridas em tais formulações são bastante variadas e a opção é por produtos encontrados na região (Macedo et al., 2012). Adicionalmente, outros fatores influenciam a produção dos macrofungos, incluindo fatores abióticos como umidade, oxigênio, temperatura e a espécie/ linhagem fúngica. (Gasparotto et al., 2019).

O cultivo em estado sólido é um dos métodos mais empregados para a produção de cogumelos, sendo uma técnica biotecnológica que possibilita a utilização de biomassas lignocelulósicas para a produção de alimentos, além da possibilidade de utilização do resíduo de cultivo em outros setores (Antunes et al., 2020). Esse processo também é considerado ecologicamente correto, uma vez que possibilita a utilização de resíduos da agroindústria e madeiras como matéria-prima para a geração de produtos com valor agregado, reduzindo possíveis impactos ambientais oriundos do seu descarte, diminuindo o custo de produção de cogumelos (Chawaka, 2019; Araújo et al., 2020; Getachew; Keneni; Karataş, 2022).

O cultivo de *Ganoderma* tem atraído atenção mundial, expandindo sua comercialização na última década, principalmente, devido à possibilidade desse cogumelo agregar valor à economia local (Singh et al., 2021). Espécies como *G. lucidum* são pouco comuns na natureza e, devido à crescente demanda por elas, é necessário produzi-las em grande escala, onde o cultivo em sacos com substratos lignocelulósicos é dito como mais favorável, possibilitando o desenvolvimento mais rápido das hifas e a colheita dos basidiomas, em comparação ao cultivo em toras de madeira (Khoo et al., 2022). É importante ressaltar que, para esse gênero, já é descrita a utilização de serragens de várias espécies vegetais, juntamente com

misturas de fibra de coco, casca de amendoim, sorgo, farelo de trigo, arroz e milho, grama, dentre outros (Seephueak; Preecha; Seephueak, 2019).

4.1.1 Açaí (*Euterpe* sp.)

O açaí ou açazeiro (*Euterpe* sp.) é uma palmeira neotropical, nativa de uma região que se estende da América Central ao norte da América do sul, com ocorrência em florestas de várzea sazonais e florestas de terra firme nos Estados do Acre, Amazonas, Rondônia e Pará (Almeida et al., 2018). A partir do processamento de seus frutos é obtida a polpa, a qual é bastante reconhecida economicamente por apresentar qualidade nutricional, sendo fonte de minerais, proteínas, polifenóis, antocianinas e ácidos graxos importantes para a saúde humana (Araújo et al., 2020).

No ano de 2018 a produção nacional do fruto alcançou 221 mil toneladas e tem demonstrado tendência de aumento a cada ano. Associado a isso, têm surgido problemáticas inerentes à essa cultura, incluindo o fato de que 90% do fruto corresponde à semente, sendo aproveitado pelas indústrias de processamento do fruto apenas 10% (Barros et al., 2021). Nesse sentido, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estima-se que cerca de 176 mil toneladas de resíduos provenientes do despulpamento do açaí tenham sido descartadas (Barbosa et al., 2019).

Assim, uma possível utilização para esses resíduos do despulpamento do açaí é seu emprego no cultivo de cogumelos, o que já é relatado na literatura, como nos trabalhos de Fonseca et al. (2015), Aguiar et al. (2021), e Sales-Campos et al. (2021), os quais demonstraram o potencial de cultivo dos cogumelos *Pleurotus ostreatus* e *P. ostreatus roseus* em resíduos de sementes de açaí, obtendo-se basidiomas com importantes características nutricionais e bioativas.

4.1.2 Marupá (*Simarouba amara*)

As árvores de marupá (*Simarouba amara*) são distribuídas naturalmente por toda a Região Amazônica, Centro-Oeste e Sudoeste do Brasil, recebendo destaque por sua madeira que é dita como uma alternativa à utilização do cedro (*Cedrela* sp.). Dentre suas possíveis utilizações, está a fabricação de móveis, brinquedos, forros e caixas, além de apresentarem potencial de aplicação na construção civil/naval e programas de reflorestamento em suas regiões de ocorrência, dado seu rápido crescimento (Paula et al., 2020; Souza et al., 2020).

Na Região Amazônica, o marupá está entre as principais espécies florestais utilizadas para a obtenção de madeira, devido a isso, a serragem proveniente do processamento dessa espécie madeireira é encontrada com frequência na região Norte do Brasil (Vargas-Isla; Hanada; Ishikawa, 2012). Nesse sentido, Bezerra e colaboradores (2016) descrevem a aplicação de resíduos de marupá na fabricação de compósitos de cimento-madeira, demonstrando o potencial desse resíduo.

Com relação ao cultivo de cogumelos, essa espécie também já possui relatos de sua potencialidade, servindo como substrato para o desenvolvimento de *P. ostreatus*, *P. djamor*, *Boletus* sp., *Auricularia* sp. e *Lentinus strigosus* (Sales-Campos; Andrade, 2020; Sales-Campos et al., 2022). No entanto, um fator a ser considerado na utilização desse resíduo é a presença de taninos, os quais são abundantes na casca e caule da espécie, uma vez que essa classe de metabólitos secundários pode apresentar efeito inibitório do crescimento dos cogumelos, dependendo de sua concentração, assim como já relatado para *Lentinula edodes* (Fan et al., 2006; Alves et al., 2015).

4.1.3 Guaruba-cedro (*Vochysia maxima*)

Vochysia maxima, conhecida pelos nomes de cedrorana, quaruba, quaruba-verdadeira, quaruba-cedro, guaruba e guaruba-cedro é uma árvore de grande porte, utilizada na construção pesada e leve, embarcações, armação de móveis, torneados e chapas (SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO, 2022). Para essa espécie, a prática silvicultural com plantio comercial ou de reflorestamento é a mais adotada visando a sua preservação, além de suprir a demanda do mercado madeireiro (Chu; Yared; Maki, 2004).

Essa espécie é dita como uma madeira tropical da Amazônia, presente na Amazônia brasileira, sendo bastante utilizada no mercado madeireiro interno, sendo empregada, principalmente, na construção civil (Reis et al., 2017; Ribeiro et al., 2019). Em estudo realizado por Almeida e colaboradores (2021), avaliou-se o índice de produtividade em uma área de manejo florestal da Amazônia brasileira, no qual, verificaram que o guaruba-cedro estava entre as cinco mais manejadas, sendo responsáveis por cerca de 200.655,2 m³ de madeira coletada.

Quanto ao cultivo de cogumelos, ainda não há relatos do uso dessa espécie como substrato de cultivo, no entanto, a geração de resíduos, como serragens, é

uma realidade e são encontrados trabalhos com *Vochysia* sp. visando o aproveitamento de seus resíduos para a fabricação de compósitos como chapas de cimento-madeira (Macêdo et al., 2012) e tijolos de solo-cimento (Viezzzer et al., 2021).

4.2 Gênero *Ganoderma*

Ganoderma P. Karst. (Polyporaceae, Basidiomycota) pertence ao grande gênero de fungos poliporóides (Ryvarden, 2000), abrangendo 80 espécies com ampla distribuição geográfica (Moncalvo; Ryvarden, 1997). *Ganoderma* há muito tempo é considerado um dos mais importantes fungos medicinais em todo o mundo (Paterson, 2006), onde espécies lacadas de *Ganoderma* foram usadas como fungos medicinais na medicina tradicional chinesa por mais de dois milênios (Anon, 1955).

O gênero *Ganoderma* é considerado cosmopolita e causador da podridão branca, pois se alimentam decompondo materiais vegetais e, devido à esta característica, as espécies deste gênero crescem sobre a superfície de diversas árvores, como palmeiras, seringueiras, pessegueiros, causando danos estruturais. No entanto, exercem papel fundamental na ciclagem de carbono (Ariffin; Idris; Singh, 2000; Paula; Briosso, 2021).

Morfologicamente, as espécies de *Ganoderma* apresentam basidiocarpo na forma de leque, crescendo sobre troncos de árvores vivas ou mortas, possuem superfície com um brilho marrom, com o basidiocarpo podendo ser sustentado por estipe e, o píleo e a estipe geralmente apresentam aspecto lacado. Os basidiósporos são coloridos, ovoides, com ápice truncado, além disso, apresentam parede dupla, onde a parede interna é ornamentada, espessa e colorida e, a parede externa é lisa, fina e hialina (Shin et al., 1986; Ryvarden, 2004;).

As propriedades químicas e farmacológicas de mais de 20 espécies de *Ganoderma* já foram estudadas em todo mundo, sendo *Ganoderma lucidum* a mais pesquisada, com mais de 240 compostos secundários já isolados dos basidiomas e/ou do micélio deste fungo (Chen et al., 2012; Cao et al., 2018; Gu et al., 2018). Esses organismos são relatados por apresentarem diversos efeitos benéficos, como antienvelhecimento (Wang et al., 2017a), antitumoral (Wang et al., 2020), combate à neurastenia (Tang et al., 2005), antidiabético (Lee et al., 2020), combate à insuficiência cardíaca (Adeyi et al., 2021) e à hepatite (Liu et al., 2017), dentre outras

atividades. Como princípios ativos, *Ganoderma* spp. apresentam polissacarídeos, triterpenóides, ácidos ganodéricos, alcaloides, ácidos graxos, ergosterol etc. (Sharma et al., 2019).

De modo geral, as espécies do gênero *Ganoderma* já contam com mais de 431 metabólitos secundários isolados nos últimos 40 anos, com cerca de 380 terpenoides (meroterpenoides, ácidos lucidênicos e ácidos ganodérico) e mais de 30 esteroides (Ahmad, 2018). No entanto, fatores que devem ser levados em consideração na obtenção de seus produtos naturais incluem a linhagem e a composição do substrato, isso porque vários estudos demonstram diferenças no perfil químico dos cogumelos e, conseqüentemente, em suas bioatividades (Bidegain et al., 2019).

4.3 Produção de biomoléculas por macrofungos

A utilização de macrofungos como alimentos nutracêuticos, promotores de saúde, deve-se, principalmente, à sua composição química, uma vez que apresentam quantidades significativas de carboidratos, lipídios, proteínas, enzimas, minerais, vitaminas e metabólitos secundários. Isto se deve às características particulares de crescimento e desenvolvimento dos macrofungos, que resultam no acúmulo de diversos metabólitos (Rahi e Malik, 2016).

Dessa forma, esses micro-organismos têm se destacado como produtores de biomoléculas com propriedades farmacológicas, sendo cultivados sob condições controladas visando a produção de polissacarídeos, polipeptídios, proteínas e diversas substâncias provenientes do metabolismo secundário (Si et al., 2019). Dentre as biomoléculas mais investigadas destacam-se os polissacarídeos como as β -D-glucanas, glicoproteínas, lectinas e terpenoides, responsáveis pelos seus atributos antioxidativos, anti-inflamatórios, anticancerígenos, imunomodulatórios, antimicrobianos, hepatoprotetores, antidiabéticos e vitamínicos (Barseghyan et al., 2016; Rai et al., 2017; Stojkovic et al., 2019; 2021; Sánchez.).

4.3.1 Proteases

As proteases são enzimas responsáveis por hidrolisar ligações peptídicas entre os aminoácidos de cadeias proteicas, liberando peptídeos de diversos tamanhos ou aminoácidos livres (Habib et al., 2007). Essas enzimas são

encontradas em plantas, animais e na maioria dos micro-organismos, sendo fundamentais em todos os organismos vivos, principalmente quanto à síntese de biomoléculas (Ramachandran et al., 2012). As proteases compreendem cerca de 2% do genoma humano e 1-5% dos genomas dos organismos infecciosos (Shamsi et al., 2016), cumprindo um papel importante na sobrevivência desses seres (Neurath et al., 1989; Valueva, 2005; Joanitti et al., 2006). Adicionalmente, essas moléculas catalisam diversos processos biológicos como a iniciação de sinais celulares, regulação da resposta inflamatória, apoptose celular, coagulação sanguínea e produção hormonal (Gomes et al., 2011).

Aproximadamente, 60% do mercado mundial de enzimas é composto por proteases (Kumari et al., 2015), uma vez que possuem aplicações em diversos setores industriais, como antiparasitárias, herbicidas, pesticidas, no setor alimentício, incluindo panificação e produção de bebidas, processamento de couro e seda, bem como aplicações na indústria de cosméticos (Afifa et al., 2022).

4.3.2 Classificação das proteases

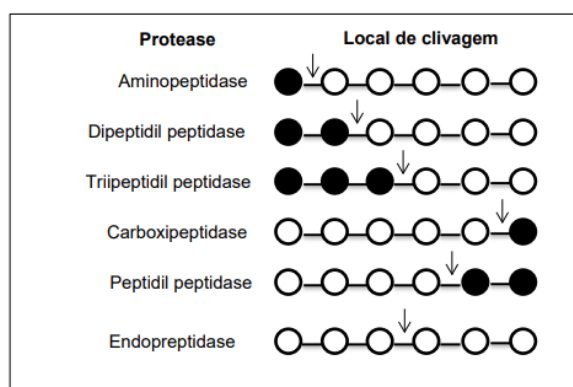
A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) classifica as proteases como hidrolases (Gurumallesh et al., 2019), sendo divididas em grupos, de acordo com o tipo de reação catalisada, propriedades químicas do sítio catalítico, estrutura da enzima e posição da ligação peptídica onde ocorrerá a clivagem proteica (Tabela 1) (Guleria et al., 2019).

Quanto à posição da clivagem hidrolítica na proteína, as proteases são classificadas em dois grandes grupos: exopeptidases e endopeptidases (Figura 1) (Mcdonald, 1985). As exopeptidases irão atuar nas extremidades de peptídeos, podendo ser subdividas em aminopeptidases, quando hidrolisam ligações peptídicas nas regiões N-terminais e, carboxipeptidases para as regiões C-terminais das proteínas. As endopeptidases, por sua vez, catalisam a quebra das demais regiões dos peptídeos (Beynon; Bond, 1989).

Tabela 1: Classificação e mecanismos de ação de proteases

Classe de protease	Mecanismo de ação	Exemplos
Aminopeptidases	Atua na extremidade N-terminal livre de uma proteína	Peptidase M1
Dipeptidases	Hidrólises na ligação dipeptídica N-terminal	Alfa-aspartil dipeptidase
Tripeptidases	Hidrólises da ligação tripeptídica N-terminal	Linfo peptidase
Carboxipeptidases	Atua na extremidade C-terminal livre e libera um único aminoácido	Carboxipeptidase Pancreática A
Serinoproteases	Serina serve como aminoácido nucleofílico do sítio ativo	Subtilisina
Metaloproteases	A catálise é mediada por um metal, muitas vezes zinco	Termolisina
Cisteínoproteases	Mecanismo catalítico envolve um grupo tiol de cisteína nucleofílica	Papaína

Fonte: Gurumallesh et al. (2019)

Figura 1: Proteases e posições de clivagens hidrolíticas nas proteínas

Fonte: Fernandes (2019)

As aminopeptidases podem ser secretadas intra ou extracelularmente. Quando são intracelulares, são encontradas em diferentes compartimentos, como citoplasmas e lisosomas, membranas (Sanz, 2007; Taylor, 1993). Essas enzimas exercem importantes funções nos organismos, como clivagem da metionina na extremidade N-terminal de proteínas recém-sintetizadas para torná-las funcionais, regulação da função de proteínas sinalizadoras, controle do ciclo celular, digestão de peptídeos gerados pela hidrólise gástrica e pancreática, além de serem

consideradas fortes receptores de alguns vírus, como coronavírus (Barret, 1994; Christensen et al., 1999; Lowther; Matthews 2000).

Dependendo do tamanho do peptídeo liberado após a hidrólise, as aminopeptidases podem ser subdividas em três grupos: aminopeptidases que quebram a primeira ligação da cadeia polipeptídica, liberando um único aminoácido e, dipeptidil e tripeptidil peptidases que atuam na segunda e terceira ligação peptídica, removendo dipeptídeos ou tripeptídeos de proteínas, respectivamente (Sanderink et al., 1988).

As carboxiproteases são classificadas de acordo com o aminoácido residual encontrado no seu sítio ativo, compreendendo as serino-carboxipeptidases, cisteíno-carboxipeptidases e metalo-carboxipeptidases (Rani et al., 2012). Essas enzimas estão envolvidas em funções primordiais, como digestão de moléculas alimentares, cicatrização de feridas internas e externas, coagulação sanguínea e pós-tradução de proteínas recém-sintetizadas (Gurumallesh et al., 2019).

As serinoproteases, em particular, são caracterizadas pela presença de um resíduo de serina no sítio ativo da enzima (Tabela 2) (Laskar et al., 2012). Essas proteases são encontradas em todos os organismos vivos e, correspondem a um terço de todas as proteases conhecidas, estando subdividas em 20 famílias e 6 classes, de acordo com a estrutura da molécula (Rao et al., 1998; Rawlings et al., 2008;). As serinoproteases são sintetizadas como zimogênios, uma forma inativa da enzima, sendo um mecanismo utilizado para impedir a degradação tecidual onde essas proteínas são biossintetizadas (Khan et al., 1999).

Tabela 2 - Características das endopeptidases

Características das endopeptidases	Serinoprotease	Cisteínoprotease	Aspartato/Carboxil protease	Metaloprotease
	Tripsina Quimotripsina	μ -Calpaína m-Calpaína Catepsina B H L	Pepsina Catepsina D	
Aminoácido do sítio ativo	Serina e Histidina	Aspartato / Cisteína	Aspartato / Cisteína	Fenilalanina / Leucina
Íons metálicos	Ca ²⁺			Ca ²⁺
pH ideal	6 - 11	2 - 3	2 - 5	5 – 8
Temperatura (°C)	50 - 70	40 - 55	40 - 55	65 – 85
Peso molecular (KDa)	18 - 35	20 - 37	30 - 48	19 – 37 / 69 - 74
Mecanismo de catálise	Endopeptidase com um resíduo de serina no sítio ativo envolvido no processo catalítico	Endopeptidase com um resíduo de cisteína no sítio ativo envolvido no processo catalítico	Endopeptidase com um resíduo de aspartato no sítio ativo envolvido no processo catalítico	Endopeptidase com íons metálicos (Zn) no sítio ativo envolvido no processo catalítico
Aplicações	Coagulação sanguínea Resposta imune à inflamação Enzimas digestivas	Apoptose das células cancerígenas da mama	Controle da pressão arterial Enzimas digestivas Amolecedor de carne	Cicatrização de feridas Desenvolvimento embrionário

Fonte: Gurumallesh, et. al. (2019)

As principais serinoproteases são quimotripsina, tripsina e elastase (Gurumallesh et al., 2019). Esses catalisadores biológicos exercem muitas funções nos organismos vivos, podendo atuar na digestão de moléculas alimentares, coagulação sanguínea, assim como dissolução de coágulos, auxiliando a penetração do espermatozoide no óvulo, renovação proteica etc. (Gurumallesh, et al 2019; Otlewski et al., 1999).

As proteases aspárticas são enzimas ácidas que hidrolisam proteínas por meio de uma molécula de água ativada que se encontra restrita a resíduos de aspartato do sítio ativo (Szecsi, 1992). Essas proteases são consideradas enzimas ácidas pois possuem atividade ótima nas faixas de pH de 3-4, e são subdividas em três famílias: retropepsina, proteínas de retrovírus e pepsina. A sua estrutura estereoquímica é caracterizada pela presença de uma fenda contendo um sítio catalítico com dois resíduos de aspartato, entre dois domínios enzimáticos (Benes et al., 2008).

Os exemplos clássicos de proteases aspárticas são pepsina, catepsina e renina (Gurumallesh et al., 2019). Essas enzimas exercem funções importantes, como modificações nas caudas das histonas para facilitar ou impedir a expressão gênica, auxilia os processos virais infecciosos, assim como no envelhecimento espermato gênico e esporulação (Tesar; Marquardt, 1990). Essas proteases também estão envolvidas no surgimento de doenças relevantes como Alzheimer, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), candidíase, etc. (Skrbec; Romeo, 2002).

As cisteíno proteases, por sua vez, são enzimas que possuem resíduos de cisteína nos seus sítios ativos, além da presença de histidina e aspartato, formando uma tríade catalítica confere a capacidade de hidrólise do substrato (Sawant; Nagendran, 2014; Siklos; Benaissa, 2015). Essas enzimas são amplamente estudadas como alvos de tratamento de desordens no sistema humano, pois atuam no remodelamento ósseo, processos de reconhecimento imunológico e apoptóticos, processamento de proteínas recém-sintetizadas e pró-hormônios (Brix et al., 2008; Turk et al., 2001). Os processos infecciosos parasitários também estão associados à participação dessas enzimas, pois processam os nutrientes necessários ao parasita e fatores de virulência (Engel et al., 1998).

As metaloproteinases requerem um íon metálico (principalmente Zn^{2+}) divalente para hidrolisarem as proteínas e, estão divididas em 30 famílias (Rani et

al., 2012). Essas proteases podem ser subdivididas, ainda, em quatro grupos: (I) neutro, (II) alcalino, (III) Myxobacter I e (IV) Myxobacter II (11). Essas hidrolases são relatadas como degradadoras de macromoléculas da matriz extracelular e membranas basais, como colágeno, fibronectina, laminina e proteoglicana. Devido à essa característica, elas também são conhecidas como matrixinas (Birkedal-Hansen, 1993). À princípio, elas são secretadas como zimogênios por neutrófilos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e células tumorais, onde, posteriormente, sofrem modificações estruturais para se tornarem ativas (Woessner, 1991).

As peptidases glutâmicas são caracterizadas pela presença de ácido glutâmico em seu sítio ativo (Gurumallesh et al., 2019). A primeira enzima identificada pertencente a esse grupo foi a peptidase glutâmica de *Scytalidium*, isolada do fungo *Scytalidium lignicola*, com o ácido glutâmico e glutamina formando uma díade catalítica. Essas hidrolases possuem pH ideal em torno de 2 e, portanto, são consideradas ácidas (Sims et al., 2004).

4.3.3. Inibidores de proteases

As proteases são fundamentais para o funcionamento adequado de diversos organismos vivos, contudo, a sua expressão deve ser controlada, pois a atividade desregulada dessas hidrolases pode desencadear distúrbios fisiológicos como hemorragia (trombina e plasmina), hipertensão (renina), câncer (metaloproteases), neurodegeneração (caspases) e infecções parasitárias e virais (cisteíno proteases) (Rauf et al., 2021).

Assim, uma das formas de regular a atividade das proteases é por meio de inibidores de proteases. A maioria dos inibidores de proteases são proteínas, no entanto, também podem ser polissacarídeos diversos, polifenóis, glicolídeos, triterpenóis e outros compostos não proteicos de baixa massa molecular (Cateni et al., 2010; Doljak et al., 2006). Os inibidores de proteases de natureza proteica são considerados os mais vantajosos em comparação às outras classes químicas, pois são mais seguros e específicos, atuando somente nas proteases de interesse, reduzindo efeitos adversos (Shamsi et al., 2016).

Essas moléculas estão presentes em todos os organismos vivos, bem como em genomas virais (Karthik; Kirthi, 2015; López-Otín; Overall, 2002). O primeiro inibidor de protease elucidado foi isolado de bactérias marinhas, identificado como

marinoestatina (serinoproteases), seguido por monastatina (cisteínoprotease), (RAUF et al., 2021). Esses inibidores vêm sendo usados para diversos fins, com ênfase para o tratamento de doenças como câncer, malária, hipertensão, trombose, AIDS, esclerose, artrite e distrofia muscular (Dunaevsky, 2014; Kobayashi et al., 2003).

REFERÊNCIAS

- ADEYI, A. O. *et al.* Ganoderma lucidum ethanol extract abrogates metabolic syndrome in rats: In vivo evaluation of hypoglycemic, hypolipidemic, hypotensive and antioxidant properties. **Obesity Medicine**, vol. 22, p. 100320, 2021.
- AHMAD, M F. *Ganoderma lucidum*: a rational pharmacological approach to surmount cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 260, p. 113047, 2020.
- AHMAD, M. F. *et al.* *Ganoderma lucidum*: A potential pleiotropic approach of ganoderic acids in health reinforcement and factors influencing their production. **Fungal Biology Reviews**, vol. 39, p. 100-125, 2022. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, Volume 29, 100755, 2022.
- AHMED, A. F. *et al.* (2023). Overview on the edible mushrooms in Egypt. **Journal of Future Foods**, 3 (1), 8-15.
- ALMEIDA, U. O. *et al.* Environment and slow-release fertilizer in the production of *Euterpe precatoria* seedlings. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, vol. 48, p. 382-389, 2018.
- ALVES, I. A. B. S. *et al.* Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por espectrofotometria no visível para quantificação de taninos totais na casca do caule de *Simarouba amara* Aubl. **Revista Árvore**, vol. 39, p. 37-47, 2015.
- ANTUNES, F. *et al.* Valorization of Mushroom By-Products as a Source of Value-Added compounds and Potential Applications. **Molecules**, vol. 25, no. 11, p. 2672-2711, 2020.
- ARAÚJO, C. S. *et al.* Use of agro-industry residues as substrate for the production of *Euterpe precatoria* seedlings. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, vol. 50, no. 58709, p.1-9, 2020.
- ARIFFIN, D.; IDRIS, A. S.; SINGH, G. Status of Ganoderma in oil palm. In: *Ganoderma diseases of perennial crops*. **Wallingford UK**: CABI, 2000. p. 49-68.
- BARBOSA, A. M. *et al.* Caracterização de partículas de açaí visando seu potencial uso na construção civil. **Matéria (Rio de Janeiro)**, vol. 24, no. 3, p. 1-11, 2019.
- BARRETT, A. J. Classification of peptidases. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 1-15, 1994.
- BARROS, S. S. *et al.* Waste açaí (*Euterpe precatoria* Mart.) seeds as a new alternative source of cellulose: Extraction and characterization. **Research, Society and Development**, vol. 10, no. 7, p. 1-16, 2021.

BARSEGHYAN, G. S.; BARAZANI, A.; WASSER, S. P. Medicinal mushrooms with anti-phytopathogenic and insecticidal properties. In: Mushroom Biotechnology. **Academic Press**, 2016. p. 137-153.

BENES, P.; VETVICKA, V.; FUSEK, M. Cathepsin D—many functions of one aspartic protease. **Critical reviews in oncology/hematology**, vol. 68, no. 1, p. 12-28, 2008.

BIDEGAIN, M. A. *et al.* Analysis of the influence of substrate formulations on the bioactive chemical profile of lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes) by conventional and chemometrics methods. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, vol. 21, no. 6, 2019.

BIJALWAN, A. *et al.* Growth performance of *Ganoderma lucidum* using billet method in Garhwal Himalaya, India. **Saudi Journal of Biological Sciences**, vol. 28, no. 5, p. 2709-2717, 2021.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. **Journal of periodontology**, vol. 64, p. 474-484, 1993.

BRIX, K. *et al.* Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. **Biochimie**, vol. 90, no. 2, p. 194 - 207, 2008.

CAO, Y. *et al.* *Ganoderma*: a cancer immunotherapy review. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 9, p. 1217, 2018.

CATENI, F. *et al.* Cerebrosides with antiproliferative activity from *Euphorbia peplis* L. **Fitoterapia**, vol. 81, no. 2, p. 97 - 103, 2010.

CHEN, Y. *et al.* Quantification of total polysaccharides and triterpenoids in *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma atrum* by near infrared spectroscopy and chemometrics. **Food Chemistry**, vol. 135, no. 1, p. 268-275, 2012.

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**, vol. 47, no. 6, p.539-546, 2017.

CHRISTENSEN, J. E. *et al.* Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 76, no. 1, p. 217 - 246, 1999.

CHU, E. Y.; YARED, J. A. G.; MAKI, H. J. O. Efeitos da inoculação micorrízica e da adubação fosfatada em mudas de *Vochysia maxima* Ducke. **Revista Árvore**, vol. 28, no. 2, p. 157-165, 2004.

CRUZ, A. *et al.* cultivated *Ganoderma lucidum* mushrooms for the production of supplements enriched with essential elements. **Journal of Food Science**, vol. 81, no. 3, p. 87 - 92, 2016.

DOLJAK, B. *et al.* Glycerolipids as selective thrombin inhibitors from the fungus *Stereum hirsutum*. **Drug development and industrial pharmacy**, vol. 32, no. 5, p. 635 - 643, 2006.

DUNAEVSKY, Y. E., *et al.* "Fungal inhibitors of proteolytic enzymes: classification, properties, possible biological roles, and perspectives for practical use." **Biochimie** vol. 101, p. 10-20, 2014.

DUNAEVSKY, Y. E., *et al.* Fungal inhibitors of proteolytic enzymes: classification, properties, possible biological roles, and perspectives for practical use. **Biochimie**, vol. 101, p. 10-20, 2014.

ECONOMOU *et al.* Valorization of spent oyster mushroom substrate and laccase recovery through successive solid-state cultivation of *Pleurotus*, *Ganoderma*, and *Lentinula* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology** 101.12 (2017): 5213-5222.

ERKEL, E. Yield performance of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst cultivation on substrates containing different protein and carbohydrate source. **African Journal of Agricultural Research**, vol. 4, no.11, p. 1331 - 1333, 2009.

EVIDENTE *et al.* "Fungal metabolites with anticancer activity." **Natural Product Reports** vol. 31.5, p. 617 – 627, 2014.

FAN, L. *et al.* Effect of caffeine and tannins on cultivation and fructification of *Pleurotus* on coffee husks. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 37, p. 420-424, 2006.

GETACHEW, A.; KENENI, A.; CHAWAKA, M. Production of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on substrate composed from wheat straw, waste paper and cotton seed waste. **International Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 4, no. 2, p. 38 - 44, 2019.

GIUSTI, A. *et al.* Molecular authentication of mushroom products: First survey on the Italian market. **Food Control**, vol. 150, p.109778, 2023.

GOLDBECK, R.; MAUGERI FILHO, F. Screening, characterization, and biocatalytic capacity of lipases producing wild yeasts from Brazil biomes. **Food Science and Biotechnology**, vol.22, p, 79- 87, 2013.

GOMES TR, M. *et al.* Plant proteinases and inhibitors: an overview of biological function and pharmacological activity. **Current Protein and Peptide Science**, vol. 12, no. 5, p. 417-436, 2011.

GURUMALLESH, P. *et al.* A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 128, p. 254-267, 2019.

HABIB, H. M. F. K. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**. 2, p. 68-85, 2007.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 Ilion species. **Microbiology Spectrum**, vol. 5, no. 4, p. 5.4. 10, 2017.

HU, L. *et al.* A new nortriterpenoid from the fruiting bodies of *Ganoderma tropicum*. **Phytochemistry Letters**, vol. 7, p. 11-13, 2014.

JOANITTI, G. A.; FREITAS, S. M.; SILVA, L. P. Proteinaceous protease inhibitors: structural features and multiple functional faces. **Current Enzyme Inhibition**, vol. 2, no. 3, p. 199-217, 2006.

KARATAŞ, A. Effects of different agro-industrial waste as substrates on proximate composition, metals, and mineral contents of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). **International Journal of Food Science & Technology**, vol. 57, no. 3, p. 1429-1439, 2022.

KARTHIK, L.; KIRTHI, Av. Protease inhibitors from marine organisms. In: **Antimicrobials**. CRC Press, p. 192-205, 2015.

KHAN, A.R. *et al.* Structural aspects of activation pathways of aspartic protease zymogens and viral 3C protease precursors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 96, no. 20, p. 10968-10975, 1999.

KHOO, S.C. *et al.* Valorisation of biomass and diaper waste into a sustainable production of the medical mushroom Lingzhi *Ganoderma lucidum*. **Chemosphere**, vol. 286, p. 131477, 2022.

KOBAYASHI, T. *et al.* *Pseudoalteromonas sagamiensis* sp. nov., a marine bacterium that produces protease inhibitors. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, vol. 53, no. 6, p. 1807 - 1811, 2003.

LASKAR, A. *et al.* Three-dimensional molecular modeling of a diverse range of SC clan serine proteases. **Molecular Biology International**, vol. 2012, 2012.

LEE, S.K. *et al.* Characterization of α -glucosidase inhibitory constituents of the fruiting body of lion's mane mushroom (*Hericium erinaceus*). **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 262, p. 113 - 197, 2020.

LIU, Q. *et al.* Characterization of polysaccharides with antioxidant and hepatoprotective activities from the edible mushroom *Oudemansiella radicata*. **Molecules**, vol. 22, no. 2, p. 234, 2017.

LÓPEZ-OTÍN, C.; OVERALL, C. M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. **Nature reviews Molecular cell biology**, vol. 3, no. 7, p. 509 - 519, 2002.

LOWTHER, W. T.; MATTHEWS, B. W. Structure and function of the methionine aminopeptidases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, vol. 1477, no. 1-2, p. 157 - 167, 2000.

LUANGHARN, T. *et al.* A new record of *Ganoderma tropicum* (Basidiomycota, Polyporales) for Thailand and first assessment of optimum conditions for mycelia production. **MycoKeys**, vol. 51, p. 65, 2019.

MACÊDO, A. N; SOUZA, A. A. C; POMPEU NETO, B. B. Chapas de cimento-madeira com resíduos da indústria madeireira da Região Amazônica. **Ambiente Construído**, vol. 12, p. 131-150, 2012

MCDONALD, J. K. An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. **The Histochemical Journal**, vol. 17, no. 7, p. 773 - 785, 1985.

MONCALVO, J; RYVARDEN, L. **A nomenclatural study of the Ganodermataceae** Donk. Fungiflora, 1997.

NEURATH, H. Proteolytic processing and physiological regulation. **Trends in Biochemical Sciences**, vol. 14, no. 7, p. 268-271, 1989.

NGUYEN, T.D. *et al.* Lanostane Triterpenoids from *Ganoderma tropicum* Collected in Vietnam and their nitroblue tetrazolium reductive activity *in vitro*. **Natural Product Sciences**, vol. 26, no. 4, p. 334-339, 2020.

NIEGO, A.G. *et al.* Macrofungi as a nutraceutical source: Promising bioactive compounds and market value. **Journal of Fungi**, vol. 7, no. 5, p. 397, 2021

ORTEGA, F.; BEHAGUE, D. P. O que a medicina social latino-americana pode contribuir para os debates globais sobre as políticas da Covid-19: lições do Brasil. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, vol. 30, p. 300 – 305, 2020.

OTIENO, O.D. *et al.* Utilization of fruit waste substrates in mushroom production and manipulation of chemical composition. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 39, p. 102 - 250, 2022.

OTLEWSKI, J.; KROWARSCH, D.; APOSTOLUK, W. Protein inhibitors of serine proteinases. **Acta Biochimica Polonica**, vol. 46, no. 3, p. 531-565, 1999.

PATERSON, R. RUSSELL M. *Ganoderma*—a therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry**, vol. 67, no. 18, p. 1985-2001, 2006.

PAULA, T.C.; BRIOSO, P.S.T. Resistance of tropical arboreous species to the action of *Ganoderma philippii*. **Ciência Florestal**, vol. 31, p. 393-416, 2021.

POPOVA, V. V. *et al.* Production of tamavidin 1, a biotin-binding protein from tamogitake mushroom, confers resistance to the blast fungus *Magnaporthe oryzae* in transgenic rice, **Molecular Biotechnology**, vol. 51, no.1, p. 9 - 17, 2012.

RAHI, D. K., MALIK, D. Diversity of mushrooms and their metabolites of nutraceutical and therapeutic significance. **Journal of Mycology**. 2016.

RAI, S. N. *et al.* Therapeutic applications of mushrooms and their biomolecules along with a glimpse of in silico approach in neurodegenerative diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 137, p. 111 - 377, 2021.

RAMACHANDRAN, R. *et al.* Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges. **Nature reviews Drug discovery**, vol. 11, no. 1, p. 69 - 86, 2012.

RANGSINTH, P. *et al.* Mushroom-derived bioactive compounds potentially serve as the inhibitors of SARS-CoV-2 main protease: An in-silico approach. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, vol. 11, no. 2, p. 158 - 172, 2021.

RANI, N. *et al.* FAT10 and NUB1L bind to the VWA domain of Rpn10 and Rpn1 to enable proteasome-mediated proteolysis. **Nature communications**, vol. 3, no. 1, p. 1 - 11, 2012.

RAO, M. B. A. M.; TANKSALE, M. S.; GHATGE, V. V. Deshpande Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases Microbiol. **Mol. Biol. Rev.**, vol. 62 , p. 597 – 635, 1990.

RAUF, A. *et al.* Diversity, molecular mechanisms and structure-activity relationships of marine protease inhibitors—A review. **Pharmacological Research**, vol. 166, p. 105 - 521, 2021.

RAUF, Abdur *et al.* Diversity, molecular mechanisms and structure-activity relationships of marine protease inhibitors—A review. **Pharmacological Research**, vol. 166, p. 105 - 521, 2021.

REIS, A.R.S. *et al.* Natural resistance of four Amazon woods submitted to xylophagous fungal infection under laboratory conditions. **Madera y Bosques**, vol. 23, no. 2, p. 155 - 162, 2017.

RIBEIRO, D. S. *et al.* Reação da densidade e das propriedades mecânicas de três espécies amazônicas submetidas a ensaio de campo. **Revista Ciência da Madeira (Brazilian Journal of Wood Science)**, vol. 10, no. 1, p. 18 - 28, 2019.

RYVARDEN, L. *et al.* **Neotropical polypores**: Part 1: Introduction, Ganodermataceae & Hymenochaetaceae. Fungiflora, 2004.

RYVARDEN, L. Studies in neotropical polypores 2: a preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. **Mycologia**, vol. 92, no. 1, p. 180 - 191, 2000.

RZYMSKI, *et al.* Potential of cultivated *Ganoderma lucidum* mushrooms for the production of supplements enriched with essential elements. **Journal of Food Science**, vol. 81.3, 2016.

SABOTIC, J.; Kos, J. Fungal Protease Inhibitors, In: MÉRILLON, J. M.; RAMAWAT, K, G (EDS), Fungal Metabolites, **Springer International Publishing Switzerland**, p. 1 - 33, 2015.

SABOTIC, J.; KOS, J.; DREO, T. Antibacterial activity of wild mushroom extracts on bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*, **Plant Disease**, vol. 100, no. 2, p. 453 - 464, 2016.

SALES-CAMPOS, C. *et al.* Cultivo experimental de basidiomicetos causadores de podridão branca da região Amazônica em diferentes substratos. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, vol. 15, no. 1, p. 1 - 17, 2022.

SALES-CAMPOS, C.; DE ANDRADE, M. C. N. Temperatura e meio de cultura mais favoráveis ao crescimento micelial de uma linhagem de *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, vol. 77, p. 539 - 543, 2020.

SÁNCHEZ, C. Bioactives from mushroom and their application. In: **Food bioactives**. Springer, Cham, p. 23-57, 2017.

SANDERINK, G. J.; ARTUR, Y.; SIEST, G. Human aminopeptidases: **a review of the literature**. 1988.

SANZ, Y. Aminopeptidases. In: Industrial enzymes. **Springer, Dordrecht**, p. 243 – 260, 2007.

SAWANT, R.; NAGENDRAN, S. Protease: an enzyme with multiple industrial applications. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, vol. 3, no. 6, p. 568-579, 2014.

SEEPHUEAK, P.; PREECHA, C.; SEEPHUEAK, W. Effects of palm oil sludge as a supplement on *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst cultivation. **Songklanakarin Journal of Science & Technology**, vol. 41, no. 2, p. 292 - 298, 2019.

SEEPHUEAK, P.; PREECHA, C.; SEEPHUEAK, W. Effects of palm oil sludge as a supplement on *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. cultivation. **Songklanakarin Journal of Science & Technology**, vol. 41, no. 2, p. 292 - 298, 2019.

SFB - SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO. **Laboratório de Produtos Florestais - QUARUBA**. [2022] Disponível em: https://lpf.florestal.gov.br/pt-br/?option=com_madeirasbrasileiras&view=especieestudada&especieestudadaid=273. Acessado em: 25 de maio de 2022.

SHAMSI, T. N.; PARVEEN, R.; FATIMA, S. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. **International journal of biological macromolecules**, vol. 91, p. 1120 - 1133, 2016.

SHAMSI, T. N.; PARVEEN, Romana; FATIMA, Sadaf. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. **International journal of biological macromolecules**, vol. 91, p. 1120 - 1133, 2016.

SHARMA, C. *et al.* Bioactive metabolites of *Ganoderma lucidum*: Factors, mechanism and broad-spectrum therapeutic potential. **Journal of Herbal Medicine**, vol. 17, p. 100 - 268, 2019.

SHIN, G. C. *et al.* Morphological characters of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karsten grown naturally in Korea. **Korean Journal of Agricultural Science**, vol. 13, no. 1, p. 44 - 51, 1986.

SI, J. *et al.* Medium composition optimization, structural characterization, and antioxidant activity of exopolysaccharides from the medicinal mushroom *Ganoderma lingzhi*. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 124, p. 1186-1196, 2019.

SIKLOS, M.; BENAÏSSA, M.; THATCHER, G. R. J. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, vol. 5, no. 6, p. 506 - 519, 2015.

SILVA, M. P. P. **Anteprojeto de produção de cogumelos shiitake (*Lentinula edodes*) em modo de produção biológico**. Dissertação de mestrado em Agricultura Biológica, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, p. 64, 2013.

SIMS, A. H. *et al.* Glutamic protease distribution is limited to filamentous fungi. **FEMS microbiology letters**, vol. 239, no. 1, p. 95-101, 2004.

SKRBEC, D.; ROMEO, D. Inhibition of *Candida albicans* secreted aspartic protease by a novel series of peptidomimetics, also active on the HIV-1 protease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 297, no. 5, p. 1350 - 1353, 2002.

SMID, I. *et al.* Source of Milk-clotting proteases, **African Journal of Microbiology Research**, vol. 11, n. 17, p. 660 - 667, 2017.

SOUZA, M. M; BUFALINO, L.; GOMES, L. G. Caracterização madeira de Marupá (*Simarouba Amara* Aubl, Simaroubaceae) visando utilização na indústria moveleira. **Brazilian Journal of Development**, vol. 6, no. 12, p. 98163 - 98185, 2020.

STOJKOVIC, D. *et al.* An insight into antidiabetic properties of six medicinal and edible mushrooms: Inhibition of α -amylase and α -glucosidase linked to type-2 diabetes. **South African Journal of Botany**, vol. 120, p. 100 - 103, 2019.

SZECSI, Pal B. The aspartic proteases. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, vol. 52, no. 210, p. 5 - 22, 1992.

TAKAKURA, Y. *et al.* Intercellular Trypsin inhibitor from edible mushroom *Pleurotus floridanus* active against proteases of microbial origin, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 173, p. 167 - 178, 2014.

TANG, W. *et al.* A randomized, double-blind and placebo-controlled study of a *Ganoderma lucidum* polysaccharide extract in neurasthenia. **Journal of medicinal food**, vol. 8, no. 1, p. 53 - 58, 2005.

TAYLOR, A. Aminopeptidases: structure and function. **The FASEB journal**, vol. 7, no. 2, p. 290 - 298, 1993.

TESAR, M.; MARQUARDT, O. Foot-and-mouth disease virus protease 3C inhibits cellular transcription and mediates cleavage of histone H3. **Virology**, vol. 174, no. 2, p. 364 - 374, 1990.

TREZZA, A. *et al.* Potential roles of protease inhibitors in anticancer therapy. In: **Cancer-Leading Proteases. Academic Press**, 2020. p. 13 - 49.

TURK, V.; TURK, B.; TURK, D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. **The EMBO journal**, vol. 20, no. 17, p. 4629 - 4633, 2001.

VARGAS-ISLA, R.; HANADA, R. E.; ISHIKAWA, N. K. Sawdust and fruit residues of Central Amazonian for *Panus strigellus* spawn's production. **Pesquisa Florestal Brasileira**, vol. 32, no. 70, p. 07 - 12, 2012.

VIEZZER, M. R. Z. *et al.* Uso de Resíduo Madeireiro Amazônico na Fabricação de Tijolos de Solo-Cimento no Município de Alta Floresta-MT. **Revista de psicologia**, vol. 15, no. 58, p. 100 - 121, 2021.

WANG, L. *et al.* Traditional uses, chemical components and pharmacological activities of the genus *Ganoderma* P. Karst.: **a review. RSC advances**, vol. 10, no. 69, p. 42084 - 42097, 2020.

WOESSNER, J. R, J. Frederick. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **The FASEB Journal**, vol. 5, no. 8, p. 2145 - 2154, 1991.

ZHOU, X. W.; SU, K. Q.; ZHANG, Y. M. Applied modern biotechnology for cultivation of *Ganoderma* and development of their products, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 93, p. 941 - 963, 2012.

5. Capítulo 1

CARACTERIZAÇÃO DE *GANODERMA* SP. ISOLADO DA REGIÃO AMAZÔNICA EM COMPARAÇÃO À UMA LINHAGEM COMERCIAL DE *GANODERMA LUCIDUM*

Paula Romenya dos Santos Gouvêa^{1,2}, Vítor Alves Pessoa^{1,2}, Giovanna Lima da Silva^{1,2}, Aldenora dos Santos Vasconcelos^{1,2,3}, Enedina Nogueira de Assunção⁴, Ceci Sales-Campos^{1,2} e Larissa Ramos Chevreuil¹

¹Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas

³Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos, Universidade do Estado do Amazonas

⁴Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 69067-005, Brasil

5.1 RESUMO

O gênero de cogumelos *Ganoderma* ainda apresenta dificuldades na classificação taxonômica. Portanto, visando contribuir para o conhecimento das espécies desse gênero, o presente trabalho propôs caracterizar um isolado amazônico, denominado *Ganoderma* sp., e compará-lo com uma linhagem comercial ('*G. lucidum*'), correspondente à uma das espécies mais representativas do gênero. Os micélios e os basidiomas foram caracterizados quanto à macro e micromorfologia. A composição de terpenos foi obtida por cromatografia em camada delgada. A filogenia foi elaborada por meio do sequenciamento da região ITS. Ambas as linhagens compartilharam características de *Ganoderma*, incluindo a estrutura do basiocarpo, a organização hifal e a morfologia dos basidiósporos. O isolado amazônico apresentou evidências de diterpenos, raramente relatados para o gênero. Na análise filogenética, a linhagem comercial se agrupou com *G. lingzhi*, enquanto para o isolado amazônico não houve formação de agrupamento com nenhuma das 55 espécies utilizadas na construção da árvore filogenética. Assim, pela combinação de diferentes informações de caracterização das espécies, foi possível verificar que a linhagem comercial corresponde a *G. lingzhi*, enquanto para *Ganoderma* sp. não foi possível obter uma identificação ao nível de espécie.

Palavras-chave: Cogumelo, Isolado Amazônico, Análise Filogenética.

5.2 ABSTRACT

The *Ganoderma* mushroom genus still presents difficulties on taxonomic classification. Thus, aiming to contribute to the knowledge of the species in this genus, the present work proposed to characterize an Amazonian isolate, called *Ganoderma* sp., and compare it with a strain sold commercially as '*G. lucidum*', which correspond to one of the most representative species of the genus. Mycelia and basidiocarps were characterized macro and micromorphologically. The terpene composition was obtained from thin layer chromatography. The phylogeny elaborated through the sequencing of the ITS region. Both lineages shared ganodermoid characteristics, including cap structure, hyphal organization and basidiospore morphology. The Amazonian isolate showed evidence of diterpenes, rarely reported to the genus. In the phylogenetic analysis, the commercial lineage present grouping with *G. lingzhi*, whereas for the Amazonian isolate there was not grouping formation with any of the 55 species used in the construction of the phylogenetic tree. Thus, by combination of different information regarding species characterization, it was possible to verify that the commercial lineage corresponds to *G. lingzhi*, while for *Ganoderma* sp. it was not possible to reach an identification at species level, proposing that it is a new species of the genus.

Keywords: Mushroom. Isolated Amazonian. Phylogenetic Analysis.

5.3 INTRODUÇÃO

Ganoderma P. Karst. 1881 é um gênero de fungos políporos tipificados por *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, pertencentes à família Ganodermataceae (sinonímia Polyporaceae), com hábito de desenvolvimento em plantas lenhosas e troncos de árvores, possuindo uma distribuição geográfica a nível mundial (Galappaththi et al., 2023). É um dos maiores gêneros de fungos poliporóides, abrangendo 80 espécies de ampla distribuição geográfica, com muitas espécies tropicais e outras restritas a regiões temperadas (Kirk et al., 2008). Destas espécies, Ryvardeen (2004) relata a existência de 20 para os neotrópicos, embora Gugliotta et al. (2010) mencionem a presença de 22 espécies somente para o território brasileiro.

Os basidiomas desse gênero são popularmente chamados de “Lingzhi”, “Chi-zhi” ou “Rui-zhi” na China, “Reishi”, “Munnertake” ou “Sachitake” no Japão e “Youngzhi” na Coreia, além de serem ditos como “cogumelos da imortalidade”, “erva de potência espiritual” e “erva celestial”, devido às suas várias propriedades medicinais (Bijalwan et al. 2020).

A identificação de espécies de *Ganoderma* era, até recentemente, baseada principalmente na morfologia dos basidiomas, bem como na ecologia e distribuição geográfica. No entanto, critérios morfológicos são amplamente afetados por caracteres pleomórficos, além de serem evidentemente influenciados pelo ambiente, levando a apresentação de alta plasticidade fenotípica de caracteres morfoanatômicos e, portanto, acarretando posteriores erros de identificação. Nesse sentido, estudos moleculares têm refinado sua classificação, tendo em vista que a base das espécies de *Ganoderma* não é universalmente aceita e permanece inadequadamente estabelecida. Apesar disso, dados filogenéticos para muitas espécies desse gênero ainda são escassos (Richter et al., 2015; Fryssouli et al., 2020).

A região do espaçador interno transcrito (ITS) foi proposta como uma sequência global de “barcode” do DNA a ser utilizada para a identificação de fungos na quarta International Barcode of Life Conference) (Liao et al., 2015). Nessa vertente, Raja et al., (2017), Loyd et al., (2018B) e Gunnels et al. (2020) têm demonstrado a eficiência da região ITS como um *barcode* para a autenticação e identificação de *Ganoderma* spp. e seus produtos comerciais, sendo possível

realizar a extração e o sequenciamento do material genético a partir de amostras frescas ou secas e trituradas.

Outra vertente crescente que vem auxiliando a caracterização de espécies do gênero *Ganoderma* é a quimiotaxonomia, onde metabólitos secundários derivados de isoprenoides (classes dos terpenoides e esteroides) são descritos com certo valor quimiotaxonômico (Ritchter et al., 2015). Porém, para criar uma base taxonômica mais elucidativa, recomenda-se a combinação de análises morfológicas, moleculares e químicas (Konara; Thambugala; Hapuarachchi, 2022). Dessa forma, o presente trabalho objetivou caracterizar um novo isolado de *Ganoderma* sp. (Manaus, Amazonas – Brasil) de acordo com suas características morfológicas, moleculares e químicas e, compará-lo com uma linhagem vendida comercialmente como '*Ganoderma lucidum*'.

5.4. METODOLOGIA

Material Biológico

Nesse estudo foram utilizadas duas linhagens de *Ganoderma*, uma de procedência comercial, '*Ganoderma lucidum*', (CC22) acessada através da Coleção de Cultura de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e, uma linhagem denominada de *Ganoderma* sp., isolada no Campus 1 do INPA (03°01'48.9" S, 59°51'01,6" O), Manaus, Amazonas – Brasil. Ambas as linhagens foram mantidas em meio ágar-batata-dextrose (BDA) e os seus basidiomas foram obtidos por meio de cultivo sólido conforme Carvalho e colaboradores (2015).

Isolamento da linhagem amazônica de *Ganoderma*

A partir do basidiocarpo coletado foram retirados pequenos fragmentos com auxílio de uma lâmina de aço inoxidável e pinça estéril. Os fragmentos passaram por uma etapa de limpeza externa utilizando de NaClO (5%), álcool etílico (70%) e água destilada autoclavada, com 1 minuto de imersão em cada solução. Posteriormente, os fragmentos foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA acrescido de cloranfenicol (0,01%), com posterior incubação em BOD a 25 °C. As culturas puras do isolado foram obtidas através de suscetíveis repiques.

Caracterização macromorfológica

Os basidiomas de ambas as espécies foram analisados quanto à cor, consistência, presença ou ausência de píleo, medidas de largura, comprimento e espessura, informações as quais foram obtidas através de observação à vista desarmada e/ou por meio de estereomicroscópio (S8APO, LEICA). Os micélios, obtidos através de crescimento em Placa de Petri, foram analisados à vista desarmada e tiveram suas características de superfície, cor do micélio, verso da colônia, textura, pigmentação, estrutura da borda e consistência, anotadas e registradas fotograficamente seguindo a metodologia de Sobal et al., 2007.

Análise micromorfológica

A partir dos basidiomas foram realizados cortes histológicos longitudinais na parte inferior do píleo, com auxílio de uma lâmina de aço inoxidável, corados com reagente de Melzer. Os cortes foram fixados em lâmina para microscópio óptico (DM500, LEICA), para a observação dos basidiósporos segundo protocolo de Baral, 1987.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Fragmentos de micélios e basidiomas foram secos em estufa e transferidos para *stubs* de alumínio, por meio de adesão a uma fita de carbono dupla face, com posterior metalização com ~20 nm de camada condutiva de ouro, com auxílio de metalizador (JEOL Smart Coater). As micrografias foram obtidas aos aumentos 1700x e 3000x, através de um microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM IT500HR), utilizando uma aceleração de 5kV, nos modos de elétrons secundários. As micrografias foram realizadas no - Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos – CMABio da Universidade do Estado do Amazonas

Comparação química das linhagens

Os basidiomas das linhagens de *Ganoderma* foram liofilizados, triturados e submetidos à extração de compostos bioativos conforme descrito por Cruz, Araújo e Nunez (2019), utilizando *n*-hexano (1:10 m/v) em banho ultrassom (USC – 3300, Unique) por 20 minutos, com consecutiva filtração em papel filtro quantitativo (Faixa azul – Quanty®), repetindo-se essa etapa duas vezes, prosseguindo a evaporação

em evaporador centrífugo (EZ-2, Genevac). Os extratos foram aplicados (2 µL, 10 mg/mL) em cromatoplasmas de sílica gel 60 (0,2 mm de espessura) (MACHEREY-NAGEL), com eluição em sistema hexano/diclorometano 1:1 (v/v) e revelação com anisaldeído sulfúrico e sulfato cérico conforme descrito por Zanca; Costa; Nunez, 2016.

Análise molecular

Os micélios das duas linhagens de *Ganoderma* foram submetidas à extração de DNA de acordo com o protocolo de DOYLE e DOYLE (1987), com modificações. A obtenção do DNA genômico foi realizado pelo método de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), consistindo na maceração do micélio fúngico com Celite 545, solução CTAB e RNase (10 mg/mL), seguido de incubação a 37 °C por 30 minutos, com posterior adição de proteinase K (10 mg/mL), clorofórmio-álcool isoamílico (CIA) e isopropanol 100%. O produto extraído foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose a 1%.

O material genético extraído foi submetido à técnica de PCR, sendo empregado os pares de primers ITS1- F/ITS4-R, conforme descrito por Gardes e Bruns, 1993. Os fragmentos amplificados foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Os produtos da amplificação foram purificados utilizando o kit PureLink™ PCR Purification (Invitrogen™) em tampão TBE 1x (Tris-Ácido Bórico-EDTA), por aproximadamente 1h e 30 min a 80 V, utilizando-se o corante Blue Orange Loading Dye (Promega) e visualizando os amplicons em transiluminador com sistema de captura de imagens (SynGene). A concentração dos dois fragmentos gênicos foi determinada a partir de um fluorímetro (Qubit).

O material gênico amplificado foi utilizado para a reação de sequenciamento utilizando o kit BigDye™ Terminator v3.1, em sequenciador 3500 (Applied Biosystems). As sequências nucleotídicas encontradas foram analisadas quanto à qualidade via ferramenta de bioinformática (PHRED), a fim de se obter os alinhamentos com sequências depositadas que apresentassem as maiores porcentagens de identidade/similaridade, utilizadas para formar um *contig* e, em seguida, comparadas com sequências depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando o programa Nucleotide

BLAST (BLASTn). As análises moleculares foram realizadas no Centro de Apoio Multidisciplinar - CAM da Universidade Federal do Amazonas

Construção da árvore filogenética

O modelo de árvore filogenética foi construído no software MEGA X no modo “maximum likelihood”, com a validação da árvore filogenética sendo realizada pela execução de 1000 conjuntos de dados de entrada *bootstrapped*, utilizando o modelo de Kimura 2-parâmetros. A matriz de dados foi alimentada através de sequências ITS de espécies de *Ganoderma* disponíveis no GenBank do NCBI, dando-se preferência para espécies tipo/holótipo e sequências provenientes de trabalhos publicados (Tabela 3).

Tabela 3 - Informações das espécies de *Ganoderma* utilizadas para a construção da árvore filogenética.

Espécie	Código da linhagem	Origem geográfica	Código no NCBI	Referência
<i>Ganoderma</i> sp.		Amazonas, Brasil		Presente estudo
<i>G. lucidum</i> (<i>G. lingzhi</i>)		Ásia		Presente estudo
<i>G. acaciicola</i>	Cui 16815 (tipo)	Austrália	NR182900.1	Sun et al. 2022
<i>G. alpinum</i>	Cui 17467 (tipo)	Yunnan, China	NR182901.1	Sun et al. 2022
<i>G. angustisporum</i>	Cui 13817 (holótipo)	Fujian, China	MG279170.1	Xing et al. 2018
<i>G. applanatum</i>	SFC20141001–24	Coréia do Sul	KY364255.1	Jargalmaa et al 2017
<i>G. aridicola</i>	Dai 12588 (holótipo)	Durban, África do Sul	KU572491.1	Xing et al. 2016
<i>G. australe</i>	URM 83325	Brasil	JQ514106.1	Gibertoni et al. 2015
<i>G. bubalinomarginatum</i>	Dai 20075 (tipo)	Guangxi, China	NR182905.1	Sun et al. 2022
<i>G. carocalcareus</i>	DMC 322 (holótipo)	Camarões, África	EU089969.1	Douanla-Meli e Langer 2009
<i>G. castaneum</i>	Cui 17283 (tipo)	Hainan, China	NR182903.1	Sun et al. 2022
<i>G. casuarinicola</i>	Dai 16336 (holótipo)	Guangdong, China	MG279173.1	Xing et al. 2018
<i>G. chalceum</i>	URM 80457	Pernambuco, Brasil	JX310812	Lima Júnior, Gibertoni & Malosso 2014
<i>G. chocoense</i>	QCAM 3123 (tipo)	Equador	MH890527	Crous et al. 2018
<i>G. cocoicola</i>	Cui 16791 (tipo)	Austrália	NR182910.1	Sun et al. 2022
<i>G. destructans</i>	CBS 139793 (tipo)	Pretoria, África do Sul	NR132919.1	Coetzee et al. 2015
<i>G. dianzhongense</i>	L4331(tipo)	Yunnan, China	NR177159.1	He et al. 2021
<i>G. eickeri</i>	CMW49692 (tipo)	África do Sul	MH571690	Tchotet Tchoumi et al. 2019
<i>G. ellipsoideum</i>	GACP14080966 (holótipo)	Hainan, China	MH106867.1	Hapuarachchi et al. 2018

<i>G. enigmaticum</i>	CBS 139792 (tipo)	Pretoria, África do Sul	NR132918.1	Coetzee et al. 2015
<i>G. guangxiense</i>	Cui 14453 (tipo)	Guangxi, China	NR182906.1	Sun et al. 2022
<i>G. hochiminhense</i>	MFLU 19-2224 (holótipo)	Vietnã	MN398324.1	Luangharn et al. 2021
<i>G. knysnamense</i>	CMW47755 (tipo)	África do Sul	MH571681	Tchotet Tchoumi et al. 2019
<i>G. leucocontextum</i>	GDGM 40200 (holótipo)	Tibet, China	KF011548	Li et al. 2015
<i>G. lingzhi</i>	Wu 1006-38 (holótipo)	Hubei, China	JQ781858.1	Cao et al. 2012
<i>G. lucidum</i>	MT26/10	República Tcheca	KJ143912.1	Zhou et al. 2015
<i>G. lucidum</i>	Rivoire4195	França	KJ143909.1	Zhou et al. 2015
<i>G. martinicense</i>	LIP SWMart08-55 (tipo)	Martinica, França	KF963256.1	Welti e Courtecuisse 2010
<i>G. meredithae</i>	CBS 271.88	Louisiana, EUA	NR164435.1	Vu et al. 2018
<i>G. mizoramense</i>	UMN-MZ4 (holótipo)	Índia	KY643750.1	Crous et al. 2017
<i>G. mbrekobenum</i>	MIN 850481	Gana, África	NR147647.1	Crous et al. 2016
<i>G. multiplicatum</i>	URM 83346	Paraíba, Brasil	JX310823	Lima Júnior, Gibertoni & Malosso 2014
<i>G. myanmarensense</i>	MFLU19-2167 (holótipo)	Mianmar	MN396330.1	Luangharn et al. 2021
<i>G. nasalanense</i>	GACP17060211 (holótipo)	Laos	MK345441.1	Hapuarachchi et al. 2019
<i>G. neojaponicum</i>	AS5.541	Taiwan	AY593866.1	Wang & Yao 2005
<i>G. aff. oerstedii</i>	URM 83400	Pernambuco, Brasil	JX310824	Lima Júnior, Gibertoni & Malosso 2014
<i>G. orbiforme</i>	URM 83332	Pernambuco, Brasil	JX310813	Lima Júnior, Gibertoni & Malosso 2014
<i>G. oregonense</i>	GO	Washington, EUA	MT196417	Viceconte et al. 2021
<i>G. ovisporum</i>	HKAS123193	China	NR182704.1	Hong-De et al. 2022
<i>G. parvulum</i>	URM 83339	Pernambuco, Brasil	JX310817	Lima-Júnior, Gibertoni & Malosso 2014
<i>G. podocarpense</i>	QCAM6422 (holótipo)	Equador	MF796661.1	Crous et al. 2017
<i>G. resinaceum</i>	MUCL52253	França	MK554786.1	Cabarro-Hernández et al. 2019
<i>G. ryvaridenii</i>	HKAS 58053 (tipo)	Camarões, África	HM138671.1	Kinge e Mih 2011
<i>G. sanduense</i>	GACP18012501 (holótipo)	China	MK345450.1	Hapuarachchi et al. 2019
<i>G. shanxiense</i>	BJTC FM423 (holótipo)	China	MK764268	Liu et al. 2019
<i>G. sessile</i>	111TX	EUA	MG654306.1	Loyd et al. 2018A
<i>G. sichuanense</i>	HMAS 42798 (holótipo)	Sichuan, China	JQ781877.1	Cao et al. 2012
<i>G. sinense</i>	Wei 5327	Hainan, China	KF494998.1	Xing et al. 2018
<i>G. subangustisporum</i>	Cui 18592 (tipo)	Yunnan, China	NR182909.1	Sun et al. 2022

<i>G. subflexipes</i>	Cui 17257 (tipo)	Guangdong, China	NR182904.1	Sun et al. 2022
<i>G. sublobatum</i>	Cui 16804 (tipo)	Austrália	NR182907.1	Sun et al. 2022
<i>G. thailandicum</i>	HKAS104640 (holótipo)	Tailândia	MK848681.1	Luangharn et al. 2019
<i>G. tongshanense</i>	Cui 17168 (tipo)	Hubei, China	NR182908.1	Sun et al. 2022
<i>G. tropicum</i>	KUMCC 18–0046	Chiang Rai, Tailândia	MH823539.1	Luangharn et al. 2019
<i>G. tropicum</i>	BCRC 37122	Taiwan, China	EU021457.1	Wang et al. 2019
<i>G. weberianum</i>	CBS128581	Taiwan	MK603805.1	Cabarroi-Hernández et al. 2019
<i>G. weixiensis</i>	HKAS100649 (holótipo)	Yunnan, China	NR166271.1	Ye et al. 2019
<i>G. wiioense</i>	MIN 938704 (tipo)	Gana, África	NR158480.1	Crous et al. 2015
<i>G. yunlingense</i>	Cui 16288 (tipo)	Yunnan, China	NR182902.1	Sun et al. 2022
<i>Tomophagus colossos</i>	TC-02	Vietnam	KJ143923.1	Zhou et al. 2015
<i>T. colossos</i>	URM 83330	Paraíba, Brasil	JQ618247	Lima-Júnior, Gibertoni & Malosso 2014

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

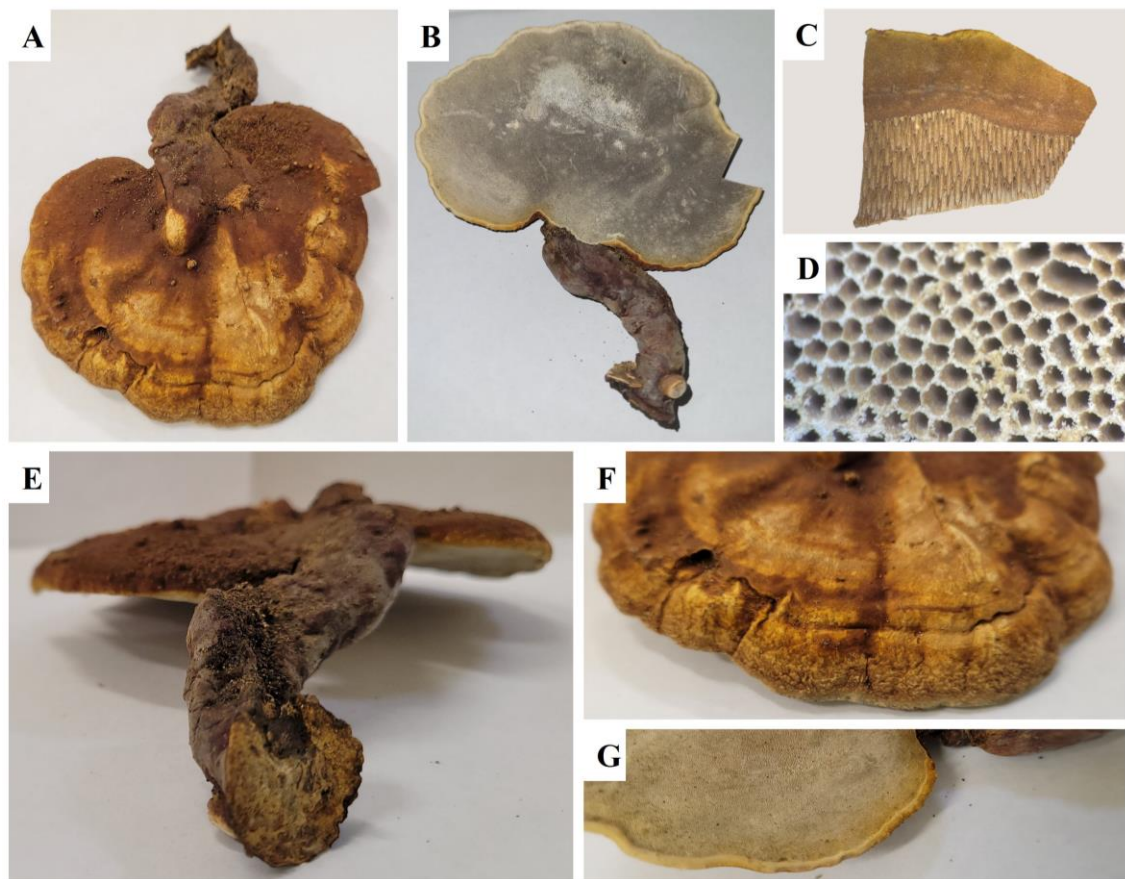
Caracterização morfológica

Quanto à morfologia do basidiocarpo do espécime amazônico, foi verificada a presença de poros na face inferior do píleo, apresentando, predominantemente, formato alongado com espaçamentos entre si (**Figura 2-D**). A partir do corte longitudinal nesta região do píleo observou-se diversas camadas de tubos e poros, característicos de espécies perenes, onde, a cada ciclo vegetativo, há formação de uma camada de tubos (**Figura 2-C**). Essas características são atribuídas às espécies poliporáceas, chamadas de fomóideas, pertencentes à ordem Polyporales (Teixeira, 1946; Zmitrovich et al., 2006).

O basidiocarpo de *Ganoderma* sp. é sésil, lenhoso estipitado, com estipe sinuoso a noduloso, com pequena ramificação (10 mm²) e base enrugada (20,05 mm²). Internamente foi observado zoneamento, formando um contexto espesso de cor castanho-escuro a mais claro junto à superfície, e tons de amarelada e castanho escuro junto aos tubos (**Figura 2-C**), os quais se apresentaram estratificados com longas camadas e interior mais claro que as bordas (**Figura 2-C**). A região dos poros apresentou coloração inicial branca, tornando-se cinza escuro ao longo do crescimento, com formatos irregulares, sendo predominante elipsoide (**Figura 2-G**). O píleo é convexo com estipe dorsal e coloração castanho-vinhosa à ferrugínea-

escura amarelada, com região apical constituída de bordas brancas, margem obtusa inteira e superfície concentricamente sulcada, lisa e lacada (**Figura 2-A, 2-B, 2-G, 2-F e 2-E**), características do gênero *Ganoderma*.

Figura 2 - Face superior (A), face inferior (B), corte longitudinal do píleo (C), poros (D), estipe (E), borda superior (F) e borda inferior (G) do basidiocarpo de *Ganoderma* sp. (linhagem isolada na Amazônia), proveniente de um cultivo sólido.

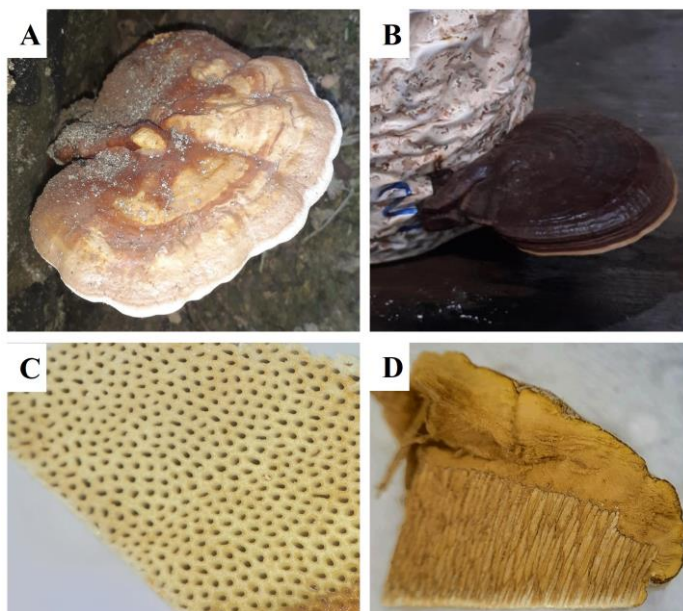


Fonte: Autor (2023)

O basidiocarpo obtido através de cultivo sólido apresentou evidentes alterações macromorfológicas quando comparado ao basidiocarpo selvagem coletado (**Figura 3-A, B**). Dentre as variações, destaca-se a mudança na coloração do píleo, o qual se tornou marrom escuro, com superfície mais lisa e laca mais aparente (**Figura 3-B**). Além disso, os poros apresentaram formato predominantemente oval e com maior espaçamento entre si (**Figura 3-C**). A região do contexto adquiriu aspecto similar à cortiça, contudo, mais rígido que o basidiocarpo coletado na natureza, enquanto a coloração dos tubos também se tornou mais clara (**Figura 3-D**). Uma hipótese é que essas diferenças estejam

associadas ao estágio de maturação dos basidiomas, uma vez que os basidiomas obtidos a partir do cultivo sólido eram possivelmente mais jovens.

Figura 3 - Basidiocarpo em ambiente natural (A), basidiocarpo do cultivo sólido (B), poros (C) e corte transversal de *Ganoderma* sp (linhagem isolada na Amazônia).



Fonte: Autor (2023)

Ganoderma lucidum (linhagem comercial) apresentou características semelhantes às de *Ganoderma* sp. (linhagem isolada na Amazônia), incluindo a presença de poros e aspecto lacado, sugerindo sua inclusão no gênero *Ganoderma*. O basidiocarpo é estipitado, lenhoso, côncavo, de superfície marrom-amarelado, lacado, com zonas sulcadas concêntricas, margem cor creme e píleo obtuso (**Figura 4-A e 4-B**). O poro é suborbicular, de cor esbranquiçada à amarelada. Os estipes são cilíndricos e excêntricos. O contexto exibiu coloração variando entre creme a marrom, com tons mais escuros próximo à superfície do píleo (**Figura 4-C**).

Figura 4 - Superfície superior (A), inferior (B) e corte transversal (C) do basidiocarpo de '*G. lucidum*' (linhagem comercial), obtido a partir de cultivo sólido.



Fonte: Autor (2023)

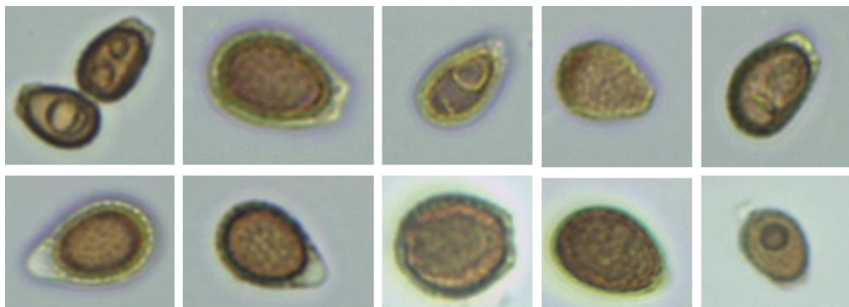
A taxonomia do gênero *Ganoderma*, em particular, tem sido intensamente investigada, uma vez que, para qualquer espécie lacada crescida em madeira era atribuído à espécie *Ganoderma lucidum*. Entretanto, novos estudos têm indicado que *G. lucidum sensu stricto* (Curtis) Karts apresenta distribuição geográfica limitada, nativa da Europa e encontrada em localidades específicas na China. Dessa forma, têm-se buscado avaliar *G. lucidum sensu lato* para identificar de fato qual espécie está sendo estudada (Lloyd et al., 2018).

A partir do estudo de Liu (1974), no qual foi atribuído a denominação “Lingzhi” para a espécie *G. lucidum*, este termo tem sido usado como binômio até pouco tempo. Além disso, a popularização de *G. lucidum* se expandiu e este acabou sendo utilizado para descrever quaisquer produtos comerciais que utilizam Lingzhi. É importante ressaltar que o termo chinês “Lingzhi” abrange diversas espécies diferentes, como por exemplo *G. lucidum* “chizi” e *G. sinense* “zizhi” (Yang, Feng, 2013). Atualmente, sabe-se que dentre as espécies comumente confundidas com *G. lucidum* encontra-se *G. lingzhi*, a qual apresenta características morfológicas e genéticas distintas (Cao et al., 2012).

Na microscopia óptica do isolado *Ganoderma* sp. foram observados hemitectosporos característicos de *Ganoderma*, com variações morfológicas dos esporos ganodermóides (**Figura 5**). Os basidiósporos apresentaram-se ovóides, cobertos por exosporos com ápice subagudo ou truncado na extremidade distal, parede grossa e ornamentada. O apêndice hilar apresentou aspectos elipsoide, enquanto o endosporo teve coloração variada e parede espessa. As características dos esporos são similares às espécies *G. applanatum*, *G. testaceum*, *G. lucidum* var. *lucidum*, *G. perzonatum* e *G. sichuanense* (Bhosle et al., 2010, Thawthong et al., 2017). Neste trabalho ao comparar as características de *Ganoderma* sp. com

espécies já catalogadas, são observadas semelhanças gerais comuns ao gênero *Ganoderma*.

Figura 5 - Basidiósporos de *Ganoderma* sp. (linhagem isolada na Amazônia).



Fonte: Autor (2023)

Os basidiósporos de *G. lucidum* apresentaram-se com formato ovoide, ápice truncado ou não, apêndice hilar oval ou elíptico, cor castanho-amarelado com tons de verde, ausência de episporo e endósporo com parede espessa, não sendo observadas estruturas de reprodução (**Figura 6**). Essas características são similares às espécies *G. lucidum* e *G. lingzhi* já descritas na literatura (Hennicke et al., 2016; Kwon et al., 2016; Wang et al., 2012). Dessa forma, as descrições morfoanatômicas demonstram semelhanças entre as espécies de trabalho, as quais compartilham características ganodermoides e diferem, principalmente, quanto ao tamanho dos tubos (**Tabela 2**).

Figura 6 - Basidiósporo de *Ganoderma lucidum* (linhagem comercial).



Fonte: Autor (2023)

Tabela 4 - Caracteres morfológicos de *Ganoderma* sp. e *G. lucidum*.

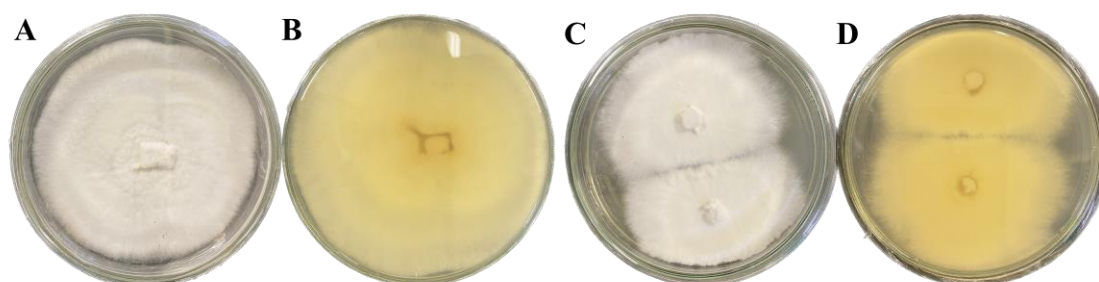
Caracteres	Espécies	
	' <i>Ganoderma lucidum</i> '	<i>Ganoderma</i> sp.
Esporo	9,43 x 6, μm	9,95 x 7,15 μm
Píleo	74,3 x 56,6 mm	116,25 x 55,0 mm
Estipe	18,00 mm ²	20,00 mm ²
Contexto	0,39 mm	0,55 mm
Tubo	10,60 mm	0,60 mm

Descrição morfológica do crescimento micelial

A espécie '*Ganoderma lucidum*' apresentou textura flocosa com zonas circunscritas marcadas, constituindo um micélio com região apical densa e coloração branca, região central em tons de amarelo e borda irregular, o verso da colônia evidenciou zonas de gradiente de coloração, onde a região próxima ao inóculo apresentou tons em amarelo escuro, com clareamento até a região apical (**Figura 7-A e B**).

Ganoderma sp. apresentou crescimento mais lento em meio BDA, necessitando da inoculação de dois fragmentos para obtenção de uma placa de Petri com crescimento completo. As colônias apresentaram textura flocosa, contudo houve formação de uma zona, onde a região apical exibiu hifas com aspecto cottonoso e borda irregular; o verso da colônia apresentou coloração amarelo opaco uniforme e, na região apical, as hifas exibiram aspecto cottonoso e coloração bege (**Figura 7-C e D**). Essas características descritas para ambas as espécies são observadas em outros estudos, como por exemplo para *Ganoderma australe* e *G. lucidum* (Fletcher, 2019; Chulikavit et al., 2022;).

Figura 7 - Crescimento micelial de '*Ganoderma lucidum*' (A-B) e *Ganoderma* sp. (C-D) crescidos em meio BDA. A e C: Frente da colônia. B e D: Verso da colônia.



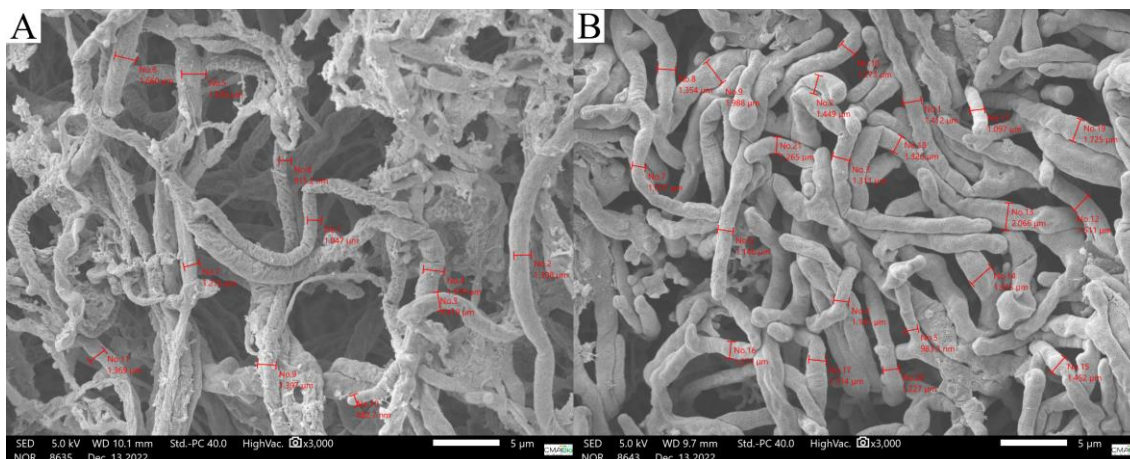
Fonte: Autor (2023)

Caracterização microestrutural

A partir da análise dos micélios das linhagens de *Ganoderma* por microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível verificar que '*G. lucidum*' apresenta hifas mais espaçadas, em formas tubulares e irregulares (**Figura 8-A**). *Ganoderma* sp. exibiu hifas tubulares pouco espaçadas e visualmente mais rígida (**Figura 8-B**).

A organização das hifas em '*G. lucidum*' se assemelha ao sistema de hifas conhecidos como trimítico, com a presença de hifas generativas, esqueléticas e ligativas, corroborando com o descrito para *G. lingzhi* (Porter e Naleway, 2022). Em *Ganoderma* sp. não foi observada a presença de hifas ligativas, podendo se enquadrar no sistema de hifas dimíticas, a qual já foi relatada para algumas espécies como *G. tsugae*, *G. hoehnelianum*, *G. gibbosum* e *G. williamsianum* (Luangharn et al., 2021).

Figura 8 - Micrografia eletrônica de varredura (MEV) dos micélios de '*Ganoderma lucidum*' (A) e *Ganoderma* sp. (B), crescidos em meio BDA.

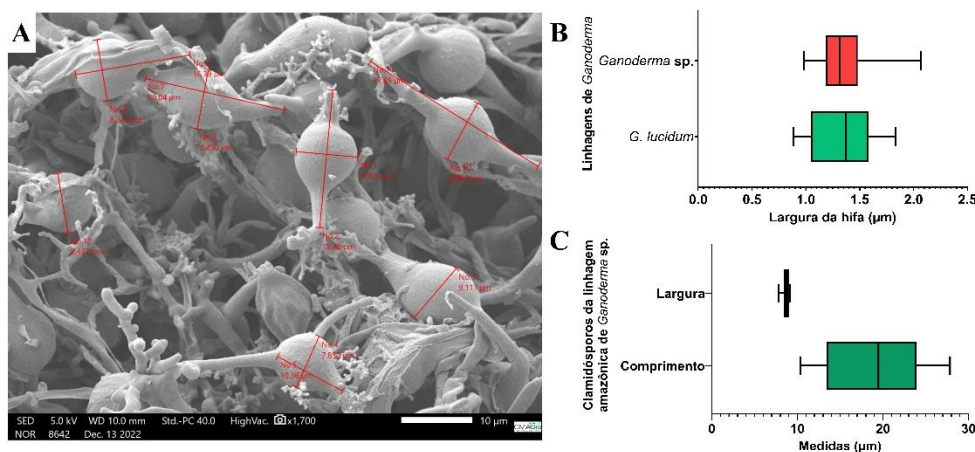


Fonte: Autor (2023)

Na medida de largura das hifas verificou-se valor médio semelhante, de $1,425 \pm 0,236 \mu\text{m}$ e $1,413 \pm 0,294 \mu\text{m}$ para '*G. lucidum*' e *Ganoderma* sp., respectivamente (**Figura 9-B**), com a presença de clamidósporos em *Ganoderma* sp. (**Figura 9-A**), os quais são estruturas formadas de forma assexual por algumas espécies lacadas de *Ganoderma*, sendo geralmente associadas à sobrevivência em condições ambientais adversas (seca, calor, frio, inundações etc.), desempenhando um importante papel no ciclo de vida de fungos decompositores de madeira (Lloyd et al., 2019). Segundo Badalyan et al. (2019), caracteres miceliais como os clamidósporos,

podem ser úteis na distinção de táxons de *Ganoderma*, uma vez que o micélio é menos polimórfico comparados aos basidiomas.

Figura 9 - Micrografia eletrônica de varredura (MEV) dos clamidósporos de *Ganoderma* sp. (A), medida de largura das hifas de '*G. lucidum*' e *Ganoderma* sp. (B) e medidas dos clamidósporos de *Ganoderma* sp. (C).



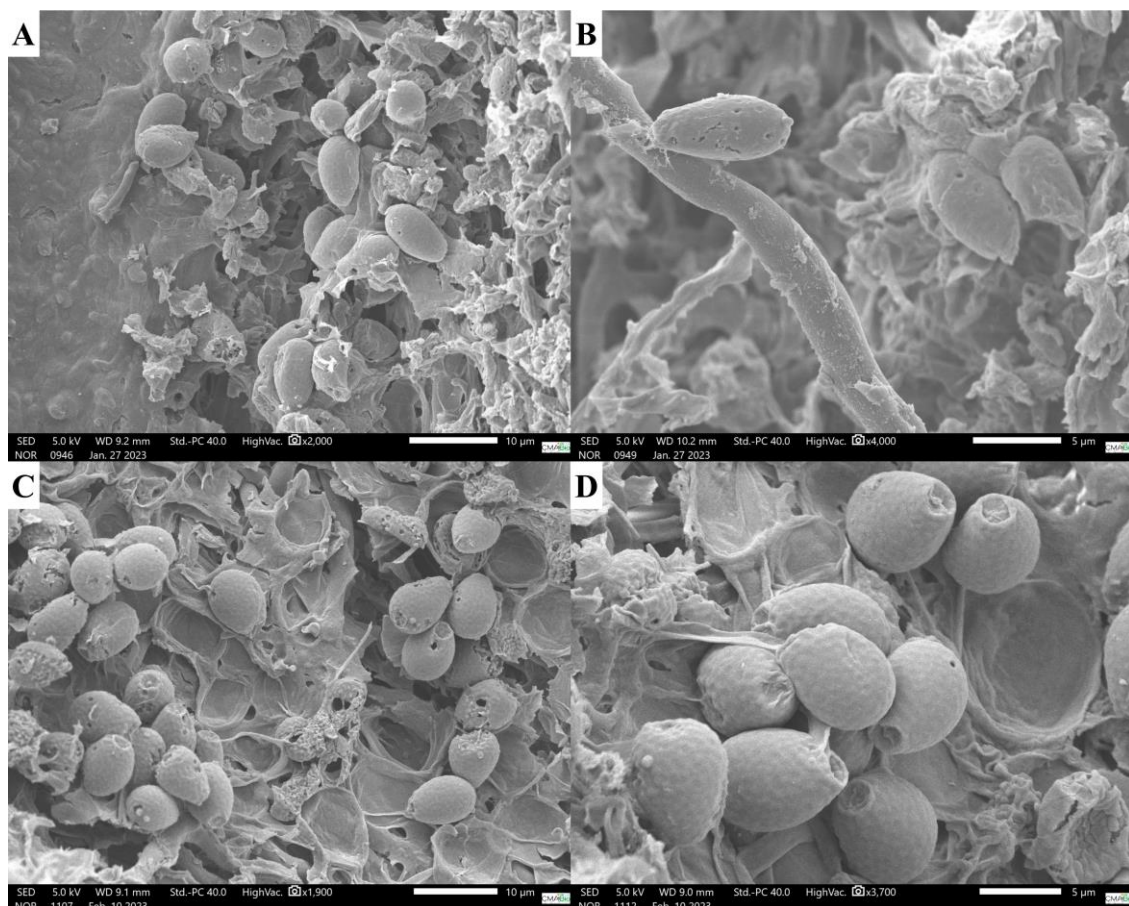
A distribuição dos clamidósporos de *Ganoderma* sp. é em grande parte intercalar, com apenas alguns poucos sendo terminais. Eles geralmente apresentam uma forma limoniforme, embora ocasionalmente possam adotar um formato globoso (**Figura 9-A**). Ademais, apresentaram comprimento variado, com valor médio de $18,82 \pm 6,34 \mu\text{m}$, ao passo que a largura foi mais uniforme, com valor médio de $8,61 \pm 0,42 \mu\text{m}$ (**Figura 9-C**). Loyd et al. (2019) ao trabalharem com *G. sessile* e *G. cf weberianum* observaram morfologias de clamidósporos semelhantes à *Ganoderma* sp., com comprimento variando de 12 a 26 μm , ao passo que a medida de largura foi superior a (9,5 a 14,1 μm).

Mohanty et al. (2011) ao trabalhar com as espécies *G. lucidum* e *G. resinaceum* verificaram a presença de clamidósporos intercalares e terminais, com medidas de $8,5\text{-}12,5 \times 5,5\text{-}7,5 \mu\text{m}$ e $9,0\text{-}22,0 \times 7,0\text{-}18,0$, respectivamente, corroborando com o observado em *Ganoderma* sp. É importante ressaltar que, apesar de a produção dessas estruturas depender das condições de cultivo, com destaque para a temperatura, determinadas espécies como *G. curtisii*, *G. meredithae*, *G. mexicanum*, *G. oregonense*, *G. ravenelli*, *G. tuberculosum* e *G. zonatum* são relatadas na literatura científica por não apresentarem clamidósporos

quando cultivados em temperaturas de 25 a 28 °C (Lloyd et al., 2018b; César et al., 2021).

A partir do basidiocarpo de *Ganoderma* sp. e '*G. lucidum*', obtido por meio de cultivo sólido, observou-se a morfologia da superfície dos basidiósporos, os quais se apresentaram, predominantemente, com formato elipsoide à ovoide e ápice truncado (**Figura 10**), corroborando com as características descritas para o gênero *Ganoderma* (Costa-Rezende et al., 2017). Os basidiósporos de *G. lucidum* (**Figura 10-A, B**) apresentaram depressões rasas, apêndice hilar elipsoide e oval, numerosos orifícios pequenos e rasos e, em menor quantidade, alguns orifícios maiores e profundos, assim como observado para *G. lucidum* (Mims e Seabury 1989; Chaiyasut, Kruatama e Sirilun 2010) e para *G. lingzhi* (Song et al. 2020).

Figura 10 - Micrografia eletrônica de varredura (MEV) dos basidiósporos de '*G. lucidum*' (A, B) e *Ganoderma* sp. (C, D).



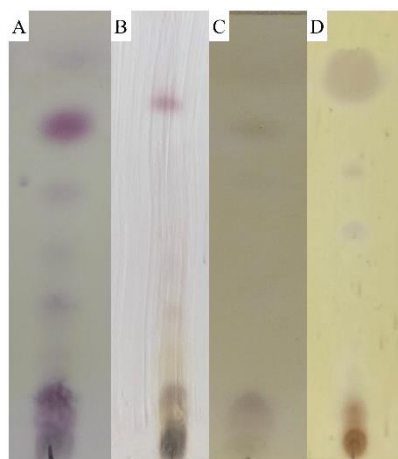
Fonte: Autor (2023)

Ganoderma sp. também apresentou numerosos orifícios, com tamanhos variados e apêndice hilar elipsoide e oval (**Figura 10-C, D**). No entanto, é possível observar que a superfície apresentou depressões mais aparentes, em comparação à '*G. lucidum*'. Estes, por sua vez, apresentaram maior semelhança com os basidiósporos de *G. tuberculosum*, *G. brownii* e *G. lobatoideum* (Gottlieb e Wright, 1999A,1999B).

Análise de terpenos

Os extratos apolares de *Ganoderma* sp. e '*G. lucidum*' demonstraram indícios da presença de substâncias derivadas de isoprenoides (**Figura 11**). No entanto, é possível observar uma clara diferença na impressão das duas espécies estudadas, principalmente utilizando do revelador anisaldeído sulfúrico (**Figura 11-A e B**). Segundo Agatonovic-Kustrin e colaboradores (2019), a revelação com anisaldeído apresenta tonalidades roxas quando há a presença de monoterpenos, triterpenos e esteroides, ao passo que diterpenos apresentam coloração marrom, informação que permite diferenciar as espécies do presente estudo, visto que *Ganoderma* sp. apresentou indícios de diterpenos, não sendo observados em '*G. lucidum*'.

Figura 11 - Cromatografia em camada delgada de extratos apolares de '*Ganoderma lucidum*' e *Ganoderma* sp. A e C: extrato de '*G. lucidum*' revelado com anisaldeído e sulfato cérico, respectivamente; B e D: extrato de *Ganoderma* sp. revelado com anisaldeído e sulfato cérico, respectivamente



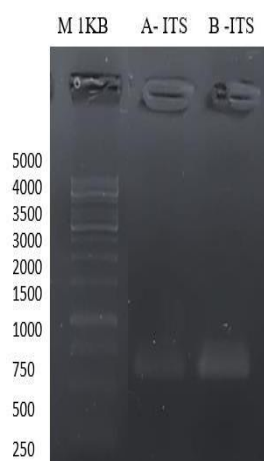
Fonte: Autor (2023)

Apesar das espécies de *Ganoderma* apresentarem em seu genoma sequências codificadoras de diferentes terpenos sintases, capazes de sintetizar esqueletos carbônicos de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, a literatura científica relata com maior incidência o isolamento e identificação apenas de sesquiterpenoides, triterpenoides e meroterpenoides, os quais são considerados como os principais componentes químicos do gênero (Zhao et al., 2019). Contudo, Abdulghani, Jitendra e Subhash (2011) relatam a presença de diterpenos na espécie *G. praelongum* (sinonímia *G. resinaceum*).

Análise molecular

A extração de DNA das amostras de '*G. lucidum*' e *Ganoderma* sp. apresentou rendimento de 70 e 100 ng/μL de material genético, respectivamente. O material obtido foi submetido à amplificação de fragmentos da região ITS do DNA ribossomal e apresentou concentração de 20 e 50 ng/μL para '*G. lucidum*' e *Ganoderma* sp., respectivamente. Posteriormente, a confirmação da amplificação do fragmento de interesse foi realizada a partir da visualização em eletroforese em gel de agarose (**Figura 12**).

Figura 12 - Gel de agarose das amostras amplificadas de '*Ganoderma lucidum*' (A) e *Ganoderma* sp. (B). M1KB: marcador molecular.



Fonte: Autor (2023)

As sequências nucleotídicas montadas via ferramenta de bioinformática (PHRED) formaram um *contig* de maior tamanho para '*G. lucidum*', com 1.425 nucleotídeos, ao passo que *Ganoderma* sp. apresentou uma sequência de 887 nucleotídeos (**Tabela 5**). As sequências obtidas foram comparadas com sequências

depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando a ferramenta “BLAST nucleotide”, onde ‘*G. lucidum*’ apresentou maior similaridade com *G. lucidum* WJGL19 (cobertura da consulta: 98%; Percentual de identificação: 97,96%), enquanto *Ganoderma* sp. apresentou maior similaridade com *G. tropicum* CE41FB2 (cobertura da consulta: 100%; Percentual de identificação 99,44%).

É importante ressaltar que a análise por BLASTn foi considerada apenas para a confirmação a nível de gênero, uma vez que Yurnaliza et al. (2020) relatam que a ferramenta BLASTn, embora apresente em seu resultado de busca um alto percentual de identificação, pode não refletir uma relação genética precisa. Assim, a identificação baseada apenas nessa metodologia pode levar a erros de identificação futuros, principalmente devido ao conhecido problema de nomenclatura associado à muitas amostras do Genbank, recomendando-se a realização de análises filogenéticas, as quais empregam algoritmos mais rigorosos (Gunnels et al. 2020).

Tabela 5 - Sequências referentes a região ITS montadas para ‘*G. lucidum*’ e *Ganoderma* sp.

Amostra	Contig montado
‘ <i>Ganoderma lucidum</i> ’	GCCCACAGTAAGGCACAAGTTAGAGGATGAGCAGGGCGGCAC ATGCCTCGAAGGCCAGCTACAACCCAGTCAAACTCGATAATG ATCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTAC CTGATTTGAGGTCAGAGGTCATAAAGCTGTCTCCAACTGAGA CGGTTAGAAGCTCGCCAGACGCTTCACGGTCGCGGCGTAGAC ATTATCACACCGAGAGCCGATCCGCAAGGAACCAAGCTAATGC GTTTGAGAGGAGCCGACCAAGAACGGCCGACAAGCCTCCAAG TCCAAGCCTACAAACCGCAAAAGCTTGTAGGTTGAAGATTTTCA GACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAA GGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCAC ATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCC AAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATATAGATGCGTTACATCGC AATACACATTCTGATACTTTATGGAGTTTGTGATAAACGCAGGC ACAGACGCGCTCCGCGAGCCGATAAAGGGCCCGTTTCACAAG CTGAAGCCCACAGTAAGTGCACAGGTGTAGAGTGGATGAGCAG GGCGTGACATGCCTCGGAAGGCCAGCTACAACCCAGTCAAAA CTCGATAATGATCCTTCCGCGAGGTTACCTGCGGAAGGATCAT TATCGAGTTTTGACCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGT GCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTGG GCTTCAGATTGCGAGGCACGCTCTTTACCGGGCTTGCGGAGCA TATCTGTGCCTGCGTTTATCACAACTCTATAAAGTAACAGAAT GTGTATTGTGATGTAACACATCTATATACAACTTTCAGCAACGG ATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCCA TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG AACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTT TGAGTGTCATGAAATCTTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTTGT GGCTTGGACTTGAGAGCTTGTGCGGCCGTTATCGGTCGGCTCCT CTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCGGATCGGCTCTCGGTGT

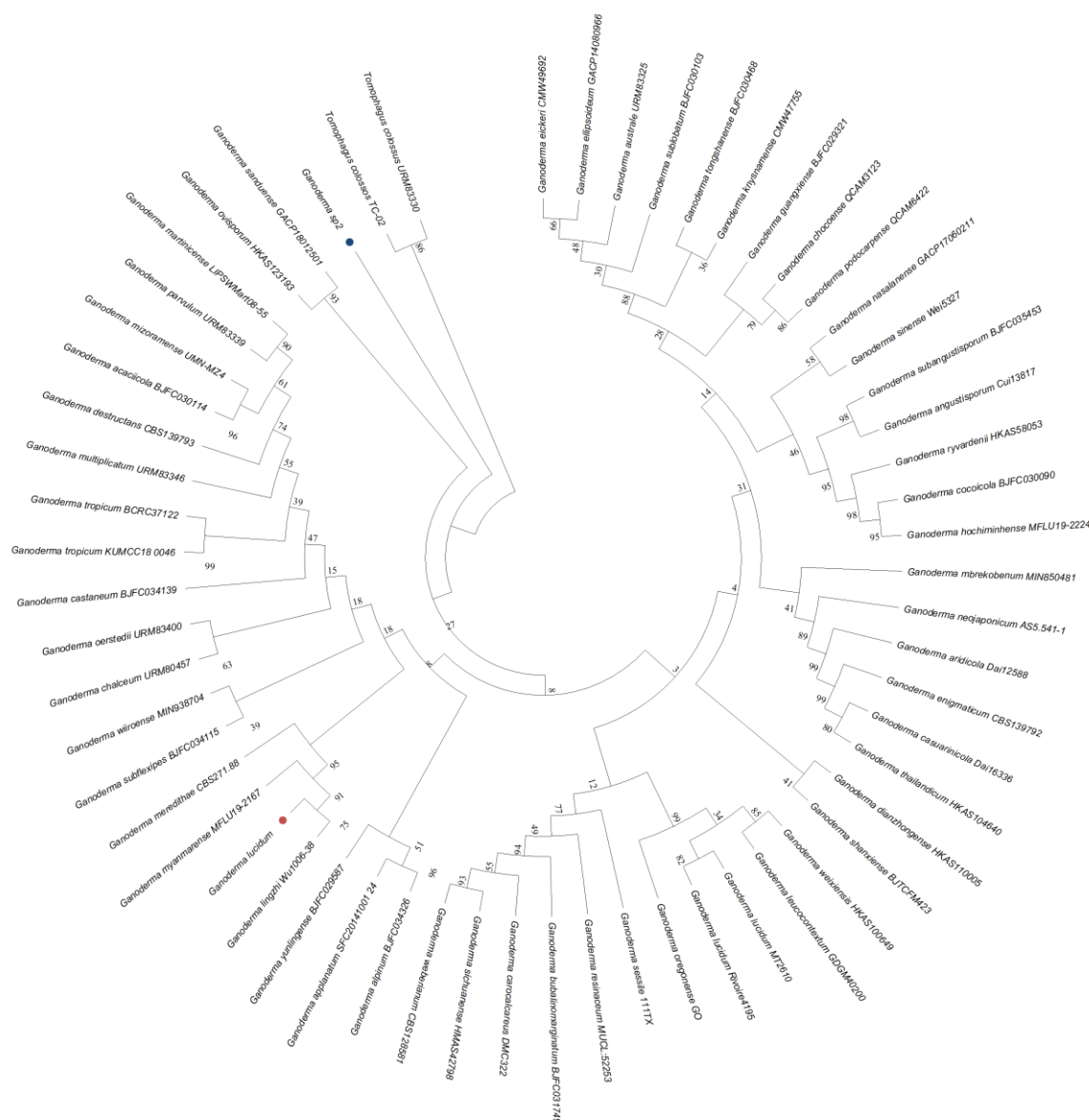
	GATAATGTCTACGCCGCGACCGTGAAGCGTTTGGCGAGCTTCT AACCGTCTTATAAGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCAAATCAG GTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA TAATTATCGAGTTTTGACGGGTTGTAGCTGGCCTTCCAG GCATGTGCACGCCTGCTCATCACTCTAACCTTGTGACTTACTGT
<i>Ganoderma</i> sp.	ACTAACAAGGGATTCCCCTAGTAACTGCGAGTGAAGCGGGAAAAG CTCAAATTTAAAATCTGGCGGTCTTTGGCCGTCCGAGTTGTAGTCT GGAGAAGTGCTTTCCGCGCTGGACCGTGTATAAGTCTCTTGGAAC AGAGCGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGACACGGACTACC AGTGCTTTGTGATGCGCTCTCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGC AGCTCAAAATGGGTGGTGAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGA GAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCAC TTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGCTGAAAGGGAAAC GCTTGAAGTCAGTCGCGTCGTCCGGAACCTCAGCCTTGCTTTTCGCT CGGTGCACTTTCCGGATGACGGGTCAGCATCGATTTTGACCGTCG GAAAAGGGCTGGAGTAATGTGGCACCTCCGGGTGTGTTATAGACT CTGGTCGCATACGGCGGTGCGGATCGAGGAACGCAGCGCGCCGC AAGGCAGGGGTTCCGCCACTTTTCGCGCTTAGGATGCTGGCATAAT GGCTTTAAACGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACAT ACCTGCGAGTGTTTGGGTGGAAAACCCGAGCGCGTAATGAAAGTG AAAGTTGGGATCCCTGTCTGTTGGGAGCACCGACGCCCGGACCAG ACGTTCTCTGACGGATCCGCGGTAGAGCATGTATGTTGGGACCCG AAAGATGGTGAACATATGCCTGAATAGGGTGAAGCCAGAGGAAACT CTGGTGGAGGCTCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCA AATTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCG

Filogenia

Na construção da árvore filogenética verificou-se divergência de resultados para ambas as espécies estudadas. '*G. lucidum*' apresentou agrupamento com a espécie *G. lingzhi* (**Figura 13**, marcador vermelho), corroborando com o trabalho de Hennicke et al. (2016) onde, ao sequenciar duas regiões gênicas (ITS e β -*tub*) de 2 linhagens (M9720 e M9724) vendidas comercialmente como '*G. lucidum*', verificaram que M9724 corresponde à *G. lingzhi*, demonstrando ainda variações morfológicas e de produção, além de diferentes teores de compostos fenólicos e triterpenoides.

Recentemente, *G. lingzhi*, erroneamente identificada como *G. lucidum*, foi identificada como sendo uma espécie de distribuição no leste asiático, enquanto, *G. lucidum* refere-se a uma espécie de ocorrência na Europa (Liu et al., 2023). Assim, atualmente, sabe-se que a espécie do gênero *Ganoderma* mais estudada, descrita na medicina tradicional chinesa, a qual é famosa por ser um cogumelo medicinal do leste asiático é na verdade *G. lingzhi*, enquanto *G. lucidum* trata-se de binômio científico que tem sido incorretamente e amplamente usado para o cogumelo cultivado comercialmente (Mirmazlou et al., 2021).

Figura 13 - Árvore filogenética de espécies do gênero *Ganoderma*, construída com a região gênica ITS1-5.8S-ITS2 pelo método de máxima verossimilhança e modelo de Kimura 2-parâmetros.



Fonte: Autor (2023)

O isolado amazônico de *Ganoderma* não apresentou agrupamento com nenhuma das 55 espécies utilizadas na construção da árvore filogenética, além de ter formado um clado a parte das demais espécies (**Figura 13**, marcador azul). Para fins de confirmação de gênero, o *contig* de *Ganoderma* sp. obtido foi submetido ao alinhamento no banco de dados MycoBank (www.mycobank.org) e apresentou maior similaridade com as espécies *G. destructans* (99,42%) e *G. resinaceum* (99,32%), no entanto, conforme observado na árvore filogenética (**Figura 12**), não houve relação do isolado com essas espécies.

Na filogenia de *Ganoderma* sp. nenhum agrupamento foi verificado, porém vale ressaltar que apesar de já serem relatadas algumas espécies de ocorrência na Amazônia, como *G. amazonense*, *G. elegantum*, *G. perzonatum* e *G. subfornicatum*, só há trabalhos publicados com dados morfológicos (Torres-Torres; Guzmán-Dávalos; Gugliotta, 2013). Assim, considerando os poucos trabalhos voltados ao isolamento e caracterização molecular de espécies de *Ganoderma* no Brasil, justifica-se o uso predominante de linhagens asiáticas na construção da matriz de dados da análise filogenética, com um baixo quantitativo de amostras da América do Sul.

Lima Júnior, Gibertoni e Malosso (2014), ao descreverem os táxons *G. chalceum*, *G. multiplicatum*, *G. orbiforme*, *G. parvulum*, *G. aff. oerstedtii* e *Tomophagus colossos* no Brasil, relatam que a distribuição geográfica deve ser considerada uma informação relevante, uma vez que todas as espécies do gênero *Ganoderma* lacadas de origem brasileira diferem das demais espécies lacadas já conhecidas na Ásia, Europa, América do Norte e algumas outras regiões da América do Sul. Outro ponto a ser levado em consideração é a grande incidência de amostras denominadas nos bancos de dados apenas como "*Ganoderma* sp.", indicando espécimes as quais não foi possível chegar a uma identificação a nível de espécie.

Trabalhos como os de Kumar e colaboradores (2015), Cabarroi-Hernández e colaboradores (2019) e Fryssouli e colaboradores (2020), ao realizarem a análise filogenética da região ITS de amostras de *Ganoderma*, também verificam um padrão de distanciamento de amostras denominadas "*Ganoderma* sp." provenientes de bancos de dados, sendo que estas se apresentam em diferentes ramos ou clados, na porção inferior da árvore filogenética. Por fim, tendo em vista as diferentes informações supracitadas quanto ao isolado amazônico (*Ganoderma* sp.), o presente trabalho sugere tratar-se de uma nova espécie.

5.6 CONCLUSÃO

A partir da combinação de análises morfológicas, químicas e moleculares foi possível verificar que a linhagem vendida comercialmente como '*G. lucidum*' na verdade se trata de um *G. lingzhi*. Quanto ao isolado amazônico, confirmou-se que este pertence ao gênero *Ganoderma*, contudo, mesmo com a combinação de diferentes etapas de caracterização, não foi possível chegar a uma espécie já descrita, levantando-se a hipótese de que se trata de uma nova espécie desse gênero. Assim, estudos futuros devem ser realizados, principalmente envolvendo o sequenciamento de outras regiões gênicas (LSU e TEF1- α) para fins de confirmação dessa hipótese.

REFERÊNCIAS

- ABDULGHANI, A.i; JITENDRA, G. V.; SUBHASH, S. D. In vitro evaluation of anti-staphylococcal activity of *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma praelongum* and *Ganoderma resinaceum* from Pune, India. **African Journal of Microbiology Research**, vol. 5, no. 3, p. 328 - 333, 2011.
- AGATONOVIC-KUSTRIN, S. *et al.* High-performance thin-layer chromatography hyphenated with microchemical and biochemical derivatizations in bioactivity profiling of marine species. **Marine drugs**, vol. 17, no. 3, p. 148, 2019.
- BADALYAN, S. M. *et al.* Morphological and ecological screening of different collections of medicinal white-rot bracket fungus *Ganoderma adspersum* (Schulzer) Donk (Agaricomycetes, Polyporales). **Italian Journal of Mycology**, vol. 48, p. 1-15, 2019.
- BHOSLE, S. *et al.* Taxonomy and diversity of *Ganoderma* from the Western parts of Maharashtra (India). **Mycosphere**, vol. 1, no. 3, p. 249-262, 2010.
- BIJALWAN, A. *et al.* Insights of medicinal mushroom (*Ganoderma lucidum*): prospects and potential in India. **Biodiversity International Journal**, vol. 4, no. 5, p. 202-9, 2020.
- CABARROI-HERNÁNDEZ, M. *et al.* The *Ganoderma weberianum-resinaceum* lineage: multilocus phylogenetic analysis and morphology confirm *G. mexicanum* and *G. parvulum* in the Neotropics. **MycKeys**, vol. 59, p. 95, 2019.
- CAO, Y.; WU, S.; DAI, Y. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom “Lingzhi”. **Fungal Diversity**, vol. 56, no. 1, p. 49 - 62, 2012.
- CARVALHO, C. S. M. *et al.* Cultivation and bromatological analysis of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst cultivated in agricultural waste. **Afr J Biotechnol**. Vol. 14, p. 412 - 418, 2015.
- CÉSAR, E. *et al.* Characterization and physical properties of mycelium films obtained from wild fungi: natural materials for potential biotechnological applications. **Journal of Polymers and the Environment**, vol. 29, no. 12, p. 4098 - 4105, 2021.
- CHAIYASUT, C.; KRUATAMA, C.; SIRILUN, S. Breaking the spores of *Ganoderma lucidum* by fermentation with *Lactobacillus plantarum*. **African Journal of Biotechnology**, vol. 9, no. 43, p. 7379 - 7382, 2010.
- CHULIKAVIT, N. *et al.* Influence of growth rates, microstructural properties and biochemical composition on the thermal stability of mycelia fungi. **Scientific Reports**, vol. 12, no. 1, p. 1 - 14, 2022.
- COETZEE, M. *et al.* *Ganoderma* species, including new taxa associated with root rot of the iconic *Jacaranda mimosifolia* in Pretoria, South Africa. **IMA fungus**, vol. 6, no. 1, p. 249 - 256, 2015.

- COSTA-REZENDE, D. H. *et al.* Morphological reassessment and molecular phylogenetic analyses of *Amauroderma* s. lat. raised new perspectives in the generic classification of the Ganodermataceae family. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, vol. 39, no. 1, p. 254 - 269, 2017.
- CROUS, P. W. *et al.* Fungal Planet description sheets: 371–399. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, vol. 35, no. 1, p. 264 - 327, 2015.
- CROUS, P. W. *et al.* Fungal Planet description sheets: 400–468. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, vol. 36, no. 1, p. 316 - 458, 2016.
- CROUS, P. W. *et al.* Fungal Planet description sheets: 558–624. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, vol. 38, p. 240, 2017.
- CROUS, P. W. *et al.* Fungal Planet description sheets: 785–867. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, vol. 41, no. 1, p. 238 - 417, 2018.
- CRUZ, F. S.; PACHECO DE ARAUJO, M. G.; NUNEZ, C. V. Leaves of *Duroia longiflora*: Isolation of a Biflavanoid and Histochemical Analysis. **Natural Product Communications**, vol. 14, no. 6, p. 1934578 - 19849779, 2019.
- DOUANLA-MELI, C.; LANGER, E. *Ganoderma carocalcareus* sp. nov., with crumbly-friable context parasite to saprobe on *Anthocleista nobilis* and its phylogenetic relationship in *G. resinaceum* group. **Mycological Progress**, vol. 8, no. 2, p. 145 - 155, 2009.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem bull**, vol. 19, p. 11-15, 1987.
- FLETCHER, I. A. Effect of temperature and growth media on mycelium growth of *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma lucidum* Strains. **Cohesive journal of microbiology and infectious disease**, vol. 2, no. 5, 2019.
- FRYSSOULI, V. *et al.* A global meta-analysis of ITS rDNA sequences from material belonging to the genus *Ganoderma* (Basidiomycota, Polyporales) including new data from selected taxa. **MycoKeys**, vol. 75, p. 71, 2020.
- GALAPPATHTHI, M. C. A. *et al.* A Review of *Ganoderma* Triterpenoids and Their Bioactivities. **Biomolecules**, vol. 13, no. 1, p. 24, 2023.
- GIBERTONI, T. B. Delimitation of taxa in *Amauroderma* (Ganodermataceae, Polyporales) based in morphology and molecular phylogeny of Brazilian specimens. **Phytotaxa**, vol. 227, no. 3, p. 201 - 228, 2015.
- GOTTLIEB, A. M.; WRIGHT, J. E. Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Ganoderma*. **Mycological Research**, vol. 103, no. 6, p. 661 - 673, 1999A.
- GOTTLIEB, A. M.; WRIGHT, J. E. Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Elfvigia*. **Mycological Research**, vol. 103, no. 10, p. 1289 - 1298, 1999B.

- GUNNELS, T. *et al.* The ITS region provides a reliable DNA barcode for identifying reishi/lingzhi (*Ganoderma*) from herbal supplements. **PLoS One**, vol. 15, no. 11, p. e0236774, 2020.
- HAPUARACHCHI, K. K. *et al.* High diversity of *Ganoderma* and *Amauroderma* (Ganodermataceae, Polyporales) in Hainan Island, China. **Mycosphere**, vol. 9, no. 5, p. 931 - 982, 2018.
- HE, J. *et al.* Phylogenetic analyses and morphological characters reveal two new species of *Ganoderma* from Yunnan province, China. **MycoKeys**, vol. 84, p. 141, 2021.
- HENNICKE, F. *et al.* Distinguishing commercially grown *Ganoderma lucidum* from *Ganoderma lingzhi* from Europe and East Asia on the basis of morphology, molecular phylogeny, and triterpenic acid profiles. **Phytochemistry**, vol. 127, p. 29 - 37, 2016.
- HONG-DE, Y. *et al.* *Ganoderma ovisporum* sp. nov. (Polyporales, Polyporaceae) from Southwest China. **Biodiversity Data Journal**, p. 197, 2022.
- JARGALMAA, S. *et al.* Taxonomic evaluation of selected *Ganoderma* species and database sequence validation. **PeerJ**, vol. 5, p. e3596, 2017.
- KONARA, U. A.; THAMBUGALA, K. M.; HAPUARACHCHI, K. K. *Ganoderma* (Ganodermataceae, Polyporales): Historical perspectives, recent advances, and future research in Sri Lanka. **Studies in Fungi**, vol. 7, no. 1, p. 1 - 7, 2022.
- KUMAR, A. *et al.* Laccase isozymes from *Ganoderma lucidum* MDU-7: isolation, characterization, catalytic properties and differential role during oxidative stress. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 113, p. 68 - 75, 2015.
- KWON, O. C. *et al.* Taxonomic position and species identity of the cultivated Yeongji '*Ganoderma lucidum*' in Korea. **Mycobiology**, vol. 44, no. 1, p. 1 - 6, 2016.
- LI, T. *et al.* *Ganoderma leucocontextum*, a new member of the *G. lucidum* complex from southwestern China. **Mycoscience**, vol. 56, no. 1, p. 81 - 85, 2015.
- LIAO, B. *et al.* Identification of commercial *Ganoderma* (Lingzhi) species by ITS2 sequences. **Chinese medicine**, vol. 10, no. 1, p. 1 - 9, 2001.
- LIMA, J. N. C.; GIBERTONI, T. B.; MALOSSO, E. Delimitation of some neotropical laccate *Ganoderma* (Ganodermataceae): molecular phylogeny and morphology. **Revista de Biología Tropical**, vol. 62, no. 3, p. 1197 - 1208, 2014.
- LIU, B. The Chinese medical fungi. Shanxi People's Press, Taiyuan. 1974.
- LIU, H. *et al.* *Ganoderma shanxiense*, a new species from northern China based on morphological and molecular evidence. **Phytotaxa**, vol. 406, no. 2, p. 129 - 136, 2019.
- LOYD, A. L. *et al.* Elucidating "lucidum": Distinguishing the diverse laccate *Ganoderma* species of the United States. **PLoS One**, vol. 13, no. 7, p. e0199738, 2018A.

LOYD, A. L. *et al.* Identifying the “mushroom of immortality”: assessing the *Ganoderma* species composition in commercial Reishi products. **Frontiers in Microbiology**, vol. 9, p. 1557, 2018B.

LOYD, A. L. *et al.* Cultural characterization and chlamydospore function of the Ganodermataceae present in the eastern United States. **Mycologia**, vol. 111, no. 1, p. 1 - 12, 2019.

LUANGHARN, T. *et al.* A new record of *Ganoderma tropicum* (Basidiomycota, Polyporales) for Thailand and first assessment of optimum conditions for mycelia production. **MycoKeys**, vol. 51, p. 65, 2019.

LUANGHARN, T. *et al.* *Ganoderma* (Ganodermataceae, Basidiomycota) species from the Greater Mekong Subregion. **Journal of Fungi**, vol. 7, no. 10, p. 819, 2021.

MIMS, C. W.; SEABURY, F. Ultrastructure of tube formation and basidiospore development in *Ganoderma lucidum*. **Mycologia**, vol. 81, no. 5, p. 754 - 764, 1989.

MOHANTY, P. S. *et al.* First report of *Ganoderma resinaceum* and *G. weberianum* from north India based on ITS sequence analysis and micromorphology. **Mycosphere**, vol. 2, no. 4, p. 469 - 474, 2011.

PORTER, D. L.; NALEWAY, S. E. Hyphal systems and their effect on the mechanical properties of fungal sporocarps. **Acta Biomaterialia**, vol. 145, p. 272 - 282, 2022.

RAJA, H. A. *et al.* DNA barcoding for identification of consumer-relevant mushrooms: A partial solution for product certification?. **Food Chemistry**, vol. 214, p. 383 - 392, 2017.

RICHTER, C. *et al.* An assessment of the taxonomy and chemotaxonomy of *Ganoderma*. **Fungal Diversity**, vol. 71, no. 1, p. 1-15, 2015.

SOBAL, M. *et al.* Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of Mexico. **Micología Aplicada Internacional**, vol. 19, no. 1, p. 15 - 23, 2007.

SONG, T. T. *et al.* Comparison of agronomic characteristics, microstructures and phytochemical content of fruiting body and spore of four cultivated varieties of *Ganoderma lingzhi*. **Mycosystema**, vol. 39, no. 1, p. 34 - 41, 2020.

SUN, Y. F. *et al.* Species diversity, systematic revision and molecular phylogeny of Ganodermataceae (Polyporales, Basidiomycota) with an emphasis on Chinese collections. **Studies in Mycology**, vol. 101, no. 1, p. 287 - 415, 2022.

TCHOTET TCHOUMI, J. M. *et al.* Taxonomy and species diversity of *Ganoderma* species in the Garden Route National Park of South Africa inferred from morphology and multilocus phylogenies. **Mycologia**, vol. 111, no. 5, p. 730 - 747, 2019.

TEIXEIRA, A. R. Ensaio para a taxonomia das poliporáceas. **Bragantia**, vol. 6, p. 299 - 351, 1946.

THAWTHONG, A. *et al.* *Ganoderma sichuanense* (Ganodermataceae, Polyporales) new to Thailand. **MycoKeys**, vol. 22, p. 27 - 43, 2017.

- TORRES-TORRES, M. G.; GUZMÁN-DÁVALOS, L.; GUGLIOTTA, A. M. *Ganoderma* in Brazil: known species and new records. **Mycotaxon**, vol. 121, no. 1, p. 93 - 132, 2013.
- VICECONTE, F. R. *et al.* *Ganoderma sessile* is a fast polysaccharide producer among *Ganoderma* species. **Mycologia**, vol. 113, no. 3, p. 513-524, 2021.
- VU, D. *et al.* Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. **Studies in mycology**, vol. 91, no. 1, p. 23-36, 2018.
- WANG, Xin-Cun *et al.* The species identity of the widely cultivated *Ganoderma*, 'G. *lucidum*' (Ling-zhi), in China. **PLoS One**, vol. 7, no. 7, p. e40857, 2012.
- WANG, D.; YAO, Y. J. Intrastrain internal transcribed spacer heterogeneity in *Ganoderma* species. **Canadian journal of microbiology**, vol. 51, no. 2, p. 113 - 121, 2005.
- WANG, D. *et al.* *Ganoderma multipileum*, the correct name for 'G. *lucidum*' in tropical Asia. **Botanical studies**, vol. 50, no. 4, p. 451 - 458, 2009.
- WELTI, S.; COURTECUISSÉ, R. The Ganodermataceae in the French West Indies (Guadeloupe and Martinique). **Fungal Diversity**, vol. 43, no. 1, p. 103 - 126, 2010.
- XING, J. *et al.* Morphological characters and phylogenetic analysis reveal a new species within the *Ganoderma lucidum* complex from South Africa. **Phytotaxa**, vol. 266, no. 2, p. 115 - 124, 2016.
- XING, J. *et al.* Morphological and molecular identification of two new *Ganoderma* species on *Casuarina equisetifolia* from China. **MycoKeys**, vol. 34, p. 93 - 108, 2018.
- YANG, Z. L.; FENG, B. 2013. What is the Chinese "Lingzhi"?—a taxonomic mini-review. *Mycology*, vol. 4, p. 1 - 4.
- YE, L. *et al.* *Ganoderma weixiensis* (Polyporaceae, Basidiomycota), a new member of the *G. lucidum* complex from Yunnan Province, China. **Phytotaxa**, vol. 423, no. 2, p. 75 - 86, 2019.
- YURNALIZA, Y. *et al.* Screening of *Burkholderia* spp. from oil palm plantation with antagonistic properties against *Ganoderma boninense*. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, vol. 21, no. 8, 2020.
- ZANCA, S. S.; COSTA, R. C.; NÚÑEZ, C. V. In Vitro Callus Induction of *Duroia macrophylla* Huber, Chemical Prospection and Biotechnological Potentialities of Its Extracts. **Scientific Pages Bot**, vol. 1, no. 001, 2016.
- ZHAO, Z. Z. *et al.* Unusual constituents from the medicinal mushroom *Ganoderma lingzhi*. **RSC advances**, vol. 9, no. 63, p. 36931-36939, 2019.
- ZHOU, L. *et al.* Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (Ganodermataceae, Polyporales) inferred from morphology and multilocus phylogeny. **Phytochemistry**, vol. 114, p. 7-15, 2015.

ZMITROVICH, I. V.; MALYSHEVA, V. F.; SPIRIN, W. A. A new morphological arrangement of the Polyporales. I. Phanerochaetineae. **Mycena: an independent mycological journal**, vol. 6, p. 4-56, 2006.

6. Capítulo 2

COMPARAÇÃO DO POTENCIAL DE BIOCONVERSÃO DE UM ISOLADO AMAZÔNICO DE *GANODERMA* SP. E UMA LINHAGEM COMERCIAL DE *G. LINGZHI*

GOUVÊA, PAULA ROMENYA DOS SANTOS^{1,2}; JÚNIOR, SÉRGIO DANTAS DE OLIVEIRA¹; PESSOA, VÍTOR ALVES^{1,2}; COSTA, CARLA LAIZE DOS SANTOS CRUZ³; SALES-CAMPOS, CECI¹; CHEVREUIL, LARISSA RAMOS¹

¹Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas

³Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia de Materiais

6.1 RESUMO

Ganoderma spp. despertam grande interesse devido às suas propriedades medicinais e farmacológicas, sendo fundamental o conhecimento sobre o seu cultivo artificial, com foco na produção de biomoléculas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a biotransformação de diferentes resíduos lignocelulósicos amazônicos por *Ganoderma* sp. (isolado na Amazônia) e *G. lingzhi* (linhagem comercial). Os fungos foram cultivados em resíduos de açaí, guaruba-cedro e três diferentes lotes de marupá. Os substratos iniciais (SI) e após o cultivo dos cogumelos (SAC) foram submetidos às análises físico-químicas, de microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios-X (DRX) e índice de cristalinidade (ICr). Os teores de umidade, cinzas, lipídios, carbono, celulose e lignina tenderam a diminuir após o cultivo, enquanto houve aumento no teor de nitrogênio. Na análise de MEV do SAC verificou-se visíveis sinais de degradação das fibras lignocelulósicas, DRX demonstrou um pico característico de celulose amorfa e o ICr evidenciou a coexistência de regiões ordenadas e desordenadas. Assim, os resíduos lignocelulósicos amazônicos apresentaram potencial de uso como suporte para o desenvolvimento de *Ganoderma* sp. e *G. lingzhi*, com destaque para a linhagem isolada na Amazônia, que apresentou maior potencial biológico na biotransformação dos resíduos.

Palavras-chaves: Macrofungos; Cultivo sólido; Caracterização físico-química; MEV; biotransformação.

6.2 ABSTRACT

Ganoderma spp. raises great interest due to its medicinal and pharmacological properties, being fundamental the knowledge about its artificial cultivation, focusing on the production of biomolecules. The objective of this work was to evaluate the biotransformation of different Amazonian lignocellulosic residues by *Ganoderma* sp. (isolated in the Amazon) and *G. lingzhi* (commercial strain). The fungi were cultivated in açaí, guaruba-cedro and three different marupá lots residues. Initial substrates (IS) and the spent mushroom substrate (SMS) were submitted to physicochemical analyses, scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD) and crystallinity Index (CI). Moisture, ash, lipid, carbon, cellulose and lignin contents tended to decrease after cultivation, while there was an increase in nitrogen content. From the SEM of SMS it is visible signs of degradation of lignocellulosic fibers, XRD showed a characteristic peak of amorphous cellulose and CI highlighted the coexistence of ordered and disordered regions. Thus, the Amazonian lignocellulosic residues showed potential use as support for the development of *Ganoderma* sp. and *G. lingzhi*, highlighting the strain isolated in the Amazon, which showed the greatest biological potential in transformation residues.

Keywords: Macrofungi; Solid Cultivation; SEM; Physicochemical characterization; Biotransformation

6.3 INTRODUÇÃO

Os cogumelos têm sido apreciados por séculos pelo seu alto teor nutricional, sabor e textura únicos, bem como por sua aplicação no tratamento de várias doenças degenerativas (Melanouri et al., 2022; Rathore et al., 2017). *Ganoderma* é um gênero de basidiomicetos, pertencente à ordem Polyporales, família Ganodermataceae (Polyporaceae) e classe Agaricomycetes (Bhardwaj e Misra, 2018). As espécies de *Ganoderma* são economicamente importantes devido ao seu uso generalizado como medicamentos tradicionais na China e em outros países, onde são relatadas como promotoras de saúde e longevidade (Chinthanom et al., 2021). Elas também são descritas como cogumelos poliporáceos, que geralmente crescem em madeiras, com cerca de 80 espécies já identificadas em regiões tropicais (Sudhakar et al., 2021).

A produção de espécies de *Ganoderma* é geralmente realizada a partir do cultivo sólido ou fermentação em estado sólido (SSF), utilizando resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono e nitrogênio (Sadh et al., 2018). Assim,

considerando a variabilidade das características intrínsecas de cada substrato de crescimento, isso acaba sendo um parâmetro importante na otimização do processo de SSF, uma vez que seus componentes podem influenciar ou retardar o crescimento fúngico e a produção de seus metabólitos (Rainert et al., 2021).

O açaí (*Euterpe* sp.) é uma palmeira da Amazônia brasileira, com produção de 1,7 milhão de toneladas de frutos, gerando US\$ 800 milhões para a economia brasileira em 2020. No entanto, a polpa representa apenas 15% do peso seco do fruto, gerando aproximadamente 1,4 milhão de toneladas de resíduos de sementes de açaí anualmente (Jorge et al., 2022). Guaruba-cedro (*Vochysia maxima*), por sua vez, apresenta interesse comercial, uma vez que sua madeira é muito valorizada no mercado madeireiro da Amazônia, tornando-a suscetível à geração de resíduos, como sua serragem, que já é relatada como sendo utilizada, por exemplo, na produção de biocompósitos (Reis et al., 2015; Viezzer et al., 2021). O marupá (*Simarouba amara*) é outro exemplo de espécie arbórea cuja madeira possui interesse econômico e pode ser utilizada na construção, sendo que a serragem produzida como resíduo já é relatada como sendo utilizável no cultivo de cogumelos (Souza et al., 2020; Sales-Campos et al., 2022).

Vários fungos, incluindo cogumelos, possuem um sistema enzimático altamente eficiente, capaz de converter resíduos lignocelulósicos em açúcares, fornecendo energia para seu crescimento e desenvolvimento (Andlar et al., 2018; Otieno et al., 2022). Portanto, visando agregar valor e minimizar o impacto ambiental causado pelo acúmulo de resíduos agroindustriais, este estudo avaliou a bioconversão de diferentes resíduos lignocelulósicos disponíveis na Amazônia, após o cultivo de *Ganoderma lingzhi* e *Ganoderma* sp.

6.4 METODOLOGIA

Material Biológico

Os fungos *G. lingzhi* (CC22), linhagem comercial e *Ganoderma* sp. (N.1962) e isolado na Amazônia foram obtidos da Coleção de Culturas de Microorganismos de Interesse Agrossilvicultural, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Resíduos de sementes de açaí (*Euterpe* sp.), serragem de guaruba-cedro (*Vochysia maxima*) e de três lotes de marupá (*Simarouba amara*) foram coletadas em feiras e serrarias na cidade de Manaus - AM, Brasil (3°06'06" S, 60°01'29" W).

Após a coleta, os resíduos foram secos, triturados e armazenados em sacos plásticos em temperatura ambiente ($\pm 30\text{ }^{\circ}\text{C}$). Os três diferentes lotes de marupá correspondem a três locais de coleta diferentes, nos quais foram observados odor e palatabilidade distintos.

Fermentação em Estado Sólido (FSS)

Para a produção do *spawn*, 1/4 da placa de Petri contendo micélio de *G. lingzhi* e *Ganoderma* sp., cultivados em meio BDA (Ágar de Batata Dextrose), foram transferidos para frascos contendo os resíduos (78%), 20% de uma mistura de farelo (arroz, trigo e milho - 60:20:20 m/m/m) e 2% de CaCO_3 , previamente autoclavados a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a incubação desses frascos a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e colonização fúngica, 5% do *spawn* foi transferido para sacos de polipropileno de alta densidade, contendo substratos preparados na mesma formulação do *spawn*, e incubados a 25°C , 90% de umidade e em fotoperíodo de 12 horas.

Determinação de taninos totais

A equivalência de ácido tânico (EAT) foi determinado nos diferentes resíduos lignocelulósicos, antes de preparar o substrato de cultivo. Amostras de cada resíduo foram secas (16 horas a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$) e submetidas à extração em metanol, durante 10 dias em repouso, no escuro. Após filtração, o sobrenadante foi concentrado, diluído em água destilada e incubado com Folin-Ciocalteu e Na_2CO_3 (10%). As reações foram submetidas às leituras espectrofotométricas a 725 nm e o teor de taninos foi estimado a partir da curva-padrão de ácido tânico (Pansera et al., 2003).

Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos foram determinados nos substratos iniciais (SI) e no substrato após o cultivo dos cogumelos (SAC). O teor de umidade foi obtido por diferença de massa, em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os teores de cinzas foram quantificados a partir da calcinação em mufla a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 4 horas (AOAC, 1997).

Para os lipídios, os substratos (SI e SAC) foram submetidos à extração a frio com clorofórmio, metanol, água e solução de Na_2SO_4 , filtrados e secados até a evaporação do clorofórmio (Bligh-Dyer, 1957). O teor de carbono (método de Walkley-Black) foi determinado por titulação com $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, com as

amostras previamente aquecidas (60 °C por 10 minutos) em uma solução contendo K_2CrO_7 e H_2SO_4 , com adição do indicador H_3PO_4 (Tedesco et al., 1995). Na determinação do nitrogênio total (método de Kjeldahl), as amostras foram digeridas com H_2SO_4 em um bloco digestor (350 °C) e destiladas adicionando-se 50mL DE NaOH (35%), coletadas em solução de H_3BO_3 com indicadores e tituladas com solução de HCl (0,05N) (Tedesco et al., 1995). O teor de proteínas foi obtido multiplicando o valor de nitrogênio pelo fator de conversão 6,25 (Furlani; Godoy, 2005).

O teor de fibra total foi determinado a partir da digestão das amostras em H_2SO_4 e NaOH, com posterior secagem a 105 °C e calcinação a 550 °C (IAL, 2008). Para as fibras em detergente neutro (FDN), as amostras foram digeridas em solução de detergente neutro e secadas a 105 °C. As amostras da etapa de FDN foram digeridas em solução de detergente ácido e secadas a 105 °C, resultando na fibra em detergente ácido (FDA), quantificando o teor de hemicelulose (Van Soest, 1990). Posteriormente, para obter a concentração de lignina, as amostras após a etapa de FDA foram colocadas em contato com $KMnO_4$ por 2 horas, seguidas de incubação por 30 minutos em uma solução desmineralizante. Após a etapa de extração, as amostras foram secadas a 105 °C e calcinadas a 550 °C para determinar os teores de celulose (Van Soest; Wine, 1968).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Difração de Raios-X (DRX) dos resíduos

Análises de MEV e DRX foram realizadas nos substratos iniciais e nos substratos após o cultivo dos cogumelos. As imagens de MEV foram obtidas usando um microscópio eletrônico de varredura (Phillips XL - 30), utilizando um feixe de elétrons de 15 kv e ampliação de 100x. O DRX foi avaliado por espectroscopia (DRX-6000, Shimadzu), com radiação de cobre $K\alpha$, 30 kV de tensão e 15 mA de corrente elétrica, com uma taxa de 2,0 graus por minuto para um contínuo 2θ , com um intervalo de 4,0 a 70,0°. O índice de cristalinidade (ICr) nos substratos foi calculado de acordo com Segal et al., (1959).

Análise estatística

Os experimentos foram arranjados em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial composto por 2 espécies de fungos (*Ganoderma* sp. e *G. lingzhi*) e 5 resíduos (açai, guaruba-cedro, marupá I, marupá II, marupá III). As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o software Statistic 7. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

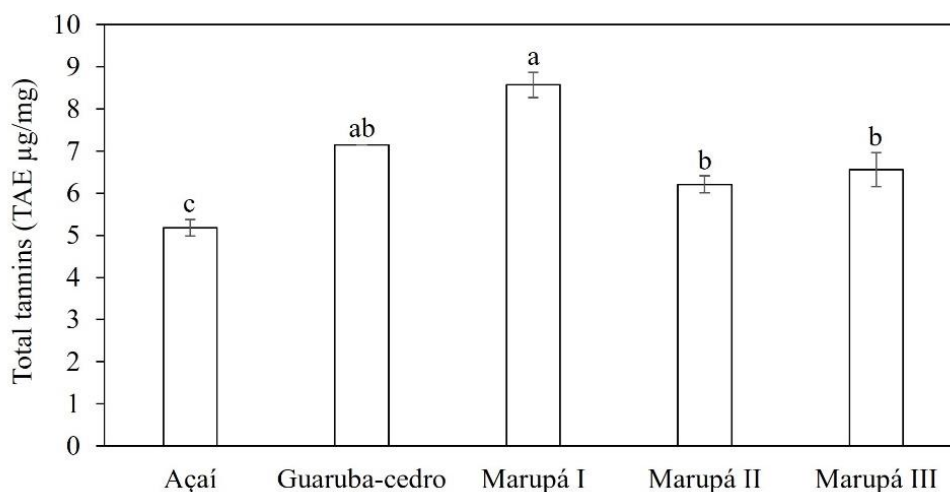
6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teor total de taninos em resíduos lignocelulósicos

O teor total de taninos nos resíduos lignocelulósicos foi determinado com o objetivo de diferenciar os resíduos de marupá, coletados em diferentes locais na cidade de Manaus, Amazonas (Brasil), uma vez que apresentavam algumas diferenças entre si, incluindo odor e adstringência. Os resíduos apresentaram teores de taninos variando de 5,18 a 8,57 µg/mg de equivalência de ácido tânico (EAT), sendo o maior valor observado para o marupá I (**Figura 14**). A diferença observada entre os resíduos de marupá pode estar associada ao período do ano, diferenças nas características do solo em cada local de coleta e sazonalidade.

Alguns basidiomicetos são capazes de degradar madeira, subprodutos da degradação de lignina e estruturas recalcitrantes, como derivados fenólicos, taninos e cafeína (Parini.,2012). No entanto, o alto teor de taninos nos substratos de cultivo de cogumelos é preocupante, pois é considerado um fator antinutricional, que pode prejudicar o desenvolvimento micelial e, conseqüentemente, a qualidade nutricional dos basidiomas (Ivarsson et al., 2021). Aguiar et al. (2022) descreveram que substratos de açai não eram adequados para o cultivo de *Pleurotus ostreatus*, possivelmente devido ao alto teor de taninos (13,88 µg/mg de EAT).

Figura 14 - Determinação do teor de taninos totais em diferentes resíduos lignocelulósicos.



Letras diferentes indicam diferenças estatísticas a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

Caracterização físico-química de SI e SAC

Vários tipos de substratos lignocelulósicos podem ser utilizados no cultivo de cogumelos, incluindo resíduos agroindustriais e subprodutos da produção de biodiesel, considerando o cultivo como um processo reprodutível, uma vez que grandes volumes desses subprodutos estão disponíveis no ambiente e não possuem nenhum tipo de tratamento (Basso et al., 2020). Além disso, a biomassa lignocelulósica, como madeira e resíduos de culturas agrícolas, é considerada o material renovável mais abundante do mundo, cuja composição pode variar em termos de teores de celulose, hemicelulose, lignina e taninos (Hussain et al., 2020; Laurichesse; Avérous, 2014).

O uso de resíduos lignocelulósicos na produção de cogumelos pode representar uma alternativa promissora para reduzir o acúmulo desses materiais no ambiente. No entanto, a identificação da composição do substrato é essencial para a produção bem-sucedida de basidiomicetos (Kumla et al., 2020). O teor de umidade no substrato inicial variou de 52,10% a 69,90%, sendo o menor valor encontrado para o açaí. Após o cultivo de ambas as espécies de *Ganoderma* foi observada uma redução significativa no teor de umidade, que variou de 3,70% a 6,89%. Essa diminuição correspondeu a aproximadamente 90% da umidade inicial, com as

maiores perdas registradas para a amostra de marupá II após o cultivo de *G. lingzhi* e para a amostra de marupá I após o cultivo de *Ganoderma* sp. (**Tabela 6**).

Miles e Chang (2004) recomendam que o substrato de cultivo de macrofungos apresente umidade na faixa de 60% a 70%, para favorecer o crescimento micelial. Chimini et al., (2021), ao avaliar resíduos de cerveja (extrato de malte) como substrato para o cultivo de *G. lingzhi*, utilizaram valores entre 63% e 66% em suas formulações.

O teor de cinzas indica a quantidade de minerais presentes nos substratos (Nielsen, 2010). Nos SI, o teor de cinzas variou entre 3,13% e 5,21%, com os valores mais altos observados nos substratos à base de marupá, com destaque para marupá III. Enquanto nos SAC das duas espécies de *Ganoderma* houve uma pequena variação (0,11% a 0,30%), com uma redução maior após o cultivo de *Ganoderma* sp., sendo a redução de 22 vezes em relação aos níveis iniciais (**Tabela 6**).

Fraile-Fabero et al. (2021), utilizando resíduos de álamo (*Populus* sp.) suplementados com grãos de trigo para o cultivo de *G. lucidum*, obtiveram teores de cinzas variando de 1,21% a 3,2% nos substratos após o cultivo. Os resíduos lignocelulósicos possuem composições de cinzas diferentes, correspondendo à celulose, hemicelulose, lignina, nitrogênio e macro/microelementos. Além disso, a natureza química dos substratos utilizados no cultivo de macrofungos apresenta influência significativa nos rendimentos produtivos desses fungos (Owaid et al., 2017).

O teor de lipídios nos SI variou de 2,47% a 3,35%, com os substratos à base de guaruba-cedro e marupá III apresentando os maiores teores de lipídios. No entanto, após o cultivo dos fungos, houve um aumento nos teores de lipídios no substrato à base de guaruba-cedro e uma diminuição no marupá III (**Tabela 6**). Essa redução pode estar relacionada à degradação desses compostos, uma vez que os microorganismos são capazes de utilizar algumas gorduras como fonte de energia (Zhao et al., 2016). Enquanto o aumento no teor de lipídios pode ser devido à capacidade de alguns fungos em sintetizar lipídios em determinados resíduos e sob certas condições de cultivo (Martínez et al., 2015).

Quanto à concentração de carbono nos SI, foi observada baixa variação, com uma redução de até 17% após o cultivo fúngico (**Tabela 6**). Chimini et al. (2021)

cultivaram *G. lucidum* em diferentes substratos à base de bagaço de malte e obtiveram teores de carbono variando de 49% a 51%.

Tabela 6 - Caracterização físico-química dos substratos iniciais (SI) e substratos após o cultivo (SAC) de *Ganoderma lingzhi* e *Ganoderma* sp.

	Substrato	Umidade (g/100)	Cinzas (g/100)	Lipídios (g/100)	Carbono (g/100)	Nitrogênio (g/100)	C:N	Total Proteínas (g/100)	Celulose (g/100)	Hemicelulose (g/100)	Lignina (g/100)
SI	Açaí	52,1 ± 0,5 ^b	3,13 ± 0,1 ^c	2,47 ± 0,1 ^b	51,13 ± 0,6 ^a	1,06 ± 0,0 ^a	47,96 ± 0,3 ^d	6,66 ± 0,2 ^a	50,80 ± 6,1 ^b	22,87 ± 0,4 ^a	4,08 ± 0,3 ^d
	Guaruba- cedro	68,8 ± 0,9 ^a	3,20 ± 0,9 ^c	3,35 ± 0,6 ^a	53,60 ± 1,7 ^a	0,54 ± 0,1 ^c	98,23 ± 1,1 ^a	3,42 ± 0,2 ^c	52,80 ± 3,8 ^b	12,80 ± 0,1 ^b	12,87 ± 0,0 ^a
	Marupá I	69,9 ± 1,4 ^a	4,57 ± 0,3 ^{ab}	2,53 ± 0,6 ^b	53,03 ± 0,5 ^b	0,60 ± 0,0 ^c	84,37 ± 2,5 ^b	3,79 ± 0,0 ^b	43,50 ± 5,8 ^c	13,27 ± 0,8 ^b	8,48 ± 0,7 ^c
	Marupá II	69,9 ± 0,4 ^a	4,04 ± 0,7 ^{bc}	2,89 ± 0,3 ^{ab}	51,15 ± 1,5 ^a	0,75 ± 0,0 ^b	70,12 ± 0,5 ^c	4,72 ± 0,2 ^c	55,40 ± 3,2 ^{ab}	12,02 ± 0,2 ^{bc}	9,18 ± 0,8 ^{ab}
	Marupá III	69,6 ± 1,6 ^a	5,21 ± 0,8 ^{ab}	3,11 ± 0,0 ^{ab}	51,73 ± 1,4 ^a	0,62 ± 0,1 ^c	83,50 ± 0,7 ^b	3,87 ± 0,2 ^a	59,40 ± 4,8 ^a	11,21 ± 0,4 ^c	10,39 ± 0,5 ^b
SAC - <i>Ganoderma</i> <i>lingzhi</i>	Açaí	5,92 ± 0,3 ^c	0,16 ± 0,0 ^{cb}	0,98 ± 0,4 ^d	47,56 ± 1,1 ^c	2,00 ± 0,0 ^a	23,78 ± 0,5 ^g	12,46 ± 0,0 ^a	51,00 ± 2,3 ^a	22,33 ± 1,4 ^a	5,74 ± 0,4 ^b
	Guaruba- cedro	6,13 ± 0,4 ^b	0,18 ± 0,0 ^b	4,43 ± 0,1 ^a	50,06 ± 0,3 ^a	1,18 ± 0,0 ^b	42,42 ± 0,3 ^c	7,30 ± 0,0 ^b	38,22 ± 0,9 ^e	13,08 ± 0,1 ^b	8,39 ± 0,5 ^a
	Marupá I	5,22 ± 0,4 ^d	0,27 ± 0,0 ^a	2,27 ± 0,0 ^b	48,58 ± 0,4 ^b	0,69 ± 0,0 ^c	71,44 ± 0,7 ^b	4,34 ± 0,0 ^c	37,69 ± 0,3 ^f	11,94 ± 0,2 ^c	6,43 ± 0,5 ^{ab}
	Marupá II	3,70 ± 0,0 ^f	0,29 ± 0,0 ^a	2,33 ± 0,1 ^b	46,87 ± 0,4 ^d	0,62 ± 0,0 ^c	75,60 ± 0,6 ^a	3,93 ± 0,0 ^c	41,60 ± 0,7 ^d	11,90 ± 0,6 ^c	5,10 ± 0,2 ^b
	Marupá III	6,18 ± 0,4 ^b	0,26 ± 0,0 ^a	2,31 ± 0,0 ^b	47,31 ± 0,5 ^c	0,68 ± 0,0 ^c	69,57 ± 0,9 ^b	4,25 ± 0,0 ^c	40,83 ± 0,2 ^d	12,00 ± 0,0 ^b	6,04 ± 0,8 ^{ab}
SAC- <i>Ganoderma</i> sp.	Açaí	6,08 ± 0,2 ^b	0,11 ± 0,0 ^d	1,28 ± 0,1 ^c	49,48 ± 0,0 ^b	1,15 ± 0,0 ^b	42,02 ± 0,0 ^c	7,25 ± 0,0 ^b	52,17 ± 1,0 ^a	20,87 ± 1,1 ^a	3,99 ± 1,9 ^b
	Guaruba- cedro	6,34 ± 0,1 ^b	0,15 ± 0,0 ^{bc}	4,84 ± 0,7 ^a	49,25 ± 0,4 ^b	1,37 ± 0,0 ^b	15,48 ± 0,1 ^h	8,58 ± 0,0 ^b	45,48 ± 0,2 ^c	14,05 ± 0,1 ^b	5,05 ± 1,1 ^b
	Marupá I	4,82 ± 0,0 ^e	0,15 ± 0,0 ^{bc}	2,74 ± 1,0 ^b	47,19 ± 2,1 ^c	1,17 ± 0,0 ^b	40,33 ± 1,6 ^d	7,34 ± 0,3 ^b	48,99 ± 0,8 ^b	11,78 ± 0,6 ^c	3,96 ± 0,4 ^b
	Marupá II	4,90 ± 0,1 ^d	0,26 ± 0,0 ^a	1,75 ± 0,0 ^c	42,61 ± 0,0 ^e	1,18 ± 0,0 ^b	36,11 ± 1,3 ^e	7,42 ± 0,2 ^b	40,83 ± 0,2 ^d	12,00 ± 0,2 ^b	6,04 ± 0,8 ^{ab}
	Marupá III	6,89 ± 0,0 ^a	0,30 ± 0,0 ^a	2,25 ± 0,1 ^b	52,00 ± 0,4 ^a	1,26 ± 0,0 ^b	26,53 ± 0,6 ^f	7,89 ± 0,2 ^b	49,72 ± 1,4 ^a	12,31 ± 0,9 ^b	4,26 ± 0,5 ^b

Média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas com 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$), no tratamento de SI e entre os tratamentos de SAC de *G. lingzhi* e *Ganoderma* sp.

O teor de nitrogênio nos SI, assim como verificado para o carbono, apresentou baixa variação, com um aumento em SAC, principalmente em guarubacetro e açaí no cultivo de *Ganoderma* sp., mostrando um aumento no teor de nitrogênio, em relação aos teores nos SI. (**Tabela 6**). Embora a presença de nitrogênio no substrato de cultivo de cogumelos seja indispensável para a síntese de aminoácidos e proteínas, alguns estudos mostram que altas concentrações podem inibir a produção de enzimas degradadoras de lignina por esses fungos, tendo um efeito negativo no crescimento micelial (Figueiró e Gracioli, 2011). Além disso, o aumento no teor de nitrogênio nos SAC pode estar associado à presença de micélio, composto por quitina na parede celular, além de proteínas do metabolismo fúngico durante a fermentação (Öztürk e Atila, 2021).

A relação C:N nos substratos iniciais (SI) variou de 47,96 a 98,23, enquanto nos SAC variou de 15,48 a 75,60, com as maiores reduções observadas após o cultivo de *Ganoderma* sp. (**Tabela 6**). A faixa ideal de C:N para a produção de cogumelos varia de acordo com a cepa utilizada, e o valor de C:N no substrato após o cultivo dos cogumelos é influenciado pelo teor de C e N, que é modificado por variações nos valores de lignina, celulose, hemicelulose e minerais após o crescimento do fungo (Chen et al., 2021).

O maior valor de proteínas totais nos SI foi observado para o resíduo de açaí, com um teor de 6,66%. Após o cultivo de *G. lingzhi*, houve um aumento no teor de proteínas, exceto nos substratos compostos por marupá I, II e III (**Tabela 6**). A quantidade de proteínas nos substratos de cultivo está relacionada ao teor de nitrogênio presente na composição dos resíduos lignocelulósicos, enquanto a quantidade de carboidratos está diretamente relacionada à composição percentual dos outros elementos (umidade, cinzas, lipídios, fibras e proteínas). Assim, se algum desses elementos apresentar valores elevados, isso influenciará a quantidade de carboidratos e, consequentemente, reduzirá a fonte de energia para o crescimento e desenvolvimento do fungo (Carrasco et al., 2017; Zhai; Han, 2018).

Os SI apresentaram teores de celulose da ordem de 50%, com reduções nos SAC, exceto nos substratos compostos por açaí e marupá I após o crescimento de *Ganoderma* sp. (**Tabela 6**). Variações no teor de celulose nos resíduos iniciais e pós-cultivo podem estar relacionadas às características da biomassa utilizada como base do substrato de cultivo, uma vez que as diferentes características das fibras

celulósicas, como grau de polimerização, tamanho de partícula e área de superfície, influenciam a eficácia da hidrólise enzimática pelo fungo (Andlar et al., 2018). Quanto à baixa ou ausência de degradação da celulose em alguns SAC, isto pode estar associada à preferência de fungos de podridão-branca, como *Ganoderma* spp., na hidrólise da lignina (Qi et al., 2023).

Aguiar et al. (2022), ao estudarem serragem de marupá, suplementada com farelo de milho, trigo e arroz, obtiveram um teor de celulose de 55,62%, com redução após o cultivo de *P. ostreatus*. Postemsky et al. (2017) cultivaram *G. lucidum* em cascas de arroz e encontraram um aumento no teor de celulose após o crescimento do fungo, sugerindo que essa espécie tem preferência por degradar hemicelulose, tornando viável o uso de determinados substratos residuais em bioprocessos com derivados de celulose (biopolpa, biocombustíveis, ração animal etc.).

Os SI apresentaram valores de lignina entre 4,08% e 12,90%, com destaque para guaruba-cedro (**Tabela 6**). Resultados semelhantes são relatados por Atila (2020), que obteve valores de lignina de 5,90% e 10,10% ao usar palha de trigo, farinha de girassol, farelo de algodão e palha de feijão como substratos para o cultivo de *G. lucidum*. Stajić et al. (2022) encontraram valores de deslignificação entre 14,21% e 50,45% ao cultivar *G. lucidum* e *G. tsugae* em diferentes substratos.

A composição do substrato após o cultivo dos cogumelos é resultado das necessidades nutricionais das espécies fúngicas cultivadas e da diversidade de materiais utilizados (por exemplo, palha de trigo e arroz, palha de algodão, bagaço de cana-de-açúcar, serragem, polpa e casca de frutas, folhas de banana, polpa de café, entre outros) (Saad et al., 2017). Assim, durante o crescimento e desenvolvimento fúngico, ocorre a degradação dos substratos lignocelulósicos pela ação de enzimas secretadas pelo micélio fúngico, permitindo a conversão biológica dos substratos em uma fonte de energia para a formação de basidiomas (Du et al., 2021; Öztürk; Atila, 2021).

Características ultraestruturais de SI e SAC

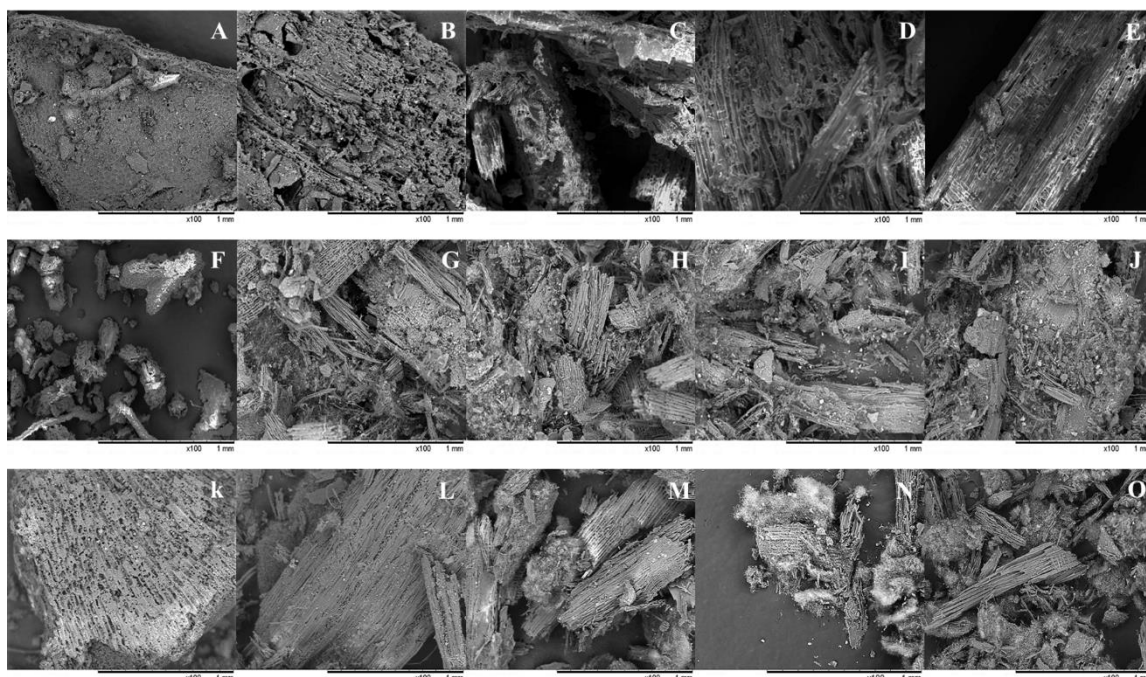
Os substratos iniciais (SI) apresentaram fibras intactas e características particulares de cada resíduo lignocelulósico (**Fig. 15-A-E**). O substrato à base de açaí (**Fig. 15-A**) apresentou estrutura rígida, densa e mais lisa em comparação aos

demais substratos, sem sinais de afrouxamento das fibras, contendo algumas rupturas e a presença de partículas de tamanhos e formatos diferentes, o que pode ser atribuído ao processo de moagem do resíduo e atrito das partículas (Barbosa et al., 2019). As saliências encontradas provavelmente são devidas às características rugosas da fibra vegetal (Nascimento et al., 2012). Além disso, foram encontradas estruturas porosas e esféricas obstruídas por grânulos centralizados, semelhantes à estrutura relatada por Mesquita et al. (2013) e Martins et al. (2021), chamadas de canais de poços, compostos de sílica, que podem ser encontrados tanto em superfícies internas quanto externas (Martins et al., 2021).

Os substratos à base de guaruba-cedro, marupá I, II e III (**Fig. 15 - B, C, D e E**) apresentaram uma estrutura mais fina, pontiaguda e fibrosa, típica de fibras lignocelulósicas, com um padrão de organização perceptível e ausência de poros irregulares. Esse padrão possivelmente está relacionado à presença de ligações de hidrogênio intracelulares entre celulose e um constituinte de microfibrilas ordenadas de hemicelulose e lignina, favorecendo uma estrutura recalcitrante de degradação (Brandt et al., 2013; Badgujar; Bhanage, 2015; Zabed et al., 2016; Alayoubi et al., 2020).

Após o cultivo das duas espécies de *Ganoderma*, os SAC apresentaram sinais visíveis de degradação da biomassa lignocelulósica, possivelmente devido à ação de enzimas lignocelulolíticas produzidas pelas hifas fúngicas, causando a degradação da estrutura lignocelulósica e resultando na formação de poros nos substratos (**Fig. 15 - F-O**). Após o cultivo de *Agaricus bisporus*, os substratos apresentaram rachaduras e tamanhos reduzidos, indicando a degradação da parede celular vegetal (Palangi et al., 2022).

Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos substratos iniciais (SI) e substratos de cogumelos gastos (SCG) de *Ganoderma lingzhi* e *Ganoderma* sp, com ampliação de 100x.



SI: (A) Açai; (B) Guaruba-cedro; (C) Marupá I; (D) Marupá II e (E) Marupá III. ***G. lingzhi* SAC:** (F) Açai; (G) Guaruba-cedro; (H) Marupá I; (I) Marupá II and (J) Marupá III. ***Ganoderma* sp. SAC:** (K) Açai; (L) Guaruba-cedro; (M) Marupá I; (N) Marupá II e (O) Marupá III.

A desorganização do arranjo microfibrilar do resíduo vegetal é devida ao afrouxamento das fibras, resultante da degradação da lignocelulose (Grimaldi et al., 2015). Além disso, a característica de maior espaçamento entre as fibras, observada nos substratos à base de serragem de marupá, sugere que esse resíduo é mais facilmente hidrolisado pelo fungo (Palangi et al., 2022).

Índice de Cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX)

Na análise de DRX dos SI e SAC, para 2θ aproximadamente a 16° , foi observado o plano cristalográfico 101 e, para 2θ a 22° , o plano cristalográfico 002, típicos da celulose do tipo I (**Fig. 16 - A, B e C**), classificados como regiões amorfa e cristalina da celulose, respectivamente (Suman et al., 2022). De acordo com Zhao et al. (2012), a celulose cristalina é mais recalcitrante ao ataque microbiano e enzimático em comparação com a amorfa.

O índice de cristalinidade relativa (ICr) indica a quantidade de compostos celulósicos, onde a fase cristalina do material é representada pela altura do pico mais alto, em torno de $2\theta = 22^\circ$, e a fase amorfa em torno de $2\theta = 16^\circ$, referente à

altura mínima. Assim, esses fatores são importantes na determinação das propriedades mecânicas, como tração e flexão, do material lignocelulósico em SI e SAC após o crescimento de *G. lingzhi* e *Ganoderma* sp.

A análise do ICr confirma a coexistência de regiões ordenadas e desordenadas (cristalinas e amorfas, respectivamente) no mesmo modelo morfológico. Assim, o ICr foi calculado para SI e SAC, sendo verificada uma tendência de redução no percentual após o crescimento das duas espécies de *Ganoderma* (**Tabela 7**). Essa redução sugere uma alteração na cristalinidade, causada pela hidrólise enzimática proveniente do metabolismo fúngico.

No SAC após o crescimento de *Ganoderma* sp., observou-se uma redução maior do ICr em comparação com *G. lingzhi* (**Tabela 7**). Essa diminuição pode estar associada à maior eficiência do complexo enzimático lignocelulolítico excretado por esse fungo, causando uma maior degradação dos substratos.

A redução do ICr entre os substratos iniciais e pós-cultivo está associada ao aumento da fragilidade da parede celular, devido ao ataque de micro-organismos celulolíticos (Hu et al., 2012). Pesquisas já mostraram que não há apenas uma redução no ICr dos substratos pós-cultivo, mas pode haver um aumento ou até mesmo nenhuma alteração após a degradação por fungos de podridão branca (Shirkavand et al., 2016). Assim, não há um padrão quanto ao ICr, podendo variar de acordo com a espécie de fungo cultivada e as características dos diferentes substratos (Chen et al., 2022).

Bala e Singh (2019), ao estudar diferentes pré-tratamentos (físicos, químicos e biológicos) na conversão de biomassa lignocelulósica por meio de *Saccharum munja* e *S. officinarum*, observaram que a hidrólise enzimática reduziu o ICr da celulose. Pré-tratamentos biológicos envolvem o uso de micro-organismos, incluindo fungos, para degradar ou induzir mudanças na biomassa.

Fungos de podridão branca degradam eficientemente a lignina por meio de seu sistema enzimático ligninolítico não específico oxidativo, composto principalmente de lacases e várias peroxidases, sendo responsáveis pela solubilização da celulose cristalina e sua transformação em celulose amorfa, com menor hidrofobicidade (Shirkavand et al., 2016). No entanto, a eficiência da degradação da biomassa depende das condições do processo (Nájera-Martínez et al., 2022). Assim, sugere-se que o SAC obtido após o crescimento de *G. lingzhi* e

Ganoderma sp. possa ser aplicado na produção de painéis de aglomerado, ração animal, bioetanol e açúcares fermentáveis (Corral-Bobadilha et al., 2019).

Figura 16 - Difratomogramas dos substratos iniciais - SI (A) e após o cultivo - SAC de *Ganoderma linghizi* (B) e *Ganoderma* sp. (C). (a) Açaí; (b) Guaruba-cedro; (c) Marupá I; (d) Marupá II; (e) Marupá III.

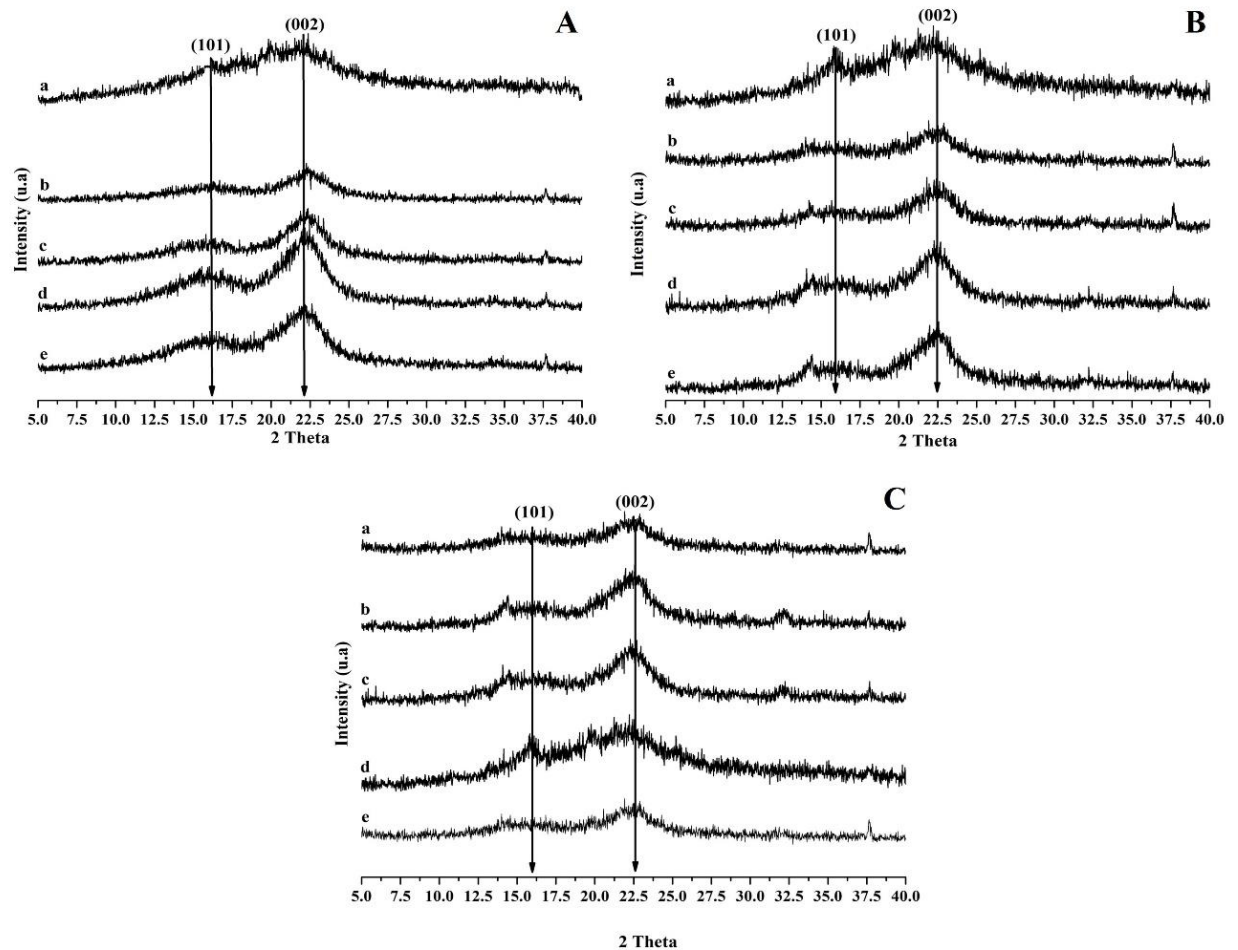


Tabela 7 - Índice de Cristalinidade (CI) por Difração de Raios-X dos substratos iniciais (SI) e após o cultivo (SAC) de *Ganoderma lingzhi* e *Ganoderma* sp.

Substrato	Espécies	Substrato	CI (%)
SI	-	Açaí	50,00
		Guaruba cedro	57,50
		Marupá I	50,00
		Marupá II	49,46
		Marupá III	44,44
SAC	<i>Ganoderma lingzhi</i>	Açaí	40,00
		Guaruba cedro	42,85
		Marupá I	43,24
		Marupá II	48,94
		Marupá III	43,47
	<i>Ganoderma</i> sp.	Açaí	37,68
		Guaruba cedro	40,00
		Marupá I	40,51
		Marupá II	36,36
		Marupá III	41,93

6.6 CONCLUSÃO

Os resíduos regionais amazônicos apresentaram diferentes características físico-químicas, no entanto, todos demonstraram bom potencial como suporte para o desenvolvimento de *Ganoderma* sp. e *G. lingzhi*. Alterações na estrutura das fibras dos substratos após o crescimento dos fungos foram observadas, sendo um processo de bioconversão que permite a aplicação dessas biomassas em diferentes áreas, como alimentação animal, engenharia civil e formulação de biocomposto, com destaque para aqueles provenientes do cultivo do *Ganoderma* sp. (linhagem isolada na Amazônia), que apresentou o maior potencial biológico na biotransformação dos resíduos lignocelulósicos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L. V. B. *et al.* Physico-chemical characterization of lignocellulosic wastes used in the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. **Conjecturas**, vol. 22, no. 14, p. 311 - 332, 2022.
- ALAYOUBI, R. *et al.* Low temperature ionic liquid pretreatment of lignocellulosic biomass to enhance bioethanol yield. **Renewable Energy**, vo. 145, p. 1808 - 1816, 2020.
- ANDLAR, M. *et al.* Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. **Engineering in Life Sciences**, vol. 18, no. 11, p. 768 - 778, 2018.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of A.O.A.C. International. 16a. ed. 3a. rev. A.O.A.C. **International**. Gaithersburg, MD, 1997.
- ATILA, F. Comparative study on the mycelial growth and yield of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) Karst. on different lignocellulosic wastes. **Acta Ecologica Sinica**, vol. 40, no. 2, p. 153 - 157, 2020.
- BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Factors governing dissolution process of lignocellulosic biomass in ionic liquid: Current status, overview and challenges. **Bioresource technology**, vol. 178, p. 2-18, 2015.
- BALA, A. SINGH, B. Development of an environmental-benign process for efficient pretreatment and saccharification of *Saccharum* biomasses for bioethanol production. **Renewable energy**, vol. 130, p. 12-24, 2019.
- BARBOSA, A. M. *et al.* Caracterização de partículas de açaí visando seu potencial uso na construção civil. **Matéria (Rio de Janeiro)**, vol. 24, 2019.
- BASSO, V. *et al.* Chemical features and antioxidant profile by *Schizophyllum commune* produced on different agroindustrial wastes and byproducts of biodiesel production. **Food chemistry**, vol. 329, p. 127 - 189, 2020.
- BHARDWAJ, A., KSHIPRA, M. 2018. *Ganoderma* sp.: The Royal Mushroom for High-Altitude Ailments, in: Misra, K., Sharma, P., Bhardwaj, A. (Eds), Management of High Altitude Pathophysiology, **Academic Press**, p. 115-152.
- BLIGH, E.G. DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification, Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37, 911–917, 1959.
- BRANDT, A. *et al.* Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green chemistry**, vol. 15, no. 3, p. 550 - 583, 2013.
- CARRASCO, G. J. A.; SERNA, S. S. O.; GUTIÉRREZ, U. J. A. Nutritional composition and nutraceutical properties of the *Pleurotus* fruiting bodies: Potential

use as food ingredient. **Journal of Food Composition and Analysis**, vol. 58, p. 69 - 81, 2017.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. 2004. Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value Medicinal Effect and Environmental Impact, second ed. **CRC Press**, Boca Raton.

CHEN, Y. *et al.* Effect of wheat bran and maize straw substrates on the agronomic traits and nutritional content of *Auricularia cornea* cv. Yu Muer. **Scientia Horticulturae**, vol. 286, p. 110 - 200, 2021.

CHIMINI, A.C. *et al.* Utilização de resíduo de cervejaria como substrato alternativo para a produção de *Ganoderma lucidum*. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, vol. 14, no. 2, p. 483 - 492, 2021.

CHINTHANOM, P. *et al.* Lanostane triterpenoids from cultivated fruiting bodies of *Ganoderma sichuanense*: Determination of the C-25 absolute configuration of ganoderic acid A and its derivatives using the phenylglycine methyl ester (PGME) method. **Phytochemistry**, vol. 192, p. 112 - 963, 2021.

CORRAL, M. B. *et al.* Bioremediation of waste water to remove heavy metals using the spent mushroom substrate of *Agaricus bisporus*. **Water**, vol. 11, no. 3, p. 454, 2019.

DU, F. *et al.* Maximizing the value of *Korshinsk peashrub* branches by the integration of *Pleurotus tuoliensis* cultivation and anaerobic digestion of spent mushroom substrate. **Renewable Energy**, vol. 179, p. 679 - 686, 2021.

FIGUEIRÓ, G. G.; GRACIOLLI, L. A. Influência da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*. **Ciência e Agrotecnologia**, vol. 35, p. 924 - 930, 2011.

FRAILE, R. *et al.* Differences in antioxidants, polyphenols, protein digestibility and nutritional profile between *Ganoderma lucidum* from industrial crops in Asia and *Ganoderma lucidum* from cultivation and Iberian origin. **Foods**, vol. 10, no. 8, p. 1750, 2021.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, vol. 64, no. 2, p. 149 - 154, 2005.

GRIMALDI, M. P. *et al.* Evaluation of lime and hydrothermal pretreatments for efficient enzymatic hydrolysis of raw sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 8, no. 1, p. 1 - 14, 2015.

HUSSAIN, I. *et al.* Preparation and physicochemical characterisation of polyurethane foams prepared using hydroxybutylated condensed tannins as a polyol source. **Industrial Crops and Products**, vol. 154, p. 112 - 636, 2020.

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

IVARSSON, E. *et al.* Use of faba bean (*Vicia faba* L.) hulls as substrate for *Pleurotus ostreatus*–Potential for combined mushroom and feed production. **Journal of Cleaner Production**, vol. 313, p. 127 - 969, 2021.

JORGE, F. T. A.; DA SILVA, A. S.; BRIGAGÃO, G. V. 2022. Açaí waste valorization via mannose and polyphenols production: techno-economic and environmental assessment. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-14.

KUMLA, J. *et al.* Cultivation of mushrooms and their lignocellulolytic enzyme production through the utilization of agro-industrial waste. **Molecules**, vol. 25, no. 12, p. 2811, 2020.

LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. **Progress in polymer science**, vol. 39, no. 7, p. 1266 - 1290, 2014.

MADADI, M.; ABBAS, A. Lignin degradation by fungal pretreatment: a review. **J Plant Pathol Microbiol**, vol. 8, no. 2, p. 1 - 6, 2017.

MARTÍNEZ, E. J. *et al.* New biofuel alternatives: integrating waste management and single cell oil production. **International journal of molecular sciences**, vol. 16, no. 5, p. 9385 - 9405, 2015.

MARTINS, L. S. *et al.* Insight on açaí seed biomass economy and waste cooking oil: Eco-sorbent castor oil-based. **Journal of Environmental Management**, vol. 293, p. 112 - 803, 2021.

MELANOURI, E. M.; DEDOUSI, M.; DIAMANTOPOULOU, P. Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part I: Screening for growth, endoglucanase, laccase and biomass production in the colonization phase. **Carbon Resources Conversion**, vol. 5, no. 1, p. 61 - 70, 2022.

MESQUITA, A. L. Estudos de processos de extração e caracterização das fibras do fruto de açaí (*Euterpe Oleraceae* Mart.) da Amazônia para produção de ecopainel de partículas homogêneas de média densidade. **Belém: Faculdade de Engenharia Química-Instituto de Tecnologia-Universidade Federal do Pará**, 2013.

NÁJERA, M. E. F. *et al.* Lignocellulosic residues as supports for enzyme immobilization, and biocatalysts with potential applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 208, p. 748 - 759, 2022.

NASCIMENTO, D. C. O. *et al.* Studies on the characterization of piassava fibers and their epoxy composites. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, vol. 43, no. 3, p. 353 - 362, 2012.

OTIENO, O. D. *et al.* 2022. Utilization of fruit waste substrates in mushroom production and manipulation of chemical composition. Biocatal. **Agric. Biotechnol.** Vol. 39, p. 102 - 250.

OWAID, M. N., ABED, I. A., AL-SAEEDI, S. S. S. Applicable properties of the bio-fertilizer spent mushroom substrate in organic systems as a byproduct from the cultivation of *Pleurotus* spp. **Information Processing in Agriculture**, vol. 4, no. 1, p. 78 - 82, 2017.

ÖZTÜRK, C.; ATILA, F. Changes in lignocellulosic fractions of growing substrates during the cultivation of *Hypsizygus ulmarius* mushroom and its effects on mushroom productivity. **Scientia Horticulturae**, vol. 288, p. 110 - 403, 2021.

PALANGI, V. *et al.* Ecofriendly usability of mushroom cultivation substrate as a ruminant feed: Anaerobic digestion using gas production techniques. **Animals**, vol. 12, no. 12, p. 1583, 2022.

PANSERA, M. R. *et al.* Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Farmacogn.** Vol. 13 (1), p. 17 - 22, 2003.

PARANI, K.; EHYNI, M. Preliminary studies of white rot fungi, brown rot fungi and soft rot fungi for coffee pulp degradation. **Asian Journal of Biological and Life Sciences**, vol. 1, no. 1, p. 45 - 50, 2012.

POSTEMSKY, P. D. *et al.* Pilot-scale bioconversion of rice and sunflower agro-residues into medicinal mushrooms and laccase enzymes through solid-state fermentation with *Ganoderma lucidum*. **Bioresource technology**, vol. 231, p. 85 - 93, 2017.

QI, J. *et al.* Fungal Selectivity and Biodegradation Effects by White and Brown Rot Fungi for Wood Biomass Pretreatment. **Polymers**, vol. 15, no. 8, p. 19 - 57, 2023.

RAINERT, K. T. *et al.* Decolorization of the synthetic dye Remazol Brilliant Blue Reactive (RBBR) by *Ganoderma lucidum* on bio-adsorbent of the solid bleached sulfate paperboard coated with polyethylene terephthalate. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, vol. 9, no. 2, p. 104 - 990, 2021.

REIS, A. R. S. *et al.* Anatomia do xilema secundário de sete espécies de *Vochysia* Aubl.(Vochysiaceae), conhecidas como quaruba no estado do Pará, Brasil. *Biota Amazônia*, vol. 5 (2), p. 45 - 51, 2015.

RATHORE, H.; PRASAD, S.; SHARMA, S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. **PharmaNutrition**, vol. 5 (2), p. 35 - 46, 2017.

SAAD, A. L. M. *et al.* Aproveitamento de resíduos agrícolas no cultivo do cogumelo medicinal *Ganoderma lucidum* utilizando a tecnologia chinesa “JunCao”. *Ambiência, Guarapuava*, vol. 13, no. 3, p. 271 - 283, 2017.

SADH, P. K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, vol. 5, no. 1, p. 1 - 15, 2018.

SALES-CAMPOS, C. et al. Cultivo experimental de Basidiomicetos causadores de podridão branca da região Amazônica em diferentes substratos. *Rev. em Agronegocio e Meio Ambient.* Vol. 15 (1), p. 193 - 206, 2022.

SEGAL, L. et al. Opportunity for New Developments in All Phases of Textile Manufacturing. Literature Cited an Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-ray Diffractometer. **Apparel Manufacturing**, vol. 43, p. 15, 1952.

SHIRKAVAND, E. et al. Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment—a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 54, p. 217 - 234, 2016.

SOUSA, W. C. S. et al. Wood colorimetry for the characterization of Amazonian tree species: A subsidy for a more efficient classification. **Cerne**, vol. 25, p. 451 - 462.

STAJIĆ, M. et al. *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*—a well-known lignin degrading species as transformers of insufficiently utilized lignocellulosic waste. **Cellulose Chemistry and Technology**, vol. 56, no. 5-6, p. 593 - 601, 2022.

SUDHAKAR, M. P.; RAVEL, M.; PERUMAL, K. Pretreatment and process optimization of bioethanol production from spent biomass of *Ganoderma lucidum* using *Saccharomyces cerevisiae*. **Fuel**, vol. 306, p. 121 - 680, 2021.

SUMAN, S. K. et al. Jute sticks biomass delignification through laccase-mediator system for enhanced saccharification and sustainable release of fermentable sugar. **Chemosphere**, vol. 286, p. 131 - 687, 2022.

TEDESCO, M. J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Ufrgs, 1995.

VAN SOEST, P. J. 1990. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **J AOAC Int**, vol. 73 (4), p. 491 - 497.

VAN SOEST, P. J., WINE, R. H. 1968. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. **J AOAC Int**, vol. 51 (4), p. 780 - 785.

VIEZZER, M. R. Z. et al. Uso de Resíduo Madeireiro Amazônico na Fabricação de Tijolos de Solo-Cimento no Município de Alta Floresta—MT. **Rev. de Psicol.** Vol. 15 (58), p. 100 - 121, 2021.

ZABED, H. et al. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and sustainable energy reviews**, vol. 66, p. 751 - 774, 2016.

ZHAI, F. H.; HAN, J. R. Decomposition of asparagus old stalks by *Pleurotus* spp. under mushroom-growing conditions. **Scientia Horticulturae**, vol. 231, p. 11 - 14, 2018.

ZHAO, X. *et al.* Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, vol. 6, no. 5, p. 561 - 579, 2012.

ZHAO, Y. *et al.* Effect of actinobacteria agent inoculation methods on cellulose degradation during composting based on redundancy analysis. **Bioresource technology**, vol. 219, p. 196 - 203, 2016.

7. Capítulo 3

O EFEITO DE RESÍDUOS AMAZÔNICOS NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE ESPÉCIES DE GANODERMA

Paula Romenya dos Santos Gouvêa¹, Larissa Batista do Nascimento Soares², Vítor Alves Pessoa¹, Sérgio Dantas de Oliveira Júnior³, Lorena Vieira Bentolila de Aguiar³, Larissa Ramos Chevreuil^{3*}, Ceci Sales-Campos³

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, Universidade do Estado do Amazonas, Amazonas, Brasil

³ Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Amazonas, Brasil

7.1 RESUMO

Ganoderma spp. despertam grande interesse devido às suas propriedades medicinais e farmacológicas. Esses cogumelos têm sido cultivados artificialmente em uma variedade de resíduos lignocelulósicos, apresentando diferentes propriedades a serem exploradas. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito de diferentes resíduos Amazônicos sobre a produção e a composição de *Ganoderma* sp. (isolado na Amazônia) e *G. lingzhi* (linhagem comercial). Os fungos foram cultivados em resíduos de sementes de açaí e serragem guaruba-cedro e de três diferentes lotes de marupá (I, II e III). A produtividade foi avaliada a partir da eficiência biológica (EB), rendimento (R) e perda de matéria orgânica (PMO). Também foi analisada a composição centesimal dos basidiomas produzidos. Os fungos exibiram maiores parâmetros produtivos quando cultivado em marupá I ($7,85 \pm 4,1\%$). Contudo, o maior R% foi observado em serragem de guaruba-cedro ($3,81 \pm 1,4\%$), com valores inferiores a 10%. Quanto à composição centesimal, *Ganoderma* sp. exibiu maiores teores de carbono em média (47,10 g/100%), nitrogênio com média (8,28 g/100%), proteínas com média (36,03 g/100%), e fibras totais com média (36,96 g/100%), enquanto *G. lingzhi* apresentou maiores valores de umidade, carboidratos totais em média (72,13 g/100%), e valor energético (390 g/100%). Em relação aos substratos de cultivo, o resíduo de açaí proporcionou maior síntese de proteínas para ambos os fungos. A composição elementar dos basidiomas demonstrou altos teores de oxigênio, carbono, potássio e fósforo e, menores concentrações de cálcio, magnésio, silício, enxofre e alumínio. Diante do exposto, apesar de os fungos não terem exibido bons parâmetros produtivos em termos aceitáveis de produção em larga escala, a espécie *Ganoderma* sp., isolada na Amazônia, exibiu altos teores de proteínas, sugerindo um potencial promissor tanto para fins comerciais, quanto medicinais e nutricionais, especialmente quando cultivado em resíduos de açaí.

Palavras-chaves: Basidiomicetos; Fermentação em Estado Sólido; Eficiência Biológica; Análise Físico-química; Micronutrientes.

7.2 ABSTRACT

Ganoderma species are of great interest due to their medicinal and pharmacological properties. These mushrooms have been artificially cultivated on various lignocellulosic residues, exhibiting different properties that can be explored. The aim of this study was to investigate the effect of different Amazonian residues on the production and composition of *Ganoderma* sp. (isolated in the Amazon) and *G. lingzhi* (commercial strain). The fungi were cultivated on residues from acai seeds, guaruba-cedro sawdust, and three different batches of marupa (I, II, and III). Productivity was evaluated based on biological efficiency (BE), yield (Y), and loss of organic matter (LOM). The proximate composition of the produced basidiocarps was also analyzed. The fungi displayed higher productivity parameters when cultivated on marupa I ($7.85 \pm 4.1\%$). However, the highest Y% was observed in guaruba-cedro sawdust ($3.81 \pm 1.4\%$), with values below 10%. Regarding the proximate composition, *Ganoderma* sp. exhibited higher average levels of carbon (47.10 g/100%), nitrogen (8.28 g/100%), total protein (36.03 g/100%), and total fiber (36.96 g/100%), while *G. lingzhi* had higher values of moisture, average total carbohydrates (72.13 g/100%), and energy value (390 g/100%). Concerning the cultivation substrates, the acai residue led to higher protein synthesis for both fungi. The elemental composition of the basidiocarps showed high levels of oxygen, carbon, potassium, and phosphorus, and lower concentrations of calcium, magnesium, silicon, sulfur, and aluminum. In conclusion, despite the fungi not exhibiting favorable productivity parameters for large-scale production, the species *Ganoderma* sp. isolated in the Amazon displayed high protein levels, suggesting promising potential for both commercial, medicinal, and nutritional purposes, especially when cultivated on acai residues.

Keywords: Basidiomycetes; Solid-state Fermentation; Biological Efficiency; Physicochemical Analysis; Micronutrients.

7.3 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Ganoderma* compreendem fungos basidiomicetos amplamente reconhecidos nas culturas tradicionais asiáticas como fontes de biomoléculas com propriedades medicinais, atraindo atenção mundial (Kurd-Anjaraki et al., 2022; Sułkowska-Ziaja et al., 2022). As bioatividades de *Ganoderma* spp. estão associadas à presença de polissacarídeos, triterpenos, flavonoides, alcaloides, esteroides, ácidos graxos insaturados, proteínas, aminoácidos, enzimas, vitaminas e minerais (Ekiz et al., 2023). Estudos relatam que as espécies desse gênero, quando cultivadas em condições controladas, apresentam um perfil medicinal mais significativo em comparação aos basidiomas coletados na natureza (El Sheikha, 2022).

Espécies de *Ganoderma* têm sido cultivadas em grande escala utilizando resíduos agrícolas como arroz, trigo, cevada, aveia, feijão, milho e soja como substratos. Nesse processo fermentativo, o cogumelo é formado a partir da degradação dos componentes estruturais desses resíduos por enzimas lignocelulolíticas específicas, excretadas pelos fungos durante o seu crescimento micelial (Elisashvili, 2012; Sales-Campos; Chevreuil., 2019).

A utilização de resíduos localmente disponíveis no cultivo de cogumelos não apenas reduz os custos de produção, mas também contribui para a reciclagem de substratos descartados na região, resultando em uma prática sustentável de redução do impacto ambiental. No Amazonas, Brasil, existem diversos resíduos com potencial para serem usados como substratos de cultivo de cogumelos, como açaí (*Euterpe* sp.), guaruba-cedro (*Vochysia maxima*) e marupá (*Simarouba amara*) (Aguiar et al., 2022).

O açaí é uma palmeira nativa da floresta amazônica, altamente valorizada por seus benefícios para a saúde humana. No entanto, durante o processamento do fruto para obtenção da polpa (suco), aproximadamente 90% do fruto é descartado, gerando um grande volume de resíduos (Boeira et al., 2020; Barros et al., 2021). O guaruba-cedro corresponde a uma espécie madeireira de distribuição neotropical e é amplamente utilizado na indústria madeireira local, principalmente na construção (Reis et al., 2015; Ribeiro et al., 2019). O marupá é uma espécie arbórea encontrada em florestas tropicais e amplamente utilizada na fabricação de caixas, revestimentos

de madeira, palitos de fósforo, molduras, compensados e instrumentos musicais (Santos et al., 2021).

Nesse cenário, o objetivo deste estudo foi cultivar duas linhagens de *Ganoderma*, utilizando diferentes resíduos amazônicos e avaliar seus efeitos nos parâmetros produtivos e composição centesimal dos cogumelos, com o intuito de gerar um melhor aproveitamento das espécies amazônicas, principalmente para fins comerciais.

7.4 METODOLOGIA

Material biológico

As linhagens de (*G. lingzhi* CC22 e *Ganoderma* sp. N: 1962) foram obtidas da Coleção de Culturas de Micro-organismos de Interesse Agrossilvicultural, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Os resíduos de sementes de açaí (*Euterpe* sp.), guaruba-cedro (*Vochysia maxima*) e três lotes de marupá (*Simarouba amara*) foram coletados em feiras e madeireiras da cidade de Manaus, Amazonas, Brasil (3°06'06" S. 60°01'29" O).

Cultivo sólido

No preparo do *spawn*, discos de micélios de *Ganoderma* spp. oriundos de placas de Petri com BDA (Agar Batata Dextrose) foram transferidos para frascos contendo os resíduos (78%), suplementados com 20% de uma mistura de farelos (arroz, trigo e milho na proporção 60:20:20 (m/m/m), respectivamente, e acrescidos de 2% de CaCO₃, previamente autoclavados a 121 °C (Aguiar et al., 2022). Após a incubação desses frascos e colonização fúngica, 5% do *spawn* foi transferido para sacos de cultivo (preparados na mesma formulação do *spawn*) os quais foram incubados a 25 °C, 90% de umidade e fotoperíodo de 12 horas.

Avaliação dos parâmetros produtivos

A eficiência biológica foi usada para expressar a produção de basidiomas, a partir da conversão dos resíduos lignocelulósicos em basidiomas (Sales-Campos; Andrade, 2011), sendo calculada de acordo com a fórmula:

$$EB (\%) = \frac{\text{Massa fresca do cogumelo (g)}}{\text{Massa seca do substrato (g)}} \times 100$$

O rendimento em gramas por Kg de substrato foi calculado por:

$$R(\%) = \frac{\text{Massa fresca do cogumelo (g)}}{\text{Massa fresca do substrato (Kg)}} \times 100$$

A perda de matéria orgânica permite avaliar a decomposição do substrato pelo fungo (Sales-Campos; Andrade, 2011), sendo determinada pela seguinte fórmula:

$$PMO (\%) = \frac{\text{Massa seca do substrato inicial (g)} - \text{massa seca do substrato residual (g)}}{\text{Massa seca do substrato inicial (g)}} \times 100$$

Determinação físico-química e composição centesimal

O teor de umidade (U%) das amostras foi obtido por dessecação em estufa a 105 °C até a obtenção de massa constante, calculado a partir da diferença entre as massas inicial e final. A matéria seca (MS) foi obtida a partir da subtração da umidade (Ial, 2008), de acordo com as fórmulas:

$$U (\%) = \frac{\text{Massa inicial da amostra (g)} - \text{massa final da amostra (g)}}{\text{Massa inicial da amostra (g)}}$$

$$MS (\%) = 100 - U(\%)$$

O teor de cinzas foi obtido a partir da carbonização e calcinação de 1 g das amostras em mufla a 550 °C, até a obtenção de cinzas de cor clara a branca, em

cadinhos previamente tarados, sendo calculada por diferença da massa inicial e final, descontando a massa do cadinho (AOAC, 1997).

Para determinação dos lipídios totais, as amostras foram submetidas à extração a frio, em clorofórmio, metanol e água na proporção 10:20:8 (v/v/v), sob agitação durante 30 minutos e, posterior adição de solução de sulfato de sódio e clorofórmio, seguido de homogeneização para separação das fases. A fase contendo a fração metanólica foi descartada e, as fases restantes foram filtradas para separação do precipitado, seguido de secagem em estufa até a evaporação do clorofórmio (Bligh-Dyer, 1959). O teor de lipídios foi determinado através da fórmula:

$$L (\%) = \frac{\text{Massa dos lipídios (g)}}{\text{Massa da amostra (g)}} \times 4 \times 100$$

A determinação do teor de carbono foi obtida a partir do aquecimento a 60 °C de cada amostra, em Erlenmeyer contendo dicromato de potássio (10 mL) e ácido sulfúrico (10 mL). Após resfriamento, foram adicionados indicadores e, em seguida, procedeu-se a titulação das amostras, utilizando uma solução de sulfato ferroso amoniacal (Tedesco et al., 2005). O valor 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.

Para a análise do nitrogênio total foi aplicado o método de Kjeldahl, em bloco digestor em dois estágios de variação de temperatura, 1º estágio (50 °C a 200 °C com duração de 30 minutos cada estágio), 2º estágio (250 °C a 350 °C, com duração de 30 minutos cada estágio) as reações foram destiladas em destilador de nitrogênio, em meio básico (NaOH 35%) e o produto dessa destilação foi recolhido em Erlenmeyer contendo 25 mL solução de ácido bórico (g/L) com indicadores e, então, titulado com ácido clorídrico 0,1 N padronizado (Tedesco et al., 2005). A concentração de nitrogênio foi determinada conforme a fórmula:

$$N (\%) = \frac{V \times Fc \times 0.0014}{M}$$

Onde:

V = Volume de H₂SO₄ gasto na titulação

Fc = Fator de conversão;

M = Massa em grama da amostra.

O conteúdo de proteína de cada amostra foi obtido a partir da multiplicação do valor do nitrogênio total pelo fator de conversão correspondente à amostra, sendo o fator 4,38 utilizado para proteínas nos cogumelos (Furlani e Godoy, 2005).

A determinação dos carboidratos totais foi obtida pela diferença entre 100% o percentual de umidade, proteínas, lipídios e cinzas (Nepa, 2006).

$$CT (\%) = 100\% - \text{umidade} (\%) - \text{proteína bruta} (\%) - \text{lipídios} (\%) - \text{cinzas} (\%)$$

Os carboidratos disponíveis foram obtidos pela diferença entre 100% e a porcentagem de umidade, proteína bruta (PB), lipídios, cinza e fibras totais (FT) (Nepa, 2006).

$$CD (\%) = 100\% - \text{umidade} (\%) - PB (\%) - \text{lipídios} (\%) - \text{cinzas} (\%) - FT (\%)$$

Determinação de macro e microminerais

A técnica analítica de espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) foi utilizada na determinação dos macros (N, K, Ca, Mg, P e S) e microminerais (Cl, Fe, B, Mn, Zn, Cu e Mo).

O detector de EDS utilizado foi acoplado a um microscópio eletrônico de

varredura (MEV). Esse sistema se baseia no bombardeio da amostra com um feixe de elétrons de alta voltagem que, como consequência, emite raios X característicos de cada elemento químico presente nas amostras, permitindo caracterizar quimicamente o material analisado (Colpan et al., 2018).

Análise estatística

Os experimentos relacionados ao cultivo sólido das espécies de *Ganoderma* foram arranjados em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial composto por 2 espécies fúngicas (*G. lingzhi* e *Ganoderma* sp) e 5 resíduos (açaí, guaruba-cedro, marupá 1, marupá 2 e marupá 3). As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o software Statistic 7.0, e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

7.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parâmetros produtivos dos basidiomas

A eficiência biológica (EB) variou de 2,72% a 7,85%, sendo os valores mais baixos observados para as duas espécies de *Ganoderma* cultivadas em resíduo de açaí. A maior EB foi encontrada para *G. lingzhi* em marupá I e II. *G. lingzhi* apresentou maiores percentuais de rendimento (R%) em comparação a *Ganoderma* sp. Ambos os fungos apresentaram maiores R% quando cultivados no substrato à base de serragem de guaruba-cedro, com os valores obtidos para *G. lingzhi* cerca de 2,5 vezes maiores em comparação a *Ganoderma* sp (**Tabela 8**).

Não foi observada diferença estatística para a perda de matéria orgânica (PMO), exceto para o açaí, que apresentou os menores valores. *Ganoderma* sp. apresentou maior PMO quando cultivado em marupá I, sendo aproximadamente 14% superior em relação a *G. lingzhi* cultivado no mesmo resíduo (**Tabela 8**).

A avaliação da eficiência biológica (EB) é importante, pois expressa a capacidade dos fungos em converter o substrato de cultivo em basidiomas. *G. lucidum* cultivado em palha de aveia, palha de feijão, capim brachiaria, capim tifton e serragem de eucalipto, sob diferentes condições de suplementação com farelo de trigo, apresentou EB variando de 0,0 a 6,7%, com os resultados mais altos para

palha de feijão e capim tifton, suplementados com 20% de farelo de trigo (Carvalho et al., 2015). *G. lucidum* cultivado em resíduos agroflorestais apresentou EB variando de 21,0 a 31,5%, com destaque para a serragem de álamo (Atila, 2022).

G. carnosum cultivado em serragem de carvalho, cascas de amendoim e sabugos de milho suplementados com farelo de aveia apresentou EB de 3,98 a 15,05% (Baktemur et al., 2022). Basidiomas de *G. lucidum* cultivados em serragem de mangueira (*Mangifera indica*), suplementada com 20% de farelo de trigo, apresentaram EB de 42,86% (Mehta et al., 2014). A EB do presente estudo foi menor do que a maioria dos trabalhos citados, sugerindo que diferenças entre os resíduos utilizados, incluindo a composição e a estrutura das fibras (hemicelulose, celulose e lignina), podem influenciar o desenvolvimento e a penetração micelial, afetando a formação de basidiomas (Jeznabadi et al., 2016; 2017).

As linhagens de *Ganoderma* não alcançaram um rendimento (R%) lucrativo, pois para um bom índice, os valores devem ser superiores a 10%, considerando o peso dos cogumelos frescos em relação ao peso do substrato úmido (Siqueira et al., 2011). O baixo R% pode ser atribuído à compactação do substrato, uma vez que dificulta a troca de oxigênio, levando ao acúmulo de dióxido de carbono e, consequentemente, afetando o desenvolvimento dos basidiomas (Estrada, Pecchia, 2017). Esse parâmetro também pode ser influenciado pelas condições ambientais, pela espécie de cogumelo e até mesmo entre linhagens da mesma espécie (Rashad et al., 2019).

A perda de matéria orgânica (PMO) é uma alternativa promissora para reduzir a biomassa lignocelulósica no ambiente, bem como o desperdício desses materiais na agroindústria (Alquati et al., 2016). No entanto, neste estudo, não foi observada uma correlação direta entre PMO e BE para as duas linhagens de *Ganoderma*.

G. lucidum cultivado em serragem de eucalipto e palha de cana-de-açúcar mostrou uma correlação direta entre PMO (52,79%) e BE (47,37%) (Saad et al., 2017). No entanto, as duas variáveis nem sempre estão correlacionadas, uma vez que a PMO corresponde à decomposição do substrato, enquanto a EB se refere à conversão do substrato em massa de cogumelo, sem considerar a matéria orgânica perdida pela liberação de CO₂ e H₂O durante a respiração fúngica (Zadrazil, Kurtzman, 1982; Rashad et al., 2019).

A produção de cogumelos utilizando resíduos lignocelulósicos como substrato de crescimento é responsável por agregar valor a esses materiais subutilizados e reduzir o impacto ambiental causado pelo descarte inadequado, além de fornecer uma renda complementar aos produtores rurais (Almeida et al., 2018). No entanto, vários fatores afetam a produção de cogumelos e sua composição nutricional, como genética, origem, composição do substrato, condições de crescimento, aclimação e estágio de desenvolvimento dos basidiomas (Wang et al., 2015).

Tabela 8 - Parâmetros produtivos de *Ganoderma lingzhi* e *Ganoderma* sp. cultivados em diferentes substratos lignocelulósicos.

Linhagens	Substratos	Eficiência biológica (%)	Rendimento (%)	Perda de matéria orgânica (%)
<i>G. lingzhi</i>	Açaí	2,72 ± 1,8 ^{Bb}	1,41 ± 0,9 ^{Cc}	31,00 ± 3,5 ^{Be}
	Guaruba-cedro	4,14 ± 1,1 ^{Bb}	3,81 ± 1,4 ^{Aa}	58,45 ± 5,8 ^{Ab}
	Marupá 1	7,85 ± 4,1 ^{Aa}	2,41 ± 1,2 ^{Bb}	58,89 ± 7,8 ^{Ab}
	Marupá 2	7,33 ± 3,9 ^{Aa}	2,26 ± 1,2 ^{BCb}	60,52 ± 5,0 ^{Ab}
	Marupá 3	4,06 ± 1,9 ^{Bb}	1,38 ± 0,6 ^{cd}	58,98 ± 4,8 ^{Ab}
<i>Ganoderma</i> sp.	Açaí	2,76 ± 0,7 ^{Cc}	1,43 ± 0,3 ^{Ac}	38,03 ± 5,5 ^{Cd}
	Guaruba-cedro	4,54 ± 1,7 ^{Ab}	1,51 ± 0,5 ^{Ac}	55,79 ± 5,8 ^{ABc}
	Marupá 1	4,80 ± 1,2 ^{Ab}	1,47 ± 0,3 ^{Ac}	70,56 ± 3,4 ^{Aa}
	Marupá 2	4,64 ± 1,2 ^{Ab}	1,43 ± 0,3 ^{Ac}	64,53 ± 6,6 ^{Ab}
	Marupá 3	4,55 ± 0,9 ^{Ab}	1,46 ± 0,3 ^{Ac}	45,48 ± 10,0 ^{Bc}

Média ± desvio padrão (n=20). Letras maiúsculas comparam a mesma espécie cultivada em diferentes substratos. Letras minúsculas comparam todas as espécies e todos os substratos. Tratamentos com a mesma letra não diferem no nível de probabilidade de 5% ($p \leq 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

Na caracterização físico-química e composição centesimal, o teor de umidade determinado nos basidiomas de *G. lingzhi* variou de 7,09% a 10,09%, com os valores mais baixos e altos observados no cultivo em marupá II e guaruba-cedro, respectivamente. O teor de umidade de *Ganoderma* sp. variou de 3,82% a 6,80%, com o valor mais baixo encontrado para o substrato à base de açaí e o mais alto para o substrato de marupá II (**Tabela 9**).

Entre as espécies estudadas e os resíduos utilizados no cultivo dos cogumelos, houve diferença estatística para o teor de cinzas, com valores variando

de 0,06% a 0,43%. Os cogumelos são capazes de acumular elementos minerais de forma mais eficiente que a maioria das plantas. Portanto, o teor de elementos minerais se torna um dos principais indicadores da qualidade dos cogumelos (Li et al., 2016). O teor de cinzas nos basidiomas de cogumelos normalmente varia de 5% a 12% da matéria seca (Kalac, 2009). Assim, o baixo teor de cinzas encontrado no presente estudo pode ser atribuído à natureza química dos substratos usados no cultivo, bem como ao estágio de colheita do basidiocarpo (Ogbe e Obeka, 2013).

O teor de lipídios diferiu apenas em *G. lingzhi* cultivado em açaí e marupá III, e em *Ganoderma* sp. em açaí e guaruba-cedro. Para os demais substratos, não foram observadas diferenças estatísticas, com valores médios de 5,6% (**Tabela 9**). O teor de lipídios em *Ganoderma* spp. pode ser influenciado por fatores ambientais, como componentes nutricionais, oxigênio e temperatura (Pedneault et al., 2007). *Ganoderma* sp. apresentou composição lipídica estável, sendo menos sensível a variações no cultivo em estado sólido, o que permite manter níveis consistentes de lipídios. Isso pode ser vantajoso para o seu cultivo e uso em diversas aplicações, incluindo fins medicinais e nutricionais.

G. lingzhi e *Ganoderma* sp. apresentaram valores médios de carbono em torno de 50%. No entanto, os teores de nitrogênio diferiram entre as espécies de fungos, com *G. lingzhi* apresentando valores entre 3,65% e 5,70%, enquanto *Ganoderma* sp. variou de 7,72% a 9,21%. Além disso, ambos os fungos apresentaram diferenças estatísticas entre os resíduos utilizados como substratos de cultivo, com as maiores porcentagens observadas para *G. lingzhi* em marupá II e *Ganoderma* sp. em açaí (**Tabela 9**). O alto teor de carbono encontrado em *G. lingzhi* e *Ganoderma* sp. corrobora com o fato de que o carbono é um componente essencial em várias biomoléculas dentro das células fúngicas, incluindo proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e polissacarídeos da parede celular, que são sintetizados por processos anabólicos nos cogumelos (Chang, Miles, 2004). Quanto ao nitrogênio, Kurd-Anjaraki et al., (2022) encontraram níveis mais elevados no basidiocarpo de *G. lucidum* (5,88 mg/100 g ou 5,8%) quando cultivado em lascas de madeira de álamo, sugerindo que a composição nutricional dos basidiomas é afetada pelas condições de crescimento e tipo de substrato.

Ganoderma sp. apresentou percentagens mais elevadas de proteína em todos os substratos avaliados, sendo aproximadamente 2,5 vezes maior em

comparação a *G. lingzhi*. Em relação aos substratos de cultivo, o resíduo de açaí proporcionou o maior teor de proteína para ambas as espécies (**Tabela 9**). As proteínas são as principais biomoléculas que contribuem para o valor nutricional dos cogumelos. Em espécies de *Ganoderma*, o teor de proteína varia de 9,93% a 16,8%, corroborando com os dados encontrados para *G. lingzhi* (Ogbe E Obeka, 2013; Stojković et al. 2014). O alto teor de proteína em *Ganoderma* sp., acima de 30%, pode estar associado à uma predisposição genética de maior produção de proteínas (Jonathan et al., 2022).

Em relação à fibra total, ambos os fungos apresentaram valores elevados, variando de 41,17% a 52,45%, com as maiores porcentagens encontradas para *G. lingzhi* quando cultivado em marupá II e para *Ganoderma* sp. em marupá III. A mesma tendência foi observada para os carboidratos totais e o valor energético, com *G. lingzhi* apresentando média de 391,1 Kcal/100g, enquanto *Ganoderma* sp. exibiu média de 242,1 Kcal/100g (**Tabela 9**).

As fibras dos basidiomas fazem parte dos carboidratos não digeríveis por enzimas digestivas nos organismos e, conseqüentemente, ajudam a reduzir os níveis de lipídios, colesterol e glicose na corrente sanguínea (Dubey et al., 2019; Aramabašić-Jovanović et al., 2021). Os polissacarídeos correspondem aos principais carboidratos encontrados nas espécies de *Ganoderma*, incluindo β -glucanos, manose, xilose e outros açúcares presentes em quantidades menores, que estão associados a diversos benefícios para a saúde (Kalac, 2009; Swallah et al., 2022). Além disso, é importante destacar que o valor energético está relacionado ao conteúdo de gordura, proteína e carboidratos disponíveis (Shams et al., 2022).

Nos cogumelos, o elemento presente na maior concentração foi o oxigênio (O), com destaque para *G. lingzhi* cultivado em açaí. O potássio (K) apresentou concentrações variando de 1,38% a 12,94%, com um valor notável para *G. lingzhi* proveniente do cultivo no resíduo de marupá III (**Tabela 10**). A presença significativa de oxigênio está comumente associada a várias funções biológicas cruciais, além de ser um componente estrutural de macromoléculas importantes, como carboidratos, lipídios e proteínas (Alzand, Bofaris, Ugis, 2018; Wang et al., 2022). Por outro lado, o potássio é um mineral essencial para os seres humanos manterem as funções normais de todas as células, incluindo células nervosas e musculares (Falandysz et al. 2020).

Tabela 9 - Caracterização físico-química e centesimal dos basidiomas de *Ganoderma lingzhi* e *Ganoderma* sp. cultivados em diferentes substratos lignocelulósicos

Linhagem	Substrato de cultivo	Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídios (%)	Carbono (%)	Nitrogênio (%)	Proteínas Totais (%)	Fibras Totais (%)	Carboidratos Totais (%)	Valor energético (Kcal/100 g)
<i>G. lingzhi</i>	Açaí	9,46 ± 0,0 ^{ABa}	0,11 ± 0,0 ^{Aa}	3,66 ± 0,1 ^{Cd}	47,33 ± 0,6 ^{Ab}	3,65 ± 0,0 ^{Ei}	16,00 ± 0,0 ^{Ae}	41,17 ± 0,2 ^{Cf}	70,80 ± 0,2 ^{Bb}	380,00 ± 1,7 ^{Cc}
	Guaruba-cedro	10,09 ± 0,0 ^{Aa}	0,06 ± 0,0 ^{Aa}	5,12 ± 0,1 ^{Ba}	45,52 ± 0,7 ^{Bc}	5,25 ± 0,0 ^{Bf}	22,95 ± 0,2 ^{Cg}	44,07 ± 1,5 ^{Bd}	72,01 ± 0,6 ^{Bb}	385,00 ± 1,6 ^{Cb}
	Marupá 1	9,33 ± 0,0 ^{Ca}	0,43 ± 0,5 ^{Aa}	5,91 ± 0,1 ^{Aa}	44,93 ± 0,6 ^{Bcd}	4,40 ± 0,2 ^{Dh}	19,97 ± 0,2 ^{Cg}	44,58 ± 0,8 ^{Bc}	71,36 ± 1,1 ^{Bb}	390,50 ± 3,4 ^{Bb}
	Marupá 2	7,09 ± 0,0 ^{Ec}	0,08 ± 0,5 ^{Aa}	6,03 ± 0,1 ^{Aa}	45,12 ± 0,3 ^{Bc}	5,70 ± 0,0 ^{Ae}	24,96 ± 0,2 ^{Cd}	52,45 ± 0,4 ^{Aa}	74,30 ± 0,3 ^{Aa}	401,46 ± 0,3 ^{Ab}
	Marupá 3	8,38 ± 0,0 ^{Db}	0,14 ± 0,0 ^{Aa}	5,15 ± 0,2 ^{Bb}	44,06 ± 0,6 ^{Bd}	4,96 ± 0,0 ^{Cg}	21,72 ± 0,9 ^{Bf}	42,20 ± 1,1 ^{Bf}	72,20 ± 1,1 ^{Ba}	398,53 ± 0,9 ^{Aa}
<i>Ganoderma</i> sp.	Açaí	3,82 ± 0,0 ^{De}	0,09 ± 0,0 ^{Aa}	4,44 ± 0,3 ^{Ac}	50,45 ± 0,3 ^{Aa}	9,21 ± 0,0 ^{Aa}	40,32 ± 0,9 ^{Aa}	44,76 ± 1,1 ^{Cf}	51,30 ± 1,1 ^{Ba}	241,17 ± 0,9 ^{Be}
	Guaruba-cedro	5,14 ± 0,0 ^{Cd}	0,06 ± 0,0 ^{Aa}	4,63 ± 1,1 ^{Ab}	49,60 ± 0,0 ^{ABa}	7,72 ± 0,0 ^{Ed}	33,82 ± 0,0 ^{Ea}	44,77 ± 1,4 ^{Cc}	56,32 ± 0,4 ^{Ae}	241,36 ± 1,5 ^{Be}
	Marupá 1	5,80 ± 0,0 ^{Cd}	0,09 ± 0,0 ^{Aa}	5,88 ± 0,4 ^{Aa}	49,19 ± 0,3 ^{Ba}	8,34 ± 0,0 ^{Bb}	36,51 ± 0,0 ^{Bd}	46,33 ± 0,6 ^{BCa}	51,70 ± 1,2 ^{Bc}	225,80 ± 5,0 ^{Cf}
	Marupá 2	6,80 ± 0,0 ^{Ac}	0,10 ± 0,0 ^{Aa}	5,29 ± 0,4 ^{Aa}	40,09 ± 0,5 ^{De}	7,90 ± 0,0 ^{Dc}	34,61 ± 0,1 ^{Db}	47,43 ± 0,7 ^{BCb}	53,19 ± 0,9 ^{Bf}	249,73 ± 1,5 ^{Ad}
	Marupá 3	6,72 ± 0,0 ^{Bc}	0,08 ± 0,0 ^{Aa}	5,27 ± 0,3 ^{Aa}	46,29 ± 0,3 ^{Cc}	7,97 ± 0,0 ^{Cc}	34,93 ± 0,1 ^{Cc}	48,96 ± 0,8 ^{Bb}	52,99 ± 0,4 ^{Bd}	252,37 ± 1,7 ^{Ad}

Média ± desvio padrão (n = 3). As letras maiúsculas comparam os tratamentos entre si (uma espécie e cinco resíduos). As letras minúsculas comparam todos os tratamentos (duas espécies e cinco resíduos). Letras iguais não são significativamente diferentes ao nível de 5% ($p \leq 0.05$). pelo teste de Tukey.

Tabela 10: Composição elementar dos basidiomas de *Ganoderma lingzhi* e *Ganoderma* sp. cultivados em diferentes substratos lignocelulósicos, determinado por espectroscopia de raios X (EDS) de energia dispersiva.

Linhagem	Substrato de cultivo	Concentração Atômica (%)						
		O	K	P	Ca	Mg	Si	S
<i>G. lingzhi</i>	Açaí	89,95 ± 3,4 ^{Aa}	2,63 ± 1,3 ^{Bab}	1,44 ± 1,08 ^{Ab}	-	0,42 ± 0,3 ^{ABb}	-	0,53 ± 0,4 ^{Aa}
	Guaruba-cedro	67,84 ± 6,6 ^{Be}	1,38 ± 0,6 ^{Bb}	0,38 ± 0,13 ^{Ab}	0,37 ± 0,1 ^{Bb}		0,22 ± 0,0 ^{Aa}	0,36 ± 0,1 ^{Aa}
	Marupá I	88,49 ± 2,0 ^{Aab}	3,59 ± 1,47 ^{Bab}	1,55 ± 0,49 ^{Ab}	1,45 ± 0,6 ^{Bb}	0,73 ± 0,1 ^{Ab}	0,30 ± 0,8 ^{Aa}	-
	Marupá II	89,43 ± 3,5 ^{Aab}	4,73 ± 4,02 ^{Bab}	0,95 ± 0,77 ^{Ab}	-	0,50 ± 0,2 ^{ABb}	0,31 ± 0,2 ^{Aa}	0,50 ± 0,4 ^{Aa}
	Marupá III	75,98 ± 7,6 ^{Bcd}	12,94 ± 4,3 ^{Aa}	1,08 ± 0,2 ^{Ab}	7,82 ± 2,69 ^{Aa}	0,89 ± 0,0 ^{Ab}	0,09 ± 0,0 ^{Aa}	0,55 ± 0,3 ^{Aa}
<i>Ganoderma</i> sp.	Açaí	68.76 ± 0.2 ^{Cde}	9.15 ± 10.05 ^{Aab}	1.86 ± 1.0 ^{Bb}	-	0.54 ± 0.2 ^{Cb}	0.38 ± 0.3 ^{Aa}	0.77 ± 0.4 ^{Aa}
	Guaruba-cedro	64.57 ± 0.8 ^{Ce}	4.77 ± 0.0 ^{Aab}	1.84 ± 0.6 ^{Bb}	-	0.04 ± 0.0 ^{Cb}	-	0.47 ± 0.1 ^{Aa}
	Marupá I	76.07 ± 0.9 ^{Bcd}	3.65 ± 2.3 ^{Aab}	1.78 ± 1.6 ^{Bb}	-	-	-	0.76 ± 0.6 ^{Aa}
	Marupá II	79.72 ± 1.84 ^{ABbc}	4.53 ± 2.6 ^{Aab}	2.73 ± 0.8 ^{ABb}	-	1.06 ± 0.2 ^{ABab}	-	0.72 ± 0.5 ^{Aa}
	Marupá III	85.24 ± 4.06 ^{Aabc}	3.78 0 ± 1.43 ^{Ab}	5.71 ± 1.5 ^{Aa}	-	2.61 ± 1.71 ^{Aa}	0.45 ± 0.2 ^{Aa}	1.13 ± 0.8 ^{Aa}

Dados expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Letras maiúsculas comparam a mesma espécie em diferentes substratos de cultivo. Letras minúsculas comparam todas as amostras das duas espécies. Tratamentos com a mesma letra não diferem no nível de probabilidade de 5% (p ≤ 0,05), de acordo com o teste de Tukey. (-) Não detectável pelo método.

O fósforo (P) variou de 0,38% a 8,71%, evidenciando os basidiomas de *Ganoderma* sp. cultivados em serragem de marupá III. O cálcio (Ca) foi observado apenas em *G. lingzhi* cultivado em serragem de guaruba-cedro e marupá I e III. Os elementos químicos magnésio (Mg), silício (Si), enxofre (S) e alumínio (Al) apresentaram concentrações abaixo de 1% para ambas as espécies (**Tabela 10**).

O magnésio desempenha um papel importante no corpo humano, uma vez que é capaz de ativar a vitamina D e contribuir para a síntese de proteínas (Dronkelaar et al. 2018). Por outro lado, a presença de cálcio nos basidiomas está associada à atividade de várias enzimas, bem como à manutenção e movimentação dos cromossomos (Burstrom 1968; White; Broadley 2003).

O enxofre é um componente de aminoácidos como taurina, metionina e cisteína, que são essenciais para a síntese de colágeno (Rolim et al. 2020). O silício está relacionado ao aumento da síntese de colágeno e à redução do envelhecimento da pele (Ferreira et al., 2018). A presença de alumínio em cogumelos pode estar relacionada à natureza metálica do suporte (porta-amostras) usado durante a análise, causando uma leitura residual de elétrons desse elemento.

Ganoderma spp. desempenham um papel importante como bioconversores e bioacumuladores de elementos inorgânicos, convertendo-os em compostos orgânicos. Dessa forma, esses minerais podem ser utilizados para melhorar o perfil nutricional/químico dos cogumelos por meio de abordagens de biofortificação (Priyadarshni et al., 2022). Além disso, a presença de macro e micronutrientes nos basidiomas desempenha um papel crucial na promoção da saúde e do bem-estar, uma vez que são essenciais para o funcionamento adequado do sistema imunológico, do metabolismo e de diversos processos fisiológicos no corpo humano (Rackerby et al., 2020; Kour et al., 2022).

Embora as espécies de *Ganoderma* não sejam consideradas comestíveis, os resultados referentes à composição centesimal e mineral são promissores, uma vez que os basidiomas apresentaram níveis elevados de proteínas, fibras, carboidratos e valor energético, baixo teor lipídico e quantidades significativas de minerais. Assim, sugere-se que as espécies de *Ganoderma* apresentem

potencial para serem utilizadas como suplemento alimentar na promoção da saúde, podendo ser consumidas na forma de cápsulas, comprimidos ou chás (Ekiz et al., 2023).

7.7 CONCLUSÕES

Apesar dos fungos terem apresentado baixa produtividade, exibiram alto teor de proteínas, principalmente *Ganoderma* sp. isolado da Amazônia. Esses resultados sugerem um potencial promissor para fins comerciais e nutricionais/medicinais, especialmente quando cultivados em substratos à base de açaí.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L. V. B, *et al.* Substrate disinfection methods on the production and nutritional composition of a wild oyster mushroom from the Amazon. **Ciência e Agrotecnologia** 45:1-9, 2021.
- AGUIAR, L. V. B. *et al.* Production of Commercial and Amazonian Strains of *Pleurotus ostreatus* in Plant Waste. **Brazilian Journal of Development**, vol. 8, p. 47299 - 47321, 2022.
- ALMEIDA, U. O. D. *et al.* Environment and slow-release fertilizer in the production of *Euterpe precatoria* seedlings. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, vol. 48, p. 382 - 389, 2018.
- ALQUATI, G. P. *et al.* Residues from urban vegetable pruning in the production of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **African Journal of Agricultural**, vol. 11, p. 3664 - 3670, 2016
- ALZAND, K. I.; BOFARIS, M. S. M.; UGIS, A. Chemical composition and nutritional value of edible wild growing mushrooms: a review. **World Journal of Pharmaceutical Research**, vol. 8, p. 31 - 46, 2019.
- ARAMABAŠIĆ-JOVANOVIĆ J. *et al.* The effects of major mushroom bioactive compounds on mechanisms that control blood glucose level. **Journal Fungus**, vol. 7, p. 58, 2021.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of A.O.A.C. International. 16a. ed. 3a. rev. **A.O.A.C. International**. Gaithersburg, MD, 1997.
- ATILA, F. Utilization of Agricultural and Forestry by-Products in *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. Production. **Mantar Dergisi**, vol. 13, p. 1 - 8, 2022.
- BAKTEMUR, G. *et al.* Use of different agricultural wastes in *Ganoderma carnosum* Pat. cultivation. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, vol. 46, p. 352 - 358, 2022.
- BARROS, S. S. Waste açaí (*Euterpe precatoria* Mart.) seeds as a new alternative source of cellulose: Extraction and characterization. **Res Doc Dev**, vol. 10, p. 1 - 16, 2021.
- BLIGH, E.G. DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification, **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, 37, 911–917, 1959.
- BOEIRA, L. S. *et al.* (2020). Chemical and sensorial characterization of a novel alcoholic beverage produced with native acai (*Euterpe precatoria*) from different regions of the Amazonas state. **LWT** 17:108632

BURSTROM, H. G. Calcium and plant growth. **Biological Reviews**, vol. 43, p. 287 – 316, 1968.

CARVALHO, C. S. M. *et al.* Cultivation and bromatological analysis of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst cultivated in agricultural waste. **African Journal of Biotechnology** 14:412-418, 2015.

COLPAN, C. O.; NALBANTY, Y; ERCELİK, M. 2018. Fundamentals of fuel cell technologies. **Compr Energy system**, vol. 5, p. 1107 – 1130, 2018.

DRONKELAAR, C. Minerals and sarcopenia; the role of calcium, iron, magnesium, phosphorus, potassium, selenium, sodium, and zinc on muscle mass, muscle strength, and physical performance in older adults: a systematic review. **Journal of the American Medical Directors Association**, vol. 19, p. 6 - 11, 2018.

DUBEY, S. K. *et al.* Role of edible mushroom as potent therapeutics for the diabetes and obesity. 3 **Biotech**, vol. 9, p. 1 - 12, 2019.

EKİZ, E. *et al.* Exploring the Potential Medicinal Benefits of *Ganoderma lucidum*: From Metabolic Disorders to Coronavirus Infections. **Foods**, vol. 12, p. 15 - 12, 2023.

EL-SHEIKHA, A. F. Nutritional profile and health benefits of *Ganoderma lucidum* “Lingzhi, Reishi, or Mannentake” as functional foods: Current scenario and future perspectives. **Foods**, vol. 11, p. 10 - 30, 2022.

ELISASHVILI, V. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, vol. 14, p. 211 - 239, 2012.

ESTRADA, A. E. R.; PECCHIA, J. Cultivation of *Pleurotus ostreatus*. In: Edible and medicinal mushrooms: technology and applications, p. 339-360. 2017. ZIED DC, PARDO-GIMÉNEZ. JOHN WILEY & SONS, CHICHESTER, **Reino Unido**

FALANDYSZ J. *et al.* 137Caesium, 40Potassium and potassium in raw and deep-oil stir-fried mushroom meals from Yunnan in China. **Journal of Food Composition and Analysis**, vol. 91, p. 103 - 538, 2020.

FERREIRA, A. O. *et al.* Anti-aging effects of monomethylsilanetriol and maltodextrin-stabilized orthosilicic acid on nails, skin and hair. **Cosmetics**, vol. 5, p. 41 - 56, 2018.

JEZNABADI, E. K; JAFARPOUR, M; EGHBALESAIED, S. King oyster mushroom production using various sources of agricultural wastes in Iran. **International Journal of Recycling Organic Waste in Agriculture**, vol. 5, p. 17 - 24, 2016.

JEZNABADI, E. K. *et al.* Effects of various substrates and supplements on king oyster (*Pleurotus ostreatus*). **Compost Science & Utilization**, vol. 25, p. 1 - 10, 2017.

JONATHAN, M.; KETA, J. N.; DHARMENDRA, S. Identification, and evaluation of proximate and antinutritional profile of some underutilized mushrooms in Yauri Local

Government Area, Kebbi State, Nigeria. **Journal of Advanced Education and Sciences**, vol. 2, p. 61 - 66, 2022.

KALAČ, P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: **A review. Food Chemistry**, vol. 113, p. 9 - 16, 2009.

KOUR, H. Bioactive compounds from mushrooms: an emerging bioresources of food and nutraceuticals. **Food Bioscience**, vol. 50, p. 102 - 124, 2022.

KURD-ANJARAKI, S. *et al.* Potential of waste reduction of agro-biomasses through Reishi medicinal mushroom (*Ganoderma lucidum*) production using different substrates and techniques. **Acta Ecologica Sinica**, vol. 42, p. 90 - 101, 2022.

LI, S.; DONG, C.; HÁ WEN, X. L. Development of Ling-zhi industry in China—emanated from the artificial cultivation in the Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences (IMCAS). **Mycology**, vol. 7, p. 74 - 80, 2016.

MAHARI, W. A. W. *et al.* A review on valorization of oyster mushroom and waste generated in the mushroom cultivation industry. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 400, p. 123 – 156, 2020.

MEHTA, S.; JANDAIK, S.; GRUPTA, D. Effect of cost-effective substrates on growth cycle and yield of lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes) from Northwestern Himalaya (India). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, vol. 16, p. 585 - 591, 2014.

MILES, P. G.; CHANG, S. T. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. **CRC press**, Boca Raton, Florida, 2004.

OGBE, A. O.; OBEKA, A. D. Proximate, mineral and anti-nutrient composition of wild *Ganoderma lucidum*: Implication on its utilization in poultry production. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, vol. 3, p. 161 - 166, 2013.

PEDNEAULT, K. *et al.* Fatty acid profiles of polar and non-polar lipids of *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopiae* var. 'citrino-pileatus' grown at different temperatures. **Mycological Research**, vol. 111, p. 1228 - 1234, 2007.

PRIYADARSHNI, K. C. *et al.* Biochemical analysis of cultivated mushroom, *Pleurotus florida* and synthesis of silver nanoparticles for enhanced antimicrobial effects on clinically important human pathogens. **Inorganic Chemistry Communications**, vol. 142, p. 109 - 673, 2022.

RACKERBY, B. *et al.* Understanding the effects of dietary components on the gut microbiome and human health. **Food Science and Biotechnology**, vol. 29, p. 1463 - 1474, 2020.

RASHAD, F. M. *et al.* Recycling of agro-wastes for *Ganoderma lucidum* mushroom production and *Ganoderma* post mushroom substrate as soil amendment. **Waste Management** vol. 88, p. 147 - 159, 2019.

REIS, A. R. S. *et al.* Anatomia do xilema secundário de sete espécies de *Vochysia* Aubl. (Vochysiaceae), conhecidas como guaruba no estado do Pará, Brasil. **Biota Amazônica**, vol. 5, p. 45 - 51, 2015.

RIBEIRO, D. S. *et al.* Reação da densidade e das propriedades mecânicas de três espécies amazônicas submetidas a ensaio de campo. **Revista Ciência Madeireiras**, vol. 10, p. 18 - 28, 2019.

ROLIM, C. S. *et al.* Análise da composição centesimal, físico-química e mineral da polpa e casca do fruto de *Endopleura uchi*. **Brazilian Journal of Development**, vol. 6, p. 16368 - 16383, 2020.

SAAD, A. L. M. *et al.* Use of agricultural residues in the cultivation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* using the "Jun-Cao" Chinese technology. **Ambiência**, vol. 13, p. 572 - 582, 2017.

SALES-CAMPOS, C.; CHEVREUIL, L. R. Macromicetos Amazônicos: potenciais biotecnológicos de modo sustentável. In: Conhecimento, Conservação e Uso de Fungos, p. 14 - 17, 2019. **Editora INPA**, Amazonas, Brasil

SALES-CAMPOS, C.; ANDRADE, M. N. C. Aproveitamento de resíduos madeireiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. **Acta Amazônica**, vol. 41, p. 1 - 8, 2011.

SANTOS, J. S. P. A. *et al.* Storage of *Simarouba amara* Aubl. Seeds. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, vol. 16, p. 89 - 95, 2021.

SHAMS, R. *et al.* Comparative study of freeze drying and cabinet drying of button mushroom. **Applied Food Research**, vol. 2, p. 100 - 084, 2022.

SIQUEIRA, F. G. *et al.* Cultivation of *Pleurotus sajor-caju* on banana stalk and Bahia grass-based substrates *Horticultura Brasileira*, vol. 29, p. 199 - 204, 2011.

STOJKOVIĆ, D. S. *et al.* A detailed comparative study between chemical and bioactive properties of *Ganoderma lucidum* from different origins. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, vol. 65, p. 42 - 47, 2014.

SUŁKOWSKA-ZIAJA, K. *et al.* Bioactivity and mycochemical profile of extracts from mycelial cultures of *Ganoderma* spp. **Molecules**, vol. 27, p. 275, 2022.

SWALLAH, M. S. *et al.* Potentialities of *Ganoderma lucidum* extracts as functional ingredients in food formulation. **Food Research International**, vol. 172, p. 113 - 161, 2023.

WANG, J. *et al.* Effect of dietary carbohydrate level on growth, feed utilization, energy retention, body composition, and digestive and metabolic enzyme activities of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. **Aquaculture Reports**, vol. 25, p. 101 - 211, 2022.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Calcium in plants. **Annals of Botany**, vol. 92, p. 487 - 511, 2003.

ZADRAZIL, F.; KURTZMAN, R. H. The Biology of Pleurotus Cultivation in the Tropics. In: Tropical mushrooms: Biological nature and cultivation methods, p. 277 - 298, 1982. **The Chinese University Press**, Hong Kong

8. Capítulo 4

PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS BIOATIVAS POR *GANODERMA* SPP. CULTIVADOS EM RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS AMAZÔNICOS

GOUVÊA, PAULA ROMENYA DOS SANTOS^{1,2}; PESSOA, VÍTOR ALVES^{1,2}; SOARES, LARISSA BATISTA DO NASCIMENTO; SILVA, GIOVANNA LIMA DA¹; SALES-CAMPOS, CECI^{1,2,3}; CHEVREUIL, LARISSA RAMOS¹

¹ Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas

³ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, Universidade do Estado do Amazonas

8.1 RESUMO

As espécies do gênero *Ganoderma* são bastante reconhecidas por seu potencial medicinal, associado às suas biomoléculas. No entanto, a produção dessas biomoléculas é influenciada pelo substrato de crescimento. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de proteases e inibidores de protease por *Ganoderma lingzhi* (linhagem comercial) e *Ganoderma* sp. (isolado na Amazônia), quando cultivados em diferentes resíduos lignocelulósicos da Amazônia (açaí, guaruba-cedro e três lotes de marupá {I, II e III}) e extraídos em diferentes soluções. Os basidiomas foram submetidos à extração em água, Tris-HCl e fosfato de sódio. Foram determinados o teor de proteínas, a atividade total proteases, enzimas fibrinolíticas, caseinolíticas e gelatinolíticas e os inibidores de tripsina, quimotripsina e papaína. Os extratos também foram caracterizados por eletroforese em géis de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR). A extração com Tris-HCl proporcionou maiores níveis de proteínas e proteases para *Ganoderma* sp., e maior atividade caseinolítica, gelatinolítica e fibrinolítica para *G. lingzhi* cultivado em açaí. Extratos aquosos de *Ganoderma* sp. em marupá III e marupá II exibiram maiores atividades inibitórias de tripsina e papaína, respectivamente. *G. lingzhi* cultivado em guaruba-cedro mostrou maior inibição de quimotripsina. SDS-PAGE demonstrou bandas mais intensas em TRIS-HCl e fosfato de sódio, principalmente na faixa de 100, 50 e 30 kDa. Os espectros de FTIR mostraram padrões para proteínas em todos os extratos, apresentando variação na transmitância de acordo com o substrato e o extrator, relacionada à concentração de diferentes moléculas. Com base nisso, foi possível destacar os extratos aquosos de *Ganoderma* sp. amazônico cultivado em diferentes resíduos de marupá como fonte de inibidores de proteases, enquanto o extrato de *G. lingzhi* em Tris-HCl de cultivo em açaí se destaca como fonte de proteases, incluindo enzimas fibrinolíticas, caseinolíticas e gelatinolíticas.

Palavras-chave: cogumelos medicinais, enzimas fibrinolíticas, inibição enzimática, resíduos agroindustriais

8.2 ABSTRACT

Ganoderma spp. are recognized for their medicinal potential. However, the production of their bioactive molecules is influenced by the growth substrate. Our objective was to evaluate the production of proteases and protease inhibitors by *Ganoderma lingzhi* (commercial strain) and *Ganoderma* sp. (isolated in the Amazon), when cultivated in different Amazonian lignocellulosic residues (açai, guaruba-cedro and three marupá lots {I, II and III}) and extract with different solutions. The basidiocarps were submitted to extraction in water, Tris-HCl and sodium phosphate. Protein content, total protease activity, activity of fibrinolytic, caseinolytic and gelatinolytic enzymes and trypsin, chymotrypsin and papain inhibitors were determined. The extracts were also characterized by electrophoresis in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) and Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance (FTIR-ATR). Tris-HCl extraction provided higher levels of proteins and proteases for *Ganoderma* sp., and higher caseinolytic, gelatinolytic and fibrinolytic activity for *G. lingzhi* cultivated in açai. Aqueous extracts of *Ganoderma* sp. in marupá III and marupá II exhibited higher trypsin and papain inhibitor activities, respectively. *G. lingzhi* cultivated in guaruba-cedro showed greater chymotrypsin inhibition. SDS-PAGE demonstrate more intense bands in TRIS-HCl and sodium phosphate, mainly in the range of 100, 50 and 30 kDa. The FTIR spectra showed patterns for proteins in all extracts, presenting variation in transmittance according to substrate and extractor, related to different molecules concentrations. From this, it was possible to highlight aqueous extracts from Amazonian *Ganoderma* sp. cultivated in different marupá wastes as source of proteases inhibitors, while *G. lingzhi* Tris-HCl extract from açai cultivation stands out as protease source, including fibrinolytic, caseinolytic and gelatinolytic enzymes.

Keywords: medicinal mushrooms, fibrinolytic enzymes, enzymatic inhibition, agro-industrial residues

8.3 INTRODUÇÃO

O gênero *Ganoderma* compreende fungos basidiomicetos amplamente utilizados na medicina tradicional asiática, sobretudo, na China e no Japão. Atualmente, sabe-se que o potencial das espécies de cogumelos desse gênero está associado à presença de moléculas com propriedades farmacológicas, as quais incluem atividade antitumoral, antioxidante, imunomoduladora e antidiabética (Wińska et al. 2019; Wang et al., 2020).

Entre as moléculas encontradas nos basidiomas de *Ganoderma* spp., as proteases compõem um grupo de enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise de ligações peptídicas, sendo conhecidas por serem importantes para a formação e maturação dos corpos frutíferos, que podem ser extraídos e usados em processos agroindustriais e de gerenciamento ambiental (Kumakura et al., 2019; Li et al., 2019). As enzimas fibrinolíticas produzidas por *Ganoderma* spp. são um exemplo de proteases com aplicação farmacêutica, uma vez que estão envolvidas na lise de coágulos de fibrina formados durante os processos de coagulação sanguínea (Pessoa et al., 2019).

Outra molécula bioativa encontrada nesses cogumelos são inibidores de proteases, relatados como parte do sistema de defesa inato desses fungos contra predadores e parasitas, tornando-os atraentes do ponto de vista de aplicações na agricultura, veterinária e medicina humana na luta contra parasitas (Sabotič, 2015). Alguns estudos demonstraram que os metabólitos de *Ganoderma* spp. podem ter atividade contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) e o vírus da dengue (Wu et al., 2022). Agora, uma tendência no desenvolvimento de medicamentos antivirais é o uso de inibidores de proteases, onde o *G. lucidum*, por exemplo, é relatado como promissor na terapia antiviral (Ekiz et al., 2023).

O cultivo de *Ganoderma* spp. em resíduos agroindustriais é promissor do ponto de vista da utilização de resíduos, redução dos impactos ambientais e estabelecimento de uma economia circular (Zervakis, Koutrotsios, 2017; Grimm, Wösten, 2018). Nesse contexto, a região amazônica, com suas diversas atividades agroindustriais e de exploração madeireira, gera uma grande quantidade de resíduos que podem ser usados para o cultivo de *Ganoderma* spp., como os subprodutos do açaí (*Euterpe* sp.), guaruba-cedro (*Vochysia maxima*) e marupá

(*Simarouba amara*), que afetam o perfil bioquímico dos corpos de frutificação, bem como sua bioatividade (Pessoa, 2022).

Portanto, para obter proteases e inibidores de proteases, é importante padronizar o substrato de cultura a ser usado, pois este é um dos principais parâmetros que afetam o conteúdo de metabólitos no bioprocessamento de obtenção de basidiomas de *Ganoderma* spp. (Ćilerdžić et al., 2016). Além disso, o estudo do extrator mais eficiente na recuperação desses metabólitos se torna relevante, pois pode afetar a quantidade de proteínas recuperadas, sua qualidade, estabilidade e complexação com outras moléculas, afetando as análises proteômicas, como SDS-PAGE, como já relatado para espécies de *Ganoderma* (Al-Obaidi et al., 2016; Roselló-Soto et al., 2016).

G. lingzhi (anteriormente *G. lucidum*) compreende uma espécie previamente mal identificada, fazendo parte de um complexo amplamente utilizado, normalmente usado como parâmetro para identificar o potencial de outras espécies de *Ganoderma* (Yue et al., 2023). Recentemente, foi relatado o potencial de obtenção de proteases e inibidores de proteases por meio da biomassa micelial de *G. lingzhi* (CC22) cultivada em fermentação submersa (Pessoa et al., 2023), no entanto, ainda não existem dados sobre a presença dessas moléculas em seus basidiomas, especialmente quando cultivados em resíduos lignocelulósicos amazônicos. Além disso, recentemente, uma linhagem amazônica, chamada *Ganoderma* sp., foi isolada pelo nosso grupo de pesquisa, a qual ainda não apresenta estudos na literatura científica. Portanto, o estudo teve como objetivo descrever o potencial de basidiomas de *G. lingzhi* (linhagem comercial) e *Ganoderma* sp. (isolado da Amazônia) na obtenção de proteases e inibidores de proteases, verificando a influência do cultivo em diferentes resíduos amazônicos e a utilização de diferentes extratores na recuperação dessas moléculas, favorecendo aplicações em nível industrial.

8.4 METODOLOGIA

Material Biológico

A linhagem comercial de *Ganoderma lingzhi* (CC22) e uma linhagem de *Ganoderma* sp. (1962) isolada na região amazônica (03°01'48.9" S, 59°51'01.6" W, Manaus, Amazonas - Brasil) foram acessadas da Coleção de Cultura de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), e cultivadas em resíduos de semente de açaí, serragem de guaruba-cedro e diferentes lotes de serragem de marupá (I, II e III). Os basidiomas produzidos foram liofilizados e triturados, sendo posteriormente mantidos sob refrigeração (4 °C) até a realização das análises.

Extração proteica

O material pulverizado dos cogumelos foi submetido à extração em água, Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) ou tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0), na proporção 1:20 (m:v), sob agitação constante por 2 horas, a $25 \pm ^\circ\text{C}$. Posteriormente, o material foi centrifugado a 5.000 rpm, 4 °C, por 20 minutos. Os sobrenadantes provenientes das extrações em Tris-HCl e fosfato foram submetidos à diálise por 48 horas, em água destilada. Os sobrenadantes foram liofilizados, resultando em 30 extratos proteicos. A concentração de proteínas nos extratos foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), com adaptações para microplaca de 96 poços, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Proteases totais

As amostras foram incubadas com 12 µL de uma solução contendo 3 mM de ditioneitol (DTT) e 2 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), e 108 µL de um tampão de acetato de sódio a 50 mM (pH 5,0), por 10 minutos à temperatura ambiente ($25 \pm 2 ^\circ\text{C}$). Posteriormente, foram adicionados 60 µL de azocaseína a 1% (p/v), prosseguindo com a incubação por 1 hora a 37 °C. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 90 µL de ácido tricloroacético a 20% (TCA) e centrifugação a 8.680 xg por 10 minutos. Os sobrenadantes foram alcalinizados com hidróxido de sódio (NaOH) a 2 M e submetidos a leituras espectrofotométricas a 420 nm. Os resultados foram expressos em unidades de atividade por mililitro de extrato

(U/mL), onde U é definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorbância em 0,01 unidades (Pessoa et al., 2023).

Atividade caseinolítica e atividade gelatinolítica

A atividade caseinolítica foi determinada usando um meio de cultura contendo 1% de leite desnatado (p/v) (Molico®, Nestlé, Brasil) e 1% de agarose (p/v), dissolvidos em tampão Tris-HCl autoclavado a 50 mM (pH 7,8). Após o meio solidificar na placa de Petri, foram feitos orifícios circulares (7 mm) e adicionados 10 µL dos extratos. Em seguida, as placas de Petri foram incubadas por 1 dia a 37 °C, e a atividade proteolítica foi analisada em 12 e 14 horas, os dados foram expressos em mm², calculando a área dos halos translúcidos produzidos pela degradação da caseína (Rovati et al., 2010).

A atividade sinérgica caseinolítica e gelatinolítica foi determinada usando um meio de cultura contendo 1,8% de ágar, 1% de gelatina e 1% de leite desnatado, dissolvidos em tampão estéril de Tris-HCl a 50 mM (pH 7,8). Em seguida, as placas de Petri foram incubadas por 1 dia a 37 °C, e a atividade proteolítica foi analisada em 12 e 24 horas, os dados foram expressos em mm², calculando a área dos halos translúcidos produzidos pela degradação da caseína e da gelatina (Teixeira, 1997).

Atividade fibrinolítica

A determinação da atividade fibrinolítica foi realizada conforme Rovati e colaboradores (2010), com a incubação de 5 mL de uma solução de fibrinogênio (0,5% p:v), 5 mL de agarose (5%) e 1 mL de trombina (100 NIH U/mL) em placas de Petri, por 30 minutos. Posteriormente, foram feitos orifícios circulares (Ø = 7 mm), onde foram adicionados 10 µL de extrato. As placas foram incubadas por 24 horas, a 37 °C, e a atividade foi determinada a partir da área (mm²) dos halos formados a partir da hidrólise da fibrina em peptídeos solúveis de baixo peso molecular.

Inibidores de serinoproteases

Na determinação da atividade de inibidores 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 a tripsina e quimotripsina, respectivamente, conforme descrito por Pessoa e colaboradores

(2023). Os resultados foram expressos em unidades de inibição por mg de proteína (UI/mg de proteína), onde UI foi definida como a quantidade de inibidor capaz de inibir uma unidade de atividade de tripsina ou quimotripsina.

Inibidores de cisteínoproteases

Na determinação da atividade de inibidores de proteases cisteínicas foi utilizado o substrato sintético BANA (cloridrato de N-benzoil-DL-arginina β -naftilamida, Sigma-Aldrich), a enzima papaína (Sigma-Aldrich) e o reagente DMACA (*p*-dimetilaminocinamaldeído, Sigma-Aldrich) para conferir cor à reação, conforme metodologia descrita por Pessoa e colaboradores (2023). Os resultados foram expressos em unidades de inibição por mg de proteína (UI/mg de proteína), onde UI foi definida como a quantidade de inibidor capaz de inibir uma unidade de atividade da papaína.

Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR)

Os extratos proteicos foram avaliados quanto aos seus constituintes por meio de espectrometria de infravermelho (FTIR-ATR). Para isso, 5 mg de cada amostra foram inseridas em equipamento de infravermelho (Cary 630) e analisadas em janela espectral de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 8 varreduras.

SDS-PAGE

O perfil de proteínas dos extratos foi obtido a partir da técnica de eletroforese em géis de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), (Laemmli, 1970), com o objetivo de estimar as faixas de massa molecular das proteínas nos diferentes extratos. As amostras foram solubilizadas em tampão Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8) contendo 1% de SDS, 10% de glicerol, 1% de β -mercaptoetanol e 0,1% de azul de bromofenol, em seguida imersas em água fervente por 10 minutos e aplicadas no gel.

A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba de eletroforese vertical (Bio-Rad), em tampão de corrida composto por Tris-HCl (25 mM), glicina (0,192 M) e SDS (0,1% m/v), aplicando uma voltagem de 200 volts e corrente elétrica de 15 mA/gel, por duas horas. Marcadores de peso molecular, variando de 10 a 225 kDa

(Promega), foram utilizados para estimar a massa molecular das proteínas separadas no gel. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com Azul Brilhante de Coomassie G-250, ácido acético (0,1% v/v), etanol e água destilada (1:4:5 v/v/v) por duas horas e, posteriormente, descorados em uma solução contendo ácido acético glacial, etanol e água destilada (1:4:5 v/v/v), permitindo a visualização das bandas de proteínas.

Análise estatística

Os experimentos foram arranjados em esquema fatorial 2 x 5 x 3, composto por 2 espécies fúngicas (*G. lingzhi* e *Ganoderma* sp.), 5 resíduos (açaí, guarubacedro, marupá I, II e III) e três diferentes extrações proteicas (água, Tris-HCl e fosfato de sódio), totalizando 30 amostras. Os ensaios foram realizados em triplicas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade, utilizando o software Statistic 7.

8.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As espécies de *Ganoderma* já foram extensivamente analisadas por suas propriedades bioativas, principalmente devido à sua importância comercial. O *Ganoderma* sp. (1962) foi isolado recentemente pelo nosso grupo e está em estágios iniciais de caracterização, incluindo adaptação ao cultivo axênico de cogumelos, análise de biologia molecular, perfil fitoquímico, produção de proteínas e polissacarídeos e adaptação a outros métodos de cultivo em condições controladas. Neste trabalho, avaliamos seus basidiomas como uma potencial fonte de proteases e inibidores de proteases, visando aplicações biotecnológicas, em comparação com o *G. lingzhi* (CC22), uma cepa comercial que já é mais estudada.

Os teores de proteína foram mais elevados nos extratos obtidos a partir da extração com fosfato de sódio para o *Ganoderma lingzhi*, enquanto a extração com Tris-HCl resultou em quantidades maiores para o *Ganoderma* sp. Em relação aos substratos de cultivo, marupá II e açaí apresentaram maiores concentrações de proteína nos extratos de Tris-HCl e fosfato de sódio para o *G. lingzhi*. Enquanto isso, o *Ganoderma* sp. mostrou um teor de proteína mais elevado no extrato de Tris-HCl

do cultivo de açaí, sendo cerca de 2 vezes maior do que o encontrado no extrato de fosfato de sódio (**Figura 17**).

O teor de proteína obtido nesta pesquisa pode ser considerado promissor em comparação com estudos anteriores (Slynko et al., 2017), nos quais basidiomas de *Ganoderma lucidum*, quando submetidos à recuperação de proteínas com extratores de diferentes polaridades, apresentaram uma concentração de proteína de 2,03 mg/g de extrato no extrato de fosfato de sódio. Extratos de proteína de basidiomas e primórdios de *G. lucidum* obtidos a partir de água quente, por sua vez, exibiram um teor de proteína de $13,3 \pm 4,9$ e $16,3 \pm 1,9$ mg/g de extrato, respectivamente (Cör et al., 2021)

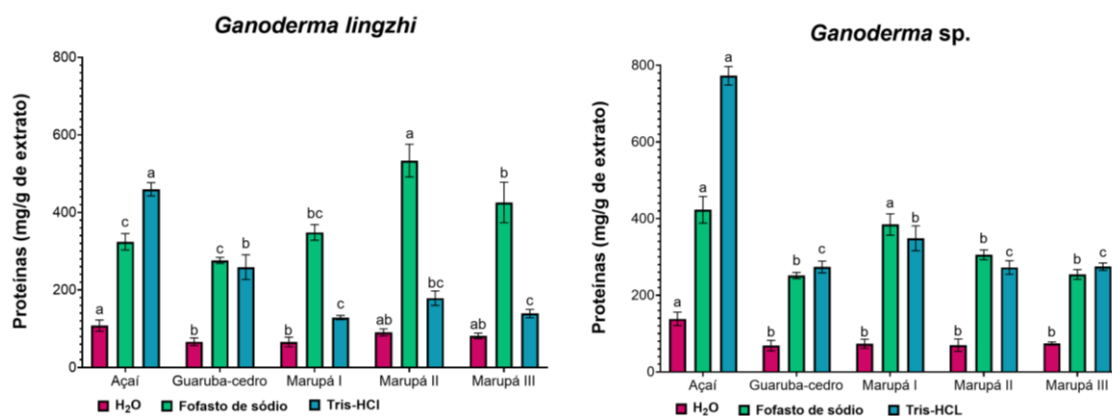
No que diz respeito à atividade de proteases totais, *G. lingzhi* exibiu e vezes mais atividades em comparação à *Ganoderma* sp., com destaque para o extrato proveniente da extração em Tris-HCl, no substrato à base de açaí. Em relação às extrações proteicas, Tris-HCl proporcionou maior eficiência na obtenção de proteases tanto em *G. lingzhi*, como em *Ganoderma* sp., ao passo que não foi verificada atividade proteolítica nos extratos aquosos de *G. lingzhi* (**Figura 18**).

Já se tem conhecimento que pelo menos 2% do conteúdo de proteínas secretadas pelo *G. lucidum* durante seu crescimento em cultivo axênico corresponde a proteases (Manavalan et al., 2012), mas a presença de suas enzimas em basidiomas maduros ainda não foi esclarecida. Os dados obtidos destacaram variações na síntese de proteases de acordo com o substrato de cultivo, o que pode estar associado a características intrínsecas dos materiais lignocelulósicos, uma vez que as proteases fazem parte do complexo enzimático responsável pela degradação da biomassa vegetal para promover o desenvolvimento fúngico (Xi et al., 2016). Os dados obtidos para *G. lingzhi* CC22 cultivado em açaí e extraído com Tris-HCl concordam com pesquisas anteriores para esta cepa, onde um extrato de biomassa micelial apresentou uma atividade proteolítica total de $70,9 \pm 6,22$ U/mL (Pessoa et al., 2023). Em relação à diferença na síntese de protease entre a cepa comercial e amazônica de *Ganoderma*, pode estar relacionada à predisposição genética, uma vez que já foram relatadas variações nos genes que codificam proteases de acordo com as espécies de *Ganoderma* (Sun et al., 2022).

O extrato aquoso de cogumelos geralmente apresenta grande variação em termos de seus constituintes, apresentando uma extração não específica que requer

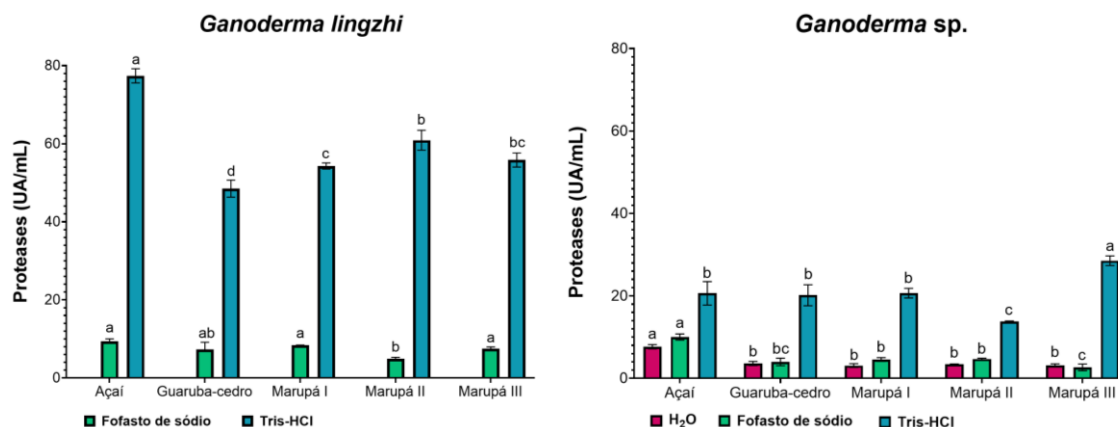
etapas adicionais de purificação e concentração, pois pode incluir polissacarídeos, moléculas de baixo peso molecular, proteínas e açúcares (Ren et al., 2014). O tampão de fosfato de sódio, por outro lado, apesar de contribuir para a estabilidade das proteínas mesmo em concentrações molares mais altas do que o TRIS, apresenta variação na interação de acordo com as características intrínsecas de cada proteína, variando em termos de sua biocompatibilidade (Payani et al., 2021). O tampão Tris-HCl é comumente utilizado na avaliação de proteases com atividade fibrinolítica de *Ganoderma* (Kumaran et al., 2011), especialmente empregando uma baixa concentração molar, uma vez que o TRIS é considerado um tampão biológico que suporta a estabilidade das proteínas quando presente em baixas concentrações (Pannuru et al., 2018).

Figura 17 - Teores de proteínas nos diferentes extratos proteicos provenientes dos basidiomas de *Ganoderma lingzhi* e *Ganoderma* sp., cultivados em diferentes resíduos lignocelulósicos.



Dados expressos com média, desvio padrão em barras. Tratamentos com a mesma letra não diferem no nível de probabilidade de 5% ($p \leq 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

Figura 18 - Atividade proteolítica total nos diferentes extratos proteicos provenientes dos basidiomas de *Ganoderma lingzhi* e *Ganoderma* sp., cultivados em diferentes resíduos lignocelulósicos.



Dados expressos com média, desvio padrão em barras. Tratamentos com a mesma letra não diferem no nível de probabilidade de 5% ($p \leq 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

Considerando que os extratos em Tris-HCl apresentaram a maior atividade proteolítica total, eles foram submetidos à avaliação da atividade caseinolítica, gelatinolítica e fibrinolítica. Verificou-se que *G. lingzhi* continua a se destacar em termos de atividade proteolítica, incluindo caseinolítica, gelatinolítica e fibrinolítica, com destaque para os extratos dos basidiomas cultivados em açaí, que se destacaram nos três ensaios conduzidos. *Ganoderma* sp. mostrou resultados positivos apenas quando cultivado em açaí e marupá II. Vale ressaltar também os basidiomas do substrato de marupá II, que apresentaram atividade mais específica, com presença de atividade caseinolítica e gelatinolítica e ausência de atividade fibrinolítica. A partir disso, foi possível inferir que o substrato de semente de açaí pode atuar como indutor de atividade fibrinolítica. Além disso, é evidente que não houve aumento considerável nas atividades após 12 horas de incubação. (**Tabela 11**).

Quanto aos ensaios de proteólise em placa, a degradação da caseína do leite é amplamente realizada como triagem de amostras a serem testadas quanto à atividade fibrinolítica, uma vez que existe uma relação linear entre a atividade caseinolítica e fibrinolítica, com a possibilidade de usar fórmulas matemáticas para converter a atividade caseinolítica em atividade fibrinolítica de plasmina ou outros agentes fibrinolíticos (Cole e Mertz, 1961; Moser e Frey 1966). O substrato à base de açaí, que fornece extratos de proteínas com atividade caseinolítica, gelatinolítica e fibrinolítica, já é sugerido na literatura científica como um indutor de síntese de proteases em cogumelos, corroborando com os dados obtidos por Fonseca, 2013.

No entanto, os extratos de proteínas a partir do substrato à base de marupá II também demonstraram alta atividade caseinolítica e gelatinolítica, mas apresentaram ausência de atividade fibrinolítica. Nesse sentido, descreve-se que proteases com maior degradação da caseína podem hidrolisar melhor proteínas globulares, enquanto aquelas com maior degradação da fibrina podem ser mais ativas contra proteínas fibrilares (Osmolovskiy et al., 2022)

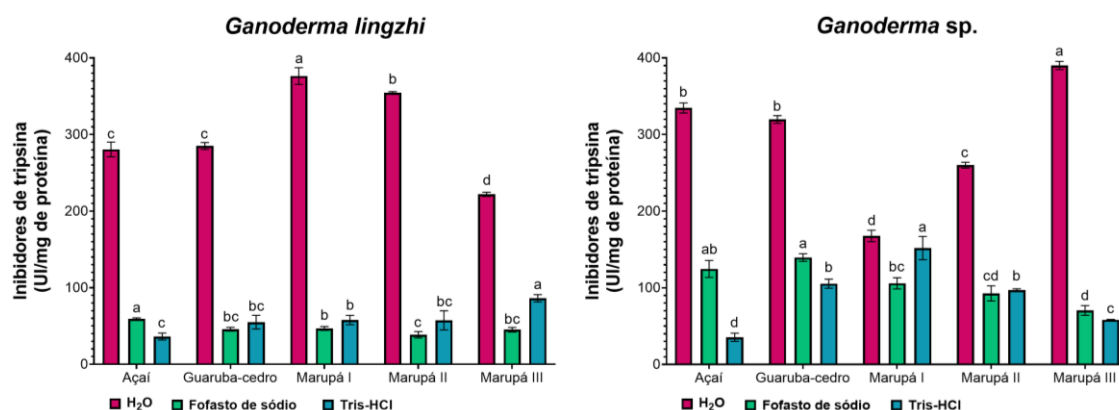
As atividades de inibição de tripsina, ao contrário das proteases, foram maiores em extratos aquosos, com destaque para os basidiomas provenientes de substratos com resíduos de marupá I e II para *G. lingzhi* e *Ganoderma* sp., respectivamente. Nos outros extratos e substratos de cultivo, *Ganoderma* sp. apresentou atividades de inibição de tripsina mais altas (**Figura 19**). Os extratos aquosos também apresentaram as maiores atividades de inibição de quimotripsina. *G. lingzhi* exibiu atividade inibitória de quimotripsina em extratos aquosos de todos os substratos de cultivo, com destaque para os basidiomas provenientes de açaí, guaruba-cedro e marupá I. Foi observada baixa inibição no extrato de Tris-HCl. *Ganoderma* sp. mostrou atividade nos extratos aquosos e de fosfato, especialmente nos extratos aquosos provenientes do cultivo de marupá I (**Figura 19**).

Tabela 11. Atividade proteolítica medida por ensaios caseinolíticos, caseinolíticos + gelatinolíticos e fibrinolíticos nos diferentes extratos dos basidiomas de *Ganoderma lingzhi* e *Ganoderma* sp., cultivados em resíduos lignocelulósicos amazônicos.

	Substrato de Cultivo	Caseinolítico (mm ²)		Caseinolítico + Gelatinolítico (mm ²)		Fibrinolítico (mm ²)
		12 hours	24 hours	12 hours	24 hours	24 hours
<i>G. lingzhi</i>	Açaí	143,01 ± 1,59 ^a	158,85 ± 1,67 ^a	92,72 ± 3,57 ^b	129,65 ± 4,38 ^{bc}	127,66 ± 5,01 ^a
	Guaruba-cedro	82,26 ± 5,30 ^c	90,30 ± 8,85 ^c	78,72 ± 14,61 ^b	97,44 ± 9,01 ^d	49,09 ± 15,91 ^b
	Marupá I	126,28 ± 15,21 ^b	148,99 ± 4,87 ^{ab}	94,81 ± 8,07 ^b	150,96 ± 4,11 ^b	89,37 ± 10,86 ^{ab}
	Marupá II	135,44 ± 5,67 ^{ab}	148,78 ± 2,50 ^{ab}	115,58 ± 3,05 ^a	186,28 ± 11,13 ^a	-
	Marupá III	133,26 ± 6,65 ^{ab}	137,32 ± 3,63 ^b	88,40 ± 10,38 ^b	128,41 ± 10,06 ^{bc}	106,65 ± 34,30 ^a
<i>Ganoderma</i> sp.	Açaí	8,48 ± 1,32 ^d	12,91 ± 1,27 ^d	-	10,59 ± 1,59 ^e	13,58 ± 6,04 ^c
	Guaruba-cedro	-	-	-	-	-
	Marupá I	-	-	-	-	-
	Marupá II	-	15,53 ± 10,42 ^{de}	-	123,40 ± 21,20 ^c	-
	Marupá III	-	-	-	-	-

Dados apresentados como médias ± desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey

Figura 19 - Atividade de inibidores de tripsina nos diferentes extratos proteicos provenientes dos basidiomas de *Ganoderma lingzhi* (A) e *Ganoderma* sp. (B), cultivados em diferentes resíduos lignocelulósicos.



Dados expressos com média, desvio padrão em barras. Tratamentos com a mesma letra não diferem no nível de probabilidade de 5% ($p \leq 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

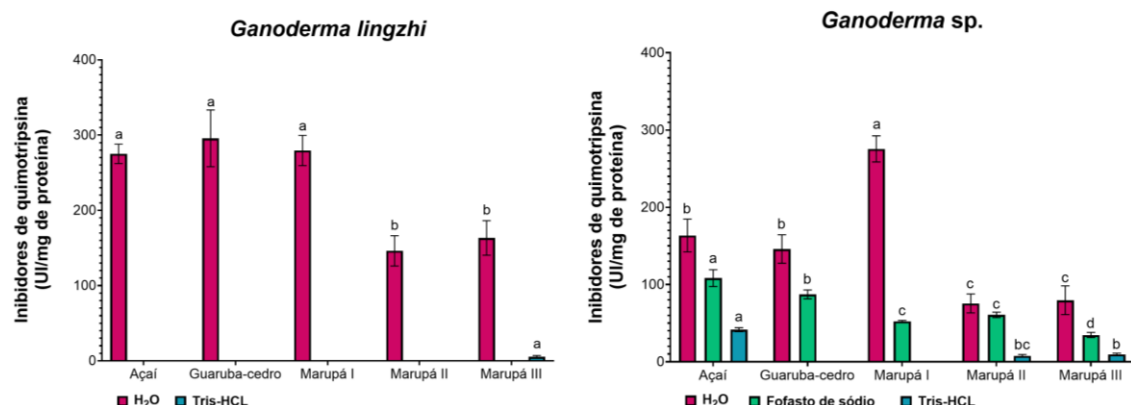
Na atividade de inibidores de quimotripsina, assim como observado para a tripsina, os extratos aquosos exibiram as maiores inibições. É importante ressaltar que *G. lingzhi* apresentou atividade frente à quimotripsina apenas nos extratos aquosos e baixa inibição no extrato obtido a partir de Tris-HCl (**Figura 20**).

Comparando as inibições das serinoproteases avaliadas, pode-se inferir que os diferentes extratos exibiram maiores atividades inibitórias frente à tripsina. Dentre os substratos de cultivo, as serragens de marupá proporcionaram maior produção desses inibidores pelos fungos estudados, com destaque para marupá I no cultivo de *G. lingzhi* e, marupá I e III no cultivo de *Ganoderma* sp., na produção de quimotripsina e tripsina, respectivamente (**Figuras 19 e 20**). Adicionalmente, sugere-se que a extração aquosa dos basidiomas de espécies do gênero *Ganoderma* é mais eficiente no processo de obtenção de inibidores de serinoproteases.

Os basidiomas selvagens de *G. lucidum* são relatados como tendo 2,39% de sua composição correspondente a inibidores de tripsina (Ogbe e Obeka, 2013). Por outro lado, a biomassa micelial da fermentação submersa de *G. lingzhi* CC22 mostrou uma atividade máxima de inibição de tripsina de 154 Tlu/mg de proteína (Pessoa et al., 2023), sugerindo que os basidiomas do cultivo axênico podem ser mais promissores na síntese dessas moléculas. Apesar da importância da tripsina

na digestão, na resposta imune e na coagulação sanguínea, a redução de sua atividade pode ser útil no tratamento de condições patológicas, como pancreatite, artrite reumatoide, fibrose cística, hipertensão, diabetes e trombose [38].

Figura 20 - Atividade de inibidores de quimotripsina nos diferentes extratos proteicos provenientes dos basidiomas de *Ganoderma lingzhi* (A) e *Ganoderma* sp. (B), cultivados em resíduos lignocelulicos.



Dados expressos com média, desvio padrão em barras. Tratamentos com a mesma letra não diferem no nível de probabilidade de 5% ($p \leq 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

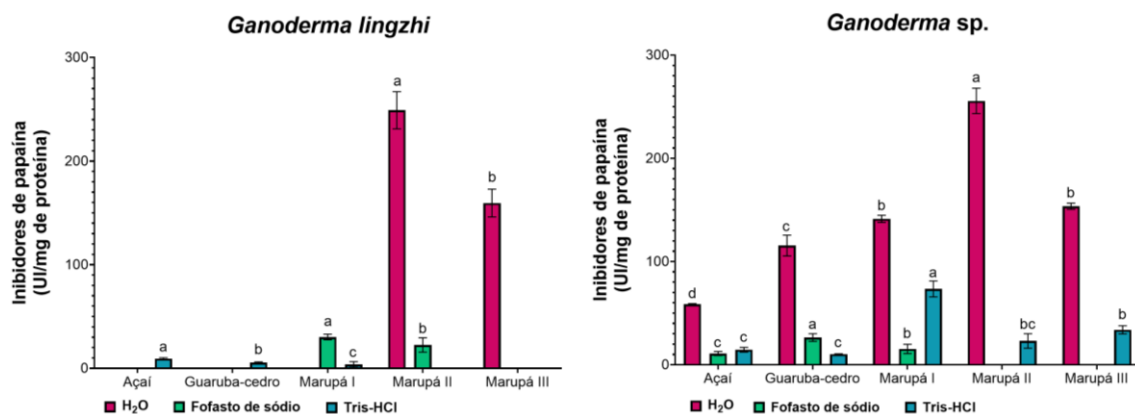
Inibidores de proteases de serina e cisteína são, respectivamente, os inibidores de proteases mais estudados (Rodríguez-Sifuentes, 2020) e têm aplicações na biomedicina, agricultura e/ou na indústria alimentícia. É importante ressaltar que essas moléculas ganharam mais destaque recentemente devido ao seu potencial como agentes terapêuticos contra a infecção pelo vírus SARS-CoV-2, principalmente por produtos naturais de baixo peso molecular (Cotabarren et al., 2020; Siewiński et al., 2022). Na pesquisa presente, os extratos aquosos demonstram alta atividade antiproteolítica, no entanto, apresentaram baixa concentração de proteínas solúveis e não mostraram bandas visíveis no SDS-PAGE. Portanto, é importante considerar que a atividade inibitória pode estar associada a compostos de baixo peso molecular, como alcaloides, peptídeos e terpenoides, que já foram relatados com potencial de inibição de proteases (Suwannarach et al., 2020).

Estudos anteriores (Lim et al., 2003) relataram a presença de inibidores de quimotripsina em extrato bruto de *G. lucidum*, com atividade específica de 67,3 Clu/mg de proteína, relacionada a 4 isoformas com diferentes especificidades de

interação enzimática, variando de 355,5 a 1172,6 Clu/mg de proteína. O extrato de Tris-HCl de *G. lucidum* é descrito como tendo inibição de quimotripsina de 65,6 Clu/mg de proteína (Lim et al., 2010). A busca por inibidores de proteases semelhantes à quimotripsina tornou-se uma tendência recentemente devido à sua possível contribuição para o tratamento da infecção por SARS-CoV-2, atuando na protease viral 3CLpro, retardando a progressão da infecção (Hartini et al., 2021).

Quanto aos inibidores de cisteínoproteases, os extratos aquosos também proporcionaram maiores atividades de inibidores de papaína. *G. lingzhi* exibiu maiores atividades quando cultivado nos substratos à base de marupá II e III, enquanto *Ganoderma* sp. apresentou inibição em todos os substratos de cultivo avaliados. Adicionalmente, ambos os fungos exibiram maiores inibições da papaína nos extratos aquosos provenientes dos basidiomas produzidos marupá II (**Figura 21**).

Figura 21. Atividade de inibidores de papaína nos diferentes extratos proteicos provenientes dos basidiomas de *Ganoderma lingzhi* (A) e *Ganoderma* sp. (B), cultivados em diferentes resíduos lignocelulósicos.



Dados expressos com média, desvio padrão em barras. Tratamentos com a mesma letra não diferem no nível de probabilidade de 5% ($p \leq 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

O substrato à base de marupá II proporcionou basidiomas com atividade inibitória de papaína semelhante tanto para o *Ganoderma* sp. quanto para o *G. lingzhi*. Nesse sentido, estudos sobre o genoma de diferentes espécies de *Ganoderma* (Ho, 2023) identificaram genes associados a proteínas como inibidores de papaína, com sequências comuns encontradas em *G. lucidum* (cepa G260125-1 e cepa Xiangnong), *G. boninense*, *G. multipileum*, *G. sinense* e *G. tsugae*, sendo

possível considerar que essas proteínas são conservadas entre as espécies de *Ganoderma*. Um estudo anterior com a biomassa micelial de *G. lingzhi* CC22 (Pessoa et al.,) também verificou uma inibição de papaína mais alta (343 Plu/mg de proteína) em comparação com tripsina e quimotripsina. Os inibidores de papaína são amplamente associados à proteção do organismo contra parasitas que usam proteases cisteína para invadir o hospedeiro, além de serem aplicados no tratamento de doenças inflamatórias (Dubey et al., 2007; Tušar et al., 2021)

Os espectros dos extratos proteicos, obtidos a partir da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR), demonstraram uma variação nos valores de transmitância conforme o substrato de cultivo e a extração de proteínas. Foram observadas várias bandas de absorção comuns nas trinta amostras, localizadas nas regiões de 3200, 2900, 1600, 1500, 1400 e 1050 cm^{-1} , o que permitiu a construção de perfis com características específicas para cada amostra, com base nos grupos funcionais químicos presentes. As diferenças nos espectros dos extratos de proteínas confirmam variações na composição molecular de todas as amostras, evidenciadas pelas variações nos valores de transmitância de acordo com o substrato de cultivo, o extrator de proteínas utilizado e, principalmente, a cepa de *Ganoderma* (**Figura 22**).

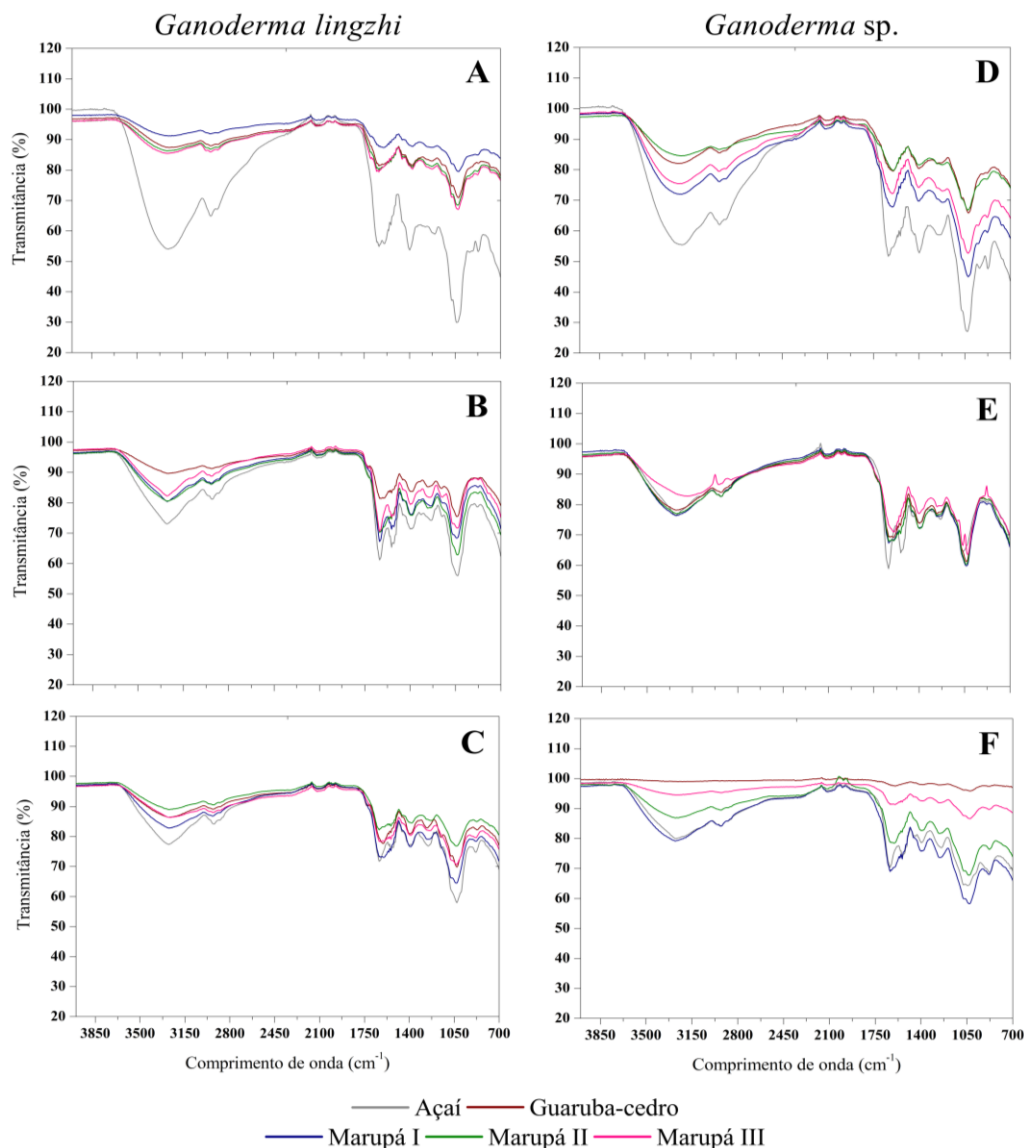
Os extratos aquosos de ambas as espécies cultivadas em açaí foram os mais semelhantes e mostraram valores de transmitância mais baixos, sugerindo uma maior incidência de grupos funcionais nessas amostras (**Figura 22A e D**). O extrato Tris-HCl de *G. lingzhi* cultivado em açaí, que apresentou uma atividade proteolítica mais alta, também exibiu picos de absorbância mais altos, o que pode estar associado a uma maior concentração das moléculas responsáveis por essa atividade (**Figura 22B**). Da mesma forma, os extratos aquosos de *Ganoderma* sp., de todos os substratos de cultivo, mostraram picos de absorbância mais altos em comparação com *G. lingzhi*, o que pode estar relacionado a uma maior incidência de inibidores de protease nessas amostras (**Figura 22D**).

Os espectros FTIR-ATR dos extratos proteicos de ambos os *Ganoderma* corroboram com estudos anteriores, nos quais, ao analisar isolados de proteína do soro de leite, foram observadas bandas nas regiões de 3268, 2961, 2926, 1638, 1410 e 1023 cm^{-1} , descritas como vibrações de estiramento características de -OH ligadas a -NH₂, presença de grupos -CH₂, grupos de amida primária e secundária

de peptídeos, e ligações -C-O, -C-C e C-OH, respectivamente, correspondendo a picos típicos de proteínas (Gbassi et al., 2012). Padrões de sinal semelhantes foram observados nos espectros FTIR-ATR de basidiomas de outros cogumelos conhecidos como "*Lingzhi*", como *G. lucidum*, *G. philippii*, *G. kunmingense*, *Amauroderma guangxiense* e *A. bataanense*, estando associados à presença de polissacarídeos, triterpenos e esteróis, mas cada amostra apresentando um padrão específico, sugerindo que essa análise pode ser usada para diferenciar espécies (Wang et al., 2019), como também foi verificado para *G. lingzhi* e *Ganoderma* sp. na presente pesquisa.

Os espectros FTIR de *G. lucidum* são descritos como sendo analisados em diferentes blocos, sendo especialmente importante a faixa de 2000 a 1500 cm⁻¹ como um guia para a ligação de polipeptídeo para o conteúdo de proteína, com um pico de absorção em aproximadamente 1648 cm⁻¹ sendo o aspecto mais significativo do conteúdo de proteína (Qiu et al., 2023). Nesse contexto, a faixa de 1700 a 1500 cm⁻¹ está correlacionada com proteínas de *Ganoderma*, como LZ-8 (Choong et al., 2023). Os dados obtidos na faixa de 1160 a 1000 cm⁻¹, que compreende o pico que apresentou a maior absorbância em todas as amostras de proteínas de *G. lingzhi* e *Ganoderma* sp., corroboram com a literatura, uma vez que já são relatados como a característica mais representativa de *Ganoderma* spp. (Choong et al., 2023).

Figura 22. Espectros de FTIR-ATR dos extratos proteicos provenientes dos basidiomas de *Ganoderma lingzhi* e *Ganoderma* sp. cultivados em diferentes resíduos lignocelulósicos e extraídos em água (A, D), tampão Tris-HCl (B, E) e fosfato de sódio (C, F).



O perfil eletroforético dos extratos aquosos (amostras de 1 a 10) de todos os basidiomas não demonstraram bandas de proteína visíveis, o que pode ser devido à baixa concentração de proteínas. No entanto, é importante considerar que a atividade de inibição de protease pode estar associada a outras moléculas além de proteínas (**Figura 23**). Todos os extratos Tris-HCl de *G. lingzhi* (amostras de 11 a 15) mostraram bandas evidentes em torno de 50 kDa, além de bandas com aproximadamente 100 kDa e abaixo de 35 kDa, ambas com baixa intensidade. O extrato do cultivo de açai, em particular, mostrou uma banda mais visível em ± 100 kDa, que é mais perceptível do que nos outros extratos (amostra 11). Os extratos

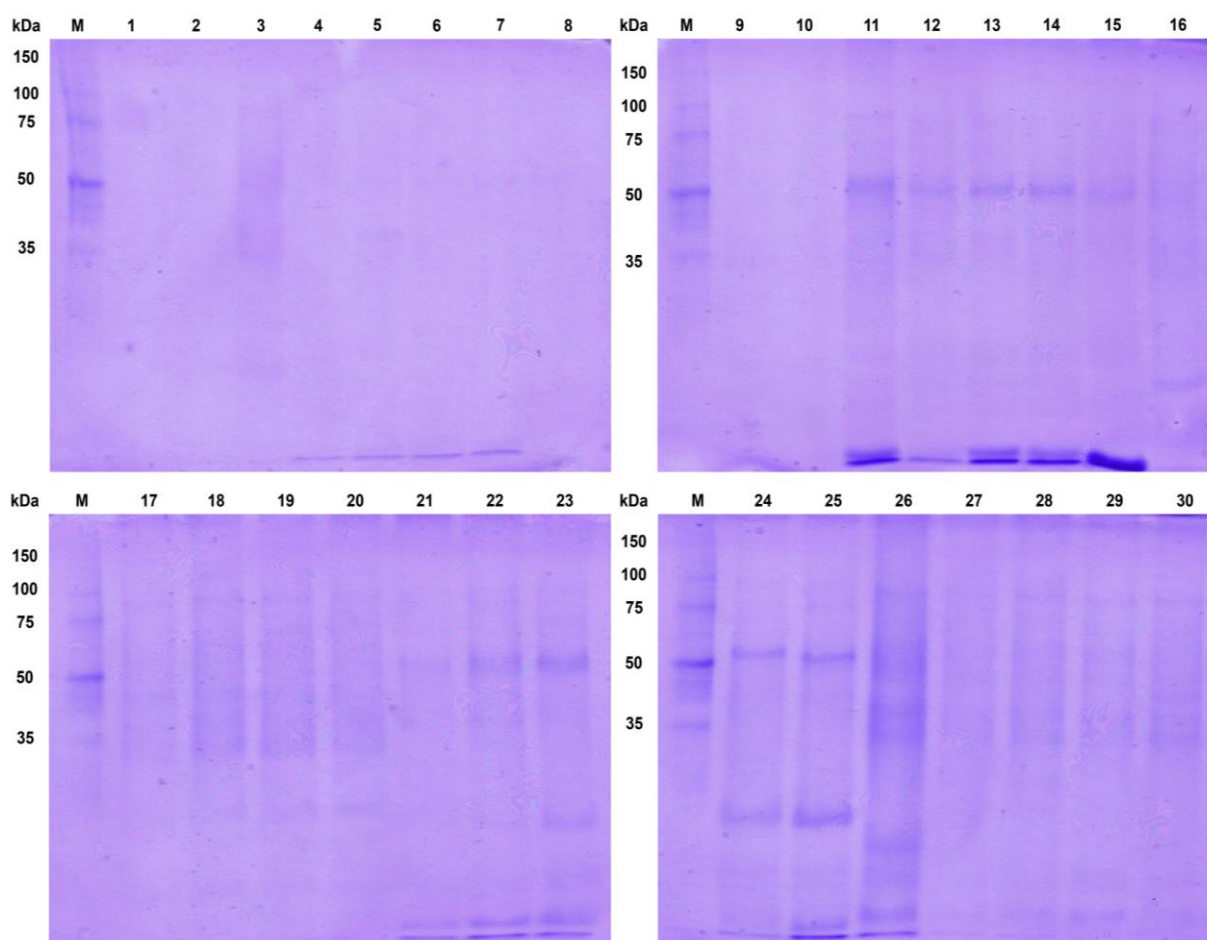
Tris-HCl de *Ganoderma* sp. (amostras de 16 a 20), por outro lado, apresentam apenas uma banda com baixa intensidade. No entanto, no extrato de resíduos de açaí (amostra 16), é possível observar bandas em 50 e 100 kDa, assim como em *G. lingzhi*, e uma banda de baixa massa molecular (± 17 kDa).

Os extratos de fosfato de sódio de *G. lingzhi* (amostras de 21 a 25) mostraram bandas de proteínas mais visíveis em torno de 55 kDa e ± 20 kDa, que são mais intensas nos extratos dos cultivos de marupá II e III (amostras 24 e 25). Os extratos de fosfato de sódio de *Ganoderma* sp. (amostras de 26 a 30) apresentam apenas bandas com baixa intensidade, sendo possível destacar bandas em ± 50 , 35, 20 e 15 kDa, principalmente no basidiocarpo do cultivo de açaí (amostra 26). A partir disso, foi possível inferir que a principal variação na obtenção de proteínas ocorre de acordo com o extrator e a cepa de *Ganoderma* utilizada, enquanto o uso de diferentes substratos leva a uma variação no conteúdo dessas proteínas.

Uma protease com atividade fibrinolítica de *G. lucidum* é relatada como sendo um dímero com massa total de 100 kDa, apresentando uma banda de 52 kDa no SDS-PAGE (Choi et al., 2000). No entanto, outro estudo relatou uma enzima fibrinolítica de *G. lucidum* com 33,2 kDa no SDS-PAGE, o que poderia ser uma protease diferente ou uma protease mutada (Kumaran et al., 2011). Em ambos os casos, é possível estabelecer uma relação com o observado no SDS-PAGE nesta pesquisa, onde os extratos de Tris-HCl de *G. lingzhi* e *Ganoderma* sp., especialmente cultivados em açaí, que apresentaram atividade fibrinolítica e bandas de proteína em 50 - 30 kDa.

Duas isoformas de inibidores foram isoladas de quimotripsina a partir do corpo de frutificação de *G. lucidum* e ambas apresentaram 17 kDa (Lim, 2003), enquanto uma proteinase A isolada a partir da biomassa micelial de *G. lucidum* apresentou 38 kDa quando analisada por SDS-PAGE (Tian e Zhang, 2005). Portanto, podemos hipotetizar que se a atividade de inibição verificada no presente trabalho se deve à presença de inibidores de protease de origem proteica, estes devem ter baixo peso molecular.

Figura 23. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) dos extratos proteicos dos basidiomas de *Ganoderma lingzhi* e *Ganoderma* sp. cultivados em resíduos lignocelulósicos da Amazônia. M: marcadores de peso molecular.



Extratos aquosos: 1- *G. lingzhi* açai, 2- *G. lingzhi* guaruba-cedro, 3- *G. lingzhi* marupá I, 4- *G. lingzhi* marupá II, 5- *G. lingzhi* marupá III, 6- *Ganoderma* sp. açai, 7- *Ganoderma* sp. guaruba-cedro, 8- *Ganoderma* sp. marupá I, 9- *Ganoderma* sp. marupá II, 10- *Ganoderma* sp. marupá III. Extratos Tris-HCl: 11- *G. lingzhi* açai, 12- *G. lingzhi* guaruba-cedro, 13- *G. lingzhi* marupá I, 14- *G. lingzhi* marupá II, 15- *G. lingzhi* marupá III, 16- *Ganoderma* sp. açai, 17- *Ganoderma* sp. guaruba-cedro, 18- *Ganoderma* sp. marupá I, 19- *Ganoderma* sp. marupá II, 20- *Ganoderma* sp. marupá III. Extratos de fosfato de sódio: 21- *G. lingzhi* açai, 22- *G. lingzhi* guaruba-cedro, 23- *G. lingzhi* marupá I, 24- *G. lingzhi* marupá II, 25- *G. lingzhi* marupá III, 26- *Ganoderma* sp. açai, 27- *Ganoderma* sp. guaruba-cedro, 28- *Ganoderma* sp. marupá I, 29- *Ganoderma* sp. marupá II, 30- *Ganoderma* sp. marupá III.

8.6 CONCLUSÃO

Embora a cepa comercial de *G. lingzhi* tenha apresentado a maior atividade proteolítica, destaca-se a possibilidade de aplicar resíduos lignocelulósicos amazônicos, especialmente açaí, como substratos para obter corpos de frutificação com essa atividade. O isolado amazônico de *Ganoderma* sp., por sua vez, mostrou atividade considerável de inibidores de protease e pode ser considerado promissor para a obtenção de moléculas com essa atividade que podem ser usadas na indústria farmacêutica, especialmente utilizando corpos de frutificação do cultivo de marupá. Nesse sentido, é importante destacar que diferentes lotes de resíduos da mesma espécie podem levar à síntese de inibidores de proteases com diferentes especificidades, o que deve ser considerado ao padronizar o processo. Por fim, a produção de extratos em TRIS-HCl é recomendada para obter proteases do basidiocarpo de *Ganoderma* spp., enquanto extratos aquosos são recomendados para obter inibidores de protease.

REFERÊNCIAS

- AL-OBAIDI, JR. Comparison of different protein extraction methods for gel-based proteomic analysis of *Ganoderma* spp. **Protein J.** 2016; 35:100-06.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemistry.** 1976; 72: 248-54.
- CHOI, H.S; YU-SEON, S.a. Fibrinolytic and antithrombotic protease from *Ganoderma lucidum*. **Mycologia.** 2000; 92: 545-552.
- CHOONG, Y.K. Preliminary results of determination of chemical changes on Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Higher Basidiomycetes) carried by Shenzhou I spaceship with FTIR and 2D-IR correlation spectroscopy. **Internacional Journal Medicine Mushrooms.** 2012; 14: 295-305.
- ČILERDŽIĆ, J; STAJIĆ, M; VUKOJEVIĆ, J. Degradation of wheat straw and oak sawdust by *Ganoderma applanatum*. **International Biodeterioration & Biodegradation Journal.** 2016; 114: 39-44.
- COLE, E.R; Mertz, E.T. Studies on plasminogen: II. A comparison of the esterolytic, caseinolytic, and fibrinolytic activities of bovine and human plasminogen. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology.** 1961; 39: 1911-19.
- CÖR, D. et al. The effects of different solvents on bioactive metabolites and “*in vitro*” antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of *Ganoderma lucidum* fruiting body and primordia extracts. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering.** 2017; 36:129-4.
- COTABARREN, J. et al. Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. **Plant Science.** 2020; 292:110398.
- DUBEY, V.K et al. Papain-like proteases: Applications of their inhibitors. **African Journal of Biotechnology.** 2007; 6: 1077-86 2012
- EKIZ, E, et L . Exploring the Potential Medicinal Benefits of *Ganoderma lucidum*: From Metabolic Disorders to Coronavirus Infections. **Foods.** 2023; 17: 1512-32.
- FONSECA, T.R.B. *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720: avaliação do crescimento, produção de basidioma e determinação da atividade proteolítica em resíduos agroindustriais. [dissertation]. [Manaus]: **Universidade Federal do Amazonas**, Manaus, 2013, 77 p.
- GBASSI, G.K, et al. Whey proteins analysis in aqueous medium and in artificial gastric and intestinal fluids. **International Journal of Biological and Chemical Sciences.** 2012; 6: 1828-37.

GRIMM, D; WÖSTEN, H.A.B. Mushroom cultivation in the circular economy. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2018; 102: 7795-803.

HARTINI, Y, et al. Biflavonoid as potential 3-chymotrypsin-like protease (3CLpro) inhibitor of SARS-Coronavirus. **Results in Chemistry**. 2021; 3: 100087.

HO, C.L. Comparative genomics analysis of *Ganoderma* orthologs involved in plant-pathogenesis. **Forests**. 2023; 14: 653-73.

KUMAKURA, K, et al. Protein components of water extracts from fruiting bodies of the reishi mushroom *Ganoderma lucidum* contribute to the production of functional molecules. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 2019; 99: 529-35.

KUMARAN S, et al. Screening of fibrinolytic protease from South Indian isolates of *Ganoderma lucidum*. **International Journal of Biological and Pharmaceutical**. 2011; 2: 431.

Kumaran, S, et al. Studies on screening, isolation and purification of a fibrinolytic protease from an isolate (VK12) of *Ganoderma lucidum* and evaluation of its antithrombotic activity. **Journal of Medical Mycology**. 2011; 52: 153-62.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 1970; 227:680-685.

LI, L.D, et al. *Ganoderma* proteins and their potential applications in cosmetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2019;103: 9239-50.

LIM, J.I, et al. Simple polyacrylamide affinity gel electrophoresis using oleic acid for the isolation of chymotrypsin inhibitor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 2010; 110: 276-80.

LIM, J.I. A simple preparative polyacrylamide gel electrophoresis for the purification of chymotrypsin inhibitor isoforms from *Ganoderma lucidum*. **Bulletin of the Korean Chemical Society**. 2003: 24; 1531-34.

MANAVALAN T, et al. Secretome analysis of *Ganoderma lucidum* cultivated in sugarcane bagasse. **Journal of Proteomics**. 2012; 77: 298-309.

MOSER, K.M; FREY, M.B. Comparison of caseinolytic and fibrinolytic assays for plasmin (fibrinolysin) in "fibrinolytic agents". **Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica**, 1966; 15: 252-72.

OGBE, A; OBEKA, A.D. Proximate, mineral and anti-nutrient composition of wild *Ganoderma lucidum*: Implication on its utilization in poultry production. **Iranian Journal of Applied Animal Science**. 2013; 3:161-66.

OSMOLOVSKIY A. A, et al.Evaluation of the Spectrum of Proteolytic Activity of Micromycetes of the Genus *Aspergillus* in relation to proteins of the hemostasis system. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**. 2022; 77: 13-137.

PANNURU P, et al. The effects of biological buffers TRIS, TAPS, TES on the stability of lysozyme. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2018; 112: 720-27.

PAVANI P, et al. The influence of sodium phosphate buffer on the stability of various proteins: Insights into protein-buffer interactions. **Journal of Molecular Liquids**. 2021; 331: 115753.

PESSOA, V.A, et al. Production of mycelial biomass, proteases and protease inhibitors by *Ganoderma lucidum* under different submerged fermentation conditions. **Brazilian Journal of Biology**. 2023; 83: 270316.

PESSOA, V.A. Análises química e quimiométrica de linhagens comerciais e amazônicas de *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* e *G. tropicum* visando inibidores proteolíticos, com ênfase na protease do HIV-1. [dissertation]. [Manaus]: **Universidade do Estado do Amazonas**, 2022, 145 p.

QIU, G, et al. Determination on tree species selection for Lingzhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes) cultivation by fourier transform infrared and two-dimensional infrared correlation spectroscopy. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. 2023; 25: 65-76.

REN, L, et al. Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**. 2014; 3: 41-51.

RODRÍGUEZ-SIFUENTES, L, et al, Legumes protease inhibitors as biopesticides and their defense mechanisms against biotic factors. **International Journal of Molecular Sciences**. 2020; 21: 3322.

ROSELLÓ-SOTO, E, et al. Application of non-conventional extraction methods: Toward a sustainable and green production of valuable compounds from mushrooms. **Food Engineering Reviews**. 2016; 8: 214-34.

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**. 2010; 26: 55-62.

SABOTIČ, J; Kos, J. Fungal protease inhibitors. Fungal metabolites: reference series in phytochemistry. **Cham: Springer**. 2015;1-33.

SIEWIŃSKI, M, et al. Use of natural cysteine protease inhibitors in limiting SARS-Co-2 fusion into human respiratory cells. **Medical Hypotheses**. 2022; 168: 110965.

SLYNKO, N.M, et al. Phylogenetic and biochemical analysis of the Reishi mushroom (*Ganoderma lucidum*) populations from Altai. **Annals of Applied Microbiology & Biotechnology Journal**. 2017; 1: 1004.

SUN, Y.F, et al. Phylogenomics and comparative genomics highlight specific genetic features in *Ganoderma* species. **Journal of Fungi**. 2022; 8: 311-34.

SUWANNARACH N, Natural bioactive compounds from fungi as potential candidates for protease inhibitors and immunomodulators to apply for coronaviruses. **Molecules**. 2020; 25:1800.

TEIXEIRA MFS. Obtenção de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* termofílicas e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de alimentos. [dissertation]. [Manaus]: **Universidade Federal do Amazonas**, 1994, 85 p.

TIAN, Y.P; ZHANG. K.C. Purification and characterization of a novel proteinase A inhibitor from *Ganoderma lucidum* by submerged fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**. 2005; 36: 357-61.

TUŠAR, L, et al. Mechanisms applied by protein inhibitors to inhibit cysteine proteases. **International Journal of Molecular Sciences**. 2021; 22: 997.

WANG, L, et al. Traditional uses, chemical components and pharmacological activities of the genus *Ganoderma* P. Karst.: a review. **RSC Advances**. 2020; 10: 42084-97.

WANG, Y.Y, et al. Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) combined with chemometrics methods for the classification of *Lingzhi* species. **Molecules**. 2019; 24: 2210-23.

WIŃSKA, K, et al. Mushrooms of the genus *Ganoderma* used to treat diabetes and insulin resistance. **Molecules**. 2019; 24: 4075.

WU, S, et al. *Ganoderma lucidum*: A comprehensive review of phytochemistry, efficacy, safety and clinical study. **Food Science and Human Wellness**. 2023; 13: 1-48.

XIE, C, et al. Secretome analysis of *Pleurotus eryngii* reveals enzymatic composition for ramie stalk degradation. **Electrophoresis**. 2016; 37: 310-20.

YUE, Y, et al. Determination and Chemotaxonomic Analysis of Lanostane Triterpenoids in the Mycelia of *Ganoderma* spp. Using Ultra-performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (I). **PlantaMed**. 2023.

ZERVAKIS, G.I; KOUTROTSIOS, G. Solid-state fermentation of plant residues and agro-industrial wastes for the production of medicinal mushrooms. Medicinal Plants and Fungi: **Recent Advances in Research and Development**. 2017; 4: 365-96.

ZHANG, H, et al. On-line immobilized trypsin microreactor for evaluating inhibitory activity of phenolic acids by capillary electrophoresis and molecular docking. **Food Chemistry**. 2020; 310: 125823.

