

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RICARDO LUIZ VIEIRA

PEPTÍDEOS BIOATIVOS COM PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ANTI-
HIPERTENSIVAS DERIVADOS DE MACROFUNGOS COMESTÍVEIS E
MEDICINAIS

CURITIBA

2021

RICARDO LUIZ VIEIRA

PEPTÍDEOS BIOATIVOS COM PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ANTI-
HIPERTENSIVAS DERIVADOS DE MACROFUNGOS COMESTÍVEIS E
MEDICINAIS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia – Área de concentração: Biotecnologia Agroalimentar.

Orientadora: Profa. Dra. Susan Grace Karp

Coordenador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2021

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Vieira, Ricardo Luiz

Peptídeos bioativos com propriedades antioxidantes e anti-hipertensivas derivados de macrofungos comestíveis e medicinais. / Ricardo Luiz Vieira. – Curitiba, 2021.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Susan Grace Karp.

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol.

1. Peptídeos. 2. Antioxidantes. 3. Cogumelos comestíveis. 4. Fermentação. I. Karp, Susan Grace. II. Soccol, Carlos Ricardo. III. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. IV. Título.

Bibliotecário: Nilson Carlos Vieira Junior CRB-9/1797



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

ATA Nº167

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

No dia oito de outubro de dois mil e vinte e um às 15:00 horas, na sala 03 (DEFESA FECHADA), Prédio de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação do mestrando **RICARDO LUIZ VIEIRA**, intitulada: **PEPTÍDEOS BIOATIVOS COM PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ANTI-HIPERTENSIVAS DERIVADOS DE MACROFUNGOS COMESTÍVEIS E MEDICINAIS**, sob orientação da Profa. Dra. SUSAN GRACE KARP. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: SUSAN GRACE KARP (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), CARLOS RICARDO SOCCOL (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), MARIA GIOVANA BINDER PAGNONCELLI (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ), ADENISE LORENCI WOICIECHOWSKI (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, SUSAN GRACE KARP, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 08 de Outubro de 2021.

Assinatura Eletrônica
13/10/2021 11:32:29.0
SUSAN GRACE KARP
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
20/10/2021 11:03:38.0
CARLOS RICARDO SOCCOL
Coorientador(a)

Assinatura Eletrônica
13/10/2021 16:44:32.0
MARIA GIOVANA BINDER PAGNONCELLI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
18/10/2021 10:35:08.0
ADENISE LORENCI WOICIECHOWSKI
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **RICARDO LUIZ VIEIRA** intitulada: **PEPTÍDEOS BIOATIVOS COM PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ANTI-HIPERTENSIVAS DERIVADOS DE MACROFUNGOS COMESTÍVEIS E MEDICINAIS**, sob orientação da Profa. Dra. SUSAN GRACE KARP, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 08 de Outubro de 2021.

Assinatura Eletrônica
13/10/2021 11:32:29.0
SUSAN GRACE KARP
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
20/10/2021 11:03:38.0
CARLOS RICARDO SOCCOL
Coorientador(a)

Assinatura Eletrônica
13/10/2021 16:44:32.0
MARIA GIOVANA BINDER PAGNONCELLI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
18/10/2021 10:35:08.0
ADENISE LORENCI WOICIECHOWSKI
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

*Dedico este trabalho a DEUS,
ao meu filho JOÃO, presente dEle, que nasceu junto com a ideia de retornar
às pesquisas, e à sua mãe e minha companheira, PRICILA – duas fontes constantes
de irritação e alegria durante a realização deste projeto – AMO!*

*Dedico este trabalho também ao leitor
E ao contribuinte de impostos, que financiou esta pesquisa*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e pelo cuidado constante. Agradeço aos meus pais, Homero Vieira Neto e Deocélia do R. Vieira, por toda a dedicação e apoio na minha criação e por possibilitarem que eu tenha uma educação de qualidade. À minha sogra Márcia Camilotti que sempre nos ajudou prontamente em vários aspectos, em todos os momentos. Ao meu sogro Luiz C. D. Costa, por toda ajuda ao longo desse período difícil. À minha companheira Pricila, sempre dedicada e amorosa nos cuidados do nosso lar e do nosso filho João, por fazerem parte da minha vida. Aos meus irmãos e cunhados, Homero, Anderson, Elaine, Juarez, Miriane, Tatiane e Marco e todos os sobrinhos (a lista é grande), que sempre me apoiaram nessa caminhada. A todos os demais familiares e amigos, vocês também foram essenciais.

Agradeço ao Professor **Dr. Carlos Ricardo Soccol, H.D.R.**, idealizador e mentor do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, pelo seu pioneirismo, visão e orientação, e pela oportunidade de participar de um projeto tão incrível relacionado a minha vocação natural. À Professora **Dr.^a Susan Grace Karp**, pela sua orientação, didática, disponibilidade, bom humor e paciência, sempre solícita e com soluções alternativas para os problemas que foram se apresentando ao longo deste projeto.

Aos professores **Dra. Vanete Thomaz Soccol**, pela sua experiência e apoio, pela disciplina de biologia molecular, profunda e útil, e pela permissão do uso dos equipamentos, sem os quais não teria resultados, **Dr. Júlio César de Carvalho**, pelas dicas valiosas nos processos de purificação e hidrólise enzimática, **Dra. Cristine Rodrigues**, pelo auxílio na parte analítica. A todos os demais professores do PPGEBB, com quem tive contato durante as disciplinas, **Dra. Adenise Lorenci Wojciechowski**, **Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe**, **Dr. Gilberto Vinícius de Melo Pereira**, **Dra. Adriane Bianchi Pedroni Medeiros**, **Dr. Luiz Alberto Júnior Letti**: o aprendizado foi imenso. Também aos colegas técnicos de departamento, Ronei Ezequiel da Paixão, Otacílio P. Tomaz Junior, Natasha Amálio Teixeira e Mitiyo Fukuda Miyaoka, e à secretária Marta Helena Szadkoski, pela dedicação e profissionalismo. À professora **Dra. Fabiola Iagher** e ao técnico Dr. Fábio Caetano, do Depto. de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, pela concessão e pronto auxílio no uso do Tecan.

Ao naturalista André A. R. de Meijer, pela identificação de grande parte do material coletado. Ao amigo Dr. Renato A. Yamasita, por permitir coletas na sua RPPN e à família Camilotti, pelas coletas na sua propriedade. Ao Dr. Orlei A. Negrello Filho e o Dr. João R. Costa Alves, pelas revisões em parte do manuscrito. Aos Professores Dr. Francisco Vítola, Dra. Ida Chapaval Pimentel e Dra. Ivana Neiva, pelo material indicado para estudo e pelas cartas de recomendação. A todos os colegas da pós-graduação e do laboratório de Bioprocessos, com especial menção para Sabrina Mores, Leonardo Herrmann, Rafaela Penha, Jéssica Viesser, Jair Rosário, Zulma Sarmiento, Patrícia Oliveira e Carlos Dalmas, alguns dos que compartilharam as angústias diárias da bancada de pesquisa, obrigado pelas ajudas salvadoras! Por fim, à Universidade Federal do Paraná, pela licença concedida para qualificação profissional e pela estrutura disponível, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos, pelo nível de excelência e à CAPES, pelo financiamento da pesquisa.

MUITO OBRIGADO!!!

AS PALAVRAS DO MESTRE, FILHO DE DAVI, REI EM JERUSALÉM:
"QUE GRANDE INUTILIDADE! ", DIZ O MESTRE. "QUE GRANDE INUTILIDADE! NADA FAZ SENTIDO! "
O QUE O HOMEM GANHA COM TODO O SEU TRABALHO EM QUE TANTO SE ESFORÇA DEBAIXO DO SOL?
GERAÇÕES VÊM E GERAÇÕES VÃO, MAS A TERRA PERMANECE PARA SEMPRE. O SOL SE LEVANTA E O SOL SE PÕE, E DEPRESSA VOLTA AO LUGAR DE ONDE SE LEVANTA.
O VENTO SOPRA PARA O SUL E VIRA PARA O NORTE; DÁ VOLTAS E MAIS VOLTAS, SEGUINDO SEMPRE O SEU CURSO.
TODOS OS RIOS VÃO PARA O MAR, CONTUDO O MAR NUNCA SE ENCHE; AINDA QUE SEMPRE CORRAM PARA LÁ, PARA LÁ VOLTAM A CORRER.
TODAS AS COISAS TRAZEM CANSEIRA. O HOMEM NÃO É CAPAZ DE DESCREVÊ-LAS; OS OLHOS NUNCA SE SACIAM DE VER, NEM OS OUVIDOS DE OUVIR.
O QUE FOI TORNARÁ A SER, O QUE FOI FEITO SE FARÁ NOVAMENTE; NÃO HÁ NADA NOVO DEBAIXO DO SOL.
HAVERÁ ALGO DE QUE SE POSSA DIZER: "VEJA! ISTO É NOVO! "? NÃO! JÁ EXISTIU HÁ MUITO TEMPO; BEM ANTES DA NOSSA ÉPOCA.
NINGUÉM SE LEMBRA DOS QUE VIVERAM NA ANTIGÜIDADE, E AQUELES QUE AINDA VIRÃO TAMPOUCO SERÃO LEMBRADOS PELOS QUE VIEREM DEPOIS DELES.
EU, O MESTRE, FUI REI DE ISRAEL EM JERUSALÉM.
DEDIQUEI-ME A INVESTIGAR E A USAR A SABEDORIA PARA EXPLORAR TUDO QUE É FEITO DEBAIXO DO CÉU. QUE FARDO PESADO DEUS PÔS SOBRE OS HOMENS!
TENHO VISTO TUDO O QUE É FEITO DEBAIXO DO SOL; TUDO É INÚTIL, É CORRER ATRÁS DO VENTO!
O QUE É TORTO NÃO PODE SER ENDIREITADO; O QUE ESTÁ FALTANDO NÃO PODE SER CONTADO.
PENSEI COMIGO MESMO: EU ME TORNEI FAMOSO E ULTRAPASSEI EM SABEDORIA TODOS OS QUE GOVERNARAM JERUSALÉM ANTES DE MIM; DE FATO ADQUIRI MUITA SABEDORIA E CONHECIMENTO.
ASSIM EU ME ESFORCEI PARA COMPREENDER A SABEDORIA, BEM COMO A LOUCURA E A INSENSATEZ, MAS APRENDI QUE ISSO TAMBÉM É CORRER ATRÁS DO VENTO. POIS QUANTO MAIOR A SABEDORIA MAIOR O SOFRIMENTO; E QUANTO MAIOR O CONHECIMENTO, MAIOR O DESGOSTO.

[ECLESIASTES 1:1-18](#)

**"Que o teu alimento seja o teu remédio,
Que o teu remédio seja o teu alimento"**

Hipócrates

RESUMO

Peptídeos bioativos (PB) são pequenos fragmentos de proteína com sequências específicas de aminoácidos, responsáveis por algum benefício ao organismo humano, por meio de atividade hipotensiva, antioxidante, antiviral, antimicrobiana, antidiabética, antitumoral, neuro protetora, opioide ou outras. Alguns apresentam multifunções em uma mesma sequência. Macrofungos (cogumelos) são um grupo diversificado de organismos que representam uma importante fonte de compostos nutricionais e medicinais. PB derivados de macrofungos são uma classe destes compostos ainda pouco estudados, principalmente com relação aos derivados do micélio. O objetivo deste trabalho foi obter PB de cepas de macrofungos e quantificar suas atividades biológicas antioxidante, antimicrobiana e anti-hipertensiva. Cepas de macrofungos foram cultivados por fermentação submersa com agitação orbital, estacionária ou mista. A biomassa produzida foi filtrada, lavada com água deionizada e liofilizada. A extração proteica foi por ultrassonicação seguida de precipitação isoelétrica, ou por extração aquosa direta da biomassa seca. A separação das frações peptídicas foi por ultrafiltração tangencial com limite de massa molecular nas faixas <3, 3-5, 5-10, e >10 kDa. A hidrólise enzimática das frações >10 kDa, livres de peptídeos endógenos, foi realizada com Protolicheterm – 145, uma serinoprotease alcalina derivada de *Bacillus licheniformis*. As frações peptídicas resultantes da ultrafiltração e da hidrólise foram analisadas quanto à sua concentração proteica em µg/mL e conservadas a -80 °C. As bioatividades testadas foram: (1) antioxidante por % de limpeza do radical DPPH, (2) inibição crescimento de microrganismos patógenos, e (3), inibição da enzima conversora da angiotensina (ACE). A biomassa final (Xf) das cepas variou entre 1,21-12,53 g L⁻¹ (peso seco), com composição proteica (Kjeldahl) entre 3,41-25,51%, de 25 cepas analisadas, em base seca. Os maiores valores de biomassa e % proteína foram para a cepa F1, um novo isolado selvagem de *Pleurotus pulmonarius*, após 7 dias de incubação (12,53 g L⁻¹ e 25,51%, respectivamente). A correlação entre as variáveis Xf e composição proteica (%) foi nula (R² = 0,0005). O rendimento proteico (Yp/x) variou entre cepas da mesma espécie. A hidrólise enzimática foi realizada em 21 dessas cepas. O grau de hidrólise variou entre 41,77 e 100 %. Das 54 frações peptídicas testadas para inibição de ACE: 3 mostraram inibição entre 93-90 %; 15 entre 85-80%; 12 entre 79-70%; 4 entre 65-62%, 1 de 47,87%, 1 de 31,97% e 1 de 27,21% (total de 33 amostras com atividade inibitória). O potencial de limpeza de DPPH foi entre 25,13 e 83,78% para 35 frações; nenhuma das frações testadas demonstrou atividade antimicrobiana. As frações mais proeminentes em bioatividade foram liofilizadas para purificação em cromatografia e sequenciamento em MALDI-TOF/MS. Este trabalho demonstra a importância do estudo de PB em macrofungos.

Palavras-chave: 1. Macrofungos. 2. Peptídeos bioativos. 3. Fermentação submersa. 6. Antioxidantes 7. Hipotensivos.

ABSTRACT

Bioactive peptides (BP) are small protein fragments with specific amino acid sequences responsible for some benefit to the human body, through hypotensive, antioxidant, antiviral, antimicrobial, antidiabetic, antitumor, neuroprotective, opioid, or other activities. Some BP present multifunctions in the same sequence. Macrofungi (mushrooms) are a diverse group of organisms that represent an important source of nutritional and medicinal compounds. BPs derived from macrofungi are a class of these compounds that have been scarcely studied, especially with respect to those derived from the mycelium. The objective of this work was to obtain BP from macrofungal strains and quantify their antioxidant, antimicrobial and antihypertensive biological activities. Macrofungal strains were cultivated by submerged fermentation with orbital, stationary or mixed shaking. The produced biomass was filtered, washed with deionized water, and lyophilized, and protein extraction was performed by ultrasonication followed by isoelectric precipitation, or by direct aqueous extraction from the dried biomass. Separation of the peptide fractions was by tangential ultrafiltration with molecular mass limit in the ranges <3, 3-5, 5-10, and >10 kDa. Enzymatic hydrolysis of the >10 kDa fractions, free of endogenous peptides, was performed with Protolicheterm - 145, an alkaline serinoprotease derived from *Bacillus licheniformis*. The peptide fractions resulting from ultrafiltration and hydrolysis were analyzed for their protein concentration in $\mu\text{g/mL}$ and preserved at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. The bioactivities tested were: (1) antioxidant by % DPPH radical scavenging, (2) growth inhibition for pathogenic microorganisms; (3) angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition. The final biomass (X_f) of the strains ranged from $1.21\text{--}12.53\text{ g L}^{-1}$ (dry weight), with protein composition (Kjeldahl) between $3.41\text{--}25.51\%$, of 25 strains analyzed, on dry basis. The highest biomass and protein values were for strain F1, a new wild isolate of *Pleurotus pulmonarius*, after 7 days of incubation (12.53 g L^{-1} and 25.51% , respectively). The correlation between variables X_f and protein composition (%) was null ($R^2 = 0.0005$). The protein yield (Y_p/x) varied between strains of the same species. Enzymatic hydrolysis was performed on 21 of these strains. The degree of hydrolysis ranged from 41.77 to 100% . Of the 54 peptide fractions tested for ACE inhibition: 3 showed inhibition between $93\text{--}90\%$; 15 between $85\text{--}80\%$; 12 between $79\text{--}70\%$; 4 between $65\text{--}62\%$, 1 of 47.87% , 1 of 31.97% and 1 of 27.21% (total 33 samples with inhibitory activity). The DPPH scavenging potential was between 25.13 and 83.78% for 35 fractions; none of the fractions tested demonstrated antimicrobial activity. The fractions most prominent in bioactivity were freeze-dried for chromatography purification and MALDI-TOF/MS sequencing. This work demonstrates the importance of studying PB in macrofungi.

Keywords: 1. Macrofungi. 2. Bioactive peptides. 3. Submerged fermentation. 4. Antioxidants. 4. Hypotensives.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CAUSAS DE MORTE NO MUNDO	19
FIGURA 2 – DIVERSIDADE DE MACROFUNGOS E A BIOTECNOLOGIA.....	22
FIGURA 3 – COGUMELO FÓSSIL MAIS ANTIGO.....	25
FIGURA 4 – ALGUNS EXEMPLOS DE BIOATIVIDADE <i>IN VITRO</i>	36
FIGURA 5 – LIGAÇÃO PEPTÍDICA.....	37
FIGURA 6 – CAMINHOS CONVERGENTES PARA OBTENÇÃO DE PB.....	39
FIGURA 7 – FLUXOGRAMA PARA OBTENÇÃO DE PBM	41
FIGURA 8 – ENTRADA E TEMPESTADE INFLAMATÓRIA DA COVID-19	45
FIGURA 9 – SÍTIO DE FORMAÇÃO DO HORMÔNIO PEPTÍDICO	48
FIGURA 10 – CLIVAGENS DE ACE SOBRE ANG-I.....	49
FIGURA 11 – RELAÇÕES ENTRE ACE E ACE2	52
FIGURA 12 – DOCUMENTOS PUBLICADOS FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	57
FIGURA 13 – NUVEM DE PATENTES	58
FIGURA 14 – FLUXOGRAMA GERAL PARA IDENTIFICAÇÃO PBM.....	74
FIGURA 15 – PRINCIPAIS ÁREAS DE COLETA	88
FIGURA 16 – ALGUMAS IMAGENS DE CAMPO DAS ESPÉCIES.....	89
FIGURA 17 – PRESERVAÇÃO E REATIVAÇÃO DAS CEPAS.....	90
FIGURA 18 – FERMENTAÇÃO SUBMERSA: MICÉLIO.....	92

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – CRESCIMENTO POPULACIONAL VS COGUMELOS	33
GRÁFICO 2 – BIOMASSA (X) VS. CEPAS FERMENTADAS	91
GRÁFICO 3 – PORCENTAGEM PROTEÍNA POR KJELDAHL	93
GRÁFICO 4 – CORRELAÇÃO X VS %PROTEÍNA	94
GRÁFICO 5 – CONCENTRAÇÃO PROTEICA SUSPENSÃO CELULAR.....	95
GRÁFICO 6 – CONCENTRAÇÃO PROTEICA AO LONGO DA HIDRÓLISE	96

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – COMPATIBILIDADE SISTEMA TETRAPOLAR.....	67
QUADRO 2 – PATENTES PB NO BRASIL.....	73
QUADRO 3 – MEIO CULTURA FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	77
QUADRO 4 – DILUIÇÃO PADRÃO FLUORESCENTE NO TAMPÃO.....	85
QUADRO 5 – FRAÇÕES PEPTÍDICAS LIMPEZA DPPH.....	99

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DOIS SISTEMAS DE FERMENTAÇÃO	60
TABELA 2 – LISTA DE CEPAS CENBAPAR	75
TABELA 3 – TOTAL CEPAS SELVAGENS E COMERCIAIS	87
TABELA 4 – CONCENTRAÇÃO PROTEÍNA EXTRATO AQUOSO	98
TABELA 5 – FRAÇÕES PEPTÍDICAS COM BIOATIVIDADE DUPLA.....	101
TABELA 6 – ALGUNS PEPTÍDEOS ANTI-HIPERTENSIVOS	107

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

% - porcentagem

aa - amino ácidos

ACE - *Angiotensin Converting Enzyme*

ACEi - *Angiotensin Converting Enzyme inhibitors*

AT₁ e AT₂ – Receptores de angiotensina 1 e 2

ATCC – *American Type Culture Collection, USA*

BCA – *Bicinchoninic Acid*

BDA – Batata Dextrose Ágar

BSA – *Bovine Serum Albumine*

CENBAPAR – Centro de Biotecnologia Agroindustrial e Agroalimentar do Paraná

CMC – Carboxi-metil celulose

CMCy – Carboxi-metil celulose e extrato de levedura (*yeast*)

COVID-19 – *Coronavirus Disease 2019*

DCV - doenças cardiovasculares

DSE – Disfunção sistólica esquerda

DMSO – *Dimethyl Sulfoxide*

DPPH – *1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl radical*

E/S – Razão Enzima/Substrato

ECA – Enzima Conversora da Angiotensina

GRAS – *Generally regarded as safe*

GI – Gastrointestinal

HC – Hospital de Clínicas da UFPR

HMG-CoA – Hidroxi-metil-glutaril coenzima A redutase

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

iECA - Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina

IC₅₀ – *Inhibitory Concentration to reach 50% of effect*

IFN – interferon

ITS – *internal transcriber spacer*

MALDI-TOF-MS – *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight – Mass Spectrometry*

MCM – *Mushroom Complete Medium*

MEA – *Malt Extract Agar*

MH – Mueller-Hinton (meio)
MHA – Mueller-Hinton Ágar
MHB - Mueller-Hinton *Broth*
MIC – *Minimal inhibitory concentration*
MRSA- *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*
NFκβ – *Nuclear Factor Kappa Beta*
NGF – *Nerve Growth Factor*
NO – Oxido Nítrico
PAM – Peptídeos Antimicrobianos
PB - Peptídeos Bioativos
PBM - Peptídeos Bioativos Derivados de Macrofungos
RAAS – *Renin Angiotensin Aldosterone System*
ROS – *Reactive oxigen species*
SARS-CoV – *Severe Acute Respiratory Sindrome – Corona Virus*
SDS-PAGE – *Sodium Dodecil Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*
SmF – *Submerged Fermentation* (Fermentação Submersa)
SSF – *Solid State Fermentation* (Fermentação no Estado Sólido)
TNF – *Tumor Necrosis Factor*
TNFα – *Tumor Necrosis Factor alpha*
UFC – unidade formadora de colônia

20 L-AMINOÁCIDOS:

Alanina	Ala	A
Aspartato	Asp	B
Cisteína	Cys	C
Aspartato	Asp	D
Glutamato	Glu	E
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Lisina	Lys	L
Metionina	Met	M
Asparagina	Asn	N
Prolina	Pro	P
Glutamina	Gln	Q
Arginina	Arg	R
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Valina	Val	V
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - temperatura em graus Celsius

© - copyright marca registrada

μ_{\max} – taxa máxima específica de crescimento (h^{-1} ou d^{-1})

μg – micrograma

mg – miligrama

g – grama

kg - kilograma

h – hora

d – dia

min – minutos

s – segundos

kDa - kilo-daltons = 1000 daltons: Da, unidade de massa atômica, equivalente a 1/12 do átomo de carbono no estado fundamental, ou $1 \text{ Da} = 1,660539066(60) \times 10^{-27} \text{g}$

rpm – rotações por minuto

L – litro

mL – mililitro: $\text{L} \cdot 10^{-3}$

μL – microlitro: $\text{L} \cdot 10^{-6}$

m – metro

mm – milímetro: $\text{m} \cdot 10^{-3}$

μm – micrometro: $\text{m} \cdot 10^{-6}$

nm – nanômetro: $\text{m} \cdot 10^{-9}$

mol – massa molecular de uma substância expressa em molécula-grama (nmol; μmol)
= $6,02214076 \times 10^{23}$ entidades = 1 mol

M – molaridade, ou concentração molar = $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, ou simplesmente molar

pH – potencial hidrogeniônico: $-\log[\text{H}^+]$

T – Temperatura, normalmente em °C

X_f – concentração final de biomassa em g/L

Y_p – rendimento proteico em mg/g

W – watt, unidade de potência, equivale a $(1\text{kg} \cdot \text{m}^2) \cdot \text{s}^{-3}$

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	18
1.2 OBJETIVOS	20
1.2.1 Objetivo geral	20
1.2.2 Objetivos específicos.....	20
1.3 METODOLOGIA DA PESQUISA	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. BIOLOGIA E DIVERSIDADE DOS MACROFUNGOS	23
2.2 COLETA, ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DAS CULTURAS	28
2.3 MACROFUNGOS: ETNOMICOLOGIA E A INDÚSTRIA DE COGUMELOS	32
2.4 BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA DOS MACROFUNGOS	34
2.5 MACROFUNGOS: USOS MEDICINAIS E TESTES DE BIOATIVIDADE	35
2.6 PEPTÍDEOS BIOATIVOS	36
2.7 MACROFUNGOS: PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E ANTIVIRAIS	41
2.8 PEPTÍDEOS INIBIDORES DE ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA	46
2.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	52
2.10 IMUNOMODULADORES: IMUNOSSUPRESSORES, IMUNOESTIMULADORES E IMUNOADJUVANTES	54
2.10.1 Proteínas Imunomoduladoras Fúngicas (FIPs)	56
2.11 BIOPROCESSOS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MACROFUNGOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA	57
2.12 BIOLOGIA SINTÉTICA E OUTRAS ESTRATÉGIAS GENÉTICAS PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DERIVADOS DE MACROFUNGOS	65
2.13 PATENTES	71
3. MATERIAL E MÉTODOS	74
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	74
3.2. MÉTODOS DE ISOLAMENTO	76
3.3. MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO	76
3.4. MEIOS DE CULTURA	76
3.5. SELEÇÃO DE INÓCULOS E FERMENTAÇÃO SUBMERSA (SMF)	77
3.6. SEPARAÇÃO DA BIOMASSA DO CALDO DE FERMENTAÇÃO	78
3.7. ROMPIMENTO CELULAR E PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO PROTEICA	79

3.7.1. Avaliação de um método alternativo de extração proteica	79
3.8. SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES PEPTÍDICAS	80
3.9. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES PEPTÍDICAS ...	80
3.10. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA	81
3.11. TESTES DE BIOATIVIDADE	82
3.11.1. Limpeza do radical DPPH (poder antioxidante).....	82
3.11.2. Inibição do crescimento microbiano (bactérias Gram positivas, Gram negativas e levedura (<i>Candida albicans</i>)	83
3.11.3. Ensaio de Inibição da atividade enzimática ACE	84
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4.1. ISOLAMENTO E CONSERVAÇÃO DE MACROFUNGOS	87
4.2. FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA	91
4.2.1 Composição proteica da biomassa	93
4.3 ROMPIMENTO CELULAR E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	94
4.4 OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ENDÓGENOS	96
4.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	96
4.6 AVALIAÇÃO DE MÉTODO ALTERNATIVO DE EXTRAÇÃO PROTEICA PARA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ENDÓGENOS E HIDROLISADOS	97
4.7 TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	98
4.7.1 Atividade antioxidante	98
4.7.2 Atividade antimicrobiana	100
4.7.3 Atividade de inibição de ACE	100
4.8. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	101
5. CONCLUSÕES	106
5.1. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	106
REFERÊNCIAS.....	108
APÊNDICE 1 – CURVAS PADRÃO PARA TESTES DE DETEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	123
APÊNDICE 2 – RESULTADOS TOTAIS DE INIBIÇÃO ACE.....	125
APÊNDICE 3 – REAGENTES E EQUIPAMENTOS	130
ANEXO 1 – MEGAFILOGENIA PARA OS MACROFUNGOS (<i>EXCETO ASCOMYCOTA</i>)	134

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, quinto maior país em território, tem se destacado nas últimas décadas como um dos maiores produtores agrícolas, principalmente agora na supersafra de 2020, como maior produtor mundial de soja. Uma pujança que caracteriza a economia secular do nosso país como grande exportador de produtos primários, ou das chamadas *comodities*. Mas não há glórias nessa questão, uma vez que o país ainda é extremamente dependente de produtos de alto valor agregado, sobretudo na área de biotecnologia, onde a maioria dos insumos, não apenas neste campo da indústria, mas inclusive, ainda precisa ser importado. Paradoxalmente, grande parte do sucesso no agronegócio hoje é resultado direto do esforço de pesquisa em biotecnologia produzida aqui mesmo no país, principalmente nas instituições públicas.

A biologia das células eucarióticas tem melhorado a compreensão de muitos de seus detalhes nas últimas décadas. Os avanços na Bioquímica, Genética, Biologia Celular e Molecular têm possibilitado conhecer a função, estrutura e sequências de macromoléculas biológicas, levando a novos campos do conhecimento denominados “ômicas”¹. Desta forma, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos foram sequenciados e estudados com base em suas propriedades, estrutura, função e papéis no contexto do metabolismo e da biologia celular.

Atenção especial tem sido dada ao reino dos fungos, uma vez que eles contam com importantes aplicações econômicas e biotecnológicas para a sociedade humana, notadamente desde o início do século XIX. Os sete filos reconhecidos deste reino eucariótico apresentam uma enorme diversidade metabólica, genética, morfológica e ecológica, com uma taxonomia de alta complexidade. Macrofungos são uma classificação artificial para as espécies pertencentes ao sub-reino (ou superfilo)

¹ Ômicas: são um novo campo do conhecimento, onde são estudadas as sequências de moléculas da vida, como por exemplo, a genômica, que estuda o sequenciamento das bases nitrogenadas do DNA, a transcriptômica, que estuda o sequenciamento das bases dos RNAs transcritos a partir deste DNA, a proteômica, que estuda as sequências de aminoácidos das proteínas traduzidas dos mRNAs. Se estende assim por diante, como p. ex., a metabolômica (proteínas exclusivas do metabolismo), secretômica (proteínas e biopolímeros extracelulares), peptidômica, dentre outras, que se traduz na forma, dinâmica, estrutura e função dos seres vivos (fonte: o autor).

Dykaria, que compreende os fungos perfeitos, ou também chamados fungos superiores.

Estes organismos são considerados fábricas celulares de compostos bioativos desde a antiguidade, e são utilizados na medicina tradicional com diversas aplicações que vão muito além da gastronomia. Dentre estes compostos, os mais estudados são os polissacarídeos, que demonstram variada bioatividade, desde imunomodulação, atividade anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana.

Dentre os compostos bioativos produzidos pelos fungos existem basicamente duas classes principais, os compostos de alto peso molecular e de os de baixo peso molecular. Nesta última classe se destacam os compostos fenólicos, que atuam como inibidores de radicais livres, decompositores de peróxidos, quelantes de metais e na limpeza de espécies reativas de oxigênio derivados do metabolismo normal. Também incluem alguns pigmentos responsáveis pela coloração dos tecidos fúngicos ou compostos voláteis capazes de inibição ou estimulação de outros organismos, competidores ou não, produzidos pela interação entre as espécies.

Nos compostos de alto peso molecular se destacam os polissacarídeos, as proteínas e os ácidos nucleicos. Há ainda a ligação entre estes polímeros formando complexos polissacaró-proteicos, ou os nucleotídeos modificados e as interações destes com os lipídeos. Tais compostos podem ter entre centenas até milhares de subunidades funcionais.

Os peptídeos bioativos (PB) são uma classe dentre estes compostos, constituídos normalmente entre 2 e 20 aminoácidos, com peso molecular geralmente inferior a 10kDa. A base de dados BIOPEP aponta 45 atividades biológicas atribuídas aos PB, obtidos a partir de diversas origens, que incluem principalmente o leite, a carne e as plantas. Estas atividades estão concentradas em 4 principais grandes grupos², onde os estudos mais se consolidaram, com as demais atividades reunidas em uma categoria única, que será mais comentada adiante.

Apesar do interesse recente nos PB, o estudo destas moléculas fundamentais teve início em 1900, com estudos sobre os derivados da caseína. A sua ingestão levou a melhores resultados na calcificação óssea de crianças que sofriam de raquitismo. Os macrofungos ainda participam de maneira tímida nesta contribuição, fato que nos

² Quatro principais atividades atribuídas aos PB, por ordem de número de estudos: (1) Anti-hipertensiva, (2) Antioxidante, (3) Antimicrobiana e (4) Antidiabética. (5) outras categorias: diversas atividades

motiva o presente empreendimento, principalmente pelo fato de estarmos investigando espécies inéditas na literatura para esse campo do conhecimento.

1.1 JUSTIFICATIVA

O cenário inusitado e caótico de 2020 nos mostrou na prática a extrema necessidade da pesquisa científica aplicada para descoberta de novos compostos com propriedades medicinais e farmacológicas. As doenças emergentes se mostraram uma dura realidade não apenas para a saúde e a vida das pessoas, mas também como uma ameaça à economia de todos os países, com sérias restrições impostas à sociedade, causando desemprego em massa e outros impactos que ainda serão sentidos em médio e longo prazo.

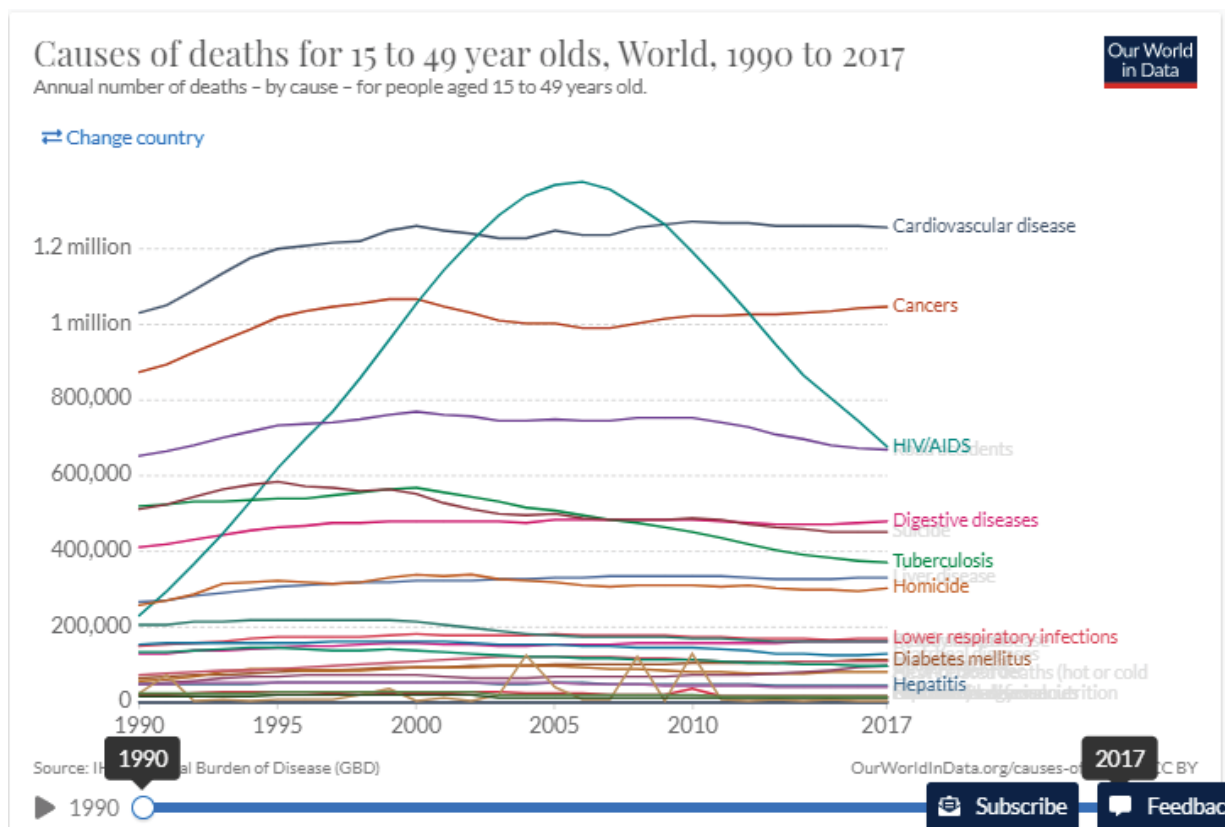
Desta forma, uma pesquisa de bioprospecção não apenas é necessária como urgente. A descoberta de novos compostos com múltiplas atividades biológicas deve ser prioridade para contenção de vírus ou outros organismos patogênicos multirresistentes, assim como fatores para tratamento preventivo ou profilático não apenas para estas doenças, mas também as morbidades crônicas ou negligenciadas, de modo a dar suporte aos pacientes em tratamento, diminuindo assim, os severos impactos de situações semelhantes ao caso da pandemia mundial causada pelo SARS-Cov-2, tanto no presente, como em novos surgimentos eventuais.

De acordo com a base de dados *ourworldindata*TM, a principal causa de morte no mundo ainda eram as doenças cardiovasculares (DCV) (1990-2017, figura 1), que causam um prejuízo imenso por atingirem a faixa etária populacional que está normalmente no auge da sua produtividade (14-49 anos). Estas doenças estão muitas vezes associadas ao consumo excessivo de sal, amidos e gorduras saturadas, além de hábitos danosos, como sedentarismo, tabagismo e álcool, fatores genéticos ou comorbidades, como diabetes, colesterol alto e obesidade.

Estas doenças (DCV) são de um espectro amplo de morbidades, que culminam geralmente na morte por falência do coração, dos rins ou por acidentes vasculares. A hipertensão, ou pressão sanguínea elevada, é uma morbidade crônica e relacionada com diversas destas e outras doenças, incluindo a osteoartrite (CHING, K. et al., 2021). O sistema enzimático (ACE) de conversão da angiotensina I para sua forma ativa e hipertensiva, angiotensina II, tem sido o principal alvo para investigação de tratamentos mais eficazes. Será detalhado mais a fundo na seção 2.8.

Outro aspecto interessante para direcionar as triagens na bioprospecção são os efeitos antioxidantes, que estão correlacionados muitas vezes com propriedades antivirais, antimicrobianas, anti-inflamatórias, anti-hipertensivas e antitumorais (SALINAS y GOMEZ, 2017; BACH, F. et al., 2019; CHUNG, D. J. et al., 2017; TOYOKUNI, S., 2016). Neste sentido, este trabalho pode servir de base para busca de novos compostos com propriedades anti-hipertensivas, anti-inflamatórias e antivirais, inclusive para contenção da COVID-19, tão importantes neste momento da história (CHATUVERDI, V. K. et al, 2018), pois compostos com afinidades pelos receptores ACE e ACE2 podem exibir propriedades bloqueadoras da entrada deste vírus (mais detalhes na seção 2.7).

FIGURA 1 – CAUSAS DE MORTE NO MUNDO 15-49 ANOS (1990-2017)



FONTE: <https://ourworldindata.org/causes-of-death> (CC BY)










Principais causas de morte no mundo (1990-2017), faixa etária mais produtiva da sociedade (14-49 anos): as doenças cardiovasculares como causa mais proeminente, acima dos cânceres, acidentes de trânsito, HIV, doenças digestivas, tuberculose, homicídios, doenças respiratórias inferiores, diabetes mellitus e hepatites.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é a bioprospecção de compostos bioativos, mais especificamente peptídeos (PB), produzidos por macromicetos cultivados em fermentação submersa (SmF).

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Isolar cepas de macrofungos selvagens ou comercialmente cultivados; 
- b) Testar a sua estabilidade em cultivo artificial e preservação prolongada em uma coleção sistematizada em biorrepositório; 
- c) Realizar depósitos destes isolados em outras coleções de microrganismos como forma de *back up* para conservação e utilização destas cepas para continuidade deste trabalho e em outros projetos de pesquisa. 
- d) Testar a capacidade de amplificação da biomassa das cepas em meio de cultivo submerso (líquido), com agitação orbital, estacionário ou misto. 
- e) Isolar o conteúdo proteico das células produzidas e mensurar o rendimento de proteína e de peptídeos endógenos resultantes da fermentação submersa. 
- f) Realizar hidrólise enzimática deste conteúdo proteico como forma de obter novos peptídeos. 
- g) Realizar a separação por ultrafiltração tangencial com limiar molecular das frações peptídicas em faixas de <3, 3-5, 5-10 e >10 kDa. 
- h) Utilizar as frações peptídicas resultantes para testes preliminares de potencial de atividade biológica *in vitro*, tais como atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-hipertensiva. 
- i) Caso algumas frações peptídicas apresentem atividade biológica proeminente, realizar a purificação, identificação, caracterização parcial e sequenciamento dos possíveis peptídeos candidatos a novos alimentos funcionais ou medicamentos. 

Legenda dos ícones para índice de progresso: (1) 😊 não realizado, mas com possibilidade, (2) 😬 realizado com sucesso parcial, com possibilidade de continuidade ou otimização, (3) 😄 realizado com sucesso, com possibilidade de replicação e otimização, (4) 🟢 resultado consolidado e publicado.

1.3 METODOLOGIA DA PESQUISA

Este é um trabalho de pesquisa, que se define como um procedimento racional e sistemático, que tem por objetivo alcançar respostas para os problemas propostos, com uso do **método científico**, que é um conjunto de etapas e processos que devem ser alcançados ordenadamente, na investigação dos fatos e na busca pela verdade.

“Para o espírito científico qualquer conhecimento é uma resposta a uma pergunta. Se não tem pergunta, não pode ter conhecimento científico.” (JAPIASSÚ, 1999, P. 84).

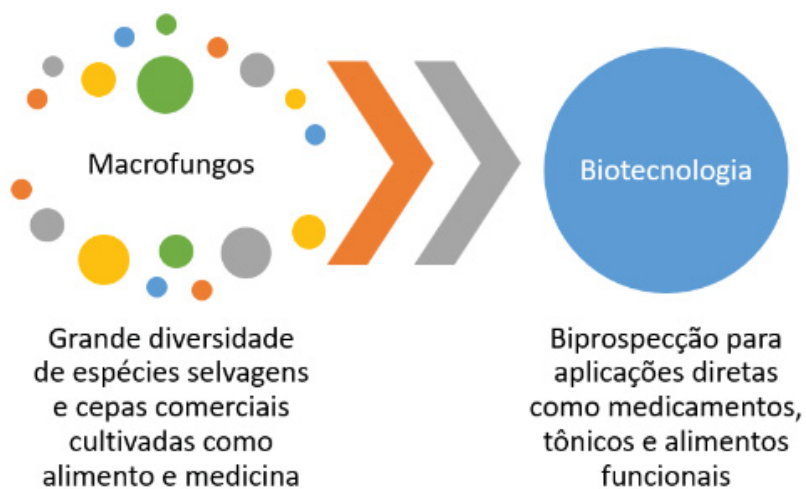
Para isso, este trabalho envolve a pesquisa exploratória, que é a familiarização com o fenômeno a se aprofundar, seguida da pesquisa descritiva, que serve para explorarmos os conteúdos observados com profundidade. Nesta etapa, o tipo de pesquisa foi bibliográfico e experimental. Bibliografia a partir das fontes de informação da literatura especializada, sobretudo nas bases de dados **Scimedirect, Web of Science, Pubmed, Google scholar, NCBI, ProQuest One Academic**, além de outros suportes como **Mendeley, Scopus, EndNote, Academia.edu e Researchgate**. Para a busca de patentes foram utilizadas as plataformas **Derwent Innovation Index, The Lens, Google Patents, INPI**, dentre outras. Na análise *in silico* foram utilizadas várias plataformas, dentre elas a **Integrity Drugs Discovery (Cortelis), Reaxys (Elsevier), BIOPEP, Galaxy**, etc. A parte experimental consiste de coletas de amostras na natureza para isolamento e análise no laboratório.

Assim, o conhecimento gerado por este esforço pretende ser um conhecimento factual (real), sistematizado, que possa ser reproduzido por outros pares e que seja passível de verificação, na qual as hipóteses podem ser testadas.

Constitui-se, portanto, de um conhecimento falível, no sentido em que constantemente novas descobertas podem vir de encontro aos modelos adotados

neste empreendimento, o que pode tornar este conhecimento renovado ou modificado, ou ainda, obsoleto.

FIGURA 2 – DIVERSIDADE DE MACROFUNGOS E A BIOTECNOLOGIA



FONTE: O autor (2021). – A realidade complexa da natureza sistematizada com a pesquisa

2. REVISÃO DE LITERATURA

O objetivo desta seção é verificar o atual estado da arte e da ciência envolvida na pesquisa e produção biotecnológica dos organismos alvo deste trabalho.

2.1. BIOLOGIA E DIVERSIDADE DOS MACROFUNGOS

Os **macrofungos** são um grupo artificial do reino *Fungi* (*Eukaryota: Opisthokonta*). Comporta aqueles fungos capazes de produzir órgãos reprodutivos conspícuos, tanto epígeos quanto hipógeos, ou seja, na superfície ou subsuperfície do solo, distinguíveis a olho nu e que podem ser manipulados com as mãos (CHANG & MILES, 1992). Inclui espécies classificadas nos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*, formando o sub-reino *Dykaria*. Mais de 95% das espécies deste grupo, assim como nos demais 4-5 filos do reino, são **microfungos** (MULLER, G. M., BILLS, G. F. e FOSTER, M., 2004).

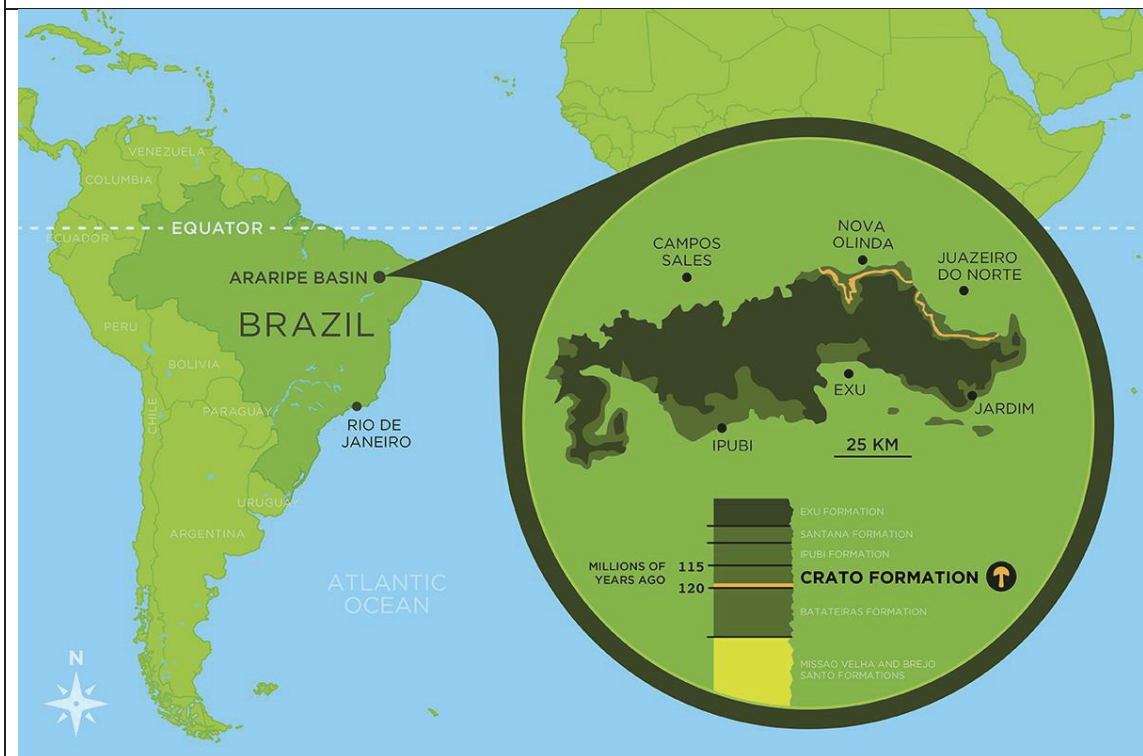
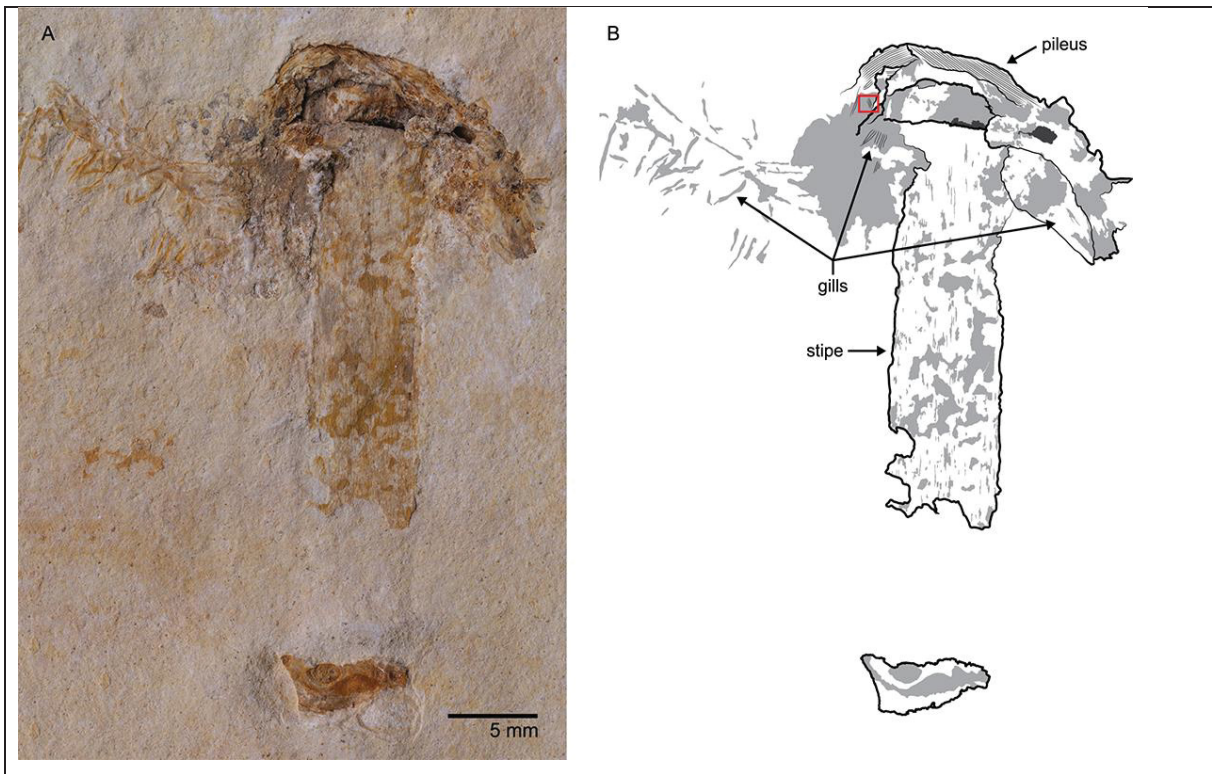
Macrofungos compreendem o grupo de organismos capaz de formar órgãos multicelulares macroscópicos onde ocorre a reprodução sexuada: os cogumelos³. São um grupo diversificado, com taxonomia difícil e ampla diversidade ecológica e metabólica. Produzem as formas clássicas pileadas-estiptadas mais conhecidas, os chapéus “agaricoides” (*Agaricaceae*); também desenvolvem as “orelhas de pau” (*Auriculariales* e *Polyporales*), os fungos coraloides (e.g.: *Ramaria* spp.), gelatinosos (e.g.: *Tremella* spp.), ninhos de passarinho (e.g.: *Cyathus* spp.), ou outras formas exóticas como *Clathrus* spp., os dedos de defunto do gênero *Xilaria* (*Ascomycota*), as estrelas-da-terra e as batatas de pó (*Geastrum* spp., *Scleroderma* spp. ou *Lycoperdon* spp.), as saias fálicas *Phallus* spp., e as morelas e as trufas (hipógeos) (*Ascomycota*). Estes são apenas alguns exemplos de membros desses dois filos, *Basidiomycota* e *Ascomycota* (*Eukaryota: Opisthokonta: Fungi: Eumycota: Dykaria*). O restante das espécies neste reino são microfungos incapazes de produzir tais órgãos sexuais macroscópicos diferenciados. O cogumelo é o órgão reprodutor conspícuo onde ocorre a relação sexual, ou recombinação genética por meiose, normalmente entre dois núcleos haploides diferentes e compatíveis, gerando, na

³ Cogumelos possuem vários sinônimos para este termo, tais como corpo de frutificação, carpóforo, esporóforo, esporocarpo, etc. com os mais recomendados atualmente para basidioma e/ou ascoma.

maioria dos casos, uma prole de núcleos haploides recombinantes, com variações de ciclos de vida entre as espécies. Este aspecto reprodutivo dos macrofungos é totalmente relevante do ponto de vista de que podemos reconhecer diferentes linhagens e indivíduos, que será discutido com detalhes adiante. Esses grupos de organismos exercem um papel importante na decomposição da matéria orgânica em solos, reciclando carbono e nutrientes. Alguns deles podem formar relações simbióticas especiais com as plantas, ou mesmo atacá-las e parasitá-las. Podem assumir a forma de parasitas em tecidos animais, ou se comportar semelhantes a predadores de outros fungos, bactérias ou animais, neste último caso, equipados com anéis de captura ou iscas sensíveis, comumente encontrados em fungos nematófagos. O micélio dos fungos se desenvolve a partir da germinação de esporos, tanto sexuais quanto assexuais, ou por fragmentação das células mãe do próprio micélio, que infestam a superfície do substrato, penetrando e envolvendo a matéria orgânica morta, no caso dos saprófagos, ou formando associações simbióticas com células vivas, como os líquens e associações micorrízicas e endofíticas, ou ainda, parasitando e predando outros organismos e tecidos vivos, tanto de plantas, outros fungos ou animais, com especial menção para os fungos entomopatogênicos, no complexo de espécies de *Ophiocordyceps*.

A sistemática e evolução deste grupo tem permanecido incógnita até anos recentes, quando o advento das novas tecnologias de sequenciamento do DNA ou a geração de códigos de barra para identificação a partir da região ITS ou outras, o que elucidou muito das relações e distinções entre as espécies e os complexos de espécies. Uma recente publicação (VARGA *et al.*, 2019), estabeleceu uma relação mais ordenada entre Basidiomycota, gerando uma árvore filogenética ampla e elucidativa sobre as relações entre os principais grupos classificados nesta subdivisão (ANEXO 1). Encontrou-se uma grande correlação entre a irradiação explosiva dos clados de cogumelos com a diversificação de Gimnospermas e Angiospermas no período Jurássico. Outra descoberta recente e relevante foi o achado do fóssil de macromiceto mais antigo do planeta (HEADS *et al.*, 2017) na formação Crato, bacia do Araripe, no estado do Ceará: um espécime preservado (figura 3) de um fruto agaricoide, pileado-estipitado, denominado *Gondwanagaricites magnificus*, com datação estimada em cerca de 120 milhões de anos, de quando América e África ainda eram um único continente (Gondwana).

FIGURA 3. Cogumelo fóssil mais antigo



in Heads SW, Miller AN, Crane JL, Thomas MJ, Ruffatto DM, Methven AS, et al. (2017) The oldest fossil mushroom. PLoS ONE 12(6): e0178327. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178327> © 2017 Heads et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

A estimativa do número total de espécies deste reino tem variado pronunciadamente ao longo das décadas. Ainda no início do século XIX, o micólogo pioneiro Elias Fries predisse que este grupo estaria dentre os organismos mais diversos dentre as plantas, equivalente aos insetos do reino animal. Não obstante que os fungos não pertencem ao reino vegetal, mas sim, muito mais próximos dos animais, quase 200 anos depois desta hipótese a estimativa para o número de espécies deste grupo flutuou de 1,5 milhões de espécies nos 1990 para vertiginosos 10 milhões (LOCEY, 2016; HEALEWATERS, D. *et al.*, 2020) até a década passada, haja visto o assombroso número de novas espécies descritas a cada ano em todos os grupos, o que ainda pode representar apenas uma pequena fração do total existente. Os macrofungos estão entre os tipos mais estudados dentre os fungos. Mesmo assim está longe de ser saturado, pois apenas 6 espécies têm sido mais intensivamente estudadas. As estimativas conservadoras para o número de macrofungos estão entre 30.000 e 264.000 espécies (KIRK, P.M. *et al.* 2008), mas o número de espécies descritas ainda se encontra em curva exponencial nos 10 últimos anos (CANNON, P. *et al.*, 2018). A última lista de espécies fúngicas para o Brasil foi publicada em 2015 (MAIA *et al.*, 2015), e consta de 5.719 espécies, divididas em 1.246 gêneros, 102 ordens e 13 filos (6 destes filos não são fungos verdadeiros) até aquele momento. O trabalho de MENOLI JR., N & SÁNCHEZ-GARCÍA, M., 2020, fez uso da taxonomia molecular de marcadores de DNA das regiões ITS, SSU, LSU, tefi- α , β -tubulina, rpb1, actina, quitina sintase e ATP6 disponíveis no *GeneBank*. Baseando-se em marcadores exclusivos como indicadores de origem para as amostras como sendo brasileiras, as sequências geradas mostraram uma distribuição de 70% para Ascomycota, 18,1% para Basidiomycota, 10% não identificado, e 1% para o restante. De acordo com ANDRÉ A. R. DE MEIJER, (comunicação pessoal), que publicou uma lista preliminar de cerca de 1200 espécies de macrofungos para o estado do Paraná em 2006 (MEIJER, 2006), corrigida e suplementada em 2010 (MEIJER, 2010), a estimativa para nosso estado está entre 7 e 10 mil espécies, com cerca de 2.000 que podem ser descritas nos próximos anos, haja visto o aumento de trabalhos de sistemática voltados para este grupo.

O estado do Paraná foi naturalmente dotado de um dos mais ricos *hotspots* de biodiversidade do mundo (REAKA-KUDLA, M. L. *et al.*, 1997) mas, infelizmente, nossa história recente o negligenciou e, como sabiamente preveniu o geólogo

Reinhardt Maack, em seu clássico *Geografia Física do Estado do Paraná*, hoje destruímos quase 98% de nossas ricas paisagens originais:

“Em pouco tempo as regiões de florestas primitivas estarão totalmente destruídas no estado do Paraná. As últimas reservas de florestas virgens podem durar até uma geração. O destino da floresta já está traçado, pois o estado não criou as reservas naturais necessárias em tempo hábil. Após o seu desaparecimento, a ciência pouco saberá sobre as plantas que caracterizam com suas sutilezas o macro e microclima de uma região. Talvez as encostas da Serra do Mar e suas respectivas regiões altas ainda exibam vegetação por um período mais longo; mas a floresta das terras altas do interior dentro de algumas décadas dará lugar a plantações, arbustos secundários e pequenas áreas de reflorestamento.” (MAACK, R., 1968).

Ainda que o desenvolvimento social e econômico de nossa região tenha sido elevado nas últimas décadas, o mesmo não foi alcançado pela consciência ambiental, e nos mantemos como um dos estados líderes do país no desmatamento. Um dos fatores mais importantes que contribuem para essa dura realidade pode ser o desconhecimento sobre a importância e o papel da biodiversidade e dos serviços ecossistêmicos, seja pela riqueza de diversidade e seus usos na indústria e na tecnologia, assim como a capacidade destes em remediar efeitos climáticos adversos e na proteção dos recursos hídricos e da erosão dos solos.

A situação atual exige uma necessidade urgente de estudar e conhecer os pequenos fragmentos remanescentes de florestas nativas antes da próxima geração, pois esperamos o desaparecimento total pelo crescimento urbano e populacional, bem como a pressão econômica por mais terras cultiváveis.

Alguns poucos esforços feitos por naturalistas para descrever e estudar nossa flora, fauna e, notavelmente, nossa funga (MEIJER, 2008), ainda não foram suficientes para nos dar o conhecimento sobre a importância de nossa rica biodiversidade.

Os organismos vivos sempre foram testados como alimento ou remédio em potencial, e o desmatamento também sempre foi um fenômeno mundial. Porém, foi somente após as demonstrações, a partir do início do século 20, da capacidade dos microrganismos em produzir moléculas úteis, de combustíveis a antibióticos, que a

humanidade passou a olhar com mais atenção para a biodiversidade como fonte potencial de produtos. Mesmo com tantas espécies existentes de macrofungos, apenas 7 são utilizadas na alimentação humana e animal na escala mega industrial, com cerca de 35 em escala industrial e 700 sendo empregadas de alguma forma como coleta ou produção para fins medicinais, alimentícios ou demais aplicações ambientais ou industriais.

2.2 COLETA, ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DAS CULTURAS

Antes de se iniciar qualquer estudo de monitoramento e coleta de macrofungos o pesquisador deve realizar estudos preliminares para diagnóstico. Elementos essenciais incluem o mapeamento da área de estudo, a caracterização da vegetação, da fauna, do clima, do solo, até mesmo da geologia. Estes fatores serão importantes para se caracterizar a funga existente ao longo do período estudado, servindo de parâmetros importantes para a análise ecológica e de biodiversidade.

A caracterização do substrato, principalmente as espécies vegetais e arbóreas associadas às ocorrências são de fundamental importância. Servem tanto para a classificação correta dos táxons quanto para direcionar os estudos de laboratório envolvendo a investigação de potenciais biotecnológicos. Os macrofungos apresentam uma estreita relação com o substrato ou hospedeiro, o que irá representar também o seu hábito de associação (simbionte, parasita ou decompositor). Todas estas informações enriquecem a compreensão do pesquisador sobre as características das espécies coletadas, e deverá também auxiliar a programação de novas coletas.

Uma vez definidos os parâmetros acima, a coleta de campo é a parte prática, onde será necessário o preparo de materiais para coleta, anotação e registro fotográfico. A correta identificação da amostra é de suma importância, e deve ser de fácil acesso, seguindo-se uma codificação sequencial simples, que depois será escrutinada com calma e detalhamento após a incursão de campo, associando-se as características com a amostra na ficha de coleta.

Uma escala funcional de trabalho deverá ser elaborada de modo a não sobrecarregar o turno, respeitando a capacidade para aproveitar totalmente o material coletado. Desta forma, para coletas mais longas deve-se planejar as guarnições de

materiais necessários tanto para o trabalho em si, quanto para a manutenção dos pesquisadores em campo, que inclui, transporte, alimentação, alojamento e logística.

Ao se coletar amostras de macrofungos, todas as informações possíveis deverão ser levantadas principalmente *in situ*, e a preservação adequada para a identificação por especialistas *ex situ* é sempre recomendada, pois muitas das características dos macrofungos para identificação requerem análise em microscopia óptica. Para isso, a equipe de coleta deverá providenciar previamente todas os materiais necessários para herborização correta (MULLER, G. M., BILLS, G. F. e FOSTER, M., 2004).

Para o isolamento, o mais indicado é a transferência de tecidos internos dos carpóforos, diretamente para os meios de cultura. Estes podem ser feitos no campo, o que garante o frescor e vitalidade do material e diminui a possibilidade de contaminação. Nesta estratégia, são retiradas hifas generativas diferenciadas ou indiferenciadas, sendo mais fácil a partir carpóforos monomíticos⁴. No grupo dimítico, está incluído a maioria dos fungos rígidos de *Polyporales*. Este procedimento pode ser feito numa estação de trabalho própria e portátil, tal como um acampamento, caso o sítio de coleta não seja próximo da base de pesquisa principal. Desta forma, o dia pode ser dividido em metade com incursões para coleta, e metade com o processamento das amostras para isolamento. Outras estratégias de isolamento de macrofungos também são possíveis, mas não serão discutidas neste trabalho.

A manutenção das culturas por longos períodos é uma necessidade fundamental para se manter um banco de células ou um biorrepositório, principalmente devido à sua importância industrial, comercial e biotecnológica, de modo que os resultados obtidos pelas pesquisas sejam estáveis a longo prazo. As culturas estoque, principalmente de cogumelos, são mantidas, normalmente, por métodos de transferência seriada, ou subculturas, transferindo-se o micélio de uma cultura velha para outra nova com meio fresco. Esta técnica, além de dispendiosa do ponto de vista de tempo, trabalho e material investido acarreta outros problemas mais sérios, como a degeneração das culturas e risco de contaminação. Pode levar ao prejuízo ou perda total dos estoques vivos, além da necessidade de transferências

⁴ MONOMÍTICO: Termo usado para o basidiocarpo com sistema hifal unicamente formado por hifas generativas. No sistema DIMÍTICO o basidiocarpo é composto tanto por hifas generativas quanto hifas estruturais estéreis, por isso, mais difícil de obter sucesso no isolamento vegetativo.

por pelo menos uma vez no ano. Dentre as alterações causadas por esta prática, estão o declínio da taxa de crescimento, alterações fisiológicas, genéticas ou morfológicas, principalmente quando cultivados em meios sintéticos.

O desenvolvimento da preservação de culturas vem sendo buscado como forma de substituição desta prática para eliminar estes problemas. Uma das primeiras estratégias para se diminuir a necessidade de transferência é a manutenção das culturas em baixas temperaturas. Normalmente, as transferências seriadas são diminuídas mantendo-se a 4 °C, mas não pode ser universalmente aplicada, pois existem espécies que não toleram esta temperatura. Outras estratégias tem sido a diminuição da exposição ao oxigênio, selando-se a superfície da cultura com parafina ou óleo mineral estéril, podendo assim ser mantidas a 15 °C. Entretanto, estas estratégias ainda são insuficientes para dirimir os problemas causados pela transferência seriada. Por outro lado, a preservação em nitrogênio líquido tem se mostrado como a mais eficiente forma de preservação para células e microrganismos de um modo geral, mostrando alta fidedignidade na recuperação dos estoques vivos. Todavia, esta prática requer uma constante reposição do nível de nitrogênio líquido, havendo necessidade de mão de obra e maquinário específico para produção do nitrogênio.

Outra forma de criopreservação tem sido a manutenção das culturas em -80 °C, com o uso de ultrafreezers, hoje em dia mais comuns nos laboratórios. De qualquer maneira, estes equipamentos também não são tão baratos e requerem uma manutenção periódica do seu mecanismo e da isolação. Necessitam de fontes alternativas de suprimento de energia em caso de queda no abastecimento normal. Além disso, recomenda-se sempre que haja pelo menos UM *back up* dos estoques em mais de um equipamento em local diferente. Quanto a preservação em -80 °C, resta ainda acrescentar que a técnica desenvolvida para preservação de fungos neste sistema vêm sendo aperfeiçoada ao longo das duas últimas décadas, partindo-se de uma delicada transferência de discos de ágar para tubos com algum criopreservante, com necessidade de pré-congelamento lento e linear, além do descongelamento rápido para se obter sucesso na reativação.

KITAMOTO, Y. et al. (2002), desenvolveram um método alternativo para criopreservação a -80 °C, que consiste em substituição do meio de ágar por serragem mais algum criopreservante. Testaram diferentes concentrações em conjunto com a umidade ideal e encontraram bons resultados utilizando 10% glicerol e umidade a

65%, com congelamento rápido e preservação por até 6 anos, sem alteração das características iniciais das linhagens de cogumelos (66 cepas), dispensando a necessidade do pré-congelamento.

VOYRON et al. (2009), apresentam um sistema para monitoramento da vitalidade e da fidelidade genética das cepas de acordo com o método de preservação, comparando a liofilização e o ultracongelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 15 cepas. Testaram 12 diferentes protocolos para liofilização destes isolados, com diferentes meios e criopreservantes, de modo que dois protocolos de liofilização são os mais indicados. A liofilização apresentou alterações morfológicas e genéticas em alguns dos isolados, enquanto que a criopreservação a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ não apresentou nenhuma. Alguns perfis metabólicos das enzimas foram alterados de alguma maneira por ambos os métodos. De qualquer forma, ambos os métodos se mostraram viáveis para preservação *ex-situ* dos fenótipos das culturas, sendo recomendada a criopreservação a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. A liofilização utilizando leite desnatado comum de prateleira como solução de suspensão tem sido feita com grande sucesso para mais 50.000 cepas de fungos, sendo um método eficaz para crioproteção intracelular.

O trabalho de JUNIOR et. al, 2014, demonstrou um método alternativo para criopreservação de *Agaricus subrufescens* a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mais simples e barato do que as suspensões com criopreservante. Utilizando apenas a semente de trigo com endosperma rígido, colonizada com o micélio e selada em canudos de plástico contendo 4 a 5 sementes, foi possível preservar as características das cepas por períodos de 2 e 5 anos. Demonstrou-se que este método também foi eficaz para outros basidiomicetos. Além disso, este mesmo grupo, em outro trabalho prévio, demonstrou que esta técnica é ineficaz a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para *A. subrufescens*.

Outro método mais antigo, barato, simples e bem consolidado é o da hidrostase do micélio, também conhecido como CASTELANI (1934, 1967), que obteve bons resultados estocando fungos patogênicos por até 20 anos. Este método representa, principalmente, a ajuda em postergar o laborioso procedimento de transferência de tecidos. Mas, esta prática apresenta os mesmos obstáculos com relação à perda da vitalidade e as demais alterações conjugadas. Além disso, também apresenta outras limitações, de forma que novas variantes têm sido desenvolvidas recentemente, como p. ex., MONTSERRAT et al., 2014, que desenvolveram um protocolo alternativo com discos de papel filtro depositados na superfície do meio ao redor do inóculo no mesmo

momento de semeadura. Estes discos serão retirados sem o ágar após a expansão da colônia e armazenadas nos criotubos com água destilada esterilizada.

Apesar deste método apresentar várias facilidades como a simplicidade e fácil reprodutibilidade, estudos mostraram que alguns isolados mantidos nestas condições apresentam graus de pleomorfismos, como alteração das características originais da cultura, perda da vitalidade e esterilidade. Neste contexto, o método de hidrostase pode ser aplicado com facilidade para preservação por longos períodos, evitando os inconvenientes da transferência seriada, mas não pode ser o único método para preservação dos isolados.

2.3 MACROFUNGOS: ETNOMICOLOGIA E A INDÚSTRIA DE COGUMELOS

Etnomicologia é o campo de estudo que investiga as relações dos usos tradicionais dos fungos pelos humanos. Os macrofungos têm sido empregues para fins biotecnológicos desde os primórdios da humanidade. Os registros arqueológicos demonstram a interatividade do ser humano com estes organismos desde há muito tempo (ZIED, D. C. & PARDO-GIMENEZ, A. 2017; SINGH, B. P. et al., 2018):

- a) Registros rupestres demonstram antiga relação cultural e religiosa;
- b) Registros históricos a.C. (escritos) dos babilônicos, persas, gregos e romanos;
- c) Registros diversos de povos mais recentes;
 - Siberianos, Incas, Astecas, Maias;
 - povos indígenas de vários países;

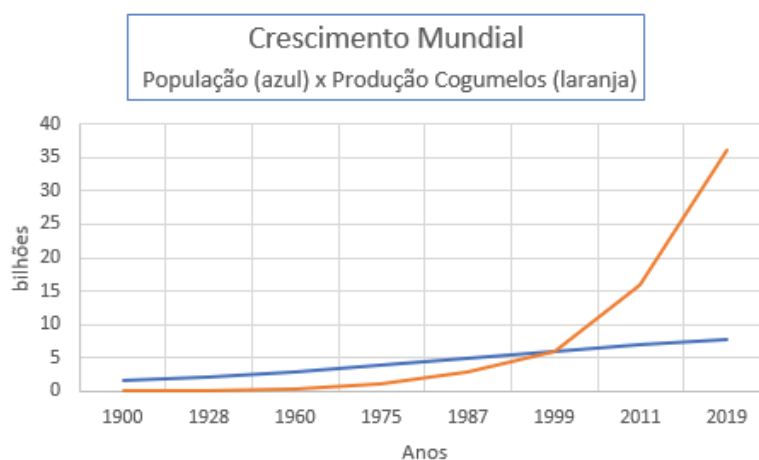
Segundo Theophrastus (500 B.C.), as trufas são “um fenômeno natural de alta complexidade, sem caule, raízes, gemas, botões ou folhas” (SHARPLES, R. W. & WINTER, D. W., 1983). As trufas são fungos hipógeos que despertaram grande interesse desde os tempos dos faraós, onde era servida como sobremesa exclusiva para a realeza. Estes fungos hipógeos eram consumidos por todas as grandes civilizações da antiguidade, com centenas de registros escritos, com grande valor, até que recentemente a sua coleta contínua os tornaram artigos mais baratos e populares como recentemente observado no mercado do Cairo (TRAPPE, 1990). Esporos de *Boletus edulis* foram encontrados em remanescentes de dentes de uma mulher o paleolítico, sugerindo que o consumo intencional vem desde aqueles tempos (POWER, 2015). Dois fragmentos de *Piptoporus betulinus*, um cogumelo conhecido e

estudado atualmente pelas suas propriedades medicinais enquanto cicatrizante, foram encontrados no conjunto mumificado do “homem do gelo”, um indivíduo que viveu cerca de 5000 anos atrás, encontrado nos alpes suíços (PEITNER et al., 1998).

Sociedades micófilas ou mico fóbicas tem registrado sua impressão ao longo da história da humanidade com distinção. Nações africanas tem sua aversão por fungos tóxicos conservada na sua tradição oral, enquanto que sociedades micófilas, tem o seu consumo e principalmente o cultivo derivado desse conhecimento, como é o caso da China e do Japão. O Brasil ainda pode ser um caso de micofobia, refletido pela baixa produção e consumo, algo que tem sido gradualmente revertido recentemente. Já para a tradição indígena nativa mostra que este grupo sempre foi utilizado, seja como alimento⁵ (SANÖMA, 2016) ou como utensílio, como p. ex., o cachimbo confeccionado a partir de madeiras infestadas com o pseudo-esclerócio de *Panus (Lentinus) velutinus*, desde o Mato Grosso do Sul, a Região Sul do Brasil, até os pampas argentinos, incluindo o Paraguai (KELLER, 2000).

Atualmente os cogumelos são populares enquanto alimento e representam uma importante indústria que fornece produtos para um imenso público, em diversas prateleiras e em diversos países. O cultivo intencional dos cogumelos tem um histórico relevante, sobretudo nas últimas décadas, demonstrando um crescimento exponencial expressivo, de forma que o crescimento da sua produção sobrepujou escalonadamente em muito o crescimento populacional humano.

GRAFICO 1 - crescimento populacional X produção mundial de cogumelos (kg)



Fonte: ZIED, D. C., 2017, LETTI et al., 2018

⁵ <https://cogumeloyanomami.org.br/>

A China é o principal país produtor, responsável por quase 90% da produção mundial, seguidos por outros países asiáticos, com 3,4 %, Américas, 3,2%, UE, 3,1%, e o restante com menos de 1%. Esta produção está atualmente dividida pelas cepas de *Lentinula edodes* (22%), *Pleurotus* spp, (19%) *Auricularia* spp. (18%), *Agaricus* (15%), *Flammulina* (11%), *Volvariella* (5%), e outros (10%). O consumo *per capita* anual saltou de 1 kg em 1997, para 4,7 kg em 2017 (ROYSE, 2017).

Esta indústria movimenta atualmente cerca de US\$ 63 bilhões ao ano, com todos os produtos associados. Mesmo assim, tem um imenso potencial de crescimento, principalmente se levarmos em conta a vocação agrícola e territorial de nosso país.

2.4 BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA DOS MACROFUNGOS

A bioprospecção é talvez a atividade mais antiga da humanidade, uma vez que se busca na natureza organismos capazes de suprir as necessidades básicas de alimentação, medicamentos e outros insumos, tais como fibras, energia e outros materiais em geral. É também o eixo principal da pesquisa em biotecnologia.

Os macrofungos representam um importante grupo de organismos que foi empregado na cultura humana como alimento, medicina, venenos, substâncias psicotrópicas, desde há muito tempo, principalmente nas nações asiáticas e na América Central (SINGH, 2018; ZIED, 2017). Os macrofungos são de especial importância econômica, cultural, religiosa, industrial, alimentícia, medicinal e biotecnológica. (WASSON, 1957; WASSER, 1999). Além disso, eles têm mostrado recentemente inúmeras outras finalidades, sendo catalogadas pelo menos 50 diferentes maneiras de aplicação biotecnológica (HYDE *et al.*, 2019)

O conteúdo proteico dos cogumelos cultivados é geralmente alto, com valor médio de 23,8 % +- 9,82 % da matéria seca (ZHOU *et al.* 2020). Os cogumelos são ricos em fibras, sais minerais, aminoácidos e vitaminas, como a niacina e o ergosterol, precursor da vitamina D, além do baixo teor de gordura 3% e 0% de colesterol (matéria seca). Alguns cogumelos produzem outras substâncias de interesse, como mencionado anteriormente, e são classificados como cogumelos medicinais. Estas substâncias envolvem duas classes de moléculas basicamente:

(A) as de alto peso molecular (APM): proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos e polissacarídeos, normalmente com vários kDa.

(B) as de baixo peso molecular (BPM): geralmente são compostos do metabolismo secundário, tais como os compostos fenólicos, esteroides, sesquiterpenos e terpenos, antraquinonas, derivados do ácido benzoico, quinolinas e também derivados do metabolismo primário, como o ácido oxálico (ALVES, M. J. *et al.* 2012). Estas substâncias tem atraído o interesse investigativo nas últimas décadas em função do potencial biológico como fármacos, nutracêuticos, nutricêuticos, alimentos funcionais ou outros tipos de suplementos para indústria alimentícia, cosmética, têxtil, química ou agroindustrial (RATHORE *et al.*, 2019; HYDE *et al.*, 2019).

2.5 MACROFUNGOS: USOS MEDICINAIS E TESTES DE BIOATIVIDADE

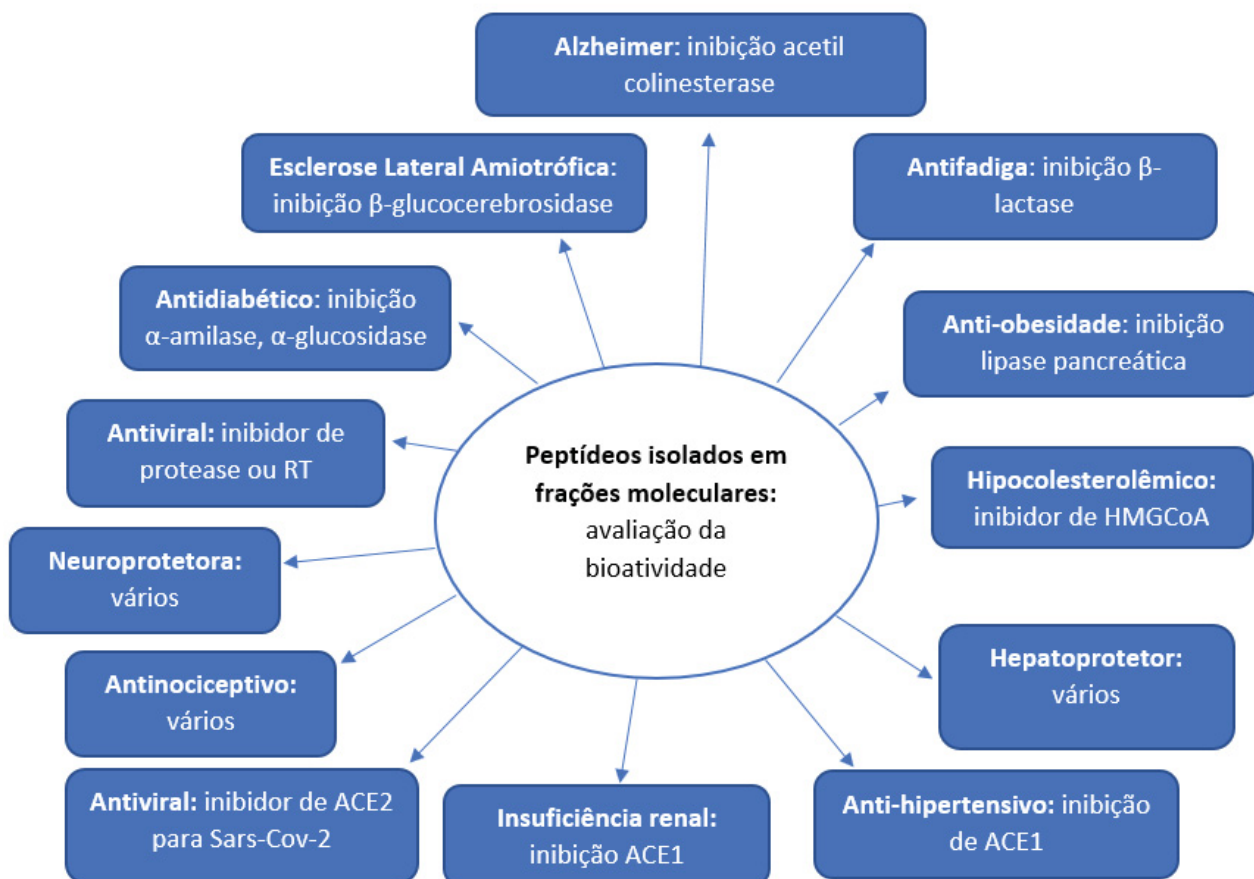
Os macrofungos são utilizados na medicina tradicional, sobretudo asiática, há milênios. Atualmente são fonte importante de vários compostos com potencial farmacológico, sendo catalogadas mais de 130 efeitos terapêuticos: anti-inflamatório, antimicrobiano, antiviral, antioxidante, antitumoral, hipolipidêmico, anti-hipertensivo, anticoagulante, imunomodulador, antitumoral, etc. (RATHORE *et al.*, 2019; HYDE *et al.*, 2019).

As pesquisas para bioprospecção de novos compostos bioativos derivados de macrofungos normalmente seguem o mesmo fluxograma que foi aplicado neste trabalho, ou seja, consiste em se isolar as frações de compostos resultantes da extração da biomassa, por diferentes métodos, e desta forma, poder concentrar esforços na detecção de alguma atividade biológica destas frações, muitas vezes pelo rastreamento preliminar *in vitro*, relacionando efeitos sobre sistemas enzimáticos ou reativos já consolidados, que podem resultar em possíveis aplicações para os extratos purificados e identificados.

Os testes neste modelo clássico buscam ensaios para detecção rápida em modelos enzimáticos conhecidos e estabelecidos como alvo para tratamentos, de modo que possibilitam triagens *in vitro* para as frações de compostos desejados (figura 4). Conforme os resultados encontrados nestes modelos, os ensaios podem avançar para avaliações da interação em modelos de células cultivadas (*in vitro*), partindo então para modelos animais *in vivo*, e principalmente, testes pré-clínicos e clínicos, com modelos consolidados para validação e aplicação das descobertas. Somente a partir daí podem ser recomendados e comercializados para uso medicinal.

Este é um processo longo de pesquisa, pois novas drogas ou substâncias costumam ter um prazo médio entre a descoberta e comercialização de cerca de 10 anos, incluindo o demorado processo de patentes.

FIGURA 4 – ALGUNS EXEMPLOS DE AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE *IN VITRO*



FONTE: O autor (2021). – Testes utilizados em publicações prévias (ver referências)

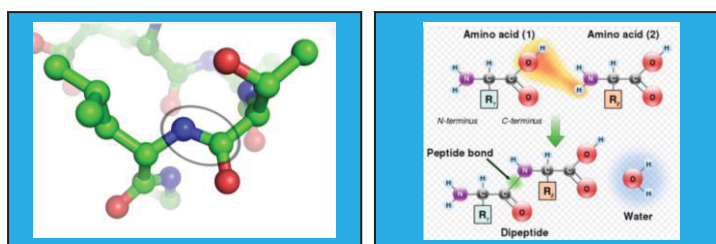
2.6 PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Peptídeos são biomoléculas produzidas por síntese celular que compõem os esqueletos das proteínas, com unidades básicas de aminoácidos conectados por ligações amida no carbono alfa (figura 5), base primordial da vida. Proteínas normalmente tem centenas de ligações peptídicas, formadas por uma combinação linear dos 20 L-aminoácidos biológicos, onde a natureza química da sua cadeia lateral irá atribuir as mais distintas propriedades e funções, de acordo com a sequência específica. Formam as unidades funcionais dos catalizadores biológicos (enzimas) e todas as proteínas estruturais constitutivas dos organismos vivos.

Peptídeos bioativos (PBA) são pequenos fragmentos de proteínas dotados de atividade biológica, que promovem algum benefício à saúde, tanto em animais quanto em humanos (BANDHARI *et al.*, 2020). A maioria dos peptídeos bioativos descritos tem sequências entre 2 e 23 aminoácidos, embora alguns podem possuir mais resíduos na sua cadeia.

De acordo com a base de dados BIOEP⁶ milhares de peptídeos já foram identificados com as mais diversas atividades biológicas. Notavelmente, alguns destes peptídeos exercem múltiplas atividades biológicas simultaneamente, o que está relacionado à sua sequência de aminoácidos e estrutura terciária. Esta complexidade de interações é permitida, dentre diversos outros fatores, pela livre rotação das cadeias laterais do fio peptídico dos carbonos alfa.

FIGURA 5 – LIGAÇÃO PEPTÍDICA



FONTE: GOOGLE imagens (2020) – CC BY-AS – 3.0

A busca por novos hidrolisados proteicos representa uma grande oportunidade de encontrar moléculas úteis para alimentos funcionais, cosméticos e farmacêuticos, bem como para nutrição animal e vegetal. Na última década, o crescimento acelerado das novas descobertas sobre as atividades biológicas dos peptídeos traz novos *insights* sobre seus mecanismos de ação em um amplo campo de aplicação prática. Uma multidão de diferentes peptídeos pode ser gerada pela hidrólise. Sua sequência determina suas propriedades físico-químicas em uma ampla gama de diferentes conformações estruturais. Essas características dos peptídeos ajudam a separá-los e classificá-los por suas propriedades específicas, como tamanho, afinidade e polaridade. As membranas de ultrafiltração podem auxiliar na tarefa de processamento dos produtos da hidrólise que podem gerar sequências aleatórias com diferentes atividades biológicas. Como ainda não existem regras estabelecidas para

⁶ (<http://www.uwn.cdu.pl/biochemia/index.php/pl/bioep>)

o melhor procedimento de hidrólise, os produtos entregues vão depender das enzimas utilizadas, do tempo e do ambiente de reação, bem como dos substratos utilizados como matéria-prima. Os resultados finais ainda são desconhecidos, uma vez que as sequências desses produtos devem ser estudadas para esclarecer seus mecanismos moleculares de interações biológicas. Revisões recentes têm mostrado a grande diversidade de peptídeos bioativos derivados de uma ampla variedade de animais, plantas e fungos (ARROUME, N. *et al.*, 2016; SÁNCHEZ, A. & VÁZQUEZ, A., 2017).

Diferentemente das proteínas os peptídeos podem ser absorvidos completamente pelo intestino, exercendo seus efeitos diretamente no trato digestivo, ou, serem absorvidos pela corrente sanguínea e permanecer intactos com formas ativas, podendo ser distribuídos por diferentes órgãos e tecidos, possibilitando o exercício dos seus efeitos fisiológicos. Os peptídeos possuem ampla potência, alta especificidade por certos tecidos, baixa toxicidade e grande estabilidade. Estas características os tornam excelentes candidatos para formulação de alimentos funcionais e medicamentos, considerando-se os efeitos adversos dos compostos sintéticos.

Numerosos peptídeos têm sido identificados a partir de fontes alimentares, com o maior número provenientes de fontes animais, sobretudo do leite, que são os mais estudados. Em seguida, os peptídeos derivados de plantas. Peptídeos derivados dos cogumelos não têm recebido muita atenção. Cogumelos (macrofungos) são fontes importantes de proteínas e peptídeos bioativos pois contém quantidades consideráveis de proteínas bioativas, especialmente enzimas, que têm sido amplamente estudadas. Contudo, peptídeos derivados de cogumelos têm sido pouco investigados, com poucos casos publicados (ZHOU *et al.* 2020).

Peptídeos derivados de cogumelos, ou PBM (peptídeos bioativos derivados de macrofungos) representam um campo atrativo para pesquisa, pois os cogumelos são fontes riquíssimas de proteínas com propriedades biológicas interessantes, mas, os possíveis peptídeos bioativos encriptados nestas proteínas ainda permanecem desconhecidos, assim como os peptídeos endógenos.

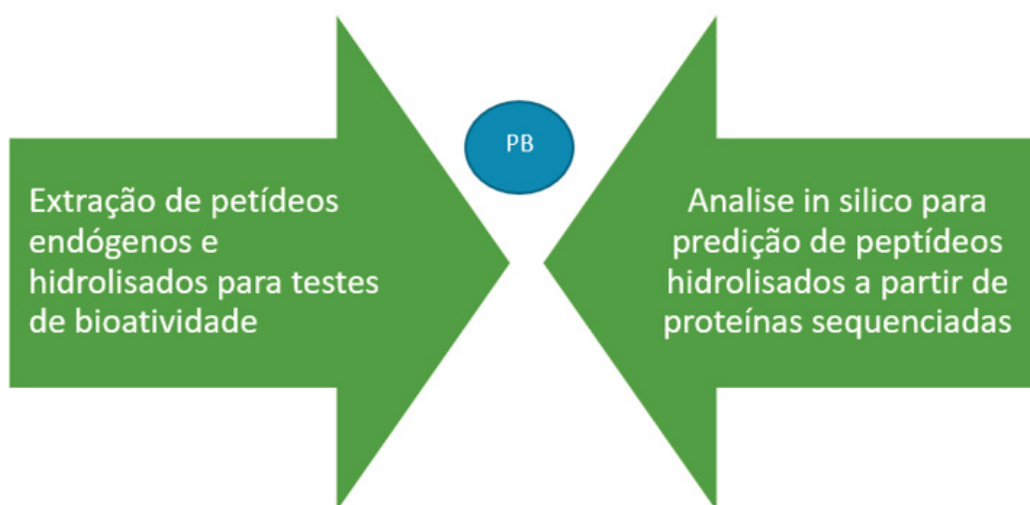
Os cogumelos têm um conteúdo alto de proteína de alta qualidade em boas quantidades. São fontes alternativas de proteína para dietas vegetarianas ou com restrição de consumo de produtos derivados de fontes animais. Até o momento, as biomoléculas mais estudadas nos cogumelos são os polissacarídeos e outros compostos de baixo peso molecular, principalmente derivados do metabolismo

secundário. Alguns grupos de proteínas bioativas estudas reportam enzimas e lecitinas, indicando que os macrofungos são fontes potenciais para PB. Estudos realizados com os PBM são de basicamente duas classes: (1) Estudos com extração orientada pela bioatividade, purificação e caracterização (seguida por este trabalho - ilustrado na figura 7) e (2) Exploração das propriedades funcionais e fisiológicas e os mecanismos subjacentes destas ações.

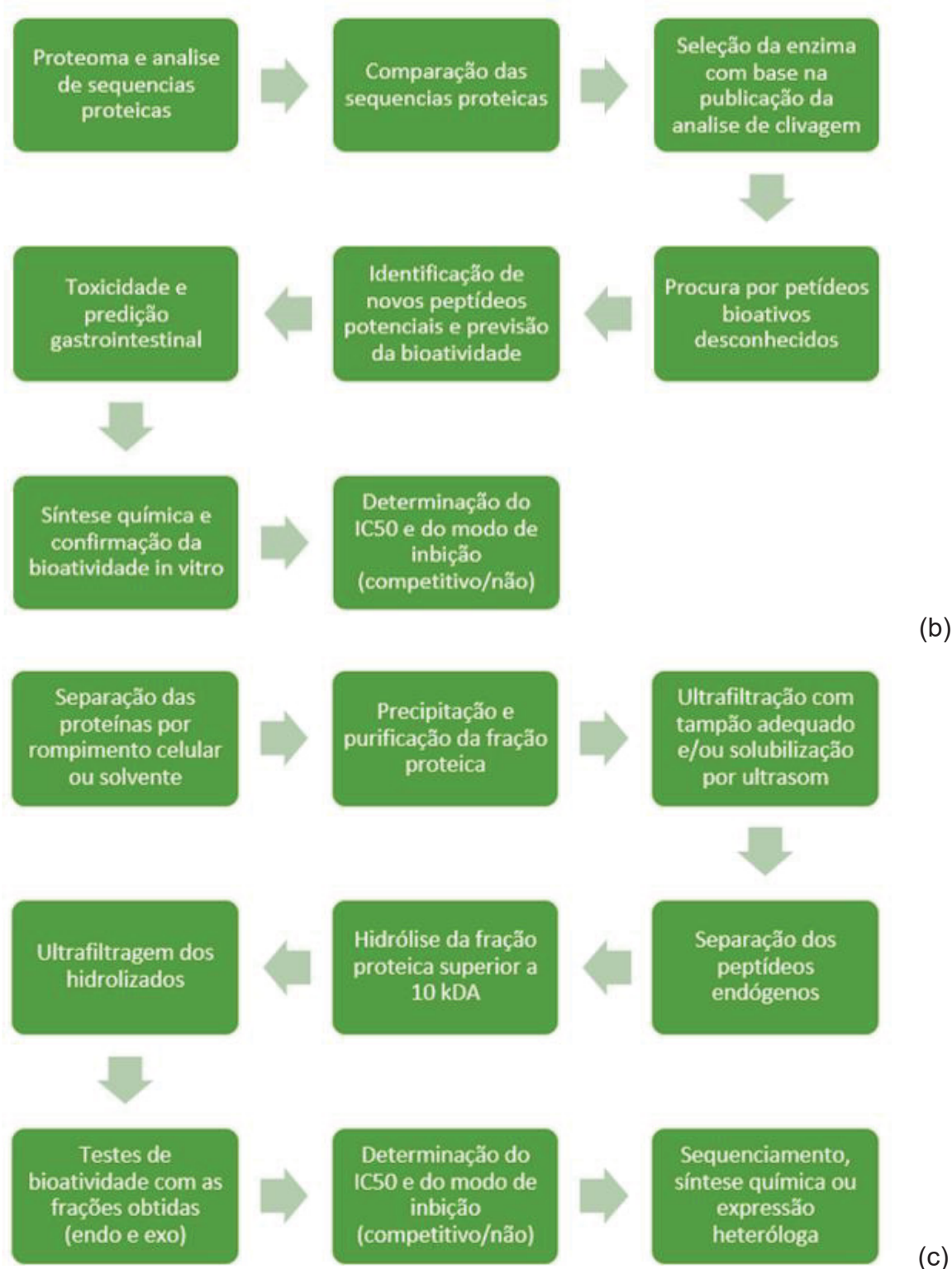
As preparações para obtenção de PBM podem ser a extração direta dos cogumelos (carpóforos), ou das células cultivadas (micélio), tanto em fermentação no estado sólido quanto fermentação submersa. A extração por ação proteolítica de enzimas exógenas é geralmente utilizada de modo a liberar fragmentos peptídicos das proteínas isoladas dos cogumelos. Outra modalidade é a fermentação microbiana (PIOVESANA et al., 2018; SAADI et al., 2015), que não será discutida nesse trabalho.

Outro caminho para a descoberta de PBM pode ser a análise *in silico* baseada em sequencias de proteomas elucidados (figura 6). Neste formato de pesquisa exploratória pode-se partir de sequencias de aa publicadas e compará-las entre si, bem como realizar simulações de hidrólises com base nos sítios ativos das enzimas desejadas. Desta forma, pode-se buscar por peptídeos desconhecidos, e então realizar previsões da sua bioatividade, bem como da sua toxicidade e digestibilidade. Após estas análises, relativamente muito mais baratas do que no modelo convencional, os peptídeos podem ser sintetizados e suas atividades testadas *in vivo* para confirmação.

FIGURA 6 – CAMINHOS CONVERGENTES PARA OBTENÇÃO DE PB

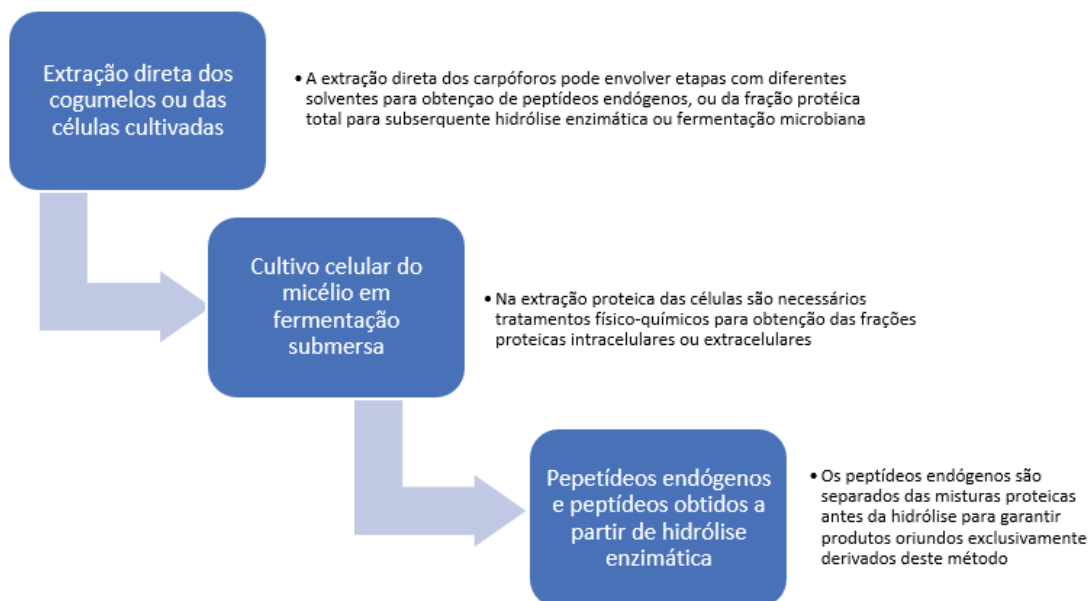


(a)



FONTE: O autor (2021). – Fluxogramas para duas maneiras alternativas, porém convergentes, para obtenção de PB(6a), de diversas fontes. Em 6b a busca a partir de análises *in silico* é detalhada com alguns passos a partir de análises de proteomas já elucidados. Como este não é o caso para a maioria dos macrofungos, o modelo adotado nessa pesquisa segue a seta esquerda de 6 a, detalhado em 6 c.

FIGURA 7 – FLUXOGRAMA PARA OBTENÇÃO DE PBM



Fonte: O autor (2020) – Este modelo foi adotado para este trabalho, com extração a partir das células cultivadas, detalhado na figura 6c.

2.7 MACROFUNGOS: PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E ANTIVIRAIS

Assim como outros organismos, os cogumelos também secretam centenas de peptídeos bioativos de modo a garantir a sua sobrevivência. Estes peptídeos geralmente tem uma origem intrínseca e são sintetizados por vias metabólicas específicas. As suas estruturas e funções biológicas mudam de acordo com a espécie de cogumelo e seu ambiente de crescimento. Peptídeos antimicrobianos dos cogumelos têm ganho atenção principalmente pela alta especificidade, baixa toxicidade e baixa interação com outras drogas. Além disso, os microrganismos tem se mostrado incapazes de desenvolver resistência contra estes peptídeos. Vários peptídeos antimicrobianos de cogumelos têm sido descritos e isolados, a maioria são endógenos, que podem ser divididos basicamente em três categorias: **antibacterianos, antifúngicos e antivirais**.

O primeiro peptídeo endógeno antibacteriano isolado de um fungo foi produzido como recombinante em 2005, demonstrou potente atividade contra alguns gram-positivos, especialmente *Streptococcus pneumoniae* (incluindo cepas multirresistentes a antibióticos convencionais). Este peptídeo, isolado do fungo

Pseudoplectania nigrella e chamado de **plectasina** (MYGIND *et al.*, 2005), foi comparado com modelos de infecção da bactéria acima citada e demonstrou níveis de toxicidade extremamente baixos em camundongos quando comparada com os controles vancomicina e penicilina. Esta classe de antibióticos endógenos é denominada **defensinas**. A plectasina demonstrou uma estrutura semelhante à outras defensinas encontradas em escorpiões, aranhas, libélulas e musgos. Isto demonstra que os cogumelos possuem vias metabólicas específicas para a geração de peptídeos antibióticos endógenos, sendo excelentes fontes para a busca por novos isolados.

Alguns PBM endógenos são espécie-específicos, como no caso da **cordymina**, que somente ocorre em *Cordyceps sinensis*, enquanto outros podem ser onipresentes, como no caso da glutathiona (GSH). Derivada de *Ophiocordyceps sinensis* (*Cordyceps sinensis*), a cordymina inicialmente foi identificada como um novo peptídeo antifúngico de 10,9 kDa, com sequência aa terminal N – AMAPPYGYRTPDAAQ, que posteriormente foi caracterizado como um peptídeo de efeitos múltiplos, incluindo a atividade antioxidante potente. Descobertas seguidas *in vivo* demonstraram efeito anti-inflamatório, antioxidante, antinociceptivo, atividade neuroprotetora e efeito protetor da osteopenia diabética.

O trabalho de MILNE *et al.* (1998) reporta a atividade dos dipeptídeos cíclicos como antibacterianos, antivirais e antitumorais, principalmente pela sua baixa liberdade rotacional. Neste trabalho, observaram o efeito de dipeptídeos cíclicos sintetizados sobre o crescimento de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Streptococcus* sp., determinados pelo método Kirck-Bauer de ensaio de difusão por disco. Três dipeptídeos cíclicos demonstraram bloquear canais de cátions e aumentar a expressão da fosfatase alcalina, tanto em procariotos, quanto em eucariotos (células de miócitos ventriculares de *guinea pigs* HT-29), demonstrando que estes compostos podem ter potencial enquanto antibióticos, relaxantes musculares e antitumorais.

Em outra tentativa de prospecção de compostos bioativos, KANDASAMY *et al.*, 2019, observaram atividade antioxidante de 67% com os extratos metanólicos de uma cepa selvagem de *Pleurotus sajor-caju* concomitantemente com atividade antibacteriana contra *S. typhi* de forma dependente da dose. Mas, na purificação, foram encontrados vários compostos que podem ser responsáveis por tal bioatividade, dentre flavonoides, polissacarídeos, compostos fenólicos, alcaloides, taninos e

proteoglicanos, sendo inconclusivo sobre a natureza do composto bacteriostático principal e dos seus mecanismos de inibição.

Uma relação interessante foi encontrada entre a atividade antioxidante e antimicrobiana. MISHRA, J. *et al.*, 2018, isolaram peptídeos naturais (endógenos) de uma cepa indiana de *Ganoderma lucidum* a partir do carpóforo e do micélio. Observaram atividades antioxidantes e antibacterianas substanciais (*E. coli* e *S. typhi*, 6,9 mm MIC 60 µg e 7,1 mm MIC 59 µg, respectivamente), partindo para caracterização destes compostos, onde encontraram grandes proporções de aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos, com predição da estrutura secundária apontando a formação de α -hélices e bobinas aleatórias. Estas conformações geralmente são as mais proeminentes nos efeitos bacteriostáticos por desestabilizarem a parede celular e promoverem o rompimento de proteínas intracelulares em procaríotos.

Também foram encontradas atividades antibacterianas com PBAM obtidos por hidrólise enzimática. Peptídeos isolados a partir de hidrólise com tripsina em *A. bisporus* demonstraram atividade de inibição de 26,6% em *Pseudomonas aeruginosa*, numa concentração de 0,25 mg/mL. Peptídeos obtidos por hidrólise de proteínas isoladas de *T. claveryi* também demonstraram inibição de 27,44% em *Bacillus cereus* na mesma concentração.

Síndrome da imunodeficiência humana adquirida (Aids) é causada pelo retrovírus HIV e é de tratamento extremamente difícil. Já foi a principal causa de morte no mundo na faixa etária de 15-49 anos (Figura 1) e atualmente têm mostrado declínio. Ainda assim, é uma doença importante a ser considerada. A enzima transcriptase reversa (RT) é uma das principais envolvidas no ciclo de replicação do vírus, sendo, portanto, alvo para potenciais peptídeos com atividade inibitória desta enzima, com alguns já isolados a partir de cogumelos. Extratos aquosos quentes de *Trametes suaveolens*, *Lactarius camphoratus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Sparassis crispa*, *Russula paludosa*, demonstraram atividade inibitória de mais de 50% para RT a 1 mg/mL. A atividade inibitória mais elevada foi para *Russula paludosa*, com 97%. O peptídeo com 4,5 kDa extraído por solução aquosa quente foi sequenciado, pelo seu terminal N com a seguinte composição: KREHGQHCEF. A concentração inibitória (IC50) foi baixíssima, de apenas 11 µM. Além disso, este peptídeo não demonstrou efeitos inibitórios sobre a atividade de ribonuclease, hemaglutinina, protease, lacase e enzimas antifúngicas. Peptídeos derivados de cogumelos com potente atividade

inibitória da transcriptase reversa podem ser candidatos para suplementação de drogas anti-HIV para o tratamento da AIDS. Entretanto, faltam modelos animais apropriados para aplicação *in vivo* o que dificulta os estudos para validação de tais candidatos. PBMs com atividade inibitória da HIV1-RT foram investigados por alguns trabalhos *in vitro*, com resultados interessantes, tais como a atividade inibitória relevante (55%) para a mistura de peptídeos do extrato etanólico de *Lignosus rhinocerus*, ou com determinação do IC₅₀ entre 50-60 µM, respectivamente, para a cordymina, já mencionada anteriormente, e para agrocybina, derivado de *Agrocybe cylindracea*. (WONG *et al.*, 2011)

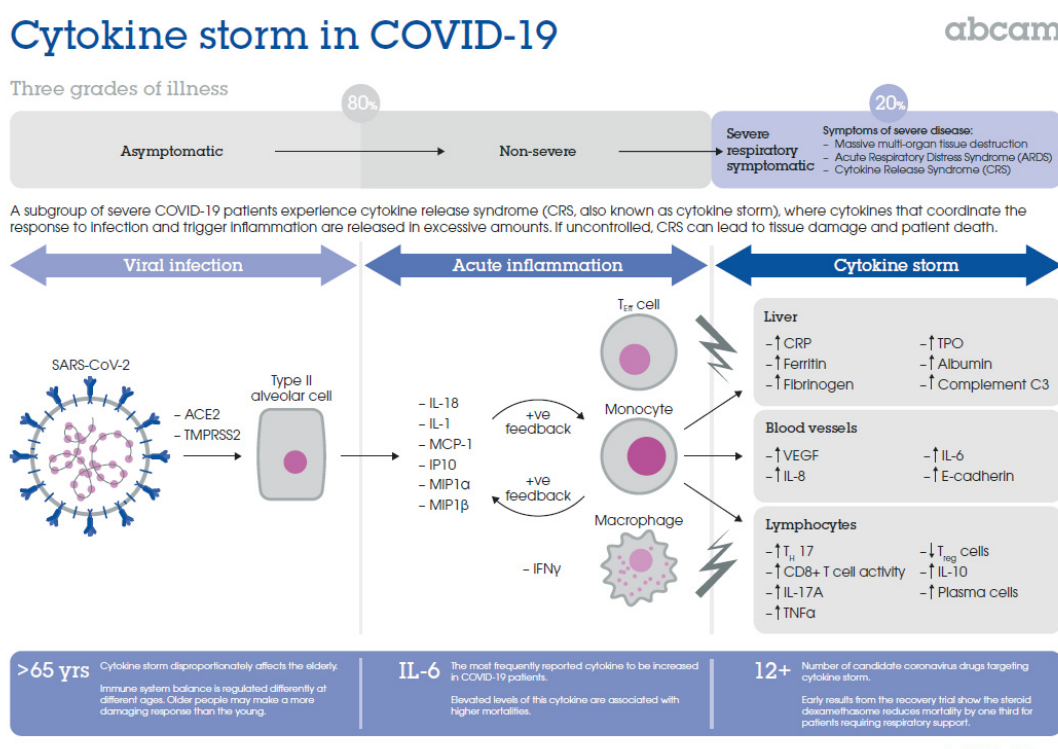
A lista de vírus que têm causado problema enquanto epidemias é longa. A hepatite, causa importante de morte, tem sido propagada pelas suas variantes, para incluir alguns, as variantes do vírus da hepatite A, B e C, assim como os DNA vírus causadores de diversas displasias como HPV, e, principalmente, os RNA-vírus como o já supracitado HIV. Nesta classe temos ainda os vírus Influenza, Zika, Dengue e a família *Coronaviridae*, causadores das síndromes respiratórias agudas (SARS-CoV e MERS-CoV), que tem desafiado os pesquisadores pela busca de novas substâncias de contenção. Os agentes antivirais podem bloquear vários espectros dessas doenças, incluindo a inibição do acoplamento das partículas na membrana da célula hospedeira, a replicação intracelular e o mecanismo de difusão dessas partículas geradas. Uma das maiores dificuldades tem sido encontrar drogas capazes de neutralizar essas ações sem efeitos colaterais graves.

Como já mencionado anteriormente, os cogumelos produzem inúmeros metabólitos com propriedades interessantes, dentre elas, a atividade antiviral. Desta forma, inúmeros trabalhos têm demonstrado o efeito inibidor, imunomodulador e adjuvante para imunização capaz de proteger ou dar suporte contra os vetores infecciosos. Dentre eles, o mais proeminente tem sido o efeito das lecitinas que será discutido mais adiante. Os PB ainda carecem de estudos mais recentes que permitam estabelecer compostos com bioatividade relevante para outros vírus.

A COVID-19 é causada pelo Sars-Cov-2, um RNA vírus de cadeia simples senso positivo envelopado e identificado como pertencente da família *coronaviridae*, com 96% de afinidade com um vírus de morcego e 79 % de afinidade com Sars-Cov surgido em 2002. O Sars-Cov adentra na célula do hospedeiro pela ação da glicoproteína Spike S1 sobre o receptor *Angiotensin Converting Enzyme 2* (ACE2) (WENHUI LI *et al.* 2003). Este receptor é também um membro do sistema RAS, que

será discutido com mais atenção na seção 2.8. Um outro alvo proeminente para o desenvolvimento de novas drogas é a principal protease de cerca de 306 aa (MPro, 3CLPro). Essa protease é essencial para ativação das proteínas virais. Inibir a entrada do vírus possui vantagens em relação ao combate dos estágios mais avançados do ciclo de replicação do vírus que podem resultar em sintomas severos da doença (figura 8). Essas duas proteínas são pontos de partida para tratamento e profilaxia a serem considerados nesta doença.

FIGURA 8 – ENTRADA E TEMPESTADE INFLAMATÓRIA DA COVID-19



FONTE: abcam© (2021 – *Covid-19 cytokine storm*). – A COVID-19 possui basicamente 3 estágios principais, com graus progressivos de morbidade. Com o conhecimento do mecanismo de entrada do vírus Sars-Cov-2, pode-se buscar novos PB que possam bloquear a adesão com a membrana da célula endotelial, eliminando toda a trajetória de infecção e principalmente de transmissão do vírus, além de busca para fatores que possam modular a tempestade de citocinas na fase severa da doença (estágio 3), onde os pacientes sofrem as maiores consequências e também risco de vida.

VERMA, 2020, realizou um estudo de simulação molecular *in silico* para estabelecer o potencial terapêutico convencional da *cordycepina*, um metabólito derivado de *Codyceps sinensis* ou *C. militaris*, contra os alvos acima mencionados. Além disso, verificou a possível atividade inibitória desta molécula na poliadenilação do mRNA do vírus, tornando-o disfuncional. Após a simulação de interação molecular com plataformas e bancos de dados sobre as moléculas alvo, foi possível mapear as

interações moleculares envolvidas. Com os algoritmos usados, a rede de interações farmacológicas foi estabelecida pelos graus de interação da droga com os receptores. Os principais achados foram a forte interação da cordycepina com a proteína glicolisada Spike S1, a MPro e atividade inibitória da poliadenilação do mRNA, mostrando um potencial de reposicionamento para tratamento como antiviral para COVID-19.

De acordo com HETLAND, G. *et al.*, 2020, os cogumelos podem apresentar soluções profiláticas ou terapêuticas contra COVID-19. O modelo de infecção dessa doença terrível tem sido um dos mais estudados, possibilitando a compreensão dos mecanismos moleculares de invasão e progressão da doença. Outros trabalhos também tem buscado a relação de prevenção e tratamento com o uso de PB, como BHULLAR, K. S., *et al.*, 2021, onde aponta que o conhecimento adquirido sobre os mecanismos de infecção possibilita a investigação para novas drogas antivirais, principalmente empregando peptídeos bioativos.

Modelos preditivos de estruturas tridimensionais têm sido desenvolvidos com sucesso para desenvolvimento de proteínas ou peptídeos com atividade antimicrobiana (LIU, S. *et al.*, 2018). A limitação bidimensional dos resultados experimentais permite apenas o sequenciamento da composição de aminoácidos, carga total residual peptídica, hidrofocidade e anfífilicos, enquanto que com a predição tridimensional das proteínas e peptídeos, a aplicação precisa da interação molecular de novas drogas baseadas em peptídeos com os seus pontos alvo pode ser simulada. Dessa forma, novos peptídeos antimicrobianos e antivirais podem ser criados ou estudados com precisão e efetividade e testados os seus efeitos *in vitro*. Isso poderá diminuir o tempo de trabalho e os gastos com experimentos de triagem de novos PB.

2.8 PEPTÍDEOS INIBIDORES DE ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA

A hipertensão, ou pressão sanguínea elevada, se caracteriza como uma alta pressão sistólica com valores persistentes acima de 140 mmHg e uma pressão diastólica acima de 90 mmHg (140/90). Esta doença é também conhecida como “assassino silencioso”, por não demonstrar sintomas que possam alertar o paciente a buscar tratamento preventivo ou imediato.

A Enzima Conversora de Angiotensina (ECA ou ACE) têm sido o principal alvo para o desenvolvimento de substâncias controladoras da pressão sanguínea. A busca

por seus inibidores têm sido a função mais estudada nos PBs provenientes de todas as fontes. A conversão da angiotensina I para sua forma ativa, angiotensina II, é realizada por essa enzima. A ACE é uma enzima promíscua pois interage não apenas na conversão da Angiotensina e da Bradiquinina (figura 10), mas em uma série de outros peptídeos. Acreditava-se que essa conversão ocorria na corrente sanguínea, mas os níveis plasmáticos da concentração dessa enzima não seriam capazes de converter na velocidade observada. Dessa forma, suspeitou-se que essa reação deveria ocorrer em outras cavidades ou superfícies. E de fato, a constatação *in vivo* foi que a maior parte da conversão ocorre nos pulmões (figura 9). Entretanto, a conversão ainda era alta, sugerindo que esta enzima está presente também em outros sítios vasculares além dos pulmões.

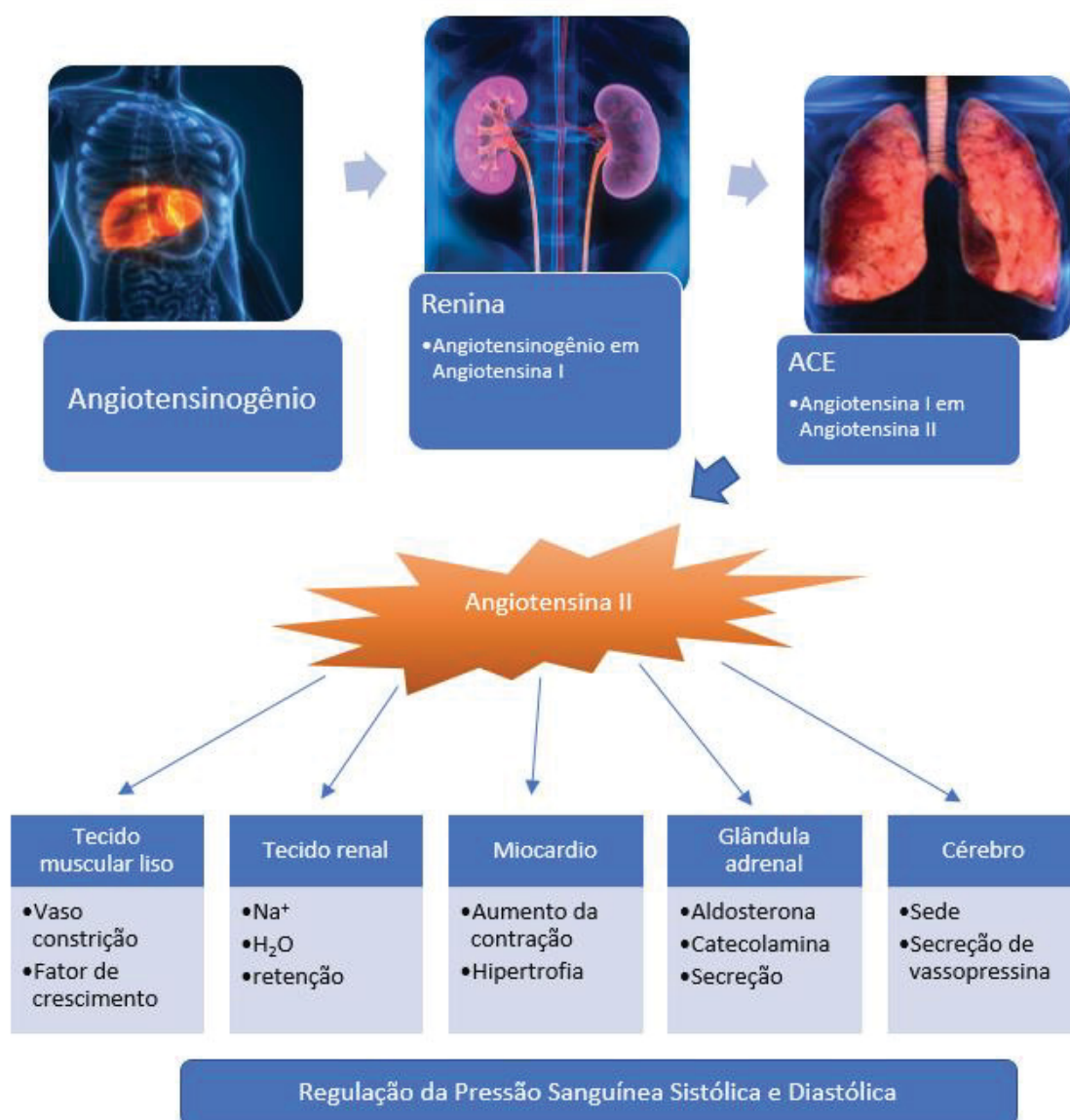
De fato, esta ectoenzima está presente na superfície das células epiteliais e endoteliais distribuídas pelo corpo, em vários órgãos. ACE (kininase, dipeptidil carboxipeptidase, peptidil carboxihidrolase, EC 3.4.15.1) facilita a remoção de dipeptídeos, e, em alguns casos, tri peptídeos a partir do terminal carboxílico de substratos compatíveis (PHILLIPS, 1993). É uma glicoproteína com 8 a 32% de carboidratos e peso molecular de 146,6 kDa.

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), ou simplesmente RAS, um sistema hormonal peptidérgico, é o mais conhecido e estudado grupo envolvido na regulação da pressão sanguínea, no balanço eletrolítico e no remodelamento vascular (ALVARENGA *et al.*, 2016). A Renina cliva o angiotensinogênio para o decapeptídeo angiotensina I (Ang I) (figura 9). Subsequentemente, a clivagem de His-Leu no seu terminal carboxílico é feita pela enzima conversora de angiotensina (ACE), gerando o octapeptídeo angiotensina II (Ang II), que é a sua forma ativa (figuras 9 e 10). Em humanos, a ACE é expressa em duas formas distintas, uma somática, abundante, presente principalmente nos endotélios pulmonares, e a segunda, mais escassa, uma isoenzima presente apenas nos testículos. A conversão de Ang I para Ang II pela atividade somática de ACE é crucial para modular a pressão sanguínea, vasoconstrição, inflamação, proliferação celular e rearranjos vasculares (ALVARENGA *et al.*, 2016).

Além disso, outras funções de ACE têm sido descobertas recentemente, que vão muito além da sua função canônica clássica de interagir com os receptores AT₁ e AT₂, que basicamente operam de maneira oposta (figura 11). AT₂ interage com ACE2, que é a enzima crucial para controlar qualquer efeito vasoativo excessivo ou promotor

de crescimento de RAAS. ACE e ACE2 operam ambas como carboxipeptidases acopladas ao endotélio, com similaridade de até 40% na sequência de aa. ACE2 cliva Ang-II para Ang-(1-7) com alta afinidade catalítica.

FIGURA 9 – SÍTIOS DE PRODUÇÃO E FORMAÇÃO DO HORMÔNIO PEPTÍDICO



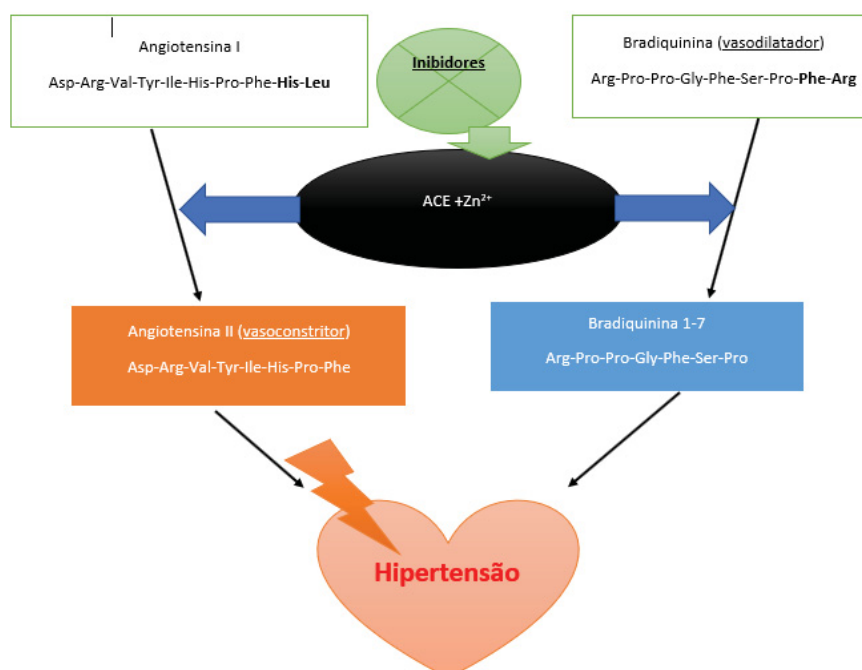
FONTE: O autor (2021) - Via clássica do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (RAAS) e seus múltiplos efeitos na regulação da pressão sanguínea. Os principais órgãos envolvidos no sistema de produção e ativação do hormônio estão destacados: fígado, rins e pulmões. (ver texto para detalhes).

Têm-se demonstrado que ACE é capaz de mediar sinais intracelulares, como aumento de fosforilação e da atividade de Ca²⁺. Estudos em células de melanoma

(TM-5) (ALVARENGA, 2016) demonstraram que Ang II pode induzir a proliferação celular após ativação por ACE, em evento que pode ser inibido após o silenciamento do gene ou por uso de ACEi (lisinopril). Outros estudos ainda demonstram que ACE pode estar ativando a expressão de diversas proteínas e fatores, induzindo o contato focal da membrana externa, pela via de sinalização da integrina, além do aumento da própria expressão de ACE, realizada por fatores de sinalização nuclear. Neste ponto, também se observou o aumento da expressão do fator AP-1 concomitantemente com aumento da expressão/atividade de Ciclooxygenase-2 (processos inflamatórios).

Vários modelos animais e humanos revelam o benefício por evidências que sugerem o papel fundamental do eixo ACE2 ->Ang (1-7) na função cardiovascular. O aumento dos níveis de ACE2 e Ang (1-7) podem ocorrer no início de algumas doenças, diminuindo com a progressão da patologia. A perda de ACE2 promove a disfunção do miocárdio, enquanto que a manutenção de ACE2 previne os remodelamentos patológicos adversos, e atrasa o progresso da falência do coração.

FIGURA 10 – CLIVAGENS DA ACE SOBRE ANG-I E BRADIQUININA



FONTE: o autor (2021) – A ação de ACE e Zn²⁺ retira dipeptídeos do terminal carboxílico dos seus substratos, resultando na forma ativa vasoconstritora e inativando a forma vasodilatadora, levando a hipertensão, que pode ser controlada com o uso dos inibidores (ver texto).

Os inibidores de ACE têm sido usados com sucesso nas últimas décadas e o seu escrutínio tem levantado interesse. Além disso, a descoberta dos novos membros seletivos do sistema RAS (ACE2) e suas diversas funções fisiológicas além da regulação da pressão arterial tem possibilitado o estudo para muitas aplicações destes compostos. Sendo assim, vários estudos recentes tem buscado traçar o perfil dos inibidores de ACE em novas facetas até então desconhecidas (HANIF, K., BID, H. K., KONWAR, R.,2010).

Evidências experimentais apontam também que os ACEis podem retardar a formação da aterosclerose, incluindo até dietas abusivas de colesterol em modelos animais experimentais (USHIYAMA-TANAKA, Y. *et al.* 2005). Os inibidores podem reduzir a expressão de LOX-1, o receptor para LDL oxidado, diminuindo seu acúmulo no interior do endotélio. Além disso, a função endotelial em pacientes normotensivos com doença arterial coronária, pacientes hipertensivos e pacientes dependentes de insulina, tem o quadro revertido pelo uso de ACEis. Os ACEis também melhoram a função endotelial por atenuar os efeitos do estresse oxidativo gerado por Ang-II. Estudos *in vitro* demonstram também que os ACEis podem alterar o balanço fibrinolítico, tanto por alterar a disponibilidade de Ang-II, quanto por atuarem em outras vias, como p. ex., agir como potente estimulador de fatores para síntese de fibrinogênio, e, aumentado a biodisponibilidade de bradiquinina, também envolvida como acelerador na síntese do plasminogênio. Em geral, os estudos demonstram que a diminuição de Ang-II e aumento de Bradiquinina no plasma contribuem de maneira significativa para prevenção da formação do átero, porém, dependente do grupo ativo.

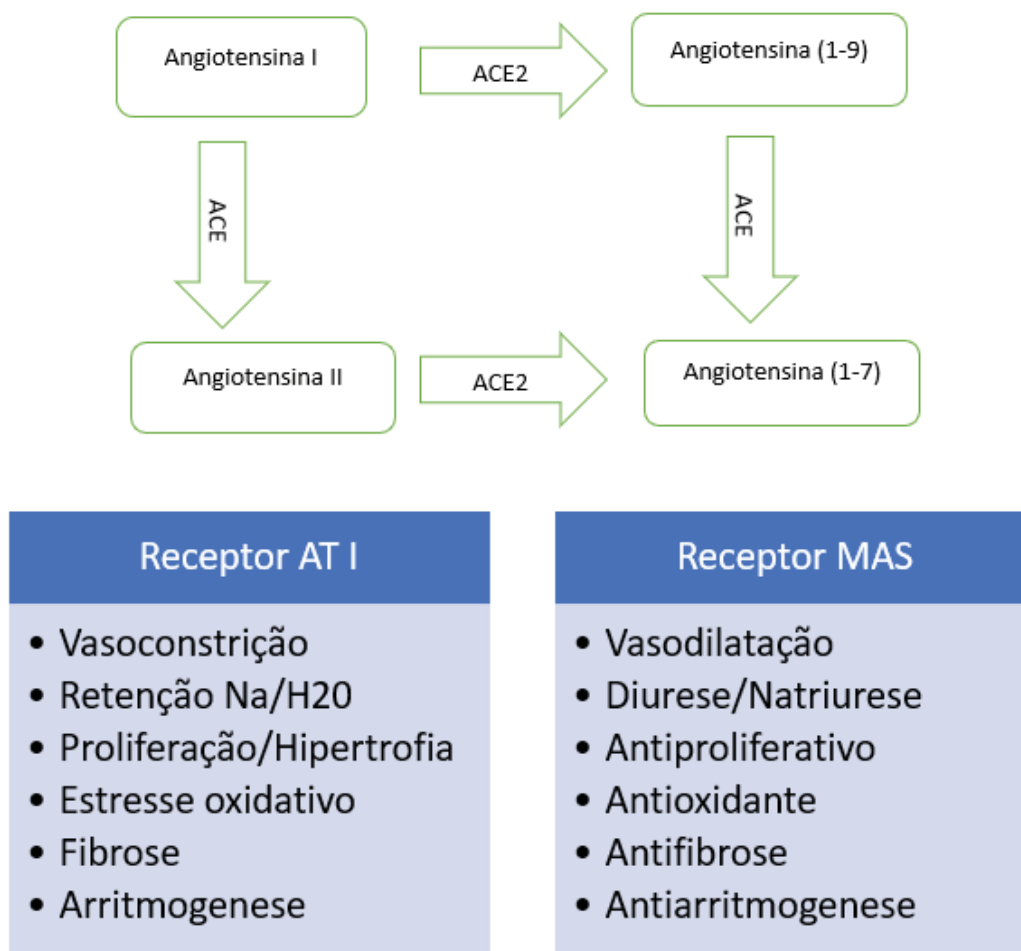
Outros grupos beneficiados pelos efeitos dos ACEis são os de pacientes portadores de DSE, de Infarto do miocárdio e das conseqüências cardíacas do diabetes tipo 2. Observou-se redução da mortalidade com o uso, apontando menor incidência da congestão cardíaca e da progressão da falência do miocárdio, diminuindo os casos de morte súbita.

Um outro aspecto importante dos ACEis é a respeito da nefropatia renal nos portadores de diabetes. O aumento da pressão nos vasos glomerulares pode causar uma série de disfunções renais, além da proliferação celular mesangial e produção exacerbada da matriz extracelular. Os ACEis podem causar diminuição da pressão glomerular por aumentar o átrio das arteríolas por seleção eferente. Numerosos estudos apontam a redução da perda renal com uso de ACEis em modelos animais de diabetes. Além disso, previne a microalbuminúria que pode resultar em proteinúria.

Outros efeitos ainda observados em pacientes diabéticos que utilizam ACEis é a diminuição da quimioatração de monócitos pela proteína-1 no trato urinário, algo que melhora a função renal.

Existe ainda a relação angiotensina I e II, ACE, diabetes e atividade antioxidante. Ang-II aumenta a atividade e a expressão da NAD(P)H oxidase, que é um fator primário para o estresse oxidativo endotelial por gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) e também pode ser um importante fator para a causa da neuropatia diabética. O diabetes também causa prejuízo no relaxamento vascular em resposta a acetilcolina e calcitonina nas arteríolas epineurais do nervo ciático. O relaxamento vascular induzido por acetilcolina é mediado pela ação dependente do NO e do fator hiperpolarizante do endotélio, ambos prejudicados pelo diabetes. Além do mais, esse prejuízo precede a redução da condutividade neural, diminuindo a velocidade da resposta motora, sugerindo que a disfunção vascular contribui para o prejuízo da atividade neural. Alguns estudos demonstram também que ACEis podem melhorar o desempenho do relaxamento endotelial neural nas arteríolas mediado por acetilcolina e calcitonina. A melhora da resposta mediada neste sistema pode estar relacionada com o aumento da capacidade de NO de superar a mitigação causada pelos superóxidos ou pelos fatores de hiperpolarização do endotélio. Neste aspecto, já foi demonstrado que a ação de ACEis podem aumentar a síntese de NO sintase. Como o superóxido reage com NO, a ação dos ACEis pode também aumentar a bioatividade do NO, com tem sido observado em pacientes em modelos animais experimentais. Desta forma, os ACEis inibem a formação de H₂O₂, que é responsável pela proliferação das células musculares lisas, diminuindo o adensamento das carótidas, como demonstrado na combinação do efeito da vitamina E com ACEis.

Além do mais, demonstrou-se que o efeito antioxidante dos ACEis é independente da pressão arterial, e, *in vitro*, ACEis demonstraram efeito antioxidante direto em LDL na presença de cobre. Ang-II aumenta a atividade da lipoxigenase-12 nas células musculares lisas, assim como nos macrófagos, por intermédio do receptor AT-1. Ainda, a ação da oxidação de lipídios em macrófagos está correlacionada a atividade de NAD(P)H oxidase celular, bem como a lipoxigenase-15. Desta forma, tem sido sugerido que ambas enzimas atuam na mediação da oxidação de lipídios e modificações em LDL. ACEis parecem mediar essa ação também por diminuir a expressão de lipoxigenase-15.

FIGURA 11 – RELAÇÕES ENTRE ACE E ACE2 E SEUS MÚLTIPLOS EFEITOS

FONTE: O autor (2021) - Estes eventos recém descobertos indicam que a manutenção do eixo RAAS pode ser promissora no combate das patologias cardiovasculares pela sua função crítica na regulação da biodisponibilidade de ACE-Ang II e ACE2-Ang(1-7), mostrando possibilidades interessantes com o uso de agentes moduladores e novas moléculas para o tratamento e para a pesquisa da hipertensão e das doenças cardiovasculares.

2.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Radicais livres são continuamente formados pelas reações fisiológicas normais em seres humanos, tais como processos de sinalização, ou para defesa contra infecções. Entretanto, quando produzidos em excesso podem levar a condições anormais, conduzindo à má formação de proteínas, mutação do DNA,

oxidação dos lipídeos de membrana ou modificação de lipoproteínas de baixa densidade. Com isto, o funcionamento fisiológico normal das células é alterado, conduzindo a uma série de processos neurodegenerativos, resultando em doenças de Alzheimer e Parkinson, ou síndromes metabólicas, como o diabetes e a hipertensão, aterosclerose, artrite, envelhecimento precoce e câncer. Ainda, estes radicais livres causam a deterioração dos alimentos, sendo um impasse para a seu processamento e estocagem, gerando alterações negativas na cor, na textura e no sabor. Quando o sistema de proteção endógeno das células falha por alguma razão, o acúmulo dos radicais livres pode resultar em instabilidade celular, afetando sua homeostase. Desta forma, várias substâncias sintéticas são utilizadas como antioxidantes, tanto como medicamentos quanto para preservação dos alimentos: p. ex. BHT (hidroxitolueno butilado) ou BHA (hidroanisol butilado). Contudo, em função dos efeitos tóxicos observados com o uso contínuo destes compostos, como hepatotoxicidade ou carcinogênese, eles vêm sofrendo restrições para o consumo. Desta a forma, a busca por novos compostos derivados de fontes naturais é necessária, e é motivo de investigação intensa nos últimos anos, o que levou a descoberta de uma série de antioxidantes derivados de alimentos.

KIMATU, B. M. et al, 2017, isolaram frações hidrolisadas por ultrafiltração do cogumelo de *Agaricus bisporus* em pó, utilizando Alcalase, Pancreatina, Flavourzyme®, e a combinação Alcalase-Pancreatina ou Alcalase-Flavourzyme. A extração proteica foi por solubilização com ácido acético glacial 5% e precipitação por sulfato de amônia e diálise. O isolado proteico foi então submetido a hidrólise com ultrafiltração sequencial. As frações proteicas também foram quantificadas quanto à composição de aminoácidos e por tamanho molecular por eletroforese. A partir deste passo realizaram testes do poder antioxidante: DPPH, atividade quelante de Fe^{2+} , poder redutor antioxidante férrico (FRAP) e inibição da oxidação do ácido linoleico. Os resultados mostraram que as maiores atividades foram para as frações hidrolisadas com menos peso molecular <3kDa, variando entre as combinações de enzimas.

Cordymina demonstrou atividade antioxidante por efeito protetor em ratos com indução de isquemia cerebral. Doses diárias de 2mg/kg BW de cordymina fortaleceram o sistema de defesa contra a isquemia cerebral por diminuir os efeitos oxidativos da lesão por patogênese. *Cordymina* restaurou a homeostase da ação antioxidante associada com a lesão por patogênese no cérebro. Além da cordymina

foram descobertos outros peptídeos com atividade antioxidante de frações extraídas de *C. sinensis*.

2.10 IMUNOMODULADORES: IMUNOSSUPRESSORES, IMUNOESTIMULADORES E IMUNOADJUVANTES

Existem inúmeras substâncias que são produzidas ou derivadas de fungos que têm algum efeito e são aplicadas para interagir com o sistema imunológico humano e animal. Segundo ENSHASY, 2010, os imunomoduladores são produtos naturais ou sintéticos que interagem com o sistema imunológico. Eles são produzidos pelo próprio organismo para manter a homeostase e uma condição saudável. Pode ser definida como uma substância, natural ou sintética, que pode suprimir, estimular ou modular qualquer um dos componentes do sistema imunológico. Os imunossupressores podem ser usados para inibir qualquer resposta patológica após um transplante ou para doenças autoimunes, hipersensibilidade ou reações patológicas imunológicas após infecções. Os imunoestimuladores são substâncias que potencializam a resposta imune induzindo a atividade ou aumentando a resposta de qualquer um de seus componentes. Eles melhoram a resposta do corpo a infecções, alergias, câncer e autoimunidade. Imunoadjuvantes são aquelas substâncias utilizadas para aumentar a eficácia da vacina.

O mercado global de imunomoduladores foi avaliado em USD 157,34 bilhões em 2018 e é estimado a alcançar USD 233,7 bilhões até 2025, de acordo com um relatório da *Grand View Research, Inc.*. A pandemia afetou o mundo inteiro causando a quebra, fusão ou compra de inúmeras empresas, modificando sobremaneira o cenário comercial para estes produtos daqui em diante.

Apesar de compostos sintéticos terem sido produzidos e comercializados com sucesso, a busca por compostos naturais está focada nos produtos de origem não sintética, por sua menor toxicidade e menos efeitos colaterais. Os fungos são organismos que produzem metabólitos muito interessantes que podem ser usados como imunomoduladoras, como a revisão de ENSHASY, H. (2010) destacou muito bem alguns deles.

Os imuno estimulantes de cogumelo são um grupo de produtos químicos que foram investigados nas últimas décadas e mostraram habilidades muito promissoras. Eles se popularizaram principalmente devido ao despertar das pessoas sobre a

importância de se ter um sistema imunológico forte como principal barreira de proteção para as doenças. Na Ásia, eles têm sido usados há muito tempo como medicina tradicional, e os últimos estudos têm confirmado essas propriedades em diversos aspectos, contribuindo para sua ampla aplicação não só no Japão, China, Coreia do Sul e países do sul da Ásia, mas também na América do Norte e a Europa desde os anos 1980. Existem centenas de compostos encontrados em partes dos cogumelos e seus micélios. Esses metabólitos têm efeitos biológicos no sistema imunológico humano e são derivados do metabolismo primário e secundário. Eles podem ser isolados e estudados em modelos para medir os efeitos positivos do ponto de vista translacional. Desta forma, podem ser produzidos por bioprocessos fermentativos, tanto na fermentação em estado sólido (SSF) quanto na fermentação líquida submersa (SmF). Eles podem ser usados como forma de tratamento profilática, leve e não invasiva, resultando na promoção da capacidade do sistema imunológico de lutar contra patógenos infecciosos e tumores endógenos.

Lectinas são proteínas altamente glicosiladas com propriedades de ligação específicas conhecidas há décadas. A primeira lectina foi descoberta em 1888 a partir de sementes de *Ricinus communis* e denominada hemaglutinina. A capacidade de precipitar eritrócitos torna-os uma proteína muito versátil e fácil de detectar (SINGH, R., *et al.*, 2010). Desde então, lectinas foram isoladas e caracterizadas de diferentes fontes, como tecidos de plantas, fungos, algas, corpos fluidos de invertebrados e membranas celulares de mamíferos (SINGH *et al.*, 1999). Eles podem ter uma infinidade de funções biológicas sobre os organismos produtores, como fixação de nitrogênio ou defesa de insetos em plantas, regular o metabolismo de carboidratos e atuar como intermediários de hormônios e foram intensamente revisados. As lectinas podem se ligar de forma não covalente e reversa a carboidratos, lipídios e glicoproteínas, precipitando, assim, aqueles contendo açúcares específicos. As lectinas de cogumelos são caracterizadas principalmente por suas atividades antiproliferativa e antitumoral. A primeira investigação sobre lectinas de cogumelos começou no início do século passado, relacionada à toxicidade dos cogumelos, descrita em *Amanita muscaria*. Posteriormente, os estudos envolvendo a identificação de cogumelos comestíveis, como *Lactarius deliciosus* e *Boletus edulis*, afastaram a ideia de que eles estivessem associados exclusivamente à toxicidade. Foram identificados também e outras espécies de fungos como *Rizoctonia solani*, *Aspergillus* spp., *Fusarium solani*, *Penicillium* spp., *Arthrobotys oligospora*, *Sclerotium sclerotinia*

e *Macrophomia phaseolina*. Nos fungos estão relacionados com funções de parasitismo, predação e líquenes e também de simbiose micorrízica, principalmente como reconhecimento de sinais. Nos cogumelos eles parecem estar relacionados com o armazenamento de proteínas, e as atividades antiviral e antibacteriana apontam para desempenhar um papel como mecanismo de defesa tanto quanto nas plantas. Algumas lectinas têm sido relacionadas à diferenciação do corpo do fruto em espécies comestíveis como *Flammulina velutipes*, *Coprinus comatus* e atividade enzimática como em *Pleurotus ostreatus* (SINGH, R. *et al.*, 2010). Existem algumas lectinas de cogumelos com suas respectivas bioatividades, já destacadas as principais características de cada uma. Sua ocorrência é principalmente nos corpos frutíferos, com menos exemplos encontrados em micélios ou meios extracelulares, possivelmente por poucos estudos ainda realizados (Singh *et al.*, 2010).

A revisão de EL-MARADNY *et al.*, 2021, traz um arcabouço robusto sobre a história e aplicação das lectinas derivadas de macrofungos contra agentes virais patogênicos e infecciosos até o presente momento. Aponta que as lectinas glicosiladas foram muito pouco exploradas do ponto de vista terapêutico e podem contribuir significativamente para o bloqueio de vários passos do ciclo viral, desde a entrada até a replicação.

2.10.1 Proteínas Imunomoduladoras Fúngicas (FIPs)

Um novo grupo de proteínas biológicas ativas foi proposto com base em suas semelhanças nas sequências e atividades de aminoácidos. Eles foram isolados recentemente de diferentes cogumelos e classificados juntos em uma nova família de proteínas denominadas Proteínas Imunomodulatórias Fúngicas (FIPs), com alto potencial de possíveis aplicações terapêuticas.

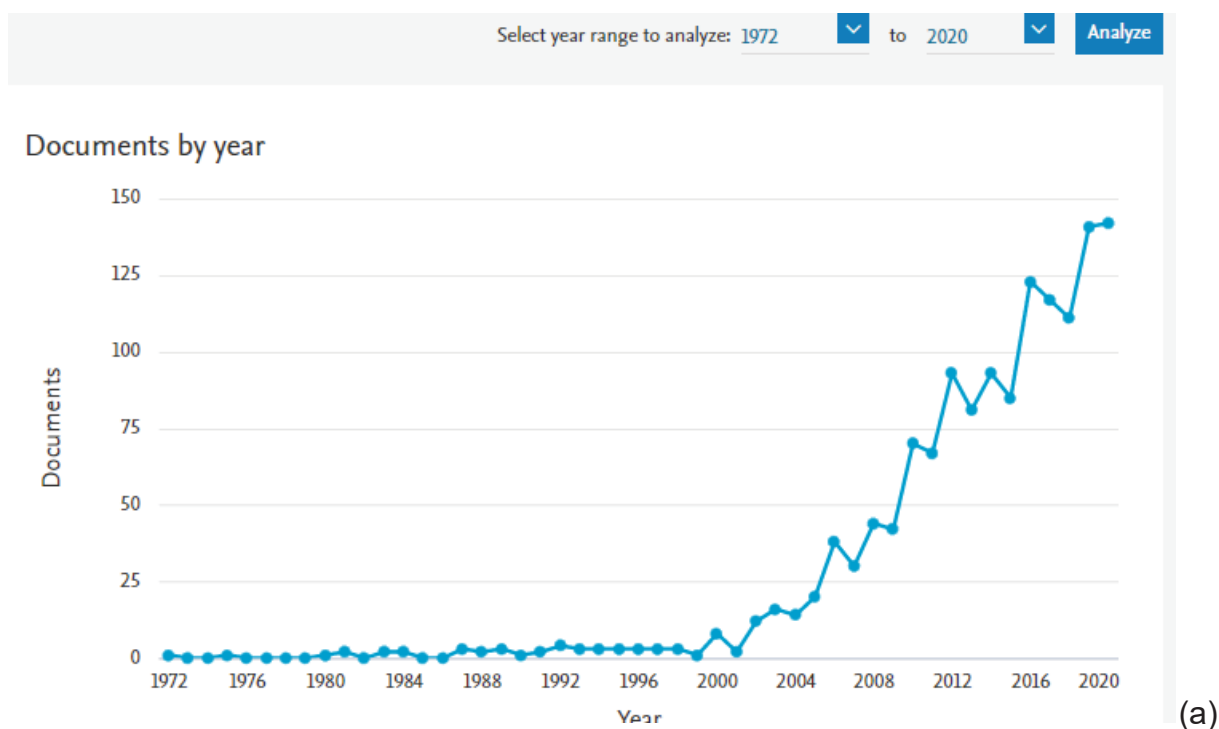
Esses tipos de proteínas têm apresentado atividades biológicas semelhantes com as lectinas, como a curva mitogênica *in vitro* de linfócitos do sangue periférico humano e esplenócitos de camundongo, apresentando uma curva em forma de sino dependente da dose. Em experimentos *in vivo*, substâncias semelhantes a FIP mostraram atividades imunossupressoras, prevenindo a reação anafilática e suprimindo a reação diabética autoimune em camundongos (XU, *et al.*, 2011).

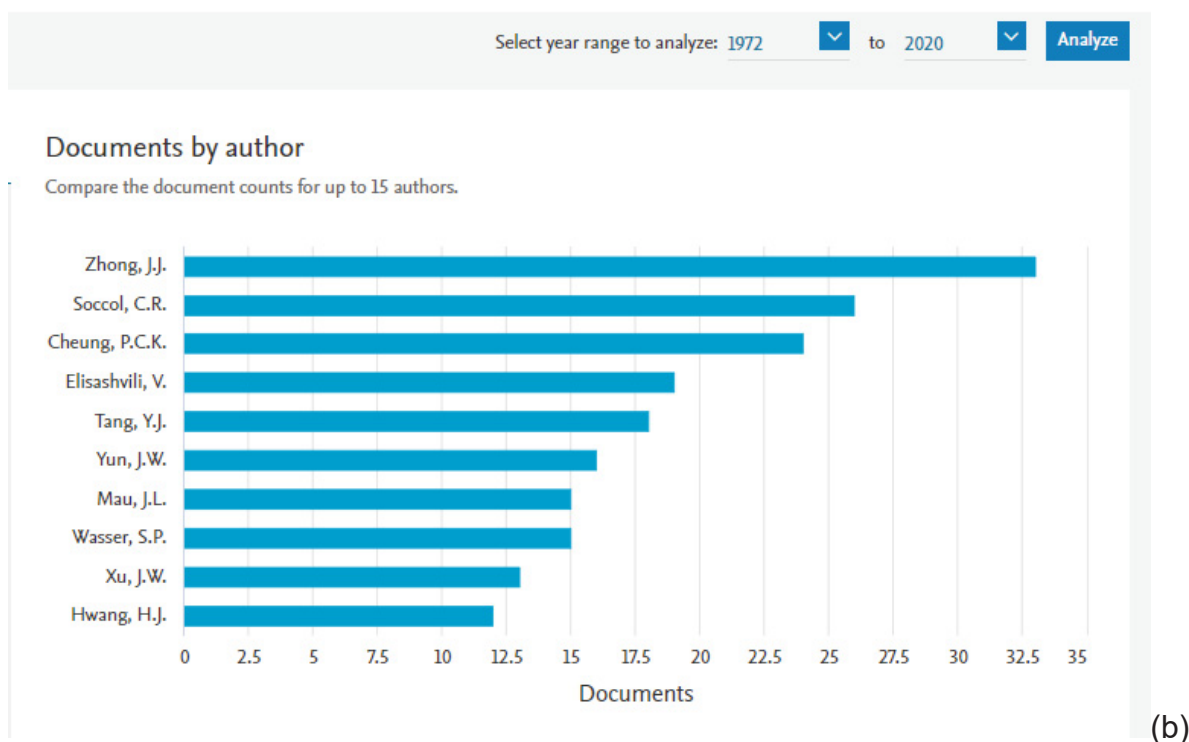
2.11 BIOPROCESSOS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MACROFUNGOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Os compostos bioativos produzidos pelos macrofungos (*Dykaria*) são inúmeros e têm sido isolados e identificados, tanto dos cogumelos quanto do micélio cultivado, além do caldo de fermentação, derivado do meio líquido submerso. Nesta modalidade de produção, os resultados apontam inúmeras vantagens com relação ao método tradicional de produção de carpóforos, que é a fermentação no estado sólido. Estas diferenças são enumeradas e comparadas na Tabela 1.

Nas duas últimas décadas este processo tem recebido muita atenção como um método promissor para obtenção da biomassa dos cogumelos medicinais e dos seus metabólitos, conforme a Figura 12, principalmente por ser um método veloz e facilmente controlável para obtenção destes produtos.

FIGURA 12 – PRODUÇÃO DE DOCUMENTOS POR ANO (a) E POR AUTOR (b)





FONTE: O autor (2021).

Busca na base de dados *Scopus*: produção de documentos por ano (a) e documentos por autor (b), com as palavras *Mushroom*, *Submerged*, *Fermentation*. Crescimento exponencial a partir do início do século 21. Prof. C. R. Soccol, segundo colocado, com 26 trabalhos, dentre os autores mais prolíficos (b). (acesso em 02/03/2021).

A maioria dos estudos têm se concentrado principalmente na produção de polissacarídeos, ácido ganodérico, cordycepina, com ainda poucos estudos sobre a produção de proteínas, hemaglutininas, ubiquitinas, proteínas imunomoduladoras e **peptídeos bioativos** (RATHORE *et al.*, 2019; HYDE *et al.*, 2019).

Outros estudos se concentram na produção de biomassa fúngica a partir deste método para produção de fonte de inóculo de simbiontes de espécies florestais, principalmente ectomicorrizas (ÁNGELES ARGAIZ *et al.*, 2020).

A maior parte dos estudos se concentra nos cultivos mono-específicos, ou seja, de uma única cepa, em detrimento das possíveis inoculações mistas. Apesar disso, algumas iniciativas de fermentações combinadas têm demonstrado que cepas simpáticas têm produções superiores de enzimas, metabólitos secundários e exopolímeros. SASHA HABU, 2010, experimentou a fermentação sinérgica entre combinações de cepas de *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis*, *Agaricus brasiliensis* e *Grifola frondosa*, principalmente para produção de exopolímeros do tipo

polissacarídeos, testando sua bioatividade enquanto antioxidantes, antitumorais e antimicrobianos. Alguns resultados mostraram alguma eficácia superior às culturas isoladas, principalmente na maior atividade antiproliferativa das células tumorais de Erlich. Porém, para a maioria dos parâmetros avaliados, não encontrou diferenças significativas entre as monoculturas e as culturas mistas.

A produção de fungos com outros microrganismos de interesse biotecnológico é ainda rasa em relação ao potencial latente. Contudo, resultados destes experimentos combinatórios demonstraram otimização para processos de produção de macromoléculas, como por exemplo, a combinação de fungos com microalgas, promovido pela fertilização mútua de trocas gasosas e não competição pelo substrato, aumento da diversidade de moléculas, como a diferenciação dos exopolímeros produzidos nestas condições com relação aos cultivos únicos, como no estudo feito por ANGELIS, S. *et al.*, 2011.

MARIAN PETRE *et al.*, 2016, experimentaram o cultivo combinado de duas espécies, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* em biorreator com resíduos lignocelulósicos bagaço de maçã e de vinho, suplementado com farelo de cereais e calcário com diferentes formulações. Testaram a performance de produção de biomassa e % proteína em mono e co-cultivo. Após identificarem os parâmetros físico-químicos que interferem positivamente, tentaram encontrar uma correlação para otimização em biorreatores de bancada, por períodos de 20 e 30 dias, para as duas modalidades de cultivo, com monitoramento e controle das condições, assim como medição do consumo de açúcares redutores por DNS e do nitrogênio acumulado por Kjeldahl. A composição da massa seca do substrato foi correlacionada com o consumo de açúcares, aumento da biomassa seca e da proteína, como fatores de conversão. O resultado mais importante nessa investigação foi de que a cultura combinada apresentou valores X e Y significativamente diferentes, sendo quase duas vezes superior ao das monoculturas, nas duas combinações de substrato, com alto grau de conversão proteica, apontando que este é um caminho a ser percorrido para futuras fermentações que pretendem otimizar a produção de proteína, como é o caso da presente pesquisa.

HAILEI, W. *et al.* (2013), realizaram a fermentação de *Ganoderma lucidum* para produção de lacases em dois tipos de reatores e obtiveram, respectivamente, 4000 U/L e 8500 U/L com frascos agitados ou reator de superfície de biomembrana. Neste último, a produção de lacase saltou para 23000 U/L com co-cultivo de *Saccharomyces*

cerevisae, sendo facilmente escalonado para um reator de 100 L, onde a produção alcançou 38000 U/L no oitavo dia. A produção de lacases é estimulada por limitação de glicose, o que pode ser acelerado com a presença da levedura no caldo de cultura, além do que, os metabólitos secundários produzidos por esta, tais como ácidos orgânicos, etanol e glicerol, também funcionam como fatores de indução para maior secreção destas enzimas.

De forma que os cogumelos têm apresentado inúmeras bioatividades, como mencionado anteriormente, receberam um grande reconhecimento mundial. Mas o método principal de obtenção destes produtos ainda é o cultivo extensivo de campo, *in door* ou *out door*, para obtenção dos carpóforos, apresentando diversos obstáculos para obtenção destes derivados em larga escala, tal como grande demanda de trabalho para o manejo dos substratos e um tempo prolongado de fermentação (TABELA 1).

No processo fermentativo o tempo decorrido entre a inoculação e a colheita pode levar em média 5-7 dias em modo submerso, ou 45-110 dias no estado sólido, dependendo da espécie. No entanto, o modo submerso ainda necessita de informações a respeito do processo em escala industrial, tais como agitação e seus efeitos de cisalhamento, substrato, morfologia e reologia, pH, temperatura, inóculo e oxigênio. Além disso, existe ainda a possibilidade de conduzir fermentação em dois estágios, conforme o produto de interesse em questão. (TANG, 2007).

TABELA 1 – Comparação entre os dois sistemas de fermentação

Fator	SmF	SSF
Tempo	Curto	Longo
Manejo	Fácil	Difícil
Contaminação	Alta /controlável	Baixa /difícil de monitorar
Energia	Alta	Baixa
Rendimento	Alto	Baixo
Purificação	Facilitada	Difícil

SmF: Fermentação submersa; **SSF:** Fermentação no estado sólido **Fonte:** o autor (2021)

A fermentação submersa em biorreatores é um tópico que vem sendo investigado por vários estudos de cinética. É caracterizada pelo aumento da viscosidade do caldo, causada por vários fatores, dentre eles, o aumento da concentração celular, modificação da morfologia durante o crescimento, das mudanças exercidas no meio pela digestão enzimática e pela secreção de

biopolímeros e outros produtos, que juntos alteram de forma significativa a reologia do fluido (Y-J TANG *et al.*, 2007). Isto é visto como um aspecto indesejável por causar vários problemas do ponto de vista da transferência de massa no suprimento de oxigênio e da remoção do CO₂, mesmo assim, é aceito como consequência inevitável das fermentações. Infelizmente, a relação entre a morfologia de crescimento e a produção de metabólitos dos cogumelos ainda é desconhecida. A estrutura multicelular do micélio resulta em heterogeneidade complexa ao longo do comprimento da hifa, o que torna dificultoso estabelecer modelos matemáticos que predizem o crescimento e permitem o planejamento de estratégias de produção.

Diversos estudos envolveram a investigação da otimização da produção dos metabólitos e da biomassa fúngica em cultivo submerso, utilizando as mais diferentes estratégias de planejamento estatístico. Um método simples e direto é a avaliação de um fator de cada vez (*One Factor At Time*: OFAT), onde são avaliados fatores físicos ou químicos de maneira independente como forma a mensurar o seu impacto individual. UMESH SINGHA *et al.* (2020) utilizaram esta estratégia para otimizar a produção de biomassa miceliana em cultivo submerso de *Pleurotus eryngii* com características nutricionais melhoradas, tais como minerais e vitamina D2. A partir desta abordagem avaliaram os fatores relevantes em frascos agitados e conseguiram estabelecer um escalonamento otimizado para reatores de 100 L. Após o cultivo o micélio foi exposto a luz ultravioleta. O micélio resultante apresentou propriedades nutricionais (micronutrientes Ca, Co e Fe) superiores aos corpos de frutificação, com aumento da vitamina D2 de 4,35 µg/g para 320 µg/g, após 20 min de exposição do micélio em irradiação UV-B.

FATEMEH ASADI *et al.* (2021) desenvolveram um novo sistema de co-cultivo para produção de exopolissacarídeos (EPS) derivados de *Ganoderma lucidum* baseado na estimulação de compostos voláteis. Após experimentação com 33 cepas de fungos e bactérias, obteve-se um aumento de até 2,2 vezes na produção de EPS com co-cultivo volátil de *G. lucidum* e *Pleurotus ostreatus*. A cultura principal, *G. lucidum* foi então submetida a cultura variável, *P. ostreatus*, numa proporção de 3:1, pH inicial de 5,0, agitação de 150 rpm, e inóculo de 10% após investigação com o método de arranjo ortogonal Taguchi L9, obtendo uma produção de 3,35 g L⁻¹ de EPS. Os detalhes deste método consistem em: (1) as culturas são isoladas de contato direto em diferentes vasos, conectadas por mangueiras para trocas gasosas. (2) podem empregar desde uma até várias culturas com mangueiras de comunicação que

permitem a difusão dos compostos voláteis das culturas acessórias com a cultura principal.

KAPRI *et al.* (2020) avaliaram a modificação nutricional de resíduos agroindustriais: resíduos da banana em pó (6,6 g/L) e torta de amendoim desengordurada (7,5 g/L), formulando um meio líquido para fermentação submersa de *Calocybe indica*, com otimização por RSM, obtiveram $X = 5,3$ g/L em 10 dias. O conteúdo proteico foi de 9 para 17%, a fibra alimentar de 7 para 22%, os glucanos de 11 para 27 %, além de um aumento global de todos os micronutrientes, flavonoides, total fenólico e vitamina D, sugerindo que este bioprocessos pode ser usado para produção de alimentos funcionais e também pode ser explorado pela indústria farmacêutica.

LEFKI-MARIA PAPASPYRIDIA *et al.* (2013) otimizaram a produção da biomassa miceliana de *Pleurotus ostreatus* em SmF com conteúdo de fibras e glucanas aumentado. Utilizaram um sistema de avaliação de perfil metabólico para mais de 95 diferentes fontes de carbono, bem como o balanço ideal C/N, com a ferramenta de monitoramento de crescimento FFmicroPlate (biolog ©). Oito destes melhores foram testados em frascos agitados, e, a melhor performance foi para xilose, com escalonamento para o biorreator de 20 L, com 17 L de volume de trabalho, na formulação xilose ($57 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e milhocina ($37 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), com alto rendimento para biomassa ($X = 39,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), glucanas ($Y = 140 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) e fibras $625 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de micélio seco, indicando a alta viabilidade para produção deste como alimento funcional e pré-biótico.

XIOMARA LÓPEZ-LEGARDA *et al.* (2020) produziram uma espécie nativa da América do Sul, *Lentinus crinitus*, em fermentação submersa com resíduos lignocelulósicos para obtenção de polissacarídeos supressores de tumor. As condições otimizadas foram feitas em reator de 5 L, com 30 °C, 300 rpm e 1,5 vvm por 4 dias. Os resultados foram $X = 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e $Y = 0,65 \text{ g/L}$ de polissacarídeos solúveis e $3,3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de polissacarídeos intracelulares por massa de micélio seco.

MIN SUN *et al.* (2020) avaliaram as características dos polissacarídeos intracelulares produzidos por fermentação submersa comparando com os presentes nos cogumelos de *Coprinus comatus*, e comparam seus efeitos como pré-bióticos *in vitro*. Não encontraram diferenças significativas entre as duas fontes de carboidratos, apontando para a produção destes compostos por SmF como substituto para o método tradicional de cultivo de carpóforos.

BIN SUN *et al.* (2021) otimizaram a produção de ácido ganodérico (AG) em fermentação submersa com a estratégia de utilizar uma linhagem de *Ganoderma lucidum* com alta expressão do gene responsável pela esporulação. O método consistia de estimular a esporulação por cultivo estático, obtendo de 2,1 até 2,6 vezes mais conteúdo de AG, quando comparado ao método tradicional de produção de micélio por SmF.

SHRADDHA S. KULKARNI *et al.* (2020) realizaram um estudo comparativo para produção de proteínas hidrofóbicas de *Pleurotus ostreatus* por SmF e SSF. As hidrofobinas são proteínas ricas em cisteína que formam camadas associadas de forma espontânea, podendo ser empregues em uma ampla gama de processos industriais, tais como surfactantes, espumantes, estabilizadores de sabor, sistemas de transporte de medicamentos *in vivo*, formulações farmacêuticas para medicamentos insolúveis e muito mais. O rendimento de hidrofobinas da classe 1 foi duas vezes maior em SSF em relação ao SmF, possivelmente em função da formulação do substrato a partir de tortas oleosas, indicando que a adição de gorduras no meio pode contribuir para um maior rendimento dessa classe de proteínas.

PRAMVADEE TEPWONG *et al.* (2012) comparam a produção de EHS (ergotioneína: 2-mercaptohistidina trimetilbetaína) em SmF em função das morfologias do micélio. A formação de pellets demonstrou um acúmulo de quase 3 vezes mais de EHS (0,79 mg/g micélio seco no 15º dia) do que no micélio livre ou em agregados (0,31 e 0,28 mg/g, respectivamente). Isso demonstra que as condições de incubação na fermentação submersa podem influenciar na obtenção do produto desejado, e sugerem que uma baixa rotação (50 rpm) promove uma maior formação de pellets.

HONGYUN LU *et al.* (2020) empregaram o tratamento de ultrassom (US) para aumentar a produção de biomassa e exopolímeros (EPS) de *Agaricus bitorquis* na fermentação submersa. A irradiação de US por 5 min na fermentação após 48h promoveu um aumento de 26% na produção de EPS, e serviu de estímulo para o crescimento miceliano, que foi até 2,52 vezes maior que no controle. O motivo para tal êxito pode ser explicado pela cinética da fermentação, onde o tratamento promoveu uma maior permeabilidade do pellet, aumentando a transferência de massa, além de alterar as estruturas do micélio e a permeabilidade da membrana. Esta técnica aponta para a aplicação do US em produções industriais de micélio ou outros metabólitos de interesse.

AGUDELO-ESCOBAR *et al.* (2017) investigaram parâmetros abióticos para produção de exopolissacarídeos (EPS) e biomassa de *Ganoderma lucidum* em SmF, tais como aeração, pH e agitação em reator de 5 L. O controle de pH combinado com o estresse hidrodinâmico de alta agitação e alta aeração favoreceu o crescimento da biomassa e a produção dos EPS em quase 100% comparada com as condições controle.

Outras modalidades de fermentação também foram experimentadas e demonstraram resultados superiores ao método da batelada simples. A batelada alimentada em reatores de agitação apresentou bons resultados por Zhong, J.J. (2002), para produção concomitante de ácido ganodérico e polissacarídeos. Sacarose foi usada como fonte principal de carbono, como sendo um substrato viável para produção de polissacarídeos, embora as células não se desenvolvam bem. Neste sentido, utilizaram a lactose como um bom promotor de crescimento celular, produção de polissacarídeos e ácido ganodérico.

Fusarium venenatum, um fungo filamentosamente originalmente não comestível, tem sua biomassa amplificada em reator air-lift para produção contínua de proteína alimentícia do seu micélio (colheita de 30 ton h⁻¹), comercializada como Quorn®, (WIEBE, M. G., 2002), marca pertencente hoje à AstraZeneca. Este aspecto ainda é pouco explorado para os macrofungos comestíveis e medicinais, considerados GRAS, mas já é bem consolidada na China, com um mercado de cerca de 30 bilhões de dólares americanos na produção de micélio de macrofungos como alimentos funcionais e dezenas de outros compostos (CHANG, 2008).

A principal razão para a escolha da SmF em detrimento da SSF é a facilidade para implementação de **ferramentas analíticas de processos**, ou PAT (*Process Analytical Tools*) assim como estratégias de controle que permitem a aquisição de dados on-line, que não podem ser acessados na SSF. Esta compreensão de alto padrão dos controles e processos são resultados de anos de estudos e pesquisas da tecnologia de fermentação submersa em biorreatores. O guia PAT⁷ permite a reprodutibilidade das condições de produção com controle e manutenção de todos os parâmetros físicos, que foram identificados e otimizados experimentalmente, permitindo a comparação contínua de batelada para batelada para manter

⁷ PAT=Process Analytical Technology) of the FDA, see (<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070305.pdf>)

uniformidade mesmo durante anos. Desta forma, a pesquisa sobre os benefícios dos cogumelos cultivados nestas condições pode ser conduzida em diferentes estudos clínicos garantindo-se assim um padrão para os resultados (SANDARGO, B., *et al.*, 2019).

2.12 BIOLOGIA SINTÉTICA E OUTRAS ESTRATÉGIAS GENÉTICAS PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DERIVADOS DE MACROFUNGOS

Os macromicetos possuem um sistema reprodutivo que exhibe um amplo espectro de variações do seu ciclo de vida, do comportamento sexual e dos mecanismos de acasalamento (RAPER, C. A., 1978). Estes são basicamente três principais parâmetros que devem ser entendidos para o cruzamento de cepas e o desenvolvimento de linhagens com características desejáveis, no modo clássico da genética de melhoramento, ou genética quantitativa. O ciclo de vida define o quanto as sucessivas etapas de desenvolvimento irão durar, o que envolve eventos celulares de regulação nuclear e da expressão de fatores que irão desencadear eventos morfológicos. O comportamento sexual se define como os padrões de eventos que conduzem à geração de uma prole, ou progênie fértil. Estes eventos envolvem a migração e fusão nuclear, meiose e produção dos descendentes. Os mecanismos de acasalamento são os fatores genéticos e morfológicos que controlam o comportamento sexual. Estes três parâmetros variam de maneira independente dentro dos limites possíveis para um dado táxon (RAPER, C. A., 1978).



O ciclo de vida típico em *Basidiomycota* consiste de nove passos sequenciais, que são basicamente os seguintes eventos: (1) a germinação de um basidiósporo que dará início ao desenvolvimento de (2) células vegetativas, normalmente haploides, que irá formar um micélio com núcleos geneticamente idênticos e capazes de se propagar indefinidamente por crescimento e divisão celular pelas extremidades das hifas. Este micélio (homocarionte) pode ainda envolver outras formas de reprodução assexuada, como a formação de oídios (esporos formados a partir da fragmentação das extremidades celulares) ou clamidósporos (esporos que formam uma parede espessa ao redor da célula). (3) O acasalamento entre este micélio haploide com outro compatível da mesma natureza por meio da fusão celular ou mais especificamente, a **plasmogamia**. (4) Este evento dará origem a um micélio fértil, um heterocarionte

denominado dicárrion. Este micélio se torna estável, e, normalmente apresenta apenas dois núcleos distintos na sua população de hifas dentro do micélio, que serão a geração parental. Este micélio também possui a capacidade de produzir novos esporos assexuais, agora dicarióticos, da mesma natureza do ciclo haploide. Sob condições especiais, este micélio poderá desenvolver o órgão reprodutivo multicelular pela geração de tecidos especializados de estrutura e sustentação (5) conhecida como cogumelo, que culminará na superfície reprodutiva, o tecido chamado **himênio**(6), onde, na célula apical especializada, denominada **basídio**, ocorrerá a **cariogamia** (7), ou fusão nuclear destes dois núcleos haploides(**n**), gerando um sistema(**2n**) com mecanismo capaz de coordenar a recombinação cromossômica seguida da sua divisão meiótica (8), com divisão em 4 novos núcleos(**n**), agora haploides, que irão migrar para as extremidades, liberando esporos de resistência (9), dando início a um novo ciclo desde (1).

Estes eventos acima apresentados estão simplificados e generalizados, de modo que podem apresentar inúmeras variações dentre os *taxa*. São governados pelos mecanismos genéticos de acasalamento. Estes mecanismos evoluem basicamente a ação de dois *loci*, A e B, nos casos de compatibilidade **tetrapolar**, com o exemplo clássico no fungo modelo *Schizophyllum comune*. Estes genes devem apresentar alelos distintos pra que haja a fertilidade, ou formação do micélio secundário estável. De um modo geral, pode-se diagnosticar a compatibilidade pelas síndromes apresentadas no quadro 1, que podem ser avaliadas tanto macroscopicamente pelas características morfológicas da cultura em placa de petri, e melhor ainda, pela microscopia óptica, com corantes específicos para núcleos e parede celular.

O sistema de acasalamento tetrapolar é governado por dois diferentes conjuntos de genes, onde a sua similaridade irá denotar a compatibilidade, a semicompatibilidade ou a incompatibilidade (QUADRO 1).

QUADRO 1 - Compatibilidade de acasalamento no sistema genético tetrapolar:

	Micélio haploide 			
	AxBx	AyBx	AxBy	AyBy
Micélio haploide AxBx 	Sem reação compatível ↓ Nenhum desenvolvimento posterior	Reação semicompatível ↓ Gene A compatível ↓ Formação de fíbulas e pareamento nuclear	Reação semicompatível ↓ Gene B compatível ↓ Migração nuclear	Reação compatível ↓ Genes A e B ↓ Formação de fíbulas fusionadas e migração nuclear no dicácion

Fonte: O Autor, 2021 – Este sistema é bastante difundido nos *taxa*

Nos sistemas semicompatíveis ocorre a plasmogamia, enquanto que o evento mais importante para a formação do dicácion estável ocorrerá somente quando ambos os alelos forem compatíveis, que deverá ser manifestada na cariogamia final.

Com base nestes pressupostos, o microbiologista geneticista deverá empregar uma série de técnicas de cruzamentos de esporos e/ou micélios haploides a fim de obter novas variantes com combinações estáveis e tentar rastrear a possível expressão maior para os produtos da via Biosintética de interesse. Estes procedimentos podem ser laboriosos, mas requer, a princípio, apenas um grande conhecimento da biologia e do cultivo das cepas, não necessitando, supostamente, de nenhuma outra ferramenta (aparelhos) ou reagente mais caro, senão apenas a capela de luxo laminar, o microscópio e alguns corantes. Isto vem sendo empregado com sucesso pelos cultivadores de cogumelos desde meados do século XX, possibilitando a descoberta de cepas altamente produtivas, aplicadas principalmente na indústria de cogumelos.

Entretanto, no atual *momentum*⁸ tecnológico, novas possibilidades advindas da biologia molecular e da bioinformática vêm revolucionando a engenharia de se

⁸ Em Física significa o produto da massa pela velocidade do corpo; impulso; quantidade de movimento. Também significa força, ímpeto, pique. O momentum é produzido e deve ser imediatamente aproveitado quando está em ação.

produzir metabólitos e enzimas específicas de modo industrial, tanto por expressão heteróloga (KATROLIA, P. *et al.*, 2019) ou pela descoberta de vias sintéticas até então ocultas dentro dos genomas dos fungos (ESKELLAN, E., 2019).

Sobre a técnica de expressão heteróloga, KATROLIA, P. *et al.*, 2019, publicaram o primeiro trabalho, segundo eles, envolvendo a produção de uma enzima fibrinolítica derivada de *Cordyceps militaris* expressa em uma levedura já consolidada, *Picchia pastorius*. Esta estratégia é importante para suprir a escassez de drogas para tratamento de desordens na coagulação sanguínea e de doenças cardiovasculares. A expressão heteróloga permite uma produção facilitada com boa relação custo benefício para aplicação terapêutica, além de permitir estudos detalhados sobre esta proteína, com análises mais completas da sua estrutura tridimensional e das sequências dos sítios catalíticos. Neste trabalho, foi feita a clonagem e a expressão de uma enzima proteolítica com 252 aminoácidos e expressa como heteróloga extracelular de 28 kDa utilizando a levedura *Picchia pastorius* como organismo de produção. Desta forma a estrutura macromolecular e de função dos sítios catalíticos foi inteiramente descrita pela primeira vez.

Durante o processo de coagulação, a trombina exerce ação proteolítica sobre o fibrinogênio, gerando a fibrina, que pode resultar em coágulos insolúveis nos vasos. Uma série de anormalidades podem resultar em doenças graves que ameaçam a vida dos portadores, como a embolia pulmonar, o infarto do miocárdio e os acidentes vasculares por coagulação excessiva. O tratamento mais utilizado é a administração intravenosa de drogas trombolíticas, como a uroquinase, que é uma serino protease obtida a partir de plasma humano. Este modo de obtenção pode conter vírus ou outros agentes infecciosos. Desta forma, a produção de agentes ativadores da dissolução de coágulos a partir de microrganismos tem despertado grande interesse, principalmente por serem mais baratos de produzir, além de evitar tais inconvenientes. Muitos agentes fibrinolíticos de origem de diversos microrganismos têm sido caracterizados. Mesmo assim, as aplicações ainda são limitadas devido aos custos de produção, tanto pela baixa expressão, como principalmente pelo custo elevado dos processos *downstream* de separação e purificação de enzimas, sendo este o principal obstáculo para sua aplicação industrial.

A clonagem e expressão heteróloga é uma estratégia de extrema importância para produção industrial destes agentes fibrinolíticos. Também facilita a caracterização estrutural destas macromoléculas. Vários genes de enzimas

fibrinolíticas presentes em bactérias já foram clonados e expressados como proteínas recombinantes (*Bacillus* spp. e *Paenibacillus*). O maior desafio ainda está em tornar estes agentes expressos solúveis nos organismos heterólogos. Diversas tentativas já foram experimentadas em *E. coli*, mas expressos como corpos inativos por problemas conformacionais. A ativação por novas configurações conformacionais feitas em laboratório também se mostrou difícil.

Organismos eucariotos como a levedura *Picchia pastorius* tem se mostrado como excelentes hospedeiros heterólogos para expressão de proteínas extracelulares solúveis, principalmente pelas modificações pós-transcricionais destas proteínas. Alguns exemplos de agentes trombolíticos já expressos nesta levedura são citados neste trabalho, demonstrando a viabilidade deste hospedeiro como produtor. Ainda, a estrutura terciária é um importante aspecto da atividade destes agentes.

Para se estudar as estruturas das proteínas existem métodos eficazes, como a cristalografia e a ressonância nuclear magnética. Todavia são custosos, trabalhosos do ponto de vista de tempo consumido e requerem grandes quantidades da proteína expressa. Os estudos *in silico* de modelagem tridimensional baseados em homologia de outros membros das famílias proteicas com estruturas 3D já elucidadas também são eficazes para predição das conformações. Todavia, a vantagem destes últimos sistemas é muito maior, do ponto de vista da sua facilidade e baixo custo envolvido. Há muito pouco publicado sobre a estrutura tridimensional dos agentes fibrinolíticos e quase nada sobre os agentes derivados de fungos. É de extrema importância para se estudar os efeitos no sangue e as suas atividades anticoagulantes se conhecer a sua estrutura. Já foram reportados inúmeros compostos derivados de cogumelos com atividades fibrinolíticas, entretanto, até este trabalho (KATROLIA, P. *et al.*, 2019), nenhuma clonagem ou expressão heteróloga a partir de genes de cogumelos havia sido publicada. *Cordyceps militaris* é uma espécie de fungo da medicina tradicional chinesa que tem sido reportado como importante produtor de compostos bioativos. Este grupo já tinha isolado e caracterizado duas novas enzimas com atividade fibrinolítica derivadas deste fungo em estudos prévios. Neste estudo eles demonstraram a clonagem e expressão de uma destas enzimas em uma levedura e fizeram a sua caracterização estrutural, os resíduos ativos e atividade catalítica dos seus domínios ativos, e afinidade pelo substrato destes sítios. Este modelo de trabalho tem um grande nível de adaptabilidade devido aos protocolos consolidados e permitem que sejam realizados uma gama infinita de novos Bioprocessos, tanto

envolvendo a produção de peptídeos ou enzimas de interesse terapêutico, como outras modalidades de macromoléculas por fermentação em biorreatores.

Outras estratégias de engenharia para biossíntese de produtos naturais em fungos foram discutidas no artigo de revisão de ESKELLAM, E., 2019. O genoma fúngico apresenta várias sequências ocultas para vias de biossíntese, que foram reveladas a partir do sequenciamento e suas anotações. Estas sequências foram recentemente identificadas, compreendidas e aplicadas formando um grupo de genes denominado como agrupamentos de genes para biossíntese (BGCs, *Biosynthetic Gene Clusters*) para produção de produtos naturais (NPs – *Natural Products*). Os diversos metabólitos, tais como hipoglicêmicos (lovastatina), antibióticos (pleuromutilina, penicilina), imunossupressores (ácido micofenólico e as ciclosporinas), além de várias outras moléculas com aplicações variadas já mencionadas anteriormente.

A complexidade dessas vias metabólicas apresenta infinitos obstáculos para sua aplicação em escala industrial e para a descoberta de novas drogas. Estes NPs são produzidos em pequenas quantidades apenas como respostas a estímulos ambientais específicos. Desta forma, são difíceis de se avaliar em laboratório. O restabelecimento do interesse da indústria farmacêutica sobre esses compostos fez ressurgir novas estratégias de rastreamento, que inclui a genômica como uma ferramenta interessante.

Neste sentido, a revisão indica três categorias para a engenharia de Bioprocessos na obtenção de NPs: (1) a perturbação dos reguladores de transcrição global, que podem “acordar” o maquinário de biossíntese, resultando em uma variedade nova de NPs, mas é imprevisível e difícil de controlar. (2) a manipulação de vias de biossíntese tanto no hospedeiro nativo quanto por expressão heteróloga, que pode ser focada capacitando a compreensão da função desta via de acordo com a expressão de cada gene, o que pode conduzir a uma série de descobertas sem precedentes, mas que é laboriosa. (3) Enzimas específicas podem ser empregadas para o uso nestas vias sintéticas adaptando-se a sua aplicação para produção de NPs, tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Estas três categorias, de acordo com o artigo, podem ser combinadas em uma série de modelos, com aplicações biocatalíticas ainda sem precedente. A formação de cepas com indução da expressão gênica por desligamento ou religamento de fatores de controle dos genes alvo, assim como a engenharia enzimática para criação

de quimeras. Além disso, a técnica recente de edição genômica CRISPR-Cas9 ainda pode ser amplamente aplicada.

2.13 PATENTES

A contribuição dos produtos naturais no desenvolvimento e descoberta de novos fármacos é inquestionável. De acordo com NOGUEIRA, R.C. *et al.*, 2010, as descobertas dos últimos 25 anos até então tiveram quase 80% de derivados obtidos a partir da mimetização ou síntese com base em produtos naturais para os agentes anticâncer. Nos anos 1990, novamente, 80% das drogas de um modo geral eram produtos naturais ou análogos inspirados nestes. A indústria farmacêutica acabou por diminuir essa proporção de escalonamento por basicamente 3 fatores: as triagens de alto rendimento, a química sintética combinatória e a legislação sobre a biodiversidade. O desenvolvimento destas tecnologias levou as indústrias a acreditar que a descoberta de novas drogas seria otimizada. Em função da extrema complexidade dos bancos de dados a partir de produtos naturais, este se mostrou incompatível com as triagens de alto rendimento nos anos 1980.

As dificuldades geradas pela legislação sobre acesso a biodiversidade e aos conhecimentos tradicionais também contribuíram pra o declínio das pesquisas a partir de produtos naturais, principalmente pelo setor privado. A convenção da Biodiversidade no Rio de Janeiro, em 1992, serviu de marco regulatório para que os países definissem a sua legislação sobre os recursos biológicos da biodiversidade, principalmente alterando a noção de quem eram os verdadeiros proprietários, definidos agora como os países e as comunidades de origem, e não como uma herança comum da humanidade. A partir dos acordos formados desde então, a maioria dos pedidos de patentes envolvendo plantas nativas brasileiras entre 2003-2008 foram de institutos de pesquisas públicos e universidades brasileiras. Entretanto, deve-se notar que o fato de se declarar que uma molécula bioativa é derivada de síntese e não de produto natural derivado de bioprospecção ou de farmacóforos baseados em isolados da biodiversidade brasileira, o inventor pode se esquivar dos problemas com partilhas e concessões destas patentes. Considerando que 95% dos depósitos de patentes são feitos nos países desenvolvidos (figura 13), isso pode representar um problema em potencial.

preparação de PBM a partir de carpóforos desidratados ou frescos de cogumelos comestíveis medicinais. O método inclui a trituração, homogeneização, hidrólise enzimática centrifugação, esterilização e ultrafiltração. Indica a adição de celulose, enzimas derivadas de cogumelos, protease neutra e papaína, na proporção de 1:1:1:2, adicionando entre 5000-10000 unidades de enzima por grama de cogumelo. A reação enzimática ocorre a 60 °C por 3 a 6 h, com a desativação das enzimas, centrifugação, esterilização e ultrafiltração para obtenção de fluido peptídico com limiar molecular de 5000 Da. O preparado pode ser usado para produção de pó liofilizado e comercializado em cápsulas ou emulsões orais líquidas. As indicações farmacológicas são nutrição, melhora do sistema imune, prevenção de tumores e vírus, antisséptico, anti-inflamatório, tratamento preventivo de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, ansiolítico, tranquilizante, umidificante dos pulmões, eliminador da fleuma, dentre outros.

Nas buscas feitas por patentes no Brasil, apenas 11 pedidos foram encontrados e estão apresentados no quadro 2. Como se percebe, o país ainda tem um vasto campo para exploração de patentes dos potenciais dos peptídeos bioativos e principalmente dos derivados de cogumelos.

QUADRO 2 - Busca por patentes no país (INPI) para peptídeos bioativos

Data	Título ¹
01/04/2019	Método de obtenção de PB inibidores de <i>Phytium insidiosum</i>
18/04/2017	PB peguilhados e seu uso
22/11/2016	Processos para obtenção de PB derivados de cristas e barbelas de frango
29/08/2016	Processos de fracionamento para produção de proteínas, PB e coprodutos derivados de biomassa microalgal
21/01/2014	PB curtos para cicatrização de ferida
29/07/2013	Processos de obtenção de PB multifuncionais
06/07/2010	Composição compreendendo aminoácidos ou PB e óleo marinho em uma emulsão óleo-em-água estável, processos de produção e seus usos
27/12/2007	Composição compreendendo PB curtos para modulação celular e imunológica
12/12/2007	Genes de éxon único que codificam PB
26/11/2004	Processo de conversão em plantas de pró-peptídeos em PB, através da atividade proteolítica controlada, utilizando vetor e cassete para expressão de uma enzima capaz de realizar esta conversão, plantas transgênicas e híbridos derivados contendo cassete de expressão e uso e composição farmacêutica das proteínas recombinantes assim produzidas
28/07/1997	Processos para fabricação de implantes contendo PB

(fonte: o autor, 2021): busca no site do INPI (www.inpi.gov.br) pelas palavras-chave "PEPTÍDEOS BIOATIVOS" no Título em 03/06/2021. ¹Nesta tabela o termo "peptídeos bioativos" está abreviado nos títulos como PB

3. MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma geral para obtenção e avaliação de peptídeos bioativos a partir de macromicetos, tanto diretamente dos carpóforos quanto do micélio cultivado em fermentação submersa, é apresentado na figura 14.

FIGURA 14 – FLUXOGRAMA GERAL PARA OBTENÇÃO DE PBM



FONTE: O autor (2021).

Fluxograma generalizado para obtenção de PB derivados de macromicetos.

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

O Centro de Biotecnologia Agroindustrial e Agroalimentar do Paraná (CENBAPAR), da Universidade Federal do Paraná (UFPR), dispõe de uma coleção de pouco mais de uma centena de cepas de macromicetos mantidos em preservação

no seu biorrepositório. Destas, foram selecionadas 24 cepas de 9 gêneros e 13 espécies para os bioensaios do presente trabalho, listados na tabela 2.

TABELA 2 – LISTA DE CEPAS DA COLEÇÃO CENBAPAR UTILIZADAS

Número	Gênero	Espécie	CEPA
1	<i>Cordyceps</i>	<i>C. sinensis</i>	CORD I ou C1
2			CORD II ou C2
3			CORD III ou C3
4			CORD IV ou C4
5			CORD V ou C5
6			CORD VI ou C6
7			CORD VII ou C7
8			CORD VIII ou C8
9	<i>Pleurotus</i>	<i>P. ostreatus</i>	P09
10			CP50
11	<i>Pleurotus</i>	<i>P. sajor-caju</i>	P22
12		<i>P. djamor</i>	PdjCH
13	<i>Ganoderma</i>	<i>G. lucidum</i>	GL112
14			GLCG144
15			GL
16		<i>G. curtisii</i>	Gcurt
17	<i>Lentinula</i>	<i>L. edodes</i>	L6602
18			L6609
19	<i>Grifola</i>	<i>G. frondosa</i>	GFC
20	<i>Schizophyllum</i>	<i>S. comune</i>	Scom
21	<i>Flammulina</i>	<i>F. velutipes</i>	Flam1
22	<i>Melanotus</i>	<i>M. alpiniae</i>	Malp
23	<i>Agaricus</i>	<i>A. blazei</i>	Ab5
24		<i>A. bisporus</i>	Ab1

Além disso, foram feitas cerca de uma dezena de coletas em diferentes localidades e ocasiões, a fim de obter novos isolados com potencial de prospecção biotecnológica. Foram obtidos 42 isolados estáveis a partir de 179 tentativas (Apêndice), detalhados na tabela 3 (Resultados).

3.2. MÉTODOS DE ISOLAMENTO

Foram avaliadas algumas estratégias para o isolamento de novas cepas com base na literatura e na experiência adquirida. O principal método utilizado foi o explante de tecidos internos do corpo de frutificação, cortando fragmentos de tecido do himênio, da trama da lamela, da subsuperfície do píleo e do estípite, com cerca de 2-5 mm de diâmetro, com uso de ferramentas de microbiologia e semeadura direta na superfície de meios semissólidos, carboxi-metil-celulose extrato de levedura (CMCY), batata-dextrose-ágar (BDA), extrato de malte ágar (MEA) ou MCM, em placas ou tubos. Outras estratégias também foram testadas, como o uso de micélio macroscópico do substrato ou semeaduras de solução de esporos e papel toalha simples umedecido e autoclavado e incubação a 24 °C em ausência de luz.

3.3. MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO

As culturas foram mantidas em tubos de ensaio com meio inclinado, com transferência periódica de até 3 meses, mantidos a 4 °C. Além disso, a preservação das culturas em médio e longo prazo também é necessária e foram realizados testes de preservação como a hidrostase ou a vaselina líquida, ambos em temperatura ambiente, ou ainda, a criopreservação (-20 °C e -80 °C).

3.4. MEIOS DE CULTURA

Foi utilizado o meio semissólido para a maioria dos isolamentos, com variações da composição entre BDA, MEA, MCM, CMC e CMCY. Outras estratégias também foram avaliadas, como a semeadura direta em meio sólido: papel toalha puro ou papel toalha simples suplementado com 0,5% farelo de trigo, umedecidos a cerca de 60%. Todos os meios foram auto clavados a 121 °C por 15 min.

Após o isolamento das cepas estáveis o micélio foi amplificado em meio líquido para fermentação submersa, que foi selecionado o MCM, ou *Mushroom Complete Medium*, com a principal fonte de carbono a glicose (dextrose), com nitrogênio composto de extrato de leveduras e peptona, mais adição de alguns sais inorgânicos, e pH ajustado para 5 a 6 antes da autoclave, detalhado no Quadro 3.

QUADRO 3 – Meio de cultura para fermentação líquida e sua composição:**MCM (Mushroom Complete Medium)**

Componente	Quantidade (g/L)
Glucose (Dextrose)	20 - 30
Extrato levedura	3
Peptona	2
Fosfato potássio monobásico	0,46
Fosfato potássio dibásico	1,0
Sulfato magnésio	0,5

Referência: JEONG, YT. *et al.*, 2009, com modificações

3.5. SELEÇÃO DE INÓCULOS E FERMENTAÇÃO SUBMERSA (SMF)

Antes da SmF, o crescimento das cepas foi mensurado quanto a sua cinética de crescimento linear da colônia na superfície do ágar na placa de Petri de 90mm. Desta forma, a taxa de crescimento radial específica (μ), para biomassa (X) em função do tempo (t) seguiu o modelo da equação 3.1, com gráficos apresentados no apêndice.

Equação para estimativa da μ :

$$X_t = X_0 e^{\mu t} \quad (3.1)$$

$$X_t / X_0 = e^{\mu t}$$

Aplicando logaritmo em ambos os lados,

$$\log_e (X_t / X_0) = \mu t$$

$$\ln X_t - \ln X_0 = \mu t$$

$$\mu = (\ln X_t - \ln X_0) / t \quad (3.2)$$

Assim, o valor de μ pode ser obtido de um gráfico de $\ln X$ pelo tempo, conforme a equação 3.3

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1) \quad (3.3)$$

Que pode ser convertida para logaritmo decimal:

$$\mu = (\log X_2 - \log X_1) / 2,3026(t_2 - t_1) \quad (3.4)$$

Neste caso então adotou-se X como sendo a medida do comprimento do diâmetro de expansão do micélio (L), em mm, em triplicata, e o tempo (t) em dias.

Um dos pontos importantes deste tipo de medição é a observação do padrão de expansão do micélio, que demonstra de maneira simples e rápida se a cepa está sofrendo alterações genéticas ou fisiológicas, ou pleomorfismos, conforme o grau de setorização ou mudanças na taxa de crescimento radial da colônia. Estes dados devem ser registrados para comparação com novos cultivos após longos períodos de preservação, de forma a se avaliar não só a qualidade da cepa, como a eficácia do método (de preservação). A medida do diâmetro com paquímetro permite precisão na coleta dos dados e o grau de desvio padrão nestes valores equivale ao grau de setorização ou irregularidade. Os isolados que foram reativados a partir da hidrostase e mantiveram o maior grau de regularidade (sem setorização), foram então selecionados para produção de inóculo no cultivo submerso. Discos de ágar com micélio de 5 mm de diâmetro foram cortados com auxílio de pipetas de vidro esterilizada, preferencialmente retirados da borda da colônia, a partir da placa de Petri. Estes discos foram semeados nos frascos em Erlenmeyer de 250 mL com rolha de algodão e gaze (entre 5-10 unidades), 67 mL de meio líquido MCM, incubados a 24-26 °C, com pH ajustado por faixa de otimização de acordo com a literatura (pH 5,5 – 6,5) com HCl ou NaOH 2M, antes da autoclavagem, a 121 °C por 15 min.

As condições de cultivo submerso variaram para algumas cepas, a saber, *shaker* de rotação orbital 5 cm (TECNAL) entre 120-144 rpm, 24-26 °C, 5-21 dias, ou estacionário na mesma faixa de temperatura ou ainda uma combinação de ambos, preferencialmente em ausência de luz.

3.6. SEPARAÇÃO DA BIOMASSA DO CALDO DE FERMENTAÇÃO

Para separação da biomassa foi realizada filtração simples em papel filtro, com lavagem sucessiva do retentato (biomassa) com água deionizada. O material do retentato foi então prensado com espátula para remover o restante de água, ressuspenso em água, filtrado e prensado novamente. O agregado de micélio em um bloco único foi submetido a secagem em estufa por temperaturas entre 36-60 °C e 12-24 h, até a massa constante. O material seco foi pesado em balança analítica, em seguida macerado em gral e pistilo até a menor granulometria possível, armazenado em tubos fechados e conservado a -20 °C até a liofilização.

3.7. ROMPIMENTO CELULAR E PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO PROTEICA

O micélio em pó liofilizado de cada cepa foi ressuscitado em água ultrapura esterilizada com pH ajustado previamente para 10 com NaOH 2M, na proporção de 1:15 (m/v). Essas soluções foram submetidas à ultrassonicação para rompimento celular nas seguintes condições: 20-40 ciclos de 30s, na potência de 80w, intercalados por 30-60s de descanso, sempre com tubo imerso em banho de gelo, etanol 20-30% e NaCl 2%, para manutenção da temperatura entre -2 e 5 °C, até que a viscosidade da suspensão diminuísse a uma razão aparente constante.

Após a ultrassonicação a solução foi deixada em repouso overnight a 4 °C, medindo-se o pH e, caso necessário, ajustando-se o mesmo novamente para 10. Foi então realizada a centrifugação a 3500-4000 rpm por 20 min, preferencialmente a 4 °C, para separação dos *debris* celulares. O precipitado, constituído das frações celulares não solúveis, foi então separado e preservado a -80 para possíveis extrações de DNA subsequentes. Foi então ajustado o pH do sobrenadante para 4, novamente centrifugado nas mesmas condições, preferencialmente a 4 °C, para precipitação das proteínas, separando-se o sobrenadante e o precipitado. O pellet precipitado representa a fração proteica, e o sobrenadante outros polímeros e substâncias diversas. Em ambas as frações foram realizadas quantificações de proteína por Bradford, Lowry ou BCA, de modo a verificar a eficácia da recuperação, que variou de acordo com a cepa, o método ou a espécie de origem (dados não apresentados). O precipitado proteico foi liofilizado (12-24h a -40 °C), pesado na balança analítica e armazenado a -80 °C.

3.7.1. Avaliação de um método alternativo de extração proteica

Um outro protocolo de extração de proteínas foi testado para as cepas da Tabela 2 (Resultados). A extração aquosa simples é recomendada como um método rápido e eficaz para obtenção de proteínas solúveis do micélio. O micélio seco e macerado obtido a partir da fermentação submersa foi ressuscitado em água ultrapura esterilizada, na referida proporção de 1:15 (m/v), e foram realizados três ciclos subsequentes de extração (com 10, 5 e 5 mL de H₂O ultrapura), agitando-se em vórtex por 1 min, mantendo-se em banho ultrassônico por 6 min na potência de X e então centrifugando-se (20 min, 3000 rpm, 6°C) para separar o precipitado do

sobrenadante. O precipitado foi encaminhado para o próximo ciclo de extração. No último ciclo não foi realizada centrifugação. Os extratos foram então reunidos.

3.8. SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES PEPTÍDICAS

O pellet proteico recuperado na seção 3.7, armazenado a -80 °C, foi descongelado e foram pesadas quantidades entre 0,05 e 0,1 g para suspensão. As frações com maior dificuldade de solubilização foram submetidas ao banho de ultrassom por alguns ciclos em baixa intensidade, até que os grumos se dissolvessem completamente. Como solventes, foram testados água ultrapura ou tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,8, na proporção de 1:5, medido a concentração proteica por Bradford, Lowry e BCA, quando possível, antes e depois das operações de separação por ultrafiltração.

A ultrafiltração foi realizada com tubos de fundo cônico de membrana tangencial (Cytiva/Sartorius/GE®), para volumes de até 20 mL. As membranas utilizadas tinham valores de limiar de peso molecular nos valores de 3, 5 e 10 kDa. A sequência de ultrafiltração foi realizada a partir do menor para o maior limite de peso molecular, com passagem prévia pela membrana de 0,22 µm, antes da centrifugação por 20 min a 4000 rpm nas membranas tangenciais. O volume resultante de filtrado e retentato foi medido com micropipeta, balão volumétrico de 5 mL e balança analítica.

Para cada fração foi feita novamente a medição proteica, por Lowry. A fração de mais alto peso molecular (>10kDa) foi considerada livre de peptídeos endógenos e foi separada para ser submetida à hidrólise enzimática. As frações de peptídeos endógenos obtidas foram identificadas e armazenadas a -80 °C para ulterior triagem da atividade biológica.

3.9. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES PEPTÍDICAS

A preparação e obtenção de peptídeos por hidrólise enzimática foi feita a partir do preparado enzimático proveniente do Federal Research Centre (FRC) “Fundamentals of Biotechnology” (Rússia), *Protolicheterm-145*, derivado de fermentação com *Bacillus licheniformis* mutante, conservado na forma de pó particulado, a 4 °C, com 10.000 U/g. A estabilidade e atividade desta enzima foi

avaliada por KOSTYLEVA et al. (2016), que demonstrou que o pH tem pouca influência na estabilidade, sendo tolerante (100%) entre 5 e 10. Já a temperatura de maior estabilidade está em 30 °C, decaindo rapidamente em temperaturas a partir de 50 °C (30%). Também avaliou a melhor faixa de pH e temperatura para atividade: pH entre 7-9 (80 a 100%), e a temperatura 50 °C (KOSTYLEVA, E.V. et al., 2016).

Deste misturado, foi separado 0,46 g e suspenso em 5 mL de tampão carbonato bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,52, agitado em vórtex por 1 min até suspensão completa das partículas. A solução foi então centrifugada em ultrafiltro de membrana tangencial com limite de 10 kDa, a 3500 rpm, por 20 min, de modo a purificar a mistura enzimática de peptídeos e outras substâncias menores, e aumentar a concentração proteica. O retentado >10 kDa foi ressuspenso no mesmo tampão e foram comparadas as concentrações antes e depois da filtração pelo método de Bradford. Partindo-se da concentração final calculou-se o volume de suspensão da protease necessário para digerir os precipitados proteicos na proporção de Enzima/Substrato (E/S) de 0,02 g/g. Os volumes foram misturados e agitados com vórtex por 1 min, incubados a 50 °C e foram medidas as concentrações de proteína a cada hora de digestão, até 3h, sendo interrompida com incubação em banho a 100 °C por 3 min. O grau de hidrólise (D.H.) foi calculado de acordo com:

$$((\text{Conc. inicial} - \text{Conc. final}) / \text{Conc. inicial}) * 100 \text{ (Eq. 3.9)}$$

Este ensaio foi repetido para proteólise dos extratos aquosos, com diferenças na relação E/S (0,1 g/g), temperatura (37 °C) e o tempo (1h) de incubação.

Após a etapa de hidrólise e interrupção, as amostras foram submetidas a ultrafiltração por membranas tangenciais de limite de peso molecular, conforme descrito no item 3.8.

3.10. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

Considerando que a composição da amostra é um fator crucial para a escolha do método de quantificação proteica, e que as amostras apresentam proteínas desconhecidas quanto à sua natureza e composição, foram avaliadas três metodologias para quantificação de proteína solúvel: Bradford (BRADFORD, 1976), Löwry (LÖWRY *et al.*, 1951) e o método do ácido bicinconínico ou BCA (BROWN, 1989). Por exemplo, uma amostra proteica rica em resíduos de arginina produzirá resultados artificialmente altos em Bradford, indicando que os resultados mais

precisos serão alcançados por Lowry ou BCA. Por outro lado, amostras ricas em resíduos de cisteína irão produzir resultados artificiais elevados em BCA, mas isso não deverá ter efeito sobre Bradford ou Lowry. De um modo geral, os três principais métodos colorimétricos foram escolhidos, Bradford, BCA e Löwry, pois as amostras representam proteínas desconhecidas quanto a sua natureza e composição.

Dessa forma, sempre que possível, os três testes foram realizados nas amostras de maneira concomitante para permitir comparações dos resultados. Os tampões de extração foram analisados quanto à sua interferência na sensibilidade dos testes, que conforme a indicação do fabricante, a sua concentração era segura.

Os ensaios para determinação da concentração de proteína seguiram as recomendações dos manuais do fabricante, conforme o tipo do ensaio e conforme a disponibilidade do reagente. Foram feitos em microplacas transparentes de 96 poços e as absorbâncias foram determinadas no aparelho Biotek® PowerWave XS, de acordo com os comprimentos de onda recomendados para cada modalidade de ensaio.

O resultado da construção da curva padrão, que foi feita com albumina do soro bovino BSA (*Bovine serum albumine*, Sigma-Aldrich e Pierce), e os detalhes para montagem dos ensaios estão descritos no apêndice 1.

3.11. TESTES DE BIOATIVIDADE

As frações ultrafiltradas obtidas foram submetidas aos testes de bioatividade após determinação da concentração proteica em $\mu\text{g/mL}$ pelo método de Löwry. A concentração proteica das amostras foi ajustada, para $100 \mu\text{L/mL}$, sempre que possível, por meio da diluição, a fim de comparar amostras diferentes na mesma concentração. No entanto, como a faixa de concentração da maioria das amostras obtidas foi de 540 a $7,8 \mu\text{L/mL}$, algumas amostras foram avaliadas em concentrações menores (não foi realizado concentração das amostras).

3.11.1. Limpeza do radical DPPH (poder antioxidante)

O ensaio para limpeza do DPPH foi desenvolvido conforme ZHONG, W., *et al.*, 2013. Primeiramente diluiu-se o DPPH na seguinte proporção para uma concentração final de 4 mM : $0,0043 \text{ g DPPH}$ em $95 \text{ mL EtOH (99 \%)}$ e $5 \text{ mL dH}_2\text{O}$,

que foi estocado no escuro a 4 °C e preparado 2 h antes do uso. Para o ensaio de reação tomou-se 100 µL amostra e 100 µL DPPH 4 mM, em triplicata, na placa transparente de 96 poços, com incubação por 1h escuro e temperatura ambiente e leitura a λ 517 nm. A reação positiva torna a coloração do roxo para o amarelado. Para controle positivo utilizou-se o Trolox. Para controle negativo utilizou-se solução salina (NaCl 0,85 %)

Cálculo da % de limpeza: $((\text{contrl DPPH} + \text{salina}) - \text{amostra})/(\text{contrl} +)$ Eq. 3.11

3.11.2. Inibição do crescimento microbiano (bactérias Gram positivas, Gram negativas e levedura (*Candida albicans*))

O teste de inibição do crescimento por medição da turbidez por refração a 600 nm consiste em desafiar as cepas de microrganismos com os extratos ou compostos de interesse e medir a sua resposta assim como um teste antimicrobiano. As cepas de microrganismos patogênicos (*Enterococcus faecalis* HC, *Pseudomonas aeruginosa* HC, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* MRSA HC, *Escherichia coli* ATCC35218, *Escherichia coli* ATCC25922, *Klebsiela pneumoniae* ATCC700603, *Candida albicans* e *Salmonella typhimurium*) foram reativadas a partir de amostras preservadas no ultrafreezers -80 °C, transferindo-se 10 µL da suspensão dos tubos de criopreservação para 2,0 mL de caldo Müller-Hinton (MHB), homogeneizado em vórtex por 10 s e incubado por 24 h a 37 °C. O caldo foi então semeado por esgotamento da alça em MH ágar para obtenção de UFCs. As colônias serviram para testes de confirmação da identidade do microrganismo e para inóculo dos ensaios de inibição de crescimento, incubado por mais 24h a 37 °C. A partir das colônias foi então feita uma diluição em salina até a escala 0,5 de McFarland. Esta suspensão será usada como inóculo para os testes dos ensaios de inibição de crescimento em microplaca, que é incubado por mais 24h a 37 °C. Cloranfenicol foi usado como controle positivo de inibição, com uma solução 6,19 µmol/L em água ultrapura e esterilizado após passagem por membrana de 0,22 µm.

Placas de 96 poços estéreis foram então preenchidas com 100µL das amostras, previamente descongeladas e equilibradas a temperatura ambiente, em triplicata para cada cepa de microrganismo. A seguir, foram pipetados 80 µL do caldo MH, e 20 µL das suspensões salinas com microrganismos no grau de turbidez 0,5

McFarland, previamente preparadas para cada uma das cepas. Para o controle negativo, a amostra foi substituída por salina pura, e, no controle positivo, a amostra foi substituída por Cloranfenicol. Após a pipetagem a placa foi coberta com a tampa, levemente homogeneizada por movimentos circulares curtos e imediatamente incubada na estufa 37 °C, por 24h, quando foi feita a leitura de absorvância no leitor de placas Biotek® a 600 nm.

3.11.3. Ensaio de Inibição da atividade enzimática ACE

O ensaio para quantificação da inibição da atividade da enzima conversora da angiotensina foi feito com o uso do kit *Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Activity Assay Kit (Fluorometric)*, Sigma-Aldrich, *Catalog Number CS0002*.

O kit adquirido é baseado na clivagem de um peptídeo fluorogênico sintético; A medida da fluorescência é resultado direto da atividade de ACE. Desta forma, o controle positivo do kit pode ser usado como rastreador de inibidores para ACE. Tem um alcance linear do método é de 1,5-110 mU de atividade de ACE.

Uma unidade de ACE é definida pela quantidade de enzima que libera 1 nmol de produto fluorescente a partir do substrato, em 1 min, nas condições do ensaio, a 37 °C.

Para este ensaio foi utilizado um aparelho de leitura de fluorescência do Departamento de Fisiologia, do Setor de Ciências Biológicas, UFPR, Infinite® M200 - Tecan (Austria). Também foi utilizado placa negra modelo Cornig™, com tampa transparente e fundo opaco, com agitação programada para reação dentro do aparelho.

O procedimento para ensaio de inibição está descrito a seguir:

1. Descongelar todos os componentes e equilibrar a temperatura ambiente antes do uso.
2. Centrifugar brevemente os vials antes de abrir.
3. Preparar todas as diluições especificadas imediatamente antes de aplicar o ensaio
4. Diluir o Controle Positivo 500 x no tampão (4µL Ctrl+ / 2000 µL tampão).
5. Todas as amostras devem estar num volume final de 50 µL
6. O branco da amostra é 50 µL de tampão
7. Diluir 10 µL do padrão em 90 µL tampão

8. A solução padrão diluída é adicionada em frações progressivas nos poços da placa de 96, em duplicata, na seguinte razão: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 μL , gerando uma solução 10^{-1} nmol/poço de padrão.
9. Trazer o padrão para o volume final de 100 μL com adição do tampão, segundo o **QUADRO 4**:

Padrão diluído 10x μL	Volume de tampão μL	Padrão por poço(nmol)
0	100	0
1	99	0,1
2	98	0,2
3	97	0,3
4	96	0,4
5	95	0,5
6	94	0,6
8	92	0,8

10. Pipetar todas as amostras para teste no volume de 25 μL , em duplicata, mapeando a localização e incluir o branco (tampão) e o controle positivo para inibição (captopril previamente diluído).
11. Diluir o substrato 100x no tampão para uso de 50 μL por poço, ou seja, para 80 poços utilizou-se 40 μL do substrato diluído em 3960 μL do tampão. (não adicionar substrato no padrão!) -> (16 poços).
12. Para a reação do ensaio, o aparelho deve estar previamente calibrado para o ensaio na temperatura de 37 °C, com ajuste para excitação a 320 nm e emissão a 405 nm, no modo cinética.
13. Estando os componentes todos prontos: amostras (25 μL), enzima positiva (25 μL) e padrão já mencionado utilizou-se uma pipeta multicanal para adição do substrato (50 μL), da maneira mais rápida e homogênea possível, para um volume final de 100 μL por poço, inserindo imediatamente no aparelho para leitura da fluorescência no modo cinética em 5 ciclos, por 5 minutos.

Os resultados foram então transcritos em uma planilha CVS excel® anexa ao próprio kit, de onde foram construídas as curvas padrão e de cinética. A regressão linear da curva padrão e das cinéticas das amostras foram transformadas de RFU/min para nmol/min (Unidades), de acordo com a equação:

$$\text{Atividade das amostras (nmol/min)} = [\text{curva}_{\text{amostra}}]/[\text{curva}_{\text{padrão}}] \times \text{DF, onde}$$

[curva_{amostra}] = curva amostra menos o branco da curva de amostra (RFU/nmol)

[curva_{padrão}] = curva padrão menos o branco da curva padrão (RFU/nmol)

DF = fator de diluição das amostras, se não usou nenhum considere 1

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ISOLAMENTO E CONSERVAÇÃO DE MACROFUNGOS

Foram coletadas 179 amostras (APÊNDICE 4) de macrofungos na natureza e em algumas prateleiras do mercado local. Os organismos foram identificados até o menor táxon possível, subsequente a tentativas de isolamento. A região passou pela pior estiagem dos últimos 50 anos, de acordo com registro da Agência Estadual de Águas, entre 2019-2021. Ainda assim foi possível encontrar algumas espécies comuns da região, com nenhuma espécie rara ou nova para a ciência. Os isolados que apresentaram crescimento estável e homogêneo, conforme descrito no item 3.8, estão apresentados na Tabela 3. A figura 17 (a e b) representa as principais áreas de coleta e a figura 18, algumas das espécies encontradas. Nota-se a escassez de áreas verdes dentro da área urbana, com alguns pontos dispersos e um dos mais destacados quase no centro da área representa o remanescente do capão com araucárias no campus Jardim Botânico, com código de localização F para as cepas.

TABELA 3 – TOTAL DE CEPAS SELVAGENS E COMERCIAIS ESTÁVEIS

Isolados selvagens e comerciais setembro 2019- janeiro 2021 – micélios estáveis

(lista completa de ocorrências no apêndice)

Código ¹	Identificação táxon inferior ²	Data ³	Isolado por ⁴	Identificado por ⁴
F1	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	190903	RLV	RLV
F2	cf. <i>Rigidoporus</i> sp.	190903	RLV	RLV
F3	<i>Polyporus tricholoma</i>	191023	RLV	RLV
F7	<i>Lentinus strighellus</i> ou <i>L. strigosus</i>	191029	RLV	AARdM
F8	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	191029	RLV	RLV
CL1	<i>Agaricus</i> sp.	191004	RLV	AARdM
CL7	<i>Lentinus velutinus</i>	191004	RLV	AARdM
CL12	<i>Himenochaetaceae</i>	191005	RLV	RLV
CL35	<i>Psilocybe cubensis</i>	200714	RLV	RLV
CL36	<i>Psilocybe cubensis</i>	200715	RLV	RLV
RV1	cf. <i>Pholiota</i> sp.	200118	RLV	AARdM
RV3	<i>Cuphophyllus niveicolor</i> ou <i>Hygroaster albellus</i>	200118	RLV	AARdM
RV7	<i>Psathyrella candoleana</i>	200118	RLV	AARdM
RV15	cf. <i>Rhodocybe</i> sp.	200118	RLV	AARdM
CB01	<i>Hymenochaetaceae</i>	191108	LPP	RLV
CB06	<i>Cyptotrampa asprata</i>	191113	RLV	RLV
CB25	<i>Podoscypha petaloides</i>	191205	RLV	RLV
CB33	<i>Lepista sordida</i>	191207	RLV	RLV
CB37	<i>Lepista sordida</i>	191210	RLV	RLV
CB39	<i>Coprinus comatus</i>	191211	RLV	RLV
CB47	<i>Lepista sordida</i>	191213	RLV	RLV

TABELA 3 (continuação)

CB49	<i>Coprinus comatus</i>	191215	RLV	RLV
CB50	<i>Trametes sanguinea (Picnoporus sanguineus)</i>	191218	RLV	RLV
CB51	<i>Coprinus comatus</i>	191219	RLV	RLV
CB52	<i>Coprinus comatus</i>	200105	RLV	RLV
CB55	<i>Auricularia fuscossuccinea</i>	201005	RLV	RLV
LP10	<i>Coprinus comatus</i>	201103	RLV	RLV
LP12	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	201201	RLV	RLV
ET	<i>Pleurotus eryngii</i>	191003	RLV	RLV
EL	<i>Pleurotua eryngii</i>	191003	RLV	RLV
PoL	<i>Pleurotus ostreatus</i>	190925	RLV	RLV
LeY	<i>Lentinula edodes</i>	190912	RLV	RLV
PdY	<i>Pleurotus djamor</i>	190912	RLV	RLV
PfY	<i>Pleurotus ostratus</i> var. Florida	190912	RLV	RLV
L1MM	<i>Lentinula edodes</i>	191006	RLV	RLV
L1B	<i>Lentinula edodes</i>	191006	RLV	RLV
AbJM	<i>Agaricus bisporus</i>	190912	RLV	RLV
AbL	<i>Agaricus bisporus</i>	190912	RLV	RLV
AbYpb	<i>Agaricus bisporus</i> var. Porto bello	190810	RLV	RLV
PoEC	<i>Pleurotus ostreatus</i> var. Branco	200520	RLV	RLV
SSPU	<i>Pleurotus ostreatus</i> var. Shimofuri	201109	RLV	RLV

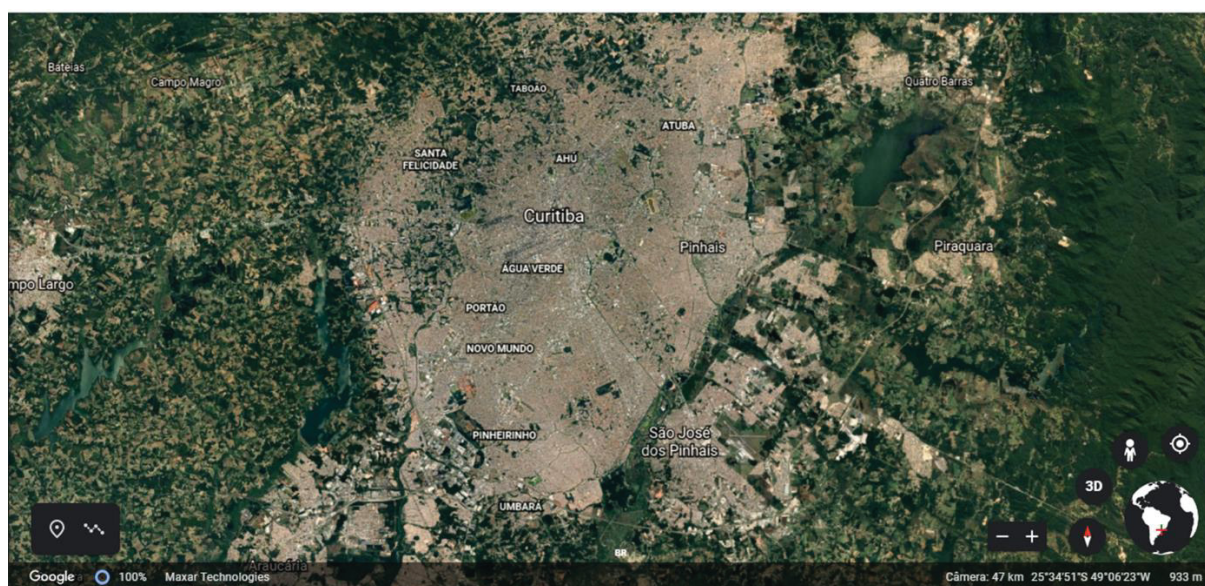
¹ O código do isolado foi concebido de forma a definir o local de coleta, no caso dos selvagens, por uma letra maiúscula, seguido do número da amostra. Para os comerciais foi adotado um sistema para facilitar a identificação da espécie, variedade e fabricante. Legenda: F = *campus* Jardim Botânico UFPR, próximo à engenharia florestal; CL = zona rural do município de Clevelândia - Pr; RV = zona rural do município de Reserva - Pr; CB = *campus* Centro Politécnico UFPR, próximo ao CENBAPAR; LP = condomínio *Le Parc*, bairro Bacacheri, Curitiba - PR; T = Treelos, Curitiba; L = Loman, Castro - PR; Y = Cogumelos Yamashita, São José dos Pinhais - PR; JM = João e Maria, Araucária, Pr; EC = Eloy Citi, RMC, Pr; U = Urakami, Mogi das Cruzes - SP; MM = Mercado municipal, bandeja sem identificação. Curitiba, Pr.

² Tentou-se identificar até o menor *taxon* possível;

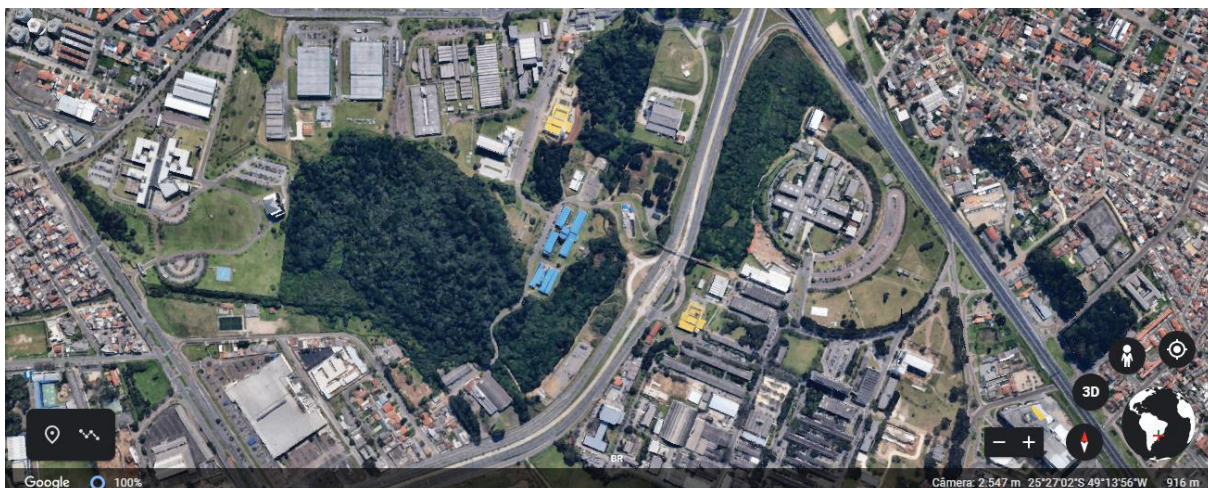
³ Para a data adotou-se AAMMDD;

⁴ RLV = Ricardo Luiz Vieira (autor); AARdM = André August Remi de Meijer (colaborador externo); LPP = Leonardo Portela Pereira (colaborador interno IC).

FIGURA 15 – PRINCIPAIS ÁREAS DE COLETA EM CURITIBA E NOS CAMPI DA UFPR



(a)

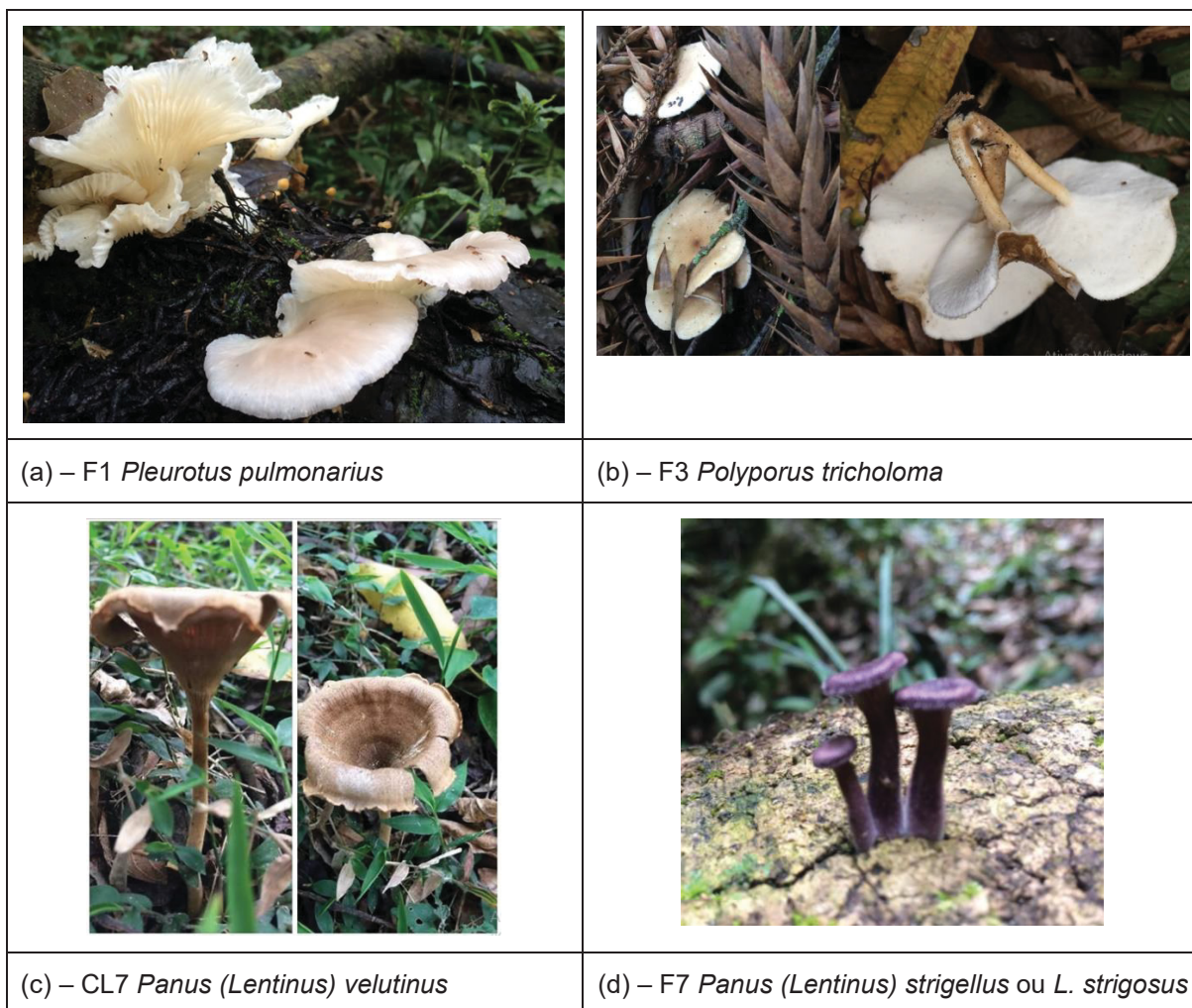


(b)

FONTE: O autor (2021) – ©Google Earth.

Imagem aérea, 47 km de altitude, da cidade de Curitiba (a) com aproximação para altitude de 2,55 km (b) destacando as áreas verdes em todo território urbano e periurbano (a), e dentro dos *campi* da UFPR (b), onde foi realizada a maioria das coletas

FIGURA 16 – ALGUMAS IMAGENS DE CAMPO DAS ESPÉCIES ENCONTRADAS

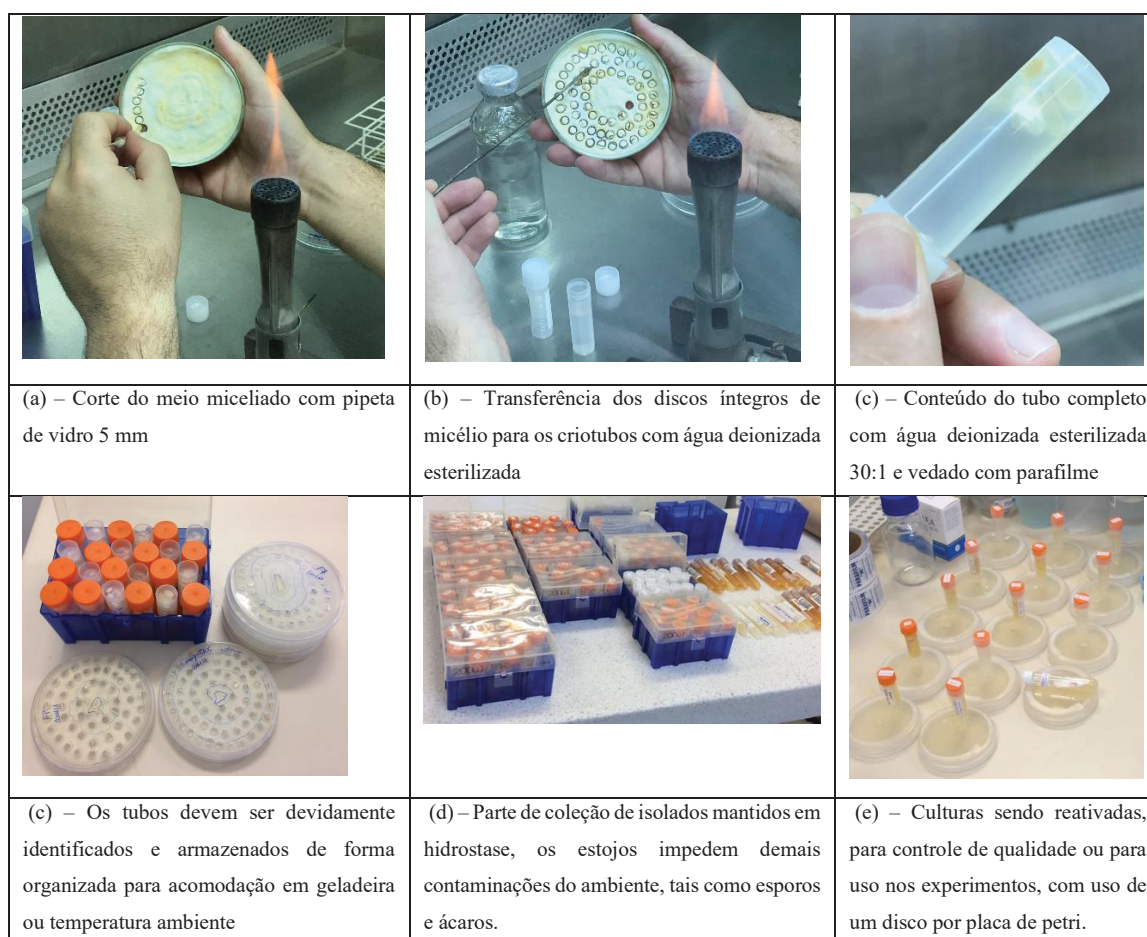


FONTE: O autor (2019-2021).

Com um sucesso de isolamento de 23,33% de micélios estáveis a partir dos carpóforos coletados, a estratégia de isolamento para trabalhos futuros pode envolver outras técnicas além das empregadas neste estudo (explantes internos), tais como coleta de esporos, micélios rizomórficos diretamente do substrato, ou outros, tais como meios de cultura alternativos, mais nutritivos ou seletivos, meios essenciais ou não esterilizados, ou com uso de armadilhas (SENANAYAKE *et al.*, 2020).

Os micélios estáveis foram mantidos num biorrepositório com três modalidades de preservação: a hidrostase em discos de ágar ou papel, a preservação com vaselina líquida (temperatura ambiente) e a criopreservação a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em endosperma rígido de trigo (testado até o momento apenas para algumas cepas). A figura 19 representa os procedimentos para preservação em hidrostase e reativação das cepas.

FIGURA 17 –Procedimentos para preservação e reativação das cepas

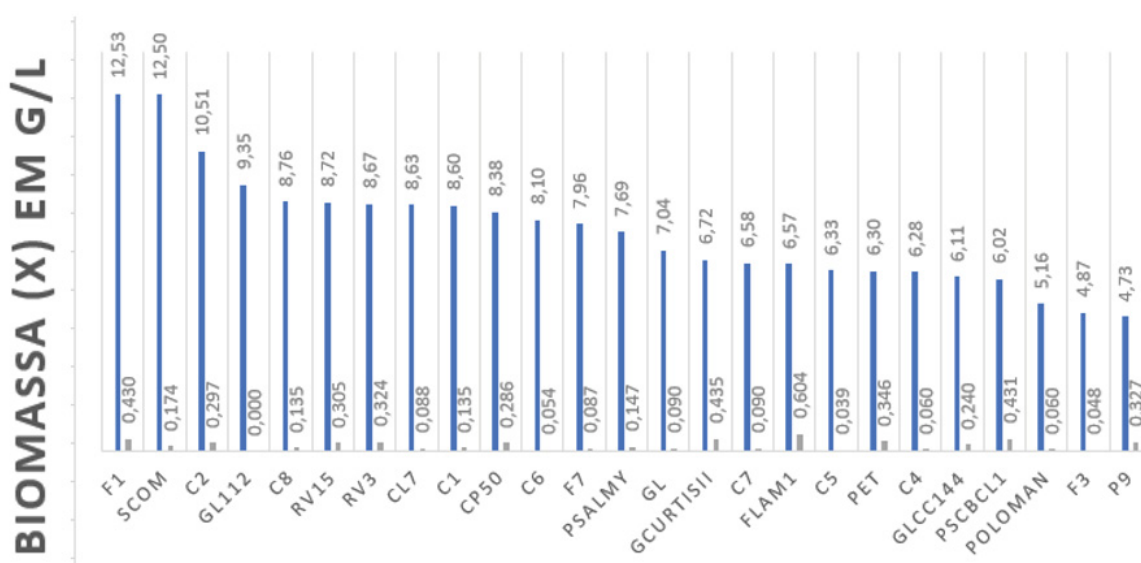


FONTE: o autor, 2020

4.2. FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA

Os isolados estáveis foram selecionados conforme o item 3.5 e cultivados em batelada de fermentação submersa com meio MCM, normalmente em triplicata, juntamente com as cepas da coleção CENBAPAR (quadro 4), resultando em concentração final de biomassa (X_f), que variou desde 1,21 até 12,53 g/L. As 25 cepas que demonstraram o melhor rendimento em biomassa dentre as 42 testadas estão apresentadas no Gráfico 2

GRÁFICO 2 – Rendimento em biomassa de 25 cepas com melhor performance, em fermentação submersa



FONTE: O autor (2021). – Fermentação realizada em meio MCM a 25 °C, pH inicial 5,5-6,5, 120 rpm, 7-16 dias de incubação sem luminosidade. As barras em azul representam a concentração final (X_f) de biomassa seca (g) produzida por unidade de meio (L), as barras em cinza, o desvio padrão em triplicata, para cada cepa, $X_{média} = 7,72 \pm 2,05$ g/L

As cepas que apresentaram maior rendimento em biomassa foram F1 (novo isolado selvagem de *Pleurotus pulmonarius*, em 7 dias de SmF agitada) e SCOM (*Schizophyllum comune* proveniente da coleção CENBAPAR, com cultivo misto em 25 dias), com 12,5 g/L de biomassa seca.

As cepas demonstraram uma variada morfologia do micélio, com formação de filamentos, agregados ou pellets, de acordo com a espécie, a velocidade de rotação e o tempo de incubação. Algumas cepas desenvolveram pigmentos com tonalidades semelhantes aos seus respectivos corpos de frutificação, tais como *Lepista sordida* e *Trametes sanguinea*. Estes resultados podem possibilitar estudos ulteriores para isolamento e caracterização destes pigmentos. A figura 18 ilustra o resultado da cepa F8 (novo isolado de *Pleurotus pulmonarius*).

FIGURA 18 –FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA CEPA F8 (*Pleurotus pulmonarius*) EM ERLLENMEYER COM AGITAÇÃO ORBITAL



FONTE: O autor (2020).

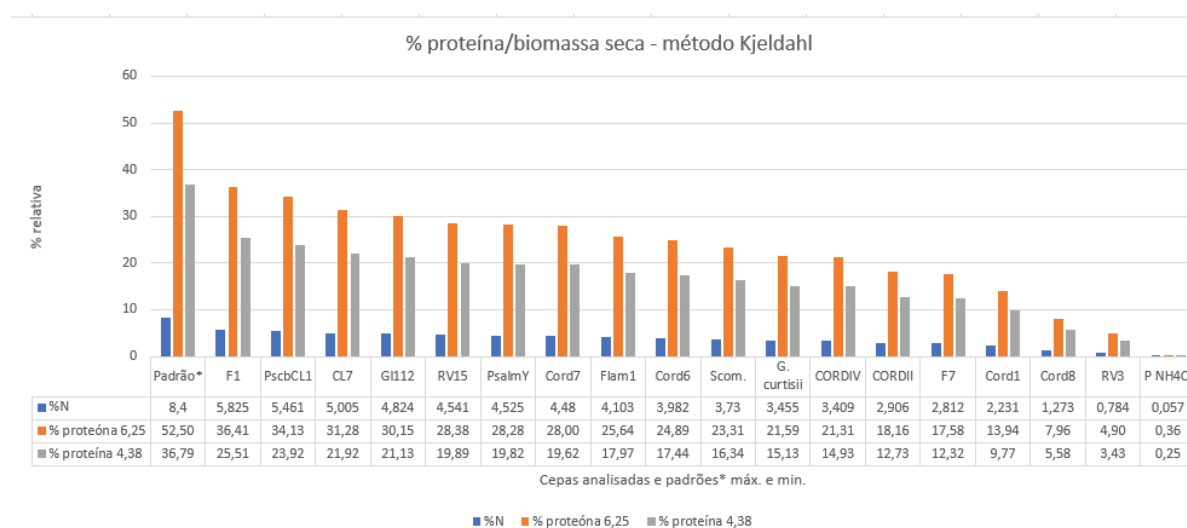
Pellets micelianas em suspensão no meio MCM. Fermentação submersa com 7 dias de incubação com a cepa selvagem **F8** *P. pulmonarius* em 67 mL de MCM, 24 °C 128 rpm, ausência de luz e pH inicial 5,5. $X_f = 4,78$ g/L

Outro detalhe interessante é a produção de micélio aéreo com características hidrofóbicas na fermentação mista: agitação por 7-10 dias seguida por cultivo estático por 7-10 dias. Algumas culturas formaram até primórdios e corpos de frutificação nesta modalidade, como no caso de *Pleurotus*, *Polyporus tricholoma* e *Schizophyllum commune*, confirmando a identidade das cepas. Outros desenvolveram pigmentos melanizados, como *Laetiporus gilbertsonii* e *Coprinus comatus*.

4.2.1 Composição proteica da biomassa

Das 42 cepas fermentadas, 17 foram selecionadas, com base na diversidade, rendimento e disponibilidade, para determinação da composição proteica por % de massa seca pelo método indireto (Kjeldahl). Os resultados estão apresentados no gráfico 3.

GRÁFICO 3 – Quantidade relativa de proteína pelo método indireto, a partir da biomassa seca de 17 cepas produzidas em fermentação submersa



FONTE: O autor (2021). – Quantificação da composição proteica (%_{prot}) pelo método indireto (Kjeldahl) utilizando, de forma comparativa, dois fatores de conversão: o padrão do laboratório (6,25) e o recomendado para fungos (4,38) em função da alta presença de quitina da parede celular (referência).

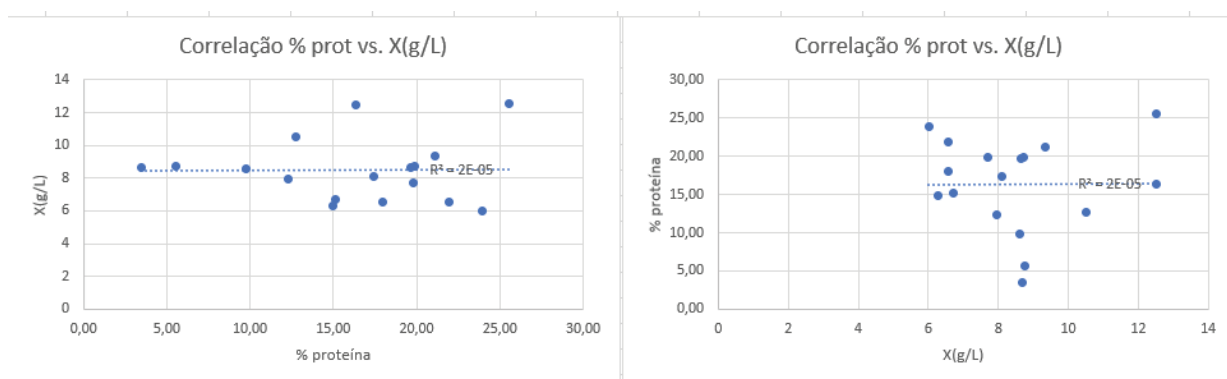
Foram considerados dois índices de estimativa para a relação proteína-nitrogênio: 4,38, normalmente recomendado para fungos em função da grande quantidade de quitina na parede celular e amônia solúvel (ref.), e 6,25, padrão comum utilizado pelo laboratório e também citado por alguns autores (CRISAN e SANDS, 1978; UZUN, Y. et al., 2009). Para se estimar com mais precisão a porcentagem de proteína por esse método, deve-se mensurar a quantidade de quitina, amônia e de

outros compostos nitrogenados não proteicos presente nas amostras, o que pode ser realizado pelo método da nihidrina ou da precipitação pelo ácido tri-cloro acético (TCA), pelo qual é possível encontrar um fator de conversão mais preciso. De qualquer maneira, a recomendação geral é utilizar o fator 4,38 para fungos.

O maior percentual de proteína foi obtido para a cepa F1 que também apresentou maior rendimento em biomassa. Considerando o índice de 4,38, o percentual proteico na biomassa desta cepa foi de 25,51% (média: 16,3%).

Os resultados obtidos para todas as cepas foram tabelados com os respectivos valores de X_f e %prot para um cálculo de correlação, que resultou nulo ($R^2=0,00002$) – gráfico 4. Assim, não se pode inferir que se um fungo produz biomassa de forma veloz e eficaz necessariamente produzirá proteína em quantidades equivalentes, segundo esta aferição empírica.

GRAFICO 4 – Análise de correlação entre X_f e %proteína das cepas



Fonte: O autor (2020) – Os dados obtidos na quantificação de biomassa fermentada (X_f – base seca) e porcentagem de proteína por Kjeldahl demonstraram não estar correlacionados ($R^2 = 0,00002$)

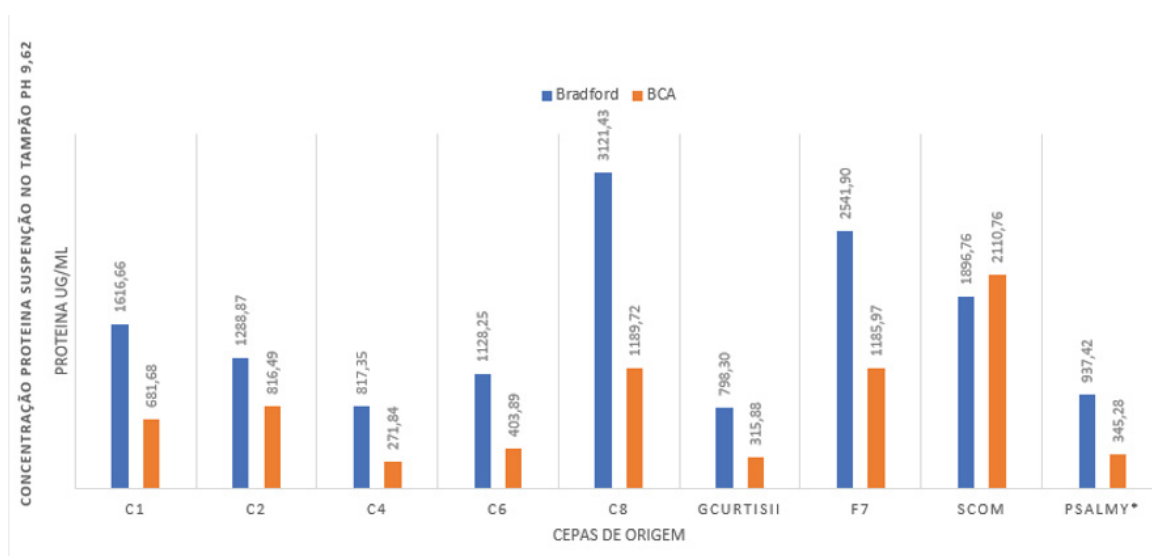
Entretanto, esses resultados empíricos apresentaram excelentes pontos de partida para a escolha das cepas a serem investigadas no presente trabalho, de modo que foram selecionadas aquelas com maior percentual de proteína na composição da biomassa seca e também os maiores rendimentos de biomassa (X).

4.3 ROMPIMENTO CELULAR E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A partir desse ponto, se iniciou a extração de proteína da biomassa produzida, onde utilizamos primeiro o método de rompimento celular por ultrassom, numa suspensão aquosa com pH 9,62 (mensurado após suspensão da biomassa), nas condições descritas no item 3.10. As amostras se comportaram de maneira diferente

a este tratamento, dependendo da espécie, com algumas formando granulações visíveis, enquanto outras diminuíram rapidamente a viscosidade. A solução com micélio rompido, deixada em repouso overnight a 4 °C, apresentou leve acidificação para pH 6-7, sendo, nesses casos, o pH novamente ajustado para 9,5 -10. A concentração proteica mensurada no sobrenadante, após separação dos debris celulares, está apresentada no Gráfico 4. De acordo com a literatura, essa faixa de pH não tem interferência na quantificação dos testes de concentração proteica utilizados.

GRÁFICO 5 – Concentração proteica a partir do rompimento celular



FONTE: O autor (2021). – Comparação Bradford e BCA da concentração proteica (µg/mL) da suspensão dos extratos celulares no tampão de extração de algumas cepas.

Foi observada significativa variação nos resultados de ambos os métodos para a maioria das amostras (gráfico 5). Isso provavelmente se deve à composição proteica dos extratos. Em geral, o método Bradford é acurado para proteínas de massa molecular >3kDa, e pode sofrer bastante interferência da composição desta proteína, enquanto o BCA é capaz de detectar peptídeos a partir de 3 aa ou mais, pois a ligação peptídica funciona como reativo para a formação de cor.

Após essa etapa, as proteínas da solução foram precipitadas tal qual descrito na seção 3.10, e o pellet proteico obtido foi liofilizado, pesado em balança analítica e armazenado a -80°C (BUCHI, 2021).

4.4 OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ENDÓGENOS

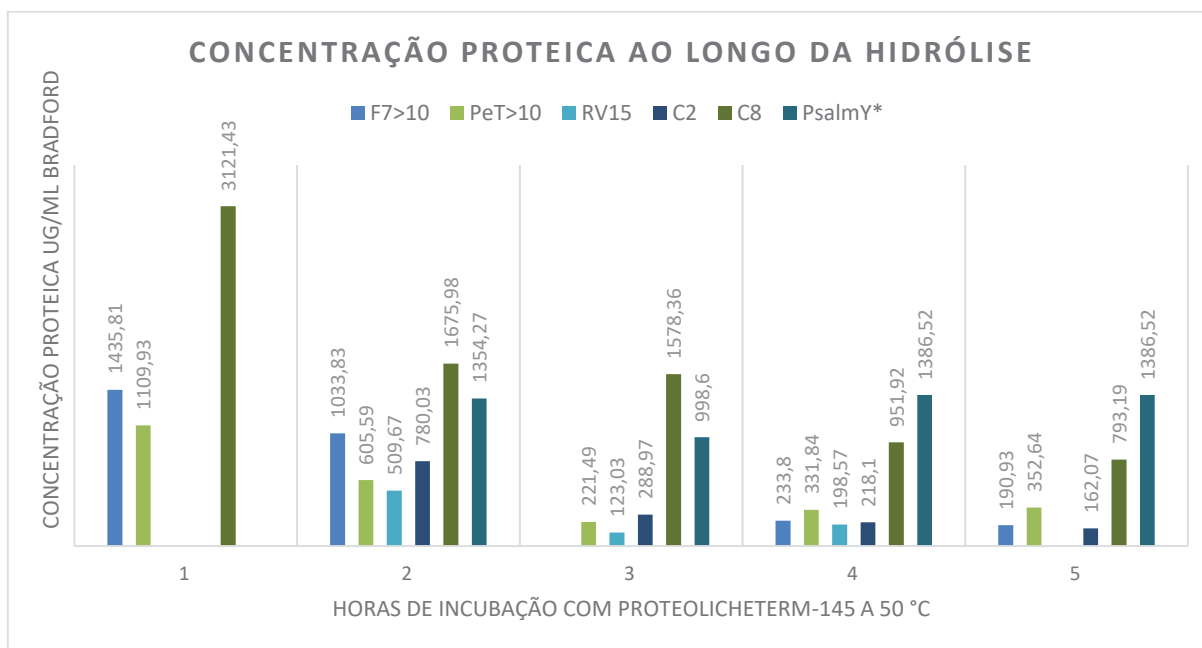
O processo de rompimento celular e extração de proteínas por ultrassonicação, por si só, já é capaz de gerar peptídeos de baixa massa molar. Sendo assim, os precipitados (pellets) proteicos foram ressuspensos em água ultrapura ou tampão Tris-HCl e submetidos a alguns ciclos de ultrassonicação em banho imerso, de modo a aumentar a solubilização das proteínas e peptídeos. A solução foi então fracionada por ultrafiltração em ordem crescente de limiar de peso molecular (3, 5 e 10 kDa), logo após microfiltração em membrana de 0,22 μm .

Esse procedimento é fundamental para garantir que o produto da hidrólise seja realmente fruto da digestão enzimática, além de separar os peptídeos endógenos produzidos pelo próprio fungo, que podem ser tanto produto de síntese não ribossômica, de vias metabólicas específicas, ou resíduos de outras proteínas oxidadas naturalmente da degradação dos precipitados. Foram obtidas concentrações relevantes (~30-1000 $\mu\text{L/mL}$) de peptídeos endógenos nessa primeira separação, os quais foram também submetidos aos testes de bioatividade.

4.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática com o preparado enzimático *Protolicheterm* -145 teve uma performance eficiente sobre as frações proteicas testadas (>10 kDa). Foram realizados dois experimentos em condições diferentes, o primeiro com a concentração E/S 0,02 g/g no tampão carbonato bicarbonato pH = 8,5, considerado ótimo segundo KOSTYLEVA et al. (2015), e no segundo utilizou-se uma concentração E/S 0,1 g/g, com hidrólise em água ultrapura a pH 7, a qual foi proporcionalmente 5 vezes mais veloz (1 h) para se chegar em 100% de hidrólise em algumas amostras, de acordo com o método de Bradford, que detecta proteínas e peptídeos de massa molar superior a 3kDa. Ressalta-se que a hidrólise total não é desejada quando o objetivo é obter peptídeos, mas isso irá depender também do sistema enzimático escolhido, se é uma endo ou exopeptidase. O Gráfico 6 representa a diminuição das concentrações de proteínas de alta massa molar ao longo do tempo de hidrólise no primeiro ensaio de digestão.

GRÁFICO 6 – Hidrólise dos concentrados proteicos intracelulares de algumas frações



FONTE: O autor (2021). – Nesta primeira hidrólise foi utilizado o tampão carbonato/bicarbonato pH 8,5, a 50 °C, com interrupção na 5ª hora em banho maria a 100 °C por 10 min. A cada hora, 10 uL das amostras foram coletadas para o teste de concentração Bradford. F7: *Panus strighellus*, PeT: *Pleurotus eryngii* Treelos, RV15: cf. *Rhodocybe* sp., C2 e C8: *Cordyceps sinensis*, PsalmY: *Pleurotus djamor* Y.

4.6 AVALIAÇÃO DE MÉTODO ALTERNATIVO DE EXTRAÇÃO PROTEICA PARA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ENDÓGENOS E HIDROLISADOS

Este método, baseado em extração aquosa simples, é menos seletivo para proteínas, de modo que outros compostos, além de proteínas e peptídeos, tanto de baixo quanto de alto peso molecular, podem estar presentes. Deste modo, pode-se realizar outras operações de purificação da fração proteica solúvel, tal como a precipitação por sais ou por ponto isoelétrico com mudanças de faixa de pH, mas nesse caso não foram realizados. Ainda assim, foram obtidas elevadas concentrações de proteínas nas extrações, como se pode observar nas cepas anotadas na Tabela 2

As extrações foram com água ultrapura, no extrato ,1 com volume de 10 mL, e nas extrações 2 e 3, com 5 mL cada. Ao final os extratos foram reunidos em 20 mL e medida a sua concentração final. A centrifugação exerceu um papel interessante neste primeiro processo de extração, pois em algumas amostras a concentração proteica aumentou no teste de detecção, mas em outras, como p. ex. GLCG144,

diminuiu drasticamente, o que pode apontar precipitação da fração solúvel (detalhes no anexo 4). A terceira extração foi realizada com banho ultrassônico, que aumentou consideravelmente a concentração final entre antes e depois dessa operação, e neste último, não foi realizada centrifugação.

QUADRO 5 – Concentrações proteicas ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos aquosos do micélio seco

cepa	Extrato 1	Extrato 2	Extrato 3	Extrato total
F3	1389,5	642,46	934,52	1055,9
GL112	707,03	314,02	729,1	523,68
L6609	1515,55	744,38	1132,72	1116,17
GFC	1656,46	1085,19	1615,29	1455,71
F8	1417,93	514,34	928,15	1307,16
PdjCH	650,58	210,03	390,41	507,98
PscbCL1	1515,12	579,28	568,67	1011,76
GLCG144	54,69	33,47	435,82	59,36
Volume (mL)	10	5	5	20

Fonte: O autor (2021)

Após esta etapa, foi novamente realizada a ultrafiltração para separação dos possíveis peptídeos endógenos, da mesma maneira que nos precipitados proteicos do rompimento celular, com passagem dos extratos pela membrana de 0,22 μm , seguida das centrifugações nas membranas de limiar de peso molecular crescente, 3, 5 e 10 kDa, a 4000 rpm por 20 min cada.

Os extratos ultrafiltrados foram identificados e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, com a fração superior a 10 kDa medida a concentração para posterior hidrólise enzimática com *Protolicheterm*- 145. Para esta hidrólise utilizou-se o pH neutro e uma relação E/S de 0,1 g g^{-1} , que apresentou um grau de hidrólise entre 86,74 a 100,00 % em 1h de incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.7 TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.7.1 Atividade antioxidante

O primeiro teste realizado foi o de limpeza de DPPH, que resultou em um total de 45 frações reativas dentre 71 testadas. Os resultados de todas as frações reativas, com seus respectivos valores em % de atividade e concentração proteica recuperada,

obtidas pelos diferentes métodos, estão reunidos na quadro 6. Os extratos aquosos endógenos ultrafiltrados com peso molecular <10 apresentaram os maiores resultados, seguidos pelos extratos aquosos hidrolisados e então pelos precipitados proteicos endógenos.

QUADRO 6 – Atividade antioxidante das frações peptídicas sobre o radical DPPH (%)

cepa e fração kDa	origem	conc. Pept.	DPPH
GLCG144<10	eae	59,36	98,39
PscbCL1<10	eae	1011,76	91,32
L6609<10	eae	1116,17	90,51
F8<10	eae	1307,16	90,35
GL112<10	eae	523,68	87,76
GFC<10	eae	1455,71	86,98
F3<10	eae	1055,9	84,89
F8<10	eah	n.d.	83,78
L6609<10	eah	n.d.	82,51
GL112<10	eah	22,01	81,5
GLCG144<10	eah	n.d.	77,67
PdjCH<10	eah	8,86	76,88
PscbCL1<10	eah	145,1	76,68
C1<10	ppe	480,39	73,88
GFC<10	eah	93,32	70,6
PdjCH<10	eae	507,98	66,24
C4<3	ppe	30,39	65,49
F3<10	eah	1055,9	62,91
C6<10	ppe	165,36	56,83
CL7<3	ppe	23,29	54,06
C6<5	ppe	88,73	52,91
Scom<10	ppe	n.d.	52,77
F7<3	ppe	172,81	52,49
CL7<10	ppe	416,3	50,39
CL7<5	ppe	n.d.	50,39
F7<10	ppe	156,8	45,68
F7<5	ppe	128,35	45,03
C4<10	ppe	278,45	43,84
C6<3	ppe	214,27	43,84
AaCc<10	ppe	1784,7	43,32
C1<5	ppe	64,08	42,9
PscbCL1<3	ppe	146,3	35,6
AaCc<5	ppe	n.d.	32,98
F1<3	ppe	n.d.	32,59
PscbCL1<5	ppe	24,78	30,89
PeT<5	ppe	n.d.	29,06
PeT<3	ppe	n.d.	28,93
AaCc<3	ppe	n.d.	27,09
PeT<10	ppe	770,66	26,96
F1<10	ppe	216,7	25,13
C4<5	ppe	44,09	23,41
PscbCL1<10	ppe	n.d.	8,77
F1>10	ppe	366,83	7,2

Fonte: O autor (2021) – cepas e frações em preto: CENBAPAR, verde: Selvagem e azul: comercial; siglas de origem: eae: extrato aquoso endógeno, ppe: precipitado proteico endógeno, eah: extrato aquoso hidrolisado. n.d.: não detectado.

4.7.2 Atividade antimicrobiana

Não foi observada atividade antimicrobiana significativa para nenhuma das amostras analisadas (14). Mas, vale ressaltar aqui, que algumas misturas peptídicas até mesmo estimularam o crescimento bacteriano, considerando-se o aumento da turbidez aparente em relação ao controle. Para se avaliar com mais precisão esse possível efeito deverão ser feitos experimentos posteriores de fermentação comparando-se outros parâmetros, inclusive, para o estímulo de microrganismos probióticos, como alguns derivados já são usados diretamente na indústria de bebidas lácteas fermentadas (GOLAK-SIWULSKA *et al.*, 2018; PELAES VITAL *et al.*, 2015).

De acordo com Yuyama *et al.* (YUYAMA *et al.*, 2018), os compostos fúngicos podem demonstrar diferentes taxas de inibição contra micro-organismos patogênicos, e essa inibição pode ser classificada em alta (70-90%), boa (40-60%) e moderada (20-40%). Nestes experimentos realizados encontramos apenas sensíveis diferenças que não foram significativas para apontar alguma atividade de inibição. As cepas testadas são de microrganismos patogênicos isolados do ambiente hospitalar e foram desafiadas contra frações peptídicas de 8 cepas, com concentrações entre 60 e 1300 µg/mL, com valores de absorvância, a 620nm, do crescimento médio em 24h. O controle positivo (salina) a leitura resultou em valores entre 0,380 e 0,809, dependendo da cepa. Para valores de controle negativo ou de inibição máxima, a média foi 0,066 (cloranfenicol). A resposta das amostras testadas (GFC<10 hdrl; F3 <10 hdrl; GLCG144 <10 eae, GLCG144<10 hdrl; PscbCL1<10 hdrl, F1<10 hdrl; F8<10 hdrl) foi entre 0,790 e 0,843, em geral, mais altos que a média do controle positivo (0,682).

4.7.3 Atividade de inibição de ACE

O ensaio para inibição da ACE foi o resultado mais surpreendente deste trabalho, onde se observou atividade inibitória em 33 das 54 frações testadas, sendo que dessas, 18 apresentaram inibição acima de 80%. A Tabela 10 apresenta os resultados das 21 amostras com maiores valores de atividade inibitória combinada com a atividade antioxidante, das quais entre cinco e dez serão selecionadas para identificação dos peptídeos. No apêndice 2 está o resultado global do ensaio de ACE.

A interação, o modo de inibição enzimático (competitivo, não-competitivo ou misto) e a concentração para inibição de 50% da atividade (IC₅₀) somente poderá ser avaliado a partir da identificação dos peptídeos, sejam de origem endógena (por rompimento celular ou extrato aquoso) ou hidrolisados por *Protolicheterm* – 145. Este preparado enzimático, sendo uma serino protease, pode estar envolvida na geração de peptídeos inibitórios de ACE pela formação de produto com afinidade, tanto competitiva (no sítio ativo), quanto não competitiva (interação alostérica). Apenas uma fração ativa a partir do precipitado proteico hidrolisado foi detectado, o da cepa F7 (*Panus strighellus*), e as demais frações ativas (8) obtidas a partir da hidrólise dos extratos aquosos, detalhadas na tabela 4, com a maior atividade combinada.

TABELA 4 – Frações peptídicas com atividade antioxidante e inibitória de ACE

Espécie/cepa*	Fração	Origem	Conc. peptídica µg/mL**	Volume (mL)	Quant. peptídeo (µg)	DPPH %	iECA %
<i>Pleurotus pulmonarius</i> F8 hdrl	<10 kDa	eah	2197,22 (1085,12)	1	2197,22	83,78	90,8
<i>Ganoderma lucidum</i> GL112 hdrl	<10 kDa	eah	4466,09	1,25	5582,61	81,5	85,41
<i>G. lucidum</i> GLCG144 hdrl	<10 kDa	eah	547,55	2,5	1368,87	61,48	77,69
<i>Panus strighellus</i> F7	<10 kDa	ppe	259,83	3	779,49	45,68	80,08
<i>Panus strighellus</i> F7	<5 kDa	ppe	128,55	1	128,55	45,03	84,92
<i>Schizophyllum comune</i> Scom	<10 kDa	ppe	156,55	3,4	532,27	52,77	82,62
<i>Auricularia</i> sp. AaCc	<10 kDa	ppe	496,52	3,6	1534,57	43,32	81,8
<i>Pleurotus pulmonarius</i> F1	<10 kDa	ppe	208,75	2,8	584,5	25,13	81,8
<i>Auricularia</i> sp. AaCc	<10 kDa	ppe	20,9 (496,52)	6,4	133,76	43,32	81,8
<i>Pleurotus djamor</i> PdJCh hdrl	<10 kDa	eah	1215,84	0,7	851,09	76,78	81,72
<i>Grifola frondosa</i> GFC hdrl	<10 kDa	eah.	26757,13(40375,6)	1,2	32108,55	70,6	81,15
<i>Pleurotus eryngii</i> Treelos	<10 kDa	ppe	16,12	3	48,36	29,06	76,56
<i>Pleurotus eryngii</i> Treelos	<5 kDa	ppe	2,4	5	12	29	73,36
<i>Pleurotus eryngii</i> Treelos	<3 kDa	ppe	n.d.	0,8		28,93	80,16
<i>Psilocybe cubensis</i> CL1	<5 kDa	eae	24,78	2	49,56	30,89	77,46
<i>Psilocybe cubensis</i> CL1	<10 kDa	eae	7,8	3	23,4	73,7	75,9
<i>Panus velutinus</i> CL7	<10 kDa	ppe	56,8 (89,14)	3	170,4	50,39	73,93
<i>Panus velutinus</i> CL7	<5 kDa	ppe	97,6 (n.d.)	2	195,2	50,39	73,85
<i>Panus velutinus</i> CL7	<3 kDa	ppe	87,27 (n.d.)	0,6	52,3	54,3	65,08
<i>Lentinula edodes</i> L6609 hdrl	<10 kDa	eah	4616,25	2,5	11540,63	82,51	63,93
<i>Polyporus tricholoma</i> F3 hdrl	<10 kDa	eah.	39,02 (310,72)	0,6	23,41	62,61	62,13

(*) em preto CENBAPAR, verde Selvagem, azul Comercial. Origem das amostras, ou método de obtenção: (eah) extrato aquoso hidrolisado / (ppe) precipitado proteico endógeno / (eae) extrato aquoso endógeno; (**) em vermelho: concentrações medidas no dia da obtenção (variável por amostra), em preto: 24/05/21 – amostras mantidas a -80 °C. FONTE: O autor (2021)

4.8. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Conforme observado nos resultados da Tabela 4, as frações com maior bioatividade combinada (antioxidante e hipotensiva), apresentam resultados relevantes encontrados neste estudo. O destaque para as frações obtidas a partir de isolados selvagens representam possibilidades inovadoras para descoberta de novos

PB ainda não identificados, o que pode representar novos avanços originais e até mesmo possibilitar pedidos de novas patentes para o uso destes peptídeos.

As concentrações peptídicas encontradas denotam uma eficiência relevante do método empregado, haja visto a concentração, o que indica o potencial da sua purificação e identificação. Um ponto a ser observado é a alta atividade das frações com baixa concentração, como no caso das frações endógenas derivadas da cepa comercial PeT (*Pleurotus eryngii* Treelos) e das cepas conservada no banco CENBAPAR Scm (*Schizophyllum comune*), *Auricularia* AaCc e da nova cepa selvagem isolada de *Psilocybe cubensis* (PscbCL1) (Tabela 4).

Todavia, vale comentar o principal destaque em face aos resultados ora apresentados, que se estabelece na performance significativa das frações derivadas das cepas selvagens, tais como o hidrolisado do extrato aquoso derivado de F8 e F1 (novos isolados selvagens de *Pleurotus pulmonarius*), as duas frações (5 e 10 kDa) de F7 (novo isolado de *Panus strighellus*), de CL7 (*Panus velutinus*), de F3 (*Polyporus trichiloma*), além do já mencionado PscbCL1, todos ainda inéditos, até o momento, para descoberta de PB com tais características.

Comentários relevantes sobre esses resultados merecem atenção sobre as frações derivadas de *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Auricularia* sp. e do isolado selvagem de *Pleurotus djamor* CH (PdJCH) que são cepas mantidas no biorrepositório do CENBAPAR mas que ainda não foram investigadas nesse sentido.

Nos anos recentes, a rotina turbulenta e competitiva tem causado aumento crônico nos níveis de estresse da população de um modo geral, associada ainda a hábitos alimentares e sedentários danosos. Estes fatores são responsáveis pela gênese da hipertensão. Esta doença acarreta diversos males associados, tais como infarto do miocárdio, eventos cerebrovasculares, insuficiência arterial periférica, além da disfunção renal, resultado do aneurisma arterial renal e a glomérulo-esclerose, conduzindo à morte prematura. Além disso, a hipertensão tem sido anotada como algumas das comorbidades sérias para predisposição dos casos graves de COVID-19, osteoartrite, diabetes ou doenças neurodegenerativas.

Um grande número de terapias tem sido apresentado, tanto como forma preventiva quanto terapêutica, mas as drogas redutoras da pressão sanguínea ainda são as preferidas para o tratamento imediato. Os inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina têm sido o principal alvo destas substâncias, sendo a primeira linha no

combate à hipertensão, à falência congestiva do coração e à disfunção sistólica esquerda (DSE).

Uma das características principais dos ACEis é a capacidade de reduzir a pressão periférica sem aumentar a demanda compensatória cardíaca. Estas características permitem o uso destas substâncias sem prejuízo das atividades físicas.

As implicações clínicas dos resultados parciais ora obtidos permitem extrapolar teoricamente a sua ação muito além da conjuntura da hipertensão, não apenas pela interação com outros sistemas, mas principalmente pela sua atividade inibitória direta nesta enzima chave (HANIF, K., BID, H. K., KONWAR, R., 2010).

Uma mensuração apurada da concentração de proteína é crucial uma vez que estes valores irão interferir em outros cálculos, tais como a atividade enzimática e IC_{50} . Os erros na determinação da concentração proteica tendem a amplificar os erros nestas estimativas. Não existe nenhum método de ensaio para determinação da concentração de proteína que demonstre resultados absolutamente apurados. Um dos aspectos mais difíceis para determinação da concentração de proteínas é a escolha do ensaio mais adequado, compatível com o tipo de amostra. Todos os ensaios utilizados neste trabalho detectam propriedades específicas de uma proteína, não a proteína completa. Assim, a proteína e o tampão utilizado são os determinantes primários para a escolha do ensaio mais apropriado. A melhor escolha para estes testes de rotina seria, possivelmente, um ensaio padronizado para análise da quantidade total de aminoácidos. De qualquer maneira, os testes utilizados têm diferentes sensibilidades para diferentes proteínas. Como curva padrão para todos os ensaios utilizou-se a BSA (albumina do soro bovino), construídas para cada teste conforme protocolos essenciais apresentados no APÊNDICE 1. Assim, as concentrações variaram de acordo com a amostra e a origem, demonstrando atividade tanto em concentrações altas quanto abaixo do espectro de detecção destes testes.

Atualmente já existem diversos produtos comerciais derivados de macrofungos com alguma indicação da atividade hipotensiva, derivadas tanto dos carpóforos quanto do micélio, produzidos por diversas empresas ao redor do mundo, vendidos principalmente como suplementos nutricionais.

Alguns peptídeos derivados de macrofungos foram isolados e identificados por outros trabalhos, com propriedades anti-hipertensivas, e são apresentados na Tabela 11 (apenas uma amostra). GEP derivado de *Tricholoma giganteum* exerceu efeito inibitório considerável *in vivo* em ratos hipertensivos espontâneos (SHR) com doses

de 1 mg/kg da massa corporal (BW), em duas horas após administração. A pressão sistólica diminuiu em 36 mmHg, enquanto que com o controle comercial captopril® diminuiu 27 mmHg. Além disso, não foi observado toxicidade ou efeito colateral, tais como reações alérgicas ou tosse (LEE *et al.*, 2007).

GENG *et al.*, 2016, destacaram um peptídeo inibidor de ACE a partir do extrato aquoso dos carpóforos de *Tricholoma matsutakei* (um cogumelo premiado), com IC₅₀ de apenas 0,40 µM, menor do que os valores IC₅₀ de peptídeos inibidores de ACE isolados da proteína do soro de leite e da caseína e a maioria dos peptídeos isolados dos subprodutos cárneos incluídos no estudo de HERNADEZ-LDESNA *et al.*, 2019. A sequência de AA foi identificada como WALKGYK, que foi posteriormente sintetizado e denominado como TMP. Administração oral em SHR com doses de 25 e 50 mg/kg BW. Diminuições máximas da pressão sistólica de 18 e 36 mmHg. Sem efeitos colaterais ou alergias, TMP se mostrou um inibidor não-competitivo.

TABELA 5 – Alguns peptídeos anti-hipertensivos isolados e identificados.

Espécie de macrofungos	Sequência de aa	IC ₅₀ e modo de inibição
<i>Grifola frondosa</i>	VIQKYP	97µg/mL - competitivo
<i>Tricholoma giganteum</i>	GEP	40µg/mL - competitivo
<i>Pholiota adiposa</i>	GEGGP	44µg/mL - competitivo
<i>Pleurotus cystidiosus</i>	AHEPVK	62µM - competitivo
<i>Agaricus bisporus</i>	AHEPVK	63µM - competitivo
<i>Ganoderma lucidum</i>	QDVL	155µM - competitivo

Fonte: O autor (2021) – modificado a partir de ZHOU *et al.*, 2020

O mesmo peptídeo AHEPVK foi encontrado em duas espécies diferentes, *Pleurotus cystidiosus* e *Agaricus bisporus* (LAU *et al.*, 2013 e LAU *et al.* 2014). Outros peptídeos com propriedades anti-hipertensivas foram descritos por WU *et al.*, 2019, como pequenos peptídeos derivados de *Ganoderma lucidum*, e alguns deles operando de maneira combinada com inibição competitiva e não competitiva, demonstrando a interação de pontes de hidrogênio e pontes salinas, tanto no sítio ativo quanto em sítios não-ativos.

A composição de aa, o terminal C- e o tamanho do peptídeo já são conhecidos como importantes na correlação com a sua atividade. O grau de hidrofocidade,

anfifílicos e alifáticos na composição dos aa também são cruciais para determinar a sua atividade, como é o caso das sequencias apresentadas na Tabela 5. O mesmo se espera para estas frações aqui apresentadas, pois estas são características compatíveis com os sítios de ACE, assim como para as atividades antioxidante e antimicrobiana.

Em vista das numerosas descobertas recentes envolvendo a função benéfica dos inibidores de ACE (HANIF, K., 2010; ALVARENGA, 2016), podemos inferir que as bioatividades encontradas neste estudo apontam inúmeras possibilidades para aplicação dos possíveis peptídeos que poderão ser identificados nestas frações avaliadas, podendo ser utilizadas em uma gama de estratégias contra diversas doenças, tanto na prevenção quanto para novos tratamentos, uma vez que estão apresentando efeitos combinados que podem agir de maneira sinérgica nos tecidos alvo, impedindo tanto a formação direta de ROS, pela forte ação antioxidante encontrada, quanto daqueles efeitos do estresse oxidativo com gênese derivada diretamente da ação de Ang-II, eliminados agora pela ação inibitória de ACE.

As espécies dos gêneros *Pleurotus*, *Lentinula*, *Ganoderma*, *Cordyceps*, *Grifola* pesquisadas no presente trabalho ainda estão longe de exaurir as possibilidades investigativas para novos compostos bioativos, principalmente peptídeos, apesar de várias publicações já realizadas. O destaque para o presente trabalho está para os isolados selvagens, principalmente das espécies inéditas na literatura para esse tema, relacionadas na tabela 4.

Quando comparados os processos operados para a recuperação dos conteúdos proteicos e peptídicos, podemos destacar com este trabalho que a extração aquosa direta merece mais atenção, principalmente pela facilidade, baixo custo, rapidez e alto grau de concentração quando comparada ao método de sonicação e precipitação proteica, mais laboriosa, custosa e demorada, de modo que estes dois processos podem ser combinados de maneira subsequente para uma recuperação mais eficiente destes compostos de alto interesse biotecnológico.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível obter uma quantidade significativa de frações peptídicas com proeminente atividade biológica para dois testes aplicados: limpeza de radicais livres de DPPH (antioxidante) e inibição ACE (anti-hipertensivo). O teste antimicrobiano deve ser aperfeiçoado e aplicado a partir da obtenção de maior volume das frações peptídicas, que poderão então ser testados para uma ampla gama de microrganismos de interesse clínico, nutricional, agrícola e cosmético, o que ainda pode ser aperfeiçoado para produção de prebióticos para aplicação direta em alimentos funcionais, para humanos, para zootecnia ou fitotecnia.

Das dez frações positivas derivadas de cepas selvagens, apenas duas foram resultado de hidrólise, o que indica a produção de PB diretamente do metabolismo intrínseco destas. As atribuições bioativas destas frações podem ser melhor descritas a partir do sequenciamento dos respectivos PB, possibilitando explicar os seus mecanismos de ação.

Mais adiante, serão necessários outros estudos em modelos animais empregando estes peptídeos, após identificados, para avaliar a sua aplicação farmacológica para testes clínicos subsequentes.

Estes resultados apontam a importância dos macrofungos para obtenção de novos compostos de interesse biotecnológico.

5.1. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros, recomenda-se:

- A continuidade da investigação de compostos derivados de cepas selvagens ou comerciais obtidas por isolamento destas e de outras espécies,
- O estudo de novos protocolos de preservação, mais eficazes, menos laboriosos e baratos.
- Cepas preservadas e certificadas da sua estabilidade e identidade biológica: confirmação por DNA e fenótipo enzimático;
- Proceder estudos para ampliação da biomassa por fermentação submersa, mono ou multiespecífica, utilizando como matéria-prima a

infinidade de recursos provenientes das fontes de biomassa da agroindústria, com otimização e escalonamento para aquelas espécies consolidadas como poderosos produtores de compostos bioativos (p. ex., membros dos gêneros *Ganoderma*, *Trametes*, *Cordyceps*, *Grifola*, *Lentinula*, *Pleurotus*, *Panus*, *Agaricus*, *Psilocybe*, *Auricularia*, dentre outros) para produção de alimentos funcionais, fármacos e ingredientes para a indústria cosmética, alimentícia e agrícola.

- A investigação sobre os potenciais derivados destas culturas, principalmente em cultivo submerso, tende a ser promissora, uma vez que estes compostos tem demonstrado ampla atividade biológica, de modo que podem surgir modelos automatizados de rastreamento de resultados positivos, a partir da bioprospecção, para posterior amplificação da biomassa, do isolamento da fração proteica e da sua hidrólise, utilizando não apenas esta enzima em específico, mas também a combinação de vários outros sistemas proteolíticos, que podem gerar produtos de alto valor agregado, produzidos a partir de resíduos da agroindústria, com baixo valor e grande volume, que são até mesmo fonte de poluição ambiental.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, DINESH CHANDRA & DHANASEKARAN, M. (eds.) **Medicinal Mushrooms: Recent progress in research and development**. 422 pp. Springer Nature Singapore Pte Ltd. (2019) <https://doi.org/10.1007/978-981-13-6382-5>
- AGRAWAL, S. and JHA, N. K. (2020) Medicinal mushrooms, **Journal of Critical Reviews**. doi: 10.31838/jcr.07.09.259.
- AGUDELO-ESCOBAR, L.M., GUTIÉRREZ-LÓPEZ, Y. AND URREGO-RESTREPO, S., (2017) Effects of aeration, agitation and pH on the production of mycelial biomass and exopolysaccharide from the filamentous fungus *Ganoderma lucidum*. **DYNA** 84(200), pp. 72-79.
- AGUSTÍ-BRISACH, C. AND ARMENGOL, J. (2012) 'Effects of temperature, pH and water potential on mycelial growth, sporulation and chlamydospore production in culture of *Cylindrocarpon* spp. Associated with black foot of grapevines', **Phytopathologia Mediterranea**, 51(1), pp. 37–50.
- AGYEI, D. AND DANQUAH, M. K. (2011) 'Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides', **Biotechnology Advances**. Elsevier Inc., 29(3), pp. 272–277. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.001.
- AIDA, F. M. N. *et al.* (2009) Mushroom as a potential source of prebiotics: a review, **Trends in Food Science & Technology** 20: 567-575.
- AKATA, I. *et al.* (2019) 'Enzyme inhibitory and antioxidant properties of six mushroom species from the *Agaricaceae* family', **South African Journal of Botany**. doi: 10.1016/j.sajb.2018.01.008.
- ALONSO SALINAS, G. L. AND ZAMORANO GÓMEZ, J. L. (2017) 'Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition', in **Anticancer Treatments and Cardiotoxicity: Mechanisms, Diagnostic and Therapeutic Interventions**. Elsevier Inc., pp. 339–341. doi: 10.1016/B978-0-12-802509-3.00030-3.
- ALY, A. H., DEBBAB, A. AND PROKSCH, P. (2011) 'Fifty Years of Drug Discovery from Fungi', **Fungal Diversity**, 50, pp. 3–19. doi: 10.1007/s13225-011-0116-y.
- ANGELES-ARGAIZ, R.E. *et al.*, (2020). From field sampling to pneumatic bioreactor mycelia production of the ectomycorrhizal mushroom *Laccaria trichodermophora* **Fungal Biology** 124 205-218
- ANGELIS, S.; Novak, A. C; Sydney, E. B; Soccol, V.T.; Carvalho, J. C.; Pandey, A.; Nosedá, M. D.; Tholozan, J. L.; Lorquin, J.; Soccol, C. R.. Co-Culture of Microalgae, Cyanobacteria, and Macromycetes for Exopolysaccharides Production: Process Preliminary Optimization and Partial Characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 1-15, 2012.

ARROUME, N. *et al.* (2016) 'Food peptides: Purification, identification and role in the metabolism', **Current Opinion in Food Science**. Elsevier Ltd, pp. 101–107. doi: 10.1016/j.cofs.2016.02.005.

AUGUST REMI DE MEIJER, A. *et al.* (2007) 'Incidences of poisonings due to *Chlorophyllum molybdites* in the state of Paraná, Brazil', 50(May), pp. 479–488. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000300014>

BACH, F. *et al.* (2019) 'Bio compounds of edible mushrooms: in vitro antioxidant and antimicrobial activities', **LWT**, 107. doi: 10.1016/j.lwt.2019.03.017.

BADALYAN, S. M. *et al.* (2015) 'Genetic resources and mycelial characteristics of several medicinal polypore mushrooms (*Polyporales*, *Basidiomycetes*)', **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 17(4), pp. 371–384. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.v17.i4.60

BEDERSKA-ŁOJEWSKA, D., ŚWIĄTKIEWICZ, S. AND MUSZYŃSKA, B. (2017) 'The use of Basidiomycota mushrooms in poultry nutrition—A review', **Animal Feed Science and Technology**. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2017.06.001.

BELLETTINI, M. B. *et al.* (2019) 'Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp.', **Saudi Journal of Biological Sciences**, 26(4), pp. 633–646. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.12.005.

BENSADOM, A. and WEINSTEIN, D. 1976. Assay of proteins in the presence of interfering materials. **Anal. Biochem.** 70:241-250

BIN SUN, HAO YOU, JUN-WEI XU. Enhancement of ganoderic acid production by promoting sporulation in a liquid static culture of *Ganoderma* species. **Journal of Biotechnology** 328 (2021) 72–77 <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.01.014>

BLEI, F. *et al.* (2020) 'Simultaneous Production of Psilocybin and a Cocktail of b - Carboline Monoamine Oxidase Inhibitors in "Magic" Mushrooms', pp. 729–734. doi: 10.1002/chem.201904363.

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254.

BRANDENBURG, W. E. *et al.* (2018) 'Mushroom poisoning epidemiology in the United States', **Mycologia**. Taylor & Francis, 00(00), pp. 1–5. doi: 10.1080/00275514.2018.1479561.

BUCHI, Switzerland. (2021) Formulation of peptides & proteins - which technique suit your needs better? **Application Review No. 005/2021** <http://www.buchi.com>

CANNON, PAUL *et al.* (2018). State of the World Fungi: Definition and Diversity, **Kew Royal Botanical Gardens**, https://stateoftheworldfungi.org/2018/reports/SOTWFungi_2018_Definition_and_Diversity.pdf

CATENI, F. *et al.*, 2021. Mycochemicals in wild and cultivated mushrooms: nutrition and health **Phytochem Rev** <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09748-2>

CARHART-HARRIS, R. L. *et al.* (no date) 'Psilocybin with psychological support for treatment-resistant depression: an open-label feasibility study', **The Lancet Psychiatry**. Carhart-Harris et al. Open Access article distributed under the terms of CC BY, 3(7), pp. 619–627. doi: 10.1016/S2215-0366(16)30065-7.

CHAKRABARTI, S., GUHA, S. AND MAJUMDER, K. (2018) 'Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health': pp. 1–17. doi: 10.3390/nu10111738.

CHANG S.T. AND MILES P.G. (1992) Mushrooms biology: a new discipline. **Mycologist**, 6, 64-65. doi10.1016/S0269-915X(09)80449-7.

CHANG, S. T. (2008) Overview of Mushroom Cultivation and Utilization as Functional Foods in CHEUNG, P. C. K. (ed.) **Mushrooms as Functional Foods**, © 2008 John Wiley & Sons, Inc. DOI:10.1002/9780470367285

CHATURVEDI, V. K. *et al.* (2018) 'Medicinal mushroom: boon for therapeutic applications', **3 Biotech**. Springer Berlin Heidelberg, 8(8), p. 0. doi: 10.1007/s13205-018-1358-0.

CHI, Y., HATAKKA, A. AND MAIJALA, P. (2007) 'Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes?', **International Biodeterioration and Biodegradation**. doi: 10.1016/j.ibiod.2006.06.025.

CHING, K., HOUARD, X., BERENBAUM, F. *et al.* Hypertension meets osteoarthritis — revisiting the vascular aetiology hypothesis. **Nat Rev Rheumatol** (2021). <https://doi.org/10.1038/s41584-021-00650-x>

CHUNG, D. J. *et al.* (2017) '*Ganoderma lucidum* repress injury of ethanol-induced steatohepatitis via anti-inflammation, anti-oxidation and reducing hepatic lipid in C57BL/6J mice', **Journal of Functional Foods**. doi: 10.1016/j.jff.2017.03.059.

CLAUDIA HARTUNG DE CAPRILES, SOFIA MATA & MARIANNE MIDDELVEEN (1989); Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia** 106: 73-79.

COSTA DE ALVARENGA, E. *et al.* (2016) 'Angiotensin Converting Enzyme Regulates Cell Proliferation and Migration'. doi: 10.1371/journal.pone.0165371.

COSTA, R. (2016) 'The Chemistry of Mushrooms: A Survey of Novel Extraction Techniques Targeted to Chromatographic and Spectroscopic Screening', in **Studies in Natural Products Chemistry**. doi: 10.1016/B978-0-444-63601-0.00009-0.

CRUZ-SOLORIO, A. *et al.* (no date) 'Functional properties of flours and protein concentrates of 3 strains of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*', **Journal of Food Science and Technology**, 55. doi: 10.1007/s13197-018-3312-x.

DANIEL, J. AND HABERMAN, M. (2017) 'Clinical potential of psilocybin as a treatment for mental health conditions. doi: 10.9740/mhc.2017.01.024.

DEVELOP, J. P., TIBERIUS, B. Ş. AND LIN, T. Ă. N. C. Ă. T. Ă. (2012) 'Culture Description of Some Spontaneous Lignicolous Macromycetes Species', **Journal of Plant Development**, 19(1), pp. 83–97. doi:10.1016/j.bej.2010.04.008

DOS SANTOS SILVA-FILHO, A. G., SEGER, C. AND CORTEZ, V. G. (2018) 'The neurotropic genus *Copelandia* (Basidiomycota) in western Paraná State, Brazil', **Revista Mexicana de Biodiversidad**, 89(1), pp. 15–21. doi: 10.22201/ib.20078706e.2018.1.1994.

DU, B., ZHU, F. AND XU, B. (2018) 'An insight into the anti-inflammatory properties of edible and medicinal mushrooms', **Journal of Functional Foods**. Elsevier, 47(June), pp. 334–342. doi: 10.1016/j.jff.2018.06.003.

EL-MARADNY, Y. A. *et al.* (2021) 'Lectins purified from medicinal and edible mushrooms: Insights into their antiviral activity against pathogenic viruses'. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.015.

ERJAVEC, J. *et al.* (2012) 'Proteins of higher fungi – from forest to application', 30(5), pp. 259–273. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.01.004.

E.V. KOSTYLEVA, A.S. SEREDA, I.A. VELIKORETSKAYA, L.I. NEFEDOVA, A.YU. SHARIKOV, N.V. TSURIKOVA, N.S. LOBANOV, M.V. SEMENOVA, A.P. SINITSYN, 2016, A New *Bacillus licheniformis* Mutant Strain Producing Serine Protease Efficient for Hydrolysis of Soy Meal Proteins published in **Mikrobiologiya**, 2016, Vol. 85, No. 4, pp. 436–445.

FARIA, M. G. I. *et al.* (2019) 'Lithium bioaccumulation in *Lentinus crinitus* mycelial biomass as a potential functional food', **Chemosphere**. Elsevier Ltd, 235, pp. 538–542. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.06.218.

FATEMEH ASADI *et al.* Enhancement of exopolysaccharide production from *Ganoderma lucidum* using a novel submerged volatile co-culture system. **Fungal Biology** 125 (2021) 25-31

FENG, J. *et al.* (2015) 'Simple and reproducible two-stage agitation speed control strategy for enhanced triterpene production by lingzhi or reishi medicinal mushrooms, *Ganoderma lucidum* ACCC G0119 (Higher basidiomycetes) based on submerged liquid fermentation', **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 17(12), pp. 1151–1159. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.v17. i12.50.

FLORES-HOLGUÍN, N., FRAU, J. AND GLOSSMAN-MITNIK, D. (2019) 'Chemical reactivity and bioactivity properties of the Phallotoxin family of fungal peptides based on Conceptual Peptidology and DFT study', **Heliyon**. Elsevier Ltd, 5(July), p. e02335. doi: 10.1016/j.heliyon. 2019.e02335.

FOOLADI, T. *et al.* (2019) 'Bioactive exopolysaccharide from *Neopestalotiopsis* sp. strain SKE15: Production, characterization and optimization', **International Journal of Biological Macromolecules**. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.203.

GADD, G. M. (2007) 'Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation', **Mycological Research**. doi: 10.1016/j.mycres.2006.12.001.

GAOXING MAA *et al.*, 2018, A critical review on the health promoting effects of mushrooms nutraceuticals **Food Science and Human Wellness** 7 (2018) 125–133

GENG, P. *et al.* (2017) 'Antifatigue Functions and Mechanisms of Edible and Medicinal Mushrooms'. doi: 10.1155/2017/9648496.

GOLAK-SIWULSKA, I. *et al.* (2018) 'Bioactive compounds and medicinal properties of Oyster mushrooms (*Pleurotus* sp.)', **Folia Horticulturae**, 30(2), pp. 191–201. doi: 10.2478/fhort-2018-0012.

GRESSLER, M. *et al.*, (2020) Mind the mushroom: natural product biosynthetic genes and enzymes of Basidiomycota DOI: 10.1039/d0np00077a

GUERRERO, A. *et al.* (2014) 'Mechanistic Peptidomics: Factors That Dictate Specificity in the Formation of Endogenous Peptides in Human Milk, pp. 3343–3351. doi: <https://10.1074/mcp.M113.036194>

HABU, SASHA; **Estudo da atividade antioxidante e antitumoral de biocompostos de macromicetos produzidos em fermentação submersa em co-cultivo; 2010**; Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná; Orientador: Carlos Ricardo Soccol; 2010.

HANIF, K., BID, H. K., KONWAR, R., Reinventing the ACE inhibitors: some old and new implications of ACE inhibition. **Hypertension Research** (2010) 33, 11–21; doi:10.1038/hr.2009.184

HASSAN, F. *et al.* (2019) 'Evaluation of the Antibacterial Activity of 75 Mushrooms Collected in the Vicinity of Oxford, Ohio (USA)', **International journal of medicinal mushrooms**, 21(2), pp. 131–141. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.2018029710

HEADS SW, MILLER AN, CRANE JL, THOMAS MJ, RUFFATTO DM, METHVEN AS, ET AL. (2017) The oldest fossil mushroom. **PLoS ONE** 12(6): e0178327. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178327>

HEALEWATERS, D. *et al.*, 2020 Fungal Systematics and Evolution: **FUSE** 6, 126 pp. DOI 10.12905/0380.sydowia72-2020-0231

HETLAND, G. *et al.* Can medicinal mushroom have a prophylactic or therapeutic effect against COVID-19 and its pneumonic superinfection and complicating inflammation? – **Scand J Immunol** 2012:93 e12937

HISCOX, J., O'LEARY, J. AND BODDY, L. (2018) 'Fungus wars: basidiomycete battles in wood decay', **Studies in Mycology**. doi: 10.1016/j.simyco.2018.02.003.

HOMOLKA, L.; Preservation of live cultures of basidiomycetes - Recent methods (Review); **Fungal biology** 118(2014)107 e1 25

HONGYUN LUA, HANGHANG LOUA, TIANYU WEIA, ZHENGJIE LIUA, YINGCHUN JIAOB, QIHE CHEN. Ultrasound enhanced production of mycelia and exopolysaccharide by *Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc. Chaidam. **Ultrasonics - Sonochemistry** 64 (2020) 105040

JAPIASSU, H. (1999). **Um desafio à educação: repensar a pedagogia científica**. São Paulo: Letras & Letras.

JEONG YT, JEONG SC, YANG BK, ISLAM R, SONG CH. Optimal Culture Conditions for Mycelial Growth and Exo-polymer Production of *Ganoderma applanatum*. **Mycobiology**. (2009) Jun;37(2):89-93. doi:10.4489/MYCO.2009.37.2.089

JIAMWORANUNKUL, S. (2019) 'Effective antioxidant production through submerged fermentation of edible mushrooms', **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**, 43(4).

JIE, Y. *et al.* (2019) 'A Novel Peroxidase from Fresh Fruiting Bodies of the Mushroom *Pleurotus pulmonarius*', **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**. Springer Netherlands, 25(4), pp. 1389–1396. doi: 10.1007/s10989-018-9784-8.

JOO SEO, D. *et al.* (2021) 'Antiviral Bioactive Compounds of Mushrooms and Their Antiviral Mechanisms: A Review'. doi: 10.3390/v13020350.

JÚNIOR LL, *et al.* Cryopreservation at $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ of *Agaricus subrufescens* on wheat grains with sucrose. **Braz J Microbiol.** (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.08.003>

KANDASAMY, S. *et al.* (2019) 'Assessment of Antioxidant, Antibacterial Activities and Bioactive Compounds of the Wild Edible Mushroom *Pleurotus sajor - caju*', **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**. Springer Netherlands, (0123456789). doi: 10.1007/s10989-019-09969-2.

KAPRI, M., SINGH, U., BEHERA, S.M., SRIVASTAV, P.P., SHARMA, S., Nutraceutical augmentation of agro-industrial waste through submerged fermentation using *Calocybe indica*, **LWT - Food Science and Technology** (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110156> .

KARP, S. G. *et al.*, Statistical Optimization of Laccase Production and Delignification of Sugarcane Bagasse by *Pleurotus ostreatus* in Solid-State Fermentation **BioMed Research International** Volume 2015, Article ID 181204, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/181204>

KATROLIA, P. *et al.* (2020) Gene cloning, expression and homology modeling of first fibrinolytic enzyme from mushroom (*Cordyceps militaris*), **Intl. J. of Biological Macromolecules** 146: 897–906 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.212>

KATSUMI TOMODA & HIRAO SHIMAZONO (1964) Acid Protease Produced by *Trametes sanguinea*, a Wood-destroying Fungus, **Agricultural and Biological Chemistry**, 28:11, 770-778, DOI: 10.1080/00021369.1964.10858303

KIMATU, B. M. *et al.*, Antioxidant potential of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions, **Food Chemistry** 230 (2017) 58–67 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.030>

KIRK, P. L. (1950) Kjeldahl method for nitrogen. **Analytical Chemistry**, 22: 354-359

KIRK PM, CANNON PF, MINTER DW, STALPERS JA., Ainsworth & Bisby's **Dictionary of the Fungi**, 10th ed. CAB International, Wallingford, United Kingdom. 2008.

KITAMOTO, Y. *et al.*; A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. **Mycoscience** (2002) 43:143–149;

KRISTIANSEN, BJÖRN (2009); Bioactive agents produced by submerged culture of a Basidiomycete cell. **PATENT** US2009/0005340 A1

KRUPODOROVA, T. A. *et al.* (2016) 'Antibacterial activity of macromycetes mycelia and culture liquid', **Microbiology and Biotechnology Letters**, 44(3), pp. 246–253. doi: 10.4014/mbl.1603.03003.

LAM, Y. W. AND NG, T. B. (2001) 'Antiproliferative and Antimitogenic Activities in a Peptide from Puffball Mushroom *Calvatia caelata*', 749, pp. 744–749. doi: 10.1006/bbrc.2001.6036.

LEFKI-MARIA PAPASPYRIDIA, PETROS KATAPODISA, B, ZACHAROULA GONOU-ZAGOUC, EVANGELIA KAPSANAKI-GOTSIC, PAUL CHRISTAKOPOULOSA, Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. **Biochemical Engineering Journal** 50 (2010) 131–138

LETTI, LUIZ A. JUNIOR *et al.* (2018) Solid-State Fermentation for the Production of Mushrooms in **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00014-1>

LAU, C. C., ABDULLAH, N., & SHUIB, A. S. (2013). Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from an edible mushroom, *Pleurotus cystidiosus* O.K. Miller identified by LC-MS/MS. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 13, 313.

LAU, C. C., ABDULLAH, N., SHUIB, A. S., & AMINUDIN, N. (2014). Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from edible mushroom *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach identified by LC-MS/MS. **Food Chemistry**, 148, 396–401.

LEE, D. H., KIM, J. H., PARK, J. S., CHOI, Y. J., & LEE, J. S. (2004). Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. **Peptides**, 25(4), 621–627.

LI, I. C. *et al.* (2018) 'Neurohealth Properties of *Hericium erinaceus* Mycelia Enriched with Erinacines', **Behavioural Neurology**, 2018. doi: 10.1155/2018/5802634.

LI, WENHUI, MICHAEL J. MOORE *et al.* (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. **Nature** 426, 6965, 11

JUNIOR, L.L. *et al.*; Five-year cryopreservation at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ of edible and medicinal basidiomycetes by wheat grain technique, **Journal of Microbiological Methods** 176 (2020) 106030 <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106030>

LOCEY, KJ, Lennon JT., Scaling laws predict global microbial diversity. **Proc Natl Acad Sci USA** 113:5970–5975, 2016

LOWRY, O. H., ROSEBOROUGH, N. J., FARR, F. L. and RANDALL, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193:265-275

MAIA, L. C. *et al.*, Diversity of Brazilian Fungi, **Rodriguesia** 66(4): 2015

MARY E. STEBBINS & WILLIAM J. ROBBINS (1949) Mineral Oil and Preservation of Fungous Cultures, **Mycologia**, 41:6, 632-636, DOI: 10.1080/00275514.1949.12017806

MEIJER, A.A.R. DE. Preliminary list of the macromycetes from the Brazilian state of Paraná. **Boletim do Museu Botânico Municipal**, Curitiba, v. 68, Edição Especial, p. 1-55, 2006.

MEIJER, A.A.R., Preliminary list of the macromycetes from the Brazilian state of Paraná: corrections and updating. **Bol. do Mus. Bot. Mun.** Curitiba. 72:1-9, 2010.

MEIJER, A.A.R., **Macrofungos Notáveis das Florestas de Pinheiro-do-Paraná**. Embrapa, Colombo, PR. 431p., 2008.

MENOLLI, N., SÁNCHEZ-GARCÍA, M. Brazilian fungal diversity represented by DNA markers generated over 20 years. **Braz J Microbiol** 51, 729–749 (2020). <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00206-y>

MEYER, V. *et al.*, (2020) Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper, **Fungal Biol Biotechnol** (2020) 7:5 <https://doi.org/10.1186/s40694-020-00095-z>

MIAO, SUSHENG *et al.* (2013) 'Antitumor activity of polysaccharides from *Lepista sordida* against laryngocarcinoma in vitro and in vivo', **International Journal of Biological Macromolecules**. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.05.033.

MIN SUN, YONGXIA WANG, WEIDONG LI, XIAOQING CAI, DONGMEI QI, YONGQING ZHANG, CHUNCHAO HAN, Comparison of the structures and prebiotic-

like effects in vitro of polysaccharides from *Coprinus comatus* fruit body and mycelium, **International Journal of Biological Macromolecules** 165 (2020) 2621–2629 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.163>

MINE, Y. *et al.* (eds.) (2010) **Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals**. 436 pp. Wiley

MISHRA, J., JOSHI, A., *et al.* (2018) 'Phenolic Rich Fractions from Mycelium and Fruiting Body of *Ganoderma lucidum* Inhibit Bacterial Pathogens Mediated by Generation of Reactive Oxygen Species and Protein Leakage and Modulate Hypoxic Stress in HEK 293 Cell Line', **Advances in Pharmacological Sciences**, 2018. doi: 10.1155/2018/6285615.

MISHRA, J., RAJPUT, R., *et al.* (2018) 'Antibacterial Natural Peptide Fractions from Indian *Ganoderma lucidum*', **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**. Springer Netherlands, 24(4), pp. 543–554. doi: 10.1007/s10989-017-9643-z.

MOHAMAD ANSOR *et al.* Anti-angiotensin converting enzyme (ACE) proteins from mycelia of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 2013, 13:256 <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/13/256>

MOHAN K. RAIZADA, M. IAN PHILLIPS, COLIN SUMNERS (eds.) (1993) **Cellular and molecular biology of the renin-angiotensin system**, 592 pp., CRC press.

MONCALVO, J. M. *et al.*, (2002) One hundred and seventeen clades of euagarics **Molecular Phylogenetics and Evolution** 23 (2002) 357–400

MONSERRAT GARCÍA-GARCÍA, LETICIA ROCHA-ZAVALA, NORMA A. VALDEZ-CRUZ, MAURICIO A. TRUJILLO-ROLDÁN. Conservation of the mycelia of the medicinal mushroom *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey. in sterile distilled water. **MethodsX** 1 (2014) 19–22

MORALES, D. *et al.* (2018) 'Extraction of bioactive compounds against cardiovascular diseases from *Lentinula edodes* using a sequential extraction method', **Biotechnology Progress**, 34(3), pp. 746–755. doi: 10.1002/btpr.2616.

MORATH, S. U., HUNG, R. AND BENNETT, J. W. (2012) 'Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential', **Fungal Biology Reviews**. Elsevier Ltd, 26(2–3), pp. 73–83. doi: 10.1016/j.fbr.2012.07.001.

MORENO, F. A. *et al.* (2006) 'Safety, Tolerability, and Efficacy of Psilocybin in 9 Patients with Obsessive-Compulsive Disorder'. **J Clin Psychiatry** 2006 Nov;67(11):1735-40. doi: 10.4088/jcp.v67n1110.

MORGAN, T. R. AND FRENCH, S. W. (2006) 'Alcoholic Liver Disease', **Comprehensive Clinical Hepatology**, pp. 311–325. doi: 10.1016/B978-0-323-03675-7.50025-1.

MULLER, G. M.; BILLS, G. F. & FOSTER, M. S.(eds.), **Biodiversity of Fungi: Inventorying and monitoring methods**. 777 pp. Academic Press, 2004.

MUSZYŃSKA, B. *et al.* (2018) 'Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review', **Food Chemistry**. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.09.149.

MYGIND, P. H., *et al.* (2005). Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. **Nature**, 437(7061), 975–980.

NEVES, J. R. *et al.* (2015) '*Propionibacterium acnes* e a resistência bacteriana', **Surg Cosmet Dermatol**, 7(3), pp. 27–38. doi: 10.5935/scd1984-8773.2015731683 RESU.

Ng, T. B. *et al.* (2016) 'Fungal proteinaceous compounds with multiple biological activities', **Applied Microbiology and Biotechnology**. Springer Verlag, pp. 6601–6617. doi: 10.1007/s00253-016-7671-9.

NOGUEIRA, RENATA CAMPOS; HARLEY FERREIRA DE CERQUEIRA & MILENA BOTELHO PEREIRA SOARES (2010) Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience, **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, 20:2, 145-157, DOI: 10.1517/13543770903555221

OLSON, B. J. S. C. & MARKWELL, J. Assays for Determination of Protein Concentration, *in* **Current Protocols in Protein Science** (2007) 3.4.1.3.4.29 John Wiley & Sons, Inc.

POWER RC, SALAZAR-GARCÍA DC, STRAUS LG, GONZÁLEZ MORALES MR, HENRY AG (2015) Microremains from El Mirón Cave human dental calculus suggest a mixed plant-animal subsistence economy during the Magdalenian in Northern Iberia. **J Archaeol Sci** 60:39–46

PAISANSAK, S. *et al.* (2021) 'Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide derived from the shiitake mushroom (*Lentinula edodes*)', **J Food Sci Technol**, 58(1), pp. 85–97. doi: 10.1007/s13197-020-04517-z.

PELAES VITAL, A. C. *et al.* Microbiological, functional and rheological properties of low-fat yogurt supplemented with *Pleurotus ostreatus* aqueous extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1028–1035, dez. 2015.

PATERSON, R. & LIMA, N. (eds.), **Bioprospecting: Success, Potential and Constraints**. 303 pp. Springer, 2017

PASSIE, T. *et al.* (2002) 'The pharmacology of psilocybin', (October 2001), pp. 357–364. doi: 10.1080/1355621021000005937.

PATERSON, R. R. M. (2006) '*Ganoderma* - A therapeutic fungal biofactory', **Phytochemistry**, pp. 1985–2001. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.07.004.

PIOVESANA, S. *et al.* (2018) 'Recent trends and analytical challenges in plant bioactive peptide separation, identification and validation'. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, pp. 3425–3444.

PISKOV, S. *et al.* (2020) 'Effects of various drying methods on some physico-chemical properties and the antioxidant profile and ACE inhibition activity of oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*)', **Foods**. MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 9(2). doi: 10.3390/foods9020160.

PODDAR, K. H. *et al.* (2013) 'Positive effect of mushrooms substituted for meat on body weight, body composition, and health parameters. A 1-year randomized clinical trial', **Appetite**. doi: 10.1016/j.appet.2013.09.008.

PRAMVADEE TEPWONG, Anupam Giri, Toshiaki Ohshima. Effect of mycelial morphology on ergothioneine production during liquid fermentation of *Lentinula edodes*. **Mycoscience** (2012) 53:102–112 DOI 10.1007/s10267-011-0145-0

PRANCE G (1984) The use of edible fungi by Amazonian Indians. **Adv Econ Bot** 1:127–139

R, M. *et al.* (2019) 'Evaluation of anti-microbial and anti-haemolytic activity of edible basidiomycetes mushroom fungi', **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, 9(1), pp. 132–135. doi: 10.22270/jddt.v9i1.2277.

RADIC, N., INJAC, R. AND STRUKELJ, B. (2009) 'Sulphur tuft culinary-medicinal mushroom, *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) murrill (*Aphylophoromycetidae*): Bioactive compounds and pharmaceutical effects (review)', **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 11(2), pp. 103–116. doi: 10.1615/IntJMedMushr.v11.i2.10.

RAPER, C. A. (1978), in CHANG, S. T. & HAYES, W. A.(eds.), **The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms**, Academic Press, <https://doi.org/10.1016/C2013-0-10484-9>

RATHORE, H. *et al.* (2019) 'Medicinal importance of mushroom mycelium: Mechanisms and applications', **Journal of Functional Foods**. doi: 10.1016/j.jff.2019.03.016.

RATHORE, H., PRASAD, S. AND SHARMA, S. (2017) 'Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review', **PharmaNutrition**. doi: 10.1016/j.phanu.2017.02.001.

REAKA-KUDLA, MARJORIE L.; DON E. WILSON, AND EDWARD O. WILSON, (1997). **Biodiversity II: Understanding and Protecting Our Biological Resources** Editors; ISBN: 0-309-52075-4, 560 pages. A Joseph Henry Press book

REZVANI, V. *et al.* (2020) 'Anticancer potentiality and mode of action of low-carbohydrate proteins and peptides from mushrooms', **Applied Microbiology and Biotechnology**. doi: 10.1007/s00253-020-10707-8.

RONCERO-RAMOS, I. AND DELGADO-ANDRADE, C. (2017) 'The beneficial role of edible mushrooms in human health', **Current Opinion in Food Science**. Elsevier Ltd, pp. 122–128. doi: 10.1016/j.cofs.2017.04.002.

SÁNCHEZ, C. (2017) 'Bioactives from mushroom and their application', in **Food Bioactives: Extraction and Biotechnology Applications**. doi: 10.1007/978-3-319-51639-4_2.

SÁNCHEZ, A. & VÁZQUEZ, A. Bioactive peptides: A review. **Food Quality and Safety**, 2017, 1, 29-46. doi:10.1093/fqs/fyx006

SANDARGO, B. *et al.* (2019) 'Biological and chemical diversity go hand in hand: Basidiomycota as source of new pharmaceuticals and agrochemicals', **Biotechnology Advances**. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.01.011.

SANDE, D. *et al.* (2019) 'Edible mushrooms as a ubiquitous source of essential fatty acids', **Food Research International**. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108524.

SANÖMA **samakönö sama tökö nii pewö oa wi tökö waheta : ana amopö = Enciclopédia dos alimentos yanomami (sanöma) : cogumelos**. -- São Paulo: Instituto Socioambiental, 2016. *Vários autores* (Série uli tä uli naha tökö kupai ï tökö pewö taö wi: saberes da floresta; 4)

SARUP, R., KAUR, A. AND KENNEDY, J. F. (2020) 'Mushroom lectins in biomedical research and development', **International Journal of Biological Macromolecules**. Elsevier B.V., 151, pp. 1340–1350. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.180.

SCUDELLARI, MEGAN (2021) How The Coronavirus Infects Our Cells: Scientists Are Unpicking Sars-Cov-2's Life Cycle **Nature** 595, 640-644 (2021) doi: <https://doi.org/10.1038/d41586-021-02039-y>

SHARMA, P. *et al.* (2020) 'Food - Derived Anticancer Peptides: A Review', **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**. Springer Netherlands, (0123456789). doi: 10.1007/s10989-020-10063-1.

SHRADDHA S. KULKARNI A, SANJAY N. NENE B, KALPANA S. JOSHI. A comparative study of production of hydrophobin like proteins (HYD-LPs) in submerged liquid and solid-state fermentation from white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 23 (2020) 101440 <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101440>

SCHULTES, R. E. (1940) Teonanácatl: the narcotic mushroom of the aztecs. **Am Anthropol** 42:429–444

SENANAYAKE, I.C., *et al.* 2020 – Morphological approaches in studying fungi: collection, examination, isolation, sporulation and preservation. **Mycosphere** 11(1), 2678–2754, Doi 10.5943/mycosphere/11/1/20

SINGH, R. S., BHARI, R. AND KAUR, H. P. (2010) 'Mushroom lectins: Current status and future perspectives', 30(August 2009), **Critical Reviews in Biotechnology**, 30:2, 99-126. doi: 10.3109/07388550903365048.

SHAMTSYAN, MARK (2010) 'Bioactive Compounds in Mushrooms', **Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food**, 1: 1, 76 — 81

SHARPLES, R. W. AND D. W. MINTER (1983) Theophrastus on Fungi: Inaccurate Citations in Athenaeus **The Journal of Hellenic Studies** Vol. 103 (1983), pp. 154-156

SIVANANDHAN, S. *et al.* (2017) 'Biocontrol properties of basidiomycetes: An overview', **Journal of Fungi**, 3(1). doi: 10.3390/jof3010002.

SUN, Y., HU, X. AND LI, W. (2017) 'Antioxidant, antitumor and immunostimulatory activities of the polypeptide from *Pleurotus eryngii* mycelium', **International Journal of Biological Macromolecules**. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.043.

TAN CS, VAN INGEN CW, TALSMA H, VAN MILTENBURG JC, STEFFENSEN CL, VLUG IJA, STALPERS JA, 1995. Freeze-drying of fungi: influence of composition and glass transition temperature of the protectant. **Cryobiology** 32: 60e67

TEDESCHI R, DE PAOLI P, 2011. Collection and preservation of frozen microorganisms. Methods in biobanking. In: Dillner J (ed.), **Methods in Molecular Biology**, vol. 675. Humana Press, New York, pp. 313e326.

TEPLYAKOVA, T. AND KOSOGOVA, T. (2015) 'Fungal Bioactive Compounds with Antiviral Effect', 3, pp. 357–371. doi: 10.17265/2328-2150/2015.08.001.

TOYOKUNI, S. (2016) 'Oxidative stress as an iceberg in carcinogenesis and cancer biology', **Archives of Biochemistry and Biophysics**. Academic Press Inc., 595, pp. 46–49. doi: 10.1016/j.abb.2015.11.025.

TRAPPE JM (1990) Use of truffles and false truffles around the world. In: Bencivenga M, Granetti B (eds) **Proceedings, Atti del Secondo Congresso Internazionale sul Tartufo**. Comunita Montana dei Monti Martini edel Serano, Spoleto, Italy

TRITEAN, N., OTILIA-GABRIELA, B. AND CONSTANTINESCU-ARUXANDEI, D. (2019) 'Extraction and Plastein Reaction of Bioactive Peptides from *Agaricus bisporus* Mushrooms', pp. 1–2. doi: 10.3390/proceedings2019029106.

UMESH SINGHA, ASHWANI GAUTAMA, TAPAN KUMAR SINGHAB, ABHAY TIWARIA, POOJA TIWARIA, VIKRAM SAHAIA, SATYAWATI SHARMAA, Mass production of *Pleurotus eryngii* mycelia under submerged culture conditions with improved minerals and vitamin D2. **LWT - Food Science and Technology** 131 (2020) 109665

UCHIYAMA-TANAKA Y, MORI Y, KISHIMOTO N, FUKUI M, NOSE A, KIJIMA Y, YAMAHARA H, HASEGAWA T, KOSAKI A, MATSUBARA H, IWASAKA T. Comparison of the effects of quinapril and losartan on carotid artery intima-media

thickness in patients with mild-to-moderate arterial hypertension. **Kidney Blood Press Res** 2005; 28:111–116.

VERMA, A. K. (2020); Cordycepin: a bioactive metabolite of *Cordyceps militaris* and polyadenylation inhibitor with therapeutic potential against COVID-19. **Journal of biomolecular structure and dynamics**
<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1850352>

VOYRON, S. *et al.* (2009). Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. **Mycological research** 113 (2009)1027 – 1038;

WAGNER, JAMES M. & ALPER, HAL S., Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances **Fungal Genetics and Biology** 89 (2016) 126–136

WANG HAILEI, TANG CHAOZHIA, YU GUANGLIA, LI PINGA, A novel membrane-surface liquid co-culture to improve the production of laccase from *Ganoderma lucidum*. **Biochemical Engineering Journal** 80 (2013) 27– 36

WANG, X. M. *et al.* (2014) 'A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China', **Food Chemistry**. Elsevier Ltd, 151, pp. 279–285. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.062.

WASSER SP (2010) Current findings, future trends and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. **Appl Microbiol Biotechnol** 89:1323–1332

WASSER SP, WEIS AL (1999) Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). **Int J Med Mushrooms** 1:31–62

WASSON VP, WASSON RG (1957) **Mushroom, Russia and History**. Pantheon Books, New York

WASSON RG, RUCK CAP, HOFFMAN A (1978) **The Road to Eleusis: Unveiling the Secret of the Mysteries**. Harcourt Brace Jovanovich, New York

WONG, J. H., Ng, T. B., Wang, H., Sze, S. C. W., Zhang, K. Y., Li, Q., & Lu, X. (2011). Cordymin, an antifungal peptide from the medicinal fungus *Cordyceps militaris*. **Phytomedicine**, 18(5), 387–392

WONG, J. H. *et al.* (2020) 'Mushroom extracts and compounds with suppressive action on breast cancer: evidence from studies using cultured cancer cells, tumor-bearing animals, and clinical trials. **Applied Microbiology and Biotechnology**.

WONGAEM, A. *et al.* (2021) 'Antioxidant properties of peptides obtained from the split gill mushroom (*Schizophyllum commune*)', **J Food Sci Technol**, 58(2), pp. 680–691. doi: 10.1007/s13197-020-04582-4.

WU, Q., LI, Y., PENG, K., WANG, X., DING, Z., LIU, L., LIU, G. (2019). Isolation and

characterization of three antihypertension peptides from the mycelia of *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 67(29), 8149–8159.

X. XU, H. YAN, J. CHEN, X. ZHANG, Bioactive proteins from mushrooms, **Biotechnol. Adv.** (2011). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.003>

XU, Q. *et al.* (2019) Bioavailability of bioactive peptides derived from food proteins across the intestinal epithelial membrane: A review', **Trends in Food Science & Technology**. Elsevier, 86 (December 2018), pp. 399–411. doi: 10.1016/j.tifs.2019.02.050.

Y.-J. TANG *et al.*: Submerged Cultivation of Mushrooms, **Food Technol. Biotechnol.** 45 (3) 221–229 (2007)

YI-CHING CHEUNG, XING-XUN LIU, WING-QIANG WANG, JIAN-YONG WU. Ultrasonic disruption of fungal mycelia for efficient recovery of polysaccharide–protein complexes from viscous fermentation broth of a medicinal fungus. **Ultrasonics Sonochemistry** 22 (2015) 243–248 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.05.006>

YUAN, Y. *et al.* (2019) 'Protective effects of polysaccharides on hepatic injury: A review', **International Journal of Biological Macromolecules**. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.002.

ZHANG, B. *et al.* (2020) 'Extraction, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Pleurotus eryngii*: A review', **International Journal of Biological Macromolecules**. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.144.

ZHANG, P., ROYTRAKUL, S. AND SUTHEERAWATTANANONDA, M. (2017) 'Production and purification of glucosamine and angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from mushroom hydrolysates', **Journal of Functional Foods**. Elsevier Ltd, 36, pp. 72–83. doi: 10.1016/j.jff.2017.06.049.

ZHONG, J.J. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid, **Enzyme Microb. Technol.** 31 (2002) 20–28.

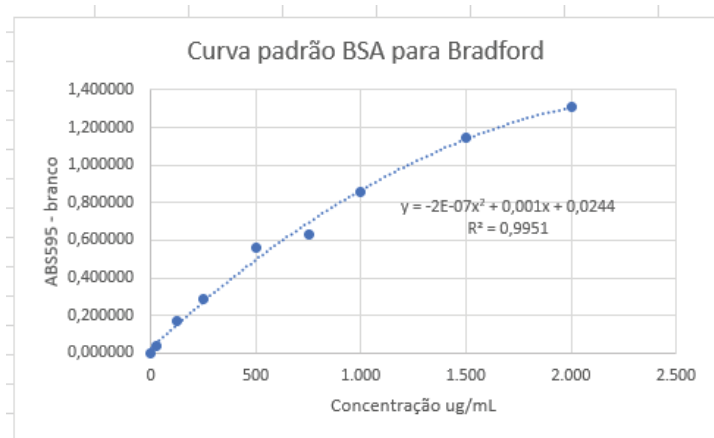
ZHOU, J. *et al.* (2020) 'A review on mushroom-derived bioactive peptides: Preparation and biological activities', **Food Research International**. Elsevier, 134(January), p.109230. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109230.

ZMITROVICH, I. V. *et al.* (2019) 'Cancer without Pharmacological Illusions and a Niche for Mycotherapy (Review)', **International journal of medicinal mushrooms**, 21(2), pp. 105–119. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.2019030047.

APÊNDICE 1 – CURVAS PADRÃO PARA TESTES DE DETEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Curva padrão para Bradford

Curva padrão BSA		BSA 2 mg/10 mL		10 uL amostra : 300 uL reagente Bradford					
amostra	Diluent (uL)	volume BSA (uL)		Final BSA concentration (ug/mL)	Abs 595 nm			média	média-branco
A	0	300		2.000	1,904	1,947	1,944	1,931667	1,309000
B	125	375		1500	1,758	1,775	1,767	1,766667	1,144000
C	325	325		1000	1,487	1,481	1,479	1,482333	0,859667
D	175	175	de B	750	1,288	1,274	1,207	1,256333	0,633667
E	325	325	de C	500	1	1,17	1,18	1,181667	0,559000
F	325	325	de E	250	0,964	0,918	0,843	0,908333	0,285667
G	325	325	de F	125	0,787	0,788	0,797	0,790667	0,168000
H	400	100	de G	25	0,666	0,657	0,66	0,661000	0,038333
I	400	Branco		0	0,604	0,627	0,637	0,622667	0,000000

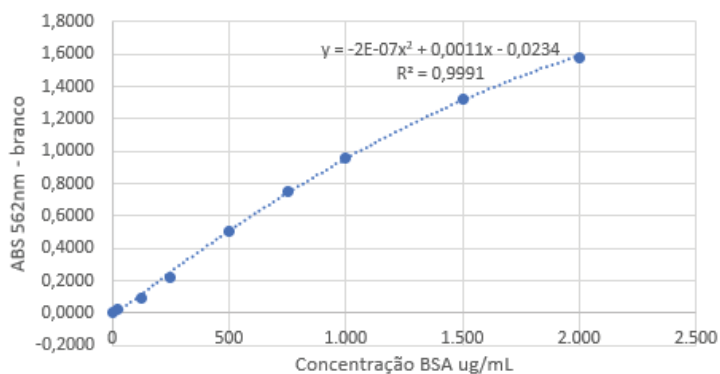


Curva padrão para BCA

Diluir as soluções A:B em 50:1 (Pierce) -> solução BCA (preparar no dia)

Curva padrão BSA		BSA 20 mg/10 mL		3uL amostra + 60 uL BCA -> 37 °C/30 min -> abs 562 nm					
amostra	Diluent (uL)	volume BSA (uL)		Final BSA concentration (ug/mL)	Abs 562 nm			média	Abs-branco
A	0	300		2.000	1,91	1,943	2,08	1,977667	1,5830
B	125	375		1500	1,788	1,72	1,657	1,721667	1,3270
C	325	325		1000	1,437	1,331	1,289	1,352333	0,9577
D	175	175	de B	750	1,176	1,145	1,122	1,147667	0,7530
E	325	325	de C	500	0,955	0,909	0,831	0,898333	0,5037
F	325	325	de E	250	0,655	0,595	0,608	0,619333	0,2247
G	325	325	de F	125	0,511	0,471	0,482	0,488000	0,0933
H	400	100	de G	25	0,436	0,394	0,423	0,417667	0,0230
I	400			0	0,398	0,392	0,394	0,394667	0,0000

Curva padrão BSA para BCA



Curva padrão para Lowry

Reagente Folin-Ciocalteu (FC)

5 mL reagente FC + 5mL upH₂O -> **1,0 N reagente fenol**

Solução Lowry:

Solução A

1g NaOH

5g Na₂CO₃250 mL H₂Oup**Solução B**

100 mg Tartarato sódio-potássio

50 mg CuSO₄10 mL H₂Oup

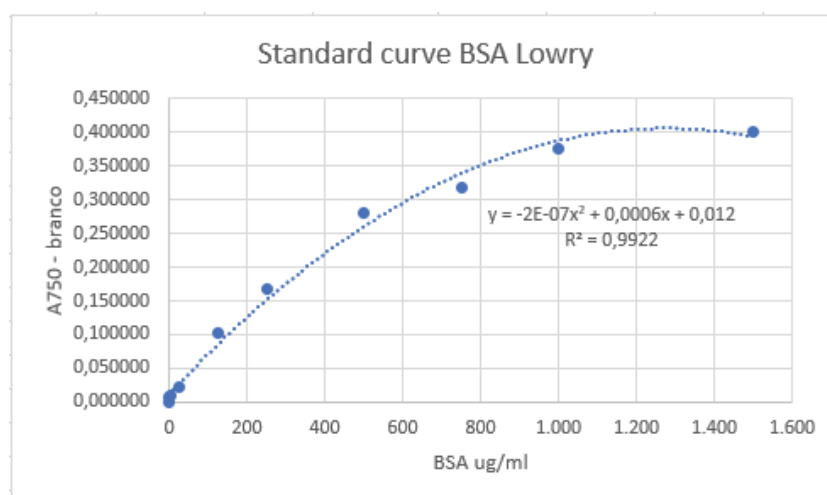
Solução A:B = 50:1 (Solução Löwry) armazenar a 4 °C frasco plástico opaco

40 µL amostra + 200 µL Löwry -> 10 min -> 20 µL FC -> 30 min -> λ 750 nm

Ou

20 µL amostra + 100 µL Löwry -> 10 min -> 10 µL FC -> 30 min -> λ 750 nm

amostra	Diluent (uL)	volume BSA (uL)	mg/ml	Final BSA concentration (ug/mL)	Abs 750 nm			média
A	250	750		1.500	0,5	0,523	0,498	0,507000
B	625	625		1000	0,487	0,477	0,48	0,481333
C	310	310	A	750	0,417	0,43	0,423	0,423333
D	625	625	B	500	0,385	0,387	0,385	0,385667
E	625	625	D	250	0,275	0,273	0,271	0,273000
F	625	625	E	125	0,204	0,206	0,215	0,208333
G	800	200	F	25	0,127	0,13	0,126	0,127667
H	800	200	G	5	0,114	0,111	0,121	0,115333
I	800	200	H	1	0,106	0,114	0,114	0,111333
J	1000	0		0	0,112	0,106	0,098	0,105333

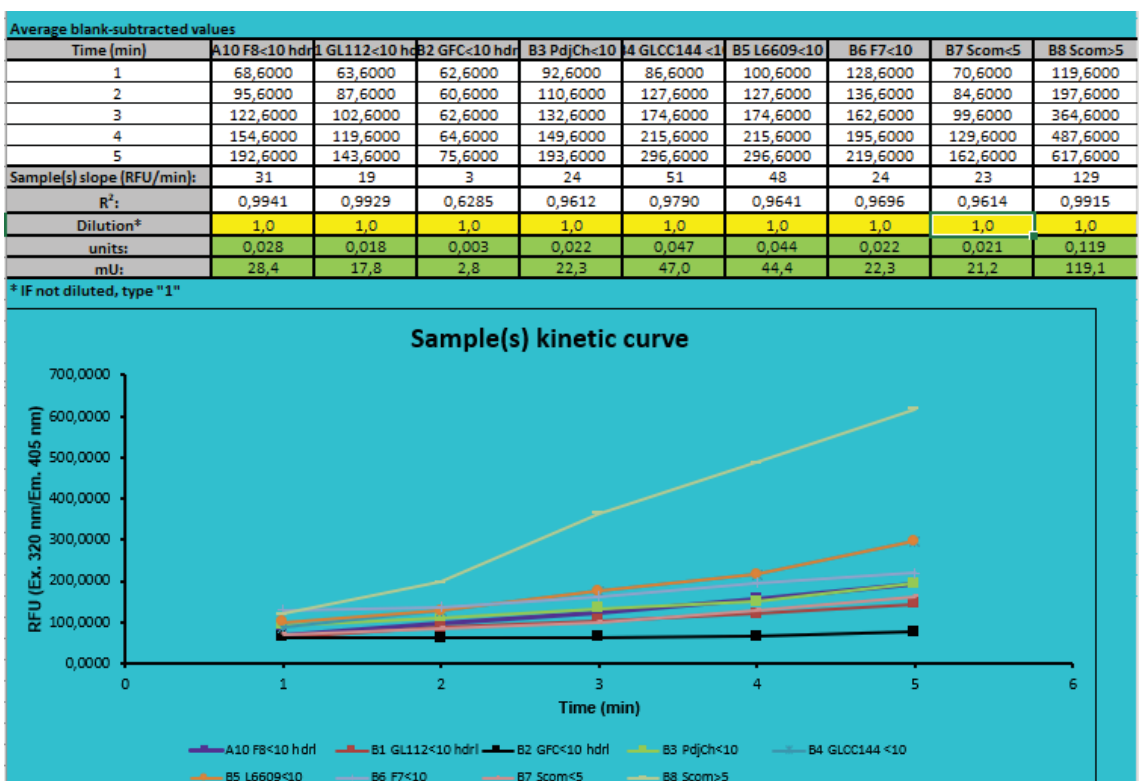
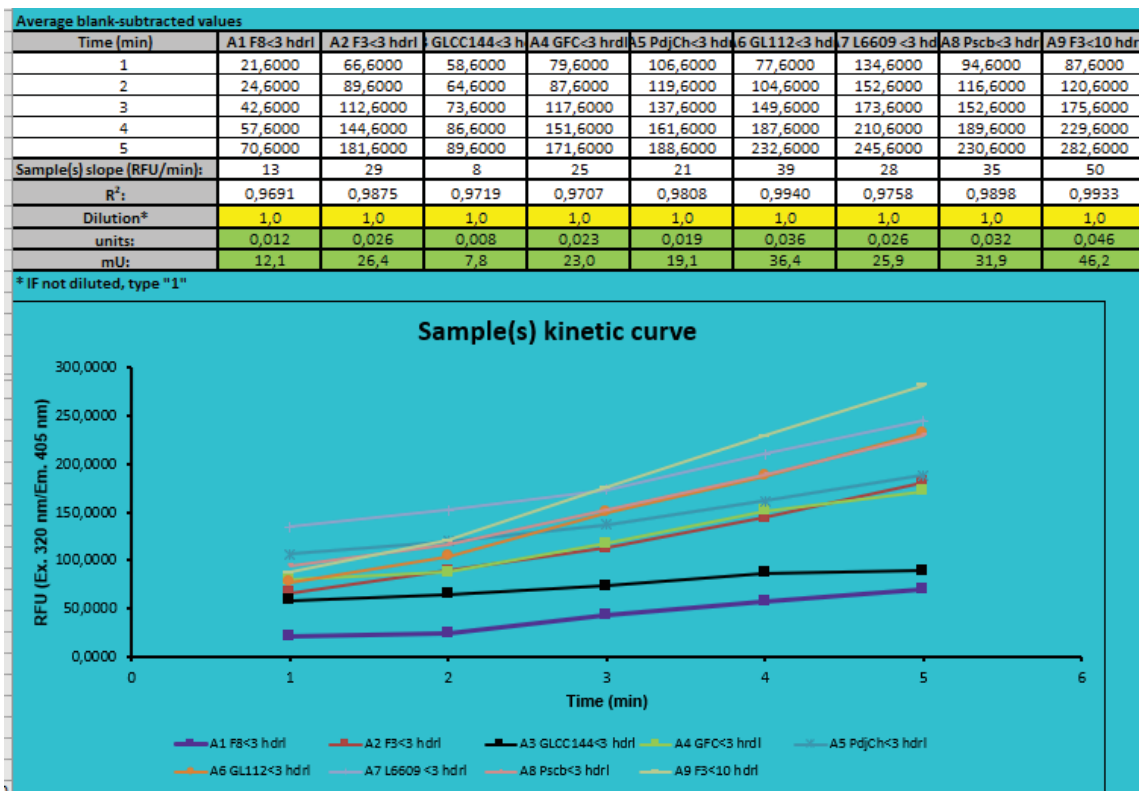


APÊNDICE 2 – RESULTADOS TOTAIS DE INIBIÇÃO ACE

	mU	mU	% inh
amostra	amostra	padrão	
GLCC144<3 hdrl	7,8	122	93,61
F8<3 hdrl	12,1	122	90,08
F8<10 hdrl	12,1	122	90,08
GL112<10 hdrl	17,8	122	85,41
F7<5	18,4	122	84,92
PdjCh<3 hdrl	19,1	122	84,34
F1<3	19,3	122	84,18
Scom<10	21,2	122	82,62
AaCC<10	22,2	122	81,80
F1<10	22,2	122	81,80
PdjCh<10 hdrl	22,3	122	81,72
F7<10 hdrl	22,3	122	81,72
F7<5	22,5	122	81,56
GFC<3 hdrl	23	122	81,15
unk	23,1	122	81,07
PeT<3	24,2	122	80,16
unk	24,2	122	80,16
F7<10	24,3	122	80,08
L6609<3 hdrl	25,4	122	79,18
F3<3 hdrl	26,4	122	78,36
Pscb<5	27,5	122	77,46
PeT<	28,6	122	76,56
AaCC<10	28,7	122	76,48
Pscb<10	29,4	122	75,90
F1<5	31,6	122	74,10
CL7<10	31,8	122	73,93
Pscb<3 hdrl	31,9	122	73,85
CL<5	31,9	122	73,85
PeT<5	32,5	122	73,36
GL112<3 hdrl	36,4	122	70,16
CL7<5	42,6	122	65,08
L6609<10 hdrl	44	122	63,93
F3<10 hdrl	46,2	122	62,13
GLCC144<10 hdrl	47	122	61,48
Gcurtisii	63,6	122	47,87
F3<5	83	122	31,97
Gcurtisii<3	88,8	122	27,21
unk	109,1	122	10,57
Gcurtisii<3	114,3	122	6,31
Scom<3	118,4	122	2,95
Scom<5	119,1	122	2,38
Gcurtisii<3	125	122	-2,46

$$\text{ACE inhibition rate (\%)} = (1 - (\text{mU}_{\text{amostra}}/\text{mU}_{\text{padrão}})) \times 100$$

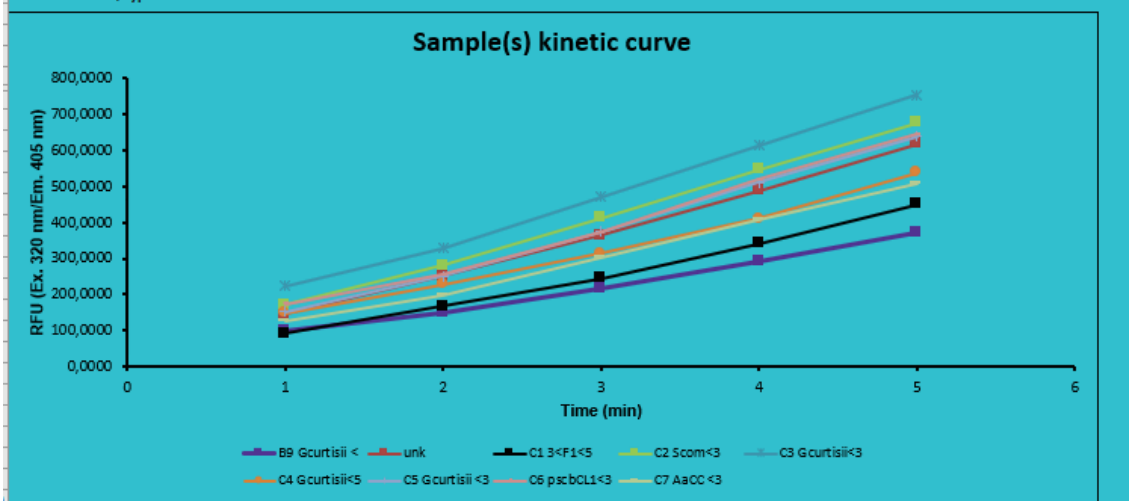
Detalhes dos resultados da cinética enzimática



Average blank-subtracted values

Time (min)	B9 Gcurtisii <	unk	C1 3<F1<5	C2 Scom<3	C3 Gcurtisii<3	C4 Gcurtisii<5	C5 Gcurtisii <3	C6 pscbCL1<3	C7 AaCC <3
1	98,6000	146,6000	90,6000	170,6000	222,6000	148,6000	151,6000	172,6000	125,6000
2	147,6000	251,6000	165,6000	279,6000	327,6000	228,6000	251,6000	255,6000	198,6000
3	216,6000	364,6000	244,6000	412,6000	470,6000	313,6000	375,6000	372,6000	303,6000
4	292,6000	487,6000	341,6000	546,6000	613,6000	409,6000	511,6000	519,6000	407,6000
5	369,6000	617,6000	450,6000	676,6000	754,6000	537,6000	638,6000	644,6000	509,6000
Sample(s) slope (RFU/min):	69	118	90	128	135	96	123	121	98
R ² :	0,9933	0,9981	0,9933	0,9987	0,9970	0,9904	0,9972	0,9913	0,9962
Dilution*	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
units:	0,064	0,109	0,083	0,118	0,125	0,089	0,114	0,112	0,090
mU:	63,6	109,1	83,0	118,4	125,0	88,8	114,3	111,9	90,5

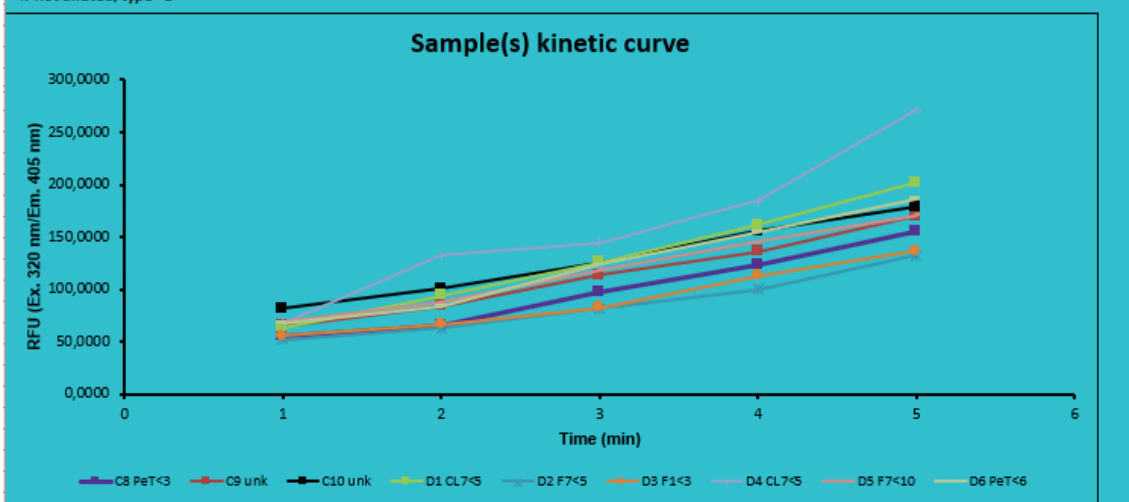
* IF not diluted, type "1"



Average blank-subtracted values

Time (min)	C8 PeT<3	C9 unk	C10 unk	D1 CL7<5	D2 F7<5	D3 F1<3	D4 CL7<5	D5 F7<10	D6 PeT<6
1	54,6000	64,6000	81,6000	63,6000	51,6000	55,6000	67,6000	68,6000	67,6000
2	64,6000	83,6000	100,6000	93,6000	62,6000	66,6000	132,6000	87,6000	83,6000
3	96,6000	113,6000	125,6000	125,6000	81,6000	82,6000	144,6000	118,6000	123,6000
4	123,6000	135,6000	155,6000	161,6000	99,6000	112,6000	184,6000	145,6000	154,6000
5	155,6000	169,6000	178,6000	201,6000	132,6000	136,6000	271,6000	170,6000	186,6000
Sample(s) slope (RFU/min):	26	26	25	34	20	21	46	26	31
R ² :	0,9775	0,9919	0,9951	0,9965	0,9645	0,9690	0,9369	0,9958	0,9879
Dilution*	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
units:	0,024	0,024	0,023	0,032	0,018	0,019	0,043	0,024	0,029
mU:	24,2	24,3	23,1	31,9	18,4	19,3	42,6	24,3	28,6

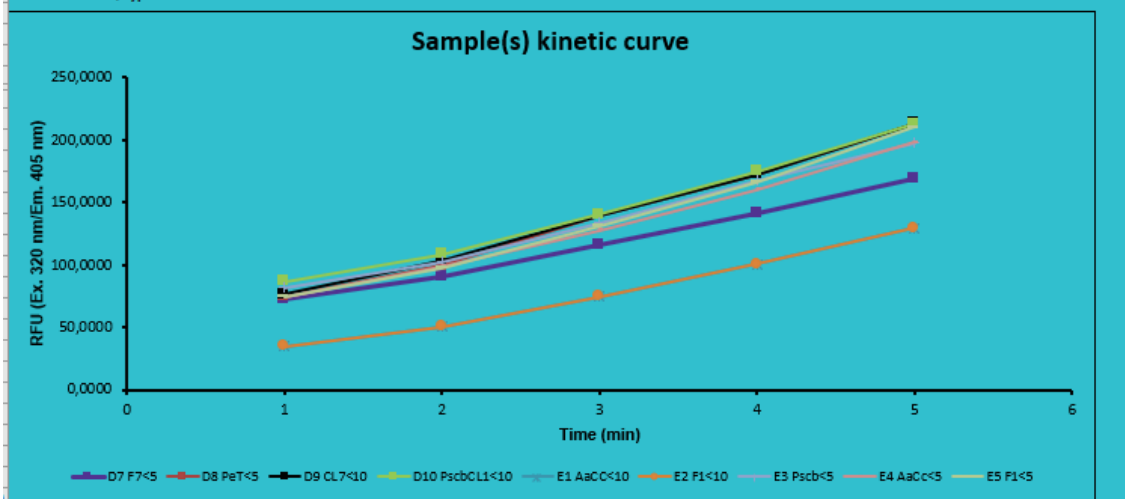
* IF not diluted, type "1"



Average blank-subtracted values

Time (min)	D7 F7<5	D8 PeT<5	D9 CL7<10	D10 PscbCL1<1	E1 AaCC<10	E2 F1<10	E3 Pscb<5	E4 AaCc<5	E5 F1<5
1	72,6000	74,6000	76,6000	86,6000	34,6000	34,6000	81,6000	74,6000	74,6000
2	90,6000	99,6000	103,6000	108,6000	50,6000	50,6000	102,6000	98,6000	97,6000
3	115,6000	139,6000	139,6000	140,6000	74,6000	74,6000	133,6000	127,6000	131,6000
4	141,6000	172,6000	172,6000	174,6000	100,6000	100,6000	167,6000	160,6000	166,6000
5	168,6000	213,6000	213,6000	212,6000	129,6000	129,6000	197,6000	198,6000	210,6000
Sample(s) slope (RFU/min):	24	35	34	32	24	24	30	31	34
R ² :	0,9950	0,9944	0,9956	0,9914	0,9898	0,9898	0,9942	0,9924	0,9883
Dilution*	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
units:	0,023	0,033	0,032	0,029	0,022	0,022	0,028	0,029	0,032
mU:	22,5	32,5	31,8	29,4	22,2	22,2	27,5	28,7	31,6

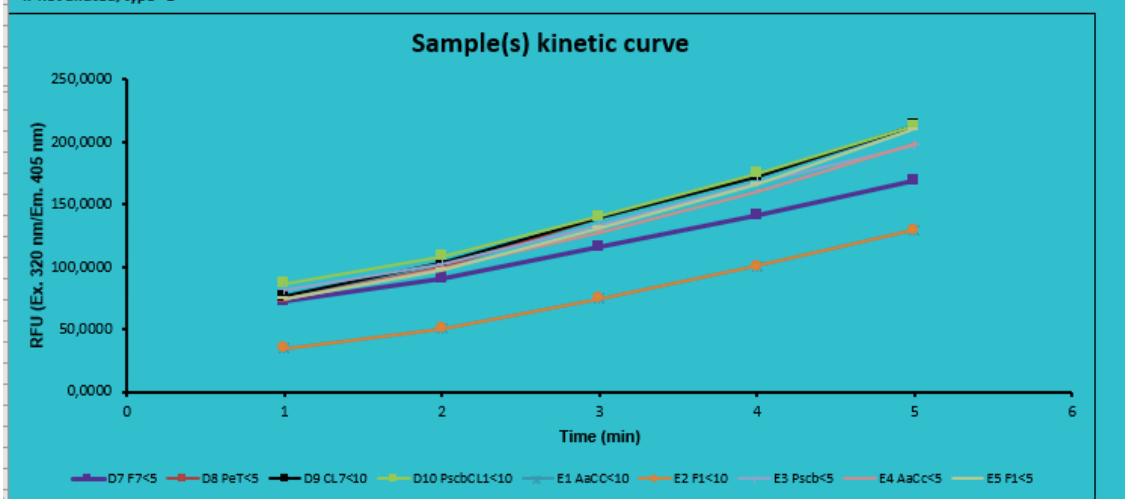
* IF not diluted, type "1"



Average blank-subtracted values

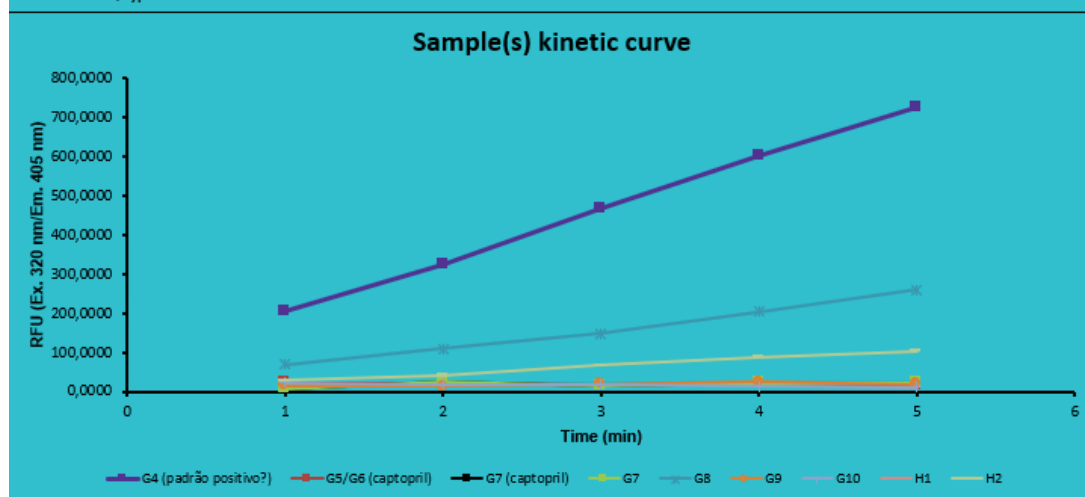
Time (min)	D7 F7<5	D8 PeT<5	D9 CL7<10	D10 PscbCL1<1	E1 AaCC<10	E2 F1<10	E3 Pscb<5	E4 AaCc<5	E5 F1<5
1	72,6000	74,6000	76,6000	86,6000	34,6000	34,6000	81,6000	74,6000	74,6000
2	90,6000	99,6000	103,6000	108,6000	50,6000	50,6000	102,6000	98,6000	97,6000
3	115,6000	139,6000	139,6000	140,6000	74,6000	74,6000	133,6000	127,6000	131,6000
4	141,6000	172,6000	172,6000	174,6000	100,6000	100,6000	167,6000	160,6000	166,6000
5	168,6000	213,6000	213,6000	212,6000	129,6000	129,6000	197,6000	198,6000	210,6000
Sample(s) slope (RFU/min):	24	35	34	32	24	24	30	31	34
R ² :	0,9950	0,9944	0,9956	0,9914	0,9898	0,9898	0,9942	0,9924	0,9883
Dilution*	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
units:	0,023	0,033	0,032	0,029	0,022	0,022	0,028	0,029	0,032
mU:	22,5	32,5	31,8	29,4	22,2	22,2	27,5	28,7	31,6

* IF not diluted, type "1"



Average blank-subtracted values									
Time (min)	padrão positivo	G5/G6 (captopril)	G7 (captopril)	G7	G8	G9	G10	H1	H2
1	205,6000	22,6000	7,6000	7,6000	69,6000	14,6000	22,6000	-20,4000	28,6000
2	326,6000	20,6000	24,6000	24,6000	109,6000	12,6000	17,6000	-16,4000	42,6000
3	466,6000	16,6000	15,6000	15,6000	148,6000	19,6000	19,6000	-16,4000	67,6000
4	601,6000	20,6000	22,6000	22,6000	203,6000	23,6000	12,6000	-17,4000	87,6000
5	726,6000	16,6000	21,6000	21,6000	260,6000	17,6000	10,6000	-19,4000	102,6000
Sample(s) slope (RFU/min):	132	-1	3	3	48	2	-3	0	19
R ² :	0,9995	0,5000	0,3543	0,3543	0,9915	0,3905	0,8582	0,0000	0,9920
Dilution*	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
units:	0,122	-0,001	0,002	0,002	0,044	0,002	-0,003	0,000	0,018
mU:	122,0	0,0	2,4	2,4	44,1	1,6	0,0	0,1	17,9

* IF not diluted, type "1"



APENDICE 3 – REAGENTES E EQUIPAMENTOS

3.1. REAGENTES

Todos os reagentes e solventes de grau analítico. Água deionizada, água miliq, reagente de bradford (azul de coomasie) b6916 Sigma-Aldrich, kit análise proteína BCA (*bicinconinic acid*) Pierce, reagente de folin Merck, *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (dpph) sigma-aldrich, tris-(hidroximetil)-aminometano, carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, hidróxido de sódio, citrato de sódio, acetato de sódio, ácido acético, álcool-etílico p.a. 98,9%, tartarato de sódio-potássio, sulfato de cobre, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfâmico, cloreto de amônia, proteína purificada *bovine serum albumin* (BSA) Pierce, Tween 80, cloreto de sódio, cloreto de potássio, carboxi-metil celulose, glicerol, óleo de imersão para microscopia. *Angiotensin converting enzyme (ACE) activity assay kit (fluorometric)*, Sigma-Aldrich, *catalog number cs0002*, adquirido em abril/2021.

3.2. EQUIPAMENTOS

Estufa BOD 25 °C, estufa bacteriológica 30, 37 e 50 °C, estufas de secagem, 50 e 100 °C, *shaker* incubadora TECNAL, câmara de fluxo laminar VECO, bico de Bunsen, autoclave, centrífuga refrigerada para 5000 rpm (mínimo), com rotor para tubos de 15 e 50 mL, microscópio, termômetro, paquímetro digital, balança analítica 0,0000 g, pHmetro digital, forno micro-ondas, ultrafreezer -80, freezer -20, geladeiras, agitador magnético, timer, placas de Petri, parafilme, microplacas 96 poços, leitores de placas 96 poços BIOTEK *power wave xs* e *infinite® 200* TECAN, liofilizador *moduloyd* Thermo Scientific, equipamento para Kjeldahl (unidade de destilação automática UDK159 VELP Scientifica), deionizador, purificador MiliQ, lavadora ultrassônica, bico ultrassom, vórtex, banho maria, micropipetas automáticas 10-20-100-200-1000-5000 µL, rack para micropipetas, micropipeta automática multicanal (10-100 µL), ponteiras plástico para os respectivos volumes, rack para ponteiras. Diversos volumes de béqueres, erlenmeyer, provetas, tubos de ensaio com tampa rosqueada, estante para tubos, tubos tipo *falcon* para centrífuga (15 e 50 mL), estantes para tubos de vários tamanhos, microtubos 1-5 mL, criotubos 1-5 mL, frascos para liofilização com tampa de borracha, balão volumétrico vários volumes. Membranas para ultrafiltração tangencial Cytiva/Sartorius/GE®, para volumes de 5-20 mL, nos limiares de peso molecular (MWCO) 3, 5 e 10kDa.

APÊNDICE 4 – LISTA TOTAL DE OCORRÊNCIAS DE MACROFUNGOS

Total de tentativas de isolamento, micélios estáveis, instável ou sem sucesso

Grupo	Espécie	Distribuição	Substrato	Ocorrência
Anamórficos	<i>Paecilomyces</i> sp.	Cosmopolita	Inseto	1x
Ascomycota	<i>Ascopolyporus</i>	Neotropical	Parasitas cochonilhas	1x
	<i>Cookeia colensoi</i>	Neotropical	Madeira decomposição	2x
Basidiomycota	cf. <i>Antrodiella</i> sp.		Madeira decomposição	1x
	<i>Amanita gemata</i>		Húmus, <i>Pinus</i>	2x
	<i>Amanita muscaria</i>		Húmus, <i>Pinus</i>	abundante
	<i>Amauroderma</i> sp.		Madeira decomposição	3x
	<i>Armillaria puigarii</i>		Humus	Abundante
	<i>Armillaria</i> sp.		Madeira, serapilheira	3x
	<i>Auricularia fuscosuccinea</i>	Pantropical	Madeira decomposição	Abundante
	<i>Auricularia nigricans</i>	Neotropical	Madeira decomposição	5x
	<i>Boletinellus exiguus</i>	Neotropical	húmus	2x
	<i>Boletus edulis</i>		Humus	4x
	<i>Coprinellus disseminatus</i>	Cosmopolita	Madeira decomposição	Abundante
	<i>Coprinus comatus</i>	Cosmopolita	Húmus	Abundante
	<i>Cotylidia spectabilis</i>	Neotropical	Serapilheira	1x
	<i>Crepidotus</i> sp.		Madeira decomposição	5x
	<i>Cuphophyllus niveicolor</i> ou <i>Hygroaster albellus</i>	Cosmopolita	Humus	1x
	<i>Cymatoderma caperatum</i>	Pantropical	Madeira decomposição	Abundante
	<i>Deconica</i> sp.		Serapilheira	1x
	<i>Entoloma</i> sp.		Humus	1x
	<i>Filoboletus gracilis</i>	Neotropical	Madeira decomposição	4x
	<i>Ganoderma australe</i>	Cosmopolita	Madeira decomposição	Abundante
	<i>Ganoderma</i> sp.		Raízes árvore viva	4x

	<i>Geastrum saccatum</i>	Cosmopolita	Humus	3x
	<i>Gerronema cyathiforme</i>	Neotropical	Madeira decomposição	5x
	<i>Gymnopilus cf. spectabilis</i>		Madeira/Humus	Abundante
	<i>Gymnopus sp.</i>		Madeira decomposição	1x
	<i>Hohenbuehelia sp.</i>		Madeira decomposição	4x
	<i>Hydnopoliporus fimbriatus</i>	Neotropical	Serapilheira	5x
	<i>Hydropus sp</i>		Madeira decomposição	2x
	<i>Hygrocybe cf. cônica</i>		Humus	1x
	<i>Lentinus crinitus</i>	Neotropical	Madeira decomposição	Abundante
	<i>Lentinus (Panus) strighellus</i> ou <i>P. strigosus</i>	Pantropical	Madeira decomposição	3x
	<i>Lentinus (Panus) velutinus</i>		Humus/serrapilheira	1x
	<i>Lepista sordida</i>	Pantropical	Humus	Abundante
	cf. <i>Lepiota sp.</i>		Humus	1x
	<i>Marasmiellus</i> 4 spp.		Madeira decomposição	4x
	<i>Marasmius</i> 3 spp.		Madeira decomposição	5x
	<i>Mycena</i> várias spp.		Serrapilheira	10x
	<i>Neoclitocybe byssiseda</i>		Madeira decomposição	3x
	<i>Omphalotus sp.</i>		Madeira decomposição	1x
	<i>Oudemansiella cubensis</i>		Madeira decom	Abundante
	<i>Panus sp.</i>		Madeira decomposição	Abundante
	<i>Phellinus sp.</i>		Madeira decomposição	1x
	cf. <i>Pholiota sp.</i>		Humus	1x
	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Cosmopolita	Madeira decomposição	10x
	<i>Pluteus sp.</i>		Madeira decomposição	1x

	<i>Podoscypha petaloides</i>		Madeira decom	1x
	<i>Polyporus gujanensis</i>	Pantropical	Madeira decomposição	Abundante
	<i>Polyporus leprieuri</i>	Pantropical	Madeira decomposição	1x
	<i>Polyporus tenuiculus</i>	Pantropical	Madeira decomposição	Abundante
	<i>Polyporus tricholoma</i>	Neotropical a paleotropical	Madeira decomposição	3x
	<i>Psathyrella candoleana</i>	Cosmopolita	Serrapilheira	Abundante
	<i>Psilocybe cubensis</i>	Cosmopolita	Esterco bovino	5x
	cf. <i>Radulodon</i> sp.		Madeira decom	1x
	<i>Ramaria</i> spp.		Serrapilheira	
	<i>Rigidoporus lineatus</i>	Cosmopolita	Madeira decom	4x
	<i>Russula</i> sp.		Humus, <i>Pinus</i>	Abundante
	<i>Russula consobrina</i>		Humus, <i>Pinus</i>	1x
	cf. <i>Rhodocybe</i> sp.		Serrapilheira	1x
	<i>Suillus cothurnatus</i>		Humus, <i>Pinus</i>	Abundante
	<i>Suillus granulatus</i>		Humus, <i>Pinus</i>	Abundante
	<i>Trametes cubensis</i>	Neotropical	Madeira decom	3x
	<i>Trametes sanguinea</i>	Pantropical	Madeira decom	Abundante
	<i>Trametes versicolor</i>	Cosmopolita	Madeira decom	Abundante
	<i>Trametes villosa</i>	Pantropical	Madeira decom	1x

ANEXO 1 – MEGAFILOGENIA PARA OS MACROFUNGOS (EXCETO ASCOMYCOTA)

Sistema de classificação (simplificado) dos grandes grupos dentro Basidiomycota, de acordo com VARGA, T. *et al.*, 2019, segundo o agrupamento cladístico proposto, por sequência de derivação dentro da árvore filogenética.

Sub-filo	Ordem	Famílias e principais gêneros <small>(para este trabalho)</small>
<i>Dacrymycetes</i>		
<i>Tremellomycetes</i>	<i>Tremellales</i>	<i>Tremella</i>
?	<i>Cantharellales</i>	<i>Cantharellus</i>
?	<i>Auriculariales</i>	<i>Auricularia</i>
?	<i>Trechisporales</i>	
<i>Phalomycetidae</i>		<i>Geastrum, Phallus, Clathrus</i>
?	<i>Hymenochaetales</i>	<i>Ramaria</i>
?	<i>Corticiales</i>	
?	<i>Russulales</i>	<i>Russula</i>
?	<i>Thelephorales</i>	
?	<i>Polyporales</i>	<i>Polyporus, Lentinus, Panus, Ganoderma</i>
<i>Agaricomycetidae</i>	<i>Boletales</i>	<i>Boletus, Suillus</i>
	<i>Agaricales</i>	<i>Hygrophoraceae (Hygropus)</i>
		<i>Pleurotaceae (Pleurotus, Crepidotus)</i>
		<i>Marasmiaceae (Marasmius, Mycena)</i>
		<i>Omphalotaceae (Lentinula)</i>
		<i>Entolomataceae (Entoloma)</i>
		<i>Amanitaceae (Amanita, Pluteus)</i>
		<i>Lycoperdaceae (Lycoperdon)</i>
		<i>Agaricaceae (Agaricus)</i>
		<i>Psathyrellaceae (Psathyrella, Coprinus)</i>
		<i>Strophariaceae (Psilocybe)</i>
		<i>Inocybaceae (Inocybe)</i>

(?) as ordens agrupadas apresentam “raízes” sem distinção de sub-filo