

Douglas Fabiano Costa de Lima

**Valorização Integrada de Resíduos Queratinosos e Subprodutos Agroindustriais
por Basidiomicetos: Regulação Espécie-Dependente da Produção Enzimática e
Modulação do Perfil Bioativo em Cultivo Submerso**

**Umuarama
2026**

Douglas Fabiano Costa de Lima

**Valorização Integrada de Resíduos Queratinosos e Subprodutos Agroindustriais
por Basidiomicetos: Regulação Espécie-Dependente da Produção Enzimática e
Modulação do Perfil Bioativo em Cultivo Submerso**

Dissertação ou Tese apresentada como
parte das exigências para a obtenção
do grau de doutor em Biotecnologia
Aplicada à Agricultura pela
Universidade Paranaense - UNIPAR.

Orientador(a): Juliana Silveira do
Valle

Umuarama
2026

Ficha Catalográfica

L732v Lima, Douglas Fabiano Costa de.
Valorização integrada de resíduos queratinosos e subprodutos agroindustriais por basidiomicetos: regulação espécie-dependente da produção enzimática e modulação do perfil bioativo em cultivo submerso / Douglas Fabiano Costa de Lima. – Umuarama : Universidade Paranaense - UNIPAR, 2026.
64 f.

Orientadora: Dr^a. Juliana Silveira do Valle.
Tese (Doutorado) – Universidade Paranaense - UNIPAR.

1. Basidiomicetos. 2. Biorrefinaria fúngica. 3. Metabolitos bioativos. 4. Regulação enzimática. I. Universidade Paranaense - UNIPAR. II. Título.

(21 ed.) CDD: 579.59

Bibliotecária Responsável Regiane Luiza Campaneli CRB 9/2194

**Valorização Integrada de Resíduos Queratinosos e Subprodutos Agroindustriais
por Basidiomicetos: Regulação Espécie-Dependente da Produção Enzimática e
Modulação do Perfil Bioativo em Cultivo Submerso**

Tese aprovada como requisito obrigatório para obtenção do Grau de Doutor no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura da Universidade Paranaense – UNIPAR, pela seguinte banca examinadora:

Profa. Dra. Maria Graciela Iecher Faria Nunes
Unipar – Universidade Paranaense

Profa. Dra. Suelen Pereira Ruiz Herrig
Unipar- Universidade Paranaense

Profa. Dra. Zilda Crsitiani Gazim
Unipar – Universidade Paranaense

Prof. Dr. Fernando Reinoldo Scremin
UEL – Universidade Estadual

Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas
UEM – Universidade Estadual
Umuarama, 13 de março de 2026

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me sustentar nos dias em que pensei não ter forças para continuar.

Esta tese foi construída entre incertezas, mudanças e recomeços. Enfrentei desafios institucionais, precisei reconstruir caminhos e atravessei fronteiras, conciliando a vida acadêmica com o trabalho diário em outro país. O percurso foi longo, por vezes solitário, mas profundamente transformador. Cada dificuldade enfrentada reforçou minha determinação e a convicção de que o conhecimento é um propósito que transcende circunstâncias.

À minha orientadora, pela orientação científica segura, pelas contribuições fundamentais para a consolidação deste trabalho e por ser um exemplo de profissionalismo e dedicação ao qual sempre me espelharei em minha trajetória acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação, pela formação acadêmica e pelo suporte institucional ao longo desta jornada.

Aos amigos do doutorado, que contribuíram diretamente para a condução desta pesquisa, pelas trocas científicas, pelo apoio técnico e pelo companheirismo nos momentos mais desafiadores.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que esta etapa fosse concluída, minha sincera gratidão.

Esta conquista simboliza mais do que um título: representa resistência, amadurecimento e a certeza de que persistir vale a pena.

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	02
CAPÍTULO 1 – Valorização integrada de resíduos queratinosos e agroindustriais por basidiomicetos: regulação espécie-independente da produção de queratinase e lacase sob diferentes regimes de cultivo.	03
RESUMO.....	03
INTRODUCAO.....	04
MATERIAL E MÉTODOS	07
Material biológico e produção e inóculo	07
Preparo dos resíduos queratinosos	07
Seleção de linhagens fúngicas com atividade queratinolítica,,,,,,,,,,,,,.....	07
Cultivo em meio líquido contendo resíduos queratinosos.....	08
Cultivo em meio líquido com diferentes fontes de carbono.....	08
Determinação da atividade da atividade de queratinase.....	09
Determinação da atividade de queratinase pelo método com Keratin Azure.....	09
Determinação da atividade de lacase	10
Análises estatísticas	11
RESULTADOS	12
Seleção de linhagens com potencial queratinolítico em meio sólido	12
Atividade queratinolítica volumétrica (U/ML) em meio líquido contendo resíduos queratinosos	13
Teor de proteínas totais nos extratos enzimáticos	15
Atividade de lacase e queratinase em meio líquido contendo diferentes fontes de carbono.....	17
Atividade específica de lacase e queratinase em meio líquido contendo diferentes fontes de carbono	20
DISCUSSÃO	25
CONCLUSÕES	30
REFERENCIAS	31

CAPÍTULO II – Modulação do perfil bioativo do micélio de <i>Ganoderma stipitatum</i> em cultivo submerso: influência das condições de cultivo sobre atividade antioxidante, fotoprotetora e anticolinesterásica	35
RESUMO	35
INTRODUÇÃO.....	36
MATÉRIAS E MÉTODOS	39
Material biológico e produção de inóculo	39
Cultivo em meio líquido	39
Produção de extratos miceliais	40
Teor de fenóis totais	40
Teor de flavonoides totais	40
Determinação da atividade antioxidante	41
Métodos de sequestro dos radicais DPPH*	41
Método de sequestro dos radicais ABTS ^{•+}	41
Determinação do fator de proteção solar (FPS) <i>in vitro</i>	42
Atividade anticolinesterásica	42
Análise estatística	43
RESULTADOS	44
DISCUSSÃO	48
CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53

Douglas Fabiano Costa de Lima

Valorização Integrada de Resíduos Queratinosos e Subprodutos Agroindustriais por Basidiomicetos: Regulação Espécie-Dependente da Produção Enzimática e Modulação do Perfil Bioativo em Cultivo Submerso

RESUMO: Esta tese teve como objetivo investigar a valorização integrada de resíduos queratinosos e subprodutos agroindustriais por fungos basidiomicetos, enfatizando a regulação espécie-dependente da produção enzimática e a modulação do perfil bioativo da biomassa micelial em cultivo submerso. A proposta se fundamenta no conceito de biorrefinaria fúngica, que busca o aproveitamento integral de resíduos de origem animal e vegetal em processos biotecnológicos de baixo impacto ambiental. No Capítulo I, foram avaliadas dezesseis linhagens de basidiomicetos quanto à capacidade de degradar resíduos queratinosos (pelos e penas) e produzir queratinases e lacases sob diferentes regimes de cultivo (agitado e estático) e fontes de carbono, incluindo melaço de cana-de-açúcar, manitol e glicose. As espécies *Lentinus berteroi* (U21-2) e *Ganoderma stipitatum* (U15-4) apresentaram os melhores desempenhos. *L. berteroi* destacou-se pela maior atividade queratinolítica sob agitação (8,55 U/mL) e atividade específica de 0,18 U/g em meio com melaço, enquanto *G. stipitatum* exibiu maior eficiência sob condição estática, especialmente em meios contendo pelos. A produção de lacase também variou conforme a espécie e o meio, atingindo até 53,71 U/mL em *G. stipitatum* cultivado estaticamente com glicose. Esses resultados demonstraram que a produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas é fortemente modulada pelo regime de cultivo e pela disponibilidade de oxigênio, refletindo ajustes bioquímicos no secretoma fúngico. O Capítulo II investigou o impacto das condições de cultivo sobre o perfil químico e funcional do micélio de *G. stipitatum*. O cultivo sob agitação promoveu extratos com maior eficiência antioxidante ($IC_{50} = 2,47$ mg/mL para ABTS^{•+}), maior fator de proteção solar (FPS = 35,86), manutenção da atividade anticolinesterásica até 0,0078 mg/mL e teores elevados de flavonoides, enquanto o cultivo estático apresentou maior teor global de fenóis. Esses achados indicam reorganização qualitativa do metabolismo secundário dependente da oxigenação. Em conjunto, os resultados comprovam o potencial dos basidiomicetos, especialmente *L. berteroi* e *G. stipitatum*, como plataformas eficientes para a conversão sustentável de resíduos agroindustriais em enzimas e metabólitos bioativos de interesse industrial, farmacêutico e cosmético, fortalecendo o papel da biotecnologia fúngica em modelos de bioeconomia circular.

Palavras-chave: Basidiomicetos. Biorrefinaria fúngica. Metabólitos bioativos. Regulação enzimática. Biorrefinaria fúngica.

Douglas Fabiano Costa de Lima

**Integrated Valorization of Keratinous and Agro-Industrial Residues by
Basidiomycetes: Species-Dependent Regulation of Enzymatic Production and
Bioactive Profile Modulation in Submerged Culture**

ABSTRACT: This doctoral thesis investigated the integrated valorization of keratinous and agro-industrial residues by basidiomycetes, emphasizing species-dependent regulation of enzymatic production and modulation of the bioactive profile of mycelial biomass under submerged cultivation. The research is grounded in the concept of a fungal biorefinery, aiming at the full utilization of animal and plant residues through low-impact biotechnological processes. In Chapter I, sixteen basidiomycete strains were evaluated for their ability to degrade keratinous residues (hair and feathers) and to produce keratinases and laccases under different cultivation regimes (static and agitated) and carbon sources, including sugarcane molasses, mannitol, and glucose. *Lentinus berteroi* (U21-2) and *Ganoderma stipitatum* (U15-4) showed superior performance. *L. berteroi* exhibited the highest keratinolytic activity under agitation (8.55 U/mL) and a specific activity of 0.18 U/g in molasses medium, while *G. stipitatum* performed better under static conditions, especially in hair-based media. Laccase production also varied according to species and substrate composition, reaching 53.71 U/mL in *G. stipitatum* cultivated statically with glucose. These findings demonstrate that the production of hydrolytic and oxidative enzymes is strongly modulated by oxygen availability and cultivation regime, reflecting species-specific adjustments in fungal secretome composition. Chapter II investigated how cultivation conditions affected the chemical and functional profile of *G. stipitatum* mycelium. Agitated cultivation produced extracts with higher antioxidant efficiency ($IC_{50} = 2.47$ mg/mL in the ABTS radical assay), greater sunscreen potential (SPF = 35.86), and sustained anticholinesterase activity up to 0.0078 mg/mL, while static cultures showed higher total phenolic content. The results indicate a qualitative reorganization of secondary metabolism, driven by oxygenation, leading to the synthesis of more functionally active compounds. Overall, this study demonstrates that cultivation adjustments can strategically direct enzymatic secretion and bioactive metabolite biosynthesis. The integrated approach establishes basidiomycetes—particularly *L. berteroi* and *G. stipitatum*—as promising biotechnological platforms for the sustainable conversion of agro-industrial residues into high-value enzymes and metabolites, reinforcing the role of fungal biotechnology in circular bioeconomy models.

Key-words: Basidiomycetes. Basidiomycetes. Fungal biorefinery. Bioactive metabolites. Enzymatic regulation. Circular bioeconomy.

CAPÍTULO I

Valorização integrada de resíduos queratinosos e agroindustriais por basidiomicetos: regulação espécie-dependente da produção de queratinase e lacase sob diferentes regimes de cultivo

RESUMO:

A valorização de resíduos queratinosos e de subprodutos agroindustriais representa uma alternativa sustentável para reduzir impactos ambientais e gerar bioprodutos de alto valor agregado. Este estudo avaliou a capacidade de diferentes basidiomicetos na produção de queratinases e lacases a partir de resíduos queratinosos sob distintos regimes de cultivo e fontes de carbono. Dezesesseis espécies foram triadas, e as linhagens *Lentinus berteroi* (U21-2) e *Ganoderma stipitatum* (U15-4) apresentaram os melhores desempenhos. *L. berteroi* produziu a maior atividade queratinolítica (8,55 U/mL) em meio contendo pelos sob agitação, com atividade específica de 0,18 U/g em melaço, enquanto *G. stipitatum* destacou-se na produção de lacase (53,71 U/mL) em cultivo estático com glicose. A agitação favoreceu a síntese de queratinase, enquanto o cultivo estático potencializou as lacases, evidenciando regulação espécie-dependente mediada pela oxigenação e pela fonte de carbono. O teor global de proteínas não se correlacionou diretamente com a atividade específica, indicando ajuste metabólico do secretoma. De modo geral, substratos ricos em α -queratina (pelos) promoveram maior degradação que penas. Os resultados demonstram que ajustes simples no regime de cultivo permitem direcionar a produção enzimática em basidiomicetos, consolidando *L. berteroi* e *G. stipitatum* como microrganismos promissores para a valorização integrada de resíduos e para o desenvolvimento de processos sustentáveis baseados em biorrefinaria fúngica.

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais. Cultivo submerso. Atividade enzimática. Biodegradação de queratina. Biotecnologia Ambiental.

INTRODUÇÃO

A expansão da avicultura industrial, do processamento de proteínas animais e da cadeia sucroenergética tem gerado grandes volumes de subprodutos orgânicos de difícil manejo. No Brasil, estima-se que a indústria avícola tenha produzido cerca de 850 mil toneladas de penas em 2025, provenientes do abate de frangos (IBGE, 2026), o que evidencia a magnitude da geração de resíduos queratinosos no setor. Além das penas, atividades como tosa, curtumes e processamento animal também geram pelos, lã, unhas e chifres ricos em queratina (Banasaz; Ferraro, 2024). De forma semelhante, a produção de açúcar e etanol a partir da cana-de-açúcar gera resíduos, como melaço, caracterizado por elevada carga orgânica e composição rica em açúcares e minerais (Castillo Alvarez *et al.*, 2025). Embora parte desses materiais seja reaproveitada, uma fração ainda apresenta baixo valor agregado, podendo gerar passivos ambientais quando não submetida a estratégias adequadas de valorização (Govindaiah *et al.*, 2026).

A produção global de resíduos queratinosos, como penas de aves e pelos de animais, atinge milhões de toneladas anualmente, sendo considerada um problema ambiental. Esses resíduos, quando descartados por métodos convencionais como aterramento ou incineração, contribuem significativamente para impactos ambientais, incluindo a emissão de gases de efeito estufa, como metano e dióxido de carbono, além de favorecerem a proliferação de microrganismos potencialmente patogênicos. No caso específico das penas, destaca-se ainda o risco sanitário associado à presença de contaminantes oriundos da produção avícola intensiva (Reddy, 2021)

A caracterização química desses materiais geralmente envolve análises elementares (CHNS/O), que indicam teores médios de carbono entre 45–50%, nitrogênio de 14–17% e enxofre de 3–5%, além de espectroscopia no infravermelho (FTIR), que revela bandas típicas das ligações peptídicas (amidas I e II) e grupos dissulfeto (S–S). Ensaio térmicos como TGA e DSC mostram estabilidade até cerca de 250 °C e principal degradação entre 280 °C e 350 °C, evidenciando a estrutura fortemente reticulada da queratina. Essas propriedades fazem com que os resíduos queratinosos sejam de grande interesse para pesquisas em reaproveitamento biotecnológico, possibilitando sua conversão em hidrolisados proteicos, fertilizantes e materiais *sustentáveis* (Mattiello *et al.*, 2022; Ferraro & Banasaz, 2024).

O principal componente estrutural dos resíduos queratinosos é a queratina, o terceiro biopolímero natural mais abundante do planeta, após a celulose e a quitina (Guo *et al.*, 2023). Trata-se de uma proteína fibrosa rica em aminoácidos sulfurados, cuja elevada estabilidade estrutural, decorrente de ligações dissulfeto e interações hidrofóbicas (Shah *et al.*, 2019), confere alta resistência à degradação e dificulta seu aproveitamento em processos convencionais (Banasaz; Ferraro, 2024).

Diante de um cenário de geração crescente de resíduos e da complexidade estrutural da queratina, surge a necessidade de estratégias capazes de converter esses materiais em produtos de maior valor agregado. Nesse contexto, a biorrefinaria tem se consolidado como um modelo de produção baseado na conversão da biomassa em múltiplos bioprodutos, voltado ao aproveitamento dos recursos e na redução de resíduos (Ahmed; Yassir, 2025). Essa abordagem integra diferentes fluxos de resíduos em um mesmo sistema produtivo, permitindo a transformação de subprodutos de baixo valor em insumos industriais e reduzindo a dependência de matérias-primas de origem extrativista (Melikoglu, 2026).

Os fungos basidiomicetos estão entre os microrganismos com potencial para a valorização de resíduos lignocelulósicos e queratinosos, uma vez que se destacam por sua capacidade de degradar substratos complexos. Esses organismos produzem uma ampla variedade de enzimas extracelulares, incluindo hidrolases e oxirredutases, que atuam na decomposição de macromoléculas e na transformação de compostos recalcitrantes (Singh *et al.*, 2026). Entre as enzimas produzidas por esses fungos destacam-se as queratinases e as lacases.

Queratinases, majoritariamente serino- (EC 3.4.21.-) e metaloendopeptidases (EC 3.4.24.-), são proteases que hidrolisam queratina (Nnolim *et al.*, 2020). Sua aplicação abrange desde a hidrólise de resíduos queratinosos até processos nas indústrias cosmética, farmacêutica, alimentícia e de rações (Chu *et al.*, 2026). Resíduos queratinosos podem sustentar o crescimento de basidiomicetos, integrando a produção de queratinase, de biomassa fúngica com propriedades bioativas e de compostos de interesse, agregando valor ao resíduo (Al-Bedak *et al.*, 2023). Basidiomicetos como *Trametes* spp. (Ahmed *et al.*, 2022) e *Pleurotus* spp. (Inácio *et al.*, 2015) produzem queratinases, com aplicações na biodegradação de resíduos e bioconversão em produtos (Haile; Ayele, 2022), contribuindo para a sustentabilidade e aproveitamento de subprodutos têxteis e avícolas.

Já as lacases são multicobre oxidases capazes de oxidar compostos fenólicos e não fenólicos, utilizando oxigênio molecular como aceptor final de elétrons, desempenhando papel central na degradação da lignina e na transformação de moléculas aromáticas (Avelino *et al.*, 2025). As enzimas produzidas por basidiomicetos como *Trametes* spp., *Lentinus* spp. e *Pleurotus* spp., degradam lignina e têm aplicações em biorremediação, tratamento de efluentes, indústria têxtil, produção de biocombustíveis e síntese de biomateriais (Sodhi, Bhatia, Batra, 2024; Younus *et al.*, 2025).

Queratinases e lacases são relevantes na decomposição de resíduos agroindustriais e na transformação de compostos complexos, e a combinação dessas enzimas potencializa processos sustentáveis de baixo impacto ambiental. Embora a produção isolada dessas enzimas por diferentes microrganismos tenha sido descrita, ainda há uma lacuna de abordagens que explorem, de forma integrada, o uso de resíduos queratinosos ou subprodutos da indústria sucroenergética como substratos em um sistema de produção de ambas as enzimas.

A versatilidade fúngica no uso de fontes de carbono torna-os ideais para aplicações biotecnológicas e industriais. O melaço de cana, rico em açúcares (40–60%) e minerais (Bumroongsri, 2024), já é usado em processos de baixo custo para produção de bioprodutos de alto valor, como biocombustíveis, polissacarídeos, oligossacarídeos, ácidos orgânicos e enzimas, com aplicações nas indústrias alimentícia, energética e farmacêutica (Zhang, Wang, Jiang., 2021). Por seus açúcares facilmente metabolizáveis, também contribui para a produção de biomassa fúngica e para a sustentabilidade da cadeia produtiva.

Explorar diversas fontes de carbono, incluindo resíduos agroindustriais, é essencial para aprimorar o crescimento fúngico, regular o metabolismo secundário e otimizar bioprodutos, favorecendo avanços biotecnológicos e sustentabilidade ambiental. Contudo, a produção enzimática também pode variar de acordo com o meio de cultivo, a cepa, a temperatura, o pH, o inóculo, o tempo de fermentação e as fontes de nitrogênio (Treichel *et al.*, 2009).

Neste contexto, embora a literatura apresente avanços na degradação de resíduos queratinosos e na produção de enzimas por fungos, ainda persistem lacunas científicas relevantes. Destaca-se a ausência de estudos que avaliem, de forma integrada, a produção

simultânea de queratinase e lacase por basidiomicetos. Adicionalmente, o uso combinado de resíduos queratinosos e subprodutos da indústria sucroenergética permanece pouco explorado, especialmente quanto ao seu potencial de indução enzimática. Soma-se a isso a limitada compreensão sobre o efeito da agitação nesse sistema, variável que pode influenciar diretamente o crescimento fúngico e a eficiência da produção enzimática. Nesse contexto, torna-se evidente a necessidade de investigações que abordem essas variáveis de maneira conjunta, a fim de contribuir para o avanço científico e tecnológico na valorização de resíduos e na biotecnologia enzimática.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico e produção de inóculo

Linhagens de basidiomicetos da coleção do Laboratório de Biologia Molecular da UNIPAR, Umuarama – PR - Brasil, foram avaliadas, totalizando 16 espécies: *Pleurotus djamor* (U16-25), *Panus strigellus* (U16-7), *Pleurotus* sp. (U18-9), *Pleurotus pulmonarius* (U16-21), *Pleurotus citrinopileatus* (U16-23), *Lentinula edodes* (U16-27), *Ganoderma stipitatum* (U15-4), *Pleurotus albidus* (U21-1), *Agaricus blazei* (U2-1), *Lentinus crinitus* (U9-1, U18-11, U19-2), *Pleurotus eryngii* (U16-30), *Pycnoporus sanguineus* (U13-14), *Lentinus berteroi* (U21-2) e *Ganoderma lucidum* (U17-2).

As linhagens foram cultivadas em ágar-extrato-de-malte 2% (m/v) a 28 °C, na ausência de luz, para produção de micélio destinado a inóculo. Para a inoculação de meios para investigação da produção de queratinases e dos meios líquidos para quantificação enzimática, foram usados três discos de 6 mm contendo micélio, sem setorização.

Preparo dos resíduos queratinosos

Pelos de cães e penas de aves foram obtidos em pet shops e granjas de Maringá, Paraná, Brasil (23°25'31"S; 51°56'19"W). Os materiais foram higienizados com água destilada e detergente neutro, secos em estufa a 60 °C por 24 h e cortados em fragmentos de 3–5 mm. Os fragmentos foram armazenados em recipientes lacrados à temperatura ambiente até o uso como resíduos queratinosos (Inácio *et al.*, 2018).

Seleção de linhagens fúngicas com atividade queratinolítica

Para avaliação indireta do potencial para produção de queratinase, as linhagens fúngicas foram inoculadas em placas de Petri (9 cm) contendo meio mineral (1 g/L extrato de levedura, 1,5 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L MgSO₄, 0,5 g/L KCl, 0,036 g/L FeSO₄, 0,035 g/L ZnSO₄) suplementado com 12 g/L de ágar e 10 g/L de resíduo queratinoso (pelos ou

penas) como única fonte de carbono (Almeida *et al.*, 2018). As placas foram incubadas a 28 °C, monitorando-se diariamente o crescimento radial do micélio. Ao atingir a borda da placa, o experimento foi encerrado, e quatro medidas equidistantes do diâmetro micelial foram registradas e analisadas pelo software Sisvar, usando o teste de Scott-Knott. As linhagens com maior crescimento foram selecionadas para quantificação da atividade de queratinase em meio líquido.

Cultivo em meio líquido contendo resíduo queratinosos

O cultivo ocorreu em triplicatas independentes em frascos Erlenmeyer (250 mL) com 100 mL de meio mineral (1 g/L extrato de levedura, 1,5 g/L KH_2PO_4 , 0,5 g/L MgSO_4 , 0,5 g/L KCl , 0,036 g/L FeSO_4 , 0,035 g/L ZnSO_4) suplementado com 10 g/L de resíduo queratinoso (pelos ou penas) (Almeida *et al.*, 2018). Após autoclavagem (121 °C, 20 min) e resfriamento, o meio foi inoculado com quatro discos de AEM contendo micélio dos fungos selecionados. Os frascos foram incubados a 28 °C por 15 dias, na ausência de luz, com ou sem agitação orbital a 100 rpm. Ao final, micélio e meio líquido foram separados por filtração (papel Whatman nº 1) e o meio líquido, denominado extrato enzimático, foi utilizado para quantificação da atividade de queratinase.

Cultivo em meio líquido com diferentes fontes de carbono

Para avaliar os efeitos de diferentes fontes de carbono sobre a produção enzimática, fungos selecionados na etapa anterior foram cultivados em frascos Erlenmeyer (250 mL) com 100 mL de meio líquido contendo diferentes fontes de carbono: glicose, manitol e pelo canino que foram adicionado ao meio basal. O meio basal continha KH_2PO_4 (1,5 g/L), MgSO_4 (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L), FeSO_4 (0,036 g/L) e ZnSO_4 (0,035 g/L). Todas as fontes de carbono foram adicionadas em quantidade suficiente para concentração final de 10 g/L. Extrato de levedura solução estoque (100 g/L) foi adicionado como fonte de nitrogênio, com concentração final de 1 g/L.

Em paralelo, com o intuito de avaliarmos a influência de um meio de cultivo simples, a base de resíduo da indústria sucroenergética, na atividade enzimática, diferentes combinações de melaço de cana e água foram utilizadas. O melaço (500 g/L de açúcares totais) foi diluído (9:1 ou 1:9) em água a 40 °C e os fungos foram cultivados em 100 mL dessas misturas previamente autoclavadas (121 °C, 20 min).

Determinação da atividade de queratinase

A atividade queratinolítica foi determinada segundo Tiwary e Gupta (2010) e Inácio *et al.*, (2018). Uma alíquota de 1 mL do extrato enzimático foi incubada com 4 mL de tampão Tris-HCl (100 mM, pH 7,0) e 20 mg de resíduo queratinoso (pelos ou penas) a 37 °C por 60 min. A reação foi interrompida com 4 mL de ácido tricloroacético 5% (m/v), seguida de centrifugação a 4400 g por 10 min. A absorbância do sobrenadante foi medida a 280 nm (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, EUA). Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde à quantidade de enzima que aumenta a absorbância em 0,01 nas condições da reação (Jin *et al.*, 2017). A atividade foi calculada conforme Barman *et al.* (2017) e a equação 1:

$$\frac{U}{mL} = \frac{VR * N * Abs280}{(0,01 * t)} \quad (1)$$

Onde VR é volume final da reação, N é o fator de diluição da enzima, Abs280 é a absorbância e t = tempo de reação em minutos.

Determinação da atividade de queratinase pelo método com Keratin Azure

Como método alternativo para avaliar a atividade de queratinase, utilizou-se Keratin Azure (KA), que são fibras de lã tingidas com Remazol Brilliant Blue R (RBBR) (Sigma-Aldrich) (Cowan *et al.*, 2023). As reações continham 450 µL de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8), 5 mg de KA e 50 µL de extrato enzimático, incubadas a 60 °C por 3 h. Após centrifugação a 8000 rpm por 10 min, a absorbância do sobrenadante foi medida a

595 nm (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, EUA). Proteinase K (50 μ M) foi usada como controle positivo, e controles analíticos excluía extrato ou KA. A atividade de queratinase foi calculada a partir de curva padrão de RBBR (0–120 μ M; $y = 0,0069x + 0,0525$ e $R^2 = 0,9991$), sendo uma unidade (U) definida como a enzima necessária para liberar 1 μ mol de RBBR por minuto.

Determinação da atividade de lacase

A produção de lacase pelos fungos foi avaliada pela oxidação de 1 mM de ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)). A reação consistiu em 0,2 mL de extrato enzimático, 0,7 mL de água, 0,45 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5,0) e 0,15 mL de ABTS (Valle *et al.*, 2014), incubada a 30 °C por 10 min. A oxidação do ABTS foi monitorada pelo aumento da absorbância a 420 nm ($\epsilon = 36\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) em leitor de microplacas (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, EUA). Controles continham todos os componentes, exceto extrato ou ABTS. Uma unidade (U) de atividade enzimática corresponde à enzima necessária para oxidar 1 μ mol de ABTS por minuto.

Determinação do teor de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Biureto (Kit Proteínas Totais, Gold Analisa, Belo Horizonte, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Tubos reacionais continham 20 μ L de extrato enzimático e 1000 μ L de reagente Biureto, incubados a 37 °C por 10 min. Albumina bovina (4 g/dL) foi usada como controle positivo, e controles analíticos excluía extrato ou reagente. A absorbância foi medida a 545 nm (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, EUA). O fator de calibração (FC) foi calculado como $FC = C_p/A_p$, onde C_p é a concentração do padrão albumina (4 g/dL) e a concentração de proteínas na amostra (C_t) foi determinada por $C_t = FC \times A_t$.

Análise estatística

Os ensaios para a produção de biomassa seguiram o delineamento inteiramente casualizado e todos os ensaios analíticos foram conduzidos em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias ($p \leq 0,05$) determinadas pelo teste de Scott-Knott com auxílio do software Sisvar 5.6 (Ferreira, 2014).

RESULTADOS

Seleção de linhagens com potencial queratinolítico em meio sólido

A seleção de linhagens com atividade queratinolítica (Tabela 1) identificou quatro espécies com maior crescimento radial em ambos os resíduos: *Pleurotus djamor* (U16-25), *Ganoderma stipitatum* (U15-4), *Lentinus berteroi* (U21-2) e *Ganoderma lucidum* (U17-2). As linhagens cresceram em meio sólido, com um dos resíduos queratinosos, em 6 dias. O crescimento radial variou de $2,81 \pm 0,29$ cm (*Lentinula edodes*) a $8,77 \pm 0,21$ cm (*L. berteroi*) no meio com pelos, e de $2,36 \pm 0,67$ cm (*L. edodes*) a $8,67 \pm 0,06$ cm (*G. lucidum*) no meio com penas.

Em geral, o crescimento foi semelhante entre pelos e penas ($p > 0,05$), exceto para *L. berteroi* (U21-2), *L. crinitus* (U9-1) e *Pleurotus citrinopileatus* (U16-23), apresentaram crescimento radial significativamente maior em meio contendo resíduo de pelo, com aumentos de **36,2%**, **50,6%** e **96,4%**, respectivamente, quando comparadas ao cultivo em resíduo de pena. ($p \leq 0,05$) sugerindo possível preferência por substratos ricos em α -queratina.

Tabela 1. Crescimento radial do micélio (cm) de espécies de fungos basidiomicetos em meio de cultivo sólido contendo resíduos queratinosos como única fonte de carbono.

Espécie	Linhagem	Pelo	Pena
<i>Agaricus blazei</i>	U2-1	$3,88 \pm 0,90^{eA}$	$5,03 \pm 0,22^{bA}$
<i>Ganoderma lucidum</i>	U17-2	$8,69 \pm 0,10^{aA}$	$8,67 \pm 0,06^{aA}$
<i>Ganoderma stitpitatum</i>	U15-4	$8,51 \pm 0,19^{aA}$	$8,29 \pm 0,37^{aA}$
<i>Lentinula edodes</i>	U16-27	$2,81 \pm 0,29^{fA}$	$2,36 \pm 0,67^{bA}$
<i>Lentinus berteroi</i>	U21-2	$8,77 \pm 0,21^{aA}$	$6,44 \pm 2,36^{aB}$
<i>Lentinus crinitus</i>	U18-11	$7,74 \pm 0,40^{bA}$	$7,18 \pm 0,63^{aA}$
<i>Lentinus crinitus</i>	U19-2	$7,77 \pm 0,12^{bA}$	$8,52 \pm 0,12^{aA}$

<i>Lentinus crinitus</i>	U9-1	7,92 ± 0,13 ^{bA}	5,26 ± 4,58 ^{bB}
<i>Panus strigellus</i>	U16-7	7,06 ± 0,12 ^{cA}	5,54 ± 1,91 ^{bA}
<i>Pleurotus albidus</i>	U21-1	6,16 ± 0,40 ^{dA}	5,72 ± 0,20 ^{bA}
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	U16-23	7,68 ± 0,13 ^{bA}	3,91 ± 3,57 ^{bB}
<i>Pleurotus djamor</i>	U16-25	8,26 ± 0,77 ^{aA}	8,57 ± 0,17 ^{aA}
<i>Pleurotus eryngii</i>	U16-30	5,88 ± 0,13 ^{dA}	7,32 ± 0,23 ^{aA}
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	U16-21	7,44 ± 0,16 ^{bA}	7,67 ± 0,85 ^{aA}
<i>Pleurotus sp.</i>	U18-9	5,92 ± 0,21 ^{dA}	6,46 ± 1,26 ^{aA}
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	U13-4	6,84 ± 0,46 ^{cA}	7,20 ± 0,41 ^{aA}

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras minúsculas na mesma coluna comparam diferentes linhagens em um mesmo resíduo. Letras maiúsculas na mesma linha comparam uma linhagem em diferentes resíduos. Letras diferentes indicam diferença estatística de acordo com o teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

Atividade queratinolítica volumétrica (U/mL) em meio líquido contendo resíduos queratinosos

As quatro linhagens que apresentaram os maiores crescimentos radiais, foram cultivadas em meio líquido com resíduos queratinosos, com ou sem agitação, para avaliar a atividade queratinolítica (Tabela 2). Todas as linhagens apresentaram maior atividade queratinolítica quando cultivadas com pelos em comparação às penas (Tabela 2). Os valores variaram de 3,22 ± 0,04 U/mL (*P. djamor*) a 8,55 ± 0,38 U/mL (*L. berteroi*).

Tabela 2. Atividade queratinolítica (U/mL) das linhagens cultivadas em meio contendo resíduos queratinosos.

Espécie	Pelo	Pena
---------	------	------

	Estático	Agitado	Estático	Agitado
<i>Ganoderma lucidum</i> (U17-2)	7,60 ± 0,57 ^{aA}	6,46 ± 0,05 ^{cB}	3,17 ± 0,19 ^{aC}	3,39 ± 0,15 ^{bC}
<i>Ganoderma stipitatum</i> (U15-4)	7,37 ± 0,09 ^{aA}	7,87 ± 0,35 ^{bA}	2,06 ± 0,26 ^{bC}	3,28 ± 0,48 ^{bB}
<i>Lentinus berteroi</i> (U21-2)	5,95 ± 0,29 ^{bB}	8,55 ± 0,38 ^{aA}	2,80 ± 0,29 ^{aD}	4,28 ± 0,27 ^{aC}
<i>Pleurotus djamor</i> (U16-25)	3,22 ± 0,04 ^{cC}	4,80 ± 0,35 ^{dA}	2,47 ± 0,24 ^{bD}	3,83 ± 0,06 ^{aA}

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras minúsculas na mesma coluna comparam diferentes linhagens em uma mesma condição de cultivo. Letras maiúsculas na mesma linha comparam uma linhagem em diferentes condições de cultivo. Letras diferentes indicam diferença estatística de acordo com o teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

A comparação da atividade queratinolítica em meio com pelos, com ou sem agitação (Figura 1), mostrou que *Ganoderma lucidum* apresentou 15,5% mais atividade em cultivo estático, enquanto *Lentinus berteroi* e *Pleurotus djamor* exibiram aumentos de 42% e 67%, respectivamente, sob agitação. *G. stipitatum* apresentou atividade semelhante em ambas as condições ($p > 0,05$), indicando resposta à oxigenação espécie-dependente.

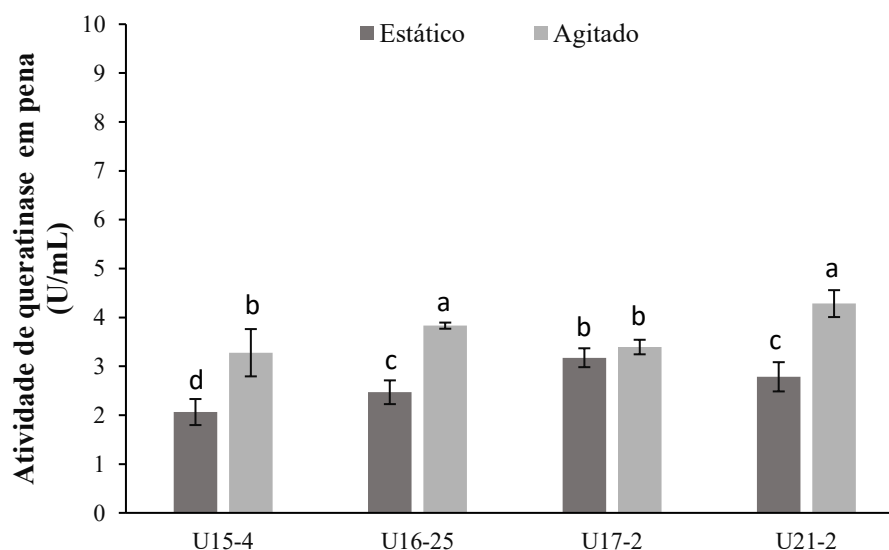


Figura 1. Atividade queratinolítica (média $\pm$ desvio padrão) de *Ganoderma stipitatum* (U15-4), *Pleurotus djamor* (U16-25), *Ganoderma lucidum* (U17-2) e *Lentinus berteroi* (U21-2), cultivadas em meio líquido contendo penas, mantidas em cultivo estático e agitado. Médias indicadas por letras distintas diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

A atividade queratinolítica em meio com penas, com ou sem agitação (Figura 2), mostrou crescimento semelhante para *G. lucidum*, *G. stipitatum* e *P. djamor* ($p > 0,05$), enquanto *L. berteroi* apresentou 64,3% mais atividade sob agitação.

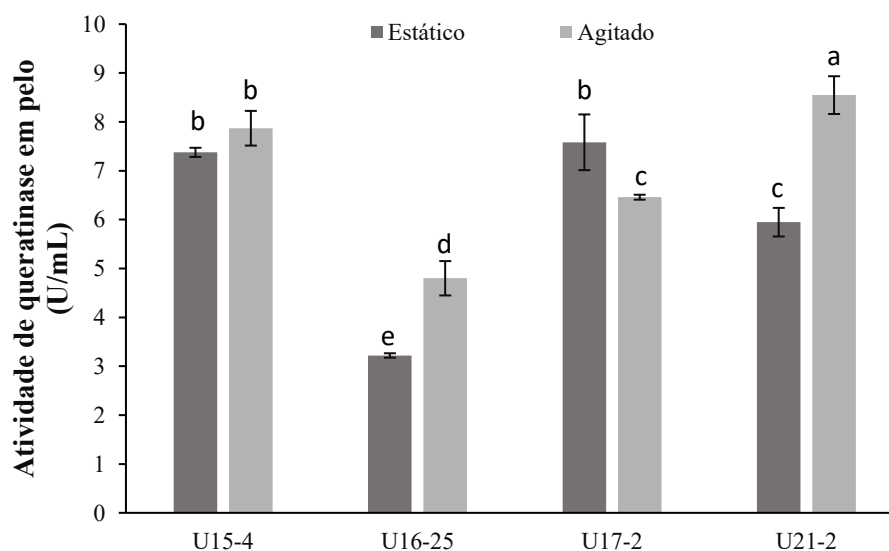


Figura 2. Atividade queratinolítica (média $\pm$ desvio padrão) de *Ganoderma stipitatum* (U15-4), *Pleurotus djamor* (U16-25), *Ganoderma lucidum* (U17-2) e *Lentinus berteroi* (U21-2), cultivadas em meio líquido contendo pelos, mantidas em cultivo estático e agitado. Médias indicadas por letras distintas diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Teor de proteínas totais nos extratos enzimáticos

Apartir dos resultados anteriores e dos melhores resultados obtidos os experimentos se deram pelas duas linhagens de melhor destaque e os teores de proteínas totais entre as linhagens selecionadas variaram entre 8,01 e 13,26 mg/mL, dependendo da fonte de carbono e condição de cultivo (Tabela 3). Em *L. berteroi*, a maior atividade específica foi observada no meio contendo melaço sob agitação ($\approx 0,17$ U/g), enquanto valores próximos a zero foram registrados em algumas condições estáticas. Em contraste, *G. stipitatum* apresentou maior atividade específica em meio contendo pelo, especialmente sob cultivo estático.

A comparação entre atividade volumétrica e atividade específica demonstrou que a produção de queratinase não foi determinada exclusivamente pela secreção proteica global, mas regulada de forma dependente da espécie e da condição de cultivo.

Tabela 3. Teor de proteínas totais (mg/mL), das linhagens cultivadas em meio com diferentes fontes de carbono e condições de cultivo (agitado e estático).

Meio	<i>Lentinus berteroi</i> (U21-2)		<i>Ganoderma stipitatum</i> (U15-4)	
	Agitado	Estático	Agitado	Estático
Melaço (1:9)	10,78 $\pm$ 1,31 ^{aB}	10,75 $\pm$ 0,19 ^{aB}	12,47 $\pm$ 0,63 ^{aA}	13,26 $\pm$ 0,81 ^{aA}
Melaço (9:1)	9,21 $\pm$ 0,48 ^{bA}	7,53 $\pm$ 0,96 ^{dD}	8,67 $\pm$ 0,19 ^{cB}	8,16 $\pm$ 0,44 ^{bB}
Manitol	9,24 $\pm$ 0,33 ^{bB}	9,47 $\pm$ 0,19 ^{bB}	10,71 $\pm$ 0,82 ^{bA}	9,53 $\pm$ 0,65 ^{bB}

Pelo	$8,67 \pm 0,48^{bA}$	$8,54 \pm 0,45^{cA}$	$8,01 \pm 0,33^{cA}$	$8,70 \pm 0,40^{bA}$
Glicose	$8,59 \pm 0,28^{bA}$	$8,16 \pm 0,09^{cA}$	$8,62 \pm 0,86^{cA}$	$8,93 \pm 0,33^{bA}$

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Letras minúsculas na mesma coluna comparam diferentes fontes de carbono sob a mesma condição de cultivo. Letras maiúsculas na mesma linha comparam uma fonte de carbono em diferentes condições de cultivo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

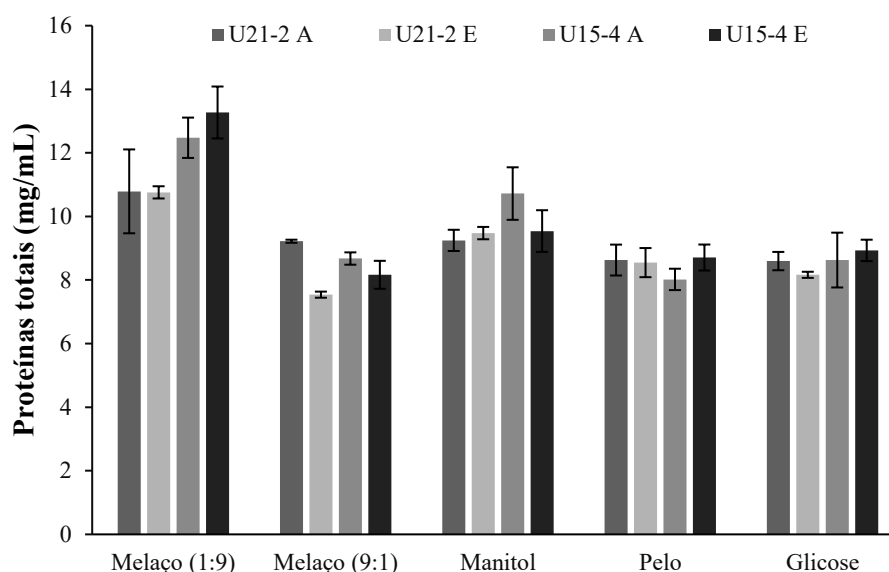


Figura 3. Teor de proteínas totais (média $\pm$ desvio padrão) nos extratos enzimáticos obtidos após cultivo de basidiomicetos em meios líquidos contendo diferentes fontes de carbono e diferentes condições de cultivo (agitado - A e estático - E). U21-2 – *Lentinus berteroi* e U15-4 – *Ganoderma stipitatum*.

Atividade de lacase e queratinase em meio líquido contendo diferentes fontes de carbono

A produção de lacase apresentou padrão distinto da queratinase (Tabela 4). Para *L. berteroi*, a maior atividade ocorreu em meio contendo manitol sob agitação ($35,33 \pm 0,12$ U/mL), representando aumento de 258% em relação ao cultivo estático. Já *G. stipitatum* apresentou maior atividade sob cultivo estático, com destaque para o meio contendo glicose

(53,71 $\pm$ 1,33 U/mL). Esses resultados evidenciam que os fatores que modulam a produção de lacase diferem daqueles que regulam a expressão de queratinase.

Tabela 4. Atividade de lacase (U/mL) em meio com diferentes fontes de carbono e condições de cultivo (agitado e estático).

Meio	<i>Lentinus berteroi</i>		<i>Ganoderma stipitatum</i>	
	(U21-2)		(U15-4)	
	Agitado	Estático	Agitado	Estático
Melaço (1:9)	24,75 $\pm$ 2,10 ^{cB}	23,09 $\pm$ 1,05 ^{bB}	30,21 $\pm$ 1,44 ^{bA}	33,21 $\pm$ 2,09 ^{cA}
Melaço (9:1)	27,83 $\pm$ 1,93 ^{bC}	34,00 $\pm$ 1,87 ^{aB}	34,15 $\pm$ 1,06 ^{bB}	40,67 $\pm$ 3,55 ^{bA}
Manitol	35,33 $\pm$ 0,12 ^{aB}	9,87 $\pm$ 0,80 ^{cD}	30,62 $\pm$ 2,80 ^{bC}	41,75 $\pm$ 0,61 ^{bA}
Pelo	23,17 $\pm$ 0,52 ^{cB}	9,29 $\pm$ 0,93 ^{cC}	43,92 $\pm$ 3,77 ^{aA}	43,71 $\pm$ 2,21 ^{bA}
Glicose	34,59 $\pm$ 0,15 ^{aC}	32,22 $\pm$ 1,51 ^{aC}	41,77 $\pm$ 0,13 ^{aB}	53,71 $\pm$ 1,33 ^{aA}

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Letras minúsculas na mesma coluna comparam diferentes fontes de carbono sob as mesmas condições de cultivo. Letras maiúsculas na mesma linha comparam uma fonte de carbono em diferentes condições de cultivo. Letras diferentes indicam diferença estatística de acordo com o teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

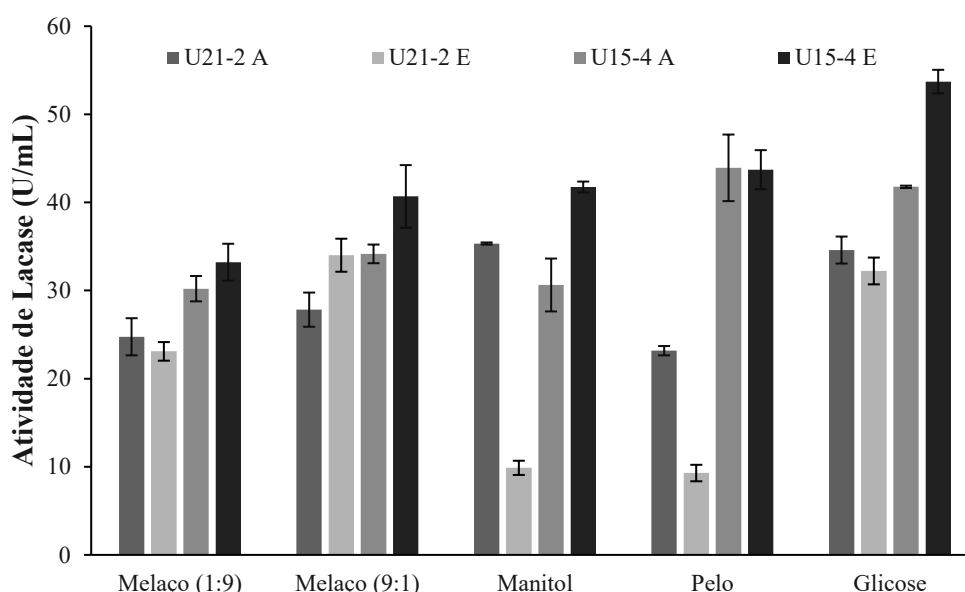


Figura 4. Atividade de lacase (média $\pm$ desvio padrão) nos extratos enzimáticos obtidos após cultivo em meios líquidos contendo diferentes fontes de carbono e diferentes condições de cultivo (agitado - A e estático - E). U21-2 – *Lentinus berteroi* e U15-4 – *Ganoderma stipitatum*.

A atividade de queratinase foi avaliada pelo método com Keratin Azure em *L. berteroi* e *G. stipitatum* em diferentes meios e condições de cultivo (Tabela 5 e Figura 5). A análise pelo método com Keratin Azure confirmou diferenças entre meios e condições. Para *L. berteroi*, o meio com melaço e agitação resultou na maior atividade ($1,90 \pm 0,06$ U/L), enquanto no cultivo estático não houve detecção da atividade enzimática. Já no meio com glicose, a condição agitada atingiu 52% da atividade obtida no cultivo estático. Em *G. stipitatum*, a maior produção foi observada no meio com pelos em cultivo estático ($0,46 \pm 0,07$ U/L), 77% acima do valor registrado sob agitação.

Tabela 5. Atividade queatinolítica (U/L) com diferentes fontes de carbono e condições de cultivo (agitado e estático), utilizando Keratin Azure.

Meio	<i>Lentinus berteroi</i>		<i>Ganoderma stitpitatum</i>	
	(U21-2)		(U15-4)	
	Agitado	Estático	Agitado	Estático

Melaço (1:9)	$0,39 \pm 0,09^{bA}$	nd ^{bB}	nd ^{bB}	nd ^{cB}
Melaço (9:1)	$1,90 \pm 0,06^{aA}$	nd ^{bC}	nd ^{bC}	$0,15 \pm 0,05^{bB}$
Manitol	$0,37 \pm 0,04^{bA}$	$0,20 \pm 0,08^{aB}$	$0,23 \pm 0,06^{aB}$	$0,09 \pm 0,04^{bC}$
Pelo	$0,18 \pm 0,05^{cB}$	$0,23 \pm 0,12^{aB}$	$0,26 \pm 0,06^{aB}$	$0,46 \pm 0,07^{aA}$
Glicose	$0,44 \pm 0,02^{bA}$	$0,29 \pm 0,01^{aB}$	$0,19 \pm 0,04^{aC}$	$0,08 \pm 0,03^{bC}$

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Letras minúsculas na mesma coluna comparam diferentes fontes de carbono sob a mesma condição de cultivo. Letras maiúsculas na mesma linha comparam uma fonte de carbono em diferentes condições de cultivo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Nd = não detectado

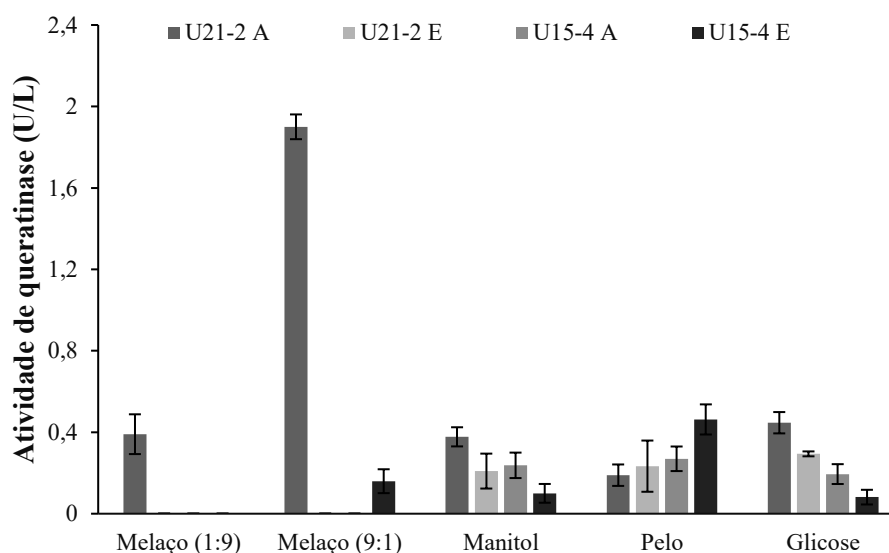


Figura 5. Atividade de queratinase (média $\pm$ desvio padrão) nos extratos enzimáticos obtidos após cultivo em meios contendo diferentes fontes de carbono e diferentes condições de cultivo (agitado - A e estático - E). U21-2 – *Lentinus berteroi* e U15-4 – *Ganoderma stipitatum*.

Atividade específica de lacase e queratinase em meio líquido contendo diferentes fontes de carbono

A atividade específica de lacase apresentou variação dependente da espécie, da fonte de carbono e da condição de cultivo (Tabela 6 e Figura 6). Para *L. berteroi*, os maiores valores de atividade específica foram observados em meio contendo manitol sob agitação, acompanhando o aumento da atividade volumétrica previamente descrita. Em geral, a condição agitada favoreceu maior atividade específica nessa espécie, independentemente da fonte de carbono.

Tabela 6. Atividade específica de lacase (U/mg) das linhagens cultivadas com diferentes fontes de carbono e condições de cultivo (agitado e estático).

Meio	<i>Lentinus berteroi</i>		<i>Ganoderma stipitatum</i>	
	(U21-2)		(U15-4)	
	Agitado	Estático	Agitado	Estático
Melaço (1:9)	2,29 ± 0,19 ^{dA}	2,14 ± 0,09 ^{cA}	2,42 ± 0,11 ^{dA}	2,50 ± 0,15 ^{dA}
Melaço (9:1)	3,01 ± 0,21 ^{cA}	4,51 ± 0,24 ^{aB}	3,93 ± 0,12 ^{cB}	4,98 ± 0,43 ^{bB}
Manitol	3,82 ± 0,01 ^{bA}	1,04 ± 0,08 ^{dB}	2,85 ± 0,27 ^{dA}	4,37 ± 0,06 ^{cB}
Pelo	2,68 ± 0,06 ^{dA}	1,08 ± 0,10 ^{dB}	5,47 ± 0,47 ^{aA}	5,02 ± 0,25 ^{bA}
Glicose	4,02 ± 0,17 ^{aA}	3,94 ± 0,18 ^{bA}	4,84 ± 0,01 ^{bA}	6,01 ± 0,014 ^{aB}

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras minúsculas na mesma coluna comparam diferentes linhagens em uma mesma condição de cultivo. Letras maiúsculas na mesma linha comparam uma linhagem em diferentes condições de cultivo. Letras diferentes indicam diferença estatística de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Para *G. stipitatum*, o padrão foi distinto, com maiores atividades específicas registradas sob condição estática, especialmente em meios contendo glicose e melaço. A normalização pela proteína total confirmou que a produção de lacase foi modulada de

maneira espécie-dependente e não acompanhou diretamente a variação na concentração proteica do sobrenadante.

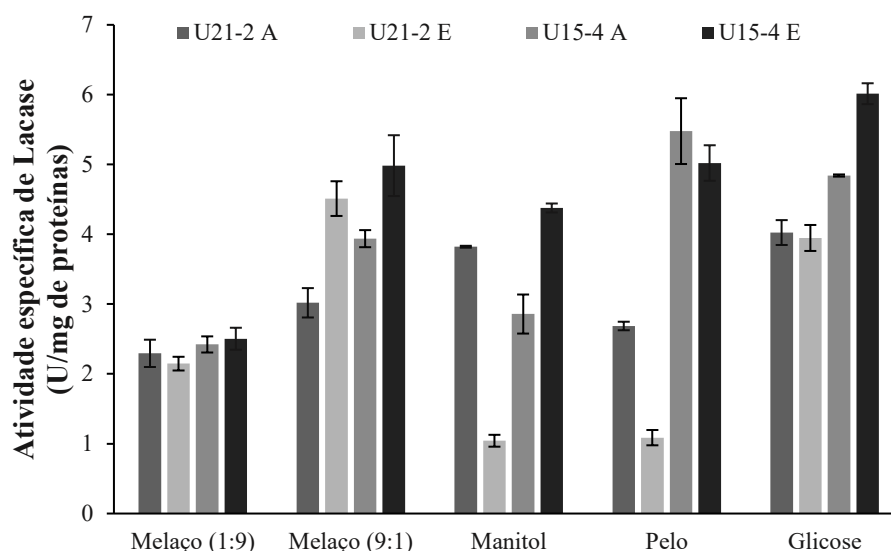


Figura 6. Atividade específica de lacase (média $\pm$ desvio padrão) nos extratos enzimáticos obtidos após cultivo em meios contendo diferentes fontes de carbono e diferentes condições de cultivo (agitado - A e estático - E). U21-2 – *Lentinus berteroi* e U15-4 – *Ganoderma stipitatum*.

A normalização da atividade queratinolítica pelo teor de proteínas totais evidenciou diferenças importantes entre espécies, fontes de carbono e condições de cultivo (Tabela 7 e Figura 7).

Tabela 7. Atividade específica de queratinase (U/mg) das linhagens cultivadas com diferentes fontes de carbono e condições de cultivo (agitado e estático).

Meio	<i>Lentinus berteroi</i>		<i>Ganoderma stipitatum</i>	
	(U21-2)		(U15-4)	
	Agitado	Estático	Agitado	Estático
Melaço (1:9)	0,03 $\pm$ 0,009 ^{bA}	nd	nd	nd
Melaço (9:1)	0,18 $\pm$ 0,005 ^{aA}	nd	nd	0,01 $\pm$ 0,007 ^{bB}

Manitol	0,03± 0,004 ^{bA}	0,01 ± 0,01 ^{bB}	0,02 ± 0,005 ^{bA}	0,01 ± 0,004 ^{cA}
Pelo	0,02 ± 0,004 ^{cA}	0,02 ± 0,01 ^{bA}	0,03 ± 0,007 ^{aA}	0,05 ± 0,008 ^{aB}
Glicose	0,04 ± 0,004 ^{bA}	0,02 ± 0,00 ^{aB}	0,02 ± 0,005 ^{bA}	0,09 ± 0,004 ^{cB}

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras minúsculas na mesma coluna comparam diferentes fontes de carbono em uma mesma condição de cultivo. Letras maiúsculas na mesma linha comparam uma fonte de carbono em diferentes condições de cultivo. Letras diferentes indicam diferença estatística de acordo com o teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$). Nd = não detectado.

Para *L. berteroi* (U21-2), a maior atividade específica foi observada no meio contendo melaço sob condição agitada (0,17 U/g), valor aproximadamente cinco vezes superior ao registrado no meio contendo melaço diluído (0,03 U/g) e superior aos meios contendo manitol (0,03 U/g), glicose (0,04 U/g) e pelo (0,02 U/g). Em condição estática, a atividade específica foi reduzida ou não detectável em meios contendo melaço, enquanto valores moderados foram observados em manitol (0,019 U/g), pelo (0,022 U/g) e glicose (0,027 U/g).

Para *G. stipitatum* (U15-4), o padrão diferiu significativamente. A maior atividade específica foi registrada no meio contendo pelos sob condição estática (0,053 U/g), seguida do meio contendo melaço sob condição agitada (0,020 U/g). Nos demais meios, os valores variaram entre 0,009 e 0,022 U/g.

De modo geral, a comparação entre atividade volumétrica e atividade específica demonstrou que as diferenças observadas não se deviam exclusivamente à concentração de proteínas totais, mas refletiam alterações no perfil de secreção enzimática entre as condições avaliadas.

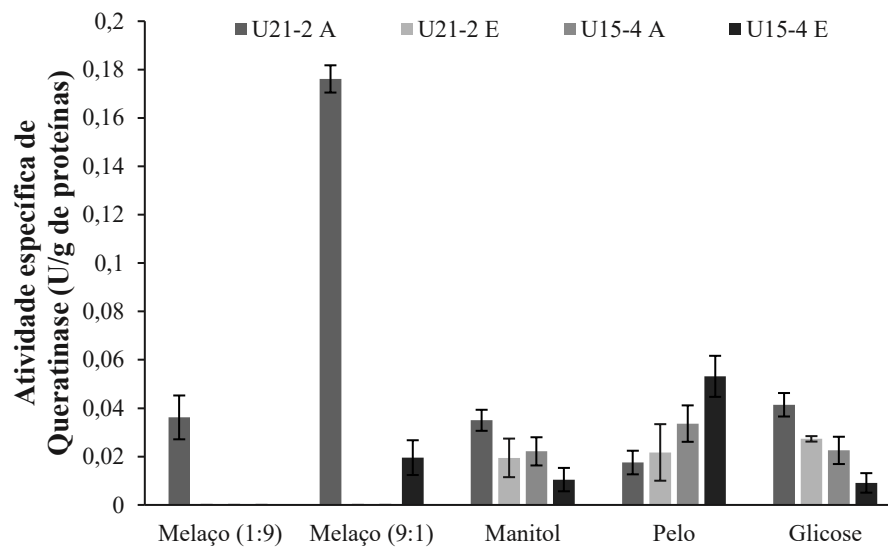


Figura 7. Atividade específica de queratinase (média $\pm$ desvio padrão) nos extratos enzimáticos obtidos após cultivo em meios contendo diferentes fontes de carbono e diferentes condições de cultivo (agitado - A e estático - E). U21-2 – *Lentinus berteroi* e U15-4 – *Ganoderma stipitatum*.

DISCUSSÃO

A maior atividade observada em substratos contendo pelos sugere maior eficiência dos basidiomicetos na degradação de α -queratina. A queratina pode ser classificada em α -queratina e β -queratina (Shavandi et al., 2017). A α -queratina, predominante em mamíferos, apresenta estrutura helicoidal formada por hélices α organizadas em fibras intermediárias estáveis, conferindo resistência mecânica ao material queratinoso. Sua organização menos compacta, em comparação à β -queratina, favorece maior acessibilidade enzimática, facilitando a atuação de queratinases (QIU et al., 2020). Na seleção inicial de espécies, observou-se maior produção de queratinase em meio contendo pelos em comparação ao cultivo em penas. Considerando que a α -queratina está predominantemente presente em materiais epidérmicos de mamíferos, como pelos, cabelos, lã e chifres, enquanto a β -queratina ocorre principalmente em aves e répteis, como nas penas (Shavandi et al., 2017), os resultados sugerem maior eficiência dos fungos avaliados na degradação de substratos ricos em α -queratina. Contudo, como a atividade foi mensurada de forma global, não é possível afirmar uma especificidade enzimática absoluta.

A busca por novas fontes de enzimas, como a queratinase, é fundamental para o avanço científico e tecnológico. Friedrich et al. (2005) relataram atividade queratinolítica de 5,7 U/mL para *Doratomyces microsporus* cultivado em meio líquido contendo farinha de soja como indutor, valor da mesma ordem de magnitude observado no presente estudo para linhagens cultivadas em meio contendo pelos. Em contrapartida, Inácio et al. (2018) reportaram atividade de 26 U/mL para *Pleurotus pulmonarius* cultivado em cabelos humanos por 25 dias em meio sólido, superando os valores aqui obtidos. Essas diferenças reforçam que, espécie fúngica, natureza do substrato, tempo de cultivo e condições experimentais influenciam diretamente os níveis de produção de queratinase.

A condição de cultivo exerceu influência significativa sobre a produção enzimática. A agitação favoreceu a produção de queratinase em algumas linhagens, especialmente em *L. berteroi*, corroborando Mustafa et al. (2023), que demonstraram que a agitação melhora a difusão de nutrientes e oxigênio, estimulando a biossíntese enzimática. A maior atividade específica de queratinase e lacase sob condição agitada em *L. berteroi* sugere que o aumento da transferência de oxigênio pode favorecer vias metabólicas associadas à secreção extracelular (Umar et al., 2023).

A variação entre cultivo estático e agitado evidenciou também que a aeração e a disponibilidade de oxigênio proporcionada pela agitação, desempenharam papel central na regulação da secreção enzimática, especialmente em *L. berteroi*. A maior atividade específica de queratinase e de lacase sob condição agitada sugere que o aumento da transferência de oxigênio favorece a ativação de vias metabólicas associadas à degradação extracelular (Umar *et al.*, 2023).

Estudos prévios sustentam esse aspecto. Shih *et al.* (2006) observaram que um maior suprimento de oxigênio no cultivo de *Antrodia cinnamomea* favoreceu o crescimento e a produção de polissacarídeos, mas inibiu a produção de triterpenoides, evidenciando regulação diferencial de vias metabólicas. De forma semelhante, Umar *et al.* (2023) relataram maior rendimento de lacase de *Ganoderma multistipitatum* em cultivo a 150 rpm, com níveis máximos de oxigênio dissolvido de 65% após 27 horas. Esses achados indicam que a oxigenação atua como fator regulatório importante, embora sua influência seja espécie-dependente.

Em *G. stipitatum*, observou-se maior atividade específica de queratinase sob condição estática em meio contendo pelo, sugerindo uma resposta regulatória distinta à disponibilidade de oxigênio. De acordo com Domingos *et al.* (2017), níveis elevados de agitação podem gerar tensão de cisalhamento e promover aglomeração micelial, comprometendo a difusão de oxigênio para o interior dos *pellets* de micélio. Tal condição pode explicar a adaptação diferenciada dessa espécie ao cultivo estático.

A análise da proteína total revelou que, em alguns casos, cultivos estáticos apresentaram maiores concentrações proteicas. O meio contendo melaço e água (1:9) destacou-se como fonte eficiente de carbono e energia para biossíntese proteica, possivelmente em função da elevada concentração de açúcares fermentáveis, conforme descrito por Pandey *et al.* (2001). Entretanto, a ausência de correlação direta entre proteína total e atividade específica indica que o aumento da secreção proteica global não implicou maior produção proporcional de queratinase, sugerindo modulação do secretoma conforme a condição de cultivo.

Em contrapartida, a atividade específica revelou que a maior concentração proteica não necessariamente resultou em maior eficiência catalítica. Em *L. berteroi*, o meio contendo melaço sob agitação apresentou a maior atividade específica (0,18 U/g), indicando que a condição metabólica favoreceu a produção direcionada de queratinase, e

não apenas aumento global da secreção proteica. Esse comportamento sugere regulação positiva associada ao estado respiratório mais ativo sob agitação, possivelmente reduzindo efeitos de repressão catabólica parcial.

Em contraste, *G. stipitatum* apresentou maior atividade específica sob condição estática, especialmente em meio contendo pelo e glicose, evidenciando que a resposta regulatória à disponibilidade de oxigênio é espécie-dependente. Esses resultados indicam que a produção de queratinase não depende exclusivamente da presença do substrato queratinoso, mas de uma interação complexa entre fonte de carbono, estado fisiológico e regulação metabólica.

A discrepância entre atividade volumétrica e atividade específica reforça a hipótese de modulação do secretoma. Em fungos, a secreção extracelular envolve múltiplas enzimas hidrolíticas e oxidativas. Assim, determinadas condições podem favorecer secreção proteica abundante, porém com menor proporção relativa de queratinase. A atividade específica, portanto, fornece um indicador mais preciso da eficiência enzimática direcionada. Petraglia *et al.* (2025), por exemplo, ao cultivarem cogumelos de *Pleurotus eryngii* e *P. ostreatus* verificaram que as atividades de protease e lipase aumentaram e permaneceram constantes no secretoma durante a formação dos corpos de frutificação, enquanto as atividades de celulase e hemicelulase diminuíram após a completa colonização do substrato.

O manitol demonstrou potencial promissor, especialmente sob agitação, possivelmente atuando como fonte energética e osmoprotetor, como descrito por Moreira e Filho (2018), favorecendo o crescimento fúngico em ambientes controlados. Em contraste, o uso de resíduos queratinosos como fonte de carbono resultou em produção proteica consistente, porém inferior à observada com substratos simples, como glicose e manitol. Essa diferença pode estar associada à maior complexidade estrutural dos resíduos queratinosos, que demandam etapas iniciais de degradação antes de serem assimilados de forma eficiente (Friedrich *et al.*, 2005).

A produção de lacase por *L. berteroi* e *G. stipitatum* evidenciou um padrão regulatório distinto daquele da queratinase. Os maiores valores foram obtidos em meios contendo glicose e manitol, sobretudo sob agitação para *L. berteroi*. De acordo com Elisashvili (2012), concentrações adequadas de glicose podem atuar como indutores de lacase em basidiomicetos. Em *L. berteroi*, a agitação aumentou a atividade de lacase em

até 258% no meio com manitol, reforçando o papel da oxigenação na regulação de enzimas oxidativas (Somerville; Proctor, 2023). Por outro lado, *G. stipitatum* apresentou maior atividade em condição estática, possivelmente refletindo mecanismos específicos de regulação gênica sob menor disponibilidade de oxigênio (Elisashvili, 2012).

Os resultados estão em consonância com D'Agostini *et al.* (2011), que reportaram produção de lacase por *Trametes versicolor* na faixa de 30–50 U/mL, e com Krupodorova, Barshteyn e Sekan (2021), que destacaram o papel positivo do manitol na indução dessa enzima em basidiomicetos. A influência da agitação observada no presente estudo também é corroborada por Mustafa *et al.* (2023), que demonstraram que esse fator melhora a difusão de nutrientes e gases, estimulando a biossíntese enzimática.

A normalização da atividade de lacase pelo teor de proteínas totais confirmou que sua produção também foi regulada de forma específica. Em *L. berteroi*, a atividade específica aumentou substancialmente sob agitação em meio contendo manitol, indicando que a oxigenação favorece vias oxidativas associadas à lacase. Já em *G. stipitatum*, a maior atividade específica sob condição estática sugere adaptação metabólica distinta, possivelmente relacionada à organização micelial e à regulação gênica sob menor tensão de cisalhamento.

Esses padrões distintos entre queratinase e lacase indicam que enzimas hidrolíticas e oxidativas respondem a sinais metabólicos diferentes, reforçando a complexidade regulatória do metabolismo extracelular em basidiomicetos (Petraglia *et al.*, 2025).

A avaliação da atividade de queratinase pelo método com Keratin Azure confirmou o padrão observado pelo método espectrofotométrico a 280 nm. *L. berteroi* apresentou maior atividade em meio contendo melaço sob agitação ($1,90 \pm 0,06$ U/L), enquanto *G. stipitatum* destacou-se em meio contendo pelo sob condição estática ($0,46 \pm 0,07$ U/L). O Keratin Azure é amplamente reconhecido como substrato padrão devido à sua especificidade, e sua utilização complementa a avaliação baseada na liberação de peptídeos solúveis.

A degradação de resíduos queratinosos naturais envolve uma interação complexa entre a enzima e o substrato. Gonzalo *et al.* (2020) e Callegaro *et al.* (2018) destacam que resíduos naturais contêm lipídios e minerais que podem atuar como cofatores na expressão enzimática, enquanto substratos artificiais apresentam composição

simplificada (Shavandi *et al.*, 2017). Assim, a combinação entre a natureza do substrato, as condições de cultivo e a espécie fúngica determina o perfil enzimático observado.

Embora as condições experimentais ainda possam ser otimizadas, os resultados demonstram a viabilidade do uso de basidiomicetos na valorização de resíduos queratinosos, contribuindo para estratégias sustentáveis de gestão desses materiais e para a produção de enzimas com potencial aplicação biotecnológica.

A análise da atividade específica evidenciou que a produção enzimática não depende exclusivamente da secreção proteica global, mas também de mecanismos regulatórios modulados pela fonte de carbono e pelo regime de cultivo, de forma espécie-dependente. A capacidade de direcionar o perfil enzimático por meio de ajustes relativamente simples nas condições de cultivo amplia o potencial desses sistemas em modelos de biorrefinaria. Assim, a seleção estratégica da condição de cultivo pode permitir a priorização de enzimas hidrolíticas voltadas à degradação de resíduos queratinosos ou de enzimas oxidativas com aplicações em biotransformações e outros processos industriais.

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que basidiomicetos têm potencial para produzir queratinases e lacases a partir de resíduos queratinosos e de diferentes fontes de carbono, incluindo subprodutos agroindustriais. A produção enzimática foi influenciada tanto pela espécie quanto pelas condições de cultivo, evidenciando respostas regulatórias distintas entre as linhagens avaliadas.

A atividade específica revelou que a expressão gênica e atividade enzimática não esteve diretamente associada à secreção proteica global, mas sim à modulação do metabolismo em função da fonte de carbono e da oxigenação. De modo geral, a agitação favoreceu a produção enzimática em *Lentinus berteroi*, enquanto *Ganoderma stipitatum* apresentou melhor desempenho sob condições estáticas.

Os resultados confirmam a viabilidade do uso de basidiomicetos na valorização de resíduos queratinosos, reforçando seu potencial em estratégias sustentáveis de produção enzimática e em modelos de biorrefinaria voltados à agregação de valor a subprodutos agroindustriais.

REFERÊNCIAS

- AHMED, Aisha; YASSIR, Makkawi. The biorefinery paradigm: technologies, feedstocks, and retrofitting for future sustainable energy. **Energies**, v. 18, n. 22, p. 5919, 2025.
- AHMED, Pablo M. *et al.* Vinasse odyssey: sugarcane vinasse remediation and laccase production by *Trametes sp.* immobilized in polyurethane foam. **Biodegradation**, v. 33, n. 4, p. 333-348, 2022.
- AL-BEDAK, Osama Abdel-Hafeez Mohamed *et al.* Microbial exploitation of feather wastes for sustainable production of keratinase and collagenase enzymes by *Didymella keratinophila* AUMC 15399 in submerged fermentation. **Fermentation**, v. 9, n. 6, p. 507, 2023.
- ALWAKEEL, Suaad S. *et al.* Keratinases produced by *Aspergillus stelliformis*, *Aspergillus sydowii*, and *Fusarium brachygibbosum* isolated from human hair: Yield and activity. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 6, p. 471, 2021.
- ARAÚJO, Nelma Lopes *et al.* Use of green light to improve the production of lignocellulose-decay enzymes by *Pleurotus spp.* in liquid cultivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 149, p. 109860, 2021.
- AVELINO, Katielle Vieira *et al.* Production and characterization of Laccase from *Lentinus berteroi* and applications for biodegradation of organic micropollutants. **Biodegradation**, v. 36, n. 4, p. 64, 2025.
- AZA, Pablo; CAMARERO, Susana. Fungal laccases: Fundamentals, engineering and classification update. **Biomolecules**, v. 13, n. 12, p. 1716, 2023.
- BANASAZ, Shahin; FERRARO, Vincenza. Keratin from animal by-products: structure, characterization, extraction and application—a review. **Polymers**, v. 16, n. 14, p. 1999, 2024.
- BUMROONGSRI, Pornchai. Value-added product from sugarcane molasses: Conversion of sugarcane molasses to non-caloric sweetener for applications in food and pharmaceutical industries. **Bioresource Technology**, v. 395, p. 130370, 2024.
- CALLEGARO, Kelly; WELTER, Nicolý; DAROIT, Daniel Joner. Feathers as bioresource: microbial conversion into bioactive protein hydrolysates. **Process biochemistry**, v. 75, p. 1-9, 2018.

CASTILLO ALVAREZ, Yoisdal *et al.* Transition to a Circular Bioeconomy in the Sugar Agro-Industry: Predictive Modeling to Estimate the Energy Potential of By-Products. **Technologies**, v. 13, n. 6, p. 238, 2025.

CHU, Yuqing *et al.* Keratinases: microbial sources, mechanisms, and industrial applications in waste valorization. **Frontiers in Microbiology**, v. 17, p. 1793191, 2026.

COWAN, Rhona M. *et al.* An improved, optimised and robust keratin azure assay for accurate assessment of keratinase activity. **Analytical Methods**, v. 15, n. 46, p. 6468-6475, 2023.

D'AGOSTINI, Érica Clarissa *et al.* Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. **Scientia Agricola**, v. 68, p. 295-300, 2011.

DE MENEZES, Cíntia Lionela Ambrosio *et al.* Industrial sustainability of microbial keratinases: production and potential applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 86, 2021.

DOMINGOS, Marcelo *et al.* A new bioreactor design for culturing basidiomycetes: Mycelial biomass production in submerged cultures of *Ceriporiopsis subvermispora*. **Chemical Engineering Science**, v. 170, p. 670-676, 2017.

ELISASHVILI, Vladimir I. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products. **International journal of medicinal mushrooms**, v. 14, n. 3, 2012.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, p. 109-112, 2014.

FRIEDRICH, J. *et al.* In vitro degradation of porcine skin epidermis by a fungal keratinase of *Doratomyces microsporus*. **Enzyme and microbial technology**, v. 36, n. 4, p. 455-460, 2005.

GONZALO, Milena *et al.* Azo dying of α -keratin material improves microbial keratinase screening and standardization. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 984-996, 2020.

GOVINDAIAH, Prasad M. *et al.* Sustainable valorisation of poultry processing by-products: green technologies and circular economy perspectives. **World's Poultry Science Journal**, p. 1-18, 2026.

GUO, Lichun *et al.* Valorization of refractory keratinous waste using a new and sustainable bio-catalysis. **Chemical Engineering Journal**, v. 397, p. 125420, 2020.

GUPTA, Rani; RAMNANI, Priya. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 70, n. 1, p. 21-33, 2006.

HAILE, Setegn; AYELE, Abate. Pectinase from microorganisms and its industrial applications. **The Scientific World Journal**, v. 2022, n. 1, p. 1881305, 2022.

INÁCIO, Fabíola Dorneles *et al.* Biodegradation of human keratin by protease from the basidiomycete *Pleurotus pulmonarius*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 127, p. 124-129, 2018.

JIN, Hyeon-Su *et al.* Development of a keratinase activity assay using recombinant chicken feather keratin substrates. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0172712, 2017.

KRUPODOROVA, T. A.; BARSHTEYN, V. Yu; SEKAN, A. Review of the basic cultivation conditions influence on the growth of basidiomycetes. **Curr. Res. Environ. Appl. Mycol**, v. 11, n. 1, p. 494-531, 2021.

MATTIELLO, Sara *et al.* Physico-chemical characterization of keratin from wool and chicken feathers extracted using refined chemical methods. **Polymers**, v. 15, n. 1, p. 181, 2022.

MELIKOGLU, Mehmet. Current status and future of ocean energy sources: A global review. **Ocean Engineering**, v. 148, p. 563-573, 2018.

MUSTAFA, Hayman K.; ANWER, Sewgil Saadudeen; ZRARY, Taha J. Influence of pH, agitation speed, and temperature on growth of fungi isolated from Koya, Iraq. **Kuwait Journal of Science**, v. 50, n. 4, p. 657-664, 2023.

PANDEY, Ashok; SOCCOL, Carlos R.; MITCHELL, David. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.

QIU, Jingwen *et al.* Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function. **Biotechnology advances**, v. 44, p. 107607, 2020.

REDDY, Chilakamarri Chaitanya *et al.* Valorization of keratin waste biomass and its potential applications. **Journal of Water Process Engineering**, v. 40, p. 101707, 2021.

SHAH, Anshuman *et al.* Keratin production and its applications: current and future perspective. **Keratin as a protein biopolymer: Extraction from waste biomass and applications**, p. 19-34, 2018.

SHARMA, Swati; GUPTA, Arun. Sustainable management of keratin waste biomass: applications and future perspectives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. e16150684, 2016.

SHAVANDI, Amin *et al.* Keratin: dissolution, extraction and biomedical application. **Biomaterials science**, v. 5, n. 9, p. 1699-1735, 2017.

SHIH, Lung; PAN, Kelly; HSIEH, Chienyan. Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1129-1135, 2006.

SIDDIQUI, Mohd *et al.* Biological degradation of keratin by microbial keratinase for effective waste management and potent industrial applications. **Current Protein and Peptide Science**, v. 22, n. 4, p. 304-312, 2021.

SINGH, Shivam *et al.* A comprehensive review on white-rot fungi for their pivotal role in degradation of pollutants. **Discover Water**, 2026.

SODHI, Abhinashi Singh; BHATIA, Sonu; BATRA, Navneet. Laccase: Sustainable production strategies, heterologous expression and potential biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 280, p. 135745, 2024.

SOMERVILLE, Greg A.; PROCTOR, Richard A. Cultivation conditions and the diffusion of oxygen into culture media: the rationale for the flask-to-medium ratio in microbiology. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 9, 2013.

TAVARES, Magali Ferreira *et al.* Decolorization of azo and anthraquinone dyes by crude laccase produced by *Lentinus crinitus* in solid state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 99-106, 2020.

TREICHEL, Helen *et al.* A review on microbial lipases production. **Food and bioprocess technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

UMAR, Aisha *et al.* Agitation role (Dissolved Oxygen) in production of laccase from newly identified *Ganoderma multistipitatum* sp. nov. and its effect on mycelium morphology. **BMC Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 280, 2023.

YOUNUS, Hina *et al.* Eco-friendly biocatalysts: laccase applications, innovations, and future directions in environmental remediation. **Catalysts**, v. 15, n. 10, p. 921, 2025

ZHANG, Shuhang; WANG, Jingjing; JIANG, Hong. Microbial production of value-added bioproducts and enzymes from molasses, a by-product of sugar industry. **Food chemistry**, v. 346, p. 128860, 2021.

CAPÍTULO II

Modulação do Perfil Bioativo do Micélio de *Ganoderma stipitatum* em Cultivo Submerso: Influência das Condições de Cultivo sobre Atividade Antioxidante, Fotoprotetora e Anticolinesterásica

RESUMO:

Este estudo avaliou a influência das condições de cultivo submerso sobre o perfil químico e funcional do micélio de *Ganoderma stipitatum*, visando sua valorização em sistemas de biorrefinaria fúngica. O fungo foi cultivado em meio líquido contendo melaço de cana-de-açúcar sob condições estática e agitada, e os extratos miceliais foram analisados quanto ao teor de compostos fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante, fator de proteção solar (*in vitro*) e atividade anticolinesterásica. O cultivo estático apresentou maior teor de fenóis totais ($31,24 \pm 5,5 \mu\text{g EAG/mg}$), enquanto o cultivo sob agitação revelou maior concentração de flavonoides ($48,10 \pm 9,5 \mu\text{g EQ/mg}$) e desempenho funcional superior. Os extratos do cultivo agitado apresentaram maior eficiência antioxidante nos ensaios de DPPH• e ABTS•⁺, com IC₅₀ de $44,28 \pm 0,20 \text{ mg/mL}$ e $2,47 \pm 0,72 \text{ mg/mL}$, respectivamente, além de elevado fator de proteção solar (FPS = $35,86 \pm 1,58$) e manutenção da inibição da acetilcolinesterase até $0,0078 \text{ mg/mL}$. Os resultados indicam que a agitação promoveu não apenas maior funcionalidade biológica, mas também uma reorganização qualitativa do metabolismo secundário, favorecendo a síntese de metabólitos fenólicos estruturalmente mais ativos. Dessa forma, o cultivo submerso agitado se mostrou uma estratégia eficiente para obtenção de extratos miceliais de *G. stipitatum* com potencial antioxidante, fotoprotetor e neuroprotetor, consolidando essa espécie como recurso promissor para aplicações nas áreas farmacêutica, nutracêutica e cosmética, em consonância com princípios da bioeconomia sustentável.

Palavras-chave: Basidiomicetos. Metabólitos secundários. Bioatividade fúngica. Biorrefinaria fúngica. Bioeconomia sustentável.

INTRODUÇÃO

Os fungos basidiomicetos formam um grupo diverso do reino Fungi, amplamente reconhecido por suas aplicações alimentícias, ecológicas e farmacológicas, destacando-se pela produção de metabólitos secundários com atividades biológicas relevantes, como antioxidantes, antimicrobianas, antitumorais, anti-inflamatórias e imunomoduladoras (Sun *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2022). Compostos bioativos, como polissacarídeos, terpenoides, fenóis e esteróis, isolados de espécies como *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* e *Inonotus hispidus*, apresentam potencial terapêutico promissor, reforçando o interesse por basidiomicetos como fontes sustentáveis de novos agentes farmacológicos (Vallavan *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2024; Zhao *et al.*, 2024).

Estudos recentes demonstram que metabólitos de basidiomicetos apresentam atividade antioxidante, protegendo as células do estresse oxidativo, além de ação antimicrobiana contra bactérias multirresistentes e efeito antitumoral mediado pela modulação de vias apoptóticas, consolidando esse grupo como um relevante recurso biotecnológico para aplicações farmacêuticas, nutracêuticas e cosméticas (Górska-Jakubowska *et al.*, 2025; Azelee *et al.*, 2025).

Ganoderma stipitatum (Polyporaceae) é um basidiomiceto de podridão branca da madeira pertencente ao gênero *Ganoderma*, amplamente reconhecido por espécies com potencial farmacológico (Plosca *et al.*, 2025). Trata-se de uma espécie neotropical com registros na América do Sul e Central, incluindo diferentes biomas brasileiros, como Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (IUCN, 2026). Apesar da ampla distribuição geográfica, *G. stipitatum* permanece pouco explorado sob o ponto de vista químico e funcional. Os estudos disponíveis concentram-se principalmente em atividade antibacteriana (Ferreira-Silva *et al.*, 2017), produção de enzimas lignocelulolíticas (Gois, 2023) e potencial de biorremediação (Cipriani-Avliá *et al.*, 2025; Floréz-Restrepo *et al.*, 2025), havendo lacunas quanto à caracterização de seus metabólitos e atividades biológicas associadas. Nesse contexto, sua investigação amplia o conhecimento sobre espécies neotropicais do gênero e contribui para a valorização biotecnológica da biomassa fúngica.

Diversos estudos recentes têm explorado o potencial antioxidante de fungos basidiomicetos por meio de ensaios de captura de radicais livres, como DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), que avaliam a capacidade de doação de elétrons de extratos fúngicos. Espécies como *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus*, *Russula vesca* e *Fomes fomentarius* demonstraram alta eficiência antioxidante, com correlação positiva entre as atividades DPPH/ABTS e o teor de fenóis e de flavonoides totais, indicando que esses compostos são os principais responsáveis pela ação redutora (Świdarski *et al.*, 2025; Yang *et al.*, 2025; Gürgen *et al.*, 2026).

Além do potencial antioxidante, pesquisas recentes têm destacado o uso de extratos de basidiomicetos como agentes fotoprotetores naturais, devido à presença de compostos fenólicos com absorção significativa na faixa UV. *Coprinus comatus* e *Pleurotus citrinopileatus*, por exemplo, apresentaram fator de proteção solar (FPS) elevado, associado à concentração de flavonoides e carotenoides (Chafaa *et al.*, 2025; Rukhsar *et al.*, 2025).

Outra vertente de investigação envolve o potencial neuroprotetor de basidiomicetos por meio da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), associada ao declínio cognitivo e à doença de Alzheimer. Espécies como *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor* e *Phellinus tremulae* demonstraram atividade anticolinesterásica significativa, correlacionada a altos níveis de compostos fenólicos e terpenoides (Alkan *et al.*, 2020; Kwon *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023). Estudos *in vitro* revelam que extratos ricos em fenóis totais e flavonoides podem modular vias neuroquímicas e reduzir o estresse oxidativo neuronal, consolidando os basidiomicetos como uma promissora fonte de moléculas bioativas multifuncionais (Alkan *et al.*, 2020).

No contexto da bioeconomia e da valorização integral de biomassa fúngica, a exploração do potencial bioativo do micélio torna-se estratégica. Em estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, demonstrou-se que *Ganoderma stipitatum* apresenta capacidade de produzir enzimas extracelulares de interesse industrial a partir de substratos residuais, evidenciando sua aptidão para aplicações em modelos de biorrefinaria fúngica. A integração entre a produção de enzimas no sobrenadante e a valorização da biomassa micelial como fonte de metabólitos bioativos representa uma

abordagem sistêmica capaz de ampliar a eficiência e a sustentabilidade do processo biotecnológico.

Assim, a investigação do perfil químico e da funcionalidade biológica do micélio de *G. stipitatum* complementa a avaliação enzimática apresentada no capítulo anterior, permitindo uma análise integrada do potencial biotecnológico dessa espécie. Considerando que variações no sistema de cultivo e na composição do meio, incluindo a utilização de melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, podem influenciar o metabolismo secundário e a composição dos extratos, o presente estudo teve como objetivo avaliar o teor de fenóis e flavonoides totais do micélio cultivado em sistema submerso sob condições estáticas e sob agitação orbital, bem como determinar sua atividade antioxidante (DPPH e ABTS), seu potencial fotoprotetor *in vitro* (FPS) e sua atividade anticolinesterásica.

Embora basidiomicetos sejam reconhecidos pelo seu potencial bioativo, *G.stipitatum* permanece pouco explorado. Observa-se escassez de estudos sobre o perfil bioativo do micélio dessa espécie, especialmente quanto à produção de compostos fenólicos e flavonoides. Além disso, há ausência de investigações que avaliem, de forma integrada, a influência do cultivo submerso na modulação simultânea de atividades antioxidante, fotoprotetora e anticolinesterásica. Adicionalmente, são limitadas as abordagens que associam a produção enzimática à valorização da biomassa micelial em um contexto de biorrefinaria. Dessa forma, essas lacunas evidenciam a necessidade de estudos integrados nessa área.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico e produção de inóculo

Ganoderma stipitatum (Murrill) Murrill (sinonímia *Fomes stipitatus* Murrill, *Ganoderma parvulum* Murrill, *Fomes parvulus* (Murrill) Sacc. & D. Sacc., *Ganoderma bibadiostriatum* Steyaert) linhagem U15-4 da coleção do Laboratório de Biologia Molecular da UNIPAR, Umuarama – PR, foi avaliada nesse estudo. A linhagem foi cultivada em ágar-extrato-de-malte (AEM) 2% (m/v) a 28 °C, na ausência de luz, para produção de micélio destinado a inóculo.

Cultivo em meio líquido

O cultivo ocorreu em frascos Erlenmeyer (250 mL) com 100 mL de meio composto por 1 g/L extrato de levedura, 1,5 g/L KH_2PO_4 , 0,5 g/L MgSO_4 , 0,5 g/L KCl , 0,036 g/L FeSO_4 , 0,035 g/L ZnSO_4 (Almeida *et al.*, 2018). Melaço de cana-de-açúcar (500 g/L de açúcares totais) foi diluído (1:1) em água ultrapura a 40 °C e adicionado ao meio até a obtenção de 20 g/L de açúcares totais. Após autoclavagem (121 °C, 20 min) e resfriamento, o meio foi inoculado com quatro discos de AEM contendo micélio do fungo. Os frascos foram incubados a 28 °C por 15 dias, na ausência de luz, com ou sem agitação orbital a 100 rpm. Ao final, micélio e meio líquido foram separados por filtração (papel Whatman nº 1). A biomassa micelial foi seca em estufa com circulação de ar a 60 °C até alcançar massa constante. Em seguida, a biomassa foi congelada em nitrogênio líquido e triturada em almofariz até a obtenção de um pó fino. Esse pó foi utilizado para a obtenção dos extratos (Halabura *et al.*, 2023).

Produção de extratos miceliais

Os extratos foram obtidos segundo Saltarelli *et al.* (2009) com algumas modificações. Uma amostra de 5 g de biomassa seca e pulverizada foi submetida a duas extrações sucessivas com 25 mL de uma solução etanol:água (80:20, v/v) por 45 minutos a 50 °C. A mistura foi centrifugada a 4400 g por 20 minutos e os sobrenadantes das duas extrações foram combinados e usados como extrato micelial.

Teor de fenóis totais

A quantificação dos compostos fenólicos nos extratos dos micélios foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Singleton *et al.* (1999). O extrato foi diluído em etanol:água (80:20, v/v) até obter as concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 mg/mL. Aliquotas de 0,3 mL foram misturadas com 2,5 mL de solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteu a 10% (v/v) e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5 g L⁻¹. A mistura foi mantida a 50 °C por 15 minutos, e a variação da absorbância foi determinada a 760 nm. A mistura de etanol e água foi utilizada como controle analítico. As concentrações de fenóis foram calculadas com base em uma curva padrão de ácido gálico (10–700 µM). Os resultados foram expressos em µg equivalentes de ácido gálico (EAG) por mg de micélio.

Teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides foi determinado pelo método colorimétrico com cloreto de alumínio, conforme descrito por Alves e Kubota (2013). O extrato foi diluído em etanol:água (80:20, v/v) até obter as concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 mg/mL. Aliquotas de 0,5 mL das diluições foram misturadas a 0,5 mL de solução de cloreto de alumínio a 2% (m/v) em metanol e mantidas à temperatura ambiente por 10 minutos. A variação da absorbância foi determinada a 425 nm. A solução de cloreto de alumínio foi utilizada como controle analítico. A concentração de flavonoides foi calculada com base

em uma curva padrão de quercetina (5–40 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados foram expressos em μg equivalentes de quercetina (EQ) por mg de micélio.

Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato foi determinada pelos métodos de sequestro de radicais livres DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS•+ (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)). O extrato foi diluído em etanol:água (80:20, v/v) até obter as concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 mg/mL.

Método de sequestro dos radicais DPPH•

Alíquotas de 0,01 mL de cada diluição do extrato foram misturadas a 0,29 mL de DPPH (60 μM), preparado em etanol no momento do uso. A mistura foi mantida por 30 minutos a 22 °C, no escuro. A variação da absorbância foi medida a 515 nm em um leitor de microplacas *SpectraMax Plus 384* (Molecular Devices, EUA). Um controle analítico foi preparado substituindo-se o extrato por 0,01 mL de etanol:água. A quantidade de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH• (concentração inibitória = IC₅₀) foi calculada segundo Rufino *et al.* (2007a).

Método de sequestro dos radicais ABTS•+

A capacidade de sequestro do radical livre ABTS•+ foi determinada conforme descrito por Rufino *et al.* (2007b). A solução de ABTS foi preparada pela mistura de 5 mL de ABTS 7 mM e 0,088 mL de persulfato de potássio 140 mM. A solução foi mantida no escuro a 25 °C por 16 horas. Antes do uso, a absorbância da solução de ABTS foi ajustada para $0,7 \pm 0,05$ a 734 nm por diluição com etanol:água (80:20, v/v). As reações foram preparadas misturando-se 0,29 mL da solução de ABTS e 0,01 mL dos extratos miceliais, sendo mantidas no escuro à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida,

a absorbância foi determinada a 734 nm em leitor de microplacas *SpectraMax Plus 384* (Molecular Devices, EUA). A quantidade de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical ABTS^{•+} (IC₅₀) foi calculada.

Determinação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro*

O fator de proteção solar (*in vitro*) do extrato foi determinado conforme a metodologia descrita por Oliveira *et al.* (2021). Para esse ensaio, o extrato foi diluído em solução etanol:água (80:20, v/v), obtendo-se as concentrações finais de 10, 20, 30, 40 e 50 mg/mL. A absorbância de cada diluição foi mensurada em triplicata em placa de 96 poços, nos comprimentos de onda entre 290 e 320 nm, com intervalos de 5 nm, utilizando um leitor de microplacas *SpectraMax Plus 384* (Molecular Devices, EUA). A solução de etanol foi utilizada como controle analítico.

O cálculo do valor do FPS foi baseado na Equação 1:

$$FPS = CF \sum_{290}^{320} EE(\lambda) I(\lambda) Abs(\lambda) \quad (1)$$

Onde CF corresponde ao fator de correção (CF = 10), $EE(\lambda)$ representa o espectro de efeito eritematoso, $I(\lambda)$ a intensidade da radiação solar e $Abs(\lambda)$ a absorbância da amostra no comprimento de onda λ . Os valores de $EE(\lambda) \times I(\lambda)$ são constantes previamente estabelecidas, conforme descrito por Mansur *et al.* (1986).

Atividade anticolinesterásica

A atividade anticolinesterásica foi avaliada por ensaio bioautográfico por cromatografia de camada delgada (CCD), conforme descrito por Yang *et al.* (2009), com adaptações. O extrato foi preparado na concentração inicial de 1,0 mg/mL em metanol, a partir da qual foram realizadas diluições seriadas até 0,0078 mg/mL. As amostras foram aplicadas em forma de pontos sobre cromatoplas de alumínio (10 × 10 cm) revestidas

com sílica gel 60 F254 (0,2 mm de espessura) e deixadas secar à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram pulverizadas com solução de acetilcolinesterase (AChE) em tampão apropriado, seguidas da aplicação de α -naftilacetato e da incubação em banho-maria a 37 °C por 20 minutos. Após a incubação, as cromatoplacas foram reveladas com Fast Blue B, resultando em coloração púrpura. A atividade anticolinesterásica foi determinada qualitativamente pela presença de halos claros, indicativos de inibição da AChE, em contraste com o fundo púrpura da placa. A concentração inibitória mínima (CIM) detectável foi definida como a menor concentração do extrato capaz de induzir inibição visível da enzima nas condições do ensaio.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. As comparações entre os modos de cultivo (estático e sob agitação) foram realizadas por meio do teste t de Student para amostras independentes, com correção de Welch para variâncias desiguais, adotando-se abordagem bicaudal. Os resultados de FPS foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e a diferença entre as médias determinadas pelo teste de Skott-Knott. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do Microsoft Excel® ou do software Sisvar 5.6 (Ferreira, 2014).

RESULTADOS

As condições de cultivo influenciaram significativamente o perfil de metabólitos fenólicos no micélio de *G. stipitatum* (Tabela 1). O cultivo estático apresentou maior teor de fenóis totais ($31,24 \pm 5,5 \mu\text{g EAG/mg}$) em comparação ao cultivo sob agitação ($13,94 \pm 3,3 \mu\text{g EAG/mg}$), diferença estatisticamente significativa, representando aumento aproximado de 124% no sistema estático (Tabela 1). Em relação aos flavonoides totais, observou-se tendência de valores superiores no cultivo sob agitação ($48,10 \pm 9,5 \mu\text{g EQ/mg}$) em comparação ao estático ($33,56 \pm 7,2 \mu\text{g EQ/mg}$), embora sem diferença estatística significativa

Tabela 1. Teor de fenóis e de flavonoides totais dos extratos do micélio de *Ganoderma stipitatum* cultivado em meio líquido sob agitação orbital ou cultivo estático.

Método	Estático	Agitado	<i>p</i> -valor
Fenóis totais ($\mu\text{g EAG/mg}$)	$31,24 \pm 5,5^a$	$13,94 \pm 3,3^b$	$p = 0,015$
Flavonoides totais ($\mu\text{g EQ/mg}$)	$33,56 \pm 7,2^a$	$48,10 \pm 9,5^a$	$p = 0,237$

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de três repetições. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas de acordo com o Teste t de Student ($p \leq 0,05$).

A capacidade de sequestro de radicais livres revelou a superioridade do extrato derivado do cultivo sob agitação, que apresentou os menores valores de IC_{50} (Tabela 2). No método de sequestro do radical DPPH, o cultivo agitado foi 1,7 vezes mais potente ($\text{IC}_{50} = 44,28 \pm 0,20 \text{ mg/mL}$) do que o estático ($\text{IC}_{50} = 75,21 \pm 0,54 \text{ mg/mL}$). Esta diferença foi ainda mais acentuada no ensaio de sequestro do radical ABTS, no qual o cultivo agitado demonstrou potência 11 vezes superior ($\text{IC}_{50} = 2,47 \pm 0,72 \text{ mg/mL}$) em comparação ao modo de cultivo estático ($\text{IC}_{50} = 27,28 \pm 0,40 \text{ mg/mL}$).

Observou-se associação entre os valores de flavonoides totais e a maior atividade antioxidante no sistema agitado, especialmente no ensaio ABTS. Embora a análise estatística não permita inferências robustas.

Tabela 2. Atividades antioxidantes dos extratos do micélio de *Ganoderma stipitatum* cultivado em meio líquido, sob agitação orbital ou cultivo estático pelos métodos de captura dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) e 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS•+).

Método	Estático	Agitado	<i>p</i> -valor
DPPH• (IC ₅₀) (mg/mL)	75,21 ± 0,54 ^b	44,28 ± 0,20 ^a	<i>p</i> < 0,0001
ABTS•+ (IC ₅₀) (mg/mL)	27,28 ± 0,40 ^b	2,47 ± 0,72 ^a	<i>p</i> < 0,0001

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de três repetições. IC₅₀ = concentração inibitória, que representa a concentração de extrato necessária para inibir 50% dos radicais DPPH ou ABTS. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas de acordo com o teste t de Student ($p \leq 0,05$). Controles positivos - Quercetina, IC₅₀ = 0,0148 ± 0,01 mg/mL (DPPH), Trolox, IC₅₀ = 0,003 ± 0,00 mg/mL (ABTS).

O ensaio bioautográfico em cromatografia de camada delgada revelou atividade inibitória frente à acetilcolinesterase em ambas as condições de cultivo, com manutenção de zonas claras de inibição até a menor concentração testada (0,0078 mg/mL), indicando CIM ≤ 0,0078 mg/mL (Tabela 3). Embora o método usado seja qualitativo, o resultado confirma a presença de metabólitos capazes de interferir na atividade da AChE, sendo necessárias outras análises qualitativas para identificação dos compostos (tabela 3).

Tabela 3. Concentração inibitória dos extratos hidroalcoólicos obtidos do micélio de *Ganoderma stipitatum* cultivado em meio líquido sob agitação orbital ou cultivo estático.

Concentração de extrato (mg/mL)	Inibição da acetilcolinesterase	
	Estático	Agitado
0,0078	+	+

0,0156	+	+
0,0312	+	+
0,0625	+	+
0,0625	+	+
0,125	+	+
0,25	+	+
0,5	+	+
1,0	+	+

O ensaio de fotoproteção apresentou uma relação dose-resposta para ambos os tratamentos, com uma vantagem estatística para o cultivo sob agitação nas maiores concentrações avaliadas (Tabela 4 e Figura 1). Até a concentração de 30 mg/mL, os cultivos apresentaram FPS similares; contudo, a 40 e 50 mg/mL, o extrato derivado do cultivo agitado apresentou FPS de $17,80 \pm 0,17$, significativamente superior ($p < 0,05$) ao FPS do cultivo estático ($14,43 \pm 1,04$). A diferença observada nas maiores concentrações indica maior eficiência na absorção de radiação UVB no extrato obtido sob agitação, resultado consistente com a atividade antioxidante (tabela 4).

Tabela 4. Fator de proteção solar (FPS) dos extratos hidroalcoólicos obtidos do micélio de *Ganoderma stipitatum* cultivado em meio líquido sob agitação orbital ou cultivo estático.

Concentração de extrato (mg/mL)	FPS	
	Estático	Agitado
10	$0,47 \pm 0,02^{eA}$	$0,53 \pm 0,10^{eA}$
20	$3,40 \pm 0,50^{dA}$	$5,76 \pm 1,57^{dA}$
30	$7,36 \pm 1,85^{cA}$	$9,73 \pm 0,60^{cA}$
40	$14,43 \pm 1,04^{bB}$	$17,80 \pm 0,17^{bA}$

50	$21,41 \pm 1,88^{aB}$	$35,86 \pm 1,58^{aA}$
----	-----------------------	-----------------------

Os resultados são a média $\pm$ desvio padrão de três repetições. Letras minúsculas na mesma coluna comparam médias de FPS das diferentes concentrações de extrato. Letras maiúsculas na mesma linha comparam médias de FPS nas diferentes condições de cultivo. Médias indicadas por letras distintas diferem significativamente ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Scott-Knott.

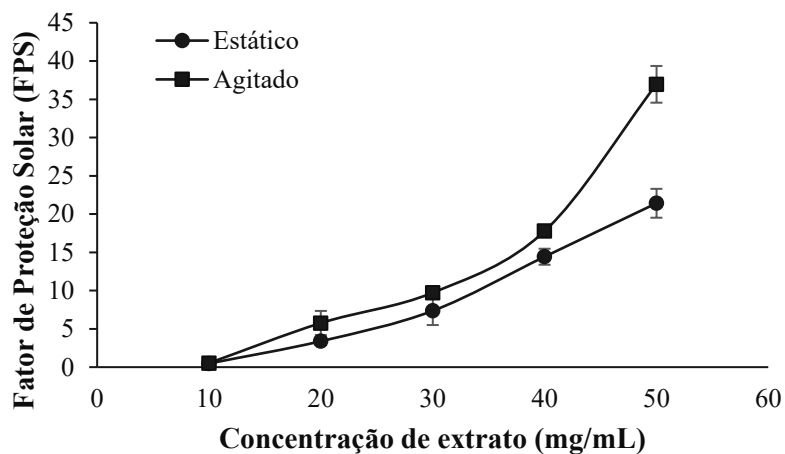


Figura 1. Relação dose-resposta do Fator de Proteção Solar (FPS) dos extratos hidroalcoólicos obtidos do micélio de *Ganoderma stipitatum* cultivado em meio líquido, sob agitação orbital ou cultivo estático.

DISCUSSAO

Este estudo demonstra, pela primeira vez, que o regime hidrodinâmico de cultivo modula significativamente o perfil bioativo do micélio de *Ganoderma stipitatum*, afetando não apenas a produção de fenóis totais, mas principalmente a eficiência funcional dos metabólitos produzidos. Embora o cultivo estático tenha promovido maior acúmulo de fenóis totais, o cultivo sob agitação resultou em extratos com maior bioatividade, evidenciada pela atividade antioxidante e fator de proteção solar. Esses dados indicam que a intensidade da aeração e a dinâmica de transferência de oxigênio podem atuar como moduladores do metabolismo secundário nessa espécie, favorecendo não necessariamente a produção quantitativa de metabólitos, mas a síntese de compostos com maior atividade biológica específica (Park, 2025).

Em fermentação submersa, a agitação pode aumentar a transferência de oxigênio e causar o estresse hidrodinâmico, modulando o metabolismo secundário em basidiomicetos. Em *Ganoderma*, a disponibilidade de oxigênio direciona a síntese de metabólitos bioativos (Tang; Zhong, 2003), e maiores níveis de oxigenação podem elevar a produção de espécies reativas de oxigênio, que atuam como sinais regulatórios na ativação de vias secundárias (Hong *et al.*, 2013; Mattila *et al.*, 2022).

O maior teor de fenóis no cultivo estático pode indicar condições menos estressantes, favorecendo o acúmulo de compostos mais simples. Já a agitação pode ter redirecionado o metabolismo para compostos mais complexos ou mais reativos no ensaio de flavonoides. Assim, os dados sugerem não redução da atividade metabólica, mas uma mudança qualitativa no perfil de metabólitos secundários, de maior acúmulo global (estático) para maior especialização relativa (agitado) (Shih *et al.*, 2006).

As condições de cultivo influenciaram a qualidade funcional dos metabólitos. Embora o cultivo estático tenha apresentado o maior teor de fenóis totais, cultivo sob agitação resultou em atividades antioxidantes superiores, evidenciadas pelos menores valores de IC₅₀ nos ensaios de DPPH e ABTS. Diferença que expressa no método ABTS, no qual o extrato agitado foi de aproximadamente 11 vezes maior que o estático. No ensaio DPPH, o extrato agitado apresentou IC₅₀ de 44,28 ± 0,20 mg/mL, sendo aproximadamente 1,7 vezes mais potente que o estático (75,21 ± 0,54 mg/mL). No ensaio ABTS•+, essa diferença foi ainda mais expressiva (2,47 ± 0,72 mg/mL vs. 27,28 ± 0,40

mg/mL), indicando que a agitação favorece a produção de metabólitos com maior eficiência redutora.

A indicação de possível relação entre o teor de flavonoides e a atividade antioxidante, sugere que a eficiência antioxidante está mais relacionada à estrutura química dos compostos do que à quantidade total de fenóis. Segundo Navarro-Hoyos (2026), essa atividade depende do número e da posição dos grupos hidroxila e da presença de sistemas conjugados, como a dupla ligação C2=C3 associada ao grupo 4-oxo, que favorecem a estabilização do radical fenóxi após a doação de elétrons ou de hidrogênio, sendo determinantes em ensaios de transferência de elétrons, como DPPH e ABTS. Estudos recentes indicam que fenólicos estruturalmente mais complexos apresentam maior eficiência antioxidante do que fenóis simples, devido à maior deslocalização eletrônica e à estabilização do radical formado (Božović *et al.*, 2026). Esse mecanismo explica o menor IC₅₀ do extrato do cultivo agitado, mesmo com menor teor total de fenóis, sugerindo enriquecimento em flavonoides estruturalmente mais ativos.

Além disso, deve-se considerar o possível efeito sinérgico entre os compostos do extrato, pois misturas de polifenóis podem atuar de forma cooperativa, potencializando a atividade antioxidante acima da soma dos efeitos individuais (Ormeneanu *et al.*, 2025). Esse sinergismo pode ter contribuído para a diferença observada no ensaio com ABTS. Assim, os dados indicam que a agitação orbital não apenas altera quantitativamente a produção de metabólitos secundários, mas também promove uma reorganização qualitativa do perfil fenólico. Esse redirecionamento metabólico favorece a produção de antioxidantes estruturalmente mais eficazes.

A atividade anticolinesterásica por bioautografia, com manutenção de zonas de inibição até 0,0078 mg/mL, indica a presença de metabólitos capazes de interferir na atividade da acetilcolinesterase (AChE), mesmo em baixas concentrações, sugerindo um potencial biológico relevante do extrato. Embora o método empregado não permita determinar parâmetros cinéticos nem elucidar o tipo de inibição (competitiva, não competitiva ou mista), evidências recentes demonstram que diversos metabólitos naturais, especialmente polifenóis e flavonoides, podem interagir não apenas com o sítio catalítico da enzima, mas também com o sítio aniônico periférico da AChE, modulando a atividade enzimática por mecanismos alternativos ou duais (Zhou *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2024).

A interação com o sítio aniônico periférico PAS é particularmente relevante no contexto da doença de Alzheimer, uma vez que essa região está associada à modulação da agregação de β -amiloide, tornando inibidores multitarget que são moléculas capazes de interferir em diferentes proteínas, enzimas ou vias metabólicas ao mesmo tempo. estrategicamente promissores (Rossi *et al.*, 2023). Nesse cenário, flavonoides têm sido amplamente descritos como inibidores de AChE com propriedades antioxidantes concomitantes, reforçando a hipótese de que compostos fenólicos presentes no extrato possam contribuir para o efeito observado (Chen *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2025). Assim, os resultados obtidos indicam o extrato como uma opção relevante para investigações mecanísticas e farmacológicas futuras voltadas a doenças neurodegenerativas.

Os extratos hidroalcoólicos apresentaram atividade fotoprotetora na faixa UVB (290–320 nm), evidenciada pelo aumento do FPS com o aumento da concentração, indicando um comportamento dose–resposta adequado para desenvolvimento cosmético. O extrato obtido sob agitação orbital atingiu FPS $35,86 \pm 1,58$ na maior concentração avaliada (50 mg/mL), superando o extrato do cultivo estático ($21,41 \pm 1,88$). Esse resultado sugere que a agitação favoreceu a produção ou enriquecimento de cromóforos naturais capazes de absorver UVB de forma mais eficiente. Compostos fenólicos, em especial flavonoides são descritos como fotoprotetores naturais por combinarem absorção de UVA/UVB (Milutinov *et al.*, 2024).

Hermund (2022), observou que até produtos comerciais rotulados com FPS alto podem apresentar valores *in vitro* menores, justamente porque o método não captura totalmente a contribuição de filtros UVA e por diferenças entre abordagens *in vitro/in vivo*, reforçando que o ensaio é mais apropriado como screening de UVB. Flavonoides e outros fenólicos atuam como cromóforos naturais, absorvendo radiação UV e exercendo ação antioxidante (Pérez-Sánchez *et al.*, 2022; Martins *et al.*, 2023). Esse duplo mecanismo fundamenta a fotoproteção atribuída aos metabólitos secundários. Assim, o maior FPS do extrato do cultivo agitado pode estar associado ao aumento relativo de flavonoides nessa condição, reforçando a relação entre o perfil fenólico e o efeito fotoprotetor. Entretanto, ainda é necessária a identificação dos compostos presentes no extrato.

Em comparação com estudos recentes, os valores obtidos nos ensaio de FPS se destacam. Trabalhos recentes utilizando o método espectrofotométrico de Mansur,

geralmente relatam FPS moderados, abaixo de 30, dependendo da concentração e da matriz (Silva *et al.*, 2023; López-García *et al.*, 2024). Assim, um FPS próximo de 36 em extrato bruto é um resultado expressivo, especialmente por não se tratar de extrato purificado ou de uma formulação otimizada. A linearidade do aumento do FPS com a concentração indica previsibilidade e facilidade de ajuste em formulações. Assim, a agitação influencia não só a quantidade, mas a qualidade funcional dos metabólitos, destacando o extrato de *G. stipitatum* como fonte promissora de ativos naturais com potencial fotoprotetor.

Sob a perspectiva biotecnológica, o cultivo submerso sob agitação mostrou-se mais promissor para a exploração industrial de *G. stipitatum*. Embora o cultivo estático tenha apresentado maior teor de fenóis totais, o sistema agitado gerou extratos com melhor desempenho funcional. Em bioprocessos industriais, a potência biológica do extrato é geralmente mais relevante que o rendimento quantitativo de metabólitos.

A fermentação submersa é a principal plataforma para produção industrial de metabólitos fúngicos, pois permite controle preciso de variáveis como oxigênio, pH, temperatura e hidrodinâmica, que modulam o metabolismo secundário (Dudekula, 2020). Sistemas agitados promovem maior homogeneidade e melhor transferência de oxigênio, favorecendo rotas oxidativas associadas à biossíntese de fenólicos mais complexos. A viabilidade industrial do cultivo agitado baseia-se na consolidação dos biorreatores do tipo tanque agitado como padrão na produção de biomassa e metabólitos secundários (Boruta, 2023). Esses sistemas permitem escalonamento previsível, maior produtividade volumétrica e menor tempo de processo, reduzindo custos e aumentando a competitividade do bioproduto.

Em conjunto, os resultados se alinham ao conceito de biorrefinaria, que integra diferentes correntes do processo fermentativo para maximizar eficiência e rentabilidade (Troiano, 2020). Nesse modelo, o sobrenadante com enzimas extracelulares pode ser aplicado industrialmente, enquanto a biomassa micelial rica em bioativos é utilizada no desenvolvimento de ativos antioxidantes, neuroprotetores ou fotoprotetores. A integração desses processos em cadeias produtivas é estratégica para fortalecer a bioeconomia baseada em fungos filamentosos, promovendo redução de resíduos e maior aproveitamento de substratos (Varriale, 2023).

CONCLUSÕES

O presente estudo evidenciou que as condições de cultivo influenciam o perfil químico e funcional do micélio de *G. stipitatum*. O cultivo sob agitação promoveu maior eficiência antioxidante, maior fator de proteção solar e manutenção da atividade anticolinesterásica, mesmo sem aumento proporcional no teor total de fenóis, indicando que a funcionalidade biológica está provavelmente associada à composição qualitativa dos metabólitos produzidos.

O cultivo submerso sob agitação se destacou como uma abordagem biotecnológica racional e escalável, capaz de gerar extratos com propriedades antioxidantes, neuroprotetoras e fotoprotetoras relevantes para aplicações farmacêuticas, nutracêuticas e cosméticas. Assim, *G. stipitatum* se destaca como um recurso promissor para a bioeconomia baseada em fungos, reforçando o potencial dos basidiomicetos como fontes sustentáveis de metabólitos de alto valor agregado.

A integração entre a produção enzimática descrita no Capítulo 1 e a valorização bioativa da biomassa apresentada neste capítulo reforça a viabilidade de estratégias baseadas em biorrefinaria fúngica, ampliando o aproveitamento biotecnológico dessa espécie.

REFERENCIAS

ALKAN, Sinan *et al.* Chemical characterization, antioxidant, enzyme inhibition and antimutagenic properties of eight mushroom species: A comparative study. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 166, 2020.

ALKAN, Sinan *et al.* Chemical characterization, antioxidant, enzyme inhibition and antimutagenic properties of eight mushroom species: A comparative study. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 166, 2020.

AZELEE, Nur Izyan Wan *et al.* Fungal Antioxidants: Production, Characterization, and Therapeutic Applications. In: **Bioprospecting of Multi-tasking Fungi for Therapeutic Applications: Volume II**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2025. p. 69-94.

BORUTA, Tomasz; ŚCIGACZEWSKA, Anna; BIZUKOJC, Marcin. Investigating the stirred tank bioreactor co-cultures of the secondary metabolite producers *Streptomyces noursei* and *Penicillium rubens*. **Biomolecules**, v. 13, n. 12, p. 1748, 2023.

BOŽOVIĆ, Mijat *et al.* Phenolic Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Punica granatum L.* Fruit Extracts. **Molecules**, v. 31, n. 2, p. 334, 2026.

CHAFAA, Nassiba *et al.* *Opuntia ficus indica*: Chemical Composition, Antioxidant, Sunscreen, and DNA Damage Protection Properties as Well as Inhibitory Activities Towards Tyrosinase and Cholinesterase Enzymes. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-15, 2025.

CHEN, Guifei *et al.* Polyphenols and Alzheimer's Disease: A Review on Molecular and Therapeutic Insights With In Silico Support. **Food Science & Nutrition**, v. 13, n. 9, p. e70496, 2025.

CICHON, Natalia *et al.* Mechanistic and therapeutic insights into flavonoid-based inhibition of acetylcholinesterase: implications for neurodegenerative diseases. **Nutrients**, v. 17, n. 1, p. 78, 2024.

CIPRIANI-AVILA, Isabel *et al.* Mycoremediation of petroleum-contaminated soil using native *Ganoderma* and *Trametes* strains from the Ecuadorian Amazon. **Journal of Fungi**, v. 11, n. 9, p. 651, 2025.

DUDEKULA, Umera Tasleem; DORIYA, Kruthi; DEVARAI, Santhosh Kumar. A critical review on submerged production of mushroom and their bioactive metabolites. **3 Biotech**, v. 10, n. 8, p. 337, 2020.

FERREIRA-SILVA, V.; GUSMÃO, N. B.; GIBERTONI, T. B. Antibacterial activity of ethyl acetate extract of Agaricomycetes collected in Northeast Brazil. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v. 7, n. 4, p. 267-274, 2017.

FLÓREZ-RESTREPO, María Alejandra *et al.* Biotransformation of acetaminophen by *Ganoderma parvulum* ligninolytic enzymes immobilized on chitosan microspheres. **Fermentation**, v. 11, n. 7, p. 387, 2025.

GAJENDRA, Kumar *et al.* Natural acetylcholinesterase inhibitors: a multi-targeted therapeutic potential in Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry Reports**, v. 11, p. 100154, 2024.

GOIS, Eduardo Henrique Baltrusch. **Condições de cultivo de *Ganoderma stipitatum* e *Ganoderma lucidum* em resíduos agroindustriais e atividades enzimáticas da biomassa micelial.** 2023. 78 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura) - Universidade Paranaense, Umuarama, 2023.

GÓRSKA-JAKUBOWSKA, Sandra *et al.* Critical Review on the Anti-Tumor Activity of Bioactive Compounds from Edible and Medicinal Mushrooms over the Last Five Years. **Nutrients**, v. 17, n. 11, p. 1887, 2025.

GRABOWSKA, Weronika *et al.* Acetylcholinesterase as a multifunctional target in amyloid-driven neurodegeneration: From dual-site inhibitors to anti-aggregation strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 17, p. 8726, 2025.

GÜRGEN, Ayşenur *et al.* Optimization of *Hymenopellis radicata* extracts using RSM and ANN-GA and evaluation of biological activities. **Scientific Reports**, 2026.

HONG, Sung-Yong; ROZE, Ludmila V.; LINZ, John E. Oxidative stress-related transcription factors in the regulation of secondary metabolism. **Toxins**, v. 5, n. 4, p. 683-702, 2013.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). The Global Fungal Red List Initiative. Versão 2025-2026. Disponível em: https://redlist.info/iucn/species_list/. Acesso em: 13 de jan. 2026.

KWON, Mi-Jin *et al.* The influence of tyrosol-enriched *Rhodiola sachalinensis* extracts bioconverted by the mycelium of *bovista plumbe* on scopolamine-induced cognitive, behavioral, and physiological responses in Mice. **Molecules**, v. 27, n. 14, p. 4455, 2022.

LI, Na *et al.* Unveiling the therapeutic potentials of mushroom bioactive compounds in Alzheimer's disease. **Foods**, v. 12, n. 15, p. 2972, 2023.

MATTILA, Hans *et al.* Basidiomycota fungi and ROS: genomic perspective on key enzymes involved in generation and mitigation of reactive oxygen species. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 3, p. 837605, 2022.

NAVARRO-HOYOS, Mirtha *et al.* Key Dietary Flavonoids: Insights into Their Structural Characteristics, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities, and Potential as Neuroprotective Agents. **Molecules**, v. 31, n. 1, p. 154, 2026.

OLIVEIRA, Rui S. *et al.* Exploring the bioactive potential of *Pisolithus* (Basidiomycota): comprehensive insights into antimicrobial, anticancer, and antioxidant properties for innovative applications. **Microorganisms**, v. 12, n. 3, p. 450, 2024.

ORMENEANU, Victor-Pierre *et al.* Synergistic Interactions Between Natural Phenolic Compounds and Antibiotics Against Multidrug-Resistant *K. pneumoniae*: A Pooled Analysis of 216 In Vitro Tests. **Microorganisms**, v. 13, n. 11, p. 2497, 2025.

PARK, Hye-Jin. Influence of culture conditions on bioactive compounds in *Cordyceps militaris*: a comprehensive review. **Foods**, v. 14, n. 19, p. 3408, 2025.

PLOSCA, Mădălina-Paula *et al.* *Ganoderma lucidum*—from ancient remedies to modern applications: chemistry, benefits, and safety. **Antioxidants**, v. 14, n. 5, p. 513, 2025.

RUKHSAR, Saliha *et al.* Mushrooms in modern cosmetics: unlocking anti-aging, antioxidant, and therapeutic potential. **Archives of Dermatological Research**, v. 317, n. 1, p. 542, 2025.

SADEGHI, Morteza *et al.* Identification of cholinesterases inhibitors from flavonoids derivatives for possible treatment of Alzheimer's disease: In silico and in vitro approaches. **Current Research in Structural Biology**, v. 7, p. 100146, 2024.

SHIH, Lung; PAN, Kelly; HSIEH, Chienyan. Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1129-1135, 2006.

SUN, Xiaoqi *et al.* Biological activities of secondary metabolites from the edible-medicinal macrofungi. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 2, p. 144, 2024.

ŚWIDERSKI, Grzegorz *et al.* Bioactive properties of selected European *Phellinus* species: A comprehensive study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 16, p. 8013, 2025.

TANG, Ya-Jie; ZHONG, Jian-Jiang. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. **Enzyme and Microbial technology**, v. 32, n. 3-4, p. 478-484, 2003.

TROIANO, DEREK; ORSAT, Valerie; DUMONT, MARIE-JOSÉE. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 117, p. 109472, 2020.

UMAR, Aisha *et al.* Agitation role (Dissolved Oxygen) in production of laccase from newly identified *Ganoderma multistipitatum* sp. nov. and its effect on mycelium morphology. **BMC Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 280, 2023.

VALLAVAN, Vimalah *et al.* A review on antistaphylococcal secondary metabolites from basidiomycetes. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5848, 2020.

VARRIALE, Ludovica; ULBER, Roland. Fungal-based biorefinery: from renewable resources to organic acids. **ChemBioEng Reviews**, v. 10, n. 3, p. 272-292, 2023.

WANG, Zhen-xin *et al.* Diverse metabolites and pharmacological effects from the basidiomycetes *Inonotus hispidus*. **Antibiotics**, v. 11, n. 8, p. 1097, 2022.

YANG, Jingya *et al.* Unveiling the bioactive compounds and therapeutic potential of *Russula*: A comprehensive review. **Journal of Fungi**, v. 11, n. 5, p. 341, 2025.

ZHAO, Meili *et al.* Review of the structural characteristics and biological activities of *Tricholoma* secondary metabolites (2018–2023). **Molecules**, v. 29, n. 19, p. 4719, 2024.