



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPGBIOTEC



VÍTOR ALVES PESSOA

**PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES SINTETIZADAS POR *Ganoderma* SPP.:
PRODUÇÃO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA E POTENCIAL
TERAPÊUTICO FRENTE AO HTLV**

MANAUS

2026

VÍTOR ALVES PESSOA

**PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES SINTETIZADAS POR *Ganoderma* SPP.:
PRODUÇÃO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA E POTENCIAL
TERAPÊUTICO FRENTE AO HTLV**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração em Saúde.

Orientadora: Dra. Ceci Sales-Campos

Coorientadores: Dra. Larissa Ramos Chevreuil
Dr. Allyson Guimarães da Costa

MANAUS

2026

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P475p Pessoa, Vítor Alves
Proteínas antioxidantes sintetizadas por Ganoderma spp.: Produção em Fermentação Submersa e Potencial Terapêutico Frente ao HTLV / Vítor Alves Pessoa. - 2026.
209 f. : il., color. ; 31 cm.

Orientador(a): Ceci Sales-Campos.
Coorientador(a): Larissa Ramos Chevreuil.
Coorientador(a): Allyson Guimarães da Costa.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2026.

1. Cogumelos Medicinais. 2. Cultivo Submerso. 3. Estresse oxidativo. 4. Polipeptídeos bioativos. 5. Antiviral. I. Sales-Campos, Ceci. II. Chevreuil, Larissa Ramos. III. Costa, Allyson Guimarães da. IV. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. V. Título

VÍTOR ALVES PESSOA

PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES SINTETIZADAS POR *Ganoderma* SPP.:
PRODUÇÃO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA E POTENCIAL TERAPÊUTICO
FRENTE AO HTLV

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor em Biotecnologia, área de
concentração Saúde.

Aprovada em: 29/07/2026

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ceci Sales-Campos
Presidente
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof. Dr. Edson Junior do Carmo
Membro Titular
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie
Membro Titular
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis
Membro Titular
Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Carlos Eduardo Castro Alves
Membro Titular
Instituto Carlos Chagas

Dedico,
À minha família;
A todos que sempre me apoiaram;
À minha criança interior que achava incrível ser cientista.

Agradecimentos

Agradeço inicialmente a Deus, por ter me dado forças durante todos esses anos, por ter me animado enquanto eu fraquejava e por sempre me mostrar o quanto olha por mim.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento de bolsa e/ou projeto de pesquisa que possibilitaram a realização desse trabalho.

Aos meus pais, Dona Tânia e Seu Dorval, por terem me feito quem sou hoje, por terem me criado para o mundo, por terem me incentivado e dado suporte todos esses anos para que eu pudesse realizar esse sonho.

À minha irmã, por todas as conversas, por todo o apoio e as caronas que me deu. Assim como aos meus sobrinhos que são as pessoinhas que mais amo nesse vida, obrigado por todos os momentos de descontração em que me salvaram de mim mesmo.

Ao meu namorado, Thiago Michalinn, que me aguentou todos esses anos, mesmo com minha falta de paciência, meu cansaço mental e dias de desânimo. Obrigado por sempre ter me apoiado e ser meu fã Nº 1.

À minha orientadora, Dra. Ceci, por sempre ter acredito em mim e na minha capacidade enquanto cientista. Sou muito grato por ter tido a liberdade criativa nos projetos de pesquisa que desenvolvi no seu laboratório, com certeza isso me moldou como pesquisador.

À minha coorientadora, Dra. Larissa, por todo esforço que teve comigo desde a iniciação científica, todas as correções, conversas e apoio. Sem dúvidas eu devo muito do que sou hoje como pesquisador à senhora.

Ao meu coorientador, Dr. Allyson, pela confiança depositada em mim e pelo apoio na parte experimental. Sou muito grato ao senhor por ter topado minha ideia e me acolhido como um de seus filhos científicos, mesmo logo após me conhecer.

À equipe do LCFC/INPA por todo apoio. Em especial, à Aldenora, Daiane, Giovanna e Larissa, minhas amigas desde o tempo de graduação. Só foi possível chegar até aqui porque nos ajudamos muito, compartilhamos lástimas e muitos momentos bons.

Àquelas pessoas que tive a honra de conhecer no LCFC, mas hoje em dia já estão em outros horizontes. Danielle, Jefte, Lorena, Luciano, Paula, Roziane, Sérgio e Walter, sou muito grato por ter lhes conhecido e pelo tempo que passamos juntos.

À equipe do CPC/HEMOAM por todo apoio. Brad, Daniele, Evelyn, Juniel e Regiane, obrigado por todos os momentos e conhecimentos que compartilhamos ao longo desse um pouco mais de 1 ano.

Agradeço também aos demais membros do grupo AmazonInterscience, pessoas tão legais que pude conhecer. Em especial ao Cláudio Catão pelo auxílio nas atividades experimentais.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e à Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) pela infraestrutura para a realização dessa pesquisa.

À Dra. Enedina e ao Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM-UFAM), por nos permitir utilizar o FTIR e pelo auxílio na extração e sequenciamento de DNA.

Ao Centro Multiusuário Para Análise de Fenômenos Biomédicos (CMABio-UEA) pelo apoio nas análises microscópicas.

Ao Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) pelo apoio nas análises de DRX e MEV.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC), pela possibilidade de realizar o doutorado.

À estimada banca de avaliação por aceitarem gentilmente avaliar a tese e contribuir para a melhora dessa pesquisa.

Estendo meus agradecimentos também a todos que participaram da minha formação, desde a graduação. Dentre eles destaco: Profa. Dra. Lucivana Mourão e Prof. Dra. Márcia Rúbia, coordenadoras do curso de graduação em Biotecnologia da UEA; Dra. Cecília Nunez, minha primeira orientadora na IC no INPA e que posteriormente virou minha orientadora de mestrado no MBT-UEA; Prof. Dr. João Paulo e Dr. Dhoone Menezes, que me receberam muito bem durante meu estágio profissional no IBCCF da UFRJ.

Aos prezados membros da minha banca avaliadora, Profa. Dra. Jordana Reis (UFMG), Dr. Eduardo Alves (ICC/Fiocruz Paraná), Profa. Dra. Adriana Malheiros (UFAM) e Prof. Dr. Edson Carmo (UFAM), por terem aceitado contribuir para a avaliação deste trabalho e para a finalização desta importante etapa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

*“Eu não sei dizer nada por dizer
Então eu escuto
Se você disser tudo o que quiser
Então eu escuto
(...)*

*Se eu não entender, não vou responder
Então eu escuto
Eu só vou falar na hora de falar
Então eu escuto
Fala!”*

Secos & Molhados (1973) – Fala

Resumo

O gênero *Ganoderma* compreende espécies de cogumelos medicinais com grande potencial para a prospecção de moléculas bioativas de baixa toxicidade. Suas proteínas, apesar de pouco estudadas, demonstram grande potencial como agentes imunomoduladores, anticânceres, antivirais e antioxidantes. Tais características as tornam excelentes candidatas para o desenvolvimento de terapias frente ao Vírus Linfotrópico de Células T Humanas tipo 1 (HTLV-1), o agente etiológico da Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATL) e da Mielopatia Associada ao HTLV/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), condições que comprometem gravemente a qualidade e expectativa de vida das pessoas vivendo com HTLV, e que até o momento não possuem tratamentos direcionados. Diante desse contexto, o objetivo desse trabalho foi produzir e caracterizar extratos proteicos de *Ganoderma* spp. cultivados em diferentes condições de fermentação submersa, além de investigar seu potencial citotóxico seletivo frente a uma linhagem celular infectada com HTLV-1. Foram utilizadas duas linhagens de *Ganoderma*, a espécie medicinal de referência *G. sichuanense* (CC22), e um isolado amazônico que foi identificado molecularmente como *G. multiplicatum* (1962). A análise das condições de cultivo indicou que a ausência de agitação resultou em maiores teores de proteínas, com destaque para *G. sichuanense*. Apesar de diferenças associadas ao metabolismo fúngico, particular de cada espécie, todas as amostras apresentaram potencial antioxidante. O extrato proteico com maior atividade antioxidante de cada linhagem foi selecionado para os ensaios celulares. Os extratos proteicos de ambas as espécies não apresentaram citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) saudáveis. Contudo, frente à linhagem infectada com HTLV-1 (MT-2), *G. sichuanense* destacou-se por apresentar atividade citotóxica mais pronunciada. A atividade imunomoduladora apresentou perfis distintos para o extrato de cada espécie, com *G. multiplicatum* apresentando um perfil mais pró-inflamatório, enquanto *G. sichuanense* teve um perfil mais imunorregulador. Com base nesses resultados, *G. sichuanense* foi selecionado para ser cultivado em diferentes condições de estresse, como uma estratégia para direcionar o metabolismo fúngico para síntese das proteínas de interesse. O estresse térmico mostrou-se promissor para esse propósito, possibilitando o aumento de aproximadamente quatro vezes da citotoxicidade frente à linhagem MT-2, infectada pelo HTLV-1, ao mesmo tempo em que aumentou a atividade antioxidante e a resposta imunomoduladora. Os dados dão suporte para futuros estudos voltados à identificação dos mecanismos de atuação e identificação das proteínas responsáveis pela atividade. Esse trabalho relata pela primeira vez proteínas obtidas de cogumelos do gênero *Ganoderma* com atividade citotóxica seletiva frente a uma linhagem celular infectada com HTLV-1.

Palavras-chave: Cogumelos Medicinais; Cultivo Submerso; Estresse oxidativo; Polipeptídeos bioativos; Antiviral.

Abstract

The genus *Ganoderma* comprises medicinal mushroom species with considerable potential for the discovery of low-toxicity bioactive molecules. Although still poorly explored, their proteins have demonstrated remarkable potential as immunomodulatory, anticancer, antiviral, and antioxidant agents. These properties make them promising candidates for the development of therapies against Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1), the etiological agent of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma (ATL) and HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP), diseases that severely compromise the quality of life and life expectancy of people living with HTLV-1 and for which no targeted therapies are currently available. In this context, the present study aimed to produce and characterize protein extracts from *Ganoderma* spp. cultivated under different submerged fermentation conditions and to investigate their selective cytotoxic potential against an HTLV-1-infected cell line. Two *Ganoderma* strains were evaluated: the reference medicinal species *Ganoderma sichuanense* (CC22) and an Amazonian isolate molecularly identified as *Ganoderma multiplicatum* (1962). The evaluation of cultivation conditions showed that static cultivation resulted in higher protein yields, particularly for *G. sichuanense*. Despite species-specific differences associated with fungal metabolism, all protein extracts exhibited antioxidant activity. The protein extract with the highest antioxidant activity from each strain was selected for subsequent cell-based assays. Protein extracts from both species showed no cytotoxicity toward healthy peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). However, against the HTLV-1-infected MT-2 cell line, *G. sichuanense* exhibited a more pronounced selective cytotoxic effect. The immunomodulatory activity also differed between species, with *G. multiplicatum* displaying a predominantly pro-inflammatory profile, whereas *G. sichuanense* promoted a more immunoregulatory response. Based on these findings, *G. sichuanense* was selected for cultivation under different stress conditions as a strategy to redirect fungal metabolism toward the synthesis of proteins with enhanced biological activity. Thermal stress proved promising for this purpose, resulting in an approximately fourfold increase in cytotoxicity against the HTLV-1-infected MT-2 cell line, while also enhancing antioxidant activity and the immunomodulatory response. These findings provide a foundation for future studies aimed at elucidating the underlying mechanisms of action and identifying the proteins responsible for the observed biological activities. To the best of our knowledge, this is the first report describing proteins obtained from *Ganoderma* mushrooms with selective cytotoxic activity against an HTLV-1-infected cell line.

Keywords: Medicinal Mushrooms; Submerged Cultivation; Oxidative Stress; Bioactive Polypeptides; Antiviral.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Basidioma do <i>Ganoderma sichuanense</i> (CC22) cultivado em laboratório..	27
Figura 2 – Basidioma selvagem do <i>Ganoderma</i> sp. 1962.	30
Figura 3 – Estrutura tridimensional da FIP-glu.	33
Figura 4 – Estrutura tridimensional da lectina POL isolada de <i>Pleurotus ostreatus</i>	34
Figura 5 – Inibidor de protease de <i>Coprinopsis cinerea</i>	36
Figura 6 – Linha do tempo da evolução das ações sobre HTLV, com foco nacional. ...	51
Figura 7 – Infecção dos linfócitos T CD4 ⁺ pelo HTLV-1 através do contato célula-célula.	52
Figura 8 – Mecanismo da patogênese do HTLV-1.	53

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Quantificação de moléculas em extratos proteicos de <i>G. sichuanense</i> cultivado sob diferentes condições de fermentação submersa. (A) Proteínas solúveis; (B) Compostos fenólicos totais.	83
Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura dos extratos proteicos da biomassa micelial de <i>G. sichuanense</i> cultivada sob diferentes condições de fermentação submersa. E: Número do experimento (1–4). A: Agitado. NA: Não agitado.	85
Figura 3 – Padrões de difração de raios X dos extratos proteicos da biomassa micelial de <i>G. sichuanense</i> cultivada sob diferentes condições de fermentação submersa. E: Número do experimento (1–4). A: Agitado. NA: Não agitado.	85
Figura 4 – Espectros de FTIR-ATR dos extratos proteicos da biomassa micelial de <i>G. sichuanense</i> cultivada sob diferentes condições de fermentação submersa. E: Número do experimento (1–4). A: Agitado. NA: Não agitado.	86
Figura 5 – Análise dos dados de FTIR-ATR. (A) Percentual de estruturas secundárias; (B) Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada aos espectros de FTIR-ATR. E: Número do experimento (1–4). A: Agitado. NA: Não agitado.	87
Figura 6 – Atividade antioxidante em extratos proteicos da biomassa micelial de <i>G. sichuanense</i> cultivada sob diferentes condições de fermentação submersa. (A) ABTS ^{•+} ; (B) DPPH [•] ; (C) Habilidade quelante; (D) Poder redutor.	88

Figura 7 – SDS-PAGE dos extratos proteicos da biomassa micelial de <i>G. sichuanense</i> cultivada sob diferentes condições de fermentação submersa. M: Marcador de massa molecular. E: Número do experimento (1–4). A: Agitado. NA: Não agitado.....	89
Figura 8 – Cinética do crescimento (A) e consumo de glicose e pH do caldo de cultivo (B) de <i>G. sichuanense</i> na condição E1NA.	90
Figura 9 – Morfologia da biomassa micelial de <i>Ganoderma sichuanense</i> CC22 da condição E1NA. (A) Macromorfologia; (B) Micromorfologia.....	91
Figura 10 – Mecanismo proposto para a indução de estresse oxidativo durante a fermentação submersa de <i>Ganoderma sichuanense</i> sob condição estática. Figura criada no BioRender. Pessoa, V. (2024). https://BioRender.com/k64h913	96

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Árvore filogenética inferida pelo método de Máxima Verossimilhança, baseada nas sequências da região ITS, mostrando o posicionamento do isolado amazônico <i>Ganoderma multiplicatum</i> 1962 (destacado em laranja).....	114
Figura 2 – Parâmetros produtivos de <i>Ganoderma multiplicatum</i> 1962 cultivado sob diferentes condições de fermentação submersa. (A) Produção de biomassa seca; (B) consumo de glicose durante a fermentação; (C) pH final do meio de cultivo; e (D) gráfico radar resumindo os parâmetros de produção avaliados.	115
Figura 3 – Macromorfologia de <i>Ganoderma multiplicatum</i> 1962 cultivado sob diferentes condições de fermentação submersa. Imagens representativas do crescimento micelial nas condições com agitação e sem agitação, correspondentes aos Experimentos 1–4.....	116
Figura 4 – Micromorfologia da biomassa micelial de <i>Ganoderma multiplicatum</i> 1962 obtida sob diferentes condições de fermentação submersa. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando a organização geral das hifas (A–H) e estruturas especializadas (I–X) nas condições com e sem agitação, nos quatro experimentos. As setas coloridas indicam as seguintes estruturas morfológicas: verde-escuro, hifas tubulares; vermelho, hifas do tipo “chifre de veado”; laranja, estruturas esféricas ornamentadas; verde-claro, estruturas esféricas de superfície lisa; rosa, conexões em grampo; azul-claro, clamidósporos; amarelo, matriz extracelular.	117
Figura 5 – (A) Espectros de FTIR-ATR da biomassa micelial de <i>Ganoderma multiplicatum</i> 1962 obtida sob diferentes condições de fermentação submersa; e (B) gráfico de escores da Análise de Componentes Principais (PCA) baseado nos dados	

espectrais. U.A.: unidades de absorbância. E: experimento (1–4); A: cultivo sob agitação; NA: cultivo sem agitação. 118

Figura 6 – Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos extratos proteicos obtidos da biomassa micelial de *Ganoderma multiplicatum* 1962 produzida sob diferentes condições de fermentação submersa, evidenciando alterações nos padrões de fragmentação. Imagens representativas dos extratos obtidos sob condições com agitação (A) e sem agitação (NA). E: experimento (1–4). 119

Figura 7 – Concentração de (A) proteínas solúveis, (B) açúcares redutores, (C) compostos fenólicos totais e (D) composição percentual relativa dessas biomoléculas nos extratos proteicos de *Ganoderma multiplicatum* 1962 obtidos sob diferentes condições de fermentação submersa. 120

Figura 8 – Atividade antioxidante dos extratos proteicos de *Ganoderma multiplicatum* 1962 obtidos sob diferentes condições de fermentação submersa, avaliada pelos ensaios de (A) ABTS^{•+}, (B) DPPH[•], (C) habilidade quelante de metais e (D) poder redutor férrico. 121

Figura 9 – Matriz de correlação de Pearson ilustrando as relações entre o teor de proteínas solúveis, compostos fenólicos totais, açúcares redutores e as atividades antioxidantes (ABTS^{•+}, DPPH[•], habilidade quelante e poder redutor) sob diferentes condições de fermentação submersa. A intensidade das cores representa a magnitude e a direção dos coeficientes de correlação de Pearson (*r*). 122

CAPÍTULO 3

Figura 1 – Espectro de FTIR-ATR dos extratos proteicos de *G. multiplicatum* e *G. sichuanense*. 146

Figura 2 – Atividade metabólica relativa de PBMCs tratadas com diferentes concentrações dos extratos proteicos de *G. multiplicatum* (A) e *G. sichuanense* (B).. 147

Figura 3 – Atividade metabólica relativa da linhagem celular MT-2 tratada com diferentes concentrações dos extratos proteicos de *G. multiplicatum* (A) e *G. sichuanense* (B). 148

Figura 4 – Efeito do extrato proteico de *G. multiplicatum* sobre a integridade e a densidade celular da linhagem MT-2 em diferentes tempos de exposição. 149

Figura 5 – Efeito do extrato proteico de *G. sichuanense* sobre a integridade e a densidade celular da linhagem MT-2 em diferentes tempos de exposição. 149

Figura 6 – Pannel de citocinas dosadas nos sobrenadantes de PBMCs estimuladas com LPS e tratadas com diferentes concentrações do extrato proteico de <i>G. multiplicatum</i> .	151
Figura 7 – Pannel de citocinas dosadas nos sobrenadantes de PBMCs estimuladas com LPS e tratadas com diferentes concentrações do extrato proteico de <i>G. sichuanense</i> .	152
Figura 8 – Mapa de calor integrativo da atividade metabólica em PBMCs, citotoxicidade na linhagem MT-2 e perfil imunomodulador induzidos pelos extratos proteicos de <i>G. multiplicatum</i> e <i>G. sichuanense</i> .	153

CAPÍTULO 4

Figura 1 – Produção de biomassa de <i>G. sichuanense</i> em diferentes condições de estresse.	171
Figura 2 – Espectros de FTIR-ATR dos extratos proteicos de <i>Ganoderma sichuanense</i> obtidos sob condições de estresse salino, senescente e térmico (A), e micrografias eletrônicas de varredura dos extratos provenientes do estresse salino (B), senescente (C) e térmico (D).	172
Figura 3 – Quantificação de proteínas solúveis pelos métodos de Bradford (A) e Lowry (B), compostos fenólicos (C) e açúcares redutores (D) nos extratos proteicos de <i>G. sichuanense</i> cultivado em diferentes condições de estresse.	174
Figura 4 – Atividade antioxidante avaliada pelos métodos de ABTS ^{•+} (A), DPPH [•] (B), habilidade quelante (C) e poder redutor (D) nos extratos proteicos de <i>G. sichuanense</i> cultivado em diferentes condições de estresse.	175
Figura 5 – Atividade metabólica relativa de PBMCs tratadas com diferentes concentrações dos extratos proteicos de <i>G. sichuanense</i> cultivado sob diferentes condições de estresse.	176
Figura 6 – Atividade metabólica relativa de células da linhagem MT-2 tratadas com diferentes concentrações dos extratos proteicos de <i>G. sichuanense</i> cultivado sob diferentes condições de estresse.	177
Figura 7 – Efeito dos extratos proteicos de <i>G. sichuanense</i> cultivado em diferentes condições de estresse sobre a densidade das células MT-2, demonstrado por micrografias representativas (A) e pela quantificação da área celular (%) obtida por análise digital de imagens (B).	179

Figura 8 – Modulação da produção de citocinas associadas à resposta inflamatória em PBMCs previamente estimuladas com LPS e tratadas com extratos proteicos de <i>Ganoderma sichuanense</i> cultivado sob diferentes condições de estresse.	180
Figura 9 – Modulação da produção de citocinas associadas à resposta imune adaptativa em PBMCs previamente estimuladas com LPS e tratadas com extratos proteicos de <i>Ganoderma sichuanense</i> cultivado sob diferentes condições de estresse.	182
Figura 10 – Modulação da produção de citocinas associadas à resposta imune regulatória e Th17 em PBMCs previamente estimuladas com LPS e tratadas com extratos proteicos de <i>Ganoderma sichuanense</i> cultivado sob diferentes condições de estresse.	183

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Composição do meio de cultura nos experimentos de fermentação submersa.	80
Tabela 2 – Matriz de planejamento experimental para o planejamento fatorial completo 2^3 aplicado à fermentação submersa de <i>G. sichuanense</i>	83
Tabela 3 – Efeitos e significância estatística das variáveis de fermentação na produção de proteínas solúveis por <i>G. sichuanense</i> em um planejamento fatorial 2^3	84
Tabela 4 – Valores de CI_{50} dos extratos proteicos para a atividade de sequestro dos radicais $ABTS^{•+}$ e $DPPH^{•}$	88
Tabela 5 – Modelos matemáticos da cinética de crescimento de <i>G. sichuanense</i> em meio composto por glicose ($10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), peptona de soja ($2,5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e extrato de levedura ($5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), sob condição não agitada (E1NA).	90

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Composição dos meios de cultivo utilizados nos diferentes experimentos.	111
---	-----

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Quantificação de proteínas solúveis estimadas pelo método de Lowry. ...	146
Tabela 2 – Composição relativa de estruturas secundárias obtida por deconvolução espectral da banda de amida I dos extratos proteicos de <i>G. multiplicatum</i> e <i>G. sichuanense</i>	147
Tabela 3 – Estimativa da concentração inibitória de 50% (CI_{50}) do extrato proteico de <i>G. sichuanense</i> sobre a linhagem MT-2, ao longo do tempo de exposição.	148

CAPÍTULO 4

Tabela 1 – Condições de estresse adotadas para a fermentação submersa.	166
Tabela 2 – Composição percentual das estruturas secundárias das proteínas presentes nos extratos de <i>G. sichuanense</i> , estimada por deconvolução da região Amida I dos espectros obtidos por FTIR-ATR.	173
Tabela 3 – Estimativa da concentração inibitória de 50% (CI_{50}) dos extratos proteicos de <i>G. sichuanense</i> sobre a atividade metabólica da linhagem MT-2, em função do tempo de exposição aos tratamentos.	178

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AbPI	Inibidor de protease de <i>Agaricus bisporus</i>
ABTS ^{•+}	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ACD	Domínio α -cristalino
AICc	Critério de Informação de Akaike corrigido
ANOVA	Análise de variância
AR	Açúcares redutores
ATL/ATLL	Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	Reflectância Total Atenuada
AZT	Azidotimidina
BBIs	Inibidores do tipo Bowman–Birk
BDA	Batata-dextrose-ágar
BSA	Albumina sérica bovina
C:N	Relação carbono:nitrogênio
CAM-UFAM	Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas
CAT	Catalase
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CFT	Compostos fenólicos totais
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
CMABio	Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COTEI	Coordenação de Tecnologia e Inovação
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DPPH [•]	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DRX	Difração de Raios X

EAG	Equivalentes de ácido gálico
EBV	Vírus Epstein–Barr
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAPEAM	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIP	Proteína imunomoduladora fúngica
FIPs	Proteínas imunomoduladoras fúngicas
FRAP	Poder redutor férrico
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
GPx	Glutathione peroxidase
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
HAM/TSP	Mielopatia Associada ao HTLV/Paraparesia Espástica Tropical
HBZ	<i>HTLV-1 basic leucine zipper factor</i>
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1
HSPs	Proteínas de choque térmico
HSV-1	Vírus herpes simplex tipo 1
HTLV-1	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas tipo 1
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
IPs	Inibidores de proteases
ITS	Região espaçadora interna transcrita (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)
kDa	Quilodalton
KTIs	Inibidores do tipo Kunitz
LCCT	Linfoma cutâneo de células T
LCFC	Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis

LPS	Lipopolissacarídeo
LZ-8	Proteína imunomoduladora de <i>Ganoderma lucidum</i>
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MHC I	Complexo principal de histocompatibilidade classe I
MT-2	Linhagem celular infectada por HTLV-1
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NK	Células <i>natural killer</i>
NTR	Região N-terminal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato-salino
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K/Akt	Via fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B
POD	Peroxidase
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
PVHTLV-1	Pessoas vivendo com HTLV-1
R^2_{adj}	R-quadrado ajustado
RMSE	Erro quadrático médio da raiz
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Transcriptase reversa
SARS-CoV-2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave tipo 2
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Se-GL-P	Proteína enriquecida com selênio
SFB	Soro fetal bovino
sHSPs	Pequenas proteínas de choque térmico

SOD	Superóxido dismutase
STLV-1	Vírus Linfotrópico de Células T Símias tipo 1
Tax	Proteína transativadora
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLRs	Receptores do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNTs	Nanotúbulos de tunelamento (<i>tunneling nanotubes</i>)
U.A.	Unidades de absorvência
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. REFERENCIAL TEÓRICO	26
2.1. <i>Ganoderma</i>	26
2.1.1. <i>Ganoderma sichuanense</i>	27
2.1.2. <i>Ganoderma</i> sp. 1962	29
2.2. Proteínas bioativas em cogumelos	31
2.2.1. Proteínas imunomoduladoras fúngicas	31
2.2.2. Lectinas.....	34
2.2.3. Inibidores de proteases.....	35
2.2.4. Enzimas antioxidantes.....	37
2.2.5. Proteínas de choque térmico.....	38
2.2.6. Potencial de mercado das proteínas bioativas de cogumelos.....	40
2.3. Complexos proteína-metabólitos	41
2.3.1. Complexos proteína-fenol	41
2.3.2. Complexos proteína-carboidratos.....	42
2.4. Fermentação submersa de cogumelos visando a produção de proteínas	43
2.4.1. Parâmetros que afetam o crescimento fúngico e a síntese de proteínas ...	43
2.4.2. Cultivo submerso em condições de estresse	45
2.5. Proteínas de cogumelos como candidatas terapêuticas em infecções virais	48
2.6. Vírus Linfotrópico de Células T Humanas tipo 1 (HTLV-1)	49
2.6.1. Histórico	50
2.6.2. Fatores epidemiológicos	51
2.6.3. Patogênese	52
2.6.4. Tratamento.....	54
3. HIPÓTESES	56
4. OBJETIVOS.....	57
4.1. Geral	57
4.2. Específicos	57
Referências	58
5. CAPÍTULO 1.....	76
5.1. Introdução.....	78
5.2. Material e Métodos.....	80
5.2.1. Material biológico e Fermentação submersa	80
5.2.2. Extração de proteínas e Ensaio de quantificação.....	80
5.2.3. Análises estruturais dos extratos proteicos	81
5.2.4. Avaliação da Atividade Antioxidante	81

5.2.5.	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	82
5.2.6.	Cinética Fúngica	82
5.2.7.	Delineamento experimental e Análise estatística	82
5.3.	Resultados	83
5.3.1.	Proteínas solúveis e Compostos Fenólicos Totais (CFT).....	83
5.3.2.	Caracterização estrutural	84
5.3.2.1.	Microscopia eletrônica de Varredura.....	84
5.3.2.2.	Difração de Raio X (DRX)	85
5.3.2.3.	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)	86
5.3.3.	Atividade antioxidante	87
5.3.4.	Perfil eletroforético	88
5.3.5.	Parâmetros do bioprocesso de E1NA.....	89
5.4.	Discussão	91
5.5.	Conclusões.....	98
	Referências	98
6.	CAPÍTULO 2.....	105
6.1.	Introdução.....	107
6.2.	Material e Métodos.....	109
6.2.1.	Material biológico e caracterização molecular	109
6.2.2.	Construção da árvore filogenética	110
6.2.3.	Fermentação submersa	111
6.2.4.	Parâmetro de produção.....	111
6.2.5.	Análise morfológica	111
6.2.6.	Análise por espectroscopia no infravermelho	112
6.2.7.	Extração de proteínas.....	112
6.2.8.	Quantificação de biomoléculas	113
6.2.9.	Atividade antioxidante	113
6.2.10.	Delineamento experimental e análise estatística.....	113
6.3.	Resultados	113
6.3.1.	Identificação do isolado.....	113
6.3.2.	Parâmetros de crescimento.....	114
6.3.3.	Morfologia fúngica	115
6.3.4.	FTIR e quimiometria.....	118
6.3.5.	Caracterização dos extratos proteicos	118
6.3.5.1.	Microestrutura.....	118
6.3.5.2.	Composição bioquímica	119

6.3.6. Atividade antioxidante	120
6.4. Discussão	122
6.5. Conclusão	129
Referências	130
7. CAPÍTULO 3.....	138
7.1. Introdução.....	140
7.2. Materiais e Métodos	142
7.2.1. Aspectos éticos.....	142
7.2.2. Cultivo fúngico, extração e caracterização proteica.....	142
7.2.2.1. Linhagens fúngicas	142
7.2.2.2. Fermentação submersa	142
7.2.2.3. Obtenção dos extratos proteicos.....	142
7.2.2.4. Quantificação de proteínas, caracterização espectroscópica e análise de estruturas secundárias	143
7.2.3. Análises em modelos celulares.....	143
7.2.3.1. Linhagem celular infectada com HTLV-1.....	143
7.2.3.2. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico	143
7.2.3.3. Viabilidade celular.....	144
7.2.3.4. Avaliação da organização da cultura celular	144
7.2.3.5. Avaliação da atividade imunomoduladora	145
7.2.4. Análise estatística e processamento dos dados.....	145
7.3. Resultados	145
7.3.1. Perfil bioquímico e estrutural dos extratos proteicos.....	145
7.3.2. Avaliação do efeito dos extratos sobre PBMCs.....	147
7.3.4. Atividade imunomoduladora	150
7.4. Discussão	153
7.5. Conclusão	158
Referências	159
8. CAPÍTULO 4.....	162
8.1. Introdução.....	164
8.2. Materiais e Métodos	166
8.2.1. Aspectos éticos.....	166
8.2.2. Cultivo fúngico.....	166
8.2.2.1. Linhagem fúngica	166
8.2.2.2. Fermentação submersa e parâmetros de crescimento	166
8.2.3. Obtenção dos extratos proteicos.....	167
8.2.4. Caracterização bioquímica	167

8.2.5.	Caracterização estrutural dos extratos proteicos	167
8.2.6.	Atividade antioxidante	168
8.2.7.	Análises em modelos celulares.....	168
8.2.7.1.	Linhagem celular infectada com HTLV-1.....	168
8.2.7.2.	Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico.....	169
8.2.7.3.	Análise de viabilidade celular	169
8.2.7.4.	Avaliação morfológica e análise da densidade celular da linhagem MT-2	170
8.2.7.5.	Atividade Imunomoduladora	170
8.2.8.	Análise dos dados.....	170
8.3.	Resultados	171
8.3.1.	Efeitos das condições de estresse sobre o crescimento fúngico.....	171
8.3.2.	Caracterização estrutural dos extratos.....	171
8.3.3.	Caracterização bioquímica dos extratos.....	173
8.3.4.	Atividade Antioxidante	174
8.3.5.	Efeito dos extratos proteicos em PBMCs	175
8.3.6.	Efeito dos extratos proteicos sobre a linhagem MT-2	176
8.3.7.	Efeito dos extratos proteicos sobre a densidade celular da linhagem MT-2	178
8.3.8.	Atividade Imunomoduladora	179
8.4.	Discussão	183
8.5.	Conclusão	188
	Referências	188
9.	CONCLUSÕES INTEGRATIVAS E PERSPECTIVAS FUTURAS	192
10.	DECLARAÇÕES	193
10.1.	Financiamento.....	193
10.2.	Conflito de interesse	193
10.3.	Uso de Inteligência Artificial	193
11.	ANEXOS	194
11.1.	Material Suplementar do Capítulo 2	194
11.2.	Material Suplementar dos Capítulos 3 e 4	197
12.	APÊNDICES.....	206
12.1.	Atividades desenvolvidas durante o doutorado	206

1. INTRODUÇÃO

Os cogumelos do gênero *Ganoderma* são uma importante fonte de biomoléculas com atividades terapêuticas variadas, sendo amplamente empregados na medicina tradicional asiática e considerados seguros para uso (Adotey et al., 2026). Entre os principais metabólitos produzidos por esses fungos encontram-se polissacarídeos e os triterpenoides, classes extensamente estudadas, assim como proteínas que, apesar de apresentarem relativamente menos estudos, demonstram um grande potencial como produtos naturais com valor farmacológico (Li et al., 2019).

As proteínas sintetizadas por espécies de *Ganoderma* apresentam estruturas e funções variadas, sendo organizadas em diferentes classes funcionais, como proteínas imunomoduladoras fúngicas, lectinas, enzimas hidrolíticas e oxidativas, proteínas de resposta ao estresse, inibidores de protease, entre outras. Essas moléculas apresentam uma diversidade de efeitos biológicos, estando associadas a atividades antibacteriana, antiviral, anticâncer, imunomoduladora e antioxidante (Chevreuil et al., 2025; Kumakura et al., 2018; Li et al., 2019).

Em algumas espécies de *Ganoderma*, o conteúdo proteico pode superar o de polissacarídeos e terpenos. Entretanto, limitações relacionadas aos processos de produção e extração, que frequentemente resultam em baixos rendimentos, constituem um dos principais entraves para sua aplicação biotecnológica (Wang et al., 2025). Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de estratégias que aumentem o rendimento das proteínas de interesse e viabilizem sua aplicação em maior escala.

Nesse contexto, a fermentação submersa representa uma estratégia promissora por possibilitar rápido crescimento fúngico, elevada reprodutibilidade e controle preciso dos parâmetros de cultivo (Bakratsas et al., 2023). A manipulação dessas condições permite modular a expressão gênica e estimular a biossíntese de moléculas de interesse, constituindo uma ferramenta eficiente para investigar alterações na produção de proteínas em resposta a diferentes estímulos ambientais (Arshadi; Nouri; Moghimi, 2023). Essa abordagem torna-se particularmente relevante considerando que determinadas classes de proteínas participam dos mecanismos de defesa dos cogumelos e têm sua expressão aumentada sob condições de estresse (Sabotić; Ohm; Künzler, 2016)

Entre as aplicações biomédicas dessas proteínas, é possível destacar seu potencial para o desenvolvimento de terapias anticâncer, devido à sua atividade de indução da apoptose em células neoplásicas, e antivirais, podendo inibir enzimas essenciais ao ciclo replicativo e bloquear a entrada de partículas virais nas células hospedeiras. (El-Maradny

et al., 2025; Ren et al., 2025). Nesse contexto, é plausível supor que proteínas de *Ganoderma* possam representar candidatas promissoras para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas ao Vírus Linfotrópico de Células T Humanas tipo 1 (HTLV-1).

O HTLV-1 é um retrovírus de RNA de cadeia simples e sentido positivo, pertencente ao gênero *Deltaretrovirus* e à família *Retroviridae* (Domingues et al., 2024). Esse vírus apresenta tropismo por células TCD4+, levando à transformação dessa linhagem, mas também pode se associar a linfócitos TCD8+ e B, além de células endoteliais e fibroblastos (Branda et al., 2025).

A transformação dos linfócitos TCD4+ associada à infecção crônica pode levar as pessoas vivendo com HTLV-1 (PVHTLV) ao desenvolvimento de condições patológicas que impactam significativamente a qualidade e a expectativa de vida. Entre elas, destacam-se a Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATL) e a Mielopatia Associada ao HTLV/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), consideradas as manifestações mais graves associadas ao vírus (Shichijo; Yasunaga, 2025).

O Brasil é considerado uma região endêmica para o HTLV-1, com estimativas que variam de 800 mil a 2,5 milhões de pessoas vivendo com o vírus, apresentando maiores prevalências nas regiões Norte e Nordeste do país (Caterino-de-Araujo et al., 2022; De Oliveira Freire et al., 2025). Apesar desses números, ainda não há tratamentos específicos para o HTLV-1, e as estratégias atualmente adotadas baseiam-se principalmente no manejo das manifestações clínicas (Akbarin; Farjami; Álvarez, 2026).

Dada a natureza proliferativa da infecção, a redução do número de cópias de células infectadas pelo HTLV-1 pode diminuir o risco de desenvolvimento das doenças associadas e, portanto, representa uma estratégia terapêutica promissora (Cooney et al., 2025). Nessa perspectiva, produtos de origem natural têm demonstrado citotoxicidade frente a linhagens celulares anormais, incluindo modelos celulares de ATL, ao mesmo tempo em que estimulam células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) saudáveis (Ling et al., 2019; Nakano et al., 2026).

Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo produzir, caracterizar, avaliar o potencial antioxidante, imunomodulador e citotoxicidade seletiva, frente a uma linhagem celular infectada pelo HTLV-1, de extratos proteicos obtidos de *Ganoderma sichuanense* CC22 (linhagem comercial de referência medicinal) e *Ganoderma* sp. 1962 (isolado amazônico), cultivados sob diferentes condições de fermentação submersa. Até onde se tem conhecimento, este é o primeiro estudo a

descrever a atividade citotóxica seletiva de proteínas produzidas por espécies do gênero *Ganoderma* frente a uma linhagem celular infectada pelo HTLV-1.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. *Ganoderma*

O gênero *Ganoderma* compreende espécies de cogumelos pertencentes à família Ganodermataceae e filo Basidiomycota, cujo nome origina do grego e significa pele brilhante (“gános” – brilhante, reluzente, brilho; e “dérma” – pele) (Du et al., 2024). Esse gênero é caracterizado por basidiósporos elipsoides a ovoides, frequentemente truncados, de parede dupla, com ornamentação endósptica como pilares livres ou anastomosados, chamados de esporos ganodermatóides, e, geralmente, é subdividido entre espécies lacadas, com a superfície do píleo brilhante, ou não-lacadas, com a superfície opaca. Contudo, essa divisão não é suportada por análises filogenéticas dada sua plasticidade morfológica (Cabarro-Hernández et al., 2023).

Espécies desse gênero são reconhecidas pelo seu potencial medicinal, sendo extensivamente utilizadas na medicina tradicional asiática, movimentando um mercado de cerca de 5 a 6 bilhões de dólares no mundo todo (Angulo-Sanchez et al., 2022). Dentre seus benefícios, inclui-se o tratamento de doenças pulmonárias, cardíacas, hepáticas e renais, além das atividades anticâncer, anti-inflamatória, antidiabética, anti-hipertensiva, antilipêmica, antiviral, antioxidante e imunomoduladora (Blundell et al., 2023). Nesse contexto, espécies como *G. lucidum*, *G. sichuanense*, *G. resinaceum* e *G. tropicum* estão entre as espécies medicinais atualmente cultivadas comercialmente (Lau et al., 2024).

Geograficamente, várias espécies do gênero podem ser encontradas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas da África, América, Ásia, Oceania e Europa ((Klaus; Wan-Mohtar, 2024). No Brasil, registros relatam a ocorrência das espécies *G. amazonense*, *G. annulare*, *G. applanatum*, *G. australe*, *G. bibadiostriatum*, *G. brownii*, *G. citriporum*, *G. chaliceum*, *G. colossus*, *G. concinnum*, *G. curtisii*, *G. dorsale*, *G. elegantum*, *G. lobatoideum*, *G. lobatum*, *G. lucidum*, *G. multicornum*, *G. multiplicatum*, *G. multiplicatum* var. *vitalii*, *G. neurosporum*, *G. nitens*, *G. nitidum*, *G. oerstedii*, *G. opacum*, *G. orbiforme*, *G. parvulum*, *G. perturbatum*, *G. pygmoideum*, “*G. reniformis*” [*Elfvigia reniformis*], *G. resinaceum*, *G. sessile*, *G. sessiliforme*, *G. stipitatum*, *G. subamboinense*, *G. subfornicatum*, *G. testaceum*, *G. tornatum*, *G. tropicum*, *G. vivianimercedianum* e *G. zonatum* (Torres-Torres et al., 2013).

2.1.1. *Ganoderma sichuanense*

A espécie *Ganoderma sichuanense* (Figura 1) corresponde ao cogumelo medicinal considerado modelo de estudo e conhecido popularmente como Lingzhi na China. Durante muito tempo, foi erroneamente chamado de *G. lucidum*, uma espécie de ocorrência na Europa (Du et al., 2023). Outro problema taxonômico é relativo ao binômio *G. lingzhi*, o qual foi proposto e amplamente adotado, enquanto *G. sichuanense* ainda não tinha sido totalmente embasado taxonomicamente. Entretanto, com base no conhecimento atual, tem-se recomendado priorizar o uso do epíteto específico *G. sichuanense* em publicações (Papp, 2024).

Figura 1 – Basidioma do *Ganoderma sichuanense* (CC22) cultivado em laboratório.



Fonte: Próprio autor

G. sichuanense é uma espécie nativa do leste asiático, originalmente descrita na Província de Sichuan, em 1983, apresentando um píleo rugoso, com superfície verrugosa ou tuberculosa, além de poros de superfície amarelada quando jovem, tornando-se marrom ou preta quando machucada (Thawthong et al., 2017). Esse cogumelo tem sido cultivado há séculos na China, Japão, Coreia do Sul e regiões próximas, principalmente em função de seus benefícios medicinais, que incluem atividade antitumoral, redução da pressão arterial, antiviral, proteção hepática e antioxidante com ação antienvhecimento (Li et al., 2023).

Uma linhagem chinesa comercial de “*G. lucidum*”, denominada CC-22, foi coletada em 19/02/2004 e depositada no Banco de Germoplasma de Cogumelos para Uso Humano da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF, Brasil). O primeiro estudo a seu respeito foi relatado por Rolim (2009) em sua tese de doutorado,

na qual foram analisados aspectos fisiológicos, bioquímicos e moleculares da linhagem. Posteriormente, Rolim et al., (2011) avaliaram diferentes marcadores moleculares na diferenciação de linhagens brasileiras e chinesas de *G. lucidum*, constatando que a linhagem CC-22 apresentava divergência genética em relação à linhagem CC-63, também de origem chinesa, sendo até mesmo mais próxima às linhagens brasileiras.

Em estudos referentes à viabilidade de cultivo, CC-22 tem se destacado por apresentar alta velocidade de crescimento, elevada eficiência biológica e alto rendimento de basidiomas (Rolim et al., 2014). Essas características são interessantes do ponto de vista industrial, uma vez que essa linhagem foi relatada também com potencial na síntese de polissacarídeos, como as β -glucanas, além de proteínas e compostos fenólicos (Rolim et al., 2020).

Nos últimos anos, essa linhagem tem sido um dos tópicos de estudo do Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, principalmente quanto ao seu potencial de bioconversão de resíduos amazônicos e síntese de moléculas bioativas, englobando todas as áreas de formação, de iniciação científica a doutorado. A partir disso, já é relatado o seu potencial na síntese de ligninases (lacases e peroxidases), celulases (endo e exoglucanases) e xilanases durante a fermentação de resíduos de semente de açaí e serragem de marupá (Chevreuil et al., 2022; Júnior et al., 2022).

Sob a denominação de “*G. lucidum*”, a linhagem CC-22 foi objeto de estudo de 3 dissertações na área de Biotecnologia. Pessoa (2022) analisou o perfil de metabólitos secundários dos basidiomas de CC-22, ao ser cultivada em resíduos regionais amazônicos, descrevendo um grande potencial na síntese de terpenoides e esteroides com alta habilidade quelante e potencial na inibição de proteases, incluindo a do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1), além de compostos fenólicos com alta atividade antioxidante através da inativação de espécies reativas.

Vasconcelos (2022) descreveu o potencial da linhagem no processamento de resíduos agroindustriais e madeireiros, possibilitando a obtenção de enzimas ligninolíticas. Silva (2022), por sua vez, avaliou o crescimento da linhagem em diferentes meios de cultivo em placa de Petri e verificou alta taxa de velocidade de crescimento micelial em todos os meios de cultivo, além de sintetizar serino e cisteinoproteases.

Em cultivo submerso, a linhagem CC-22 demonstrou uma produção de biomassa, proteínas solúveis, proteases e inibidores de proteases dependente da composição do meio

de cultivo (concentração dos nutrientes), bem como da condição de incubação (sob agitação ou cultura estática). A partir desse estudo, o cultivo estático revelou-se como uma alternativa viável para a obtenção de biomassa rica em proteínas, apresentando atividade de enzimas proteolíticas, incluindo caseinolíticas e fibrinolíticas. Por outro lado, o cultivo sob agitação se mostrou mais promissor para a obtenção de inibidores de serino e cisteinoproteases (Pessoa et al., 2023).

Gouvêa (2023) em sua tese de doutorado, a partir do sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e de análise filogenética, verificou que a linhagem CC-22 correspondia à espécie *G. sichuanense* (= *G. lingzhi*). Essa descoberta corrobora com a literatura científica atual, que relata que *G. lucidum* é uma espécie de ocorrência na Europa e não na China. Assim, a partir desse momento, a linhagem passou a ser tratada por esse binômio. Posteriormente, CC-22 foi cultivada em diferentes resíduos lignocelulósicos amazônicos, evidenciando um grande potencial de deslignificação e enriquecimento do teor de nitrogênio no substrato pós-cultivo (Gouvêa et al., 2023).

Apesar da rápida velocidade de crescimento evidenciada em estudos anteriores, o cultivo de *G. sichuanense* CC-22 em resíduos amazônicos não apresentou uma produtividade elevada. Porém, seus basidiomas demonstraram potencial nutracêutico significativo, devido ao alto teor de fibras e proteínas, além de minerais como potássio, fósforo, cálcio e selênio, variando conforme o substrato cultivado (Gouvêa et al., 2024). Além disso, a utilização de diferentes resíduos e soluções extratoras influenciou a recuperação de proteínas bioativas dos basidiomas, com os extratos aquosos apresentando alta atividade de inibição de serino e cisteinoproteases, ao passo que a atividade proteolítica (caseinolítica e fibrinolítica) foi maior em soluções como Tris-HCl e fosfato de sódio (Chevreuil et al., 2025).

Na fermentação submersa, *G. sichuanense* CC-22 apresentou um caldo fermentado rico em exopolissacarídeos, celulasas, ligninases, xilanases e proteases. Essa fermentação também produziu uma biomassa micelial rica em compostos fenólicos e, consequentemente, em atividade antioxidante (Oliveira-Junior et al., 2024; Silva et al., 2024). Contudo, informações referentes à produção de proteínas antioxidantes por essa linhagem e seus efeitos em modelos celulares ainda não estão disponíveis.

2.1.2. *Ganoderma* sp. 1962

Uma linhagem amazônica de *Ganoderma* foi coletada em um fragmento florestal localizado no campus I do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e isolada

no Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis, sendo incorporada às linhagens de trabalho e identificada inicialmente como *Ganoderma tropicum* (Figura 2). No entanto, após a revisão dos dados morfológicos, juntamente com análises moleculares, confirmou-se que essa linhagem se tratava de um *Ganoderma*, mas não a espécie inicialmente proposta. Assim, devido às limitações dos dados disponíveis na época, não foi possível chegar à identificação à nível de espécie, resultando na designação provisória *Ganoderma* sp. 1962, número referente ao seu depósito na Coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA (Gouvêa, 2023).

Figura 2 – Basidioma selvagem do *Ganoderma* sp. 1962.



Fonte: Próprio autor.

Enquanto erroneamente denominada *G. tropicum*, a linhagem foi objeto de estudo de 3 dissertações de mestrado. Pessoa (2022) investigou o potencial dos metabólitos secundários presentes nos basidiomas de *Ganoderma* sp. 1962 em inibir proteases relevantes à saúde, destacando-se por uma maior inibição da protease do HIV-1, em comparação à linhagem comercial chinesa do cogumelo medicinal *G. sichuanense* CC-22, apresentando, assim, potencial para atuar como adjuvante no tratamento de pessoas portadora do HIV.

Vasconcelos (2022) descreveu a aptidão da linhagem 1962 no bioprocessamento de resíduos lignocelulósicos regionais amazônicos, possibilitando, ainda, a obtenção de enzimas celulolíticas e ligninolíticas, que são produtos de alto valor agregado e com grande potencial de aplicação industrial. Silva (2022), por sua vez, avaliou a influência de diferentes meios de cultura no crescimento micelial e na produção de proteases com aplicação farmacêutica, constatando o potencial dessa linhagem como fonte de enzimas caseinolíticas e fibrinolíticas.

Ganoderma sp. 1962, cultivado em resíduos lignocelulósicos amazônicos, aumentou em 142% o teor de nitrogênio nos substratos após o cultivo do fungo, além de reduzir o conteúdo de lignina em 48%, evidenciando um grande potencial de bioconversão (Gouvêa et al., 2023). Além disso, mesmo apresentando baixo rendimento de produção de cogumelos, os basidiomas apresentaram elevado teor proteico, exibindo valor de até 40,32% de proteína bruta, de acordo com o substrato utilizado no cultivo (Gouvêa et al., 2024). Proteínas bioativas pertencentes às classes de inibidores de tripsina, quimotripsina e papaína, além de proteases caseinolíticas, gelatinolíticas e fibrinolíticas foram detectadas nos basidiomas de 1962, apresentando variações na atividade em função do substrato de cultivo e da solução extratora utilizada, ressaltando o potencial dessa linhagem de *Ganoderma* na síntese de proteínas bioativas (Chevreuil et al., 2025).

Na fermentação submersa de *Ganoderma* sp. 1962, embora tenha demonstrado uma produção inferior de exopolissacarídeos, revelou-se promissora no que se refere ao acúmulo de biomassa, quando comparado ao *G. sichuanense* CC-22 (Silva et al., 2024). Informações sobre a produção de proteínas bioativas a partir da fermentação submersa dessa linhagem ainda não estão disponíveis.

2.2. Proteínas bioativas em cogumelos

As proteínas bioativas são consideradas abundantes em cogumelos, sendo descritas como capazes de exercer atividades antitumorais, antivirais, antimicrobianas, imunomoduladoras e antioxidantes (Grienke et al., 2014). Essas macromoléculas fúngicas têm recebido grande atenção devido ao seu potencial como ingredientes ativos e à possibilidade de produção através de processos biotecnológicos *in vitro* (Li et al., 2019). Nesse contexto, as classes que recebem maior destaque devido ao seu potencial biotecnológico incluem as proteínas imunomoduladoras fúngicas (FIPs), proteínas ligantes de carboidratos (lectinas), enzimas e inibidores de proteases (Sousa; Araújo-Rodrigues; Pintado, 2023).

2.2.1. Proteínas imunomoduladoras fúngicas

Proteínas imunomoduladoras fúngicas, do inglês *Fungal immunomodulatory proteins* (FIPs), são proteínas encontradas em cogumelos medicinais e comestíveis. Essas proteínas são caracterizadas por apresentarem baixa massa molecular (~13 kDa, geralmente 110-114 resíduos de aminoácidos), sequências de aminoácidos altamente conservadas (ricas em asparagina e valinas acetiladas), além de apresentar atividade

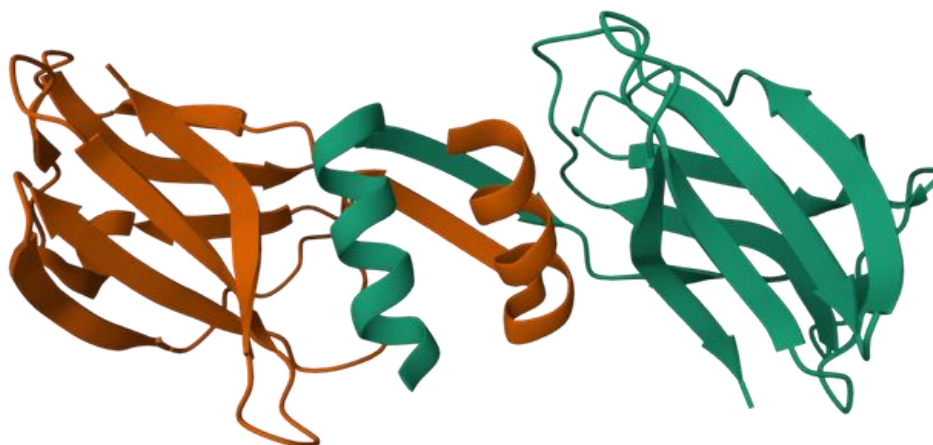
imunomoduladora, que é a sua característica mais proeminente (Sousa; Araújo-Rodrigues; Pintado, 2023; Zhou et al., 2019). Atualmente, mais de 30 FIPs já foram isoladas de cogumelos, podendo ser encontrada mais de uma FIP em uma mesma espécie (Ejike et al., 2020).

A notável capacidade imunomoduladora dessas proteínas tem sido associada à sua estrutura, composta por um dímero com estrutura em formato de halter, assemelhando-se à estrutura da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina humana (IgVH). Nessa configuração, estão presentes as regiões determinantes de complementariedade que, juntamente com a região variável da cadeia leve, são responsáveis pela especificidade de ligação com o antígeno, desencadeando a resposta imunológica. Nesse sentido, a similaridade estrutural proporciona semelhanças funcionais, inclusive entre diferentes FIPs (Sousa; Araújo-Rodrigues; Pintado, 2023; Wang et al., 2012).

Diversas FIPs são candidatas para o desenvolvimento de suplementos alimentares funcionais e/ou agentes terapêuticos, já tendo sido relacionadas com atividade antioxidante, antialérgica, anti-inflamatória, hemaglutinante, antitumoral e imunomoduladora. Essas proteínas atuam como ativadora de células T, estimulando a expressão de citocinas importantes, como IL-2, IL-3, IL-4, INF- γ , TNF- α , entre outras (Uribe-Echeverry; Lopez-Gartner, 2017; Yu et al., 2023). Ademais, devido ao seu potencial na regulação imune e supressão de tumores e doenças autoimunes, a literatura descreve essas proteínas como potenciais candidatas para o desenvolvimento de vacinas (Bastiaan-Net et al., 2013).

Extraída do cogumelo *Ganoderma lucidum*, a FIP-glu (anteriormente conhecida como LZ-8) (Figura 3) foi a primeira proteína isolada dessa espécie e, também, a primeira FIP conhecida, sendo, portanto, a mais estudada (Bhardwaj; Misra, 2020). Nesse cenário, dentre os primeiros estudos com essa proteína, destaca-se a pesquisa de Tanaka et al., (1989), a qual, ao descreverem a sequência de aminoácidos dessa proteína, já relatavam sua similaridade com a imunoglobulina. Os autores sugeriram, então, que FIP-glu tenha relação com alguma proteína ancestral pertencente à superfamília das imunoglobulinas, indicando que a origem dessa família de proteínas poderia ser rastreada até os fungos.

Figura 3 – Estrutura tridimensional da FIP-glu.



Fonte: Protein data bank (PDB)

Diversos estudos descrevem o potencial da FIP-glu no desenvolvimento de medicamentos com baixa ou nenhuma toxicidade, podendo ser empregada para prevenção e tratamento de condições patológicas, especialmente aquelas envolvendo respostas imunológicas, como câncer, doenças autoimunes, osteoporose, dentre outras (Bhardwaj; Misra, 2020). Mais recentemente, Guo et al., (2023) destacaram o potencial dessa proteína como ingrediente bioativo em produtos cosméticos, uma vez que apresenta alta atividade antioxidante, induz a apoptose de células de melanoma e inibe a síntese de melanina, sendo comparável à vitamina C.

Até o momento, foi descrita a síntese de FIPs por *G. lucidum* (FIP-glu/LZ-8), *G. tsugae* (FIP-gts), *G. japonicum* (FIP-gja), *G. microsporum* (FIP-gmi), *G. applanatum* (FIP-gap1 e FIP-gap2), *G. atrum* (FIP-gas), *G. sinense* (FIP-gsi), *G. bonisense* (FIP-gbo), *G. amboinense* (FIP-gam), *G. tenuis* (FIP-gte) e *G. capense* (FIP-gca). Essas proteínas são compostas por 106 a 133 resíduos de aminoácidos, com massas moleculares variando de 12 a 15 kDa, sendo ricas em resíduos de Asp e Val, e baixos níveis de His, Cys e Met. Essas proteínas também exibem alta homologia e quatro diferentes fragmentos de aminoácidos conservados (WGRG, DKAYTYRV, SDGSQK e AQWN), indicando a conservação durante a evolução do *Ganoderma* (Lin et al., 2022).

Apesar da ampla ocorrência de FIPs em espécies de *Ganoderma*, o teor de FIPs em cogumelos é naturalmente baixo, rendendo, por exemplo de 5 a 10 mg de FIP-glu por 300 g de micélio de *G. lucidum* (Kino et al., 1989). Dessa forma, visando sua aplicação, estudos têm se concentrado em avaliar diferentes condições de fermentação que possam aumentar a expressão, simplificar a purificação e, conseqüentemente, a recuperação

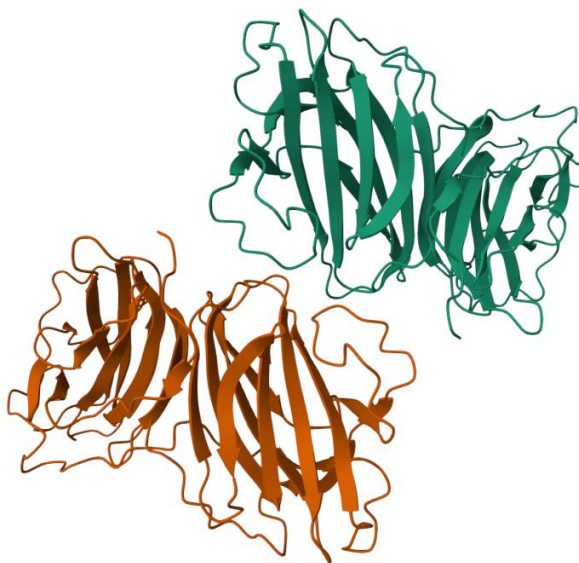
dessas proteínas, de modo a atender os requisitos de produção em nível industrial (Cong et al., 2014).

2.2.2. Lectinas

Lectinas (Figura 4) são proteínas de origem não-imune que possuem como principal característica a presença de sítios de ligação à sequências de oligo e polissacarídeos, possibilitando uma interação altamente específica com polissacarídeos, glicanos, glicoproteínas e glicolipídios. Essas interações conferem às lectinas a capacidade de aglutinar eritrócitos sem alterar as propriedades dos carboidratos (Alvarez; Félix; Lemos, 2023). Contudo, essa classe de proteínas se distingue das FIPs por apresentar conjugação com carboidratos específicos em sua cadeia polipeptídica (Zhao et al., 2020).

Estudos com essas proteínas já foram conduzidos em diversas classes e famílias de organismos, indicando que são macromoléculas amplamente distribuídas entre os seres vivos (Maliki et al., 2022). Nos cogumelos, as lectinas estão entre as proteínas mais estudadas, localizando-se, em sua grande maioria, de forma intracelular, apresentando ampla faixa de massa molecular (variando de 12 a 190 kDa), diversidade estrutural e, conseqüentemente, características físico-químicas diferenciadas (El-Maradny et al., 2021).

Figura 4 – Estrutura tridimensional da lectina POL isolada de *Pleurotus ostreatus*.



Fonte: Protein data bank (PDB)

A interação entre as lectinas e os glicanos da superfície celular viabiliza a sua aplicação em uma ampla gama de atividades, incluindo a tipagem sanguínea no sistema

ABO, transporte de fármacos, marcadores moleculares de patógenos, desenvolvimento de fármacos antimicrobianos, antiparasitários e antivirais, além de anticânceres (Silva et al., 2020). Nesse contexto, é encontrada na literatura a descrição de lectinas de cogumelos com atividade imunoestimulante, antimicrobiana, antiproliferativa, antioxidante, dentre outras (Singh; Walia; Kennedy, 2020).

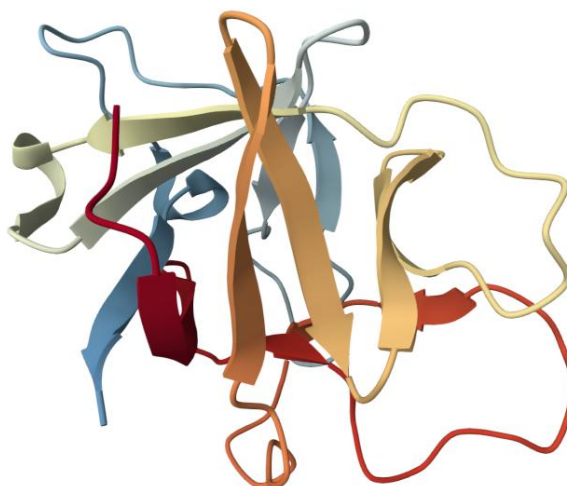
Espécies do gênero *Ganoderma* como *G. lucidum*, *G. adspersum*, *G. capense* e *G. applanatum* já são relatados com a capacidade de sintetizar lectinas com grande variação de massa molecular (18-126 kDa), alta especificidade por diferentes carboidratos e estabilidade frente às diferentes condições de temperatura e pH (Li et al., 2019). Adicionalmente, além da atividade hemaglutinante, as lectinas de *Ganoderma* são relatadas por apresentar potencial imunomodulador e têm sido estudadas quanto às suas propriedades antivirais, anticâncer e antimicrobiana, bem como na modulação do sistema imune no tratamento de diversas doenças (Karunarathna et al., 2025).

A síntese dessas proteínas é extremamente dependente dos substratos, fase de crescimento e modo em que os cogumelos são cultivados (Davitashvili et al., 2008). Nesse contexto, a recuperação de lectinas da biomassa micelial obtida a partir do cultivo submerso é mais promissora em comparação ao basidioma, permitindo o controle do processo e a utilização de técnicas de indução da sua síntese (Nikitina; Loshchinina; Vetchinkina, 2017). À exemplo disso, Kumaran et al., (2017) conseguiram obter um alto rendimento de uma lectina de *G. applanatum* ao otimizar o meio de cultura líquido.

2.2.3. Inibidores de proteases

Inibidores de Proteases (IPs) (Figura 5) são proteínas encontradas em diversos organismos vivos, como animais, plantas e microrganismos, nos quais atuam na regulação da atividade de enzimas proteolíticas, prevenindo a proteólise indesejada (Cotabarren et al., 2020). Essas proteínas são classificadas, principalmente, quanto aos resíduos de aminoácidos que compõem o seu sítio ativo, como os inibidores de serinoproteases, cisteinoproteases etc. (Singh et al., 2020).

Figura 5 – Inibidor de protease de *Coprinopsis cinerea*.



Fonte: Protein data bank (PDB)

Os IPs também podem ser classificados em famílias, conforme a sua sequência de aminoácidos (estrutura primária), ou clãs, segundo a sua estrutura tridimensional (estrutura terciária) (Rawlings et al., 2018). Entre esses, as famílias serpinas, fitocistatinas, inibidores do tipo Kunitz (KTIs), inibidores de Bowman-Birk (BBIs), inibidores bifuncionais de α -amilase-tripsina etc. têm ganhado destaque devido ao potencial de aplicação no tratamento do câncer, patologias neurodegenerativas e distúrbios autoimunes (Gitlin-Domagalska; Maciejewska; Dębowski, 2020).

Os IPs têm sido descritos nos processos de reparação tecidual, defesa contra infecção, coagulação sanguínea, câncer, epilepsia, dentre outras condições patológicas, garantindo uma vasta aplicação no campo da biotecnologia (Shamsi; Parveen; Fatima, 2016). Além disso, considerando que essas proteínas possuem, em geral, alto conteúdo de resíduos de cisteína, na forma de pontes de dissulfeto, observa-se uma alta resistência ao tratamento térmico, às condições de pHs extremos, forças iônicas e proteólise, favorecendo sua aplicação industrial (Cotabarren et al., 2020).

Novos IPs têm sido descobertos a partir de fontes microbianas, como bactérias e fungos, cuja atenção deve-se, principalmente, à maior facilidade de recuperação dessas proteínas, em comparação a outros organismos (Dunaevsky et al., 2014). Além disso, os fungos, de maneira singular, representam uma fonte enorme e pouco explorada de inibidores de proteases que, apesar da versatilidade, características únicas e novos mecanismos inibitórios, apresenta apenas uma pequena parcela de IPs caracterizados (Sabotič; Kos, 2015).

Em cogumelos, os IPs, assim como as lectinas, são descritos como proteínas que participam do sistema de defesa inato contra predadores e parasitas (Sabotić; Ohm; Künzler, 2016). Nesses organismos, é relatada, de forma predominante, a presença de inibidores do tipo Kunitz, que pertencem ao grupo das micosporinas e apresentam massa molecular estimada em cerca de 16 kDa (Burchacka; Pięta; Łupicka-Słowik, 2022).

Um inibidor de proteinase aspártica, com alta atividade de inibição frente à proteinase A, foi isolado do caldo fermentado de *G. lucidum*, sendo uma glicoproteína com massa molecular de 38 kDa e alta estabilidade térmica, reportada como possuindo alto potencial como estabilizante na indústria alimentícia (Tian; Zhang, 2005). Ademais, inibidores de serino (tripsina e quimotripsina) e cisteínoproteases (papaína) também são descritos na literatura científica como presentes na biomassa micelial e basidiomas de *G. sichuanense* e do isolado amazônico de *Ganoderma* sp. 1962, cujo potencial aplicação farmacológica é destacada pelos autores (Chevreuil et al., 2025; Pessoa et al., 2023).

2.2.4. Enzimas antioxidantes

Além das proteínas que exercem atividade antioxidante por meio de mecanismos inespecíficos, existem as proteínas antioxidantes de caráter enzimático, que atuam através de mecanismos específicos, como superóxido dismutases (SOD), catalases (CAT), peroxidases (POD) e glutathione peroxidases (GPx) (Pour-Aboughadareh et al., 2020). Essas enzimas são produzidas por diversos organismos, já sendo relatadas em cogumelos como *G. lucidum* e *G. applanatum* (Nimse; Pal, 2015).

SOD é uma metaloenzima considerada como o antioxidante enzimático mais efetivo, pois, na presença excessiva do ânion superóxido altamente reativo ($O_2^{\bullet-}$), promove a conversão deste em peróxido de hidrogênio menos agressivo ($2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$), configurando-se como um agente citoprotetor frente aos efeitos tóxicos decorrentes de EROs. Com base nisso, na sequência, as enzimas CAT, POD e GPx podem atuar decompondo-o à água e oxigênio ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) (Demirci-Çekiç et al., 2022; Huang et al., 2023).

Estudos sobre a suplementação de SOD por diferentes vias de administração têm demonstrado, através de modelos celulares e animais, sua capacidade de atuação frente à diferentes condições patológicas, aumentando a defesa antioxidante do organismo e apresentando efeito citoprotetor frente à apoptose induzida quimicamente, contribuindo, assim, para a mitigação de processos inflamatórios (Stephenie et al., 2020). Já a administração de CAT, conforme relatado em estudos com modelos animais, demonstrou

capacidade de aumentar a defesa antioxidante tanto da mãe quanto do feto, além de diminuir a taxa de restrição de crescimento intrauterino (RCIU) (Guo et al., 2022).

Em ratos hiperlipidêmicos expostos à radiação gama, a suplementação com peroxidases foi capaz de melhorar distúrbios na glicose, perfil lipídico sérico, atividade de transaminases, amenizar reduções nos níveis de proteínas totais e albumina, além de normalizar alterações histopatológicas dos tecidos renais e hepáticos (Hanafy; Mansour; Hedayat, 2006). Assim, ressalta-se a atividade indispensável dessas enzimas, sendo a suplementação proveniente de fontes exógenas considerada uma *trend* no combate aos efeitos do estresse oxidativo no corpo humano (Bratovcic, 2020).

É importante ressaltar que, a produção dessas enzimas é dependente do aumento nas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, decorrente de estresses bióticos ou abiótico, que levam a alterações na expressão de genes relacionados ao sistema de defesa (Espinosa-Vellarino et al., 2024). Assim, diversas estratégias têm sido avaliadas visando elucidar os mecanismos responsáveis pela resposta fúngica em condições de estresse oxidativo (Chen et al., 2024).

À exemplo disso, Wang et al., (2011) relatam a produção das enzimas CAT e SOD por *G. lucidum*, com variações de atividade dependendo da qualidade de luz empregada durante o seu crescimento micelial. Maciel et al., (2013) relatam também a variação na atividade de CAT e SOD após exposição da biomassa micelial de *G. lucidum* ao herbicida Picloram. Guo et al., (2016), por sua vez, relatam uma maior expressão das enzimas CAT, SOD e POD após exposição da biomassa micelial de *G. lucidum* a cádmio.

2.2.5. Proteínas de choque térmico

Proteínas de choque térmico, do inglês *Heat-Shock Proteins* (HSP), ou também chamadas proteínas de estresse, são sintetizadas por todos os organismos e em todos os tipos celulares, sendo abundantes e altamente conservadas (Hagymasi; Dempsey; Srivastava, 2022). Essas proteínas são indispensáveis aos organismos e apresentam como característica serem redox-sensíveis, com sua expressão regulada por variações ambientais, como estresse oxidativo, choque térmico, radiação UV, metais pesados etc. (Agnew; Watson, 2006).

Em condições fisiológicas, as HSPs estão envolvidas em diversos processos biológicos, dentre os quais têm-se o dobramento e tráfego de proteínas, montagem e desmontagem de complexos proteicos, dentre outros, desempenhando, portando, um papel crucial na proteostase corporal (Zininga; Ramatsui; Shonhai, 2018). Em condições

de estresse ambiental, a síntese das HSPs é altamente regulada de forma positiva, uma vez que atuam protegendo as células contra danos letais e evitando a propagação do dano (Multhoff; Hightower, 2011).

As HSPs são classificadas 6 famílias diferentes com base em sua massa molecular, apresentando vários membros com alta similaridade em suas sequências, sendo elas: 1) HSPs pequenas (sHSPs), com massa molecular de 12 a 40 kDa; 2) HSP40; 3) HSP60; 4) HSP70; 5) HSP90; e 6) HSPs grandes, com 100 à 110 kDa (Bolhassani; Rafati, 2008). Nesse contexto, estudos têm relacionado o tamanho à sua localização nos compartimentos celulares, sendo que os que apresentam menor massa (sHSP e HSP40) são predominantemente encontrados no citosol, ao passo que as de maior dimensão podem ser localizadas também no retículo endoplasmático e mitocôndria (Colaco et al., 2013).

Além da massa molecular e localização celular, diferenças quanto à estrutura também são observadas. Por exemplo, as HSP70 apresentam-se, em sua maioria, na forma de um monômero, as HSP90 como um homodímero e as HSP60 com dois anéis heptaméricos empilhados, que formam uma cavidade para o dobramento de proteínas (Moyle, 2017). As sHSPs, em particular, compartilham uma estrutura comum, composta de três regiões, o domínio α -cristalino (ACD), uma região N-terminal flexível e não conservada (NTR), e uma região C-terminal. O ACD geralmente apresenta uma dobra β -sanduíche semelhante à imunoglobulina (Dahiya; Buchner, 2019).

Essas proteínas possuem caráter intracelular, porém, em situações específicas, podem ser liberadas para o ambiente extracelular. Nesse contexto, exercem funções relevantes em mecanismos imunológicos, como a indução de respostas pró-inflamatórias e a apresentação de antígenos intracelulares às células do sistema imune, atuando como mediadoras na ativação das células apresentadoras de antígenos (Calderwood; Gong; Murshid, 2016). Dessa forma, embora seja uma classe de proteínas altamente conservada ao longo da evolução, a similaridade estrutural das HSPs não implica, necessariamente, em funções similares em diferentes organismos (Tutar; Tutar, 2010).

HSPs produzidas por fontes microbianas, com destaque para as sHSPs, são descritas por apresentarem diversas aplicabilidades biotecnológicas, uma vez que são capazes de atuar sobre diversos substratos, sem depender necessariamente de ATP (adenosina trifosfato) ou cofatores, podendo aumentar a estabilidade e melhorar a qualidade de produtos proteicos (Guzzo, 2012). Assim, representam uma alternativa

promissora para o desenvolvimento de processos e/ou produtos nas áreas de proteômicas, nanobiotecnologia e bioprocessos (Han; Yun; Lee, 2008).

Estudos de transcriptômica e proteômica de cogumelos têm demonstrado a hiperexpressão de HSPs em condições de estresse, indicando que desempenham um papel vital na sua sobrevivência em condições adversas (Luo et al., 2021). Tal como Zhang et al., (2016), ao avaliar a resposta do micélio de *G. lucidum* após exposição a 42 °C, verificaram um aumento na expressão de HSP17,4 e HSP22, principalmente, além de HSP70 e HSP90, em menor quantidade.

Resultados semelhantes foram encontrados por Liu et al., (2017) ao analisar a biomassa micelial de *G. lucidum* exposta à 42 °C, após 5 dias de fermentação, indicando ser uma espécie modelo para o estudo de mudanças ambientais e como estas regulam o crescimento e desenvolvimento de basidiomicetos. Liu et al., (2018) descrevem que, durante o estresse térmico, ocorre a geração de espécies reativas de oxigênio que atuam como mediadores na expressão de HSPs, na biossíntese de ácido ganodérico e levam a mudanças na ramificação das hifas.

Cai et al., (2023) avaliaram a expressão de proteínas por *G. lingzhi* após estresse térmico e identificaram 34 chaperonas, incluindo seis HPS20s, sete HSP70s e duas HSP90s, sendo as HPS20s as mais responsivas ao calor. Wang et al., (2023), por sua vez, relatam que as HSPs desempenham papel fundamental na resposta de *G. lingzhi* à infecção por *Trichoderma hengshanicum*, cuja regulação negativa aumenta a suscetibilidade por parte do *Ganoderma*, compondo, assim, uma via de defesa importante.

2.2.6. Potencial de mercado das proteínas bioativas de cogumelos

Relatórios de mercado têm destacado o crescimento do mercado de cogumelo medicinais, com um aumento estimado de US\$ 5,94 bilhões, com CAGR de 9,96% de 2022 a 2027 (Martinez-Burgos et al., 2024). Nesse contexto, destacam-se os produtos à base de Reishi (*Ganoderma sichuanense* = *G. lingzhi*), além dos fármacos à base de cogumelos já disponíveis comercialmente, como coriolanas, krestinas, letinanas, schizophyllanas, dentre outros (Niego et al., 2021).

A produção anual da indústria de *Ganoderma* é estimada em US\$ 2,5 bilhões, além do grande interesse por parte da pesquisa acadêmica (Zhou et al., 2024). Desse montante, apenas 15-20% do total do mercado é referente a produtos à base de biomassa micelial ou caldo fermentado de *Ganoderma* (Matijašević; Sknepnek, 2024).

Entre as formas de comercialização de produtos à base de *Ganoderma*, encontram-se cápsulas, chás, comprimidos, líquidos de ingestão oral, extratos alcoólicos e aquosos, além da vasta utilização em cosméticos, como hidratantes, máscaras, bases líquidas ou em pó, xampus, cremes reparadores de pele e protetores solares (Galappaththi et al., 2024; Swallah et al., 2023). Nesse sentido, os compostos bioativos de *Ganoderma* estão entre os mais requisitados no mercado global contemporâneo (Kozarski; Vunduk, 2024).

2.3.Complexos proteína-metabólitos

Em sistemas biológico, interação moleculares das proteínas com proteínas distintas, lipídeos, ácidos nucleicos, compostos fenólicos, carboidratos e/ou outra moléculas de baixa massa molecular também é um fator determinante na modulação da sua atividade (Morris; Black; Stollar, 2022). Dessa forma, análises envolvendo proteínas tornam-se complexas devido à contaminação com compostos fenólicos, terpenos, pigmentos, carboidratos e outras substâncias (Wu et al., 2014).

2.3.1. Complexos proteína-fenol

Compostos fenólicos são capazes de formar ligações reversíveis ou irreversíveis com proteínas, devido ao fato de serem facilmente oxidados, uma vez que são excelentes doadores de prótons, formando ligações de hidrogênio com o grupo carboxila das proteínas. Contudo, uma alta afinidade entre um composto fenólico e uma proteína só é observado se ele for pequeno o suficiente para penetrar as regiões interfibrilares das proteínas e grande o suficiente para formar redes de ligação em mais de um ponto da cadeia peptídica (Ozdal; Capanoglu; Altay, 2013).

A interação química entre proteínas e compostos fenólicos pode ser mediada por meio de ligações não-covalentes incluindo pontes de hidrogênio, ligações de van der Waals e interações iônicas hidrofóbicas, caracterizando ligações fracas e de caráter reversível que são posteriormente estabilizadas por ligações de hidrogênio (Jakobek, 2015). Contudo, ligações covalentes também podem ocorrer, levando ao *crosslinking* proteico. Nesses casos, fatores como o tipo de composto fenólico, tipo de proteína, pH e temperatura podem influenciar na formação das ligações (Li et al., 2021).

A formação de complexos proteína-fenol pode levar a modificações nas propriedades funcionais e fisiológicas das proteínas, incluindo capacidade antioxidante dessas moléculas, podendo ocorrer o aumento ou a diminuição dessa atividade, além dos possíveis efeitos sinérgicos (Guan et al., 2021). Além disso, as propriedades de

processamento, como solubilidade, emulsificação, gelificação e alergenicidade podem ser alteradas, em comparação à proteína nativa, levando os complexos proteína-fenol a receberem mais atenção nos últimos anos (Schild et al., 2023).

Em estudos envolvendo as propriedades funcionais destes complexos é relatado que os compostos fenólicos servem como uma barreira química, evitando a ação direta de oxidantes sobre os aminoácidos, bem como uma barreira física, aumentando a estabilidade da cadeia (Lin et al., 2023). No que diz respeito à atividade antioxidante, a interação proteína-fenol pode mascarar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos, permitindo associar a atividade antioxidante às proteínas ou às propriedades decorrentes da formação do complexo (Jakobek, 2015).

2.3.2. Complexos proteína-carboidratos

No contexto da indústria farmacêutica, proteínas terapêuticas apresentam um desafio quanto à manutenção da sua estabilidade em períodos prolongados, principalmente no caso de formulações líquidas que necessitam de refrigeração (2–8 °C) durante o transporte e armazenamento. Dentre as estratégias empregadas, a secagem de proteínas na presença de açúcares, através de técnicas como a liofilização, tem se destacado, uma vez que aumentam a sua estabilidade, protegendo contra desidratação, congelamento e estresse térmico (Mensink et al., 2017).

A glicosilação enzimática ocorre naturalmente em meios contendo altas concentrações de açúcares redutores, resultando na modificação de proteínas durante o processo de produção, extração e armazenamento, sendo observada tanto em formulações líquidas quanto liofilizadas de proteínas terapêuticas (Zhang et al., 2009). Esse processo resulta em alterações na carga, na capacidade de interação com alvo e nas taxas de degradação das proteínas e, conseqüentemente, modifica a atividade biológica dessas moléculas (Quan et al., 2008).

A formação desses complexos inicia com uma reação de condensação do grupo carbonila dos açúcares redutores com grupos amina dos aminoácidos, o qual é desprotonado, formando uma N-glicosilamina e liberando uma molécula de água. Essa reação ocorre mais comumente no grupo ϵ -amino de resíduos de lisina, contudo, também podem ocorrer, em menor extensão, nos grupos imidazol dos resíduos de histidina, indol dos resíduos de triptofano e guanidil dos resíduos de argininas (Oliveira et al., 2016).

A formação de ligações covalentes entre essas classes de moléculas compreende apenas a fase inicial do que é conhecido como reação de Maillard, a qual, dependendo

das condições da reação, pode progredir até a formação das melanoidinas (polímeros nitrogenados ou co-polímeros de coloração marrom) em sua fase final (Wang; Qian; Yao, 2011). Essa classe de moléculas tem sido associada a uma variedade de atividades biológicas, incluindo antiobesidade, antibacteriana, moduladora da microbiota intestinal e antioxidante, com destaque para sua habilidade quelante, sendo considerada, portanto, um ingrediente funcional e o futuro dos nutracêuticos (Shaheen et al., 2022).

2.4. Fermentação submersa de cogumelos visando a produção de proteínas

O cultivo submerso, também chamado de fermentação submersa, pode ser definido como o processo de crescimento de microrganismos na presença de água, utilizando um substrato líquido contendo fontes de carbono, nitrogênio e micronutrientes (Majumder et al., 2024). Essa técnica de cultivo destaca-se por possibilitar um alto controle sobre os parâmetros de cultivo, como o teor de oxigênio dissolvido, pH, temperatura, dentre outras variáveis, possibilitando a obtenção de altas concentrações do produto desejado, favorecendo sua aplicação em escala industrial (Sun; Shahrajabian; Lin, 2022).

Devido ao controle dos parâmetros de cultivo, esta técnica tem se destacado em relação à produção de basidiomas por cultivo sólido, principalmente no âmbito da obtenção de compostos bioativos a partir desses cogumelos (Bakratsas et al., 2023). Dentre os fatores que contribuem para a sua utilização, tem-se a incorporação de componentes específicos no meio de cultura e a expressiva diminuição do tempo de cultivo, além do aumento no rendimento de biomassa micelial e compostos bioativos quando em condições otimizadas (Lu et al., 2020).

Espécies do gênero *Ganoderma*, por exemplo, são raramente encontradas na natureza e os indivíduos encontrados não são o suficiente para cobrir as necessidades comerciais, necessitando do desenvolvimento de novos métodos de cultivo que atendam às demandas de mercado (Hassan; Al-Qiassi, 2022; Rahangdale; Wankhade, 2023). Nesse contexto, a produção de biomassa micelial de *Ganoderma* em fermentação submersa é uma alternativa para suprir as necessidades do mercado, onde a definição de condições de cultivo é um fator determinante no aumento de escalas de produção (Hsu; Cheng, 2018).

2.4.1. Parâmetros que afetam o crescimento fúngico e a síntese de proteínas

O cultivo submerso de macrofungos pode ser afetado por diversos parâmetros como nutrientes que compõem o meio de cultura, temperatura, pH, taxa de aeração,

volume de inóculo, forças de cisalhamento, dentre outros (Hamza et al., 2024). Esses parâmetros devem proporcionar condições bioquímicas e físico-químicas para que a fermentação seja favorável à síntese de produtos de interesse, seja a própria biomassa ou metabólitos específicos (Rosales-López et al., 2022).

A fonte de carbono nos meios de cultura, presente na forma de carboidratos, ácidos orgânicos, lipídeos, entre outros, é crucial para o crescimento celular e a eficiência na síntese de produtos microbianos, sendo a glicose a preferida pela maioria dos microrganismos (Ma et al., 2024). A eficiência do cultivo de cogumelos, como *Ganoderma lucidum*, em fermentação submersa utilizando glicose como fonte de carbono já é relatada, com concentração desse nutriente sendo responsável por variações na síntese de moléculas como triterpenoides, polissacarídeos e proteínas (Fang; Zhong, 2002; Pessoa et al., 2023).

A fonte de nitrogênio, por sua vez, pode ser de origem orgânica, como peptona e extrato de levedura, ou inorgânica, como cloreto e sulfato de amônio, impactando diretamente no crescimento microbiano e produção de metabólitos (Shi et al., 2015). O tipo e concentração desse nutriente também é um fator decisivo na produção de biomassa e moléculas como polissacarídeos, triterpenos e proteínas durante a fermentação submersa de espécie de *Ganoderma* (Feng et al., 2019; Pessoa et al., 2023; Suberu et al., 2013).

No cultivo submerso, a agitação é utilizada como um mecanismo de transferência de massa de oxigênio, além de atuar na homogeneização de nutrientes presentes no meio de cultura, promovendo o balanço entre o teor de O₂ dissolvido e o metabolizado (Scargiali et al., 2014). Em sistemas onde o controle de taxas de aeração não é possível, a agitação é responsável também pela dissolução de CO₂ acumulado durante o metabolismo microbiano, evitando o aumento da pressão hidrostática e alterações metabólicas (Amanullah; Buckland; Ninos, 2003).

A agitação também impacta significativamente na morfologia, crescimento e produtos formados, uma vez que gera forças de cisalhamento que afetam a estrutura das hifas fúngicas, podendo levar à diferentes respostas fisiológicas (Dudekula; Doriya; Devarai, 2020). Devido as forças mecânicas geradas pela agitação, o micélio frequentemente apresenta crescimento esférico, formando aglomerados e/ou *pellet*, que podem apresentar variações de tamanho em decorrência das condições reológicas no meio de cultivo. Além disso, à medida que o tamanho dos *pellets* aumenta, a difusão de

nutrientes e oxigênio para o centro dos *pellets* pode tornar-se restrito (Berovic; Podgornik, 2019).

Em cultivos estáticos, devido à concentração de CO₂ no ambiente, o micélio tende a formar uma fina camada de hifas sobre o substrato em busca de oxigênio, tornando-se mais vigoroso ao longo do período de cultivo. Assim, a transferência de massa de oxigênio ocorre apenas na superfície livre do fermentador (Scargiali et al., 2014; Whabi; Yu; Xu, 2024). Embora essa condição seja restritiva para o suporte respiratório fúngico, estudos com *G. lucidum* relatam que o cultivo estático possui potencial igual ao cultivo agitado para a produção de biomassa, além de possibilitar um material rico em proteína, em comparação ao cultivo sob agitação, possivelmente devido à ausência de forças de cisalhamento que levam ao extravasamento do conteúdo celular (Kachrimanidou et al., 2023; Pessoa et al., 2023).

Parâmetros de fermentação, como idade e quantidade do inóculo, componentes do meio de cultivo, adição de componentes exógenos, oxigênio dissolvido, velocidade e tipo de agitação, pH, temperatura etc., podem afetar a formação de *pellets* e a morfologia fúngica (Lu et al., 2024). A morfologia fúngica em fermentação submersa é frequentemente classificada em: (1) micélios dispersos com filamentos curtos, (2) micélios algodonosos com rede micelial difusa, (3) agregados miceliais em padrão entrelaçados, (4) crescimento peletizado com centro compacto e superfície peluda, e (5) *pellet* compacto com estrutura esférica nítida e superfície externa lisa (El Enshasy, 2022).

As diferentes morfologias podem influenciar também o processo de cultivo, uma vez que alteram a viscosidade do caldo de cultivo e, conseqüentemente, a homogeneização dos seus componentes, podendo acarretar maiores custos no processo *downstream* (Böl et al., 2021). Portanto, a análise da morfologia se torna de grande importância em bioprocessos, uma vez que a síntese dos produtos de fermentação, seja a própria biomassa ou biomoléculas específicas, estão intrinsecamente relacionadas a uma morfologia fúngica específica (Kelly et al., 2006). Em decorrência disso, a área denominada engenharia morfológica tem emergido como uma tendência em bioprocessos, estabelecendo conexões entre diferentes áreas de conhecimento (Meyer et al., 2021).

2.4.2. Cultivo submerso em condições de estresse

A fermentação submersa, por si só, caracteriza-se como uma condição de cultivo estressante para os fungos, uma vez que são organismos altamente aeróbicos na natureza

e, conseqüentemente, podem ser exigentes quanto aos níveis de oxigênio (Li *et al.*, 2011). Durante esse processo, a agitação é responsável pelo aumento do oxigênio dissolvido no microambiente (El-Enshasy, 2007) e a ausência desse mecanismo, no caso de culturas estáticas, pode levar ao acúmulo de espécie reativas de oxigênio advindas do próprio metabolismo (Bai; Harvey; McNeil, 2003).

Pesquisas com cultivo fúngico em estresse oxidativo tem sido associado a maior atividade proteolítica e acúmulo de proteínas na biomassa (Li; Harvey; McNeil, 2009). No cultivo estático de *G. lucidum*, por exemplo, a oxigenação é um fator de grande importância e a geração de EROS durante a fermentação leva à indução da expressão de genes das vias de biossíntese de moléculas antioxidantes (Zhang; Tang; Zhong, 2010). Da mesma forma, o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) no cultivo submerso dos macrofungos *Antrodia camphorata* e *A. cinnamomea*, tem se mostrado como uma alternativa para o aumento da produção de metabólitos de interesse farmacológico (Hu et al., 2020; Xia et al., 2017).

A tensão de cisalhamento, intrínseca ao cultivo submerso sob agitação e/ou aeração, também se caracteriza como uma condição de estresse para o fungo, afetando características morfológicas, como o comprimento da hifa e o tamanho e a forma dos *pellets* (Kelly et al., 2006). Em decorrência dessas condições particulares do cultivo submerso, o metabolismo fúngico é alterado de modo a possibilitar o acesso às proteínas pouco ou mesmo não-expressas nos basidiomas, como relatado em trabalhos com *G. lucidum*, nos quais foram observadas bandas proteicas nos caldos fermentados e biomassa miceliais que não eram presentes no basidioma de uma mesma linhagem (Sa-ard et al., 2015; Sarnthima; Khammaung; Sa-ard, 2017).

A modulação do metabolismo fúngico em resposta às condições de cultivo surge como uma abordagem promissora para a síntese de novas moléculas de interesse industrial. Assim, em vez de recorrer ao enriquecimento do meio com componentes específicos e que encarecem o processo, esse processo permite que o uso de meios basais de cultivo seja suficiente, estimulando a produção dos compostos de interesse como resultado das respostas de defesa do microrganismo (Arshadi; Nouri; Moghimi, 2023; Dudekula; Doriya; Devarai, 2020; Pham et al., 2019).

Outras condições de estresse abiótico incluem o estresse salino, o qual acarreta o desbalanço na homeostase osmótica e, em virtude disso, pode afetar o desenvolvimento de diversos organismos, como os cogumelos basidiomicetos, os quais apresentam alta sensibilidade frente ao cloreto de sódio (NaCl) (Pyeon et al., 2022). Essa condição é

descrita como limitante ao crescimento fúngico de *G. lucidum*, cuja concentração de 0,2 M de NaCl é capaz de inibir o desenvolvimento micelial em, aproximadamente, 34,3% (Qiao et al., 2023).

É importante ressaltar que a adição de sais em baixas concentrações tem se mostrado uma estratégia eficiente na indução de produtos da fermentação, como no trabalho de Mahmoud, Mohamed e Abd Elzaher (2007), no qual ao cultivo de *G. resinaceum* em fermentação submersa estática, utilizando meio GYP (Glicose, Extrato de levedura e Peptona) suplementado com 35 mM de NaCl, obteve um aumento na produção de biomassa fúngica, sem impactos negativos no seu teor proteico. Xu, Xia e Zhong (2013), por sua vez, descreveram que a suplementação com 100 mM de NaCl no início do cultivo é capaz de aumentar a produção de ácidos ganodéricos por *G. lucidum* cultivado em fermentação submersa estática, sem impactar a produção de biomassa, sendo uma estratégia simples e eficiente para a obtenção dessas moléculas.

O estresse térmico é o fator abiótico mais preocupante, devido aos seus impactos negativos na integridade da membrana celular, estabilidade proteica, reações enzimáticas e estrutura citoesquelética, inibindo o crescimento micelial e a ramificação das hifas (Liu et al., 2017). A resposta fúngica à essa condição envolve a síntese de diversas moléculas que atuam como um sistema de proteção, geralmente atuando em conjunto com enzimas essenciais, mantendo-as funcionais (Tan et al., 2018).

O estresse senescente é outra condição que pode ser observada durante a fermentação submersa fúngica, especialmente quando se utiliza meios de cultura simples por longos períodos de incubação (Dias et al., 2021). A limitação no conteúdo de nutrientes atua como um fator que favorece a síntese de diferentes metabólitos, com destaque para os antioxidantes (Chakraborty; Majumdar; Bhowal, 2021). Essa condição leva também ao acúmulo de diversas moléculas no micélio, o que não ocorreria em condições fisiológicas normais, e, por conta disso, tem sido considerada promissora como fonte de biomassas ricas em proteínas (Hameed et al., 2017).

Em cogumelos, a restrição nutricional tem sido relatada como um mecanismo de indução do desenvolvimento micelial e, no caso do cultivo sólido, desencadeamento da frutificação (Letti et al., 2018). Essa condição estimula fatores de transcrição associados à escassez de nutrientes, regulando positivamente genes biossintéticos de aminoácidos, transportadores de aminoácidos, aminoacil-tRNA sintetase e proteínas transportadoras, de forma a modular a homeostase nutricional e, através da via de sinalização de EROs, aumenta a expressão de antioxidantes em *G. lucidum* (Lian et al., 2021). Diante do

supracitado, estudos visando o emprego de condições estressantes torna-se promissor para aumento no rendimento de produtos de interesse biotecnológico, particularmente proteínas e antioxidantes.

2.5. Proteínas de cogumelos como candidatas terapêuticas em infecções virais

Nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado o potencial terapêutico de proteínas de cogumelos no contexto de infecções virais. À exemplo disso, destaca-se a proteína imunomoduladora fúngica isolada de *Ganoderma microsporum* (FIP-gmi) descrita como um antiviral de amplo espectro por apresentar atividade frente a diferentes cepas do vírus Epstein–Barr (EBV) em células epiteliais e linfócitos B primários. Efeito esse que está relacionado à capacidade da proteína de se ligar ao receptor epitelial EphA2, interrompendo a fusão viral, mecanismo que também foi demonstrado frente ao vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e ao coronavírus da síndrome respiratória aguda grave tipo 2 (SARS-CoV-2) (Ho et al., 2022; Vo et al., 2025).

Lectinas de diversos cogumelos comestíveis e medicinais também apresentam atividade antiviral, atuando principalmente pela inibição de enzimas virais, como a transcriptase reversa (RT) do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1), e pela ligação a glicanos presentes nas glicoproteínas do envelope viral, bloqueando o reconhecimento de receptores e correceptores envolvidos na adesão e entrada do vírus nas células hospedeiras. Além da ação antiviral direta, algumas lectinas, como as isoladas de *Pleurotus ostreatus*, exercem atividade imunomoduladora e podem atuar como adjuvantes vacinais, estimulando células apresentadoras de antígenos, linfócitos T e B e aumentando a produção de anticorpos específicos, potencializando as respostas imune humoral e celular às vacinas (El-Maradny et al., 2021; Seo; Choi, 2021; Zhang; Zhang; Ling, 2022).

Enzimas oxidativas também tem apresentado atividade antiviral em modelos *in vitro*. À exemplo disso, uma lacase de 58 kDa isolada de *Pleurotus ostreatus* foi capaz de inibir tanto a entrada quanto a replicação do HCV (M EL-Fakharany et al., 2010). Da mesma forma, um extrato semipurificado rico em tirosinase obtido de *Agaricus bisporus* também inibiu a replicação do HCV em modelos celulares (Lopez-Tejedor et al., 2021). Além disso, extratos enriquecidos em lacases de *Lentinus* sp. e *Ganoderma* sp. interferiram no ciclo replicativo do HIV-1 por meio da inibição da transcriptase reversa, apresentando atividade semelhante à observada para a azidotimidina (AZT) (Flórez-Sampedro et al., 2016).

Além da atividade antiviral direta, proteínas de cogumelos podem contribuir para o controle de infecções virais por meio da modulação da resposta imune, estimulando células efectoras, como macrófagos, células *natural killer* e linfócitos T e B, além de regular a produção de citocinas e ativar vias de sinalização inflamatórias e antioxidantes. Nesse contexto, FIPs e lectinas destacam-se por induzir a produção de citocinas como interferon gama (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Além disso, as FIPs podem modular a resposta imune de maneira dependente do contexto, promovendo perfis de resposta Th1 ou Th2 (Drzewiecka et al., 2024).

No contexto do câncer, incluindo leucemias, proteínas de cogumelos podem induzir apoptose, inibir a síntese proteica por meio da interação com RNA e ribossomos, bloquear o ciclo celular e modular vias inflamatórias e de sobrevivência celular (Rezvani et al., 2020). Considerando essas propriedades, proteínas de cogumelos surgem como candidatas promissoras para investigação no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra oncovírus, como o vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1.

2.6. Vírus Linfotrópico de Células T Humanas tipo 1 (HTLV-1)

O Vírus Linfotrópico de Células T Humanas (HTLV) é um retrovírus, que apresenta em sua estrutura um genoma composto de 2 cópias idênticas de RNA de fita simples, além das enzimas: transcriptase reversa, que transcreve sua sequência de RNA em DNA; integrase, que insere as sequências virais no genoma da célula hospedeira; e protease, que atua na maturação de proteínas virais estruturais e funcionais (Kassay et al., 2021; Pluta; Jaworski; Douville, 2020). Atualmente, são conhecidos 4 diferentes tipos distintos desse vírus, identificados como HTLV-1, -2, -3 e -4, os quais estão taxonomicamente incluídos na família Retroviridae, subfamília Orthoretrovirinae e gênero (Vallinoto et al., 2022).

Os tipos de HTLV mais investigados são o HTLV-1, que apresenta maior patogenicidade, e o HTLV-2, que é menos frequentemente associado a patologias. Ambos compartilham cerca de 70% das sequências de nucleotídeos do seu material genético, possuindo uma estrutura de genoma similar (Martinez; Al-Saleem; Green, 2019). O HTLV-3 e HTLV-4 também possuem similaridades genéticas com o HTLV-1 e HTLV-2, no entanto, não têm sido associados a patologias, sendo, portanto, menos estudados (Larocque et al., 2011). Entretanto, análises de reconstrução genômica sugerem que esses vírus também produzam partículas virulentas e, portanto, seu potencial patogênico não deve ser totalmente negligenciado (Moin et al., 2023).

HTLV-1 é o agente etiológico da leucemia-linfoma de células T do adulto (ATLL), uma condição oncológica com baixa expectativa de recuperação, e da mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), um distúrbio neurodegenerativo de progressão crônica (Ramezani et al., 2022). Adicionalmente, a infecção por esse vírus também tem sido associada às doenças inflamatórias, como a uveíte, dermatite infecciosa, encefalite, e alterações pulmonares, intestinais, urinárias, disfunção erétil e distúrbios psicológicos, além de repercussão prejudicial em casos de coinfeção (Rosadas et al., 2023a).

Atualmente, sabe-se também que o impacto da infecção pelo HTLV-1 vai além de suas doenças associadas, uma vez que pode elevar a mortalidade por todas as causas, aumentando o risco de condições crônicas como, por exemplo, doenças renais e diabetes (Rosadas; Taylor, 2022). Nesse contexto, uma investigação conduzida a pedido da Organização Mundial da Saúde (OMS) descreve que o risco de morte em pessoas que vivem com o HTLV-1 aumenta em 57%, em comparação com a população HTLV-1 negativa (Schierhout et al., 2020).

2.6.1. Histórico

O HTLV-1 foi evidenciado, inicialmente, em 1979 nos Estados Unidos, a partir da descoberta da presença de partículas retrovirais em uma linhagem de células T provenientes de um paciente cujas manifestações clínicas eram, na época, associadas ao linfoma cutâneo de células T (LCCT), à micose fungoide ou à síndrome de Sézary, conforme particularidades clínicas (Gallo, 2005). Estudos remontam sua origem à África, sugerindo ser uma zoonose que se originou a partir da transmissão do Vírus Linfotrópico de Células T Símiatipo 1 (STLV-1) por primatas não humanos, como chimpanzés, mandris, gorilas e macacos nativos da região (Gessain, 2011).

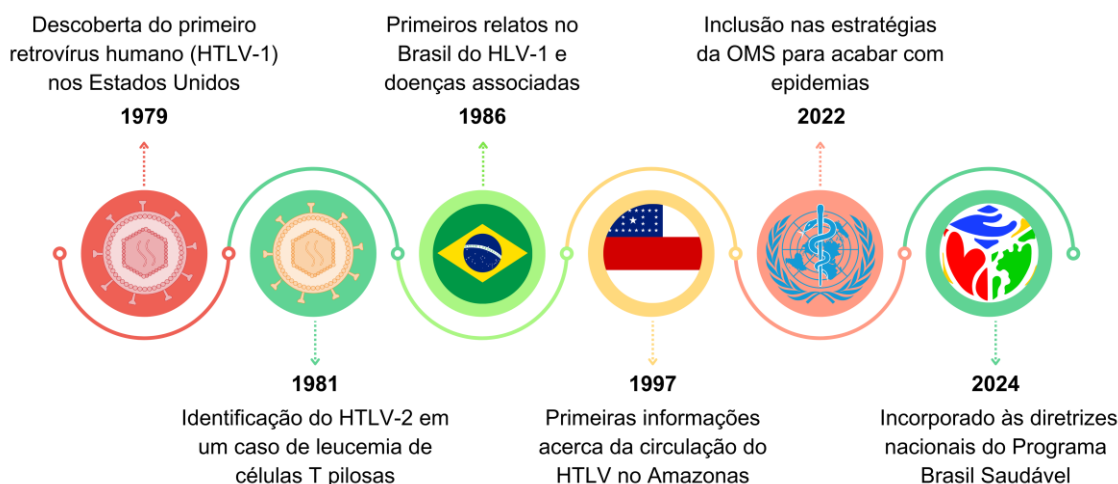
No Brasil, os primeiros relatos do HTLV datam de 1986, entre imigrantes japoneses em Campo Grande no Mato Grosso do Sul, com o surgimento de patologias associadas (HAM/TSP) em 1989. Em 1993, a triagem sorológica torna-se obrigatória nos hemocentros e, desde então, a infecção tem sido relatada em vários estados brasileiros (Passos et al., 2010). No Amazonas, informações acerca da circulação do HTLV na população podem ser encontradas a partir do ano de 1997 (Galvão-Castro et al., 1997).

Em 2022, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou um guia com novas estratégias a serem implementadas até 2030, visando acabar com epidemias e promover a cobertura universal da saúde. Nesse documento, o HTLV foi incluído em 2 ações: 1.

Prevenir a transmissão vertical (de mãe para filho); 2. Fornecer prevenção e tratamento apropriados de complicações advindas de infecções sexualmente transmissíveis e suas sequelas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022).

Em 2024, o HTLV foi incorporado às diretrizes nacionais do “Programa Brasil Saudável – Unir para Cuidar: Construindo um Novo Amanhã”, do Ministério da Saúde, que visa eliminar doenças e infecções prioritárias como problemas de saúde pública até 2030 (Brasil, 2025). Contudo, percebe-se que mesmo com sua descoberta precoce no final da década de 70, demoraram mais de 40 anos para o HTLV receber atenção no contexto da saúde pública brasileira (Figura 6). Nesse cenário, estudos epidemiológicos sobre o HTLV têm contribuído para a formulação de teorias sobre sua origem, a estimativa do número de pessoas infectadas e a conscientização sobre a infecção, além de auxiliar no desenvolvimento de estratégias para seu controle (Ishak et al., 2020).

Figura 6 – Linha do tempo da evolução das ações sobre HTLV, com foco nacional.



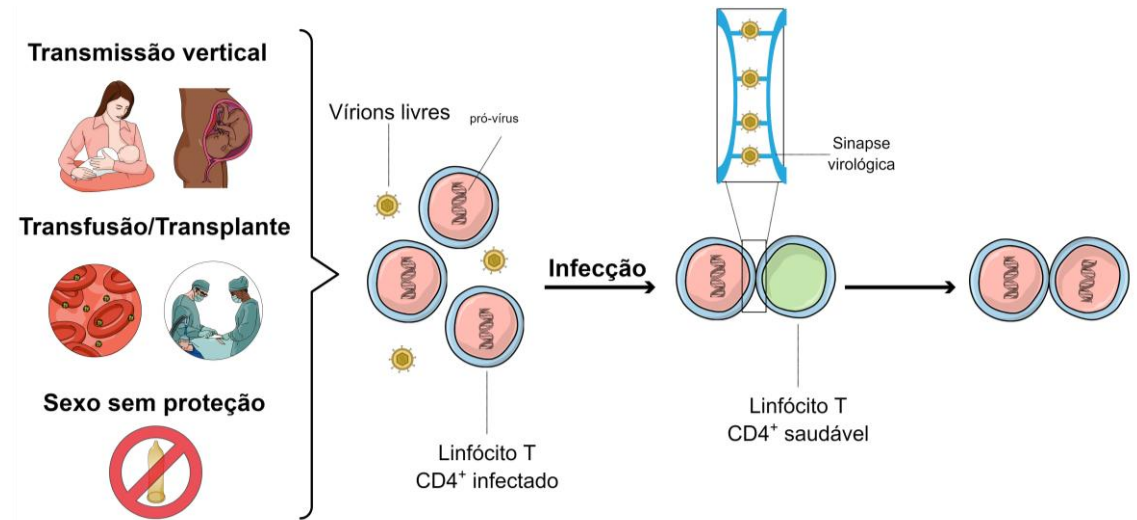
Fonte: Próprio autor.

2.6.2. Fatores epidemiológicos

A transmissão do HTLV pode ocorrer por via vertical (mãe para filho, principalmente através da amamentação), por meio de relações sexuais sem preservativo, pelo contato com sangue e tecidos de pessoas vivendo com HTLV, através de transfusão de sangue, transplante de tecidos e mediante compartilhamento de objetos perfurocortantes (Rosadas et al., 2023b). Diferentemente de outros retrovírus, a infecção pelo HTLV está associada principalmente ao contato célula-célula (Figura 7), enquanto o contato com vírions livres é considerado pouco eficiente do ponto de vista infeccioso, sendo depende da carga pró-viral da fonte de contágio (Stufano et al., 2021).

No mundo todo, estima-se que 5 a 10 milhões de pessoas convivam com o HTLV-1, sendo o Brasil o país com o maior número de casos e uma infecção considerada endêmica, com estimativas entre 800 mil e 2,5 milhões de casos positivos (Botelho et al., 2024; Melo et al., 2024; Nascimento et al., 2024; Oikawa et al., 2026). A prevalência tende a aumentar com a idade, principalmente em mulheres, podendo atingir 10% na população com mais de 50 anos (Firmino et al., 2025).

Figura 7 – Infecção dos linfócitos T CD4⁺ pelo HTLV-1 através do contato célula-célula.



Fonte: Próprio autor.

Embora estudos realizados no Amazonas indiquem uma baixa prevalência da infecção pelo HTLV, estimada em 0,15% entre doadores de sangue da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) (Santos et al., 2024), investigações mais recentes envolvendo a população da região metropolitana de Manaus identificaram uma soroprevalência de 0,3% e evidenciaram a circulação de diferentes linhagens virais, incluindo o subgrupo HTLV-1aC, até então não descrito na Amazônia brasileira. Esses achados reforçam a necessidade de ampliar os estudos epidemiológicos e a vigilância molecular da infecção na região (Silva et al., 2026).

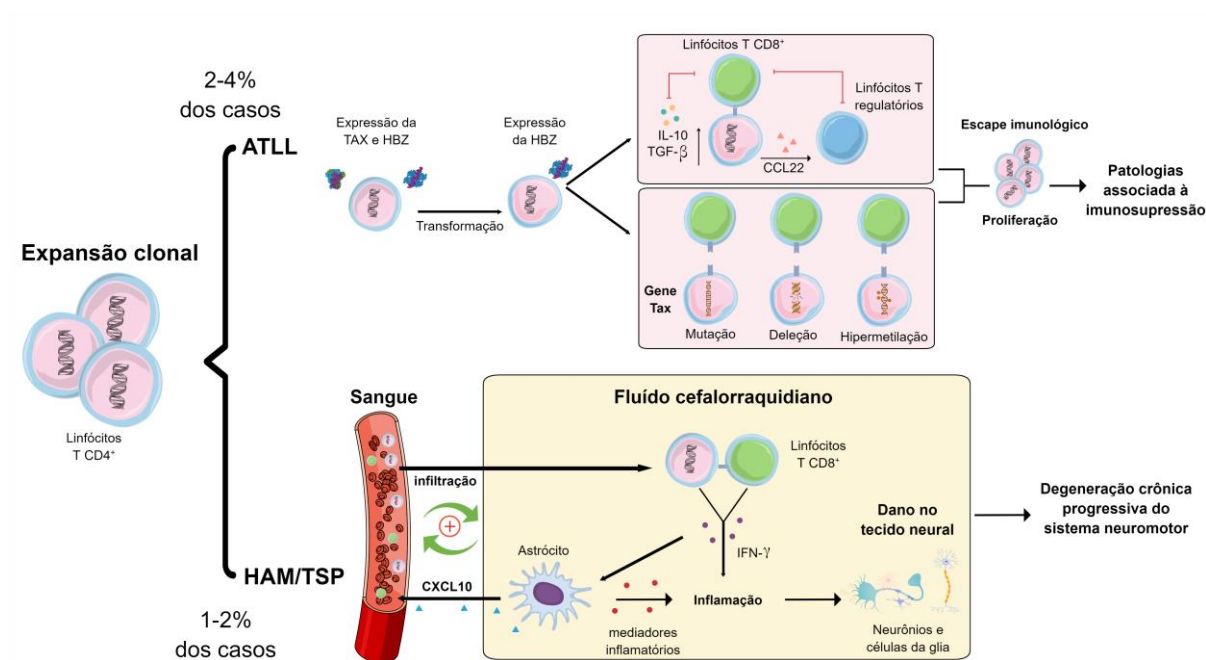
2.6.3. Patogênese

A infecção pelo HTLV é crônica e persiste durante toda a vida do paciente. No entanto, a maioria dos indivíduos infectados não apresenta sintomas graves, sendo classificados como portadores assintomáticos (Yamauchi et al., 2021). Manifestações clínicas mais severas, como HAM/TSP, ocorrem em aproximadamente 0,3% a 3,8% dos casos, enquanto a ATLL é observada em 2% a 5% dos indivíduos infectados pelo HTLV-

1 (Yamauchi *et al.*, 2021). Nesse sentido, a carga pró-viral é reconhecida como um fator de risco, onde uma alta carga tem sido associada à progressão da ATLL, HAM/TSP, bem como outras condições patológicas (Ferraz *et al.*, 2020).

O mecanismo exato do desenvolvimento de condições patológicas ainda não é totalmente elucidado, mas sabe-se que pode ser influenciado por fatores ambientais e genéticos, bem como a eficiência da resposta imune do indivíduo infectado, com destaque para a produção de citocinas e ativação de linfócitos (Zargari *et al.*, 2020). A infecção pelo HTLV promove a expressão de citocinas pró-inflamatórias, levando a uma condição inflamatória crônica que oportuniza a replicação viral, immortalizando células, promovendo sua migração e causando danos teciduais que determinam o desenvolvimento de condições patológicas (Figura 8) (Futsch *et al.*, 2018).

Figura 8 – Mecanismo da patogênese do HTLV-1.



Fonte: Próprio autor.

Nesse contexto, mesmo indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 apresentam alterações no sistema imune, caracterizadas principalmente pelo aumento da expressão de citocinas do perfil Th1, como o interferon gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e, em menor intensidade, de citocinas do perfil Th2, como as interleucinas 5 e 10 (IL-5 e IL-10) (Porto *et al.*, 2002). Associadas à desregulação da resposta imunológica e às alterações na sinalização celular que favorecem a sobrevivência das células infectadas, destacam-se as proteínas virais Tax (trans-activator protein) e HBZ

(*HTLV-1 basic leucine zipper factor*), consideradas os principais fatores de virulência do HTLV-1 (Forlani et al., 2021).

A proteína HBZ modula vias de sinalização relacionadas ao crescimento celular, à resposta imune e à diferenciação de linfócitos T, desempenhando papel central na persistência da infecção e na leucemogênese da leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) (Zhao; Matsuoka, 2012). A proteína Tax exerce papel fundamental na imortalização e transformação dos linfócitos T infectados, promovendo alterações na expressão gênica e na função de diversas proteínas celulares (Chevalier et al., 2012). Além disso, sua atividade tem sido associada à indução do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO), estabelecendo um estado de estresse oxidativo que favorece danos celulares, instabilidade genômica e a progressão da infecção para manifestações clínicas mais graves (Chevalier et al., 2012; Currer et al., 2012; Takahashi et al., 2013).

2.6.4. Tratamento

Apesar da descoberta precoce e da estabilidade genética do HTLV-1, ainda não existem tratamentos ou vacinas padronizados e eficazes que sejam capazes de eliminar a infecção, e o manejo clínico permanece direcionado principalmente ao controle das manifestações associadas (Wang et al., 2024). No caso da ATL, o tratamento baseia-se na combinação de quimioterapia e antirretrovirais, embora as taxas de resposta permaneçam insatisfatórias (Santos et al., 2025). Para a HAM/TSP, por sua vez, os antirretrovirais apresentam eficácia limitada, e o manejo é realizado principalmente com corticosteroides, cujo uso prolongado está associado a diversos efeitos adversos (Saab; DiCapua; Zubair, 2024).

Baseado na imunopatogênese do HTLV, estratégias de tratamento voltadas à imunoterapia tem se mostrado atrativas (Weterings; Rowan; Cook, 2025). Nesse cenário, a utilização de produtos naturais tem demonstrado um potencial promissor, através da manutenção da homeostase dos sistemas imune e nervoso, podendo diminuir a dor e espasticidade muscular, no caso da HAM/TSP, bem como diminuindo a viabilidade de células oncogênicas, no caso da ATLL (Baghban et al., 2024; Fadaee et al., 2024).

Adicionalmente, como a progressão da infecção está diretamente relacionada à proliferação das células infectadas, estratégias capazes de reduzir essa população celular representam uma abordagem terapêutica promissora, diminuindo o risco de progressão para ATL ou HAM/TSP (Cooney et al., 2025). A linhagem MT-2 foi estabelecida a partir da cocultura de linfócitos T provenientes de sangue de cordão umbilical humano com

células leucêmicas do sangue periférico de um paciente com ATL (Nakano et al., 2017), sendo atualmente um importante modelo celular utilizado na avaliação de compostos naturais frente a células infectadas pelo HTLV-1. Nesse contexto, diversos estudos têm investigado o potencial citotóxico seletivo de metabólitos secundários de plantas frente a essa linhagem, utilizando PBMCs de indivíduos saudáveis como controle de seletividade (Kai et al., 2011; Nakano et al., 2011, 2026).

Além da indução de morte celular, estudos utilizando a linhagem MT-2 têm demonstrado diferentes mecanismos de ação antiviral de produtos naturais, incluindo alterações morfológicas e estruturais, como a redução do brotamento viral na superfície celular e da formação de nanotúbulos de tunelamento (*tunneling nanotubes*, TNTs). Essas finas estruturas membranosas, ricas em actina, conectam células adjacentes e permitem a transferência direta de componentes celulares e partículas virais, favorecendo a disseminação do HTLV-1. Assim, sua redução está associada à diminuição da produção viral e da transmissão que necessita do contato célula à célula (Coelho-dos-Reis et al., 2011; Omsland et al., 2018).

Estudos envolvendo macromoléculas e compostos derivados de cogumelos frente ao HTLV-1 ainda são escassos. Entre eles, destaca-se a lentinana, uma β -glucana isolada de *Lentinula edodes*, cuja administração em pacientes infectados promoveu melhora da resposta imunológica e redução da carga antigênica viral (Aoki et al., 1984). Além disso, Zhao, Chen e He (2018), demonstraram que extratos de *G. lucidum* modulam diferentes vias de sinalização celular, incluindo as vias de interação citocina-citocina, JAK-STAT, receptor de células T, TNF e PI3K-Akt, o que pode levar à uma resposta imune mais eficiente frente ao HTLV-1. Embora a aplicação de proteínas bioativas permaneça praticamente inexplorada, esses resultados reforçam o potencial terapêutico de biomoléculas de cogumelos no contexto do HTLV.

3. HIPÓTESES

A presente tese baseia-se na hipótese de que diferentes condições de fermentação submersa modulam, de forma diferencial, a fisiologia de espécies do gênero *Ganoderma*, promovendo alterações qualitativas e quantitativas nas proteínas presentes na biomassa micelial. Além disso, considerando que proteínas bioativas de cogumelos frequentemente apresentam atividade antioxidante *in vitro*, hipotetiza-se que a avaliação do potencial antioxidante possa ser utilizada como estratégia de triagem para a identificação de extratos proteicos com maior potencial biotecnológico.

Ademais, pressupõe-se que proteínas bioativas de cogumelos, devido à sua capacidade de interagir com componentes do sistema imune, sejam capazes de induzir respostas imunológicas e citotóxicas com potencial terapêutico frente ao HTLV-1. Por fim, considerando que essas proteínas desempenham funções relacionadas aos mecanismos de defesa dos cogumelos, hipotetiza-se que a aplicação de condições de estresse controladas durante a fermentação submersa atue como indutora de sua síntese, favorecendo a obtenção de extratos com maior potencial farmacológico.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Prospectar proteínas antioxidantes produzidas por *Ganoderma* spp. com potencial para o tratamento da infecção pelo HTLV-1.

4.2. Específicos

- ✓ Revisar a identificação molecular do isolado amazônico *Ganoderma* sp. 1962;
- ✓ Analisar a produção de biomassa e proteínas intracelulares solúveis por *Ganoderma* spp. em diferentes meios basais, na presença e ausência de agitação;
- ✓ Caracterizar bioquímica e estruturalmente os extratos proteicos das biomassas miceliais de *Ganoderma* spp.;
- ✓ Triar os extratos proteicos obtidos das diferentes condições de cultivo através de ensaios antioxidantes químicos *in vitro*;
- ✓ Avaliar o potencial citotóxico e imunomodulador dos extratos proteicos com maior atividade antioxidante em modelos celulares saudáveis e infectados com HTLV-1.
- ✓ Estimar a influência de condições de estresse durante a fermentação submersa como estratégia para o aumento das atividades farmacológicas de interesse.

Referências

- ADOTEY, Gideon *et al.* The Medicinal Mushroom *Ganoderma*: A Review of Systematics, Phylogeny, and Metabolomic Insights. **Journal of Fungi**, v. 12, n. 1, p. 58, 2026.
- AGNEW, Linda L.; WATSON, Kenneth. Detection of Stress Proteins as Biomarkers of Oxidative Stress. **Current Protocols in Toxicology**, v. 28, n. 1, p. 17.8.1-17.8.26, 2006.
- AKBARIN, Mohammad Mehdi; FARJAMI, Zahra; ÁLVAREZ, Hugo Ramírez. Interferon dynamics in deltaretroviruses: why HTLV-1 evades, but BLV responds. **Molecular Biology Reports**, v. 53, n. 1, p. 571, 2026.
- ALVAREZ, Christian; FÉLIX, Carina; LEMOS, Marco F. L. The Antiviral Potential of Algal Lectins. **Marine Drugs**, v. 21, n. 10, p. 515, 2023.
- AMANULLAH, Ashraf; BUCKLAND, Barry C.; NIENOW, Alvin W. Mixing in the Fermentation and Cell Culture Industries. In: **Handbook of Industrial Mixing**. [S.l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2003. p. 1071–1170.
- ANGULO-SANCHEZ, Lucia T. *et al.* Biosynthesis, Gene Expression, and Pharmacological Properties of Triterpenoids of *Ganoderma* Species (Agaricomycetes): A Review. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 24, n. 6, 2022.
- AOKI, Tadao *et al.* Antibodies to HTLV I and III in sera from two Japanese patients, one with possible pre-AIDS. **The Lancet**, Originally published as Volume 2, Issue 8408. v. 324, n. 8408, p. 936–937, 1984.
- ARSHADI, Nooshin; NOURI, Hoda; MOGHIMI, Hamid. Increasing the production of the bioactive compounds in medicinal mushrooms: an omics perspective. **Microbial Cell Factories**, v. 22, n. 1, p. 11, 2023.
- BAGHBAN, Arezoo *et al.* Combating HTLV-1 infections with *Taxus baccata* phytoconstituents: Molecular mechanisms potential anti-ATLL agents. **Pharmacological Research - Natural Products**, v. 4, p. 100036, 2024.
- BAI, Zhonghu; HARVEY, Linda M.; MCNEIL, Brian. Oxidative Stress in Submerged Cultures of Fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 267–302, 2003.
- BAKRATSAS, Georgios *et al.* Mycoprotein Production by Submerged Fermentation of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus* in a Batch Stirred Tank Bioreactor Using Agro-Industrial Hydrolysate. **Foods**, v. 12, n. 12, p. 2295, 2023.
- BASTIAAN-NET, Shanna *et al.* Biochemical and functional characterization of recombinant fungal immunomodulatory proteins (rFIPs). **International Immunopharmacology**, v. 15, n. 1, p. 167–175, 2013.
- BEROVIC, Marin; PODGORNIK, Bojana Boh. Engineering Aspects in Production of Various Medicinal Mushrooms Biomass in Submerged Bioreactors. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 21, n. 8, 2019.

BHARDWAJ, Anuja; MISRA, Kshipra. A Comprehensive Review on *Ganoderma lucidum* derived Bioactive peptide Ling Zhi-8. **International Journal of Environment and Health Sciences**, v. 2, n. 4, 2020.

BLUNDELL, Renald *et al.* The Phytochemistry of *Ganoderma* Species and their Medicinal Potentials. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 51, n. 04, p. 859–882, 2023.

BÖL, Markus *et al.* Challenges of influencing cellular morphology by morphology engineering techniques and mechanical induced stress on filamentous pellet systems—A critical review. **Engineering in Life Sciences**, v. 21, n. 3–4, p. 51–67, 2021.

BOLHASSANI, Azam; RAFATI, Sima. Heat-shock proteins as powerful weapons in vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 7, n. 8, p. 1185–1199, 2008.

BOTELHO, Bruno José Sarmiento *et al.* Molecular and Phylogenetic Evidence of Interfamilial Transmission of HTLV-1 in the Afro-Descendant Community of São José de Icatú in the Brazilian Amazon. **Viruses**, v. 16, n. 8, p. 1290, 2024.

BRANDA, Francesco *et al.* Human T-Lymphotropic Virus (HTLV): Epidemiology, Genetic, Pathogenesis, and Future Challenges. **Viruses**, v. 17, n. 5, p. 664, 2025.

BRASIL. Comitê Interministerial para a Eliminação da Tuberculose e de Outras Doenças Determinadas Socialmente. **Diretrizes Nacionais do Programa Brasil Saudável: unir para cuidar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2025. 72 p. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_brasil_saudavel.pdf. Acesso em: 31 dez. 2025.

BRATOVCIC, Amra. Antioxidant Enzymes and their Role in Preventing Cell Damage. **Acta Scientifci Nutritional Health**, v. 4, n. 3, p. 01–07, 2020.

BURCHACKA, E.; PIĘTA, P.; ŁUPICKA-SŁOWIK, A. Recent advances in fungal serine protease inhibitors. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112523, 2022.

CABARROI-HERNÁNDEZ, Milay *et al.* *Ganoderma* from Cuba: an approach to some species based on morphology and phylogenetic analyses. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 140, n. 3, p. 323–357, 2023.

CAI, Manjun *et al.* Comparative proteomic analysis of two divergent strains provides insights into thermotolerance mechanisms of *Ganoderma lingzhi*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 167, p. 103796, 2023.

CALDERWOOD, Stuart K.; GONG, Jianlin; MURSHID, Ayesha. Extracellular HSPs: The Complicated Roles of Extracellular HSPs in Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 2016.

CATERINO-DE-ARAUJO, Adele *et al.* HTLV-1 and HTLV-2 infections in patients with endemic mycoses in São Paulo, Brazil: A cross-sectional, observational study. **The Lancet Regional Health – Americas**, v. 15, 2022.

- CHAKRABORTY, Ankita; MAJUMDAR, Sayari; BHOWAL, Jayati. Phytochemical screening and antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts of different filamentous fungi. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 10, p. 6091–6108, 2021.
- CHEN, Xin *et al.* Enhancement of protein production in *Aspergillus niger* by engineering the antioxidant defense metabolism. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 17, n. 1, p. 91, 2024.
- CHEVALIER, Sébastien A. *et al.* The Transcription Profile of Tax-3 Is More Similar to Tax-1 than Tax-2: Insights into HTLV-3 Potential Leukemogenic Properties. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e41003, 2012.
- CHEVREUIL, Larissa Ramos *et al.* Screening of ligninolytic enzymes produced by *Ganoderma lucidum* in solid residues from the Amazon. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, p. e243111436257–e243111436257, 2022.
- CHEVREUIL, Larissa Ramos *et al.* Recovery of Proteases and Protease Inhibitors from *Ganoderma* spp. Cultivated in Amazonian Lignocellulose Wastes. **Current Protein and Peptide Science**, v. 26, n. 1, p. 76–88, 2025.
- COELHO-DOS-REIS, Jordana Graziela A. *et al.* Evaluation of the effects of Quercetin and Kaempherol on the surface of MT-2 cells visualized by atomic force microscopy. **Journal of Virological Methods**, v. 174, n. 1, p. 47–52, 2011.
- COLACO, Camilo A. *et al.* Heat Shock Proteins: Stimulators of Innate and Acquired Immunity. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 1, p. 461230, 2013.
- CONG, Wei-Ran *et al.* Production and functional characterization of a novel fungal immunomodulatory protein FIP-SN15 shuffled from two genes of *Ganoderma* species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 13, p. 5967–5975, 2014.
- COONEY, James P. *et al.* Combination antiretroviral therapy and MCL-1 inhibition mitigate HTLV-1 infection in vivo. **Cell**, v. 188, n. 18, p. 4896–4912.e19, 2025.
- COTABARREN, Juliana *et al.* Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. **Plant Science**, v. 292, p. 110398, 2020.
- CURRER, Robert *et al.* HTLV Tax: A Fascinating Multifunctional Co-Regulator of Viral and Cellular Pathways. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012.
- DAHIYA, Vinay; BUCHNER, Johannes. Functional principles and regulation of molecular chaperones. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 114, p. 1–60, 2019.
- DAVITASHVILI, Elene *et al.* Evaluation of Higher Basidiomycetes Mushroom Lectin Activity in Submerged and Solid-State Fermentation of Agro-Industrial Residues. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 10, 2008.
- DE OLIVEIRA FREIRE, Jacielma *et al.* HTLV-1 and Pregnancy: A Retrospective Study of Maternal and Neonatal Health Outcomes in an Endemic Region of Brazil. **Pathogens**, v. 14, n. 4, p. 389, 2025.

- DEMIRCI-ÇEKİÇ, Sema *et al.* Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 209, p. 114477, 2022.
- DIAS, Luciana P. *et al.* Conidiation under illumination enhances conidial tolerance of insect-pathogenic fungi to environmental stresses. **Fungal Biology**, v. 125, n. 11, p. 891–904, 2021.
- DOMINGUES, Wilson *et al.* Novel approaches for HTLV-1 therapy: innovative applications of CRISPR-Cas9. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 66, p. e48, 2024.
- DRZEWIECKA, Beata *et al.* Bioactive Peptides and Other Immunomodulators of Mushroom Origin. **Biomedicines**, v. 12, n. 7, p. 1483, jul. 2024.
- DU, Yupeng *et al.* Chemodiversity, pharmacological activity, and biosynthesis of specialized metabolites from medicinal model fungi *Ganoderma lucidum*. **Chinese Medicine**, v. 19, n. 1, p. 51, 2024.
- DU, Zhuo *et al.* Re-Examination of the Holotype of *Ganoderma sichuanense* (Ganodermataceae, Polyporales) and a Clarification of the Identity of Chinese Cultivated Lingzhi. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 3, p. 323, 2023.
- 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.
- DUNAEVSKY, Y. E. *et al.* Fungal inhibitors of proteolytic enzymes: Classification, properties, possible biological roles, and perspectives for practical use. **Biochimie**, v. 101, p. 10–20, 2014.
- EJIKE, Udochukwu Camillius *et al.* New advances and potentials of fungal immunomodulatory proteins for therapeutic purposes. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n. 8, p. 1172–1190, dez. 2020.
- EL ENSHASY, Hesham A. Fungal morphology: a challenge in bioprocess engineering industries for product development. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 35, p. 100729, 1 mar. 2022.
- EL-ENSHASY, Hesham A. Chapter 9 - Filamentous Fungal Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. *In*: YANG, Shang-Tian (Org.). **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 225–261.
- EL-MARADNY, Yousra A. *et al.* Lectins purified from medicinal and edible mushrooms: Insights into their antiviral activity against pathogenic viruses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 179, p. 239–258, 2021.
- EL-MARADNY, Yousra A. *et al.* Biochemical characterization of a novel purified lectin extracted from *Pleurotus ostreatus* mushroom for its antiviral activity. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 27893, 2025.

ESPINOSA-VELLARINO, Francisco Luis *et al.* Enzymes Involved in Antioxidant and Detoxification Processes Present Changes in the Expression Levels of Their Coding Genes under the Stress Caused by the Presence of Antimony in Tomato. **Plants**, v. 13, n. 5, p. 609, 2024.

FADAE, Afsane *et al.* Cannabinoid receptors as new targets for HTLV-1 associated myelopathy (HAM/TSP) treatment. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 87, 2024.

FANG, Qing-Hua; ZHONG, Jian-Jiang. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, n. 1, p. 61–65, 2002.

FENG, Jie *et al.* Optimization of *Ganoderma lucidum* Polysaccharides Fermentation Process for Large-Scale Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, n. 3, p. 972–986, 2019.

FERRAZ, Sheila N. *et al.* Neurologic, clinical, and immunologic features in a cohort of HTLV-1 carriers with high proviral loads. **Journal of NeuroVirology**, v. 26, n. 4, p. 520–529, 2020.

FIRMINO, Alisson de Aquino *et al.* HTLV-1 Infection and Cervicovaginal Susceptibility to High-Risk HPV: Findings from Women Living with HTLV-1 in Salvador, Brazil. **Viruses**, v. 17, n. 2, p. 140, 2025.

FLÓREZ-SAMPEDRO, Laura *et al.* In vitro anti-HIV-1 activity of the enzymatic extract enriched with laccase produced by the fungi *Ganoderma* sp. and *Lentinus* sp. **Vitae**, v. 23, n. 2, p. 109–118, 2016.

FORLANI, Greta *et al.* HTLV-1 Infection and Pathogenesis: New Insights from Cellular and Animal Models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, p. 8001, 2021.

FUTSCH, Nicolas *et al.* Cytokine Networks Dysregulation during HTLV-1 Infection and Associated Diseases. **Viruses**, v. 10, n. 12, p. 691, 2018.

GALAPPATHTHI, M. C. A. *et al.* Taxonomy, Phylogeny, and Beneficial Uses of *Ganoderma* (Ganodermataceae, Polyporales). In: **Ganoderma**. [S.l.]: CRC Press, 2024.

GALLO, Robert C. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 5926–5930, 2005.

GALVÃO-CASTRO, B. *et al.* Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion**, v. 37, n. 2, p. 242–243, 1997.

GESSAIN, A. Le rétrovirus humain oncogène HTLV-1 : épidémiologie descriptive et moléculaire, origine, évolution et aspects diagnostiques et maladies associées. **Bulletin de la Société de pathologie exotique**, v. 104, n. 3, p. 167–180, 2011.

GITLIN-DOMAGALSKA, Agata; MACIEJEWSKA, Aleksandra; DĘBOWSKI, Dawid. Bowman-Birk Inhibitors: Insights into Family of Multifunctional Proteins and

Peptides with Potential Therapeutical Applications. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 12, p. 421, 2020.

GOUVÊA, Paula *et al.* Amazonian Residue Effect on the Production and Centesimal Composition of *Ganoderma* spp. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 31, n. 02, p. 77, 2024.

GOUVÊA, Paula Romenya dos Santos *et al.* Agro-wastes bioconversion by an Amazonian isolate of *Ganoderma* sp. and a commercial strain of *Ganoderma lingzhi*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 54, p. 102959, 2023.

GOUVÊA, P. R. S. **Estudo comparativo do cultivo de *Ganoderma* spp. em resíduos lignocelulósicos amazônicos visando a obtenção de inibidores de protease**. 2023. 141 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2023.

GRIENKE, Ulrike *et al.* European medicinal polypores – A modern view on traditional uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 3, p. 564–583, 2014.

GUAN, Hui *et al.* Phenolic-protein interactions in foods and post ingestion: Switches empowering health outcomes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 118, p. 71–86, 2021.

GUO, Guanglun *et al.* Effect of Maternal Catalase Supplementation on Reproductive Performance, Antioxidant Activity and Mineral Transport in Sows and Piglets. **Animals**, v. 12, n. 7, p. 828, 2022.

GUO, Shanshan *et al.* Enhancement of tolerance of *Ganoderma lucidum* to cadmium by nitric oxide. **Journal of Basic Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 36–43, 2016.

GUO, Zhi-Jian *et al.* Evaluating the Application Potential of a Recombinant *Ganoderma* Protein as Bioactive Ingredients in Cosmetics. **Molecules**, v. 28, n. 7, p. 3272, 2023.

GUZZO, Jean. Biotechnical applications of small heat shock proteins from bacteria. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Directed Issue: Small HSPs in Physiology and Pathology. v. 44, n. 10, p. 1698–1705, 2012.

HAGYMASI, Adam T.; DEMPSEY, Joseph P.; SRIVASTAVA, Pramod K. Heat-Shock Proteins. **Current Protocols**, v. 2, n. 11, p. e592, 2022.

HAMEED, Ahsan *et al.* Antioxidants Potential of the Filamentous Fungi (*Mucor circinelloides*). **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1101, 2017.

HAMZA, Arman *et al.* Submerged production of mycelium biomass and bioactive compounds from *P. ostreatus* in a controlled fermentation medium. **Food and Humanity**, v. 2, p. 100302, 2024.

HAN, Mee-Jung; YUN, Hongseok; LEE, Sang Yup. Microbial small heat shock proteins and their use in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 6, p. 591–609, 2008.

HANAFY, N.; MANSOUR, S. Z.; HEDAYAT, I. S. Effect of peroxidase on hyperlipidemic rats exposed to whole body gamma irradiation. **Isotope and Radiation Research**, v. 38, 2006.

HASSAN, Abdullah Abdulkareem; AL-QIASSI, Abier Raouf Mahmoud. Isolation of the Medicinal Mushroom *Ganoderma resinaceum* in Iraq, Morphological, Molecular Identification and Production of Basidiocarps on Novel Media. **Trends in Sciences**, v. 19, n. 14, p. 4949–4949, 2022.

HO, Ha Phan Thanh *et al.* *Ganoderma microsporum* immunomodulatory protein acts as a multifunctional broad-spectrum antiviral against SARS-CoV-2 by interfering virus binding to the host cells and spike-mediated cell fusion. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 155, p. 113766, 2022.

HSU, Kai-Di; CHENG, Kuan-Chen. From nutraceutical to clinical trial: frontiers in *Ganoderma* development. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 21, p. 9037–9051, 2018.

HU, Peng-Fei *et al.* Oxidative stress induction is a rational strategy to enhance the productivity of *Antrodia cinnamomea* fermentations for the antioxidant secondary metabolite antrodin C. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 68, n. 13, p. 3995–4004, 2020.

HUANG, Xin *et al.* Variation in antioxidant enzyme activity and key gene expression during fruit development of blackberry and blackberry–raspberry hybrids. **Food Bioscience**, v. 54, p. 102892, 2023.

ISHAK, Ricardo *et al.* HTLV in South America: Origins of a silent ancient human infection. **Virus Evolution**, v. 6, n. 2, p. veaa053, 2020.

JAKOBEK, Lidija. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food Chemistry**, v. 175, p. 556–567, 2015.

JÚNIOR, Sérgio Dantas de Oliveira *et al.* Cellulase and Xylanase production by *Ganoderma lucidum* in solid-state fermentation using amazonian lignocellulosic wastes **Studies in engineering and exact sciences**, v. 3, n. 3, p. 455–471, 2022.

KACHRIMANIDOU, Vasiliki *et al.* *Ganoderma lucidum* Mycelia Mass and Bioactive Compounds Production through Grape Pomace and Cheese Whey Valorization. **Molecules**, v. 28, n. 17, p. 6331, 2023.

KAI, Hisahiro *et al.* Inhibition of proliferation by agricultural plant extracts in seven human adult T-cell leukaemia (ATL)-related cell lines. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, n. 3, p. 651–655, 2011.

KARUNARATHNA, Samantha Chandranath *et al.* Exploring the health benefits of *Ganoderma*: bioactive compounds and mechanisms of action; immunomodulatory, and anti-tumour activities. **New Zealand Journal of Botany**, v. 63, n. 5, p. 2325–2409, 2025.

KASSAY, Norbert *et al.* Biochemical Characterization, Specificity and Inhibition Studies of HTLV-1, HTLV-2, and HTLV-3 Proteases. **Life**, v. 11, n. 2, p. 127, 2021.

- KELLY, S. *et al.* Effects of fluid dynamic induced shear stress on fungal growth and morphology. **Process Biochemistry**, From Biochemical Engineering to Systems Biology. v. 41, n. 10, p. 2113–2117, 2006.
- KINO, K. *et al.* Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 1, p. 472–478, 1989.
- KLAUS, Anita; WAN-MOHTAR, Wan Abd Al Qadr Imad. *Ganoderma* in Traditional Culture. In: **Ganoderma**. [S.l.]: CRC Press, 2024.
- KOZARSKI, Maja; VUNDUK, Jovana. It Is Said That Antioxidants Are Our Answer to Immortality: An Insight into the Antioxidant Activity of *Ganoderma*. In: **Ganoderma**. [S.l.]: CRC Press, 2024.
- KUMAKURA, Kei *et al.* Protein components of water extracts from fruiting bodies of the reishi mushroom *Ganoderma lucidum* contribute to the production of functional molecules. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 2, p. 529–535, 2018.
- KUMARAN, Sekar *et al.* Isolation and Characterization of Lectin from the Artist's Conk Medicinal Mushroom, *Ganoderma applanatum* (Agaricomycetes), and Evaluation of Its Antiproliferative Activity in HT-29 Colon Cancer Cells. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 19, n. 8, p. 675–684, 2017.
- LAROCQUE, Émilie *et al.* Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 3 (HTLV-3)- and HTLV-4-Derived Antisense Transcripts Encode Proteins with Similar Tax-Inhibiting Functions but Distinct Subcellular Localization. **Journal of Virology**, v. 85, n. 23, p. 12673–12685, 2011.
- LAU, Meng Fei *et al.* Bibliometric, taxonomic, and medicinal perspectives of *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki: A mini review. **Mycology**, v. 15, n. 3, p. 360–373, 2024.
- LETTI, Luiz A. J. *et al.* Solid-State Fermentation for the Production of Mushrooms. In: PANDEY, Ashok; LARROCHE, Christian; SOCCOL, Carlos Ricardo (Orgs.). **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. [S.l.]: Elsevier, 2018. p. 285–318.
- LI, Liu-Dingji *et al.* *Ganoderma* proteins and their potential applications in cosmetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 23, p. 9239–9250, 2019.
- LI, Qiang; HARVEY, Linda M.; MCNEIL, Brian. Oxidative stress in industrial fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 199–213, 2009.
- LI, Xuefei *et al.* Characterization and fungicide sensitivity of *Trichoderma* species causing green mold of *Ganoderma sichuanense* in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023.
- LI, Yuting *et al.* Engineering polyphenols with biological functions via polyphenol-protein interactions as additives for functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 470–482, 2021.

- LIAN, Lingdan *et al.* GCN4 Regulates Secondary Metabolism through Activation of Antioxidant Gene Expression under Nitrogen Limitation Conditions in *Ganoderma lucidum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 14, p. e00156-21, 2021.
- LIN, Duanquan *et al.* Improved functionality and safety of peptides by the formation of peptide-polyphenol complexes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 141, p. 104193, 2023.
- LIN, Jingwei *et al.* *Ganoderma* immunomodulatory proteins: mushrooming functional FIPs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 7, p. 2367–2380, 2022.
- LING, Taotao *et al.* Cytostatic and Cytotoxic Natural Products against Cancer Cell Models. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 2012, 2019.
- LIU, Rui *et al.* Heat stress-induced reactive oxygen species participate in the regulation of HSP expression, hyphal branching and ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum*. **Microbiological Research**, v. 209, p. 43–54, 2018.
- LIU, Yong-Nan *et al.* Identification of Reference Genes and Analysis of Heat Shock Protein Gene Expression in Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum*, after Exposure to Heat Stress. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 19, n. 11, 2017.
- LOPEZ-TEJEDOR, David *et al.* In Vitro Antiviral Activity of Tyrosinase from Mushroom *Agaricus bisporus* against Hepatitis C Virus. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 8, p. 759, 2021.
- LU, Hongyun *et al.* Macrofungi: A review of cultivation strategies, bioactivity, and application of mushrooms. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 5, p. 2333–2356, 2020.
- LU, Zhengwu *et al.* Morphological Engineering of Filamentous Fungi: Research Progress and Perspectives. v. 34, n. 6, p. 1197–1205, 2024.
- LUO, Lu *et al.* Heat stress in macrofungi: effects and response mechanisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 20, p. 7567–7576, 2021.
- M EL-FAKHARANY, Esmail *et al.* Oyster Mushroom Laccase Inhibits Hepatitis C Virus Entry into Peripheral Blood Cells and Hepatoma Cells. **Protein & Peptide Letters**, v. 17, n. 8, p. 1031–1039, 2010.
- MA, Qian *et al.* Co-utilization of carbon sources in microorganisms for the bioproduction of chemicals. **Biotechnology Advances**, v. 73, p. 108380, 2024.
- MACIEL, Giselle Maria *et al.* Response of *Ganoderma lucidum* and *Trametes* sp. to the herbicide picloram: Tolerance, antioxidants and production of ligninolytic enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 105, n. 2, p. 84–92, 2013.
- MAHMOUD, Yehia A. G.; MOHAMED, Eman H. F. A.; ABD ELZAHHER, E. H. F. Response of the Higher Basidiomycetic *Ganoderma resinaceum* to Sodium Chloride Stress. **Mycobiology**, v. 35, n. 3, p. 124–128, 2007.

- MAJUMDER, Reshab *et al.* Mycoprotein: production and nutritional aspects: a review. **Sustainable Food Technology**, v. 2, n. 1, p. 81–91, 2024.
- MALIKI, Intan Mariana *et al.* Production of Lectins from Marine Algae: Current Status, Challenges, and Opportunities for Non-Destructive Extraction. **Marine Drugs**, v. 20, n. 2, p. 102, 2022.
- MARTINEZ, Michael P.; AL-SALEEM, Jacob; GREEN, Patrick L. Comparative virology of HTLV-1 and HTLV-2. **Retrovirology**, v. 16, n. 1, p. 21, 2019.
- MARTINEZ-BURGOS, Walter José *et al.* Bioactive Compounds Produced by Macromycetes for Application in the Pharmaceutical Sector: Patents and Products. **Fermentation**, v. 10, n. 6, p. 275, 2024.
- MATIJAŠEVIĆ, Danka; SKNEPNEK, Aleksandra. Development and Emergence of *Ganoderma*-Based Industry: A Global Perspective. *In: Ganoderma. [S.l.]*: CRC Press, 2024.
- MELO, F. A. *et al.* Outcomes of patients with adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) in a university and public cancer center in Brazil. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 46, p. S250, 2024.
- MENSINK, Maarten A. *et al.* How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 114, p. 288–295, 2017.
- MEYER, Vera *et al.* Understanding and controlling filamentous growth of fungal cell factories: novel tools and opportunities for targeted morphology engineering. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 8, 2021.
- MOIN, Abu Tayab *et al.* Accelerating cancer vaccine development for Human T-Lymphotropic Virus (HTLV) using a high-throughput molecular dynamics approach. **bioRxiv**, 2023. Preprint.
- MORRIS, Rhiannon; BLACK, Katrina A.; STOLLAR, Elliott J. Uncovering protein function: from classification to complexes. **Essays in Biochemistry**, v. 66, n. 3, p. 255–285, 2022.
- MOYLE, Peter Michael. Biotechnology approaches to produce potent, self-adjuvanting antigen-adjuvant fusion protein subunit vaccines. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 3, p. 375–389, 2017.
- MULTHOFF, Gabriele; HIGHTOWER, Lawrence E. Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies. **Cell Stress and Chaperones**, v. 16, n. 3, p. 251–255, 2011.
- NAKANO, Daisuke *et al.* Screening of promising chemotherapeutic candidates against human adult T-cell leukemia/lymphoma from plants: active principles from *Physalis pruinosa* and structure–activity relationships with withanolides. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, n. 3, p. 559–567, 2011.

NAKANO, Daisuke *et al.* Screening of promising chemotherapeutic candidates from plants against human adult T-cell leukemia/lymphoma (V): coumarins and alkaloids from *Boenninghausenia japonica* and *Ruta graveolens*. **Journal of Natural Medicines**, v. 71, n. 1, p. 170–180, 2017.

NAKANO, Daisuke *et al.* Screening of promising chemotherapeutic candidates from plants against human adult T-cell leukaemia/lymphoma (X): withanolides from *Physalis pruinosa*. **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–6, 2026.

NASCIMENTO, Jéssica Oliveira de Souza *et al.* Epidemiological and clinical profile of HTLV-1 patients: a closer look at a reference center in Bahia, Brazil. **VirusDisease**, v. 35, n. 2, p. 243–249, 2024.

NIEGO, Allen Grace *et al.* Macrofungi as a Nutraceutical Source: Promising Bioactive Compounds and Market Value. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 5, p. 397, 2021.

NIKITINA, Valentina E.; LOSHCHININA, Ekaterina A.; VETCHINKINA, Elena P. Lectins from Mycelia of Basidiomycetes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1334, 2017.

NIMSE, Satish Balasaheb; PAL, Dilipkumar. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015.

OIKAWA, Juliana Tiemi *et al.* Prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection among patients attending a dermatology clinic in Northeastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 279, p. 108137, 2026.

OLIVEIRA, Fabíola Cristina *et al.* Food Protein-polysaccharide Conjugates Obtained via the Maillard Reaction: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 7, p. 1108–1125, 2016.

OLIVEIRA-JUNIOR, S. D. *et al.* Adding-value to *Ganoderma lingzhi* by producing enzymes and antioxidant compounds under submerged fermentation using different culture media. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e283882, 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Global health sector strategies on, respectively, HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections for the period 2022-2030**. Geneva: World Health Organization, 2022.

OMSLAND, Maria *et al.* Inhibition of Tunneling Nanotube (TNT) Formation and Human T-cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) Transmission by Cytarabine. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 11118, 2018.

OZDAL, Tugba; CAPANOGLU, Esra; ALTAY, Filiz. A review on protein–phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 954–970, 2013.

PAPP, Viktor. The Lingzhi naming dilemma: Overlooked and long-forgotten names threaten nomenclatural stability. **Fungal Biology Reviews**, v. 47, p. 100338, 2024.

PASSOS, Leny N. M. *et al.* Paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1: relato de dois casos com manifestações dermatológicas em familiares de

- doador de sangue HTLV-1 positivo assintomático no Hemocentro do Amazonas - Hemoam. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 86–89, 2010.
- PESSOA, V. A. **Análises química e quimiométrica de linhagens comerciais e amazônicas de *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* e *G. tropicum* visando inibidores proteolíticos, com ênfase na protease do HIV-1**. 2022. 144 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus (AM), 2022.
- PESSOA, V. A. *et al.* Production of mycelial biomass, proteases and protease inhibitors by *Ganoderma lucidum* under different submerged fermentation conditions. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e270316, 2023.
- PHAM, Janette V. *et al.* A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.
- PLUTA, Aneta; JAWORSKI, Juan P.; DOUVILLE, Renée N. Regulation of Expression and Latency in BLV and HTLV. **Viruses**, v. 12, n. 10, p. 1079, 2020.
- PORTO, Maria Aurélia F. *et al.* Implicações clínicas e imunológicas da associação entre o HTLV-1 e a estrongiloidíase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 641–649, 2002.
- POUR-ABOUGHADAREH, Alireza *et al.* Wild Relatives of Wheat Respond Well to Water Deficit Stress: A Comparative Study of Antioxidant Enzyme Activities and Their Encoding Gene Expression. **Agriculture**, v. 10, n. 9, p. 415, 2020.
- PYEON, Ha-Young *et al.* Transcriptomic Analysis of Salt Stress Response in *Pleurotus ostreatus*. **Horticulturae**, v. 8, n. 12, p. 1147, 2022.
- QIAO, Jinjin *et al.* Function of a hydrophobin in growth and development, nitrogen regulation, and abiotic stress resistance of *Ganoderma lucidum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 370, p. fnad051, 2023.
- QUAN, Cynthia *et al.* A study in glycation of a therapeutic recombinant humanized monoclonal antibody: Where it is, how it got there, and how it affects charge-based behavior. **Analytical Biochemistry**, v. 373, n. 2, p. 179–191, 2008.
- RAHANGDALE, Poonam; WANKHADE, Anjali M. *Ganoderma lucidum* ethanolic extract for the treatment of androgenic alopecia in rats with testosterone-induced Baldness. **Medical and Pharmaceutical Journal**, v. 2, n. 2, p. 107–120, 2023.
- RAMEZANI, Samaneh *et al.* HTLV, a multi organ oncovirus. **Microbial Pathogenesis**, v. 169, p. 105622, 2022.
- RAWLINGS, Neil D. *et al.* The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D624–D632, 2018.
- REN, Sizhu *et al.* A Review of Bioactive Components and Pharmacological Effects of *Ganoderma lucidum*. **Food Science & Nutrition**, v. 13, n. 7, p. e70623, 2025.

REZVANI, Vala *et al.* Anticancer potentiality and mode of action of low-carbohydrate proteins and peptides from mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 16, p. 6855–6871, 2020.

ROLIM, Charline Soares dos Santos *et al.* Main biocompounds profile in brazilian strains of medicinal mushroom Reishi. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 78843–78855, 2020.

ROLIM, L. N. **Estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares de isolados de *Ganoderma lucidum* (Fr.) karst. cultivados pela técnica Jun-Cao**. 120 f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), 2009.

ROLIM, Leonardo do Nascimento *et al.* Use of RAPD molecular markers on differentiation of brazilian and chinese *Ganoderma lucidum* strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, p. 273–281, 2011.

ROLIM, Leonardo do Nascimento *et al.* Application of Chinese Jun-Cao technique for the production of Brazilian *Ganoderma lucidum* strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 367–375, 2014.

ROSADAS, Carolina *et al.* Infecção pelo HTLV e suspensão do aleitamento materno: contexto e desafios na implementação das políticas de prevenção de forma universal no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 32, n. 2, 2023a.

ROSADAS, Carolina *et al.* HTLV-1 screening of blood donations: We are systematically missing opportunities. **British Journal of Haematology**, v. 202, n. 6, p. 1220–1223, 2023b.

ROSADAS, Carolina; TAYLOR, Graham P. HTLV-1 and Co-infections. **Frontiers in Medicine**, v. 9, 2022.

ROSALES-LÓPEZ, Catalina *et al.* Evaluation of Conditions to Improve Biomass Production by Submerged Culture of *Ganoderma* sp. **Microorganisms**, v. 10, n. 7, p. 1404, 2022.

SAAB, Lea; DICAPUA, Daniel; ZUBAIR, Adeel S. HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): Case based discussion of risk factors, clinical, and therapeutic considerations. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 459, p. 122973, 2024.

SA-ARD, Piyawan *et al.* Antioxidant, antibacterial and DNA protective activities of protein extracts from *Ganoderma lucidum*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 2966–2973, 2015.

SABOTIČ, Jerica; KOS, Janko. Fungal Protease Inhibitors. *In: Fungal Metabolites*. [S.l.]: Springer, Cham, 2015. p. 1–33.

SABOTIČ, Jerica; OHM, Robin A.; KÜNZLER, Markus. Entomotoxic and nematotoxic lectins and protease inhibitors from fungal fruiting bodies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 1, p. 91–111, 2016.

- SANTOS, Felipe Araujo *et al.* Performance of immunological assays for universal and differential diagnosis of HTLV-1/2 infection in candidates for blood donations from the Brazilian Amazon. **PLOS ONE**, v. 19, n. 7, p. e0298710, 2024.
- SANTOS, Guilherme Oliveira *et al.* Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma in the Interior of Bahia: A Case Report. **Brazilian Journal of Case Reports**, v. 5, n. 1, p. bjcr46–bjcr46, 2025.
- SARNTHIMA, Rakrudee; KHAMMAUNG, Saranyu; SA-ARD, Piyawan. Culture broth of *Ganoderma lucidum* exhibited antioxidant, antibacterial and α -amylase inhibitory activities. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 11, p. 3724–3730, 2017.
- SCARGIALI, F. *et al.* Mass transfer and hydrodynamic characteristics of unbaffled stirred bio-reactors: Influence of impeller design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 41–47, 2014.
- SCHIERHOUT, Gill *et al.* Association between HTLV-1 infection and adverse health outcomes: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 133–143, 2020.
- SCHILD, Kerstin *et al.* Unraveling the effects of low protein-phenol binding affinity on the structural properties of beta-lactoglobulin. **Food Chemistry**, v. 426, p. 136496, 2023.
- SEO, Dong Joo; CHOI, Changsun. Antiviral Bioactive Compounds of Mushrooms and Their Antiviral Mechanisms: A Review. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 350, 2021.
- SHAHEEN, Sherif *et al.* Dissecting dietary melanoidins: formation mechanisms, gut interactions and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 32, p. 8954–8971, 2022.
- SHAMSI, Tooba Naz; PARVEEN, Romana; FATIMA, Sadaf. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 1120–1133, 2016.
- SHI, Kan *et al.* Controlling composition and color characteristics of *Monascus* pigments by pH and nitrogen sources in submerged fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 2, p. 145–154, 2015.
- SHICHIJO, Takafumi; YASUNAGA, Jun-ichirou. Stratagems of HTLV-1 for persistent infection and the resultant oncogenesis: Immune evasion and clonal expansion. **Leukemia Research**, v. 152, p. 107680, 2025.
- SILVA, A. J. *et al.* The green microalgae *Tetradismus obliquus* (*Scenedesmus acutus*) as lectin source in the recognition of ABO blood type: purification and characterization. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 1, p. 103–110, 2020.
- SILVA, G. L. **Prospecção de enzimas proteolíticas expressas por basidiomicetos, com vistas às futuras aplicações biotecnológicas**. 2022. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus (AM), 2022

SILVA, Danielle Furtado da *et al.* Triagem de meios de cultivo para a produção de biomassa micelial e exopolissacarídeos por *Ganoderma* spp. **Observatório de la economía latinoamericana**, v. 22, n. 4, p. e4326–e4326, 2024.

SILVA, Jean de Melo *et al.* Emergence of West African Human T-Lymphotropic Virus 1aC Subgroup, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 32, n. 7, p. 1207–1211, 2026.

SINGH, Ram Sarup; WALIA, Amandeep Kaur; KENNEDY, John F. Mushroom lectins in biomedical research and development. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 1340–1350, 2020.

SINGH, Sujata *et al.* Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. **Insect Science**, v. 27, n. 2, p. 186–201, 2020.

SOUSA, Ana Sofia; ARAÚJO-RODRIGUES, Helena; PINTADO, Manuela Estevez. The Health-promoting Potential of Edible Mushroom Proteins. **Current Pharmaceutical Design**, v. 29, n. 11, p. 804–823, 2023.

STEPHENIE, Sarah *et al.* An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. **Journal of Functional Foods**, v. 68, p. 103917, 2020.

STUFANO, Angela *et al.* Work-Related Human T-lymphotropic Virus 1 and 2 (HTLV-1/2) Infection: A Systematic Review. **Viruses**, v. 13, n. 9, p. 1753, 2021.

SUBERU, H. A. *et al.* Mycelia Biomass Yield of *Ganoderma lucidum* Mushroom by submerged culture. **Nigerian Journal of Technological Research**, v. 8, n. 2, p. 64–67, 2013.

SUN, Wenli; SHAHRAJABIAN, Mohamad Hesam; LIN, Min. Research Progress of Fermented Functional Foods and Protein Factory-Microbial Fermentation Technology. **Fermentation**, v. 8, n. 12, p. 688, 2022.

SWALLAH, Mohammed Sharif *et al.* Therapeutic potential and nutritional significance of *Ganoderma lucidum* – a comprehensive review from 2010 to 2022. **Food & Function**, v. 14, n. 4, p. 1812–1838, 2023.

TAKAHASHI, Masahiko *et al.* HTLV-1 Tax oncoprotein stimulates ROS production and apoptosis in T cells by interacting with USP10. **Blood**, v. 122, n. 5, p. 715–725, 2013.

TAN, Xiaoyan *et al.* De novo transcriptome sequencing and comprehensive analysis of the heat stress response genes in the basidiomycetes fungus *Ganoderma lucidum*. **Gene**, v. 661, p. 139–151, 2018.

TANAKA, S. *et al.* Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8). An immunomodulator from a fungus, *Ganoderma lucidum*, having similarity to immunoglobulin variable regions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 28, p. 16372–16377, 1989.

THAWTHONG, Anan *et al.* *Ganoderma sichuanense* (Ganodermataceae, Polyporales) new to Thailand. **MycoKeys**, v. 22, p. 27–43, 2017.

TIAN, Ya-Ping; ZHANG, Ke-Chang. Purification and characterization of a novel proteinase A inhibitor from *Ganoderma lucidum* by submerged fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 2, p. 357–361, 2005.

TORRES-TORRES, Mabel Gisela *et al.* *Ganoderma* in Brazil: known species and new records. **Mycotaxon**, v. 121, n. 1, p. 93--132, 2013.

TUTAR, Lütfi; TUTAR, Yusuf. Heat shock proteins; an overview. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 216–222, 2010.

URIBE-ECHEVERRY, Paula Tatiana; LOPEZ-GARTNER, German Ariel. Fungal immunomodulatory proteins in the context of biomedicine. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, n. 2, p. 286–306, 2017.

VALLINOTO, Antonio Carlos Rosário *et al.* HTLV: It Is Time to Reach a Consensus on Its Nomenclature. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

VASCONCELOS, A. S. **Bioprocessamento de resíduo agroindustrial e madeireiro da Amazônia via fermentação em estado sólido utilizando *Ganoderma* spp. para a produção de enzimas lignocelulolíticas**. 2022. 171 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus (AM), 2022.

VO, Di Ngoc Kha *et al.* Broad-spectrum antiviral activity of *Ganoderma microsporum* immunomodulatory protein: Targeting glycoprotein gB to inhibit EBV and HSV-1 infections *via* viral fusion blockage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 307, p. 142179, 2025.

WANG, He-Ya; QIAN, He; YAO, Wei-Rong. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 573–584, 2011.

WANG, Lihua *et al.* Effect of different light of LED light quality on growth and antioxidant enzyme activities of *Ganoderma lucidum*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 36, n. 18, p. 2471–2474, 2011.

WANG, Siying *et al.* Ultrasound-enhanced deep eutectic solvent extraction of *Ganoderma lingzhi* By-Products: A study on protein and antioxidant properties. **Food Bioscience**, v. 68, p. 106753, 2025.

WANG, Tiana T. *et al.* Current State of Therapeutics for HTLV-1. **Viruses**, v. 16, n. 10, p. 1616, 2024.

WANG, Tiantian *et al.* Transcriptome analysis of *Ganoderma lingzhi* (Agaricomycetes) response to *Trichoderma hengshanicum* infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023.

WANG, Xue-fei *et al.* Immunomodulatory effects of fungal proteins. **Current topics in nutraceutical research**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2012.

WETERINGS, Devon A.; ROWAN, Aileen G.; COOK, Lucy B. Immunological aspects of HTLV-1 persistence; for the prevention and treatment of Adult T-cell leukaemia-lymphoma (ATL). **Leukemia Research**, v. 148, p. 107635, 2025.

WHABI, Viraj; YU, Bosco; XU, Jianping. From Nature to Design: Tailoring Pure Mycelial Materials for the Needs of Tomorrow. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 3, p. 183, 2024.

WU, Xiaolin *et al.* Universal sample preparation method integrating trichloroacetic acid/acetone precipitation with phenol extraction for crop proteomic analysis. **Nature Protocols**, v. 9, n. 2, p. 362–374, 2014.

XIA, Yongjun *et al.* Induction of antroquinonol production by addition of hydrogen peroxide in the fermentation of *Antrodia camphorata* S-29. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 2, p. 595–599, 2017.

XU, Yi-Ning; XIA, Xiao-Xia; ZHONG, Jian-Jiang. Induced effect of Na(+) on ganoderic acid biosynthesis in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* via calcineurin signal transduction. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 7, p. 1913–1923, 2013.

YAMAUCHI, Junji *et al.* An update on human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) focusing on clinical and laboratory biomarkers. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 218, p. 107669, 2021.

YU, Shuhui *et al.* Characterization, Recombinant Production, and Bioactivity of a Novel Immunomodulatory Protein from *Hypsizygus marmoreus*. **Molecules**, v. 28, n. 12, p. 4796, 2023.

ZARGARI, Razieh *et al.* The Role of Chemokines in the Pathogenesis of HTLV-1. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

ZHANG, Qibin *et al.* A Perspective on the Maillard Reaction and the Analysis of Protein Glycation by Mass Spectrometry: Probing the Pathogenesis of Chronic Disease. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 2, p. 754–769, 2009.

ZHANG, Wen-Xian; TANG, Ya-Jie; ZHONG, Jian-Jiang. Impact of oxygen level in gaseous phase on gene transcription and ganoderic acid biosynthesis in liquid static cultures of *Ganoderma lucidum*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, n. 6, p. 683–690, 1 ago. 2010.

ZHANG, Xue *et al.* Heat Stress Modulates Mycelium Growth, Heat Shock Protein Expression, Ganoderic Acid Biosynthesis, and Hyphal Branching of *Ganoderma lucidum* via Cytosolic Ca²⁺. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 14, p. 4112–4125, 2016.

ZHANG, Yu; ZHANG, Guoying; LING, Jianya. Medicinal Fungi with Antiviral Effect. **Molecules**, v. 27, n. 14, p. 4457, 2022.

ZHAO, Ruolin; CHEN, Qilong; HE, Yu-min. The effect of *Ganoderma lucidum* extract on immunological function and identify its anti-tumor immunostimulatory activity based on the biological network. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 12680, 2018.

ZHAO, Shuang *et al.* Immunomodulatory Effects of Edible and Medicinal Mushrooms and Their Bioactive Immunoregulatory Products. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 269, 2020.

ZHAO, Tiejun; MATSUOKA, Masao. HBZ and its roles in HTLV-1 oncogenesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012.

ZHOU, Ding-Xi *et al.* Breeding a new *Ganoderma lucidum* strain with increased contents of individual ganoderic acids by mono–mono crossing of genetically modified monokaryons. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 2024.

ZHOU, Rong *et al.* Research Progress of Bioactive Proteins from the Edible and Medicinal Mushrooms. **Current Protein & Peptide Science**, v. 20, n. 3, p. 196–219, 2019.

ZININGA, Tawanda; RAMATSUI, Lebogang; SHONHAI, Addmore. Heat Shock Proteins as Immunomodulants. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2846, 2018.

5. CAPÍTULO 1

Impacto dos Parâmetros de Fermentação Submersa nas Proteínas Extraídas de *Ganoderma sichuanense* e seu Potencial Antioxidante

O presente capítulo corresponde a um artigo publicado em janeiro de 2026 na revista *Microorganisms* (ISSN 2076-2607), edição especial “*Microbial bioprocesses*”, editada pela MDPI, fator de impacto de 4,2. O conteúdo foi adaptado para atender à estrutura e aos objetivos desta tese, preservando os resultados, as interpretações e as conclusões científicas do trabalho original, em conformidade com os termos da licença Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms14010133>.

Impacto dos parâmetros de fermentação submersa nas proteínas extraídas de *Ganoderma sichuanense* e seu potencial antioxidante

Vítor Alves Pessoa^{1,2,*}, Larissa Ramos Chevreuil², Roziane Rodrigues Nunes²,
Daiane Barão Pereira^{1,2}, Giovanna Lima-Silva^{1,2}, Larissa Batista do Nascimento
Soares^{2,3}, Aldenora dos Santos Vasconcelos^{2,3,4}, Sérgio Dantas de Oliveira-Junior²,
Walter J. Martínez-Burgos^{2,*} and Ceci Sales-Campos^{1,2,3}

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Amazonas, Brasil;

²Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis (LCFC), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Amazonas, Brasil;

³Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Universidade do Estado do Amazonas, Amazonas, Brasil;

⁴Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos, Universidade do Estado do Amazonas, Amazonas, Brasil.

Resumo

Embora a espécie *Ganoderma sichuanense* seja amplamente reconhecido como fonte de biomoléculas bioativas, pouco ainda se sabe sobre as características que afetam a produção de suas proteínas e como isso se reflete na atividade antioxidante. Neste capítulo, foi avaliada a influência de diferentes composições do meio de cultura em fermentação submersa, com e sem agitação, na produção de extratos proteicos com atividade antioxidante a partir da biomassa micelial de *G. sichuanense*. Os extratos proteicos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura, difração de raios X e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier por reflectância total atenuada. Adicionalmente, foram avaliados quanto ao teor de proteínas e fenólicos, atividades antioxidantes (ABTS⁺, DPPH[•], habilidade quelante e poder redutor) e perfil eletroforético em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A cinética de crescimento da condição que apresentou maior recuperação proteica também foi determinada. Os extratos apresentaram diferenças microestruturais, variando de estruturas fibrilares a agregadas, enquanto a cristalinidade permaneceu inalterada. Em contrapartida, alterações na composição química e na organização da estrutura secundária foram evidenciadas por espectroscopia no infravermelho. O extrato obtido do cultivo na ausência de agitação, em meio de cultura contendo 10 g·L⁻¹ de glicose, 5 g·L⁻¹ de extrato de levedura e 2,5 g·L⁻¹ de peptona de soja (denominado E1NA) apresentou os maiores teores de proteína solúveis e compostos fenólicos, além da maior atividade antioxidante (CI₅₀ = 4,8 e 24,0 µg de proteína·mL⁻¹ para ABTS⁺ e DPPH[•], respectivamente). A análise por SDS-PAGE revelou maior intensidade das bandas proteicas nos extratos obtidos sob cultivo sem agitação. O modelo de Gompertz estimou uma taxa de crescimento específica de 0,0068 h⁻¹ no E1NA, cuja micromorfologia foi caracterizada pela presença de hifas curtas e altamente ramificadas do tipo “chifre de veado”. Em conjunto, os resultados demonstram que a ausência de agitação constitui uma estratégia eficiente para modular o metabolismo de *G. sichuanense*, favorecendo a recuperação de proteínas com elevado potencial antioxidante.

Palavras-chave: Bioprocessos; Estrutura secundária; Estresse oxidativo; Lingzhi; Modulação do metabolismo; Polipeptídeos; Ultraestrutura.

Abstract

Although *Ganoderma sichuanense* is widely recognized as a source of bioactive molecules, little is still known about the factors affecting the production of its proteins and how these influence antioxidant activity. In this chapter, the influence of different culture medium compositions under submerged fermentation, with and without agitation, on the production of protein extracts with antioxidant activity from the mycelial biomass of *G. sichuanense* was evaluated. The protein extracts were characterized by scanning electron microscopy, X-ray diffraction, and attenuated total reflectance–Fourier transform infrared (FTIR-ATR) spectroscopy. Additionally, the extracts were evaluated for soluble protein and phenolic compound

contents, antioxidant activities (ABTS^{•+}, DPPH[•], metal chelating ability, and reducing power), and electrophoretic profile by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Growth kinetics under the cultivation condition that resulted in the highest protein recovery was also determined. The extracts exhibited distinct microstructural patterns, ranging from fibrillar to aggregated structures, whereas crystallinity remained unchanged. In contrast, changes in chemical composition and secondary structure organization were evidenced by infrared spectroscopy. The extract obtained from non-agitated cultivation in a medium containing 10 g·L⁻¹ glucose, 5 g·L⁻¹ yeast extract, and 2.5 g·L⁻¹ soy peptone (designated E1NA) exhibited the highest soluble protein and phenolic compound contents, as well as the greatest antioxidant activity (IC₅₀ = 4.8 and 24.0 µg protein·mL⁻¹ for the ABTS^{•+} and DPPH[•] assays, respectively). SDS-PAGE analysis revealed greater protein band intensity in extracts obtained under non-agitated cultivation. The Gompertz model estimated a specific growth rate of 0.0068 h⁻¹ for E1NA, whose micromorphology was characterized by the presence of short, highly branched staghorn-like hyphae. Overall, the results demonstrate that the absence of agitation represents an effective strategy for modulating the metabolism of *G. sichuanense*, favoring the recovery of proteins with high antioxidant potential.

Keywords: Bioprocesses; Lingzhi; Metabolic modulation; Oxidative stress; Polypeptides; Secondary structure; Ultrastructure.

5.1. Introdução

Entre os antioxidantes naturais, várias moléculas pequenas são reconhecidas como moléculas bioativas. No entanto, macromoléculas como proteínas e seus derivados também podem exibir um potencial antioxidante notável, dependendo de sua composição de aminoácidos e estrutura conformacional (Chen et al., 2023). As proteínas antioxidantes não apenas resistem aos danos causados pelos radicais livres, mas também protegem os componentes celulares contra o estresse oxidativo, atuando como aliadas frente uma série de condições patológicas (Meng et al., 2023).

Uma proteína imunomoduladora fúngica (*Fungal Immunomodulatory Proteins*, FIP) sintetizada pelo fungo *Ganoderma lucidum* (FIP-glu ou LZ-8) apresenta significativo potencial antioxidante, além de promover a proliferação de queratinócitos e inibir o desenvolvimento de células de melanoma e suprime a síntese de melanina. Comparada à vitamina C, essa proteína tem sido destacada como um ingrediente potencial em produtos destinados à reparação tecidual e ao clareamento da pele (Guo et al., 2023). Em modelos celulares, a FIP-glu também exibiu capacidade imunomoduladora, ativando macrófagos (RAW264.7) e apresentando atividade tanto pró-inflamatória quanto anti-inflamatória, de forma contexto-dependente (Li et al., 2019).

As FIPs já foram descritas em várias espécies de *Ganoderma*, incluindo *G. lucidum*, *G. tsugae*, *G. japonicum*, *G. microsporum*, *G. applanatum*, *G. atrum*, *G. sinense*, *G. bonisense*, *G. amboinense*, *G. tenuis* e *G. capense*. Essas proteínas são compostas de 106 a 133 aminoácidos, com massa molecular em torno de 12 kDa, e são ricas em resíduos de ácido aspártico (Asp) e valina (Val), com baixos níveis de histidina (His), cisteína (Cys) e metionina (Met). Elas também exibem alta homologia e quatro fragmentos de

aminoácidos conservados diferentes (WGRG, DKAYTYRV, SDGSQK e AQWN), sugerindo conservação evolutiva dentro do gênero *Ganoderma* (Lin et al., 2022). Entretanto, o teor de FIPs em cogumelos é relativamente baixo, com 5 a 10 mg de FIP-glu a cada 300 g de micélio de *G. lucidum* (Kino et al., 1989).

Outros derivados proteicos de *G. lucidum* também foram relatados com atividade antioxidante, incluindo uma proteína enriquecida com selênio (Se-GL-P) (Du et al., 2007), as enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (Wang et al., 2011), extratos de proteína bruta (Sa-ard et al., 2015), um proteoglicano (Zhu et al., 2019) e um glicopeptídeo (Luo et al., 2024). Assim, é possível observar que outros polipeptídeos sintetizados por *Ganoderma* também podem apresentar relevante atividade antioxidante, com potencial para uso em formulações benéficas à saúde.

Ganoderma sichuanense, especificamente, é um cogumelo cujas propriedades medicinais são amplamente reconhecidas em países asiáticos, tornando-o uma espécie de significativa importância ecológica e comercial. Estudos relatam seu potencial como agente antitumoral, antiviral, antienvelhecimento, hipoglicêmico, hipocolesterolêmico, hepatoprotetor, hipotensor e antioxidante (Chinthanom et al., 2021; Li et al., 2023). Esta espécie tem enfrentado diversos problemas taxonômicos, sendo frequentemente referida erroneamente como *G. lucidum* em várias publicações e incorretamente associada ao epíteto específico *G. lingzhi* (Du et al., 2023). Artigos recentes sugerem que, considerando o conhecimento atual, as publicações devem priorizar o nome *G. sichuanense* (Papp, 2024).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis (LCFC/INPA) descreveu nos últimos anos o potencial de *G. sichuanense* (CC22) na síntese de proteínas, incluindo a classe de proteínas inibidoras de proteases, tanto em basidiomas (Chevreuil et al., 2025) quanto na biomassa micelial (Pessoa et al., 2023). Essa classe de proteínas também tem demonstrado atividade antioxidante *in vitro*, como observado para um inibidor de protease de *Agaricus bisporus* (AbPI), que apresentou elevada capacidade antioxidante e efeito citoprotetor frente ao estresse oxidativo (Vishvakarma; Mishra, 2019). Em modelos celulares utilizando adipócitos (3T3-L1), AbPI também foi capaz de reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares e aumentar a captação de glicose, demonstrando um efeito comparável ao de medicamentos comerciais, sugerindo seu potencial como candidata ao tratamento do estresse oxidativo e diabetes (Vishvakarma; Mishra, 2020).

A produção de extratos proteicos enriquecidos em diferentes proteínas

antioxidantes derivadas de espécies de *Ganoderma* representa uma alternativa promissora para uso como ingredientes ativos em cosméticos, medicamentos e suplementação proteica. No entanto, estratégias para otimizar a produção em fermentação submersa são necessárias. Dada essa lacuna de conhecimento, o presente trabalho visou avaliar a influência das concentrações dos componentes do meio de cultura e da agitação na produção de proteínas antioxidantes por *G. sichuanense* em fermentação submersa, bem como avaliar como essas condições afetam as propriedades estruturais das proteínas recuperadas.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Material biológico e Fermentação submersa

G. sichuanense (CC22) foi acessado da coleção de trabalho do Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis, pertencente à Coordenação de Tecnologia e Inovação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (COTEI/INPA). O macrofungo foi mantido em meio BDA (batata-dextrose-ágar) e, posteriormente, cultivada em diferentes meios líquidos com pH 6,0, cujas composições variaram conforme os experimentos descritos na Tabela 1, com incubação a 25 °C, sob agitação a 120 rpm (A) ou não agitada (NA), por 12 dias. As 4 formulações de meio de cultura e as 2 condições de cultivo foram determinadas conforme estudo prévio (Pessoa et al., 2023), totalizando 8 condições experimentais.

Tabela 1 – Composição do meio de cultura nos experimentos de fermentação submersa.

Meio de Cultura	Concentração (g.L ⁻¹)		
	Glicose	Peptona de soja	Extrato de levedura
Experimento 1 (E1)	10	2,5	5
Experimento 2 (E2)	20	2,5	5
Experimento 3 (E3)	10	5	5
Experimento 4 (E4)	20	5	5

5.2.2. Extração de proteínas e Ensaio de quantificação

A biomassa micelial foi homogeneizada em cloreto de sódio 0,15 M (1:20, m/v) por 2 horas, a 120 rpm e 10 °C. Em seguida, o material foi centrifugado por 20 minutos a 10.000 × g e 4 °C. O sobrenadante foi dialisado em membranas de celulose, com *cut-off* de 12 kDa, contra água destilada por 48 horas, sob refrigeração (4 °C), resultando em extratos proteicos de média à alta massa molecular. Posteriormente, foi realizada uma

nova centrifugação por 20 minutos a $4.667 \times g$ e 4°C , seguida de liofilização (Pessoa et al., 2023).

O teor de proteínas nos extratos foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. O conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT) foi estimado utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e ácido gálico como padrão, sendo os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato ($\text{mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$ de extrato) (Oliveira-Junior et al., 2024).

5.2.3. Análises estruturais dos extratos proteicos

Os extratos proteicos foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando um microscópio eletrônico Philips XL-30 ESEM, com feixe de elétrons de 15 kV e ampliação de $100\times$. A análise por Difração de Raios X (DRX) foi realizada em um difratômetro de raio x Shimadzu XRD-6000, utilizando radiação $\text{Cu K}\alpha$, tensão de 30 kV e corrente de 15 mA, com velocidade de varredura de $2,0^\circ$ por minuto, em um intervalo contínuo de 2θ de $4,0^\circ$ a $70,0^\circ$.

Os grupos químicos presentes nos extratos proteicos foram investigados por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR). Para isso, 5 mg de cada amostra foram analisados em um espectrômetro Agilent Cary 630 FTIR, na faixa de 750 a 4000 cm^{-1} , com resolução correspondente a 8 varreduras. A caracterização da estrutura secundária das proteínas nas amostras foi realizada utilizando a região da banda amida I ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$), por meio de autodeconvolução de Fourier e ajuste de curvas gaussianas. As porcentagens das estruturas secundárias foram calculadas pela integração e combinação das curvas ajustadas, utilizando o RStudio.

5.2.4. Avaliação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos proteicos foi avaliada por meio dos ensaios de inibição dos radicais $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e $\text{DPPH}^\bullet$, habilidade quelante de íons ferrosos e poder redutor do íon férrico, utilizando metodologias adaptadas para microplacas de 96 poços (Khatua; Ghosh; Acharya, 2017). Para os testes, os extratos proteicos foram inicialmente ressuspensos em água destilada na concentração de $10\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Amostras com inibição superior a 50% nos ensaios de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e $\text{DPPH}^\bullet$, foram diluídas seriadamente ($10, 5, 2,5, 1,25, 0,625$ e $0,3125\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) para determinação da concentração capaz de inibir 50% do radical (CI_{50}). No ensaio de poder redutor, o aumento da absorbância

indicou maior potencial antioxidante das amostras.

5.2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os extratos proteicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Marcadores de massa molecular (Promega, Madison, WI, EUA), na faixa de 10 a 225 kDa, foram utilizados para estimar a massa molecular das proteínas presentes nas amostras.

5.2.6. Cinética Fúngica

A condição experimental de fermentação submersa que apresentou o extrato proteico com maior atividade antioxidante, teve sua cinética de crescimento avaliada. Para isso, *G. sichuanense* foi cultivado em meio contendo glicose ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), peptona de soja ($2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e extrato de levedura ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), em condição sem agitação.

Diariamente, três frascos Erlenmeyer foram coletados ao longo de 12 dias para avaliação dos parâmetros de produção de biomassa (biomassa seca em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e da taxa específica de crescimento (h^{-1}). O caldo fermentado foi utilizado para monitoramento do pH e do consumo de glicose (açúcares redutores em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), determinado pelo método empregando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Pessoa et al., 2023).

5.2.7. Delineamento experimental e Análise estatística

Um planejamento fatorial completo no esquema 2^3 foi aplicado para avaliar os efeitos de três fatores: glicose (X_1), peptona (X_2) e agitação (X_3), cada um em dois níveis (baixo: -1 e alto: $+1$), tendo como variável resposta a concentração de proteínas solúveis. Um total de oito condições experimentais foi definido com base nesse delineamento (Tabela 2). Essas condições foram utilizadas para avaliar o impacto dos fatores de cultivo sobre a produção de proteínas durante a fermentação submersa, e os dados obtidos foram analisados utilizando o RStudio. As análises estatísticas dos ensaios de quantificação foram realizadas no software Statistica 7, com dados provenientes de triplicatas submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 1% ($p < 0,01$).

Os valores de CI_{50} foram calculados por regressão não linear, utilizando o modelo de inibidor versus resposta normalizada com inclinação variável, e as taxas específicas de

crescimento foram estimadas por ajuste de modelos matemáticos aos dados por regressão não linear, ambos utilizando o software GraphPad Prism (versão 9.4). A Análise de Componentes Principais (PCA) foi empregada para comparação estatística do perfil químico de cada extrato proteico obtido por FTIR-ATR, utilizando o software OriginPro (versão 2025).

Tabela 2 – Matriz de planejamento experimental para o planejamento fatorial completo 2^3 aplicado à fermentação submersa de *G. sichuanense*.

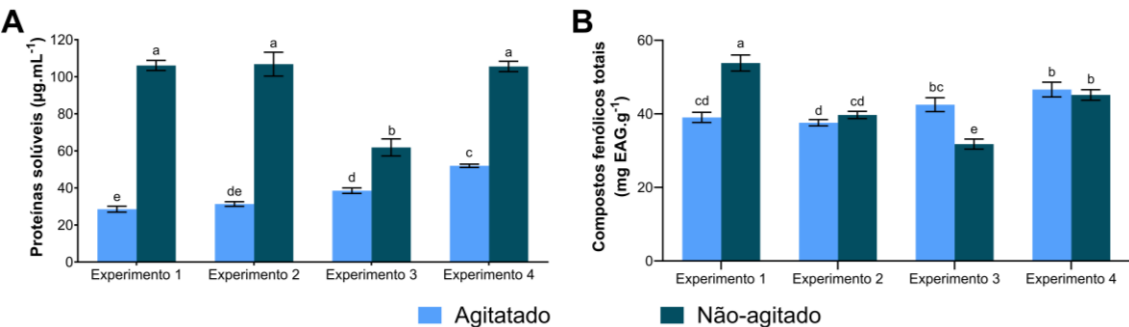
Experimento	X ₁ (Glicose)	X ₂ (Peptona)	X ₃ (Agitação)
E1NA	-1	-1	-1
E2NA	1	-1	-1
E3NA	-1	1	-1
E4NA	1	1	-1
E1A	-1	-1	1
E2A	1	-1	1
E3A	-1	1	1
E4A	1	1	1

5.3. Resultados

5.3.1. Proteínas solúveis e Compostos Fenólicos Totais (CFT)

A condição não agitada (NA) resultou em maior concentração de proteínas em todos os experimentos (E) avaliados, com valores próximos a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, exceto para E3NA (Figura 1A). Por outro lado, observou-se baixa influência dos fatores meio de cultura e agitação sobre o teor de compostos fenólicos totais (CFT), com o maior valor registrado em E1NA ($53,81 \text{ mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$ de extrato) e o menor em E3NA ($31,78 \text{ mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$ de extrato) (Figura 1B).

Figura 1 – Quantificação de moléculas em extratos proteicos de *G. sichuanense* cultivado sob diferentes condições de fermentação submersa. (A) Proteínas solúveis; (B) Compostos fenólicos totais.



Letras distintas indicam diferença estatística entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 1%.

A análise do planejamento fatorial 2^3 revelou que todos os fatores e suas interações influenciaram significativamente o teor de proteínas solúveis ($p < 0,05$). Entre os fatores principais, a agitação exerceu a maior influência sobre a resposta, seguida da concentração de peptona, enquanto as interações entre os fatores também contribuíram significativamente para a produção de proteínas. Os coeficientes de efeito indicaram que a agitação e a concentração de peptona exerceram influência negativa sobre a resposta, ao passo que as interações binárias apresentaram efeito positivo. O elevado coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9934$) indicou o bom ajuste do modelo aos dados experimentais e uma elevada capacidade preditiva (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeitos e significância estatística das variáveis de fermentação na produção de proteínas solúveis por *G. sichuanense* em um planejamento fatorial 2^3 .

Fator/Interação	Efeito estimado	Valor de p (ANOVA)	Significância
Agitação	-155.14	5.02×10^{-18}	Altamente significativo
Peptona	-88.47	1.27×10^{-2}	Significativo
Glicose	1.43	4.12×10^9	Altamente significativo
Agitação:Peptona	108.47	1.47×10^{-10}	Altamente significativo
Glicose:Peptona	85.96	2.35×10^{-8}	Altamente significativo
Glicose:Agitação	4.15	6.91×10^{-5}	Significativo
Glicose:Peptona:Agitação	-64.70	1.53×10^{-5}	Significativo

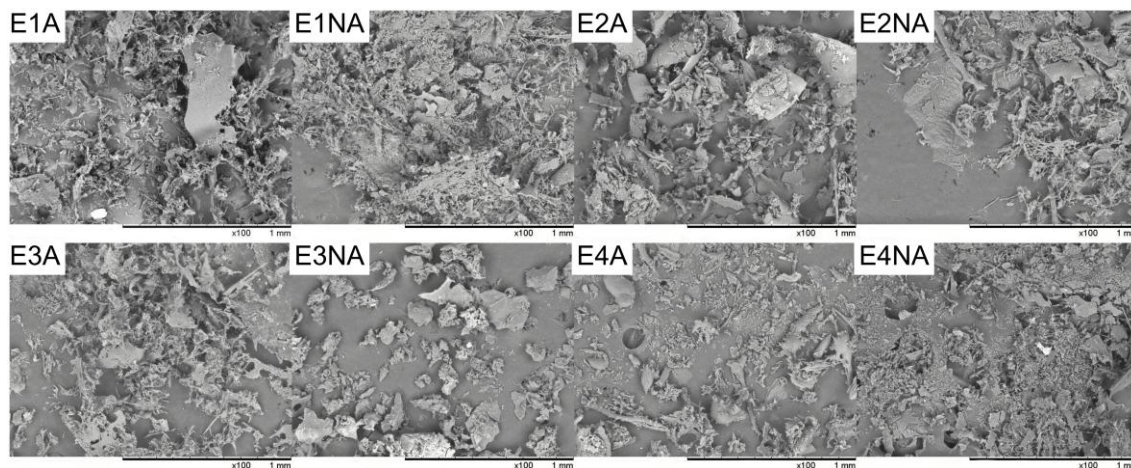
A significância de cada fator foi classificada como altamente significativa ($p < 0,001$), significativa ($0,001 < p < 0,05$) ou não significativa ($p > 0,05$), com base no valor obtido da ANOVA.

5.3.2. Caracterização estrutural

5.3.2.1. Microscopia eletrônica de Varredura

As micrografias obtidas por MEV revelaram variações na microestrutura dos extratos proteicos em função da condição de fermentação submersa. A maioria dos extratos apresentou agregados, enquanto E1NA e E3A exibiram estruturas mais fibrilares. E1A e E2NA, por sua vez, apresentaram tanto aglomerados quanto estruturas fibrilares (Figura 2).

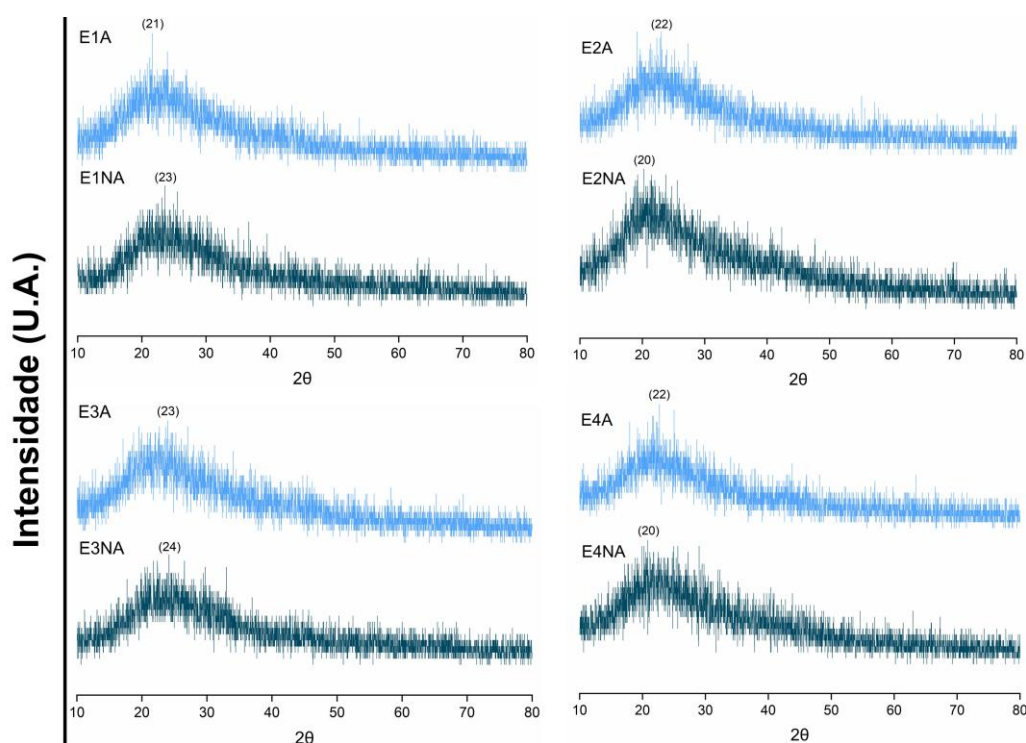
Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura dos extratos proteicos da biomassa micelial de *G. sichuanense* cultivada sob diferentes condições de fermentação submersa. E: Número do experimento (1–4). A: Agitado. NA: Não agitado.



5.3.2.2. Difração de Raio X (DRX)

As análises de DRX demonstraram que as diferentes condições de fermentação submersa não influenciaram a cristalinidade dos extratos proteicos. Todos os extratos apresentaram um padrão difuso característico de estruturas amorfas, com picos de difração em 2θ na faixa entre 20 e 24° (Figura 3).

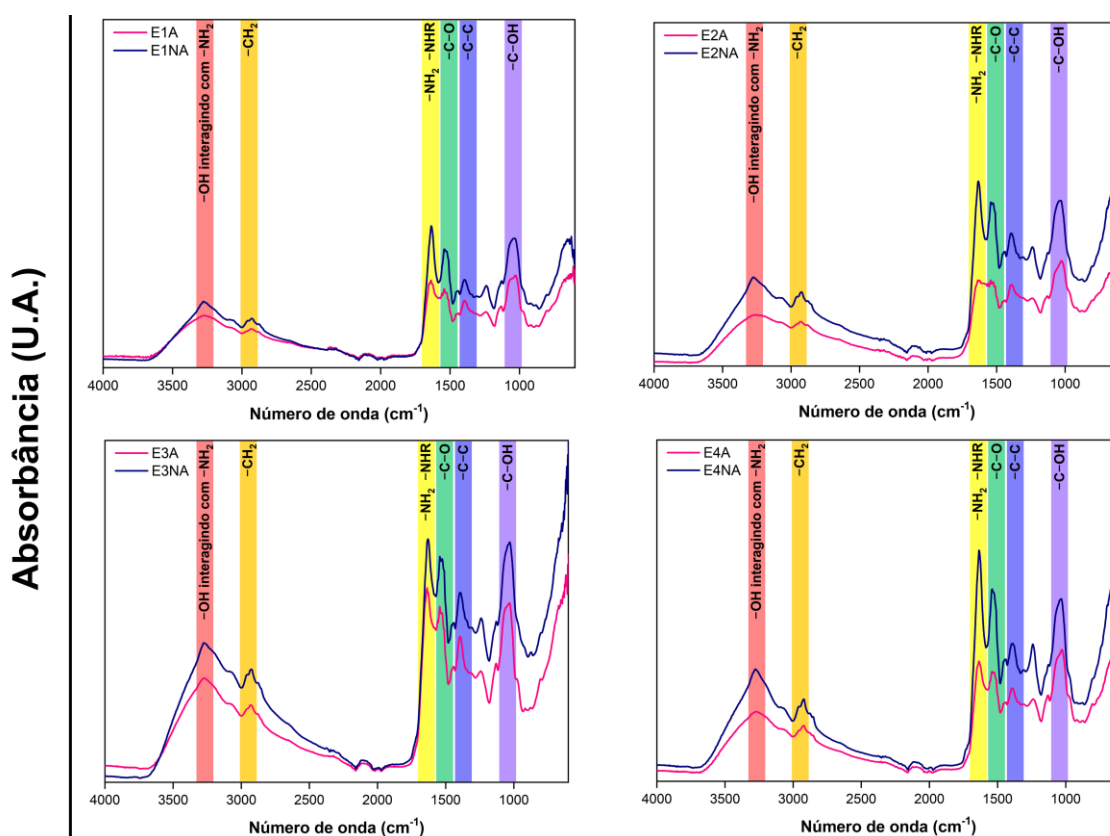
Figura 3 – Padrões de difração de raios X dos extratos proteicos da biomassa micelial de *G. sichuanense* cultivada sob diferentes condições de fermentação submersa. E: Número do experimento (1–4). A: Agitado. NA: Não agitado.



5.3.2.3. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)

A análise por FTIR dos extratos proteicos revelou elevado grau de similaridade nos perfis de absorção, com variações na transmitância dependentes tanto da composição do meio de cultura quanto das condições de agitação (Figura 4). Os extratos provenientes de fermentações submersas em condição não agitada apresentaram menor transmitância, sugerindo associação com maior teor de proteínas.

Figura 4 – Espectros de FTIR-ATR dos extratos proteicos da biomassa micelial de *G. sichuanense* cultivada sob diferentes condições de fermentação submersa. E: Número do experimento (1–4). A: Agitado. NA: Não agitado.

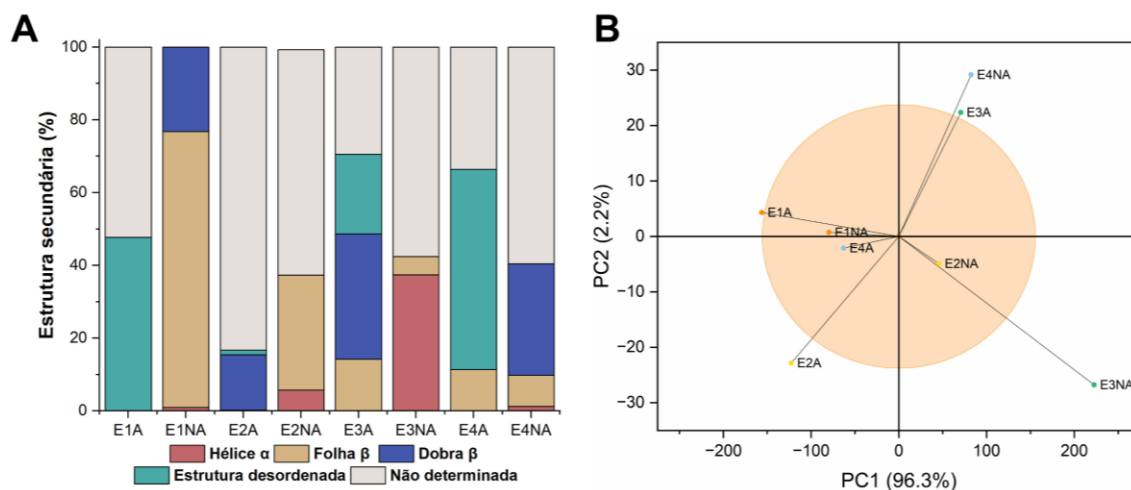


A estrutura secundária das amostras variou consideravelmente em função das condições de cultivo empregadas. A maioria das amostras apresentou conformações estruturais que não puderam ser completamente determinadas, com exceção de E1NA, cuja estrutura foi integralmente estimada (Figura 5A). Foi estimado para E1NA uma composição de estruturas de folha β (75,77%), voltas β (23,21%) e hélices α (1,00%).

A PCA dos espectros de FTIR revelou que tanto as condições de agitação quanto a composição do meio de cultura exerceram influência significativa sobre a composição

química dos extratos proteicos (Figura 5B). A análise dos *loadings* destacou que a região entre 1620 e 1640 cm^{-1} , característica de proteínas, foi a que mais contribuiu para a diferenciação entre as amostras.

Figura 5 – Análise dos dados de FTIR-ATR. (A) Percentual de estruturas secundárias; (B) Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada aos espectros de FTIR-ATR. E: Número do experimento (1–4). A: Agitado. NA: Não agitado.

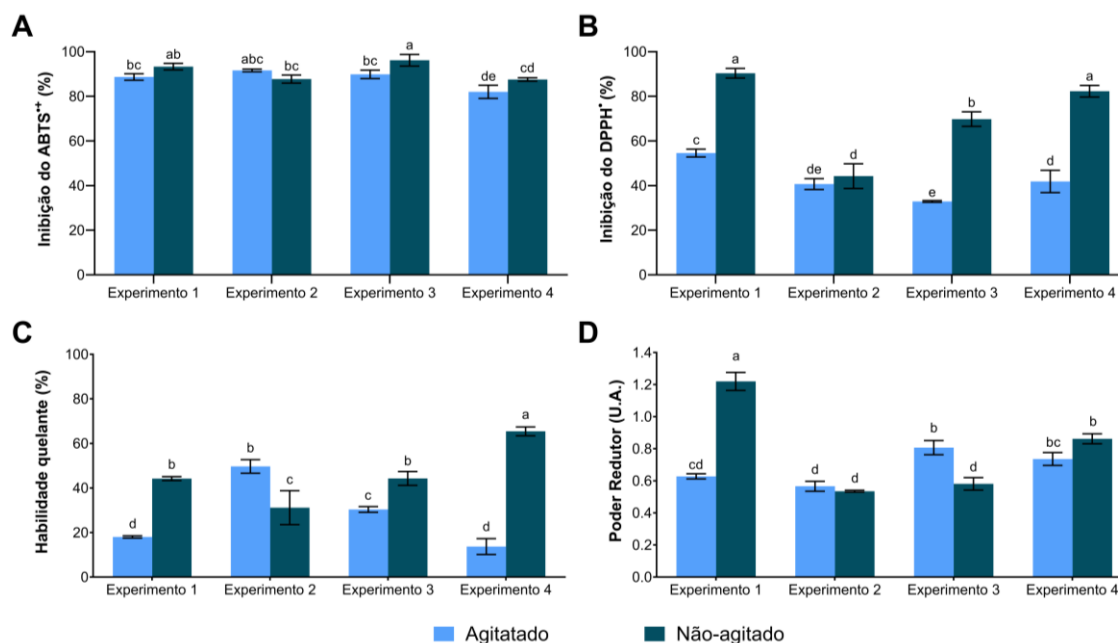


5.3.3. Atividade antioxidante

A análise do potencial antioxidante *in vitro* revelou elevada capacidade de sequestro do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ em todos os extratos proteicos, com valores superiores a 80% (Figura 6A). Por outro lado, a inibição do radical $\text{DPPH}^{\bullet}$ foi mais seletiva, sendo observada atividade significativa apenas em E1NA, E3NA e E4NA (Figura 6B).

A capacidade de quelação de Fe^{2+} foi significativamente maior em E4NA ($65,43 \pm 1,97\%$), em comparação às demais amostras (Figura 6C). Na avaliação do poder redutor de Fe^{3+} , a maior atividade foi observada novamente para E1NA ($1,220 \pm 0,056$) (Figura 6D). Adicionalmente, a amostra E1NA exibiu a maior capacidade de inibição dos radicais $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e $\text{DPPH}^{\bullet}$, necessitando de concentrações mais baixas para inibir 50% (CI_{50}) desses radicais (Tabela 4).

Figura 6 – Atividade antioxidante em extratos proteicos da biomassa micelial de *G. sichuanense* cultivada sob diferentes condições de fermentação submersa. (A) ABTS^{•+}; (B) DPPH[•]; (C) Habilidade quelante; (D) Poder redutor.



Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 1%.

Tabela 4 – Valores de CI₅₀ dos extratos proteicos para a atividade de sequestro dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•].

Experimento		ABTS ^{•+}		DPPH [•]	
n.º	Condição	CI ₅₀ (µg de extrato.mL ⁻¹)	CI ₅₀ (µg de proteína.mL ⁻¹)	CI ₅₀ (µg de extrato.mL ⁻¹)	CI ₅₀ (µg de proteína.mL ⁻¹)
1	Agitada	1225,0 ± 114,5	42,9 ± 4,0	9681,3 ± 270,5	339,2 ± 9,5
	Não-agitada	507,2 ± 19,4	4,8 ± 0,2	2550,0 ± 96,5	24,0 ± 0,9
2	Agitada	927,4 ± 10,0	29,6 ± 0,3	ND	ND
	Não-agitada	637,4 ± 11,2	6,0 ± 0,1	ND	ND
3	Agitada	1405,0 ± 210,6	36,5 ± 5,5	ND	ND
	Não-agitada	1852,0 ± 96,6	29,9 ± 1,6	8134,7 ± 296,8	131,5 ± 4,8
4	Agitada	1711,3 ± 89,5	32,9 ± 1,7	ND	ND
	Não-agitada	1064,2 ± 79,7	10,1 ± 0,8	6474,3 ± 216,0	61,3 ± 2,0

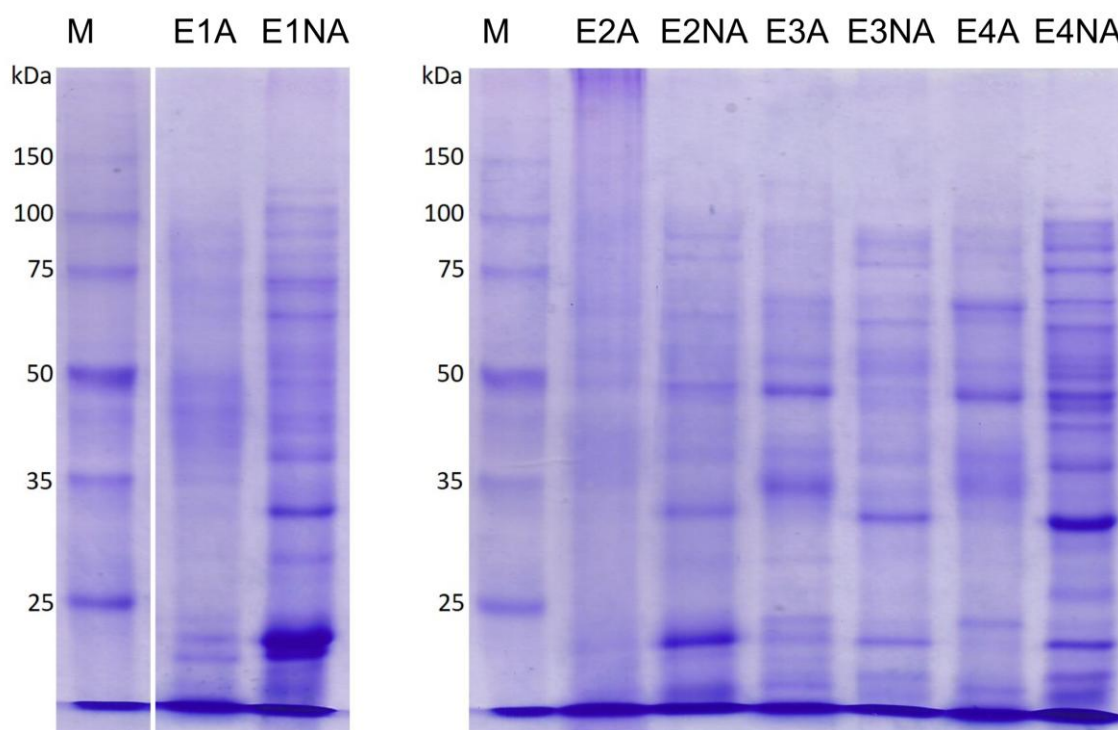
ND: não determinado.

5.3.4. Perfil eletroforético

A análise eletroforética revelou um perfil proteico heterogêneo entre os extratos, com bandas variando de aproximadamente 12 a 125 kDa. Os extratos E1NA e E4NA apresentaram um padrão de bandas mais intenso e complexo (Figura 7), corroborando

com o maior teor de proteínas e as atividades antioxidantes mais elevadas observadas para esses extratos, sugerindo uma associação entre a composição proteica e as atividades avaliadas.

Figura 7 – SDS-PAGE dos extratos proteicos da biomassa micelial de *G. sichuanense* cultivada sob diferentes condições de fermentação submersa. M: Marcador de massa molecular. E: Número do experimento (1–4). A: Agitado. NA: Não agitado.



5.3.5. Parâmetros do bioprocesso de E1NA

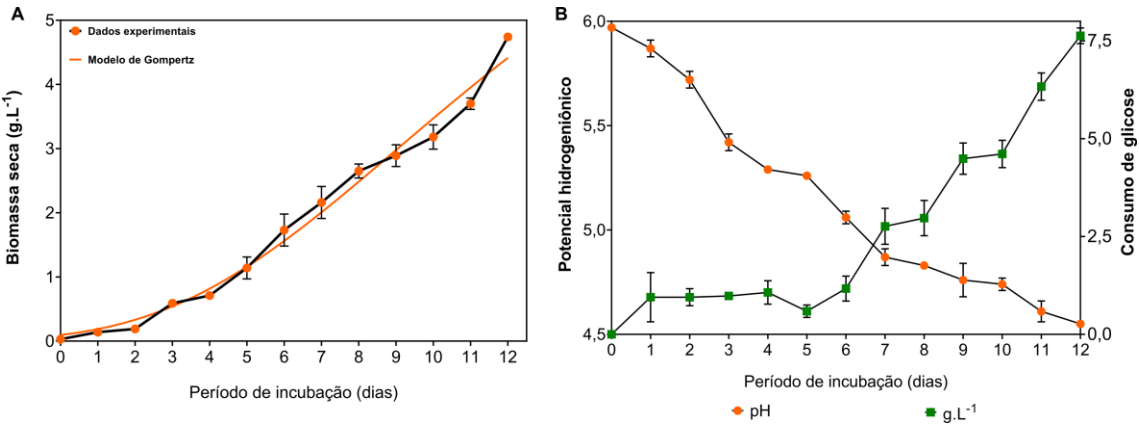
O meio de cultivo 1 na ausência de agitação (E1NA), que resultou no extrato proteico com a maior atividade antioxidante, teve sua cinética de crescimento avaliada. Dois modelos matemáticos foram ajustados aos dados experimentais para estimar a taxa específica de crescimento. O modelo de Gompertz foi o que melhor descreveu o crescimento de *G. sichuanense*, visto que apresentou valores mais baixos no Critério de Informação de Akaike corrigido (AICc) e no erro quadrático médio da raiz (RMSE), além de maior R-quadrado ajustado (R^2_{adj}) (Tabela 5).

Tabela 5 – Modelos matemáticos da cinética de crescimento de *G. sichuanense* em meio composto por glicose (10 g·L⁻¹), peptona de soja (2,5 g·L⁻¹) e extrato de levedura (5 g·L⁻¹), sob condição não agitada (E1NA).

Modelo	Taxa de Crescimento específica (h ⁻¹)	R ² _{adj}	AICc	RMSE
Exponencial	0,0084	0,9484	-80,2	0,3327
Gompertz	0,0068	0,9793	-114,4	0,2077

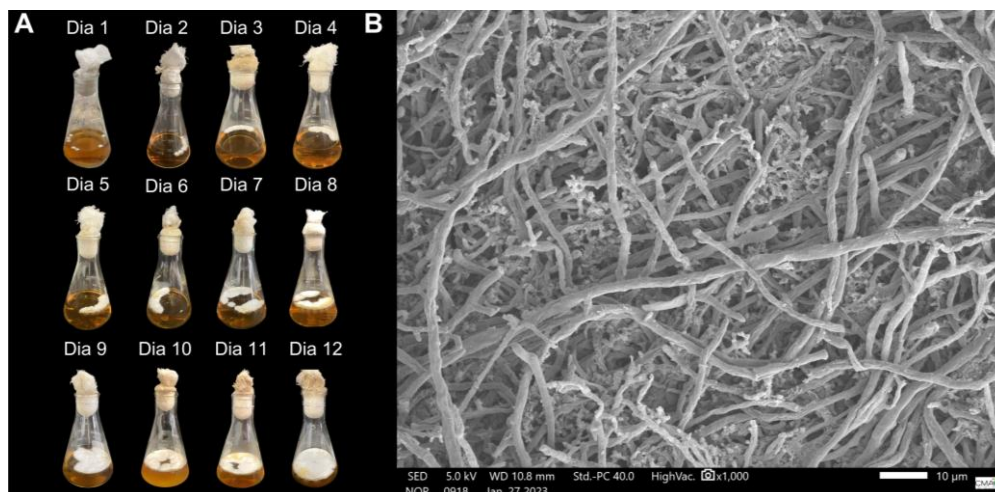
A cinética de crescimento de *G. sichuanense* apresentou um padrão típico de crescimento microbiano, com uma fase lag durante os dois primeiros dias de cultivo, seguida por uma fase exponencial bem definida. Essa fase estendeu-se do terceiro dia até o final do período de cultivo (Figura 8A). Paralelamente ao crescimento micelial, observou-se redução progressiva do pH do meio, atingindo 4,55 ± 0,01, e aumento do consumo de açúcares a partir do sétimo dia, alcançando 76,3% ao final do cultivo (Figura 8B).

Figura 8 – Cinética do crescimento (A) e consumo de glicose e pH do caldo de cultivo (B) de *G. sichuanense* na condição E1NA.



A macromorfologia fúngica demonstrou a dispersão do micélio ao longo de todo o período de cultivo, aumentando a superfície de contato com o meio líquido, favorecendo a assimilação de nutrientes e sustentando um crescimento vigoroso, até cobrir a superfície do meio de cultivo no 12º dia (Figura 9A). A análise microscópica da biomassa coletada no final do cultivo revelou uma combinação de hifas longas e tubulares com hifas curtas e altamente ramificadas, denominadas “hifas tipo chifre de veado” (Figura 9B).

Figura 9 – Morfologia da biomassa micelial de *Ganoderma sichuanense* CC22 da condição E1NA. (A) Macromorfologia; (B) Micromorfologia.



5.4. Discussão

Os teores de proteínas solúveis obtidos para *G. sichuanense* foram semelhantes aos relatados para o cogumelo comestível *P. ostreatus*, cujas concentrações variaram entre 35 e 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, conforme as variações no pH de 2 a 8 (González et al., 2021). A variação no teor de proteínas solúveis entre as condições de cultivo pode estar relacionada à ausência de forças de cisalhamento durante o cultivo não agitado. Em cultivos sob agitação, esse estresse mecânico pode causar danos ao micélio e favorecer o extravasamento de componentes intracelulares, conforme já descrito para *G. lucidum* (Elisashvili, 2012; Petre; Petre, 2016).

A caracterização de extratos proteicos frequentemente é dificultada pela presença de compostos fenólicos e de outras moléculas capazes de interferir nas análises (Wu et al., 2014). Embora a etapa de diálise empregada durante a extração proteica seja eficiente para remover compostos fenólicos livres, essa estratégia não é eficaz quando esses compostos se encontram complexados às proteínas (Liu et al., 2019), como sugerem os resultados obtidos neste estudo. Contudo, as interações entre proteínas e polifenóis podem mascarar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos, de modo que a atividade observada pode ser atribuída tanto às proteínas quanto aos complexos proteína-polifenol formados (Jakobek, 2015).

Em sistemas simples, como matrizes alimentares, a formação de complexos proteína-polifenol ocorre sob condições adequadas de pH, força iônica e temperatura, sendo mediada principalmente por interações não covalentes, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, forças eletrostáticas e forças de van der Waals. Essas

associações podem conferir vantagens funcionais, incluindo o aumento da atividade antioxidante e a obtenção de sistemas bioativos, como emulsões, géis, filmes para embalagens e plataformas de liberação de compostos bioativos (Feng et al., 2023). Nesse contexto, o extrato proteico obtido na condição E1NA apresenta potencial para aplicações biotecnológicas e no desenvolvimento de produtos funcionais.

A extração assistida por sal é uma técnica amplamente estabelecida, com elevada eficiência da extração e que, ao mesmo tempo, preserva a funcionalidade das proteínas. O NaCl é comumente empregado para promover o efeito *salting-in*, no qual baixas concentrações de sal exercem influência mínima sobre a estrutura proteica. As interações fracas estabelecidas entre os íons carregados e as proteínas reduzem a agregação molecular e favorecem o aumento da solubilidade proteica. Entretanto, esse efeito pode variar em função de fatores como a concentração de proteínas da amostra, o que pode explicar as diferenças observadas na microestrutura dos extratos obtidos no presente trabalho (Jiang et al., 2021; Lawal, 2004).

O tamanho médio das partículas é outro fator capaz de influenciar as propriedades funcionais dos materiais proteicos (Hu et al., 2015). Essa característica afeta diretamente a solubilidade, uma vez que partículas menores apresentam maior área superficial disponível para hidratação, favorecendo sua interação com o meio (Wang et al., 2020). Além disso, o tamanho das partículas pode influenciar a aplicação industrial dos extratos proteicos, por afetar suas propriedades tecnológicas e biofuncionais (Chen; Chi; Xu, 2012; Jeewanthi; Lee; Paik, 2015).

Um estudo que avaliou diferentes concentrações de NaCl na extração de proteínas de sementes de *Moringa oleifera* descreveu estruturas semelhantes às observadas no presente estudo quando utilizada a concentração de 0,15 M. Segundo os autores, essas estruturas são adequadas para análises de solubilidade proteica, hidrofobicidade superficial e espectroscopia (Du et al., 2022).

O padrão de difração obtido por DRX é característico de materiais predominantemente amorfos (Fernandes et al., 2014), o que é importante do ponto de vista tecnológico, uma vez que sólidos amorfos tendem a apresentar maior solubilidade e estabilidade quando comparados às estruturas cristalinas, tornando-se mais adequados para aplicações farmacêuticas (Schittny; Huwyler; Puchkov, 2019). Os picos de difração observados são compatíveis com estruturas secundárias do tipo folha β , enquanto as variações em sua intensidade sugerem alterações na conformação global das proteínas (Zhao et al., 2015). Padrões de difração semelhantes já foram descritos para isolado

proteico de soro de leite (Ghadetaj; Almasi; Mehryar, 2018) e para extratos de *G. lucidum* (Mousavi et al., 2023), corroborando os resultados obtidos neste estudo.

As bandas espectrais observadas por FTIR-ATR são características de proteínas e semelhantes ao descrito para isolados proteicos do soro de leite (Gbassi et al., 2026). As bandas em 3280, 2920, 1630, 1540, 1400 e 1050 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, às vibrações de estiramento dos grupos -OH associados ao -NH₂, à presença de grupos -CH₂, aos grupos amida I e amida II das proteínas e às ligações C-O, C-C e C-OH.

Em *G. lucidum*, a região espectral entre 1700 e 1500 cm^{-1} , correspondente às vibrações de estiramento das ligações amida, mostrou-se altamente informativa para a avaliação do conteúdo proteico, especialmente da proteína imunomoduladora fúngica FIP-glu/LZ-8 (Choong et al., 2012). Essa região apresenta pequenas variações espectrais, refletindo a estabilidade do conteúdo proteico. Além disso, bandas em ~1648 cm^{-1} têm sido propostas como marcadores bioquímicos confiáveis para a presença de proteínas (Qiu et al., 2023).

O extrato proteico obtido na condição E1NA apresentou estruturas secundárias compatível com o descrito para proteínas imunomoduladoras fúngicas, incluindo a FIP-glu isolada de *G. lucidum* (Shao et al., 2019). Em contraste, as demais condições apresentaram maior proporção de estruturas desordenadas e não-determinadas, o que pode refletir tanto a presença de regiões intrinsecamente sem ordenação, quanto limitações na resolução estrutural da metodologia empregada (De Meutter; Goormaghtigh, 2021). Além disso, não se pode descartar a influência de outras moléculas presentes nos extratos, uma vez que interações entre proteínas e polifenóis podem promover alterações conformacionais e modificar a estabilidade estrutural das proteínas (Yang et al., 2019).

Estudos anteriores com a biomassa micelial de *G. lucidum* relataram valores de CI₅₀ para inibição do radical ABTS^{•+} de 927 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em extrato aquoso (Mohsin; Negi; Ahmed, 2011) e atividade específica de 2,47 μg de proteína $\cdot\text{mL}^{-1}$ (Sa-ard et al., 2015). Para o radical DPPH[•], foram descritos valores de CI₅₀ de 2067,47 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para extratos aquosos (Lee; Lim, 2019), 9000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para extratos metanólicos (Rajoriya; Tripathy; Gupta, 2015) e 135,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para uma glicoproteína isolada de *G. lucidum* (Wu; Wang, 2009). Em comparação, os resultados obtidos neste estudo, especialmente para o extrato E1NA, evidencia-se o elevado potencial antioxidante, reforçando a influência das condições de fermentação submersa na biossíntese de compostos bioativos.

A elevada capacidade de sequestro de radicais livres observada nos extratos

proteicos pode estar relacionada à presença de proteínas ricas em aminoácidos como tirosina, fenilalanina, triptofano, cisteína, lisina, arginina e histidina. Esses resíduos são capazes de doar elétrons ou átomos de hidrogênio, neutralizando espécies reativas e protegendo biomoléculas contra danos oxidativos (Elias; Kellerby; Decker, 2008).

Os ensaios com os radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} diferem quanto aos seus mecanismos de avaliação da capacidade antioxidante. O radical DPPH[•] pode ser estabilizado tanto pela transferência de elétrons quanto pela doação de átomos de hidrogênio, enquanto o ABTS^{•+} reage preferencialmente com compostos capazes de doar hidrogênio (Boligon; Machado; Athayde, 2014; Nimse; Pal, 2015). Em razão de sua maior sensibilidade e da cinética de reação mais rápida (Martysiak-Żurowska; Wenta, 2012), o método ABTS^{•+} é considerado mais adequado para avaliar a atividade antioxidante de proteínas, que são predominantemente moléculas hidrofílicas (Chen et al., 2023).

Os resultados obtidos no ensaio de habilidade quelante foram comparáveis aos descritos para extratos metanólicos de basidiomas de *Ganoderma tsugae*, que apresentaram aproximadamente 65% de quelação na concentração de 10 mg·mL⁻¹ (Mau et al., 2005), e para polissacarídeos de *G. lucidum*, com cerca de 70% de quelação na mesma concentração (Kozarski et al., 2012). Esses resultados reforçam o potencial antioxidante e a capacidade de quelação de metais dos extratos proteicos de *G. sichuanense*.

Quanto ao poder redutor, o extrato etanólico de basidiomas de *G. lucidum* apresentou atividade significativamente inferior, sendo necessárias concentrações superiores a 160 mg·mL⁻¹ para atingir absorvância de 1,0 (Rajasekaran; Kalaimagal, 2011). De forma semelhante, o extrato metanólico dos basidiomas do cogumelo comestível *Pleurotus eous* apresentou absorvância de 1,132 na concentração de 10 mg·mL⁻¹ (Sudha et al., 2012). Em comparação, os extratos proteicos obtidos neste estudo demonstraram elevada capacidade redutora em concentrações substancialmente menores.

A capacidade dos extratos proteicos de interagir com íons metálicos, especialmente ferro, pode ser atribuída à presença de resíduos de aminoácidos contendo grupos doadores de elétrons, como histidina (nitrogênio), glutamato e aspartato (oxigênio) e metionina e cisteína (enxofre), capazes de formar complexos de coordenação com íons metálicos (Quintanar; Rivillas-Acevedo, 2013). Da mesma forma, a atividade quelante pode estar relacionada à presença de grupos funcionais, como hidroxila (-OH), tiol (-SH) e carboxila (-COOH), presentes nas cadeias laterais das proteínas, que atuam como ligantes e estabilizam esses complexos metálicos (Kontoghiorghes; Kontoghiorghes,

2020).

Proteínas de baixa massa molecular, geralmente com massa molecular entre 12 e 15 kDa, incluindo as FIPs, têm sido associadas à maior atividade antioxidante em *G. lucidum* (Lin et al., 2022; Sarnthima; Khammaung; Sa-ard, 2017). Assim, a maior intensidade de bandas proteicas abaixo de 25 kDa, observada para os extratos proteicos E1NA e E4NA, sugere associação com o maior potencial atividade antioxidante desses extratos.

Embora a hidrólise enzimática seja frequentemente empregada para aumentar a biodisponibilidade e a atividade biológica de peptídeos, estudos com *G. lucidum* indicam que esse processo pode reduzir a atividade antioxidante (Sarnthima; Khammaung; Sa-ard, 2017). Nesse contexto, os extratos proteicos de *G. sichuanense* obtidos no presente trabalho representam uma alternativa promissora, por dispensarem tratamentos enzimáticos adicionais e manterem elevada atividade antioxidante, características que favorecem sua aplicação em processos biotecnológicos.

Estudos envolvendo proteínas provenientes do micélio e do caldo fermentado de *G. lucidum* demonstraram a presença de bandas proteicas ausentes nos basidiomas, sugerindo que determinadas proteínas podem ser sintetizadas em resposta às condições impostas pela fermentação submersa (Sa-ard et al., 2015; Sarnthima; Khammaung; Sa-ard, 2017). Nesse sentido, diferenças na intensidade e na massa molecular das bandas proteicas também podem refletir modificações pós-traducionais, processos de proteólise, variabilidade genética entre linhagens e condições de cultivo, incluindo a exposição a fatores de estresse (Li et al., 2018).

A exposição de fungos a condições de estresse térmico e oxidativo pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que atuam como moléculas sinalizadoras na ativação de respostas adaptativas ao estresse (Liu et al., 2018). Como consequência, ocorre a indução da síntese de proteínas e de outras moléculas antioxidantes, contribuindo para a proteção celular frente aos danos oxidativos (Morano; Grant; Moye-Rowley, 2012; Zhang et al., 2016). Embora não tenham sido encontrados estudos demonstrando a produção de proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins* – HSPs) por *G. lucidum* em resposta ao estresse oxidativo, sua indução durante a fermentação submersa sob estresse térmico já é relatada (Liu et al., 2017).

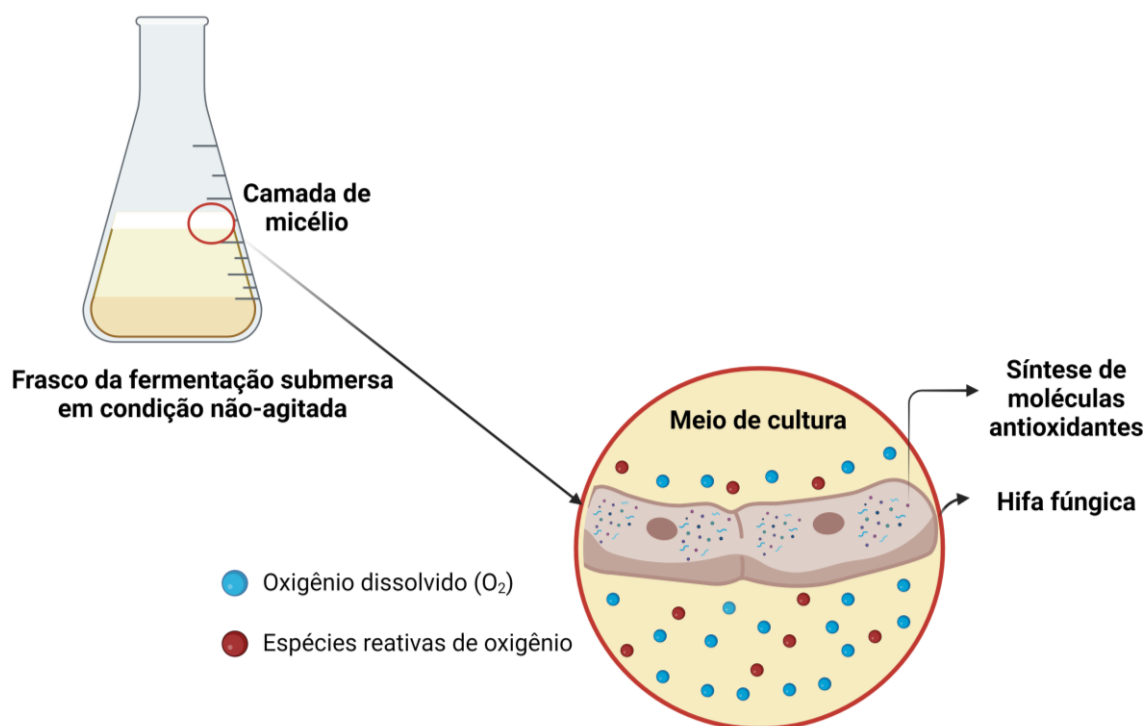
O estresse oxidativo também pode promover alterações no metabolismo fúngico, modulando a expressão de diversas proteínas (Li et al., 2011). Entre elas, destacam-se as HSPs, cuja expressão pode ser aumentada em resposta a variações de temperatura, pH e

condições oxidativas, desempenhando papel fundamental na manutenção da homeostase celular (Tiwari; Thakur; Shankar, 2015).

Durante a fermentação submersa, a agitação favorece a transferência de oxigênio para o meio de cultivo, contribuindo para o equilíbrio entre a disponibilidade de oxigênio e o consumo metabólico do fungo (Kachrimanidou et al., 2023). Em contrapartida, a ausência de agitação pode reduzir a transferência de oxigênio, favorecendo condições de limitação de oxigênio, fenômeno já descrito em processos fermentativos com fungos (Weber; Agblevor, 2005).

Considerando a maior produção de proteínas e a maior atividade antioxidante observadas na ausência de agitação, propõe-se que a limitação na transferência de oxigênio possa ter desencadeado respostas adaptativas relacionadas ao estresse oxidativo, culminando no aumento da produção de proteínas com potencial antioxidante (Figura 10). Embora esse mecanismo não tenha sido investigado diretamente neste estudo, ele fornece uma hipótese para explicar os resultados obtidos e indica que o controle da transferência de oxigênio pode representar uma estratégia promissora para otimizar a produção de proteínas bioativas por *G. sichuanense*.

Figura 10 – Mecanismo proposto para a indução de estresse oxidativo durante a fermentação submersa de *Ganoderma sichuanense* sob condição estática. Figura criada no BioRender. Pessoa, V. (2024). <https://BioRender.com/k64h913>.



O modelo de Gompertz, amplamente utilizado para descrever a cinética de crescimento microbiano em condições controladas (Tarlak, 2020) e o acúmulo de biomassa de cogumelos (Kumar et al., 2020), mostrou-se adequado para descrever o crescimento de *G. sichuanense* sob cultivo estático. De forma semelhante, na fermentação submersa de *Ganoderma* sp. conduzida sob agitação a 100 rpm, o modelo de Gompertz também apresentou o melhor ajuste aos dados experimentais, com taxa específica de crescimento de $0,0087 \text{ h}^{-1}$ (Rosales-López et al., 2022). Esses resultados demonstram que o cultivo estático constitui uma estratégia eficiente para a produção de biomassa fúngica, além de favorecer a obtenção de extratos proteicos com elevado potencial antioxidante.

Apesar de o fungo ter colonizado completamente a superfície do meio de cultivo no 12º dia, o crescimento permaneceu na fase exponencial. Esse período é adequado para a coleta da biomassa, uma vez que é caracterizado pela intensa síntese de metabólitos primários, incluindo proteínas essenciais para a proliferação e o desenvolvimento celular (Sanchez; Demain, 2008). Dessa forma, a interrupção do cultivo nesse momento mostrou-se apropriada e compatível com o objetivo de maximizar a produção de proteínas.

A acidificação do meio de cultivo observada ao final da fermentação constitui um fenômeno comum em processos fermentativos envolvendo fungos, estando associada à produção de ácidos orgânicos decorrentes do metabolismo de carboidratos (Fang; Zhong, 2002). As “hifas tipo chifre de veado” observadas neste estudo também já foram descritas em *G. lucidum*, *G. carnosum*, *G. resinaceum*, *G. sinense* e *G. oregonense*, sendo mais abundantes durante o desenvolvimento do micélio aéreo (Adaskaveg; Gilbertson, 1986; Boromenskyi; Bisko, 2019). Considerando que essa morfologia diferenciada está associada ao intenso remodelamento da parede celular e à síntese de proteínas estruturais e secretadas, levanta-se a hipótese de que sua ocorrência possa estar relacionada ao maior acúmulo de proteínas observado na condição E1NA. Entretanto, essa hipótese deverá ser confirmada em estudos futuros.

Estudos futuros deverão concentrar-se na identificação das proteínas presentes no extrato E1NA por técnicas proteômicas, permitindo a caracterização molecular dos principais componentes responsáveis pela atividade observada. Além disso, a avaliação do potencial biológico desse extrato em modelos celulares, a ampliação da produção em escala piloto e a investigação da estabilidade dos extratos sob diferentes condições de processamento constituem etapas importantes para validar sua aplicabilidade biotecnológica e subsidiar futuras aplicações industriais.

5.5. Conclusões

Os extratos proteicos obtidos da biomassa de *G. sichuanense* CC22 foram caracterizados estruturalmente e demonstraram potencial para aplicações biotecnológicas. O extrato obtido a partir do cultivo sem agitação em meio contendo 10 g·L⁻¹ de glicose, 2,5 g·L⁻¹ de peptona de soja e 5 g·L⁻¹ de extrato de levedura (E1NA) destacou-se por apresentar maior concentração de proteínas e compostos fenólicos, além de elevada atividade antioxidante, sugerindo a formação de complexos proteína-fenol favoráveis à atividade antioxidante, com baixo CI₅₀ nos ensaios com ABTS^{•+} e DPPH[•] e elevado poder redutor de Fe³⁺.

A ausência de agitação durante o cultivo induziu a presença de proteínas distintas daquelas observadas sob agitação, possivelmente relacionadas a respostas ao estresse oxidativo decorrente da limitação da transferência de oxigênio. Além disso, a presença de hifas do tipo chifre de veado esteve associada a biomassa com maior conteúdo proteico, sugerindo que essa morfologia favoreça o acúmulo dessas moléculas. Em conjunto, esses resultados demonstram que a manipulação das condições de fermentação submersa constitui uma estratégia eficaz para modular a produção de proteínas antioxidantes por *G. sichuanense*.

Referências

- ADASKAVEG, James E.; GILBERTSON, Robert L. Cultural Studies and Genetics of Sexuality of *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae* in Relation to the Taxonomy of the *G. lucidum* Complex. **Mycologia**, v. 78, n. 5, p. 694–705, 1986.
- BOLIGON, Aline Augusti; MACHADO, Michel Mansur; ATHAYDE, Margareth Linde. Technical Evaluation of Antioxidant Activity. **Medicinal chemistry**, v. 4, n. 7, p. 517–522, 2014.
- BOROMENSKYI, D. O.; BSKO, N. A. Micromorphological features of species of *Ganoderma* (Ganodermataceae) in pure culture. **Ukrainian Botanical Journal**, v. 76, n. 6, p. 486–492, 2019.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.
- CHEN, Chen; CHI, Yu-Jie; XU, Wei. Comparisons on the Functional Properties and Antioxidant Activity of Spray-Dried and Freeze-Dried Egg White Protein Hydrolysate. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 6, p. 2342–2352, 2012.

- CHEN, Yajuan *et al.* Proteins, polysaccharides and their derivatives as macromolecular antioxidant supplements: A review of in vitro screening methods and strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 224, p. 958–971, 2023.
- CHEVREUIL, Larissa Ramos *et al.* Recovery of Proteases and Protease Inhibitors from *Ganoderma* spp. Cultivated in Amazonian Lignocellulose Wastes. **Current Protein and Peptide Science**, v. 26, n. 1, p. 76–88, 2025.
- CHINTHANOM, Panida *et al.* Lanostane triterpenoids from cultivated fruiting bodies of *Ganoderma sichuanense*: Determination of the C-25 absolute configuration of ganoderic acid A and its derivatives using the phenylglycine methyl ester (PGME) method. **Phytochemistry**, v. 192, p. 112963, 2021.
- CHOONG, Yew Keong *et al.* Preliminary Results of Determination of Chemical Changes on Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.)P. Karst. (Higher Basidiomycetes) Carried by Shenzhou I Spaceship with FTIR and 2D-IR Correlation Spectroscopy. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 14, n. 3, 2012.
- DE MEUTTER, Joëlle; GOORMAGHTIGH, Erik. Evaluation of protein secondary structure from FTIR spectra improved after partial deuteration. **European Biophysics Journal**, v. 50, n. 3, p. 613–628, 2021.
- DU, Ming *et al.* Purification and characterization of a novel fungi Se-containing protein from Se-enriched *Ganoderma lucidum* mushroom and its Se-dependent radical scavenging activity. **European Food Research and Technology**, v. 224, n. 5, p. 659–665, 2007.
- DU, Qiu-Han *et al.* Extraction concentration of NaCl on structural, physicochemical and functional properties of *Moringa oleifera* seeds protein. **LWT**, v. 155, p. 112988, 2022.
- DU, Zhuo *et al.* Re-Examination of the Holotype of *Ganoderma sichuanense* (Ganodermataceae, Polyporales) and a Clarification of the Identity of Chinese Cultivated Lingzhi. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 3, p. 323, 2023.
- ELIAS, Ryan J.; KELLERBY, Sarah S.; DECKER, Eric A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 430–441, 2008.
- ELISASHVILI, Vladimir I. Submerged Cultivation of Medicinal Mushrooms: Bioprocesses and Products (Review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 14, n. 3, 2012.
- FANG, Qing-Hua; ZHONG, Jian-Jiang. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 769–774, 2002.
- FENG, Yulin *et al.* Molecular Mechanisms and Applications of Polyphenol-Protein Complexes with Antioxidant Properties: A Review. **Antioxidants**, v. 12, n. 8, p. 1577, 2023.

FERNANDES, Regiane Victória de Barros *et al.* Physical and chemical properties of encapsulated rosemary essential oil by spray drying using whey protein–inulin blends as carriers. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 6, p. 1522–1529, 2014.

GBASSI, Gildas K. *et al.* Whey proteins analysis in aqueous medium and in artificial gastric and intestinal fluids. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 6, n. 4, p. 1828–1837, 2026.

GHADETAJ, Ali; ALMASI, Hadi; MEHRYAR, Laleh. Development and characterization of whey protein isolate active films containing nanoemulsions of *Grammosciadium ptrocarpum* Bioss. essential oil. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 16, p. 31–40, 2018.

GONZÁLEZ, Abigail *et al.* Evaluation of functional and nutritional potential of a protein concentrate from *Pleurotus ostreatus* mushroom. **Food Chemistry**, v. 346, p. 128884, 2021.

GUO, Zhi-Jian *et al.* Evaluating the Application Potential of a Recombinant Ganoderma Protein as Bioactive Ingredients in Cosmetics. **Molecules**, v. 28, n. 7, p. 3272, 2023.

HU, Hao *et al.* Effect of high intensity ultrasound on physicochemical and functional properties of aggregated soybean β -conglycinin and glycinin. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 102–110, 2015.

JAKOBEK, Lidija. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food Chemistry**, v. 175, p. 556–567, 2015.

JEEWANTHI, Renda Kankanamge Chaturika; LEE, Na-Kyoung; PAIK, Hyun-Dong. Improved Functional Characteristics of Whey Protein Hydrolysates in Food Industry. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 35, n. 3, p. 350–359, 2015.

JIANG, Yongli *et al.* Effects of salting-in/out-assisted extractions on structural, physicochemical and functional properties of *Tenebrio molitor* larvae protein isolates. **Food Chemistry**, v. 338, p. 128158, 2021.

KACHRIMANIDOU, Vasiliki *et al.* *Ganoderma lucidum* Mycelia Mass and Bioactive Compounds Production through Grape Pomace and Cheese Whey Valorization. **Molecules**, v. 28, n. 17, p. 6331, 2023.

KHATUA, S.; GHOSH, S.; ACHARYA, K. Simplified Methods for Microtiter Based Analysis of In Vitro Antioxidant Activity. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 11, n. 2, 2017.

KINO, K. *et al.* Isolation and Characterization of a New Immunomodulatory Protein, Ling Zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 1, p. 472–478, 1989.

KONTOGHIORGHES, George J.; KONTOGHIORGHE, Christina N. Iron and Chelation in Biochemistry and Medicine: New Approaches to Controlling Iron Metabolism and Treating Related Diseases. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1456, 2020.

- KOZARSKI, Maja *et al.* Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, n. 1, p. 144–153, 2012.
- KUMAR, Vinod *et al.* Effects of treated sugar mill effluent and rice straw on substrate properties under milky mushroom (*Calocybe indica* P&C) production: Nutrient utilization and growth kinetics studies. **Environmental Technology & Innovation**, v. 19, p. 101041, 2020.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LAWAL, Olayide S. Functionality of African locust bean (*Parkia biglobossa*) protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. **Food Chemistry**, v. 86, n. 3, p. 345–355, 2004.
- LEE, Hyeong-Ryeol; LIM, Heung-Bin. Antimutagenic and antioxidative effects of polysaccharides isolated from the water extract of *Ganoderma lucidum*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 9, n. 4, p. 001–007, 2019.
- LI, Chun-Hong *et al.* SDS-PAGE and 2-DE protein profiles of *Ganoderma lucidum* from different origins. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 2, p. 447–454, 2018.
- LI, Q. *et al.* Oxidative stress in fungal fermentation processes: the roles of alternative respiration. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 3, p. 457–467, 2011.
- LI, Qi-Zhang *et al.* Immunomodulatory activity of *Ganoderma lucidum* immunomodulatory protein via PI3K/Akt and MAPK signaling pathways in RAW264.7 cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 12, p. 23337–23348, 2019.
- LI, Xuefei *et al.* Characterization and fungicide sensitivity of *Trichoderma* species causing green mold of *Ganoderma sichuanense* in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023.
- LIN, Jingwei *et al.* *Ganoderma* immunomodulatory proteins: mushrooming functional FIPs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 7, p. 2367–2380, 2022.
- LIU, Jun *et al.* Recent advances in phenolic–protein conjugates: synthesis, characterization, biological activities and potential applications. **RSC Advances**, v. 9, n. 61, p. 35825–35840, 2019.
- LIU, Rui *et al.* Heat stress-induced reactive oxygen species participate in the regulation of HSP expression, hyphal branching and ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum*. **Microbiological Research**, v. 209, p. 43–54, 2018.
- LIU, Yong-Nan *et al.* Identification of Reference Genes and Analysis of Heat Shock Protein Gene Expression in Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum*, after Exposure to Heat Stress. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 19, n. 11, 2017.

- LUO, Hong-jian *et al.* Structural characterization and anti-oxidative activity for a glycopeptide from *Ganoderma lucidum* fruiting body. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 261, p. 129793, 2024.
- MARTYSIAK-ŻUROWSKA, Dorota; WENTA, Weronika. A Comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 11, n. 1, p. 83–89, 2012.
- MAU, Jeng-Leun *et al.* Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*. **Food Chemistry**, v. 93, n. 4, p. 641–649, 2005.
- MENG, Chaolu *et al.* DP-AOP: A novel SVM-based antioxidant proteins identifier. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 247, p. 125499, 2023.
- MOHSIN, Mohammed; NEGI, Prem Singh; AHMED, Zakwan. Determination of the Antioxidant Activity and Polyphenol Contents of Wild Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt. Fr.) P. Karst. (Higher Basidiomycetes) from Central Himalayan Hills of India. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 13, n. 6, 2011.
- MORANO, Kevin A.; GRANT, Chris M.; MOYE-ROWLEY, W. Scott. The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 190, n. 4, p. 1157–1195, 2012.
- MOUSAVI, Seyyed Mojtaba *et al.* *Ganoderma lucidum* methanolic extract as a potent phytoconstituent: characterization, in-vitro antimicrobial and cytotoxic activity. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 17326, 2023.
- NIMSE, Satish Balasaheb; PAL, Dilipkumar. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015.
- OLIVEIRA-JUNIOR, S. D. *et al.* Adding-value to *Ganoderma lingzhi* by producing enzymes and antioxidant compounds under submerged fermentation using different culture media. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e283882, 2024.
- PAPP, Viktor. The Lingzhi naming dilemma: Overlooked and long-forgotten names threaten nomenclatural stability. **Fungal Biology Reviews**, v. 47, p. 100338, 2024.
- PESSOA, V. A. *et al.* Production of mycelial biomass, proteases and protease inhibitors by *Ganoderma lucidum* under different submerged fermentation conditions. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e270316, 2023.
- PETRE, Marian; PETRE, Violeta. Biotechnology of Mushroom Growth Through Submerged Cultivation. In: PETRE, Marian (Org.). **Mushroom Biotechnology**. San Diego: Academic Press, 2016. p. 1–18.
- QIU, Guansheng *et al.* Determination on Tree Species Selection for Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes) Cultivation by Fourier Transform Infrared and Two-Dimensional Infrared Correlation Spectroscopy. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 25, n. 1, 2023.

- QUINTANAR, Liliana; RIVILLAS-ACEVEDO, Lina. Studying metal ion-protein interactions: electronic absorption, circular dichroism, and electron paramagnetic resonance. **Methods in Molecular Biology**, v. 1008, p. 267–297, 2013.
- RAJASEKARAN, Muthiah; KALAIMAGAL, C. In vitro antioxidant activity of ethanolic extract of a medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum*. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, p. 1427–1433, 2011.
- RAJORIYA, Ashutosh; TRIPATHY, Sushri Shant; GUPTA, Nibha. In vitro antioxidant activity of selected *Ganoderma* species found in Odisha, India. **Tropical Plant Research**, v. 2, n. 2, p. 72–77, 2015.
- ROSALES-LÓPEZ, Catalina *et al.* Evaluation of Conditions to Improve Biomass Production by Submerged Culture of *Ganoderma* sp. **Microorganisms**, v. 10, n. 7, p. 1404, 2022.
- SA-ARD, Piyawan *et al.* Antioxidant, antibacterial and DNA protective activities of protein extracts from *Ganoderma lucidum*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 2966–2973, 2015.
- SANCHEZ, Sergio; DEMAINE, Arnold L. Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. **Microbial Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 283–319, 2008.
- SARNTHIMA, Rakrudee; KHAMMAUNG, Saranyu; SA-ARD, Piyawan. Culture broth of *Ganoderma lucidum* exhibited antioxidant, antibacterial and α -amylase inhibitory activities. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 11, p. 3724–3730, 2017.
- SCHITTNY, Andreas; HUWYLER, Jörg; PUCHKOV, Maxim. Mechanisms of increased bioavailability through amorphous solid dispersions: a review. **Drug Delivery**, v. 27, n. 1, p. 110–127, 2019.
- SHAO, Ke-Di *et al.* Characterization of a novel fungal immunomodulatory protein, FIP-SJ75 shuffled from *Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes* and *Volvariella volvacea*. **Food and Agricultural Immunology**, v. 30, n. 1, p. 1253–1270, 2019.
- SUDHA, Govindan *et al.* Antioxidant activity of various extracts from an edible mushroom *Pleurotus eous*. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 661–668, 2012.
- TARLAK, Fatih. Development and validation of one-step modelling approach for prediction of mushroom spoilage. **Journal of Food & Nutrition Research**, v. 59, n. 4, p. 281, 2020.
- TIWARI, Shraddha; THAKUR, Raman; SHANKAR, Jata. Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi. **Biotechnology Research International**, v. 2015, n. 1, p. 132635, 2015.
- VISHVAKARMA, Reena; MISHRA, Abha. Protective effect of a protease inhibitor from *Agaricus bisporus* on *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 244–254, 2019.

- VISHVAKARMA, Reena; MISHRA, Abha. Effect of protease inhibitor from *Agaricus bisporus* on glucose uptake and oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 10, n. 3, p. 136, 2020.
- WANG, Huan *et al.* Effect of Spray-Drying and Freeze-Drying on the Properties of Soybean Hydrolysates. **Journal of Chemistry**, v. 2020, n. 1, p. 9201457, 2020.
- WANG, Lihua *et al.* Effect of different light of LED light quality on growth and antioxidant enzyme activities of *Ganoderma lucidum*. **Zhongguo Zhong yao za zhi**, v. 36, n. 18, p. 2471–2474, 2011.
- WEBER, Jost; AGBLEVOR, F. A. Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 669–676, 2005.
- WU, Xiaolin *et al.* Universal sample preparation method integrating trichloroacetic acid/acetone precipitation with phenol extraction for crop proteomic analysis. **Nature Protocols**, v. 9, n. 2, p. 362–374, 2014.
- WU, Yalin; WANG, Denong. A New Class of Natural Glycopeptides with Sugar Moiety-Dependent Antioxidant Activities Derived from *Ganoderma lucidum* Fruiting Bodies. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 2, p. 436–442, 2009.
- YANG, Chen *et al.* Effect of pyrogalllic acid (1,2,3-benzenetriol) polyphenol-protein covalent conjugation reaction degree on structure and antioxidant properties of pumpkin (*Cucurbita sp.*) seed protein isolate. **LWT**, v. 109, p. 443–449, 2019.
- ZHANG, Xue *et al.* Heat Stress Modulates Mycelium Growth, Heat Shock Protein Expression, Ganoderic Acid Biosynthesis, and Hyphal Branching of *Ganoderma lucidum* via Cytosolic Ca²⁺. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 14, p. 4112–4125, 2016.
- ZHAO, Xiaoyan *et al.* XRD, SEM, and XPS Analysis of Soybean Protein Powders Obtained Through Extraction Involving Reverse Micelles. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 92, n. 7, p. 975–983, 2015.
- ZHU, Li-Fang *et al.* Development of *Ganoderma lucidum* spore powder based proteoglycan and its application in hyperglycemic, antitumor and antioxidant function. **Process Biochemistry**, v. 84, p. 103–111, 2019.

6. CAPÍTULO 2

Um isolado amazônico de *Ganoderma* como fonte de proteínas antioxidantes: influência das condições de fermentação submersa sobre a arquitetura micelial e a bioatividade

O presente capítulo corresponde a um artigo publicado em abril de 2026 na revista *Brazilian Journal of Microbiology* (ISSN 1678-4405), edição especial “*Microbial Diversity*”, editada pela Springer, com fator de impacto de 1,9. O conteúdo foi adaptado para atender à estrutura e aos objetivos desta tese, preservando os resultados, as interpretações e as conclusões científicas do trabalho original, em conformidade com os termos da licença Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-026-01934-8>.

Um isolado amazônico de *Ganoderma* como fonte de proteínas antioxidantes: influência das condições de fermentação submersa sobre a arquitetura micelial e a bioatividade

Vítor Alves Pessoa^{1,2}; Giovanna Lima-Silva^{1,2}; Aldenora dos Santos Vasconcelos^{2,3,4}; Lorena Vieira Bentolila de Aguiar²; Enedina Nogueira de Assunção⁵; Walter José Martinez-Burgos²; Ceci Sales-Campos^{1,2,3}; Larissa Ramos Chevreuil²

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, Brasil.

²Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Amazonas, Brasil.

⁴Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos (CMABio), Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Amazonas, Brasil.

⁵Centro de Apoio Multidisciplinar, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, Brasil.

Resumo

Ganoderma sp. 1962 é um isolado amazônico com potencial relatado para a produção de compostos bioativos; entretanto, os efeitos dos parâmetros de fermentação submersa sobre a arquitetura micelial, a recuperação e a bioatividade de extratos proteicos ainda são pouco compreendidas. Neste estudo, foi avaliada a influência de diferentes condições de fermentação submersa na obtenção de proteínas antioxidantes de *Ganoderma* sp. 1962. A identificação molecular foi realizada por meio do sequenciamento da região espaçadora interna transcrita (ITS), seguida de análise filogenética. O isolado foi cultivado em quatro composições de meio de cultivo, em condições agitadas (A) e não agitadas (NA), totalizando oito condições experimentais. A biomassa micelial foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR). Os extratos proteicos obtidos da biomassa micelial foram avaliados quanto ao teor de proteínas solúveis, compostos fenólicos totais (CFT) e açúcares redutores (AR). A atividade antioxidante foi determinada pelos ensaios de sequestro dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•], habilidade quelante de metais e poder redutor. A análise das sequências de ITS por BLASTn revelou elevada similaridade (>98% de identidade) com *Ganoderma multiplicatum*, resultado posteriormente confirmado pela análise filogenética utilizando sequências de referência disponíveis no GenBank. A produção de biomassa variou entre 5,57 e 8,73 g·L⁻¹, sendo observadas diferenças expressivas no consumo de glicose entre as condições de cultivo e maior tendência à acidificação do meio em condição agitação. As diferenças macromorfológicas foram caracterizadas principalmente pela formação de *pellets* nas condições agitadas e de agregados miceliais nas condições sem agitação. A análise micromorfológica revelou características dependentes das condições de cultivo, incluindo a formação de hifas curtas e altamente ramificadas do tipo chifre de veado nas condições sem agitação, enquanto o cultivo sob agitação favoreceu a formação de hifas longas e filamentosas. A análise por FTIR-ATR evidenciou diferenças espectrais significativas entre as biomassas, indicando que a composição do meio de cultivo influenciou fortemente a sua composição química. A condição E3NA

(Experimento 3, não agitada) apresentou o maior teor de proteínas solúveis ($218,35 \pm 16,95 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de extrato), enquanto a condição E1A (Experimento 1, sob agitação) apresentou os maiores teores de açúcares redutores ($25,50 \pm 1,59 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de extrato) e compostos fenólicos totais ($31,96 \pm 1,39 \text{ mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$ de extrato). O extrato E1A apresentou a maior atividade antioxidante, com valores de $90,34 \pm 0,66\%$ para ABTS^{+} , $68,09 \pm 1,74\%$ para $\text{DPPH}^{\bullet}$ e poder redutor de $0,335 \pm 0,011$, sugerindo que as interações entre proteínas e compostos fenólicos, bem como entre proteínas e carboidratos, podem contribuir para a atividade antioxidante, conforme evidenciado pela análise de correlação. Embora a fermentação sem agitação tenha favorecido a recuperação de proteínas solúveis, as interações entre proteínas e metabólitos parecem desempenhar um papel mais relevante na atividade antioxidante. Em conjunto, este estudo fornece evidências inéditas do potencial de *G. multiplicatum* para a produção de proteínas antioxidantes por fermentação submersa.

Palavras-chave: Atividade antioxidante; Biomassa micelial; Extratos proteicos; Fermentação submersa; *Ganoderma* amazônico.

Abstract

Ganoderma sp. 1962 is an Amazonian isolate with reported potential for the production of bioactive compounds; however, the effects of specific submerged fermentation parameters on mycelial architecture and on the recovery and bioactivity of protein extracts remain poorly understood. In this study, the influence of different submerged fermentation conditions on the recovery of antioxidant proteins from *Ganoderma* sp. 1962 was evaluated. Molecular identification was performed by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region followed by phylogenetic analysis. The isolate was cultivated under four nutrient compositions combined with agitated (A) and non-agitated (NA) regimes, resulting in eight experimental conditions. Mycelial biomass was structurally characterized using scanning electron microscopy (SEM) and Attenuated Total Reflection–Fourier Transform Infrared (FTIR-ATR) spectroscopy. Protein extracts obtained from the mycelial biomass were analyzed for soluble protein content, total phenolic compounds (TPC), and reducing sugars (RS). Antioxidant activity was assessed using ABTS^{+} , $\text{DPPH}^{\bullet}$, metal chelating ability, and reducing power assays. BLAST analysis of ITS rDNA sequences revealed high similarity ($>98\%$ identity) to *Ganoderma multiplicatum*, which was subsequently confirmed by phylogenetic analysis using reference sequences from GenBank. Biomass production ranged from 5.57 to 8.73 g L^{-1} , with marked variation in glucose consumption among conditions and a stronger tendency toward pH acidification under agitated cultivation. Macromorphological differences were predominantly characterized by pellet formation under agitated cultivation and by mycelial aggregates under static conditions. Micromorphological analysis revealed cultivation-dependent traits, including the formation of short, highly branched “staghorn” hyphae under non-agitated conditions, whereas agitated cultures promoted long, filamentous hyphae. FTIR-ATR analysis showed significant spectral differences among samples, indicating that culture medium composition strongly influenced the chemical composition of the biomass. The E3NA condition (Experiment 3, non-agitated) yielded the highest soluble protein content ($218.35 \pm 16.95 \text{ mg g}^{-1}$ extract), while E1A (Experiment 1, agitated) exhibited the highest levels of RS ($25.50 \pm 1.59 \text{ mg g}^{-1}$ extract) and TPC ($31.96 \pm 1.39 \text{ mg GAE g}^{-1}$ extract). The E1A extract showed the strongest antioxidant activity, with values of $90.34 \pm 0.66\%$ (ABTS^{+}), $68.09 \pm 1.74\%$ ($\text{DPPH}^{\bullet}$), and 0.335 ± 0.011 (reducing power), suggesting that protein–phenol and protein–carbohydrate interactions may contribute to antioxidant activity, as supported by correlation analysis. Although non-agitated fermentation favored soluble protein recovery, protein–metabolite interactions may play a more relevant role in antioxidant activity. Overall, this study provides novel evidence of the potential of *G. multiplicatum* to produce antioxidant proteins under submerged fermentation.

Keywords: Amazonian *Ganoderma*; Antioxidant activity; Mycelial biomass; Protein extracts; Submerged fermentation.

6.1. Introdução

O gênero *Ganoderma* compreende um grupo de cogumelos medicinais amplamente reconhecido por sua capacidade de produzir uma variedade de compostos bioativos de relevância farmacológica, incluindo terpenoides, polissacarídeos, esteroides,

alcaloides e proteínas (Lin et al., 2022; Yang et al., 2019). Dentre esses compostos, os polissacarídeos e os triterpenos têm sido amplamente investigados, enquanto as proteínas e outras classes de metabólitos permanecem comparativamente pouco exploradas, apesar de seu expressivo potencial biológico (Li et al., 2019).

As proteínas derivadas de *Ganoderma* compreendem diferentes classes funcionais com reconhecida relevância para a saúde humana. Entre elas, destacam-se as proteínas imunomoduladoras fúngicas (*Fungal Immunomodulatory Proteins* – FIPs), que têm despertado crescente interesse devido às suas atividades imunomoduladora, antitumoral, antiviral, antialérgica, hemaglutinante, antioxidante, entre outras (Qu et al., 2018). Nesse contexto, a região Amazônica representa um reservatório promissor de diversidade fúngica ainda pouco explorada, oferecendo potencial para a identificação de novas linhagens capazes de sintetizar proteínas com características bioquímicas e funcionais únicas (Sales-Campos et al., 2021).

Um exemplo desse potencial é o fungo *Ganoderma* sp. 1962, isolado em Manaus, Amazonas, Brasil (Gouvêa et al., 2023). Essa linhagem tem demonstrado elevada capacidade de síntese proteica, evidenciada pelo aumento do teor de proteínas em resíduos pós-cultivo (Gouvêa et al., 2023) e pela produção de proteínas de interesse farmacológico, como enzimas fibrinolíticas e inibidores de proteases, quando cultivada em resíduos lignocelulósicos amazônicos (Chevreuil et al., 2025).

Estudos comparativos entre *Ganoderma* sp. 1962 e uma linhagem comercial de *Ganoderma sichuanense* revelaram diferenças significativas na produção de biomassa micelial durante a fermentação submersa (Silva et al., 2024). Entretanto, é importante destacar que as condições de cultivo desempenham papel fundamental no conteúdo de proteínas, o qual nem sempre está diretamente relacionado à elevada produção de biomassa micelial (Pessoa et al., 2023). Essa dissociação evidencia a necessidade não apenas de otimizar as estratégias de cultivo para maximizar a recuperação de proteínas, mas também de empregar abordagens analíticas capazes de avaliar, de forma rápida, a composição da biomassa produzida.

Nesse contexto, técnicas analíticas rápidas e não destrutivas têm adquirido crescente importância. A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) tem se mostrado uma ferramenta eficiente para a identificação e caracterização de biopolímeros e outros metabólitos (Synytsya et al., 2024). Em particular, a espectroscopia por refletância total atenuada acoplada à FTIR (FTIR-ATR) permite a análise de grupos funcionais relacionados às proteínas de forma não destrutiva, tornando-a uma técnica

adequada para aplicações industriais de baixo custo e passíveis de escalonamento (Andrade et al., 2019). No entanto, a composição química da biomassa, por si só, não explica integralmente as diferenças na síntese de metabólitos, uma vez que a fisiologia fúngica também é fortemente influenciada pela organização morfológica durante a fermentação submersa.

Paralelamente, a engenharia morfológica tem ganhado destaque como uma abordagem para correlacionar a morfologia fúngica com a síntese de metabólitos específicos (Anteck; Bizukojc; Ledakowicz, 2016). Estudos nessa área demonstram, por exemplo, alterações na estrutura da parede celular, formação de *pellets* e síntese de proteínas enriquecidas com selênio por *Ganoderma lucidum* como mecanismos que aumentam a tolerância ao selenito de sódio durante a fermentação submersa (Xu et al., 2024). No entanto, a maior parte das evidências disponíveis concentra-se em classes de metabólitos distintas das proteínas, e a influência das características morfológicas induzidas pelas condições de cultivo sobre o desempenho funcional de extratos proteicos obtidos por fermentação submersa ainda permanece pouco compreendida.

Apesar de estudos anteriores relatarem a capacidade de *Ganoderma* sp. 1962 em produzir proteínas, a relação entre as condições de fermentação submersa, a arquitetura micelial e a atividade antioxidante ainda não é descrita. Dessa forma, este estudo teve como objetivo investigar como condições de fermentação submersa modulam a morfologia micelial, a composição da biomassa e as propriedades antioxidantes de extratos proteicos de um isolado amazônico de *Ganoderma*. Por meio da integração de análises microscópicas, caracterização bioquímica e ensaios de atividade antioxidante, este trabalho busca elucidar a relação entre as condições de cultivo, a arquitetura micelial e a bioatividade antioxidante em cultivos fúngicos submersos.

6.2. Material e Métodos

6.2.1. Material biológico e caracterização molecular

O macrofungo *Ganoderma* sp. isolado 1962 foi acessado pelo Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis da Coordenação de Tecnologia e Inovação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (COTEI-INPA), Manaus, Amazonas, Brasil. O isolado foi mantido em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) para preservação e manutenção rotineira.

A fermentação submersa foi conduzida em meio glicose–extrato de levedura–peptona (GYP), ajustado para pH 6,0, com incubação a 25 °C por 10 dias sob condição estática, conforme descrito anteriormente (Pessoa et al., 2023). A condição estática foi adotada para obtenção de biomassa micelial padronizada destinada à extração de DNA genômico, uma vez que cultivos sob agitação frequentemente promovem o acúmulo de polissacarídeos, os quais podem interferir na eficiência e na pureza da extração de DNA. A biomassa micelial recuperada foi macerada em nitrogênio líquido, e o DNA genômico foi extraído utilizando o kit PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen™), seguindo as instruções do fabricante. A integridade do DNA e a eficiência da extração foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 1%.

A região espaçadora interna transcrita (Internal Transcribed Spacer – ITS) foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os pares de *primers* ITS1/ITS4 e ITS5/NL4, e os amplicons foram analisados em gel de agarose a 0,8%. O sequenciamento foi realizado utilizando o kit BigDye™ Terminator v3.1 em um sequenciador automático 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). A qualidade das sequências foi avaliada por meio dos escores de qualidade Phred, e as leituras direta (*forward*) e reversa (*reverse*) foram montadas para obtenção de uma sequência consenso. A sequência obtida foi comparada com sequências de referência depositadas no banco de dados do NCBI por meio da ferramenta BLASTn. A sequência ITS gerada neste estudo foi depositada no GenBank sob o número de acesso PX736081.

6.2.2. Construção da árvore filogenética

A árvore filogenética foi inferida pelo método de Máxima Verossimilhança utilizando o software MEGA X, com o modelo de Kimura de dois parâmetros e distribuição gama discreta (+G) para considerar a variação das taxas de substituição entre os sítios, empregando 1000 réplicas de *bootstrap*. A visualização da árvore foi realizada no iTOL v7. O conjunto de dados foi composto por sequências da região ITS de espécies de *Ganoderma* obtidas no NCBI/GenBank, priorizando sequências derivadas de espécimes-tipo ou de referência (Anexos, Tabela suplementar 1), sendo *Tomophagus colossus* utilizado como grupo externo (*outgroup*).

6.2.3. Fermentação submersa

Ganoderma sp. 1962 cultivado em meio BDA foi utilizado como inóculo para a fermentação submersa. Sete discos de micélio ($\varnothing = 7$ mm) foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 125 mL de meio de cultivo com diferentes composições (Tabela 1), ajustado para pH 6,0. Os frascos foram incubados por 12 dias a 25 °C, agitados a 120 rpm (A) ou não agitados (NA), totalizando oito condições experimentais, com base nos parâmetros de cultivo previamente estabelecidos (Pessoa et al., 2023). Para cada condição experimental, foram preparados 25 frascos Erlenmeyer.

Tabela 1 – Composição dos meios de cultivo utilizados nos diferentes experimentos.

Meio de cultura	Concentração (g.L ⁻¹)		
	Glicose	Peptona de soja	Extrato de levedura
Experimento 1 (E1)	10	2,5	5
Experimento 2 (E2)	20	2,5	5
Experimento 3 (E3)	10	5	5
Experimento 4 (E4)	20	5	5

6.2.4. Parâmetro de produção

Após o período de fermentação, três frascos de cada condição foram selecionados aleatoriamente e utilizados como réplicas biológicas independentes para a determinação dos parâmetros de produção. O conteúdo dos frascos foi centrifugado (10.000 rpm, 10 min, 20 °C) para separar a biomassa micelial do caldo fermentado. A produção de biomassa micelial (biomassa seca em g.L⁻¹) foi estimada com base no peso seco após secagem em estufa a 60 °C. O consumo de glicose foi determinado pela quantificação dos açúcares redutores (AR) nos caldos fermentados utilizando o método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). O cálculo foi realizado subtraindo os valores dos controles (dia 0, $n = 3$) pelo obtido no final da fermentação submersa (12º dia).

6.2.5. Análise morfológica

A macromorfologia fúngica foi documentada após a fermentação por meio de fotografias digitais, antes da separação do caldo fermentado, sendo selecionado, ao acaso, um frasco representante de cada condição. Para a análise micromorfológica, fragmentos de biomassa micelial *in natura* (~0,5 cm) foram fixados em solução de Karnovsky modificada (2% de formaldeído e 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio

0,2 M, pH 7,4) por 24 h à temperatura ambiente (25 °C). Após a fixação, as amostras foram lavadas quatro vezes com tampão cacodilato de sódio (0,2 M, pH 7,4) e pós-fixadas por 2 h em solução contendo tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianeto de potássio a 0,8% (1:1, v/v), à temperatura ambiente. Em seguida, foram desidratadas em série crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90% e três etapas em etanol 100%), permanecendo 20 min em cada concentração, e submetidas à secagem por ponto crítico utilizando o equipamento Leica EM CPD300.

O material seco foi montado em suportes de alumínio (*stubs*) utilizando fita de carbono e metalizado com platina até uma espessura aproximada de 10 nm em um metalizador Leica EM ACE600. As micrografias foram obtidas em diferentes ampliações utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM IT500HR), operando a uma tensão de aceleração de 5 kV, no modo de elétrons secundários. As características morfológicas foram avaliadas qualitativamente e interpretadas em conjunto com os dados de composição bioquímica e atividade antioxidante.

6.2.6. Análise por espectroscopia no infravermelho

Os espectros foram obtidos utilizando um espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR, Cary 630), na faixa espectral de 750 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 8 varreduras. Para as análises, 5 mg das biomassas miceliais liofilizadas e pulverizadas de cada condição experimental foram analisados à temperatura ambiente (25 °C), sendo o espectro de fundo registrado antes de cada leitura. Os espectros foram obtidos a partir das amostras de biomassa reunidas, representativas de cada condição experimental.

6.2.7. Extração de proteínas

A biomassa micelial (5 g) foi submetida à extração de proteínas solúveis utilizando solução de cloreto de sódio 0,15 M, na proporção de 1:20 (m/v), sob agitação de 120 rpm por 2 h a 10 °C. Em seguida, o material foi centrifugado ($10.000 \times g$, 20 min, 4 °C), e o sobrenadante foi submetido à diálise contra água destilada por 48 h a 4 °C, utilizando membranas de celulose com *cut-off* de 12 kDa, obtendo-se extratos proteicos de média e alta massa molecular. Por fim, o material dialisado foi centrifugado novamente ($4.667 \times g$, 20 min, 4 °C) e liofilizado.

6.2.8. Quantificação de biomoléculas

A concentração de proteínas nos extratos foi determinada pelo método de Bradford (1976), adaptado para microplacas de 96 poços, utilizando curva padrão de albumina sérica bovina (BSA). O teor de compostos fenólicos totais (CFT) foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, sendo os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra ($\text{mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$ de extrato) (Oliveira-Junior et al., 2024). Os açúcares redutores (AR) foram quantificados pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), utilizando curva padrão de glicose para estimativa das concentrações (Pessoa et al., 2023). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

6.2.9. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos proteicos ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi determinada por meio dos ensaios de sequestro dos radicais 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ($\text{ABTS}^{+\bullet}$) e 2,2-difenil-1-picril-hidrazil ($\text{DPPH}^{\bullet}$), habilidade quelante de íons ferrosos e poder redutor de íons férricos, utilizando metodologias adaptadas para microplacas de 96 poços. No ensaio de poder redutor, o aumento da absorbância foi considerado indicativo de maior potencial antioxidante (Khatua; Ghosh; Acharya, 2017). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

6.2.10. Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4×2 (quatro meios de cultivo $\times$ duas condições de cultivo). Todas as análises quantitativas foram realizadas em triplicata e submetidas à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 1% ($p < 0,01$), utilizando o software Statistica 7. Os dados obtidos por FTIR-ATR foram submetidos à análise quimiométrica por Análise de Componentes Principais (PCA). Adicionalmente, foi realizada a análise de correlação de Pearson entre as biomoléculas e a atividade antioxidante de todas as condições de cultivo. Ambas as análises foram conduzidas no software OriginPro 2025.

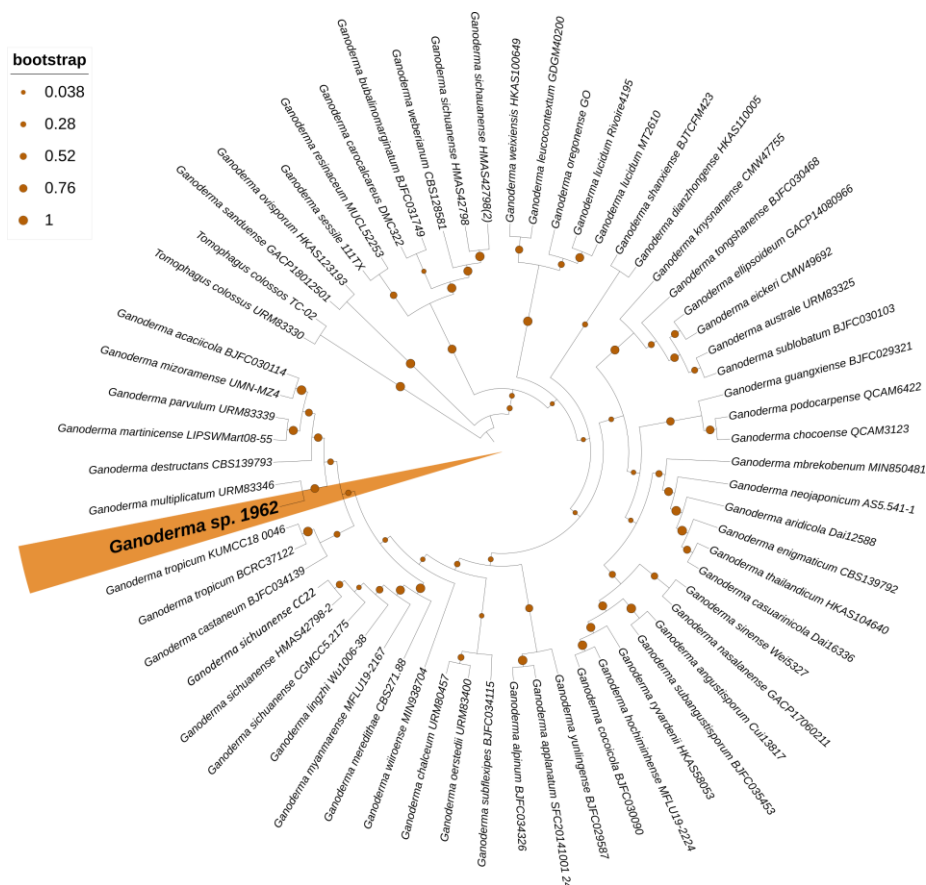
6.3. Resultados

6.3.1. Identificação do isolado

A sequência da região ITS obtida apresentou elevada similaridade com fungos pertencentes à ordem *Polyporales*, particularmente com espécies do gênero *Ganoderma*,

quando comparada às sequências depositadas no banco de dados do NCBI. As maiores similaridades foram observadas com as linhagens de *Ganoderma* sp. CIRM-BRFM 1410 e CIRM-BRFM 2361 (99,10% de identidade; 100% de cobertura da consulta; *E-value* = 0,0, para ambos), bem como com os isolados de *Ganoderma multiplicatum* CC8 (98,74% de identidade; 100% de cobertura da consulta; *E-value* = 0,0) e Dai 17395 (98,73% de identidade; 99% de cobertura da consulta; *E-value* = 0,0). Na árvore filogenética construída com sequências representativas do gênero *Ganoderma*, o isolado amazônico agrupou-se em um único clado juntamente com *G. multiplicatum*, corroborando sua identificação taxonômica (Figura 1).

Figura 1 – Árvore filogenética inferida pelo método de Máxima Verossimilhança, baseada nas sequências da região ITS, mostrando o posicionamento do isolado amazônico *Ganoderma multiplicatum* 1962 (destacado em laranja).



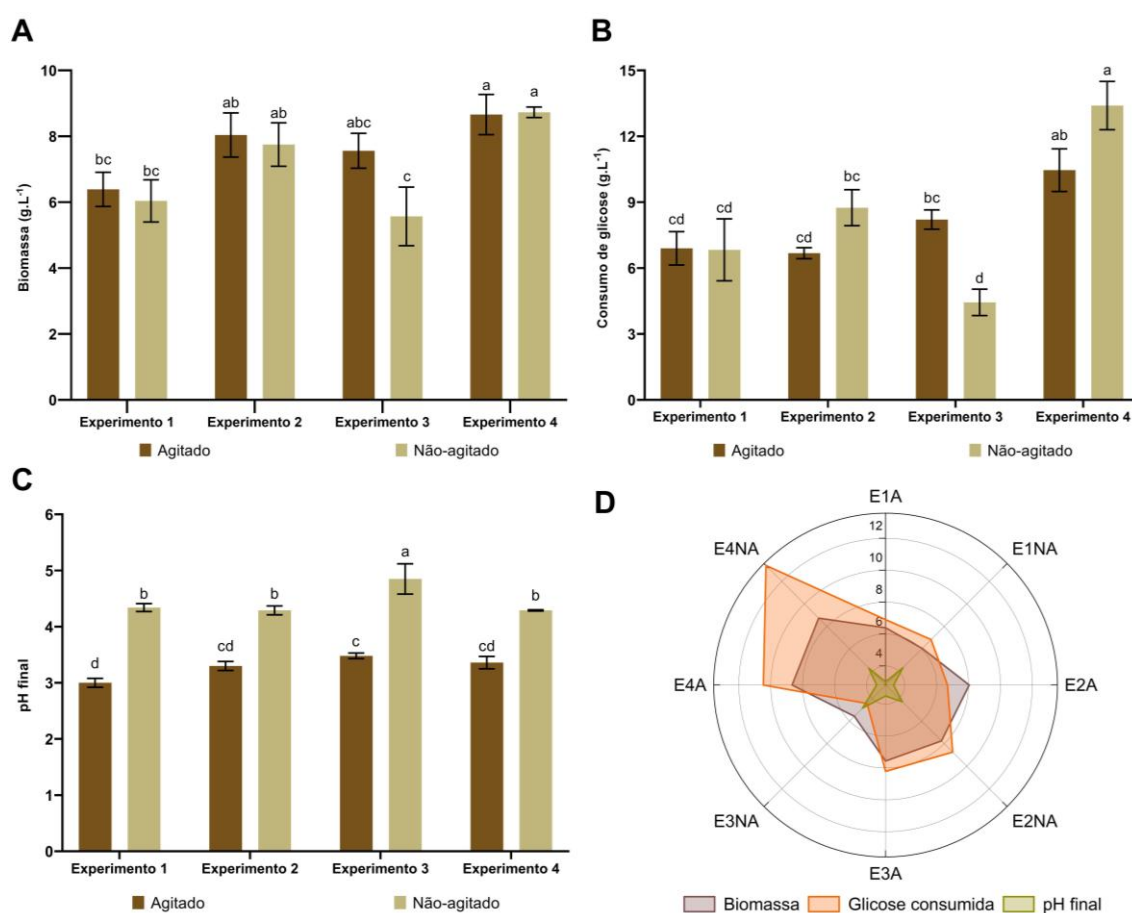
Os valores de *bootstrap* (1000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore. *Tomophagus colossus* foi utilizado como grupo externo (*outgroup*).

6.3.2. Parâmetros de crescimento

O cultivo de *G. multiplicatum* 1962 sob diferentes condições de fermentação resultou em produção de biomassa micelial variando de $5,57 \pm 0,89 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (E3NA) a $8,73$

$\pm 0,16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (E4NA) (Figura 2A). O consumo de glicose por variou de $4,44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (E3NA) a $13,40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (E4NA) (Figura 2B). Observou-se acidificação do meio de cultivo em todas as condições avaliadas, com menores valores de pH final nos cultivos sob agitação (Figura 2C). A condição E1A apresentou o menor pH ($3,00 \pm 0,08$), enquanto E3NA apresentou o maior valor ($4,85 \pm 0,27$). As condições E4NA e E4A apresentaram os maiores valores de produção de biomassa e consumo de glicose entre as condições avaliadas (Figura 2D).

Figura 2 – Parâmetros produtivos de *Ganoderma multiplicatum* 1962 cultivado sob diferentes condições de fermentação submersa. (A) Produção de biomassa seca; (B) consumo de glicose durante a fermentação; (C) pH final do meio de cultivo; e (D) gráfico radar resumindo os parâmetros de produção avaliados.



Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Letras distintas sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p < 0,01$), de acordo com análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

6.3.3. Morfologia fúngica

Sob condições de cultivo com agitação, *G. multiplicatum* apresentou crescimento na forma de *pellets*, caracterizado por estruturas esféricas de superfície lisa. Em contraste,

o cultivo sem agitação resultou na formação de agregados miceliais entrelaçados e dispersos sobre a superfície do meio de cultivo (Figura 3).

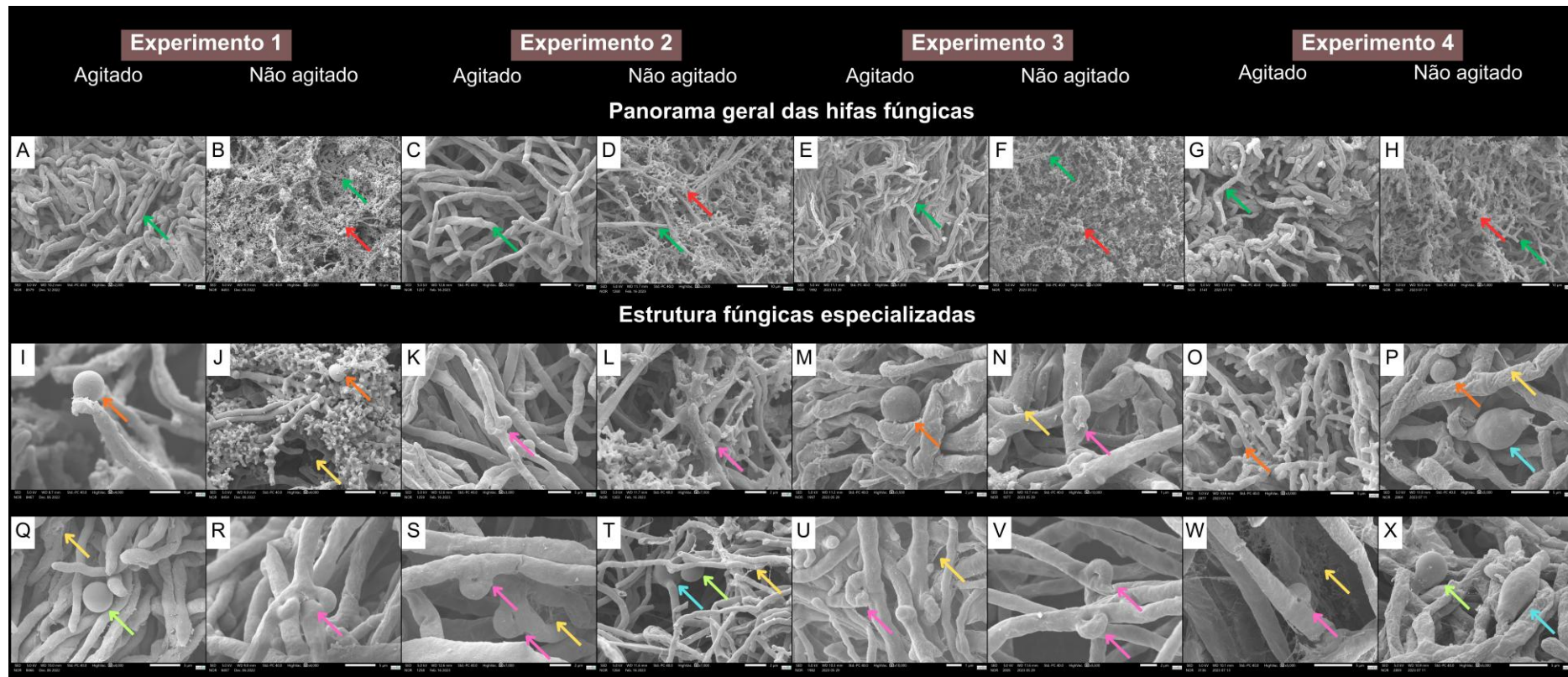
O tamanho dos *pellets* variou entre as condições experimentais. A condição E1A apresentou *pellets* de tamanhos variados, enquanto E2A foi caracterizada predominantemente por *pellets* pequenos. Na condição E3A observaram-se *pellets* de tamanho médio a grande, ao passo que E4A apresentou predominantemente *pellets* de tamanho intermediário. Também foram observadas variações na coloração dos meios de cultivo, incluindo a presença de tonalidades acobreadas em algumas condições. Nos cultivos sob agitação, especialmente nos experimentos 2 e 3, verificou-se ainda a adesão de agregados miceliais às paredes dos frascos Erlenmeyer (Figura 3).

Figura 3 – Macromorfologia de *Ganoderma multiplicatum* 1962 cultivado sob diferentes condições de fermentação submersa. Imagens representativas do crescimento micelial nas condições com agitação e sem agitação, correspondentes aos Experimentos 1–4.



Diferenças micromorfológicas foram observadas entre todas as condições de cultivo. Sob agitação verificaram-se predominantemente hifas filamentosas longas, rígidas e tubulares, enquanto o cultivo não agitado resultou em hifas curtas e altamente ramificadas, do tipo "chifre de veado" (Figura 4). Pequenas estruturas esféricas ornamentadas depositadas sobre as hifas foram observadas nas condições E1A, E2NA, E3A, E4A e E4NA (Figura 4I, J, M, O, P). Estruturas esféricas de superfície lisa associadas às hifas foram identificadas em E1A, E2NA e E4NA (Figura 4Q, T, X). Grampos de conexão foram observados em todas as condições experimentais, com exceção da E1A (Figura 4). Clamidósporos foram identificados nas condições E2NA e E3NA (Figura 4T, X). Estruturas de matriz extracelular (MEC), com morfologia semelhante a teia de aranha recobrindo as hifas, foram observadas em todas as condições de cultivo (Figura 4).

Figura 4 – Micromorfologia da biomassa micelial de *Ganoderma multiplicatum* 1962 obtida sob diferentes condições de fermentação submersa. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando a organização geral das hifas (A–H) e estruturas especializadas (I–X) nas condições com e sem agitação, nos quatro experimentos. As setas coloridas indicam as seguintes estruturas morfológicas: verde-escuro, hifas tubulares; vermelho, hifas do tipo “chifre de veado”; laranja, estruturas esféricas ornamentadas; verde-claro, estruturas esféricas de superfície lisa; rosa, conexões em grampo; azul-claro, clamidósporos; amarelo, matriz extracelular.



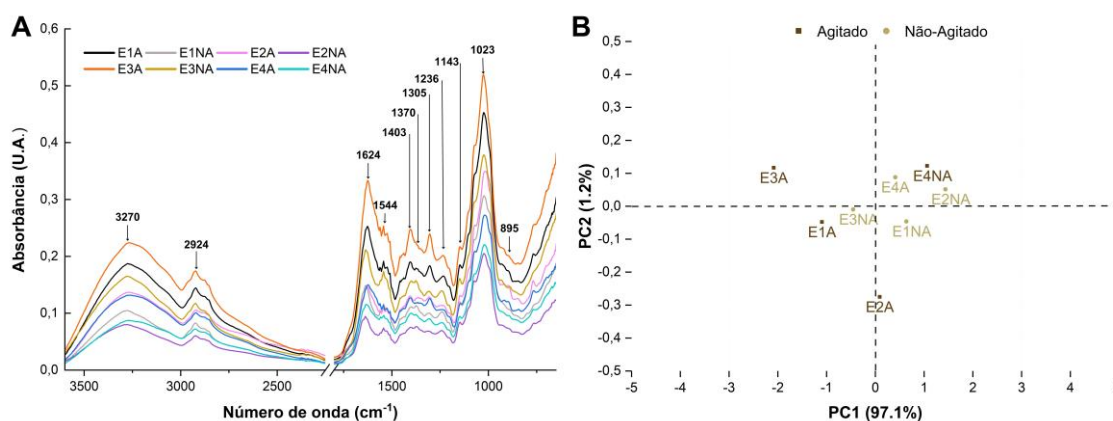
6.3.4. FTIR e quimiometria

A análise por FTIR-ATR revelou um perfil consistente de bandas de absorção em todos os tratamentos, com padrões espectrais semelhantes entre as biomassas miceliais obtidas sob as diferentes condições de fermentação (Figura 5A). Entretanto, foram observadas diferenças na intensidade de absorbância entre as condições, destacando-se E3A e E1A, que apresentaram os maiores valores de absorbância.

Os espectros apresentaram bandas de absorção em 3270 cm^{-1} (estiramento de O–H e N–H), 2924 cm^{-1} (estiramento de C–H), 1624 cm^{-1} (amida I, estiramento de C=O) e 1544 cm^{-1} (amida II, deformação angular de N–H), além de bandas entre 1403 e 1236 cm^{-1} (deformação angular de C–H e estiramento de C–N), entre 1143 e 1023 cm^{-1} (estiramento de C–O) e banda em 895 cm^{-1} (ligações glicosídicas do tipo β) (Figura 5A).

O primeiro componente principal (PC1) explicou 97,1% da variância total, promovendo a separação das amostras ao longo do eixo X no gráfico de PCA (Figura 5B). A análise dos *loadings* indicou que a região espectral compreendida entre 1150 e 950 cm^{-1} foi a que mais contribuiu para a separação das amostras.

Figura 5 – (A) Espectros de FTIR-ATR da biomassa micelial de *Ganoderma multiplicatum* 1962 obtida sob diferentes condições de fermentação submersa; e (B) gráfico de escores da Análise de Componentes Principais (PCA) baseado nos dados espectrais. U.A.: unidades de absorbância. E: experimento (1–4); A: cultivo sob agitação; NA: cultivo sem agitação.



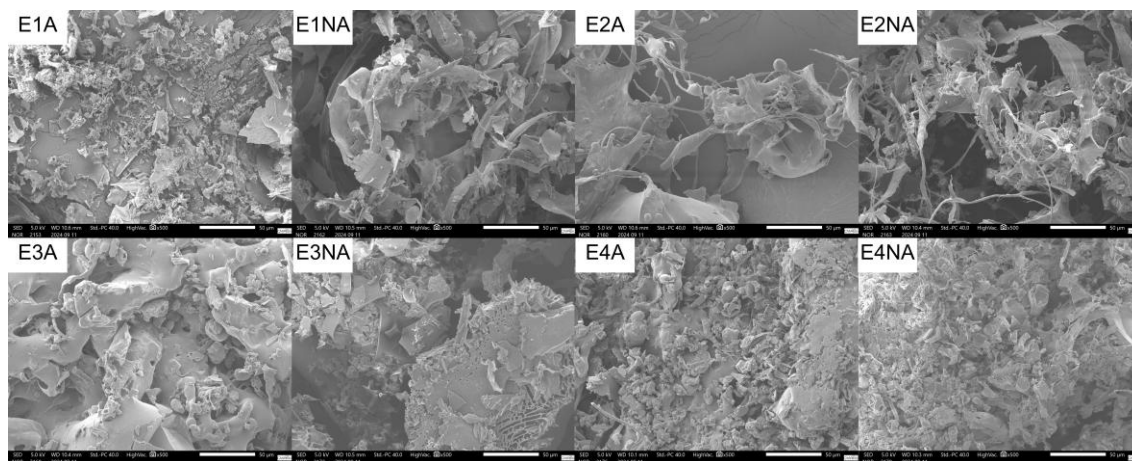
6.3.5. Caracterização dos extratos proteicos

6.3.5.1. Microestrutura

A análise da microestrutura dos extratos proteicos revelou padrões morfológicos distintos entre as diferentes condições de fermentação. O extrato da condição E1A apresentou uma morfologia altamente fragmentada, composta por placas lamelares

irregulares com bordas serrilhadas. Características semelhantes, embora menos fragmentadas, também foram observadas nas condições E4A e E4NA. Em contraste, os extratos das condições E1NA, E2A e E2NA apresentaram estruturas lamelares maiores, delgadas e mais dispersas, com aspecto relativamente uniforme. Um terceiro padrão microestrutural foi observado nas condições E3A e E3NA, caracterizado por estruturas compactas e agregadas, formando aglomerados ou grânulos densos (Figura 6).

Figura 6 – Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos extratos proteicos obtidos da biomassa micelial de *Ganoderma multiplicatum* 1962 produzida sob diferentes condições de fermentação submersa, evidenciando alterações nos padrões de fragmentação. Imagens representativas dos extratos obtidos sob condições com agitação (A) e sem agitação (NA). E: experimento (1–4).

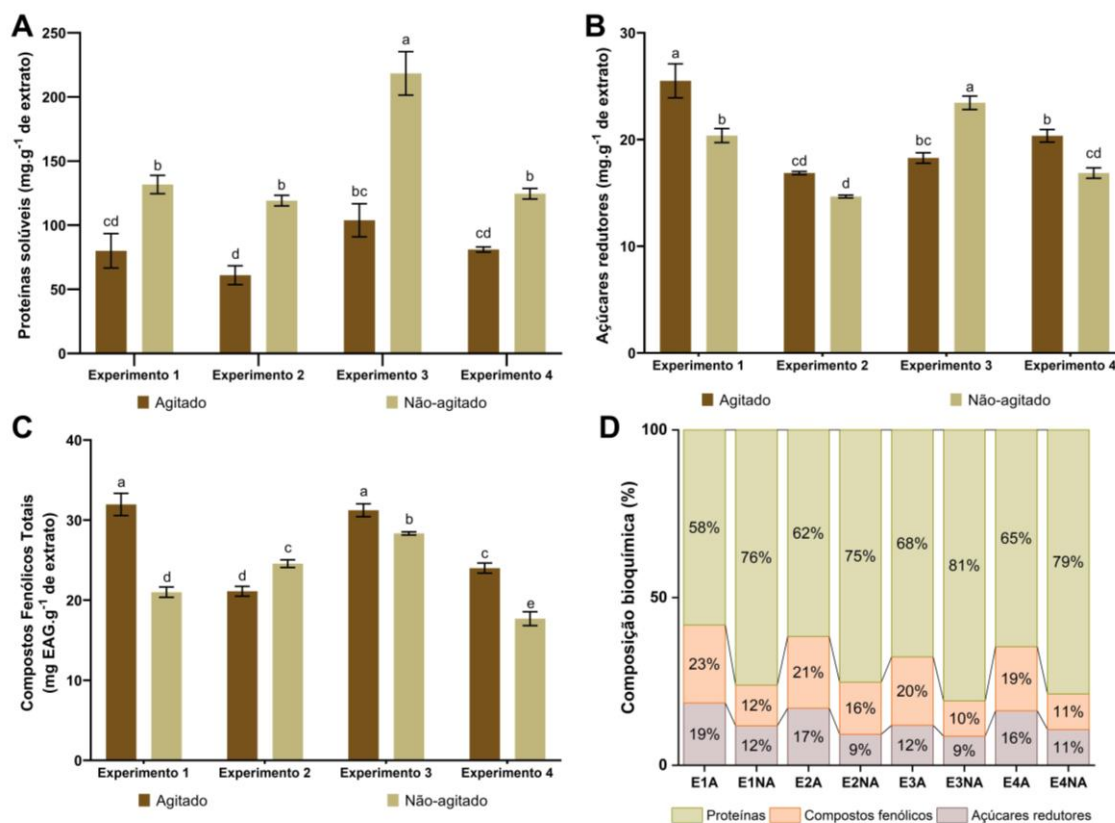


6.3.5.2. Composição bioquímica

O teor de proteínas solúveis foi maior nos extratos obtidos sob condições não agitadas, destacando-se a condição E3NA ($218,35 \pm 16,95 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de extrato) (Figura 7A). Em contrapartida, os maiores teores de compostos fenólicos totais e de açúcares redutores foram observados nos extratos obtidos sob agitação (Figura 7B e C).

Apesar de E1A apresentar uma das menores concentrações de proteínas ($80,03 \pm 13,37 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de extrato), exibiu os maiores teores de açúcares redutores ($25,50 \pm 1,59 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de extrato) e de compostos fenólicos ($31,96 \pm 1,39 \text{ mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$ de extrato) (Figura 7A–C). Esse perfil refletiu-se na composição relativa dos extratos, na qual E3NA apresentou a maior proporção de proteínas, enquanto E1A apresentou a menor (Figura 7D).

Figura 7 – Concentração de (A) proteínas solúveis, (B) açúcares redutores, (C) compostos fenólicos totais e (D) composição percentual relativa dessas biomoléculas nos extratos proteicos de *Ganoderma multiplicatum* 1962 obtidos sob diferentes condições de fermentação submersa.

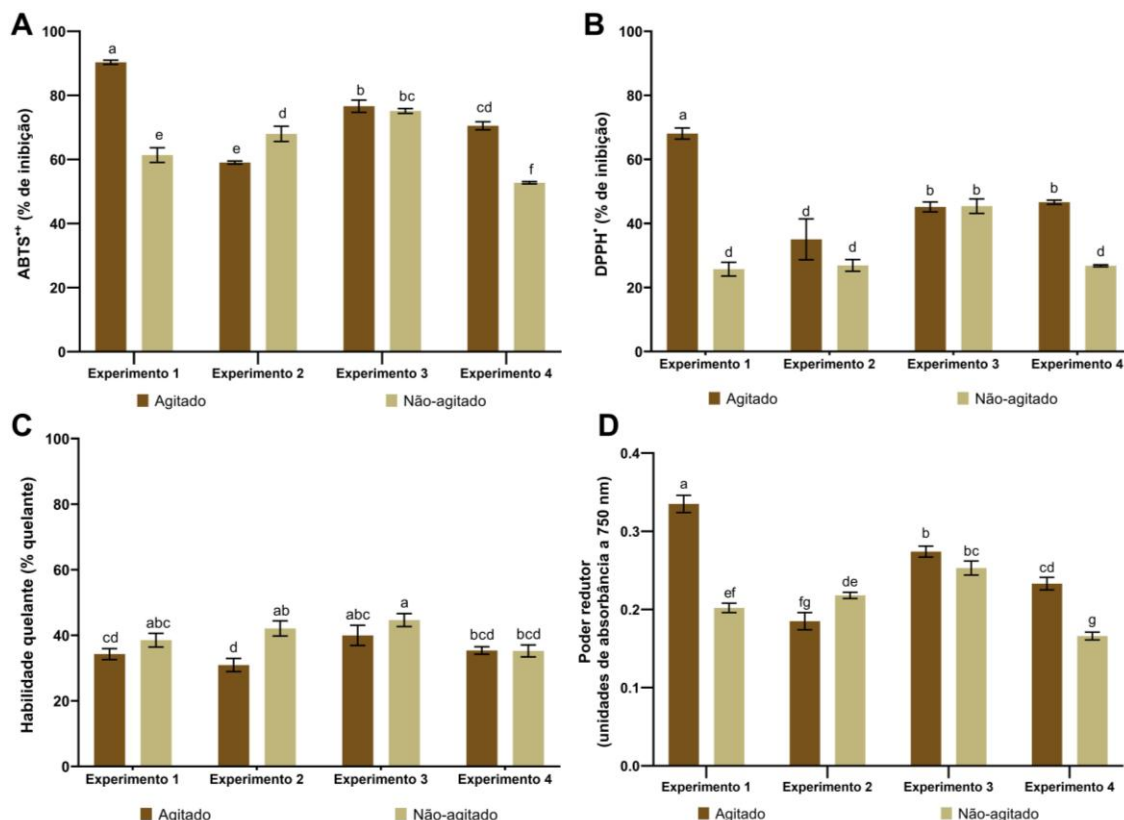


Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Letras distintas sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p < 0,01$), de acordo com análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

6.3.6. Atividade antioxidante

O extrato E1A apresentou a maior atividade sequestradora de radicais livres, com valores de inibição de $90,34 \pm 0,66\%$ para o radical ABTS^{•+} e de $68,09 \pm 1,74\%$ para o radical DPPH[•] (Figura 8A e B). Todos os extratos apresentaram baixa habilidade quelante de metais, sendo o maior valor observado para a condição E3NA ($44,66 \pm 1,97\%$) (Figura 8C). No ensaio de poder redutor férrico (FRAP), o extrato E1A apresentou a maior absorvância ($0,335 \pm 0,011$), indicando maior capacidade antioxidante em comparação às demais condições (Figura 8D).

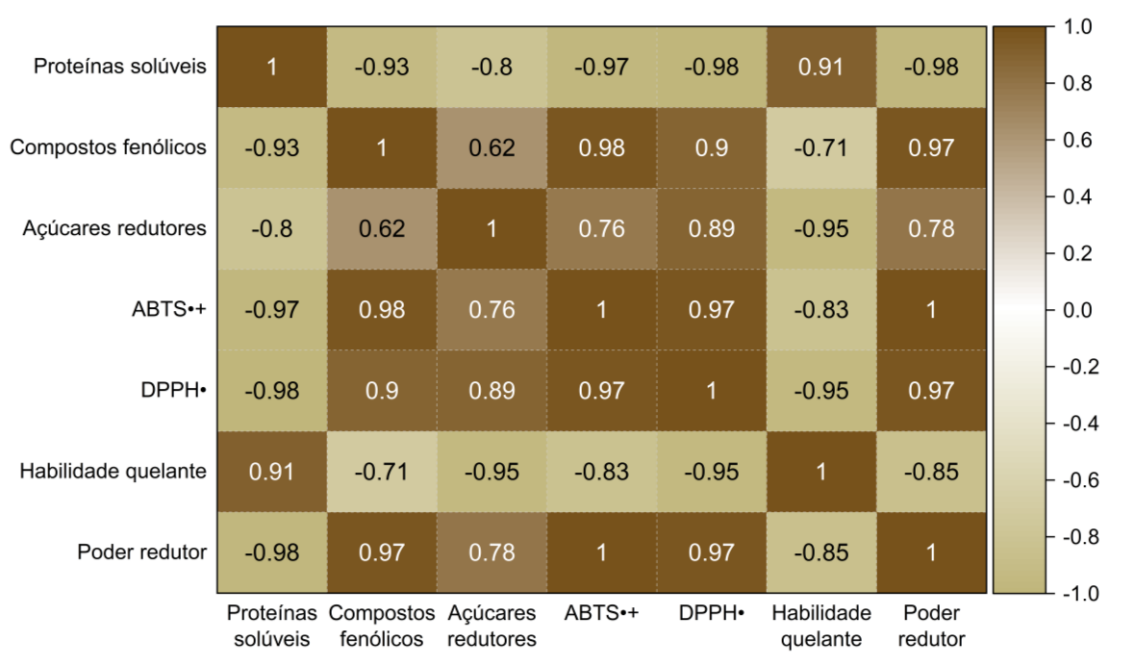
Figura 8 – Atividade antioxidante dos extratos proteicos de *Ganoderma multiplicatum* 1962 obtidos sob diferentes condições de fermentação submersa, avaliada pelos ensaios de (A) ABTS⁺, (B) DPPH[•], (C) habilidade quelante de metais e (D) poder redutor férrico.



Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Letras distintas sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p < 0,01$), de acordo com análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

A análise de correlação de Pearson foi realizada para avaliar as relações entre o teor de proteínas solúveis, compostos fenólicos totais e açúcares redutores na atividade antioxidante. Os compostos fenólicos totais e os açúcares redutores apresentaram correlação positiva com os ensaios de ABTS⁺, DPPH[•] e poder redutor. Em contraste, a habilidade quelante de metais apresentou correlação positiva com o teor de proteínas solúveis (Figura 9).

Figura 9 – Matriz de correlação de Pearson ilustrando as relações entre o teor de proteínas solúveis, compostos fenólicos totais, açúcares redutores e as atividades antioxidantes (ABTS^{•+}, DPPH[•], habilidade quelante e poder redutor) sob diferentes condições de fermentação submersa. A intensidade das cores representa a magnitude e a direção dos coeficientes de correlação de Pearson (r).



6.4. Discussão

Embora uma cultura fúngica pura já tivesse sido obtida e identificada provisoriamente como *Ganoderma* sp. 1962, com base em características macromorfológicas, até o momento não havia sido realizada sua identificação molecular (Gouvêa et al., 2023). Considerando as limitações da identificação baseada exclusivamente em características morfológicas no gênero *Ganoderma*, que apresenta elevada plasticidade fenotípica, a utilização de marcadores moleculares é indispensável para uma identificação precisa em nível de espécie.

A região espaçadora interna transcrita (ITS) é amplamente reconhecida como o “código de barras molecular universal” para a identificação de fungos (Liao et al., 2015). A eficiência do sequenciamento da região ITS para a autenticação e identificação de espécies de *Ganoderma* e de seus produtos comerciais é bem estabelecida, permitindo análises confiáveis em diferentes tipos de amostras, incluindo micélio fresco e materiais desidratados (Gunnels et al., 2020; Loyd et al., 2018; Raja et al., 2017).

O isolado identificado foi identificado como *Ganoderma multiplicatum*, uma espécie neotropical originalmente descrita no Brasil e reconhecida por sua elevada variabilidade morfológica, fator que historicamente contribuiu para sua identificação equivocada como *G. lucidum* (Torres-Torres et al., 2013). No Brasil, essa espécie já foi registrada nos estados de Alagoas, Amazonas, Mato Grosso do Sul, Pará, Rio de Janeiro,

Paraíba, Rondônia e Roraima. No Amazonas, sua ocorrência foi documentada nos municípios de Humaitá, Barcelos e Manaus (Bolaños; Bononi; Gugliotta, 2016; Steyaert, 1980).

Estudos anteriores demonstraram o potencial antimicrobiano dessa espécie frente a patógenos humanos, bem como seus efeitos antiproliferativos sobre linhagens tumorais de mama, pulmão, colo do útero e cólon (Espinosa-García et al., 2021; Sharifi et al., 2012). Entretanto, essas investigações concentraram-se principalmente em metabólitos secundários e polissacarídeos obtidos de basidiomas coletados na natureza. Em contrapartida, estudos direcionados à obtenção de proteínas bioativas de *G. multiplicatum* produzidas por fermentação submersa ainda são escassos.

A produção de biomassa obtida neste estudo foi superior à reportada por Silva et al. (2024), que registraram produção máxima de $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ ao cultivar a mesma linhagem por fermentação submersa em meios Melin-Norkrans Modificado (MNM) e Polissacarídeo (POL), durante 14 dias. O maior acúmulo de biomassa pode estar associado às diferenças na composição do meio de cultivo, especialmente à utilização de fontes orgânicas de nitrogênio prontamente assimiláveis, como extrato de levedura e peptona de soja, que reduzem o custo metabólico da assimilação de nitrogênio por fornecerem aminoácidos e peptídeos (Lima-Silva et al., 2026). Além disso, a ausência de sais inorgânicos pode ter contribuído para o melhor crescimento, semelhante ao descrito para a fermentação submersa de *Ganoderma curtissii* (Rosales-López et al., 2022).

A composição do meio de cultivo foi o principal fator responsável pela produção de biomassa, uma vez que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as condições com e sem agitação para um mesmo meio. Em concordância com estudo anterior realizado com *G. sichuanense* CC22, maiores valores de biomassa foram obtidos na concentração de 20 g.L^{-1} de glicose em comparação a 10 g.L^{-1} , independentemente da concentração de peptona de soja (Pessoa et al., 2023). Esse comportamento pode estar relacionado às diferenças na relação carbono:nitrogênio (C:N), uma vez que a maior disponibilidade de carbono favorece o crescimento micelial e a formação de biomassa nas condições avaliadas.

A glicose é amplamente reconhecida como uma importante fonte de carbono para o crescimento micelial e a produção de biomoléculas em espécies de *Ganoderma* (Lim; Ilham; Wan-Mohtar, 2024), constituindo, portanto, um parâmetro relevante de avaliação. Em fermentação submersa, a linhagem domesticada *G. sichuanense* CC22, caracterizada por crescimento e produção estáveis, apresenta consumo de glicose limitado a aproximadamente 8 g.L^{-1} (Pessoa et al., 2023). Em contraste, o isolado amazônico

avaliado no presente estudo apresentou maior consumo desse substrato, sugerindo um metabolismo do carbono mais ativo. Essa diferença pode refletir características metabólicas distintas entre linhagens silvestres e domesticadas, reforçando o potencial de isolados silvestres de *Ganoderma* para aplicações em bioprocessos.

Em cultivos submersos de *Ganoderma*, o consumo de glicose entre 5 e 10 g.L⁻¹ é geralmente considerado elevado e tem sido associado à produção de ácidos orgânicos, resultando em uma redução concomitante do pH do meio (Fang; Zhong, 2002), padrão também observado no presente estudo, especialmente nas condições sob agitação. Basidiomicetos cultivados em fermentação submersa na presença de glicose são conhecidos por produzir ácidos orgânicos, como os ácidos oxálico e L-málico, além de intermediários de baixa massa molecular do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Takao, 1965). Além disso, espécies de *Ganoderma* podem sintetizar metabólitos secundários conhecidos coletivamente como ácidos ganodéricos, os quais também podem contribuir para a acidificação do meio de cultivo (Yan et al., 2022).

A condição E3NA apresentou a menor produção de biomassa e foi acompanhada por menor consumo de glicose e variações menos pronunciadas do pH em comparação às demais condições. Resultados semelhantes foram relatados para *G. sichuanense* CC22, em que menores rendimentos de biomassa sob cultivo estático foram associados à distribuição limitada de nutrientes decorrente da ausência de mecanismos de mistura e homogeneização (Pessoa et al., 2023). Nesse contexto, a relação carbono:nitrogênio (C:N) é um fator amplamente reconhecido por influenciar o crescimento micelial e a produção de metabólitos em cultivo de cogumelos (Han et al., 2024).

A composição do meio de cultivo e a agitação são fatores conhecidos por influenciar a formação de *pellets*, a morfologia fúngica e a síntese do produto de interesse durante a fermentação submersa (Lu et al., 2024). A variação observada no tamanho dos *pellets* pode estar associada às alterações nas propriedades físico-químicas do caldo de cultivo em função da composição do meio (Teixeira et al., 2023). As diferenças na coloração do meio podem estar relacionadas tanto à síntese de pigmentos, como observado para *G. lucidum* cultivado na presença de peptona (Kejariwal et al., 2022), quanto à degradação enzimática dos componentes do meio de cultivo (Luo et al., 2025).

A adesão de agregados miceliais às paredes dos frascos pode afetar negativamente a produção de biomassa. Esse fenômeno tem sido descrito como resultado do desprendimento de hifas dos *pellets*, que, devido às forças centrífugas e de cisalhamento, tornam-se incapazes de restabelecer o crescimento na forma de *pellets*, aderindo posteriormente à superfície do vidro (Wang; Lin; Hsu, 2021). Observações semelhantes

foram relatadas durante a fermentação submersa de *G. lucidum*, na qual fragmentos de hifas apresentam uma camada gelatinosa rica em carboidratos na interface entre o vidro e o micélio, característica frequentemente associada à produção de exopolissacarídeos (Wagner et al., 2004; Wang; Lin; Hsu, 2021).

As variações micromorfológicas das hifas, observadas entre os cultivos com agitação e sem agitação, são consistentes com descrições anteriores para o gênero *Ganoderma* (Adaskaveg; Gilbertson, 1986; Boromenskyi; Bisko, 2019; Porter et al., 2023). A ocorrência de hifas do tipo “chifre de veado” no cultivo estático, previamente descrita para *G. sichuanense*, tem sido associada a respostas fisiológicas à limitação de oxigênio. Em condições sem agitação, a transferência de oxigênio limitada por difusão pode levar à formação de microambientes localizados de hipóxia, favorecendo o aumento da ramificação das hifas. Essa diferenciação morfológica pode ampliar a área de contato com o meio de cultivo e facilitar a expansão do micélio em direção à interface ar-líquido, favorecendo o crescimento sob baixa disponibilidade de oxigênio e desencadeando respostas metabólicas adaptativas, incluindo um possível aumento do acúmulo intracelular de proteínas (Pessoa et al., 2026; Ren et al., 2026).

As estruturas esféricas ornamentadas identificadas neste estudo também são descritas para *G. sichuanense* e podem estar associadas ao armazenamento de biomoléculas ou nutrientes, possivelmente originadas da vacuolização das hifas (Mahmoud; Mohamed; Abd Elzaher, 2007; Oliveira-Junior et al., 2024). As estruturas esféricas de superfície lisa associadas às hifas, denominadas cutículas celulares, bem como os grampos de conexão, correspondem a características morfológicas típicas de espécies de *Ganoderma* em cultivos submersos (Adaskaveg; Gilbertson, 1986; Oliveira-Junior et al., 2024; Page et al., 2018; Wan Mohtar et al., 2016).

A presença de clamidósporos pode indicar uma resposta adaptativa a condições adversas e tem sido associada a fenótipos de crescimento rápido e termotolerância (Badalyan et al., 2019; Loyd et al., 2019), o que pode estar relacionado ao crescimento observado neste estudo. As estruturas com aspecto de teia de aranha correspondem à matriz extracelular (MEC), também descrita em cultivos submersos de outros basidiomicetos, sendo composta por polímeros de proteínas, carboidratos e lipídios que favorecerem a adesão celular, a proteção e o armazenamento de nutrientes (Jaros; Köbsch; Rohm, 2018; Pesciaroli et al., 2013).

As variações observadas nos perfis de absorbância obtidos por FTIR-ATR sugerem que condições específicas de cultivo podem ter influenciado o acúmulo de biomoléculas intracelulares, independentemente do rendimento total de biomassa. Perfis

espectrais semelhantes foram descritos para basidiomas de outras espécies de *Ganoderma* e são geralmente associados à presença de proteínas, polissacarídeos (β -glucanas e quitina) e compostos terpenoides, incluindo os ácidos ganodéricos e lucidênicos (Synytsya et al., 2024).

A região espectral entre 1150 e 950 cm^{-1} , que apresentou a maior contribuição para a diferenciação química entre as amostras, é compatível com bandas atribuídas a estruturas relacionadas a carboidratos e terpenoides, incluindo metabólitos secundários de *Ganoderma*. Esses sinais são comumente associados ao estiramento de ligações C–O, às vibrações C–CH₃ e às deformações de anéis cíclicos (Yao et al., 2019).

A microscopia dos extratos proteicos (Figura 6) revelou uma microestrutura mais fragmentada na condição E1A, com a presença de agregados de menor tamanho. Considerando que o tamanho das partículas influencia propriedades funcionais de materiais proteicos, essa característica pode favorecer a hidratação e a interação com o solvente, contribuindo para maior solubilidade (Souza et al., 2015; Wang et al., 2020).

Embora o tamanho médio das partículas não tenha sido determinado diretamente neste estudo, as características microestruturais observadas para E1A sugerem que essa condição pode favorecer a obtenção de extratos proteicos com maior solubilidade e melhor dispersibilidade. Esses aspectos são relevantes do ponto de vista tecnológico, uma vez que o tamanho das partículas e a organização microestrutural têm sido associados às propriedades tecno- e bio- funcionais de extratos proteicos, influenciando seu potencial para aplicações industriais (Chen; Chi; Xu, 2012; Jeewanthi; Lee; Paik, 2015).

A condição E3NA apresentou o maior teor de proteínas solúveis, apesar de ter exibido o menor crescimento fúngico. Contrariamente, um estudo anterior com *G. sichuanense* demonstrou que a condição E3NA também esteve associada à redução tanto da produção de biomassa quanto das proteínas, provavelmente em decorrência de uma relação carbono:nitrogênio (C:N) próxima de 1:1 (Pessoa et al., 2023). Essa comparação sugere que o acúmulo de proteínas sob baixas relações C:N pode envolver respostas metabólicas distintas entre espécies de *Ganoderma*.

Condições ricas em nitrogênio podem aumentar a demanda energética para a assimilação desse elemento e para a biossíntese de aminoácidos, sendo frequentemente associadas à limitação do crescimento fúngico, ao mesmo tempo em que favorecem a síntese de proteínas. Nesse contexto, meios de cultivo formulados com fontes orgânicas de nitrogênio, que geralmente apresentam baixas relações C:N, têm sido descritos como favoráveis ao acúmulo de proteínas (Lima-Silva et al., 2026; Silva et al., 2025).

A maior recuperação de proteínas observada nas condições sem agitação, corrobora estudos anteriores, onde também foi observada tendência de maior recuperação de proteínas em biomassas de *G. sichuanense* provenientes de cultivos estáticos, alcançando valores próximos de $400 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de extrato (Pessoa et al., 2023). Esse comportamento tem sido atribuído à ausência de forças de cisalhamento, que podem provocar danos celulares e o extravasamento de componentes intracelulares em cultivos sob agitação (Pessoa et al., 2026).

A quantificação de proteínas realizada neste estudo teve como objetivo principal comparar as diferentes condições de fermentação. Assim, comparações diretas entre os valores absolutos obtidos e aqueles descritos na literatura devem ser interpretadas com cautela, uma vez que a formação de complexos entre proteínas e outros metabólitos pode interferir em métodos colorimétricos, como o ensaio de Bradford. Esse método baseia-se na ligação do corante *Coomassie Brilliant Blue* a resíduos básicos e aromáticos das proteínas. No entanto, a interação dessas moléculas com compostos fenólicos ou carboidratos pode mascarar parcialmente esses sítios de ligação, levando à subestimação do teor proteico (Banik et al., 2009; Gazzola et al., 2015).

Não foi observada uma relação consistente entre o teor de proteínas solúveis e a intensidade de absorbância obtida por FTIR, o que pode ser atribuído à contribuição de componentes insolúveis presentes na biomassa micelial (Sadhana; Malini, 2018). Em espécies de *Ganoderma*, polissacarídeos e terpenoides figuram entre os principais constituintes da biomassa e podem contribuir significativamente para os espectros de infravermelho, mascarando eventuais variações associadas às proteínas (Synytsya et al., 2024).

O maior acúmulo de proteínas solúveis pareceu estar associado à presença das hifas curtas do tipo chifre de veado observadas nas condições de cultivo sem agitação (Figura 4B, D, F e H). Essa morfologia tem sido descrita em associação ao desenvolvimento do micélio aéreo, representando uma estratégia de crescimento voltada para ampliar o acesso a nutrientes, incluindo o oxigênio (Adaskaveg; Gilbertson, 1986; Boromenskyi; Bisko, 2019). Além disso, o aumento do acúmulo de proteínas em micélios cultivados sob condições estáticas também foi relatado para *G. sichuanense*, em que essas formas hifais diferenciadas, interpretando-as como respostas adaptativas às condições ambientais, impactando a síntese de biomoléculas (Pessoa et al., 2026).

A caracterização das proteínas extraídas pode ser dificultada pela tendência dessas moléculas em coprecipitar com compostos de baixa massa molecular, como compostos fenólicos e carboidratos (Wu et al., 2014). Embora a diálise seja empregada para remover

essas substâncias, esse procedimento pode ser ineficiente quando elas se encontram complexadas às proteínas (Liu et al., 2019b), o que pode ter ocorrido no presente estudo. Entretanto, a formação de complexos proteína–fenol e/ou proteína–carboidrato pode modificar as propriedades das proteínas e potencializar suas atividades biológicas, incluindo a atividade antioxidante (Jakobek, 2015; Shaheen et al., 2022).

Os compostos fenólicos podem atuar como um escudo químico, limitando a oxidação das proteínas e aumentando sua estabilidade conformacional por meio de interações não covalentes (Lin et al., 2023). Paralelamente, os carboidratos são reconhecidos por estabilizar proteínas ao manter camadas de hidratação e conferir proteção contra estresses físico-químicos, como desidratação, congelamento e desnaturação térmica, mecanismos amplamente explorados em formulações farmacêuticas e biotecnológicas (Mensink et al., 2017). Nesse contexto, a maior concentração de compostos fenólicos e carboidratos observada no extrato E1A pode favorecer a formação de arranjos moleculares estabilizadores, capazes de preservar a integridade das proteínas e potencializar seu desempenho funcional.

A organização fragmentada observada no extrato proteico obtido na condição E1A (Figura 6) pode estar relacionada aos maiores teores de compostos fenólicos totais (CFT) e carboidratos, que podem interferir na agregação proteína–proteína e dificultar a formação de estruturas compactas. Essa observação está de acordo com o observado no capítulo anterior, para extratos proteicos de *G. sichuanense*, nos quais estruturas fragmentadas e fibrilares foram associadas a maior conteúdo de compostos fenólicos (Pessoa et al., 2026).

Os perfis de atividade antioxidante observados neste estudo sugerem que a concentração de proteínas, isoladamente, não explica o potencial antioxidante dos extratos proteicos de *G. multiplicatum*. O desempenho antioxidante superior do extrato E1A pode estar relacionado à sua organização microestrutural distinta, evidenciada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), em conjunto com os maiores teores de compostos fenólicos totais (CFT) e açúcares redutores, que podem atuar de forma sinérgica para potencializar a bioatividade. Em estudo anterior, Espinosa-García et al. (2021) relataram baixo potencial antioxidante em extratos orgânicos de *Ganoderma* obtidos por fermentação submersa, resultado associado ao baixo teor de compostos fenólicos totais (13 mg EAG.g⁻¹).

Gu et al. (2025) também relataram maior atividade antioxidante de peptídeos de *G. lucidum* quando avaliados pelo ensaio de ABTS^{•+} em comparação ao DPPH[•], corroborando a adequação do método ABTS^{•+} para a avaliação de compostos

predominantemente hidrofílicos. A baixa capacidade quelante observada neste estudo pode estar relacionada à reduzida disponibilidade de grupos funcionais, como hidroxila (–OH), tiol (–SH) e carboxila (–COOH), envolvidos na complexação de íons metálicos (Kontoghiorghes; Kontoghiorghe, 2020). Os valores de poder redutor obtidos são comparáveis aos descritos para *G. lucidum*, em que valores de absorbância próximos de 0,3 foram observados na concentração de 20 mg·mL⁻¹ para extratos aquosos de esporos (Klaus; Kozarski; Nikšić, 2011) e frações polissacarídicas (Shi; Zhang; Yang, 2013).

As correlações observadas sugerem que a atividade antioxidante dos extratos proteicos de *G. multiplicatum* pode resultar de associações bioquímicas entre diferentes componentes, e não da ação isolada de compostos individuais. Os ensaios baseados em mecanismos de oxidorredução apresentaram forte associação com os compostos fenólicos totais e os açúcares redutores, sustentando a hipótese da contribuição das interações proteína–fenol e proteína–carboidrato para o desempenho antioxidante. Em contraste, a correlação positiva entre o teor de proteínas e a habilidade quelante evidencia um possível papel das proteínas em mecanismos antioxidantes independentes de reações de oxidorredução. Em conjunto, esses resultados suportam um modelo multifatorial para explicar a atividade antioxidante dos extratos proteicos.

No gênero *Ganoderma*, diversos compostos de natureza proteica já foram descritos com atividade antioxidante, incluindo proteínas enriquecidas com selênio, enzimas antioxidantes, proteoglicanos, glicopeptídeos e extratos proteicos, evidenciando seu potencial para aplicações farmacêuticas (Du et al., 2007; Luo et al., 2024; Sa-ard et al., 2015; Wang et al., 2011; Zhu et al., 2019). Dessa forma, a obtenção de extratos proteicos com elevada atividade antioxidante, como observado no presente estudo, representa uma estratégia promissora para agregar valor aos produtos derivados de *Ganoderma*, especialmente aqueles isolados amazônicos ainda pouco explorados.

6.5. Conclusão

O isolado fúngico 1962 foi identificado como *Ganoderma multiplicatum*, e a composição da biomassa e a micromorfologia mostraram-se fortemente moduladas pelas condições de cultivo submerso. Os cultivos sem agitação promoveram arquiteturas hifais distintas, incluindo a formação de hifas do tipo “chifre de veado”, consistentemente associadas à maior recuperação de proteínas solúveis. Em contrapartida, o cultivo em meio contendo 10 g·L⁻¹ de glicose, 5 g·L⁻¹ de extrato de levedura e 2,5 g·L⁻¹ de peptona de soja, sob condições agitada, resultou em extratos proteicos com desempenho antioxidante superior em relação às demais condições avaliadas. Esse resultado é

atribuído à recuperação concomitante de proteínas, compostos fenólicos e carboidratos, favorecendo a formação de complexos proteína–metabólito com maior atividade funcional. Em conjunto, esses achados indicam que a fermentação submersa representa uma estratégia promissora para a obtenção de extratos ricos em proteínas antioxidantes a partir de *G. multiplicatum* da Amazônia.

Referências

- ADASKAVEG, James E.; GILBERTSON, Robert L. Cultural Studies and Genetics of Sexuality of *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae* in Relation to the Taxonomy of the *G. lucidum* Complex. **Mycologia**, v. 78, n. 5, p. 694–705, 1986.
- ANDRADE, Jonathan *et al.* FTIR-ATR determination of protein content to evaluate whey protein concentrate adulteration. **LWT**, v. 99, p. 166–172, 2019.
- ANTECKA, Anna; BIZUKOJC, Marcin; LEDAKOWICZ, Stanislaw. Modern morphological engineering techniques for improving productivity of filamentous fungi in submerged cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 12, p. 193, 2016.
- BADALYAN, Susanna M. *et al.* Morphological and ecological screening of different collections of medicinal white-rot bracket fungus *Ganoderma adspersum* (Schulzer) Donk (Agaricomycetes, Polyporales). **Italian Journal of Mycology**, v. 48, p. 1–15, 2019.
- BANIK, Samudra Prosad *et al.* Interference of sugars in the Coomassie Blue G dye binding assay of proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 386, n. 1, p. 113–115, 2009.
- BOLAÑOS, Ana Cristina; BONONI, Vera Lúcia Ramos; GUGLIOTTA, Adriana de Mello. New records of *Ganoderma multiplicatum* (Mont.) Pat. (Polyporales, Basidiomycota) from Colombia and its geographic distribution in South America. **Check List**, v. 12, n. 4, p. 1–7, 13 ago. 2016.
- BOROMENSKYI, D. O.; BISKO, N. A. Micromorphological features of species of *Ganoderma* (Ganodermataceae) in pure culture. **Ukrainian Botanical Journal**, v. 76, n. 6, p. 486–492, 2019.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.
- CABARROI-HERNÁNDEZ, Milay *et al.* The *Ganoderma weberianum-resinaceum* lineage: multilocus phylogenetic analysis and morphology confirm *G. mexicanum* and *G. parvulum* in the Neotropics. **MycologyKeys**, v. 59, p. 95–131, 2019.
- CAO, Yun; WU, Sheng-Hua; DAI, Yu-Cheng. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom “Lingzhi”. **Fungal Diversity**, v. 56, n. 1, p. 49–62, 2012.

- CHEN, Chen; CHI, Yu-Jie; XU, Wei. Comparisons on the Functional Properties and Antioxidant Activity of Spray-Dried and Freeze-Dried Egg White Protein Hydrolysate. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 6, p. 2342–2352, 2012.
- CHEVREUIL, Larissa Ramos *et al.* Recovery of Proteases and Protease Inhibitors from *Ganoderma* spp. Cultivated in Amazonian Lignocellulose Wastes. **Current Protein & Peptide Science**, v. 26, n. 1, p. 76–88, 2025.
- COETZEE, Martin P. A. *et al.* *Ganoderma* species, including new taxa associated with root rot of the iconic Jacaranda mimosifolia in Pretoria, South Africa. **IMA Fungus**, v. 6, n. 1, p. 249–256, 2015.
- CROUS, P. W. *et al.* Fungal Planet description sheets: 371–399. **Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 35, p. 264–327, 2015.
- CROUS, P. W. *et al.* Fungal Planet description sheets: 400–468. **Persoonia**, v. 36, p. 316–458, 2016.
- CROUS, P. W. *et al.* Fungal Planet description sheets: 558–624. **Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 38, p. 240–384, 2017.
- CROUS, P. W. *et al.* Fungal Planet description sheets: 785–867. **Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 41, p. 238–417, 2018.
- DOUANLA-MELI, Clovis; LANGER, Ewald. *Ganoderma carocalcareus* sp. nov., with crumbly-friable context parasite to saprobe on *Anthocleista nobilis* and its phylogenetic relationship in *G. resinaceum* group. **Mycological Progress**, v. 8, n. 2, p. 145–155, 2009.
- DU, Ming *et al.* Purification and characterization of a novel fungi Se-containing protein from Se-enriched *Ganoderma lucidum* mushroom and its Se-dependent radical scavenging activity. **European Food Research and Technology**, v. 224, n. 5, p. 659–665, 2007.
- ESPINOSA-GARCÍA, Victoria *et al.* Biological Activities of Different Strains of the Genus *Ganoderma* spp. (Agaricomycetes) from Mexico. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 23, n. 2, 2021.
- FANG, Qing-Hua; ZHONG, Jian-Jiang. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 769–774, 2002.
- GAZZOLA, Diana *et al.* Advantages of the KDS/BCA Assay over the Bradford Assay for Protein Quantification in White Wine and Grape Juice. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 66, n. 2, p. 227–233, 2015.
- GOMES-SILVA, Allyne Christina *et al.* Delimitation of taxa in *Amauroderma* (Ganodermataceae, Polyporales) based in morphology and molecular phylogeny of Brazilian specimens. **Phytotaxa**, v. 227, n. 3, p. 201–228, 2015.
- GOUVÊA, Paula Romenya dos Santos *et al.* Agro-wastes bioconversion by an Amazonian isolate of *Ganoderma* sp. and a commercial strain of *Ganoderma lingzhi*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 54, p. 102959, 2023.

- GU, Yimeng *et al.* Preparation of novel *Ganoderma lucidum* protein-derived bioactive peptides and their oxidation resistance, melanin synthesis inhibition and anti-inflammatory functions. **Food Bioscience**, v. 64, p. 105885, 2025.
- GUNNELS, Tess *et al.* The ITS region provides a reliable DNA barcode for identifying reishi/lingzhi (*Ganoderma*) from herbal supplements. **PLOS ONE**, v. 15, n. 11, p. e0236774, 2020.
- HAN, Jiandong *et al.* Effects of Different Carbon and Nitrogen Ratios on Yield, Nutritional Value, and Amino Acid Contents of *Flammulina velutipes*. **Life**, v. 14, n. 5, p. 598, 2024.
- HAPUARACHCHI, K. *et al.* High diversity of *Ganoderma* and *Amauroderma* (Ganodermataceae, Polyporales) in Hainan Island, China. **Mycosphere**, v. 9, p. 931–982, 2018.
- HAPUARACHCHI, K. K. *et al.* Ganodermataceae (Polyporales): Diversity in Greater Mekong Subregion countries (China, Laos, Myanmar, Thailand and Vietnam). **Mycosphere**, v. 10, p. 221–316, 2019.
- HE, Jun *et al.* Phylogenetic analyses and morphological characters reveal two new species of *Ganoderma* from Yunnan province, China. **MycoKeys**, v. 84, p. 141–162, 2021.
- JAKOBEK, Lidija. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food Chemistry**, v. 175, p. 556–567, 2015.
- JARGALMAA, Suldbold *et al.* Taxonomic evaluation of selected *Ganoderma* species and database sequence validation. **PeerJ**, v. 5, p. e3596, 2017.
- JAROS, Doris; KÖBSCH, Johannes; ROHM, Harald. Exopolysaccharides from Basidiomycota: Formation, isolation and techno-functional properties. **Engineering in Life Sciences**, v. 18, n. 10, p. 743–752, 2018.
- JEEWANTHI, Renda Kankanamge Chaturika; LEE, Na-Kyoung; PAIK, Hyun-Dong. Improved Functional Characteristics of Whey Protein Hydrolysates in Food Industry. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 35, n. 3, p. 350–359, 2015.
- KEJARIWAL, Mona *et al.* Peptone Induced Pigment Production of *Ganoderma lucidum*. **The Journal of Plant Science Research**, v. 38, p. 165–172, 2022.
- KHATUA, S.; GHOSH, S.; ACHARYA, K. Simplified Methods for Microtiter Based Analysis of In Vitro Antioxidant Activity. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 11, n. 2, 2017.
- KINGE, Tonjock Rosemary; MIH, Afui Mathias. *Ganoderma ryvardense* sp nov associated with basal stem rot (BSR) disease of oil palm in Cameroon. **Mycosphere**, p. 179–188, 2011.
- KLAUS, Anita S.; KOZARSKI, Maja S.; NIKŠIĆ, Miomir P. Antioxidant properties of hot water extracts from carpophore and spores of mushroom *Ganoderma lucidum*. **Zbornik Matice srpske za prirodne nauke**, n. 120, p. 279–288, 2011.

- KONTOGHIORGHES, George J.; KONTOGHIORGHE, Christina N. Iron and Chelation in Biochemistry and Medicine: New Approaches to Controlling Iron Metabolism and Treating Related Diseases. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1456, 2020.
- LI, Liu-Dingji *et al.* *Ganoderma* proteins and their potential applications in cosmetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 23, p. 9239–9250, 2019.
- LI, Tai-Hui *et al.* *Ganoderma leucocontextum*, a new member of the *G. lucidum* complex from southwestern China. **Mycoscience**, v. 56, n. 1, p. 81–85, 2015.
- LIAO, Baosheng *et al.* Identification of commercial *Ganoderma* (Lingzhi) species by ITS2 sequences. **Chinese Medicine**, v. 10, n. 1, p. 22, 2015.
- LIM, Teik Chee; ILHAM, Zul; WAN-MOHTAR, Wan Abd Al Qadr Imad. Production of Ganodiesel from the biomass of *Ganoderma lucidum* in air-L-shaped bioreactor (ALSB). **Heliyon**, v. 10, n. 15, 2024.
- LIMA JÚNIOR, Nelson Correia; BAPTISTA GIBERTONI, Tatiana; MALOSSO, Elaine. Delimitation of some neotropical laccate *Ganoderma* (Ganodermataceae): molecular phylogeny and morphology. **Revista de Biología Tropical**, v. 62, n. 3, p. 1197–1208, 2014.
- LIMA-SILVA, Giovanna *et al.* Catabolite Repression and Substrate Induction as Strategies for Protease Production in Edible Mushrooms. **Macromol**, v. 6, n. 1, p. 9, 2026.
- LIN, Duanquan *et al.* Improved functionality and safety of peptides by the formation of peptide-polyphenol complexes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 141, p. 104193, 2023.
- LIN, Jingwei *et al.* *Ganoderma* immunomodulatory proteins: mushrooming functional FIPs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 7, p. 2367–2380, 2022.
- LIU, Hong *et al.* *Ganoderma shanxiense*, a new species from northern China based on morphological and molecular evidence. **Phytotaxa**, v. 406, n. 2, p. 129–136, 2019a.
- LIU, Jun *et al.* Recent advances in phenolic–protein conjugates: synthesis, characterization, biological activities and potential applications. **RSC Advances**, v. 9, n. 61, p. 35825–35840, 2019b.
- LOYD, Andrew L. *et al.* Identifying the “Mushroom of Immortality”: Assessing the *Ganoderma* Species Composition in Commercial Reishi Products. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.
- LOYD, Andrew L. *et al.* Cultural characterization and chlamydospore function of the Ganodermataceae present in the eastern United States. **Mycologia**, v. 111, n. 1, p. 1–12, 2019.
- LU, Zhengwu *et al.* Morphological Engineering of Filamentous Fungi: Research Progress and Perspectives. v. 34, n. 6, p. 1197–1205, 28 jun. 2024.
- LUANGHARN, Thatsanee *et al.* *Ganoderma* (Ganodermataceae, Basidiomycota) Species from the Greater Mekong Subregion. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 10, p. 819, 2021.

- LUO, Hong-jian *et al.* Structural characterization and anti-oxidative activity for a glycopeptide from *Ganoderma lucidum* fruiting body. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 261, p. 129793, 2024.
- LUO, Shanshan *et al.* Optimization of Submerged Fermentation Conditions for Polysaccharide Production in Species of the Genus *Ganoderma* (Agaricomycetes) and Comparative Analysis of the Antioxidant Activities of Different Strains. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 27, n. 1, 2025.
- MAHMOUD, Yehia A. G.; MOHAMED, Eman H. F. A.; ABD ELZAHHER, E. H. F. Response of the Higher Basidiomycetic *Ganoderma resinaceum* to Sodium Chloride Stress. **Mycobiology**, v. 35, n. 3, p. 124–128, 2007.
- MENSINK, Maarten A. *et al.* How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 114, p. 288–295, 2017.
- OLIVEIRA-JUNIOR, S. D. *et al.* Adding-value to *Ganoderma lingzhi* by producing enzymes and antioxidant compounds under submerged fermentation using different culture media. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e283882, 2024.
- PAGE, D. E. *et al.* Sexuality and mating types of *Ganoderma philippii*, *Ganoderma mastoporum* and *Ganoderma australe*, three basidiomycete fungi with contrasting ecological roles in south-east Asian pulpwood plantations. **Australasian Plant Pathology**, v. 47, n. 1, p. 83–94, 2018.
- PESCIAROLI, Lorena *et al.* Characterization of *Pleurotus ostreatus* Biofilms by Using the Calgary Biofilm Device. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 19, p. 6083–6092, 2013.
- PESSOA, V. A. *et al.* Production of mycelial biomass, proteases and protease inhibitors by *Ganoderma lucidum* under different submerged fermentation conditions. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e270316, 2023.
- PESSOA, Vítor Alves *et al.* Impact of Submerged Fermentation Parameters on Proteins Extracted from *Ganoderma sichuanense* and Their Antioxidant Potential. **Microorganisms**, v. 14, n. 1, p. 133, 2026.
- PORTER, Debora Lyn *et al.* A review of the material and mechanical properties of select *Ganoderma* fungi structures as a source for bioinspiration. **Journal of Materials Science**, v. 58, n. 8, p. 3401–3420, 2023.
- QU, Zheng-Wei *et al.* Recombinant Expression and Bioactivity Comparison of Four Typical Fungal Immunomodulatory Proteins from Three Main *Ganoderma* Species. **BMC Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 80, 2018.
- RAJA, Huzefa A. *et al.* DNA barcoding for identification of consumer-relevant mushrooms: A partial solution for product certification? **Food Chemistry**, v. 214, p. 383–392, 2017.
- REN, Ang *et al.* Morphology Engineering: Uniform *Ganoderma lucidum* Pellet Formation in Coconut Juice by Bidirectional Submerged Fermentation. **Journal of Food Science**, v. 91, n. 2, p. e70892, 2026.

ROSALES-LÓPEZ, Catalina *et al.* Evaluation of the Use of Elicitors for the Production of Antioxidant Compounds in Liquid Cultures of *Ganoderma curtisii* from Costa Rica. **Molecules**, v. 27, n. 13, p. 4265, 2022.

SA-ARD, Piyawan *et al.* Antioxidant, antibacterial and DNA protective activities of protein extracts from *Ganoderma lucidum*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 2966–2973, 2015.

SADHANA, B.; MALINI, R. Hema. FTIR analysis for harvested Oyster mushroom. **TEJAS Thiagarajar College Journal**, v. 3, n. 4, p. 49–61, 2018.

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

SHAHEEN, Sherif *et al.* Dissecting dietary melanoidins: formation mechanisms, gut interactions and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 32, p. 8954–8971, 2022.

SHARIFI, Asghar *et al.* Antimicrobial potentials of crude fractions of polysaccharides of *Ganoderma* spp. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 39, p. 6817–6821, 2012.

SHI, Min; ZHANG, Zhenya; YANG, Yingnan. Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP). **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 200–206, 2013.

SILVA, Danielle Furtado da *et al.* Triagem de meios de cultivo para a produção de biomassa micelial e exopolissacarídeos por *Ganoderma* spp. **Observatorio de La Economía Latinoamericana**, v. 22, n. 4, p. e4326–e4326, 2024.

SILVA, Giovanna Lima *et al.* Highlighting the Potential of an Amazonian Oyster Mushroom (*Pleurotus Ostreatus*) through Comparison with Commercial Strains: Mycelial Growth and Protease Production in Different Culture Media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 197, n. 12, p. 8302–8318, 2025.

SOUZA, Clitor J. F. *et al.* Polymeric complexes obtained from the interaction of bovine serum albumin and κ -carrageenan. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 286–290, 2015.

STEYAERT, R. L. Study of Some *Ganoderma* Species. **Bulletin du Jardin botanique national de Belgique**, v. 50, n. 1/2, p. 135–186, 1980.

SUN, Y. F. *et al.* Species diversity, systematic revision and molecular phylogeny of Ganodermataceae (Polyporales, Basidiomycota) with an emphasis on Chinese collections. **Studies in Mycology**, v. 101, n. 1, p. 287–415, 2022.

SYNYTSYA, Andriy *et al.* Mid-Infrared Spectroscopic Study of Cultivating Medicinal Fungi *Ganoderma*: Composition, Development, and Strain Variability of Basidiocarps. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 1, p. 23, 2024.

TAKAO, Shoichi. Organic Acid Production by Basidiomycetes. **Applied Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 732–737, 1965.

- TCHOUMI, James Michel Tchotet *et al.* Taxonomy and species diversity of *Ganoderma* species in the Garden Route National Park of South Africa inferred from morphology and multilocus phylogenies. **Mycologia**, v. 111, n. 5, p. 730–747, 2019.
- TEIXEIRA, Flaviane Borges *et al.* Efeitos Das Condições de Cultivo Para Obtenção de Pellets Fúngicos. **Revista Agrotecnologia - Agrotec**, v. 14, n. FluxoCont, p. 27–33, 2023.
- TORRES-TORRES, Mabel Gisela *et al.* *Ganoderma* in Brazil: known species and new records. **Mycotaxon**, v. 121, n. 1, p. 93–132, 2013.
- VICECONTE, Fátima R. *et al.* *Ganoderma sessile* is a fast polysaccharide producer among *Ganoderma* species. **Mycologia**, v. 113, n. 3, p. 513–524, 2021.
- VU, D. *et al.* Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. **Studies in Mycology**, v. 92, n. 1, p. 135–154, 2019.
- WAGNER, Ricardo *et al.* Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide. **Journal of Biotechnology**, v. 114, n. 1, p. 153–164, 2004.
- WAN MOHTAR, Wan Abd Al Qadr Imad *et al.* Production of exopolysaccharide by *Ganoderma lucidum* in a repeated-batch fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 91–101, 2016.
- WANG, D. M.; YAO, Y. J. Intrastrain internal transcribed spacer heterogeneity in *Ganoderma* species. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 113–121, 2005.
- WANG, Dong-Mei *et al.* *Ganoderma multipileum*, the correct name for ‘*G. lucidum*’ in tropical Asia. **Botanical Studies**, v. 50, n. 4, p. 451–458, 2009.
- WANG, Huan *et al.* Effect of Spray-Drying and Freeze-Drying on the Properties of Soybean Hydrolysates. **Journal of Chemistry**, v. 2020, n. 1, p. 9201457, 2020.
- WANG, Lihua *et al.* Effect of different light of LED light quality on growth and antioxidant enzyme activities of *Ganoderma lucidum*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 36, n. 18, p. 2471–2474, 2011.
- WANG, Yi-Cheng; LIN, Fang-Yi; HSU, Tai-Hao. Effects of nitrogen from different sources on mycelial biomass and polysaccharide production and pellet morphology in submerged cultures of *Grifola frondosa*. **BioResources**, v. 16, p. 2937–2952, 2021.
- WELTI, Stéphane; COURTECUISSÉ, Régis. The Ganodermataceae in the French West Indies (Guadeloupe and Martinique). **Fungal Diversity**, v. 43, n. 1, p. 103–126, 2010.
- WU, Xiaolin *et al.* Universal sample preparation method integrating trichloroacetic acid/acetone precipitation with phenol extraction for crop proteomic analysis. **Nature Protocols**, v. 9, n. 2, p. 362–374, 2014.
- XING, Jia-Hui *et al.* Morphological characters and phylogenetic analysis reveal a new species within the *Ganoderma lucidum* complex from South Africa. **Phytotaxa**, v. 266, n. 2, p. 115–124, 2016.

- XING, Jia-Hui *et al.* Morphological and molecular identification of two new *Ganoderma* species on *Casuarina equisetifolia* from China. **MycoKeys**, v. 34, p. 93–108, 2018.
- XU, Mengmeng *et al.* The Performance and Evolutionary Mechanism of *Ganoderma lucidum* in Enhancing Selenite Tolerance and Bioaccumulation. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 6, p. 415, 2024.
- YAN, Meng-Qiu *et al.* Effects of Oleic Acid Addition Methods on the Metabolic Flux Distribution of Ganoderic Acids R, S and T's Biosynthesis. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 6, p. 615, 2022.
- YANG, Hong-De *et al.* *Ganoderma ovisporum* sp. nov. (Polyporales, Polyporaceae) from Southwest China. **Biodiversity Data Journal**, v. 10, p. e80034, 2022.
- YANG, Yunli *et al.* Advances in research on the active constituents and physiological effects of *Ganoderma lucidum*. **Biomedical Dermatology**, v. 3, n. 1, p. 6, 2019.
- YAO, Guohua *et al.* Understanding the infrared and Raman spectra of ganoderic acid A: An experimental and DFT study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 210, p. 372–380, 2019.
- YE, Lei *et al.* *Ganoderma weixiensis* (Polyporaceae, Basidiomycota), a new member of the *G. lucidum* complex from Yunnan Province, China. **Phytotaxa**, v. 423, n. 2, p. 75–86, 2019.
- ZHOU, Li-Wei *et al.* Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (Ganodermataceae, Polyporales) inferred from morphology and multilocus phylogeny. **Phytochemistry**, Special Issue: Ganoderma Phytochemistry. v. 114, p. 7–15, 2015.
- ZHU, Li-Fang *et al.* Development of *Ganoderma lucidum* spore powder based proteoglycan and its application in hyperglycemic, antitumor and antioxidant function. **Process Biochemistry**, v. 84, p. 103–111, 2019.

7. CAPÍTULO 3

Perfis diferenciais de citotoxicidade em células MT-2 infectadas
pelo HTLV-1 e imunomodulação in vitro de extratos proteicos de
Ganoderma sichuanense e *Ganoderma multiplicatum*

O presente capítulo corresponde à estrutura prévia de um artigo, ainda não submetido.

Perfis diferenciais de citotoxicidade em células MT-2 infectadas pelo HTLV-1 e imunomodulação *in vitro* de extratos proteicos de *Ganoderma sichuanense* e *Ganoderma multiplicatum*

Vítor Alves Pessoa^{1,2}, Giovanna Lima-Silva^{1,2}, Juniel Assis Crespo Neto^{3,4}, Daniele de Sá Pereira^{3,5}, Regiane Oliveira da Costa^{3,5}, Cláudio Lucas Santos Catão^{3,5}, Ceci Sales-Campos^{1,2}, Allyson Guimarães da Costa^{3,4,5}, Larissa Ramos Chevreuil²

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Amazonas, Brasil;

²Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis (LCFC), Coordenação de Tecnologia e Inovação (COTEI), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Amazonas, Brasil;

³Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Amazonas, Brasil;

⁴Programa de Pós-graduação em Hematologia e Hemoterapia (PPGH), Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Amazonas, Brasil;

⁵Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Amazonas, Brasil.

Resumo

Na infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1), estratégias voltadas à redução da carga celular infectada e à modulação da resposta imune representam alternativas terapêuticas promissoras para prevenir a progressão às doenças associadas. Nesse contexto, proteínas derivadas de cogumelos medicinais do gênero *Ganoderma* têm sido descritas como capazes de interagir com receptores de células imunes, induzindo morte seletiva em células transformadas e modulando a resposta imunológica. Assim, o presente estudo avaliou a citotoxicidade frente à linhagem celular infectada pelo HTLV-1 e a atividade imunomoduladora de extratos proteicos de uma linhagem comercial de *G. sichuanense* e de um isolado amazônico de *G. multiplicatum*, utilizando a linhagem MT-2 e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) sob resposta inflamatória, respectivamente. As espécies fúngicas foram cultivadas em fermentação submersa utilizando meio GYP, conforme condições previamente definidas em estudos anteriores, e os extratos proteicos foram obtidos das biomassas miceliais utilizando solução salina (0,15 M NaCl). Os extratos foram submetidos à quantificação proteica pelo método de Lowry, análise da estrutura secundária por espectroscopia no infravermelho, avaliação da atividade citotóxica pelo ensaio de metil tiazolil tetrazólio (MTT) e análise da atividade imunomoduladora por *Cytometric Bead Array* (CBA). *G. sichuanense* apresentou maior teor proteico (528,91 ± 8,81 mg·g⁻¹ de extrato), com maior conteúdo de α-hélice e β-antiparalela, enquanto *G. multiplicatum* apresentou maior conteúdo de voltas β. Ambos estimularam o metabolismo de PBMCs sem apresentar sinais de citotoxicidade. Frente à linhagem MT-2, apenas *G. sichuanense* apresentou citotoxicidade pronunciada, com CI₅₀ normalizada de 32,63 µg de proteína·mL⁻¹ após 48 h de tratamento. O extrato de *G. multiplicatum* induziu perfil pró-inflamatório e linfoproliferativo, com aumento das Interleucinas(IL)-1β, IL-2, IL-17A, do Fator de Necrose Tumoral-α (TNF-α) e do Interferon-γ (IFN-γ). Em contraste, *G. sichuanense* reduziu progressivamente IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN-γ e IL-4, sugerindo perfil imunorregulador potencialmente relevante no contexto da infecção pelo HTLV-1. De forma geral, os resultados demonstram que os extratos proteicos atuam diferencialmente em células imunes e destacam o extrato proteico de *G. sichuanense* como mais promissor para aplicações terapêuticas voltadas ao HTLV-1.

Palavras-chave: Antiviral, Cogumelo medicinal, Imunomodulação, Proteínas bioativas

Abstract

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection involves mechanisms associated with clonal expansion of infected cells and immune dysregulation, making therapeutic strategies aimed at reducing infected cell burden and modulating immune responses promising approaches to prevent the progression to the associated diseases. In this context, proteins derived from medicinal mushrooms of the *Ganoderma* genus have been described as capable of interacting with immune cell receptors, inducing selective death

in transformed cells while modulating immune responses. Thus, the present study evaluated the cytotoxicity of protein extracts against an HTLV-1-infected cell line and their immunomodulatory activity, using a commercial strain of *G. sichuanense* and an Amazonian isolate of *G. multiplicatum*, with the MT-2 cell line and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) under inflammatory stimulation, respectively.. The fungal species were cultivated under submerged fermentation using GYP medium according to conditions previously established in earlier studies, and protein extracts were obtained from mycelial biomass using saline solution (0.15 M NaCl). The extracts were subjected to protein quantification by the Lowry method, secondary structure analysis by infrared spectroscopy, evaluation of cytotoxic activity using the methylthiazolyltetrazolium (MTT) assay, and analysis of immunomodulatory activity by Cytometric Bead Array (CBA). *G. sichuanense* presented higher protein content ($528.91 \pm 8.81 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ extract), with higher α -helix and antiparallel β -sheet contents, whereas *G. multiplicatum* showed higher β -turn content. Both extracts stimulated PBMC metabolism without inducing cytotoxicity. Against the MT-2 cell line, only *G. sichuanense* exhibited pronounced cytotoxicity, with a normalized IC_{50} of $32.63 \text{ } \mu\text{g protein} \cdot \text{mL}^{-1}$ after 48 h of treatment. The *G. multiplicatum* extract induced a pro-inflammatory and lymphoproliferative profile, characterized by increased Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-17A, Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), and Interferon- γ (IFN- γ) levels. In contrast, *G. sichuanense* progressively reduced IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN- γ , and IL-4, suggesting an immunoregulatory profile potentially relevant in the context of HTLV-1 infection. Overall, the results demonstrate that the protein extracts act differentially on immune cells and highlight the *G. sichuanense* protein extract as the most promising candidate for therapeutic applications targeting HTLV-1.

Keywords: Antiviral, Bioactive proteins, Immunomodulation, Medicinal mushroom,

7.1. Introdução

O Vírus Linfotrófico de Células T Humanas tipo 1 (HTLV-1) é um retrovírus transmitido pelas vias sexual, vertical e parenteral, com estimativa de 10 a 20 milhões de pessoas vivendo com a infecção em todo o mundo. Embora a maioria das pessoas vivendo com HTLV-1 (PVHTLV-1) permaneça assintomática, cerca de 5% podem desenvolver doenças associadas ao vírus, como a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), uma doença neurodegenerativa crônica, ou a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL), uma neoplasia agressiva de células T CD4⁺ (Letafati et al., 2026; Noori et al., 2026).

A proteína transativadora (Tax) e o fator de transcrição de zíper de leucina básica (HBZ) expressas pelas células infectadas desempenham papéis centrais na persistência viral, promovendo a proliferação dos linfócitos T CD4⁺ infectados, modulando respostas imunes e impulsionando a progressão para as doenças associadas (Brites et al., 2021). Nesse contexto, a redução da carga de células infectadas pode diminuir o risco de desenvolvimento de ATL, HAM/TSP e outras condições inflamatórias associadas, representando uma potencial estratégia terapêutica, uma vez que os tratamentos atualmente disponíveis são majoritariamente voltados ao manejo clínico dessas manifestações (Cooney et al., 2025).

Além da redução da carga de células infectadas, a imunoterapia também é considerada uma abordagem promissora no contexto da infecção, uma vez que a desregulação imunológica contribui para a progressão às doenças associadas. À exemplo disso, citocinas como IL-2, IL-4, IL-6 e IL-8 estão relacionadas à proliferação e

sobrevivência de células infectadas. Na HAM/TSP, o aumento de IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10, IL-12p70 e TNF- α está associado ao dano tecidual, ruptura da barreira hematoencefálica e desmielinização. Em contraste, na ATL, o aumento de IL-10, TGF- β e CCL22, associado à redução de IFN- γ , favorece a supressão da resposta efetora anti-HTLV-1 e antitumoral, contribuindo para a manutenção e expansão das células leucêmicas (Futsch et al., 2018; Guimarães et al., 2025).

Moléculas derivadas de fontes naturais têm atraído atenção por sua capacidade de induzir seletivamente a morte de células transformadas, ao mesmo tempo em que estimulam a proliferação de células saudáveis, incluindo células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) (Rodríguez-Garza et al., 2023). Produtos naturais de origem fúngica, especialmente aqueles derivados de cogumelos medicinais, apresentam em sua composição compostos fenólicos, terpenos, polissacarídeos e proteínas que têm demonstrado grande potencial antiviral por meio da interferência na entrada viral, replicação do genoma, atividade de proteínas virais e modulação da resposta imune (Seo; Choi, 2021).

Dentre os cogumelos medicinais, espécies do gênero *Ganoderma* apresentam amplo histórico de uso seguro, baixa toxicidade e número limitado de efeitos adversos graves relatados, com alguns extratos já incluídos como “*Generally Recognized as Safe*” (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos (Sharma et al., 2025). Dessa forma, representam uma fonte promissora de moléculas bioativas candidatas ao desenvolvimento de terapias, dentre as quais as proteínas constituem uma classe relativamente pouco explorada (Li et al., 2019).

Ganoderma sichuanense, uma espécie modelo de cogumelo medicinal, assim como *Ganoderma multiplicatum*, uma espécie ainda pouco explorada quanto ao potencial biotecnológico, foram descritas como fontes de proteínas bioativas, incluindo proteases, inibidores de proteases e proteínas antioxidantes (Chevreuil et al., 2025; Pessoa et al., 2023, 2026a, 2026b), no entanto, o potencial terapêutico desses extratos ainda permanece pouco compreendido. Nesse contexto, o presente estudo avaliou o potencial terapêutico frente ao HTLV-1 de extratos proteicos obtidos de uma linhagem comercial de *G. sichuanense* e de um isolado amazônico de *G. multiplicatum*, cultivados em fermentação submersa sob condições previamente estabelecidas para maior recuperação de proteínas antioxidantes, por meio da investigação de atividades citotóxicas e imunomoduladoras.

7.2. Materiais e Métodos

7.2.1. Aspectos éticos

O presente estudo faz parte de um projeto maior, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), sob o CAAE nº 96247226.0.0000.0009 e parecer nº 8.320.006 (Anexos, Documentos suplementares 1). A coleta do sangue periférico utilizado no presente trabalho foi realizada somente após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), em conformidade com a Resolução CNS nº 466/2012.

7.2.2. Cultivo fúngico, extração e caracterização proteica

7.2.2.1. Linhagens fúngicas

A linhagem comercial *Ganoderma sichuanense* CC22 e isolado amazônico *Ganoderma multiplicatum* 1962 foram acessados da coleção de trabalho do Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis, pertencente à Coordenação de Tecnologia e Inovação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (COTEI/INPA). As linhagens foram mantidas em placas de Petri em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), refrigeradas à 4 °C até a utilização. A reativação para o cultivo foi realizada em meio BDA com incubação à 25 °C.

7.2.2.2. Fermentação submersa

G. sichuanense e *G. multiplicatum* foram cultivados por 12 dias à 25 °C em meio de líquido contendo glicose (10 g·L⁻¹), peptona de soja (2,5 g·L⁻¹) e extrato de levedura (2,5 g·L⁻¹), utilizando-se como inóculo 7 discos de micélio (Ø = 7 mm) previamente cultivados em meio BDA. As condições de incubação foram definidas individualmente para cada linhagem com base em avaliações prévias, considerando a condição de cultivo que resultou na obtenção de extratos proteicos com maior atividade antioxidante, conforme demonstrado nos capítulos 1 e 2. Dessa forma, foi adotado cultivo estático para *G. sichuanense*, enquanto *G. multiplicatum* foi cultivado sob agitação orbital a 120 rpm (Pessoa et al., 2026a, 2026b). Após as fermentações submersas, as biomassas miceliais foram separadas do meio de cultura através de filtração à vácuo, lavadas com água destilada, congeladas, liofilizadas e maceradas.

7.2.2.3. Obtenção dos extratos proteicos

As extrações foram realizadas utilizando solução 0,15 M de NaCl (1:20 m/v) sob agitação (2 h, 120 rpm, 10 °C), seguido de centrifugação (20 minutos, 10,000 × g, 4 °C). O sobrenadante foi dialisado contra água destilada, utilizando membranas de celulose com *cut-off* de 12 quilodaltons (kDa), por 48h, sob refrigeração a 4 °C, sendo

posteriormente centrifugado (20 min, $4.667 \times g$, 4 °C) e liofilizado, resultando em extratos proteicos enriquecidos em proteínas de média a alta massa molecular.

7.2.2.4. Quantificação de proteínas, caracterização espectroscópica e análise de estruturas secundárias

O teor de proteínas solúveis nos extratos foi estimado pela metodologia de Lowry et al. (1951) com adaptações para microplaca de 96 poços, com base em uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA). Os grupos químicos presentes nos extratos proteicos foram investigados por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR). Para isso, 5 mg de cada amostra foram analisados utilizando um espectrômetro Cary 630 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), na faixa de 750 a 4000 cm^{-1} .

A caracterização da estrutura secundária das proteínas foi realizada utilizando a região da banda de amida I (1700–1600 cm^{-1}). Os espectros foram submetidos à correção de baseline, suavização pelo filtro de Savitzky–Golay e normalização dos sinais antes da análise. A deconvolução da banda de amida I foi conduzida por ajuste Gaussiano múltiplo não linear utilizando o pacote *minpack.lm* no software RStudio versão 4.4.2. Os percentuais das estruturas secundárias foram calculados a partir da integração das áreas das bandas ajustadas.

7.2.3. Análises em modelos celulares

7.2.3.1. Linhagem celular infectada com HTLV-1

A linhagem celular comercial MT-2, derivada de células T CD4⁺ humanas cronicamente infectadas por HTLV-1, foi utilizada como modelo celular infectado. O cultivo foi realizado em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 contendo vermelho de fenol, modificado com L-glutamina, Hepes e bicarbonato de sódio (Gibco™, Rockville, MD), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB, Gibco™) e 1% de antibiótico + antimicótico (Gibco™). Trocas de meio de cultura foram realizadas em média a cada 48h.

7.2.3.2. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico

A coleta de sangue periférico de um indivíduo apto à doação na Fundação HEMOAM foi realizada após a assinatura do TCLE. O isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foi realizado por gradiente de densidade utilizando Histopaque® (Sigma-Aldrich), sendo utilizadas como células HTLV-1 negativas para comparação com a linhagem infectada.

Após a coleta, o sangue periférico foi diluído em tampão fosfato-salino (PBS) na proporção de 1:1 (v/v) e cuidadosamente adicionado em tubos Falcon contendo Histopaque® na proporção de 1:3 (Histopaque:sangue diluído), seguido de centrifugação a $400 \times g$ por 30 min. A interface correspondente às PBMCs foi coletada e lavada três vezes com meio RPMI suplementado, utilizando centrifugação a $400 \times g$ por 10 min a 4 °C. Em seguida, o *pellet* de células foi ressuspensionado em meio RPMI suplementado, de acordo com a concentração celular necessária para a realização dos testes.

7.2.3.3. Viabilidade celular

O efeito dos extratos proteicos sobre a viabilidade celular foi avaliado por meio da capacidade das células de reduzir o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a cristais de formazan, após o tratamento com diferentes concentrações dos extratos. Para isso, PBMCs e células da linhagem MT-2 foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10^5 células/poço) utilizando meio RPMI suplementado, tratadas com diferentes concentrações dos extratos proteicos (3,125 a $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e incubadas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Para as PBMCs foi avaliado o período de tratamento de 24 h, enquanto para a linhagem MT-2 foram avaliados os períodos de 24, 48 e 72 h.

Após os períodos de incubação, o meio de cultura foi removido e adicionou-se 100 μL de meio RPMI sem vermelho de fenol e 10 μL de solução de MTT (5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em PBS), seguidos de incubação por 4 h. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) 100% para solubilização dos cristais de formazan. O meio de cultura RPMI foi utilizado como controle negativo, enquanto o DMSO (25%, v/v) foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram expressos como percentual de atividade metabólica celular em relação ao controle negativo.

7.2.3.4. Avaliação da organização da cultura celular

Para avaliação morfológica, células da linhagem MT-2 (5×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços de fundo plano e incubadas por 48h até atingir aproximadamente 80% de confluência. As células foram então expostas aos extratos proteicos em diferentes concentrações (3,125 a $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e incubadas por 24 h a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂. As alterações na morfologia da camada celular foram visualizadas por microscopia de luz invertida, utilizando um microscópio Zeiss PrimoVert na objetiva de 4 $\times$ (aumento total de 40 $\times$) por proporcionar maior cobertura do campo experimental.

7.2.3.5. Avaliação da atividade imunomoduladora

Para a dosagem de citocinas, as PBMCs foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^5 células/poço e previamente estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) por 24 h visando a indução de resposta pró-inflamatória, sendo incubadas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Em seguida, foi realizado o tratamento com a adição dos extratos proteicos nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 µg·mL⁻¹, seguido de incubação adicional por 24 h.

Após o período de incubação, os sobrenadantes foram coletados para a dosagem das citocinas IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, TNF-α e IFN-γ utilizando os kits BD Cytometric Bead Array (CBA) *Human Th1/Th2/Th17 Cytokine* e *Human Inflammatory Cytokines*. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Biosciences), com processamento dos dados no software *FCAP array*, conforme as instruções do fabricante. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em pg·mL⁻¹.

7.2.4. Análise estatística e processamento dos dados

Os dados de quantificação proteica foram submetidos à análise de variância one-way (ANOVA), seguida do teste de Tukey, enquanto os ensaios celulares foram analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnett, considerando diferenças significativas para valores de $p < 0,05$. Os valores de concentração inibitória de 50% (CI₅₀) foram estimados por regressão não linear do tipo log(inibidor) versus resposta normalizada com inclinação variável. As análises estatísticas e regressões foram realizadas no software GraphPad Prism versão 9.4. Para a construção do mapa de calor no software RStudio versão 4.4.2, os dados dos ensaios celulares foram normalizados em relação aos respectivos controles experimentais, transformados em Z-score e integrados em uma matriz comparativa com controle médio.

7.3. Resultados

7.3.1. Perfil bioquímico e estrutural dos extratos proteicos

O teor de proteínas solúveis diferiu significativamente entre os extratos proteicos das espécies avaliadas (Tabela 1). O extrato obtido da biomassa de *G. sichuanense* apresentou maiores concentrações proteicas, com valores aproximadamente 1,5 vezes superiores aos observados para *G. multiplicatum*.

A espectroscopia no infravermelho demonstrou a presença de bandas de absorção semelhantes entre as duas amostras, as quais diferenciaram-se principalmente pela maior intensidade de absorbância observada no extrato do *G. sichuanense* (Figura 1).

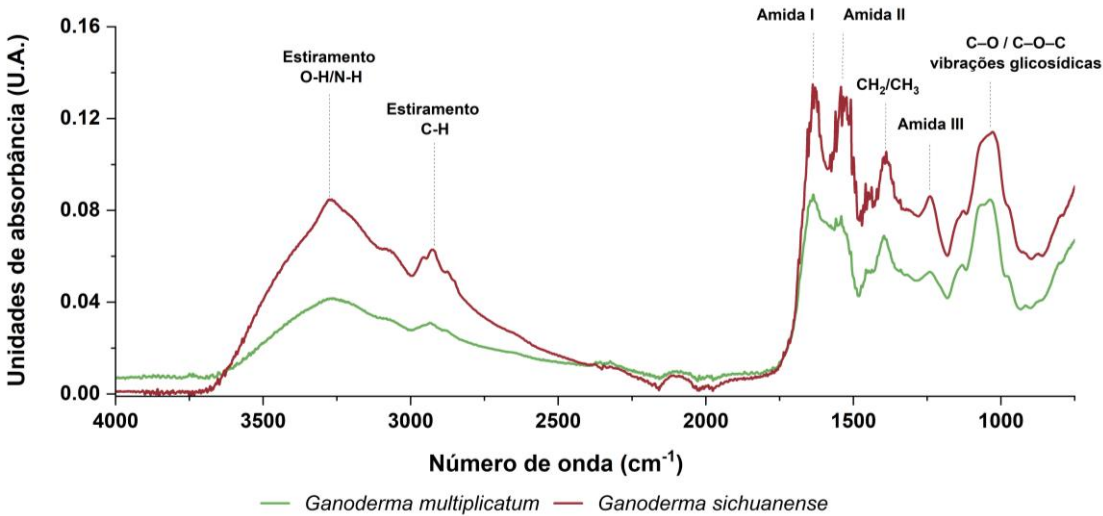
Adicionalmente, observa-se que o extrato proteico dessa espécie apresenta maior complexidade espectral na região correspondente às bandas de amida I e II (1700–1500 cm^{-1}), associadas, principalmente, às vibrações de grupos peptídicos, quando comparado ao extrato do *G. multiplicatum*.

Tabela 1 – Quantificação de proteínas solúveis estimadas pelo método de Lowry.

Amostra	Proteínas solúveis	
	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}$ de extrato ⁻¹	$\text{mg}\cdot\text{g}$ de extrato ⁻¹
<i>Ganoderma multiplicatum</i>	92,18 ± 4,50b	354,55 ± 17,32b
<i>Ganoderma sichuanense</i>	137,52 ± 2,29a	528,91 ± 8,81a

Dados apresentados como média ± desvio padrão (n = 3 repetições independentes). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 1 – Espectro de FTIR-ATR dos extratos proteicos de *G. multiplicatum* e *G. sichuanense*.



A análise de deconvolução espectral da banda de amida I (1700–1600 cm^{-1}) sugere diferenças no perfil conformacional dos extratos, permitindo sua distinção quanto à composição de estruturas secundárias. O extrato proteico de *G. multiplicatum* apresentou maior enriquecimento em voltas β , sugerindo uma organização estrutural mais distribuída e heterogênea. Em contrapartida, *G. sichuanense* exibiu maiores percentuais de α -hélice e folhas β antiparalelas, indicando um perfil conformacional relativamente mais organizado. Os conteúdos de estruturas desordenadas e folhas- β mostraram-se semelhantes entre os extratos proteicos (Tabela 2).

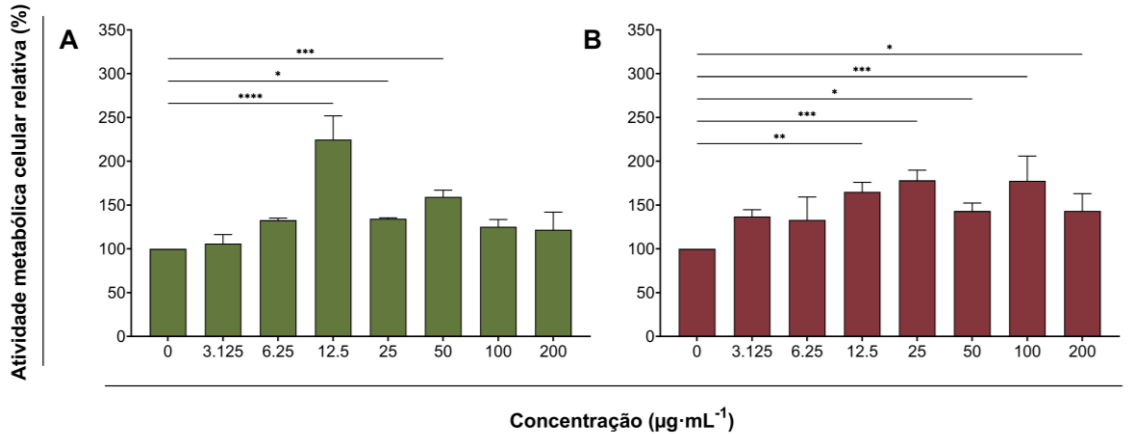
Tabela 2 – Composição relativa de estruturas secundárias obtida por deconvolução espectral da banda de amida I dos extratos proteicos de *G. multiplicatum* e *G. sichuanense*.

Extratos proteicos	Estruturas secundária (%)				
	α -hélice	Folhas β	Estruturas aleatórias	Volta β	β -antiparalela
<i>G. multiplicatum</i>	12,76	46,46	6,93	33,08	0,77
<i>G. sichuanense</i>	21,00	48,09	5,02	16,75	9,73

7.3.2. Avaliação do efeito dos extratos sobre PBMCs

O tratamento das PBMCs com os extratos proteicos não promoveu redução da atividade metabólica relativa em nenhuma das concentrações avaliadas (Figura 2). Em contraste, foi observado aumento da atividade metabólica em todos os tratamentos avaliados. *G. multiplicatum* apresentou maior faixa de estimulação entre 12,5 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 2A), enquanto *G. sichuanense* manteve esse efeito em uma faixa mais ampla de concentrações, entre 12,5 e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 2B).

Figura 2 – Atividade metabólica relativa de PBMCs tratadas com diferentes concentrações dos extratos proteicos de *G. multiplicatum* (A) e *G. sichuanense* (B).



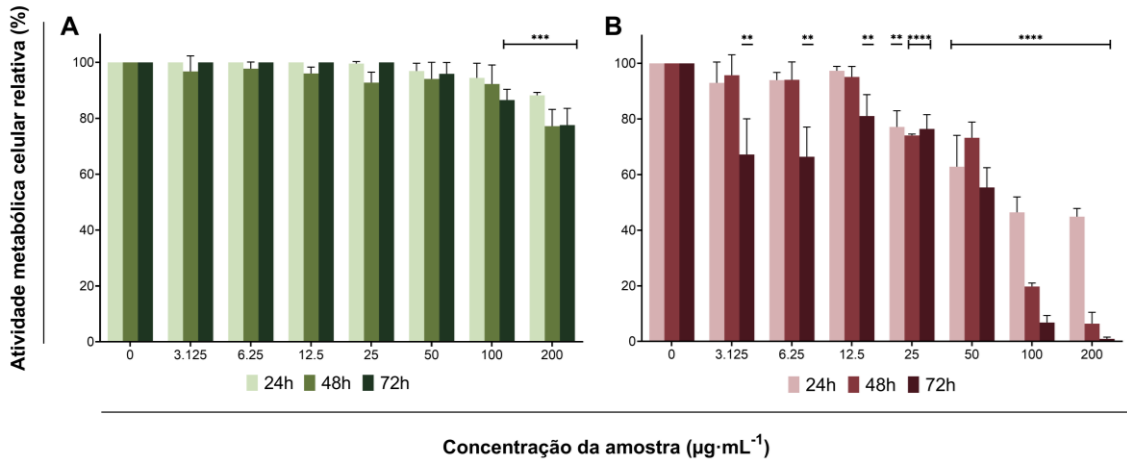
Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$ repetições independentes). Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett; ns = diferenças estatísticas não significativas; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

7.3.3. Avaliação do efeito dos extratos sobre células MT-2 infectadas pelo HTLV-1

Diferentemente do observado para as PBMCs, os extratos proteicos exibiram potencial em reduzir a viabilidade das células infectadas com HTLV-1, evidenciado pela diminuição da atividade metabólica celular relativa (Figura 3). O extrato proteico de *G. multiplicatum* promoveu a redução da atividade metabólica de forma mais proeminente apenas na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ no período de 72h e na concentração de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, em todos os períodos avaliados (Figura 3A). O extrato de *G. sichuanense*, por

sua vez, apresentou efeito mais proeminente, com redução da atividade metabólica celular a partir da concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ nos períodos de 24 e 48 h, ao passo que todas as concentrações apresentaram atividade no período de 72 h (Figura 3B).

Figura 3 – Atividade metabólica relativa da linhagem celular MT-2 tratada com diferentes concentrações dos extratos proteicos de *G. multiplicatum* (A) e *G. sichuanense* (B).



Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$ repetições independentes). Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett; ns = diferenças estatísticas não significativas; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Para melhor caracterizar o efeito sobre células infectadas pelo HTLV-1, o extrato proteico de *G. sichuanense*, que apresentou redução progressiva da atividade metabólica de acordo com o aumento da concentração testada, foi submetido à estimativa da concentração inibitória de 50%. A modelagem dose-resposta dos ensaios de atividade metabólica demonstrou aumento progressivo do efeito citotóxico sobre a linhagem MT-2 ao longo do tempo de exposição, evidenciado pela redução gradual dos valores estimados de CI_{50} (Tabela 3).

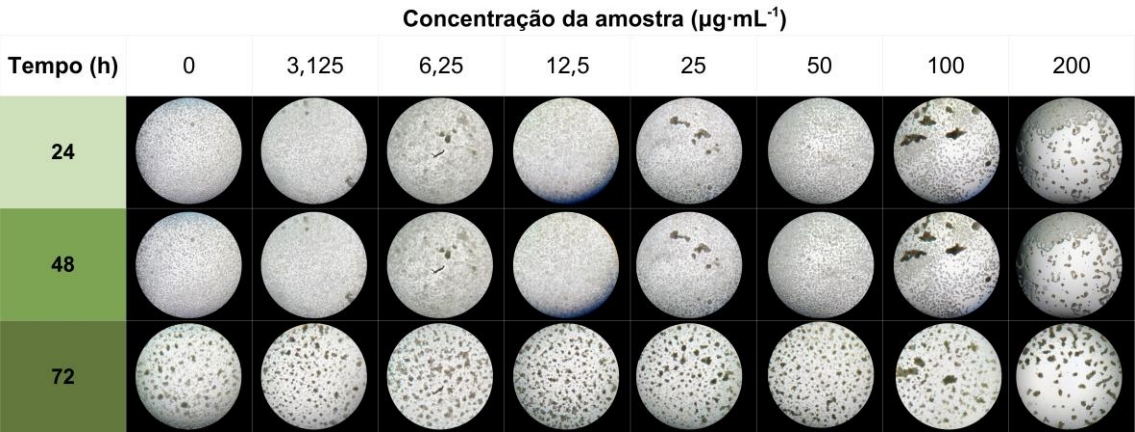
Tabela 3 – Estimativa da concentração inibitória de 50% (CI_{50}) do extrato proteico de *G. sichuanense* sobre a linhagem MT-2, ao longo do tempo de exposição.

Tempo (h)	CI_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Intervalo de confiança (95%)	$\log\text{CI}_{50}$	CI_{50} normalizada (μg de proteína $\cdot\text{mL}^{-1}$)*	R^2
24	112,40	86,79 – 156,00	2,05	59,45	0,8855
48	61,70	52,60 – 71,74	1,79	32,63	0,9466
72	45,68	38,30 – 53,85	1,66	24,16	0,9423

Valores obtidos por regressão não linear utilizando o modelo dose-resposta sigmoidal com inclinação variável ($\log[\text{inibidor}]$ vs. resposta normalizada). *Valores normalizados pelo teor proteico do extrato.

Microscopicamente, foram observadas alterações na integridade e distribuição da camada celular após o tratamento com os extratos proteicos (Figuras 4 e 5). O tratamento com o extrato proteico do *G. multiplicatum* demonstrou efeitos mais evidentes apenas nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, caracterizados pela presença de áreas com ausência de células, bem como pela formação de agregados celulares (Figura 4).

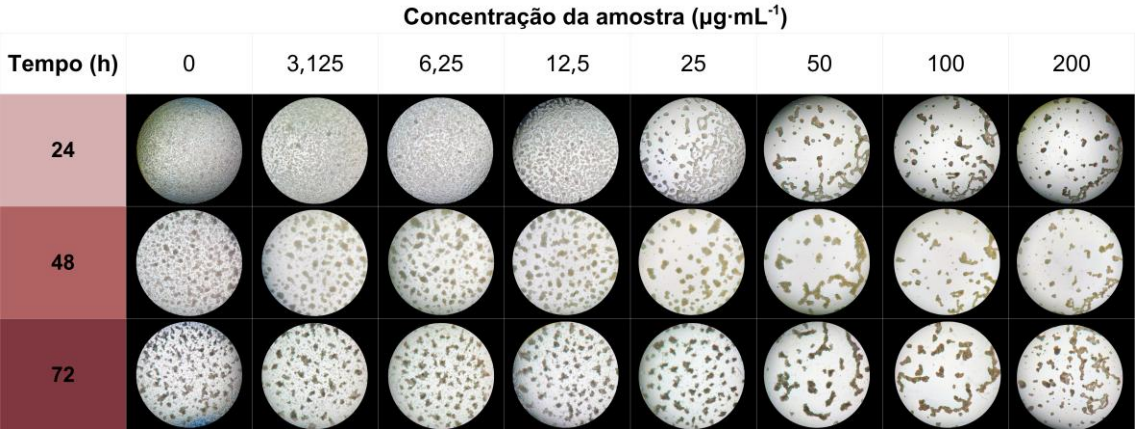
Figura 4 – Efeito do extrato proteico de *G. multiplicatum* sobre a integridade e a densidade celular da linhagem MT-2 em diferentes tempos de exposição.



Imagens representativas dos tratamentos avaliados em cada período experimental, obtidas a partir de ensaios conduzidos independentemente.

Alterações semelhantes foram observadas após o tratamento com o extrato proteico de *G. sichuanense*, incluindo a formação de áreas acelulares e agregados celulares (Figura 5). Entretanto, os efeitos foram mais pronunciados e observados a partir de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, acompanhados pelo escurecimento, formação dos agregados e acúmulo de debris celulares, corroborando a maior citotoxicidade do extrato sobre a linhagem MT-2, em concordância com os resultados do ensaio de MTT.

Figura 5 – Efeito do extrato proteico de *G. sichuanense* sobre a integridade e a densidade celular da linhagem MT-2 em diferentes tempos de exposição.



Imagens representativas dos tratamentos avaliados em cada período experimental, obtidas a partir de ensaios conduzidos independentemente.

7.3.4. Atividade imunomoduladora

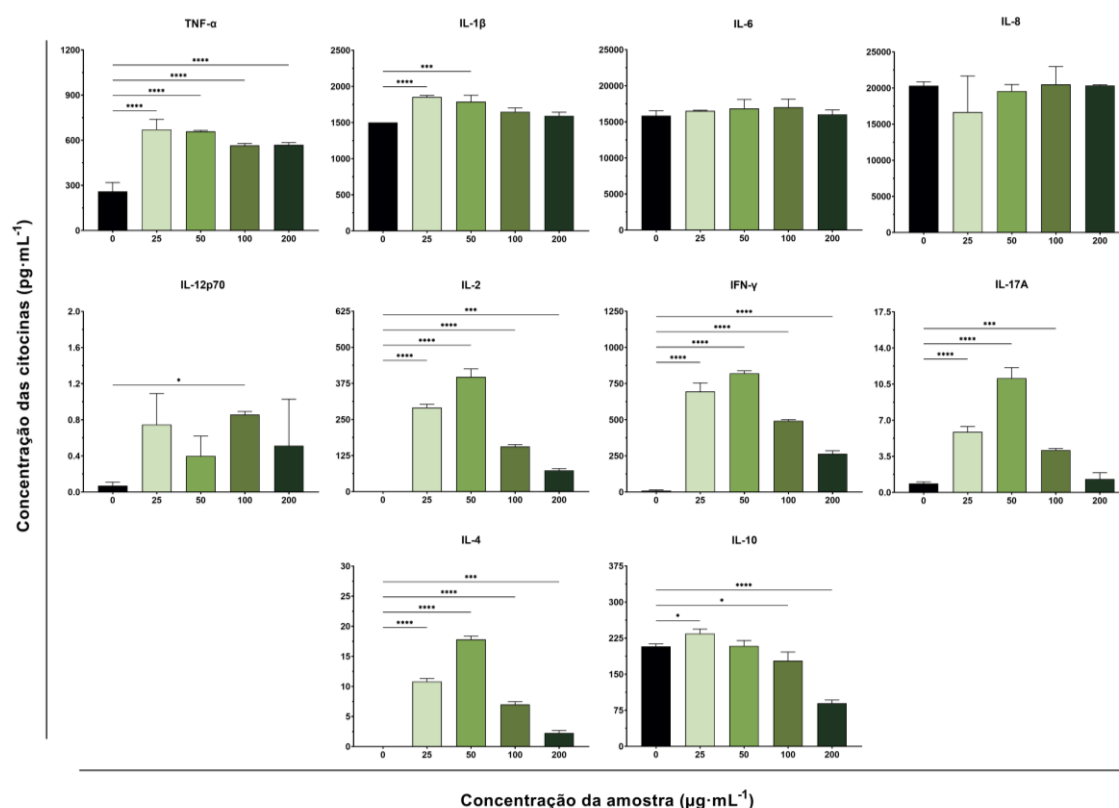
O tratamento das PBMCs estimuladas com LPS e o extrato proteico de *G. multiplicatum* promoveu alterações na produção de citocinas, com um perfil imunomodulador predominantemente pró-inflamatório (Figura 6). Entre as citocinas pró-inflamatórias avaliadas, observou-se aumento significativo na produção de TNF- α , cujos níveis permaneceram elevados entre 25 e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, variando de $569,21 \pm 15,42$ a $671,40 \pm 68,07$ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$. De maneira semelhante, IL-1 β também apresentou aumento significativo após os tratamentos, com maiores valores observados entre 25 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($1854,02 \pm 22,38$ e $1789,91 \pm 22,38$ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente).

Em contraste, IL-6 e IL-8, apesar de apresentarem pequenas variações nos valores médios entre os tratamentos, não apresentaram alterações significativas em relação ao controle. Já para IL-12p70, verificou-se aumento discreto, com maior valor observado após tratamento com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extrato proteico ($0,86 \pm 0,03$ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 6).

Os níveis de IL-2 aumentaram significativamente após tratamento com o extrato de *G. multiplicatum*, apresentando maior concentração observada em 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($397,78 \pm 27,43$ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e redução nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Resultado semelhante foi observado para IFN- γ , cuja produção atingiu o maior valor em 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($3790,86 \pm 80,40$ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$), seguida de redução nas maiores concentrações (Figura 6).

No mesmo sentido, IL-17A apresentou aumento significativo, principalmente em 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extrato de *G. multiplicatum* ($11,08 \pm 1,44$ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e redução progressiva com o aumento da concentração do extrato. IL-4 também demonstrou aumento significativo seguido de redução com maiores concentrações, com valores entre $7,01 \pm 0,45$ e $10,82 \pm 0,49$ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$. IL-10, por sua vez, manteve valores próximos ao controle nas menores concentração, com uma redução progressiva de acordo com a concentração do extrato, destacando-se 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($89,72 \pm 6,68$ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 6).

Figura 6 – Painel de citocinas dosadas nos sobrenadantes de PBMCs estimuladas com LPS e tratadas com diferentes concentrações do extrato proteico de *G. multiplicatum*.



Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$ repetições independentes). Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett; ns = diferenças estatísticas não significativas; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

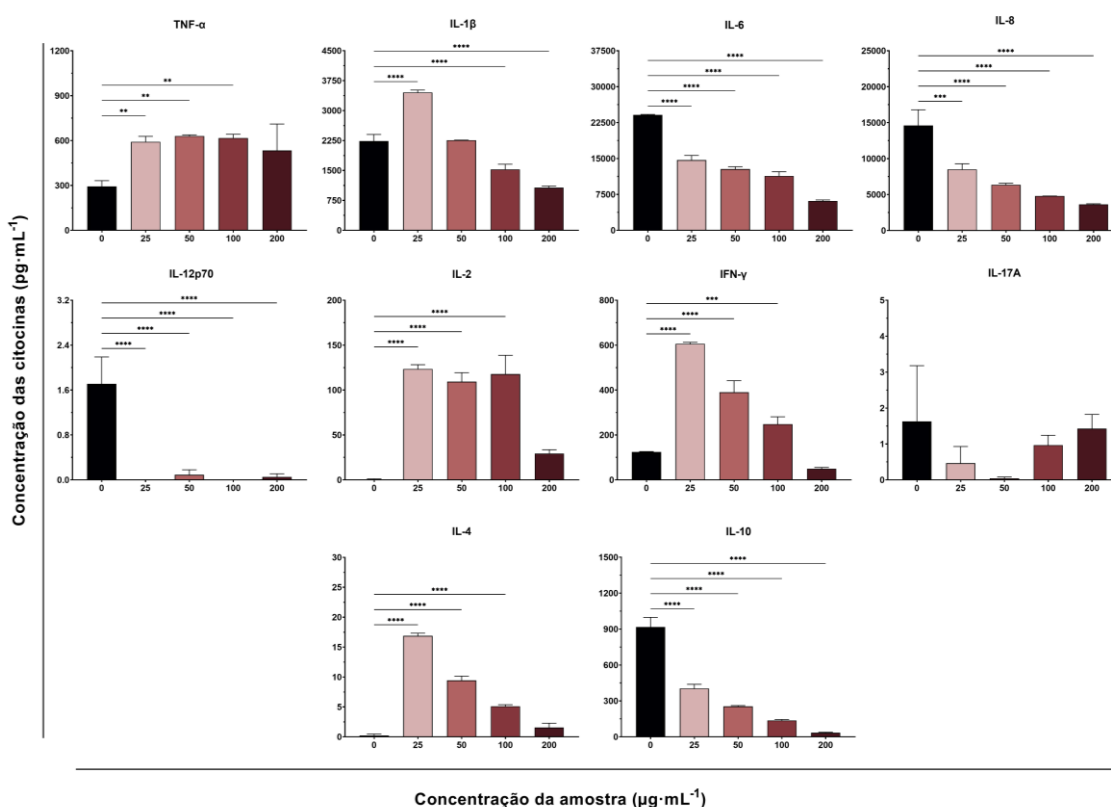
O extrato proteico de *G. sichuanense*, por sua vez, também promoveu alterações significativas na produção de citocinas, caracterizando um perfil imunomodulador misto, marcado tanto pela indução quanto pela redução de mediadores inflamatórios (Figura 7). Verificou-se um aumento significativo na produção de TNF- α entre 25 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, com valores de $591,60 \pm 36,49$ e $617,11 \pm 25,14$ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. IL-1 β apresentou comportamento distinto, com aumento significativo apenas nas menores concentrações testadas, seguido de redução progressiva nas maiores doses, chegando a $1068,29 \pm 41,84$ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ após tratamento com a amostra a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A citocina IL-6 também apresentou redução significativa após o tratamento com o extrato de *G. sichuanense*, com redução significativa a partir da concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($14662,45 \pm 385,54$ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em relação ao controle ($24111,86 \pm 36,83$ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$). O mesmo padrão foi observado para IL-8 após tratamento com 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do extrato proteico, reduzindo de $20359,13 \pm 2177,18$ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para $8504,30 \pm 780,50$ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Da mesma forma, os níveis de IL-12p70 foram reduzidos, chegando a valores próximos ao limiar de detecção em praticamente todas as concentrações avaliadas (Figura 7).

Os níveis de IL-2 e IFN- γ aumentaram significativamente, atingindo os maiores valores médios no tratamento com 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($123,46 \pm 4,77 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $605,93 \pm 6,79 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente), seguido de redução expressiva na concentração de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do extrato proteico de *G. sichuanense*. IL-17A não apresentou aumento significativo após os tratamentos, permanecendo em baixos níveis em todas as concentrações avaliadas (Figura 7).

IL-4 apresentou aumento significativo em 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do extrato de *G. sichuanense* ($16,89 \pm 0,44 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) seguido de redução com o aumento da concentração, enquanto a IL-10 demonstrou redução progressiva, alcançando os menores níveis após tratamento com o extrato na concentração de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($34,20 \pm 4,51 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 7).

Figura 7 – Pannel de citocinas dosadas nos sobrenadantes de PBMCs estimuladas com LPS e tratadas com diferentes concentrações do extrato proteico de *G. sichuanense*.



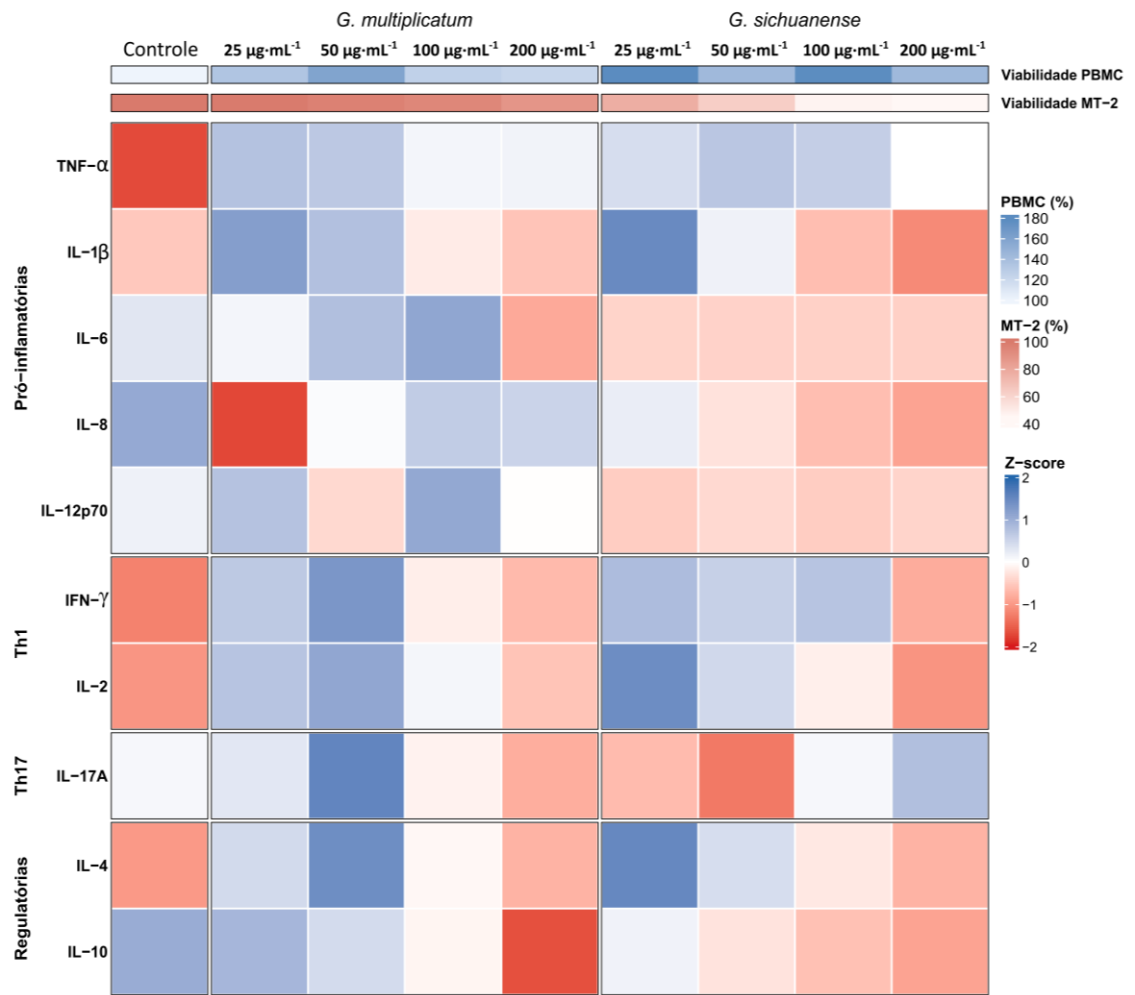
Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$ repetições independentes). Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett; ns = diferenças estatísticas não significativas; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

A análise integrativa dos dados sumariza os padrões distintos de resposta celular observados após tratamento com os extratos proteicos de *G. multiplicatum* e *G. sichuanense*. Em ambas as espécies, o aumento da concentração dos extratos esteve

associado à manutenção ou aumento da atividade metabólica de PBMCs, concomitantemente à redução da viabilidade da linhagem MT-2 (Figura 8).

Contudo, a menor redução e/ou manutenção da viabilidade da linhagem MT-2, após tratamento com o extrato proteico de *G. multiplicatum*, ocorreu paralelamente à manutenção ou aumento da produção da maioria das citocinas avaliadas, com destaque para TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-2 e IL-17A. Em contraste, o extrato proteico de *G. sichuanense* apresentou redução progressiva da viabilidade da MT-2 acompanhada pela diminuição dos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70 e IL-10 nas maiores concentrações.

Figura 8 – Mapa de calor integrativo da atividade metabólica em PBMCs, citotoxicidade na linhagem MT-2 e perfil imunomodulador induzidos pelos extratos proteicos de *G. multiplicatum* e *G. sichuanense*.



7.4. Discussão

Embora as condições de fermentação submersa influenciem significativamente o teor de proteínas solúveis obtidas da biomassa micelial de espécies do gênero *Ganoderma*, maiores concentrações proteicas não necessariamente refletem maior atividade biológica (Pessoa et al., 2023). Dessa forma, os extratos avaliados no presente estudo foram selecionados com base no maior potencial antioxidante, previamente

observado para cada espécie (Pessoa et al., 2026a, 2026b). Essa escolha considera que, proteínas capazes de interagir com células imunes são frequentemente associadas à atividade antioxidante em modelos *in vitro* (Li et al., 2019; Lin et al., 2022).

A quantificação de proteínas pelo método de Lowry revelou concentrações de proteínas solúveis superiores às previamente observadas pelo método de Bradford para as mesmas amostras (Pessoa et al., 2026a, 2026b). Essas diferenças corroboram com estudos anteriores que destacam a maior sensibilidade do método de Lowry para proteínas de extratos fúngicos, devido à sua interação com resíduos de tirosina, triptofano e cisteína, permitindo melhor detecção de variações na composição química das proteínas, enquanto o método de Bradford apresenta maior dependência da interação com resíduos aromáticos e básicos específicos (Legler et al., 1985; Silva et al., 2025).

Apesar do aumento do teor proteico determinado pelo método de Lowry, os resultados permaneceram consistentes com aqueles obtidos nos capítulos anteriores, nos quais a biomassa micelial de *G. multiplicatum* apresentou menor rendimento de proteínas solúveis em relação a *G. sichuanense* (Pessoa et al., 2026a, 2026b). Esse padrão também corrobora com o perfil espectroscópico observado por FTIR-ATR, visto que o isolado amazônico apresentou menor intensidade de absorbância nas bandas atribuídas a componentes proteicos, indicando menor concentração dessas moléculas na amostra.

De forma geral, os espectros de FTIR-ATR dos extratos proteicos de ambas as espécies apresentaram perfil semelhante ao descrito para concentrados proteicos de *Agaricus bisporus* (Karabulut et al., 2024). Os sinais observados podem ser atribuídos ao estiramento O–H/N–H na região de 3300–3400 cm^{-1} , ao estiramento C–H próximo de 2900 cm^{-1} e às bandas de amida I ($\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$) e amida II ($\sim 1540 \text{ cm}^{-1}$), associadas à conformação estrutural e ao conteúdo proteico. Adicionalmente, os sinais entre 1400 e 1300 cm^{-1} estão relacionados à deformações de C–H e modos vibracionais de proteínas, podendo também apresentar contribuição de carboidratos residuais (Karabulut et al., 2024).

Padrão semelhante também foi observado em estudos anteriores com extratos proteicos do basidioma de *G. sichuanense* (Chevreuil et al., 2025). Entretanto, os percentuais de estruturas secundárias diferiram daqueles previamente reportados no capítulo 1, nos quais predominavam folhas- β ($\sim 75\%$) e voltas- β ($\sim 23\%$), com baixo teor de α -hélice ($\sim 1\%$). Essas diferenças estão relacionadas à maior densidade de pontos na região de 1700–1600 cm^{-1} no presente trabalho, permitindo ajuste mais refinado das bandas sobrepostas durante a análise de deconvolução da banda de amida I.

A relevância biológica das diferenças conformacionais está relacionada ao seu potencial em modular a interação com receptores da superfície celular. Nesse contexto, estruturas secundárias como folhas- β , α -hélices e *loops* exercem papel relevante na organização de regiões envolvidas no reconhecimento molecular. Esses arranjos estruturais moldam a topologia e as superfícies de interação com receptores de células imunes, favorecendo a complementaridade com receptores como os do tipo Toll (TLRs) e outros receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (Asami; Shimizu, 2021; Bell et al., 2003; Sun; Foster; Boyington, 2004).

A influência dessas conformações sobre a atividade imunológica já é descrita para diferentes proteínas, incluindo imunoglobulinas e citocinas (Sun; Foster; Boyington, 2004). Estruturas ricas em folhas- β têm sido associadas à interação com TLR4 e à modulação funcional de células do sistema imune, enquanto regiões contendo α -hélices e *loops* expostos participam na formação de interfaces de reconhecimento receptor-ligante relacionadas à ativação celular (Awasthi; Anbanandam; Rodgers, 2015; Clements et al., 1992; Wychowanec et al., 2025). À exemplo disso, estudos com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC I) demonstram que α -hélices e folhas- β contribuem conjuntamente para a formação de sítios de reconhecimento antigênico associados à ativação de linfócitos T (Hunt; Munitz; Pease, 1992).

O potencial de interação dos extratos proteicos com receptores celulares foi inicialmente evidenciado pelo aumento da atividade metabólica em PBMCs. A resposta observada apresentou perfil não monotônico dependente da concentração, com maior estimulação em concentrações intermediárias, padrão frequentemente associado à respostas horméticas em células do sistema imune (Hastings, 2005; Schirmacher, 2021). Efeitos semelhantes foram descritos por Gill e Rieder (2008), onde observaram aumento de até 2,5 vezes na atividade metabólica de PBMCs humanas tratadas com extratos de *Ganoderma lucidum*, em concentrações entre 1 e 350 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, atribuindo esse efeito ao aumento da proliferação celular.

Proteínas imunomoduladoras fúngicas estão entre as principais classes de proteínas de *Ganoderma* associadas à proliferação de linfócitos T e B, células *natural killer* (NK) e células dendríticas, apresentando atividade mitogênica. Em PBMCs humanas, essas proteínas são capazes de ativar a via fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B (PI3K/Akt), com participação adicional das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), incluindo a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e p38, promovendo a progressão do ciclo celular da fase G0/G1 para S. Além disso, induzem a

secreção de citocinas relacionadas à expansão linfocitária, incluindo IL-2 e IL-3 (Hsiao et al., 2008; Khalid et al., 2025).

Nas condições avaliadas, o extrato proteico de *G. multiplicatum* promoveu maior redução da atividade metabólica da linhagem MT-2 apenas na concentração de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Esse comportamento pode estar relacionado ao menor teor de proteínas solúveis presentes na amostra, embora a composição do extrato também possa ter influenciado essa resposta, uma vez que o efeito observado atingiu um platô ao longo do período de exposição, sem aumento progressivo da atividade citotóxica.

G. sichuanense, por sua vez, apresentou maior potencial citotóxico sobre a linhagem MT-2 infectada pelo HTLV-1, promovendo redução da atividade metabólica a partir da concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ nos períodos de 24 e 48 h, e a partir de 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ após 72 h de exposição. Embora ainda não sejam encontrados relatos sobre a atividade citotóxica de cogumelos frente à linhagem MT-2, estudos com extratos hidroalcoólicos de plantas agrícolas demonstraram valores de CI_{50} variando entre 14,1 e 320,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ após 72 h de tratamento (Kai et al., 2011), destacando o potencial observado no presente trabalho.

A redução da densidade celular, a formação de áreas livres de células, o escurecimento celular e o aparecimento de debris observados na microscopia da linhagem MT-2 tratada com os extratos proteicos corroboram com os resultados obtidos no ensaio de atividade metabólica por MTT, indicando comprometimento da viabilidade da linhagem MT-2 após os tratamentos. A presença de agregados celulares observada após os tratamentos pode estar relacionada aos processos de morte celular induzidos na linhagem MT-2, uma vez que estruturas derivadas da apoptose, como vesículas extracelulares e corpos apoptóticos, atuam modulando as interações e a organização celular em microambientes inflamatórios. Essas estruturas podem promover ativação linfocitária e recrutamento celular, favorecendo processos de agregação e reorganização celular local (Dieudé; Kaci; Hébert, 2021), podendo assim contribuir para o padrão de agregação observado após os tratamentos.

Mesmo apresentando perfis semelhantes sobre a atividade metabólica de PBMCs, os extratos proteicos demonstraram padrões distintos de atividade imunomoduladora, assim como observado para a atividade frente à linhagem MT-2. Essas diferenças foram evidenciadas principalmente pelo perfil de citocinas induzido após os tratamentos, sugerindo mecanismos distintos de interação com células imunes e de modulação funcional da resposta imunológica.

A imunomodulação induzida pelo extrato de *G. multiplicatum* sugere predominância de resposta pró-inflamatória e linfoproliferativa, caracterizada principalmente pelo aumento de IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-17A. No contexto da infecção pelo HTLV-1, essas citocinas estão frequentemente associadas a estados de hiperativação imunológica e inflamação crônica. A elevação de IL-2 e IFN- γ , por exemplo, constitui uma das principais características da ativação espontânea de linfócitos T observada em PVHTLV-1, contribuindo para a manutenção da proliferação celular e amplificação da resposta inflamatória (Assone et al., 2022; Shafiei; Mozhgani, 2023).

Da mesma forma, TNF- α , IL-1 β e IL-17A estão relacionadas à intensificação do processo inflamatório e ao recrutamento celular, sendo frequentemente associadas à fisiopatologia da HAM/TSP, especialmente em processos de neuroinflamação e dano tecidual (Letafati et al., 2026). Em contrapartida, o perfil observado não apresentou aumento expressivo de IL-10, citocina frequentemente relacionada à imunossupressão e à manutenção da sobrevivência de células leucêmicas na ATL (Weterings; Rowan; Cook, 2025).

Esse perfil imunomodulador, associado à baixa capacidade de redução da viabilidade da linhagem MT-2, sugere menor potencial terapêutico frente ao HTLV-1. Contudo, o aumento da atividade metabólica em PBMCs, juntamente com a indução de citocinas associadas à ativação imunológica, sugere a possibilidade de outras aplicações biológicas para o extrato. Nesse contexto, compostos naturais com propriedades pró-inflamatória e potencial linfoproliferativo vêm sendo investigados como agentes adjuvantes em diferentes contextos neoplásicos (Dong et al., 2022; Wang et al., 2024).

A atividade imunomoduladora induzida pelo extrato proteico de *G. sichuanense* apresentou perfil distinto, caracterizado predominantemente pela redução progressiva de citocinas associadas à inflamação e à proliferação celular. Embora tenha sido observado aumento inicial de TNF- α , IL-1 β , IL-2, IFN- γ e IL-4 nas menores concentrações avaliadas, diminuições progressivas e expressivas foram observadas para IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70, IFN- γ e IL-4 com o aumento da concentração do extrato. Esse comportamento sugere um efeito imunomodulador concentração-dependente, caracterizado por uma resposta inicial de ativação celular, seguida de supressão parcial de mediadores inflamatórios e linfoproliferativos.

O aumento na secreção de IL-2 nas menores concentrações, seguido de redução nas maiores concentrações, verificado para ambos os extratos é consistente com o aumento na atividade metabólica verificada para as PBMCs no ensaio com MTT. Esse achado corrobora portanto o potencial mitogênicos das amostras, uma vez que essa

citocina é reconhecida como um fator de crescimento de linfócitos T, sendo verificado no sobrenadante de células em processo de mitose (Spolski; Li; Leonard, 2018).

No contexto da infecção pelo HTLV-1, a redução de IL-6, IL-8 e IL-1 β é particularmente relevante, uma vez que essas citocinas estão envolvidas na manutenção do processo inflamatório crônico, no recrutamento celular e no dano tecidual observado principalmente na HAM/TSP. Além disso, IL-6 e IL-10 também participam de mecanismos relacionados à sobrevivência celular e evasão imune em células transformadas pelo HTLV-1 (Bastos Ferreira et al., 2026; Futsch et al., 2018).

A diminuição observada para IL-10 é particularmente relevante, considerando o papel dessa citocina na imunossupressão e na manutenção do microambiente favorável à progressão da ATL. Paralelamente, a ausência de aumento expressivo de IL-17A sugere menor potencial de exacerbação de vias inflamatórias associadas à neuroinflamação e recrutamento celular persistente (Letafati et al., 2026; Weterings; Rowan; Cook, 2025).

Esses resultados tornam-se ainda mais relevantes quando associados à maior capacidade do extrato em reduzir a atividade metabólica e promover alterações na organização do microambiente celular da linhagem MT-2. Conforme observado no mapa de calor, o extrato de *G. sichuanense* combinou estímulo do metabolismo de PBMCs saudáveis, atividade citotóxica frente a células infectadas pelo HTLV-1 e redução de citocinas potencialmente envolvidas na progressão inflamatória e manutenção da infecção. Dessa forma, os resultados sugerem um perfil promissor para aplicações terapêuticas relacionadas ao HTLV-1, tanto pela capacidade de comprometer a viabilidade celular quanto pela modulação de mediadores imunológicos associados à fisiopatologia da HAM/TSP e ATL.

7.5. Conclusão

Os extratos proteicos de *Ganoderma sichuanense* e *Ganoderma multiplicatum* apresentaram atividades biológicas distintas nos modelos celulares avaliados, demonstrando que diferentes espécies do gênero *Ganoderma* podem modular respostas celulares por mecanismos específicos. No contexto da infecção pelo HTLV-1, *G. sichuanense* destaca-se com maior potencial terapêutico, enquanto *G. multiplicatum* apresenta-se como uma fonte promissora de moléculas bioativas para investigação em outros contextos patológicos. Em conjunto, os resultados reforçam o potencial terapêutico de proteínas derivadas de cogumelos medicinais e evidenciam a micodiversidade amazônica como fonte de moléculas de interesse biotecnológico.

Referências

- ASAMI, Junta; SHIMIZU, Toshiyuki. Structural and functional understanding of the toll-like receptors. **Protein Science**, v. 30, n. 4, p. 761–772, 2021.
- ASSONE, Tatiane *et al.* Systemic cytokines and GlycA discriminate disease status and predict corticosteroid response in HTLV-1-associated neuroinflammation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, p. 293, 2022.
- AWASTHI, Shanjana; ANBANANDAM, Asokan; RODGERS, Karla K. Structure of a TLR4-interacting SPA4 peptide. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27431–27438, 2015.
- BASTOS FERREIRA, Ana Patrícia *et al.* Evaluation of the Association of Cytokines, Interleukin 6 Polymorphism, and Proviral Load With Myelopathy, Pain, and Functionality in HTLV1-Infected Patients. **Journal of Medical Virology**, v. 98, n. 2, p. e70839, 2026.
- BELL, Jessica K. *et al.* Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 10, p. 528–533, 2003.
- BRITES, Carlos *et al.* Pathogenesis of HTLV-1 infection and progression biomarkers: An overview. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 101594, 2021.
- CHEVREUIL, Larissa Ramos *et al.* Recovery of Proteases and Protease Inhibitors from *Ganoderma* spp. Cultivated in Amazonian Lignocellulose Wastes. **Current Protein and Peptide Science**, v. 26, n. 1, p. 76–88, 2025.
- CLEMENTS, John M. *et al.* Biological and structural properties of MIP-1 α expressed in yeast. **Cytokine**, v. 4, n. 1, p. 76–82, 1992.
- COONEY, James P. *et al.* Combination antiretroviral therapy and MCL-1 inhibition mitigate HTLV-1 infection in vivo. **Cell**, v. 188, n. 18, p. 4896–4912.e19, 2025.
- DIEUDÉ, Mélanie; KACI, Imane; HÉBERT, Marie-Josée. The Impact of Programmed Cell Death on the Formation of Tertiary Lymphoid Structures. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.
- DONG, Songtao *et al.* Emerging role of natural products in cancer immunotherapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 12, n. 3, p. 1163–1185, 2022.
- FUTSCH, Nicolas *et al.* Cytokine Networks Dysregulation during HTLV-1 Infection and Associated Diseases. **Viruses**, v. 10, n. 12, p. 691, 2018.
- GILL, Simperal K.; RIEDER, Michael J. Toxicity of a traditional Chinese medicine, *Ganoderma lucidum*, in children with cancer. **The Canadian Journal of Clinical Pharmacology**, v. 15, n. 2, p. e275–285, 2008.
- GUIMARÃES, Ana Beatriz *et al.* In Vitro Model of the Human Blood–Brain Barrier to Explore HTLV-1 Immunopathogenesis. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 47, n. 10, p. 818, 2025.
- HASTINGS, Kenneth L. Commentary on Hormetic Dose-Response Relationships in Immunology: Occurrence, Quantitative Features of the Dose Response, Mechanistic Foundations, and Clinical Implications. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, n. 2–3, p. 297–298, 2005.

HSIAO, Yi-Min *et al.* Effect of a fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* on cell cycle and interferon-gamma production through phosphatidylinositol 3-kinase signal pathway. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 423–430, 2008.

HUNT, H. D.; MUNITZ, T. I.; PEASE, L. R. Alloreactive cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes determined by both the alpha helices and beta sheets of the class I peptide binding site. **Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 3, p. 821–829, 1992.

KAI, Hisahiro *et al.* Inhibition of proliferation by agricultural plant extracts in seven human adult T-cell leukaemia (ATL)-related cell lines. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, n. 3, p. 651–655, 2011.

KARABULUT, Gulsah *et al.* Sustainable fungi-based protein extraction from agro-waste mushroom stem using deep eutectic solvents. **Food Chemistry: X**, v. 24, p. 101931, 2024.

KHALID, Hafsa *et al.* Fungal immunomodulatory proteins (FIPs) from *Ganoderma lucidum*: Unveiling their immunomodulatory mechanisms and potential for cancer therapy. **Pure and Applied Biology (PAB)**, v. 14, n. 2, p. 159–186, 2025.

LEGLER, Günter *et al.* On the chemical basis of the Lowry protein determination. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 2, p. 278–287, 1985.

LETAFATI, Arash *et al.* Unmasking HAM/TSP: understanding HTLV-1-driven neurological disease. **Journal of NeuroVirology**, v. 32, n. 2, p. 8, 2026.

LI, Liu-Dingji *et al.* *Ganoderma* proteins and their potential applications in cosmetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 23, p. 9239–9250, 2019.

LIN, Jingwei *et al.* *Ganoderma* immunomodulatory proteins: mushrooming functional FIPs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 7, p. 2367–2380, 2022.

LOWRY, Oliver H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

NOORI, Bezhan *et al.* Epidemiology and Clinical Outcomes of HTLV-1: A Comprehensive Narrative Review of Endemic and Nonendemic Regions. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2026, n. 1, p. 8667755, 2026.

PESSOA, V. A. *et al.* Production of mycelial biomass, proteases and protease inhibitors by *Ganoderma lucidum* under different submerged fermentation conditions. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e270316, 2023.

PESSOA, Vítor Alves *et al.* Impact of Submerged Fermentation Parameters on Proteins Extracted from *Ganoderma sichuanense* and Their Antioxidant Potential. **Microorganisms**, v. 14, n. 1, p. 133, jan. 2026a.

PESSOA, Vítor Alves *et al.* An Amazonian *Ganoderma* isolate as a source of antioxidant proteins: Influence of submerged fermentation conditions on mycelial architecture and bioactivity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 120, 2026b.

RODRÍGUEZ-GARZA, Nancy E. *et al.* In Vitro Biological Activity and Lymphoma Cell Growth Inhibition by Selected Mexican Medicinal Plants. **Life**, v. 13, n. 4, p. 958, 2023.

SCHIRRMACHER, Volker. Less Can Be More: The Hormesis Theory of Stress Adaptation in the Global Biosphere and Its Implications. **Biomedicines**, v. 9, n. 3, p. 293, 2021.

SEO, Dong Joo; CHOI, Changsun. Antiviral Bioactive Compounds of Mushrooms and Their Antiviral Mechanisms: A Review. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 350, 2021.

SHAFIEI, Mohammadreza; MOZHGANI, Sayed-Hamidreza. Th17/IL-17 Axis in HTLV-1-Associated Myelopathy Tropical Spastic Paraparesis and Multiple Sclerosis: Novel Insights into the Immunity During HAMTSP. **Molecular Neurobiology**, v. 60, n. 7, p. 3839–3854, 2023.

SHARMA, Aman *et al.* Bioactive compounds of *Ganoderma* species: molecular mechanisms and therapeutic potential in cancer and metabolic disorders. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 12, p. 497, 2025.

SILVA, Giovanna Lima *et al.* Highlighting the Potential of an Amazonian Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) through Comparison with Commercial Strains: Mycelial Growth and Protease Production in Different Culture Media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 197, n. 12, p. 8302–8318, 2025.

SPOLSKI, Rosanne; LI, Peng; LEONARD, Warren J. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 10, p. 648–659, 2018.

SUN, Peter D.; FOSTER, Christine E.; BOYINGTON, Jeffrey C. Overview of Protein Structural and Functional Folds. *In: Current Protocols in Protein Science. [S.l.: S.n.].* v. 35 p. 17.1.1-17.1.189.

WANG, Yuke *et al.* Targeting CD8⁺ T cells with natural products for tumor therapy: Revealing insights into the mechanisms. **Phytomedicine**, v. 129, p. 155608, 2024.

WETERINGS, Devon A.; ROWAN, Aileen G.; COOK, Lucy B. Immunological aspects of HTLV-1 persistence; for the prevention and treatment of Adult T-cell leukaemia-lymphoma (ATL). **Leukemia Research**, v. 148, p. 107635, 2025.

WYCHOWANIEC, Jacek K. *et al.* Effect of Tyrosine-Containing Self-Assembling β -Sheet Peptides on Macrophage Polarization and Inflammatory Response. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 17, n. 19, p. 27740–27758, 2025.

8. CAPÍTULO 4

Modulação metabólica induzida por estresse como estratégia para
potencialização das atividades biológicas de extratos proteicos de
Ganoderma sichuanense

O presente capítulo corresponde à estrutura prévia de um artigo, que se pretende submeter na revista *Systems Microbiology and Biomanufacturing* (ISSN 2662-7655), editada pela Springer, com fator de impacto de 3.5.

Modulação metabólica induzida por estresse como estratégia para potencialização das atividades biológicas de extratos proteicos de *Ganoderma sichuanense*

Vítor Alves Pessoa^{1,2}, Giovanna Lima-Silva^{1,2}, Aldenora dos Santos Vasconcelos^{1,3,4}, Juniel Assis Crespo Neto^{5,6}, Regiane Costa de Oliveira^{5,7}, Cláudio Lucas Santos Catão^{5,7}, Ceci Sales-Campos^{1,2,3}, Allyson Guimarães da Costa^{5,6,7}, Larissa Ramos Chevreuil²

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Amazonas, Brasil;

²Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis (LCFC), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Amazonas, Brasil;

³Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte (PPGBIONORTE), Universidade do Estado do Amazonas, Amazonas, Brasil;

⁴Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos, Universidade do Estado do Amazonas, Amazonas, Brasil;

⁵Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Amazonas, Brasil;

⁶Programa de Pós-graduação em Hematologia e Hemoterapia (PPGH), Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Amazonas, Brasil;

⁷Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Amazonas, Brasil.

Resumo

Ganoderma sichuanense é um cogumelo medicinal amplamente empregado como modelo para estudos da biossíntese de produtos naturais bioativos. Entre as biomoléculas de interesse, destacam-se as proteínas associadas aos mecanismos de defesa fúngica, cuja expressão pode ser estimulada por condições de estresse. Nesse contexto, o cultivo submerso sob estresse controlado representa uma estratégia promissora para potencializar a obtenção de extratos com maior atividade biológica. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da indução de estresse em cultivo submerso como estratégia para modular as características estruturais, bioquímicas e farmacológicas de extratos proteicos de *G. sichuanense*. A modulação metabólica foi induzida por estresse salino (NaCl), senescência (18 dias de cultivo) e estresse térmico (40 °C). Os extratos proteicos foram obtidos da biomassa micelial por extração salina e, caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada (FTIR-ATR). Adicionalmente, foram determinados os teores de proteínas, açúcares redutores e compostos fenólicos. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de ABTS^{•+}, DPPH[•], habilidade quelante e poder redutor. A atividade dos extratos em modelos celulares foi investigada em PBMCs saudáveis e na linhagem celular MT-2, cronicamente infectada por HTLV-1, por meio do ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT). As condições de estresse não promoveram alterações significativas na produção de biomassa, com média de 4,8 g·L⁻¹. Entretanto, modificações nas características bioquímicas e estruturais dos extratos foram observadas, incluindo variações no conteúdo de proteínas, açúcares redutores, compostos fenólicos, morfologia das partículas e composição das estruturas secundárias das proteínas. Todos os extratos apresentaram elevada atividade antioxidante, com destaque para o estresse senescente, associado ao maior conteúdo de compostos fenólicos. Adicionalmente, os extratos estimularam a atividade metabólica de PBMCs saudáveis e promoveram redução da viabilidade e da densidade celular da linhagem MT-2, destacando-se o extrato obtido sob estresse térmico, que apresentou o menor valor de CI₅₀ (27,77 µg·mL⁻¹). A dosagem de citocinas demonstrou que as condições de estresse alteraram o perfil imunomodulador dos extratos, sendo o estresse térmico associado a uma resposta predominantemente imunoestimuladora, enquanto os extratos produzidos sob estresse salino e senescente apresentaram maior capacidade de modular mediadores inflamatórios. Diante disso, o estresse térmico apresenta-se como uma estratégia promissora para a modulação metabólica

de *G. sichuanense* e a obtenção de biomoléculas de interesse farmacológico. Esses resultados fornecem suporte para futuros estudos voltados à identificação das proteínas bioativas, à elucidação dos mecanismos celulares envolvidos e à exploração de outras aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Antioxidante; Cogumelo medicinal; HTLV-1; Imunomodulação; Plasticidade metabólica; Proteínas bioativas.

Abstract

Ganoderma sichuanense is a medicinal mushroom widely used as a model organism for studies on the biosynthesis of bioactive natural products. Among its biomolecules of interest, proteins associated with fungal defense mechanisms stand out, as their expression can be stimulated under stress conditions. In this context, submerged cultivation under controlled stress represents a promising strategy to enhance the production of extracts with improved biological activity. This study aimed to evaluate the potential of stress induction during submerged cultivation as a strategy to modulate the structural, biochemical, and pharmacological characteristics of protein extracts from *G. sichuanense*. Metabolic modulation was induced through salt stress (NaCl), senescence (18 days of cultivation), and thermal stress (40 °C). Protein extracts were obtained from the mycelial biomass by saline extraction and characterized by scanning electron microscopy (SEM) and attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR-ATR). In addition, protein, reducing sugar, and phenolic compound contents were determined. Antioxidant activity was evaluated using the ABTS^{•+}, DPPH[•], metal-chelating, and reducing power assays. The biological activity of the extracts was investigated in healthy peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and in the HTLV-1 chronically infected MT-2 cell line using the methyl tetrazolium (MTT) reduction assay. Stress conditions did not significantly affect biomass production, resulting in an average yield of 4.8 g·L⁻¹. However, changes in the biochemical and structural characteristics of the extracts were observed, including variations in protein, reducing sugar, and phenolic compound contents, as well as particle morphology and protein secondary structure composition. All extracts exhibited high antioxidant activity, particularly those obtained under senescence stress, which were associated with the highest phenolic compound content. Furthermore, the extracts stimulated the metabolic activity of healthy PBMCs and reduced both cell viability and cell density in the MT-2 cell line. The thermal stress extract showed the strongest effect, exhibiting the lowest IC₅₀ value (27.77 µg·mL⁻¹). Cytokine quantification demonstrated that stress conditions altered the immunomodulatory profile of the extracts; heat stress was associated with a predominantly immunostimulatory response, whereas extracts produced under salinity stress and senescence exhibited a greater capacity to modulate inflammatory mediators. These findings indicate that thermal stress is a promising strategy for the metabolic modulation of *G. sichuanense* and the production of biomolecules with pharmacological potential. Moreover, the results provide support for future studies aimed at identifying its bioactive proteins, elucidating the cellular mechanisms involved, and exploring additional biotechnological applications.

Keywords: Antioxidant; Bioactive proteins; HTLV-1; Immunomodulation; Medicinal mushroom; Metabolic plasticity.

8.1. Introdução

Ganoderma sichuanense é um cogumelo medicinal amplamente utilizado como organismo-modelo em estudos sobre a biossíntese de produtos naturais. Diversas pesquisas têm empregado estratégias de engenharia metabólica para otimizar a produção de moléculas bioativas, visando aumentar tanto o rendimento quanto a eficiência da obtenção de seus produtos derivados (Du et al., 2025). Nesse contexto, a fermentação submersa destaca-se como uma plataforma biotecnológica promissora, pois possibilita o controle preciso das condições de cultivo, incluindo a composição do meio, temperatura, aeração e a aplicação de diferentes fatores de estresse. Essa flexibilidade permite modular

o metabolismo fúngico e direcionar a biossíntese de metabólitos de interesse biotecnológico e farmacêutico (Romero et al., 2025).

Em condições de estresse, o metabolismo proteico fúngico sofre intensa remodelação, caracterizada pela regulação positiva de proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, incluindo enzimas antioxidantes, como catalases, peroxidases e superóxido dismutases, além de proteínas relacionadas à reciclagem e manutenção proteica, como proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSPs) e proteases (Kroll; Pähitz; Kniemeyer, 2014; Li; Harvey; McNeil, 2009). Em *G. sichuanense*, esse mecanismo adaptativo já foi descrito como uma resposta capaz de modular a expressão de proteínas biologicamente ativas frente a condições adversas de cultivo, favorecendo a produção de moléculas com potencial farmacológico e ampliando o interesse biotecnológico da espécie (Cai et al., 2023).

A estratégia de cultivo sob condições de estresse torna-se particularmente relevante, considerando que diversas proteínas bioativas intracelulares de *Ganoderma* estão funcionalmente associadas aos mecanismos de defesa e adaptação fúngica. Nesse sentido, além de HSPs e das enzimas antioxidantes, outras classes proteicas, como lectinas, inibidores de proteases e proteínas imunomoduladoras fúngicas (*Fungal Immunomodulatory Proteins*, FIPs) participam da resposta adaptativa dos fungos e podem ter sua expressão aumentada após diferentes estímulos ambientais e fisiológicos (Li et al., 2018; Sabotič; Ohm; Künzler, 2016).

Essas proteínas, além de desempenharem papel central na adaptação celular às condições de estresse, apresentam elevado potencial biotecnológico devido às suas propriedades antioxidantes, imunomoduladoras, antitumorais e antivirais (Burchacka; Pięta; Łupicka-Słowik, 2022; Liu; Bastiaan-Net; Wichers, 2020; Pockley; Henderson, 2017). Conforme demonstrado no Capítulo 3, extratos proteicos de *G. sichuanense* (CC22) apresentam atividades imunomoduladora e citotóxica frente células infectadas com o vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1), além de serem fonte de proteases, inibidores de proteases e proteínas antioxidantes (Chevreuil et al., 2025; Pessoa et al., 2023, 2026).

Nessa perspectiva, a indução de respostas adaptativas por condições controladas de estresse apresenta-se como uma estratégia promissora para direcionar o metabolismo fúngico à produção de proteínas bioativas e, conseqüentemente, potencializar as propriedades farmacológicas dos extratos obtidos. Assim, o presente estudo propôs diferentes condições de estresse e avaliou seus efeitos sobre o crescimento micelial, a

recuperação de proteínas, as características estruturais e bioquímicas e as atividades antioxidante, citotóxica frente à linhagem MT-2 infectada pelo HTLV-1 e imunomoduladora de extratos proteicos de *G. sichuanense* CC22.

8.2. Materiais e Métodos

8.2.1. Aspectos éticos

O presente estudo faz parte de um projeto maior, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), sob o CAAE nº 96247226.0.0000.0009 e parecer nº 8.320.006 (Anexos, Documentos suplementares 1). A coleta do sangue periférico foi realizada somente após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), em conformidade com a Resolução CNS nº 466/2012

8.2.2. Cultivo fúngico

8.2.2.1. Linhagem fúngica

Ganoderma sichuanense (CC22) foi acessado da coleção de trabalho do Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis, pertencente à Coordenação de Tecnologia e Inovação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (COTEI/INPA). A linhagem foi mantida em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-água (BDA) refrigeradas à 4 °C até a utilização. A reativação para cultivo foi realizada em meio BDA com incubação à 25 °C.

8.2.2.2. Fermentação submersa e parâmetros de crescimento

Na fermentação submersa, sete discos miceliais ($\varnothing = 7$ mm) provenientes de culturas previamente crescidas em meio batata-dextrose-água (BDA), foram inoculados em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 125 mL de meio de cultivo composto por glicose ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), extrato de levedura ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e peptona de soja ($2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Os cultivos foram mantidos sob condições estáticas ($n = 25$) e submetidos a diferentes condições de estresse abiótico, visando modular a síntese proteica, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições de estresse adotadas para a fermentação submersa.

Estresse aplicado	Meio de cultivo	Condições de incubação	Referência
Salino	Meio padrão + NaCl (0,35 mM)	12 dias a 25 °C	Adaptado de Mahmoud, Mohamed e Elzaher (2007)
Senescente	Meio padrão	18 dias a 25 °C	Adaptado de Pessoa et al. (2026)
Térmico	Meio padrão	25 °C por 10 dias	Adaptado de

Após os períodos de fermentação, a biomassa micelial foi separada do caldo fermentado por filtração a vácuo e lavada com água destilada. De cada condição, frascos foram selecionados aleatoriamente e utilizados como replicatas biológicas independentes ($n = 3$) para a determinação da produção de biomassa ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Para isso, a biomassa foi seca em estufa a 60 °C até peso constante e quantificada gravimetricamente. O material proveniente dos demais frascos, após filtração, foi reunido, liofilizado, triturado e acondicionado sob refrigeração a 4 °C até sua utilização.

8.2.3. Obtenção dos extratos proteicos

As biomassas miceliais liofilizadas e pulverizadas foram submetidas à extração proteica utilizando solução de NaCl 0,15 M na proporção de 1:20 (m/v), sob agitação constante (120 rpm) por 2 h a 10 °C, seguida de centrifugação (20 min, $10.000 \times g$, 4 °C). O sobrenadante obtido foi submetido à diálise contra água destilada utilizando membranas de celulose com *cut-off* de 12 kDa, durante 48 h sob refrigeração (4 °C). Posteriormente, o material foi centrifugado novamente (20 min, $4.667 \times g$, 4 °C) e liofilizado, resultando em extratos enriquecidos em proteínas de média à alta massa molecular.

8.2.4. Caracterização bioquímica

O teor de proteínas solúveis foi estimado pelas metodologias descrita por Bradford (1976) e Lowry et al. (1951), adaptadas para microplacas de 96 poços, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão analítico. O teor de compostos fenólicos totais (CFT) foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, sendo os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de amostra (Singleton; Rossi, 1965). Os açúcares redutores foram quantificados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), utilizando uma curva padrão de glicose para estimativa dos valores (Miller, 1959).

8.2.5. Caracterização estrutural dos extratos proteicos

A estrutura dos extratos proteicos foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram dispostas sobre uma fita de carbono e metalizadas com platina até uma espessura aproximada de 10 nm utilizando o equipamento Leica EM ACE600. As micrografias foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de

varredura JEOL JSM IT500HR, operado a uma voltagem de aceleração de 5 kV, em modo de elétrons secundários.

A composição química dos extratos proteicos foi avaliada por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR). Aproximadamente 5 mg de cada amostra foram analisados em um espectrômetro Cary 630 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), na faixa espectral de 750 a 4000 cm^{-1} .

A avaliação da estrutura secundária das proteínas foi realizada a partir da região correspondente à banda de amida I (1700–1600 cm^{-1}). Inicialmente, os espectros foram submetidos à correção de linha de base, suavização utilizando o filtro de Savitzky–Golay e normalização dos sinais. Posteriormente, a deconvolução da banda de amida I foi conduzida por ajuste Gaussiano múltiplo não linear empregando o pacote *minpack.lm* no software RStudio versão 4.4.2. Os percentuais relativos das estruturas secundárias foram estimados por meio da integração das áreas das bandas ajustadas.

8.2.6. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos proteicos foi avaliada por meio de ensaios de sequestro dos radicais ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) e DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), capacidade quelante de íons ferrosos e poder redutor do íon férrico, utilizando metodologias adaptadas para microplacas de 96 poços (Oliveira-Junior et al., 2024). Para os ensaios, os extratos proteicos foram inicialmente ressuspensos em água destilada na concentração de 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Nos ensaios de ABTS^{•+}, DPPH[•] e habilidade quelante, os resultados foram expressos em percentual de inibição/quelação. Para o ensaio de poder redutor, o aumento da absorbância foi considerado indicativo de maior potencial antioxidante das amostras.

8.2.7. Análises em modelos celulares

8.2.7.1. Linhagem celular infectada com HTLV-1

A linhagem celular comercial MT-2, derivada de células T CD4⁺ humanas cronicamente infectadas por HTLV-1, foi utilizada como modelo celular infectado. O cultivo celular foi realizado em meio RPMI 1640 com vermelho de fenol, modificado com L-glutamina, Hepes e bicarbonato de sódio (Gibco™, Rockville, MD), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB, Gibco™) e 1% de antibiótico +

antimicótico (Gibco™). O meio de cultura foi renovado, em média, a cada 48h para manutenção da viabilidade e das condições adequadas de cultivo celular.

8.2.7.2. Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico

O isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de um doador saudável da Fundação HEMOAM foi realizado por gradiente de densidade utilizando Histopaque® (Sigma-Aldrich), sendo utilizadas como células HTLV-1 negativas para comparação com a linhagem infectada. Após a coleta, o sangue periférico foi diluído em tampão fosfato-salino (PBS) na proporção de 1:1 (v/v) e cuidadosamente adicionado em tubos Falcon contendo Histopaque® na proporção de 1:3 (Histopaque: sangue diluído), seguido de centrifugação a $400 \times g$ por 30 min. A interface correspondente às PBMCs foi coletada e lavada três vezes com meio RPMI suplementado, seguido de centrifugação a $400 \times g$ por 10 min a 4 °C. Posteriormente, o *pellet* de células foi ressuspensionado em meio RPMI suplementado, de acordo com a concentração celular necessária para a realização dos testes.

8.2.7.3. Análise de viabilidade celular

A citotoxicidade dos extratos proteicos foi avaliada a partir do ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), baseado na capacidade metabólica celular de converter o sal tetrazólico em cristais de formazan. Para os ensaios, PBMCs e células da linhagem MT-2 foram semeadas em placas de 96 poços, na densidade de 1×10^5 células/poço em meio RPMI suplementado, e tratadas com diferentes concentrações dos extratos proteicos (3,125–200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). As células foram incubadas a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Para as PBMCs, o período de exposição foi de 24 h, enquanto para a linhagem MT-2 foram avaliados os períodos de 24, 48 e 72 h.

Após os períodos de incubação, o meio de cultura foi removido e substituído por 100 μL de meio RPMI sem vermelho de fenol, contendo 10 μL de solução de MTT (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em PBS), seguido de incubação por 4 h. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram solubilizados em 100 μL de DMSO 100%. O meio RPMI foi utilizado como controle negativo, enquanto DMSO (25%, v/v) foi empregado como controle positivo. Os resultados foram expressos em percentual de atividade metabólica celular em relação ao controle negativo.

8.2.7.4. Avaliação morfológica e análise da densidade celular da linhagem

MT-2

Para a avaliação morfológica, células da linhagem MT-2 foram distribuídas em placas de 96 poços de fundo plano, na densidade de 5×10^5 células/poço, e incubadas por 48 h até atingirem aproximadamente 80% de confluência. Posteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos proteicos (3,125–200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e incubadas por 24 h a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. As alterações morfológicas e o padrão de agregação celular foram avaliados por microscopia de luz invertida utilizando um microscópio Zeiss PrimoVert com objetiva de 4× (aumento total de 40×).

As imagens obtidas foram processadas no software ImageJ/Fiji (*National Institutes of Health*, Bethesda, MD, EUA) para determinação da densidade celular. Após conversão para escala de cinza, correção de fundo e segmentação por limiarização, a área ocupada pelas células foi quantificada e expressa como percentual de área ocupada (%Area). Posteriormente, os valores obtidos foram normalizados em relação ao grupo controle e utilizados para comparação entre os tratamentos.

8.2.7.5. Atividade Imunomoduladora

Para a avaliação da modulação da produção de citocinas, PBMCs foram semeadas em placas de 96 poços, na densidade de 1×10^5 células/poço, e previamente estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) por 24 h, visando induzir uma resposta pró-inflamatória. As células foram mantidas a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após esse período, as células foram tratadas com os extratos proteicos nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, permanecendo incubadas por mais 24 h.

Ao término da incubação, os sobrenadantes celulares foram coletados para quantificação das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, TNF- α e IFN- γ , utilizando os kits BD *Cytometric Bead Array* (CBA) *Human Th1/Th2/Th17 Cytokine* e *Human Inflammatory Cytokines*. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Biosciences), com processamento dos dados no software FCAP *Array*, conforme recomendações do fabricante. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e os resultados foram expressos em pg·mL⁻¹.

8.2.8. Análise dos dados

Os dados de quantificação de biomoléculas foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA), seguido de teste de Tukey, enquanto os ensaios celulares foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Dunnett. Em ambos os

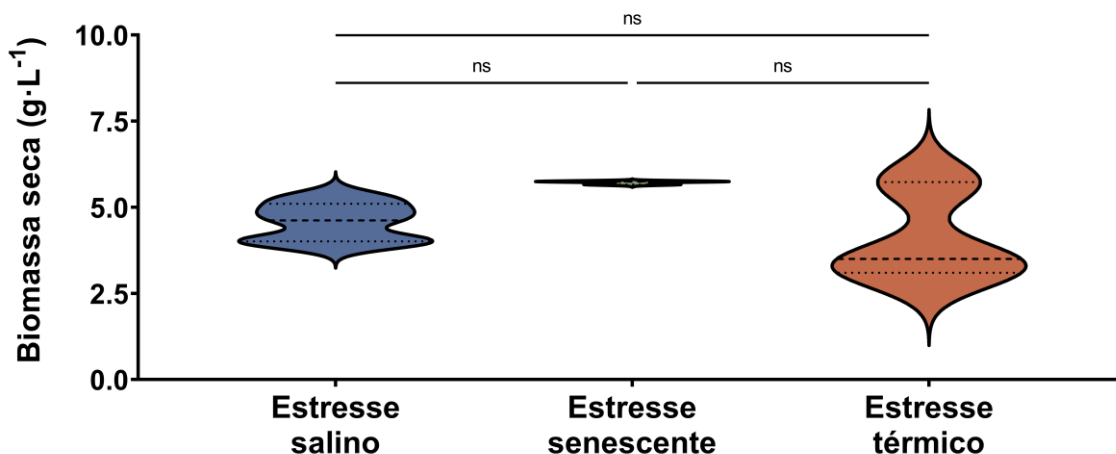
casos, foram consideradas significativas as diferenças com valores de $p \leq 0,05$. Os valores de CI_{50} foram estimados por regressão não linear utilizando o modelo $\log(\text{inibidor})$ versus resposta normalizada com inclinação variável. Todas as análises estatísticas e regressões foram realizadas no software GraphPad Prism versão 9.4.

8.3. Resultados

8.3.1. Efeitos das condições de estresse sobre o crescimento fúngico

As diferentes condições de estresse não promoveram diferenças estatisticamente significativas na produção de biomassa micelial, resultando em uma produção média de $4,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. O estresse térmico apresentou a maior heterogeneidade na produção de biomassa, seguido pelo estresse salino, enquanto o estresse senescente resultou em crescimento mais uniforme, evidenciado pela menor dispersão dos dados (Figura 1).

Figura 1 – Produção de biomassa de *G. sichuanense* em diferentes condições de estresse.



Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$ experimentos independentes). ns = diferenças estatísticas não significativas segundo o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p \leq 0,05$).

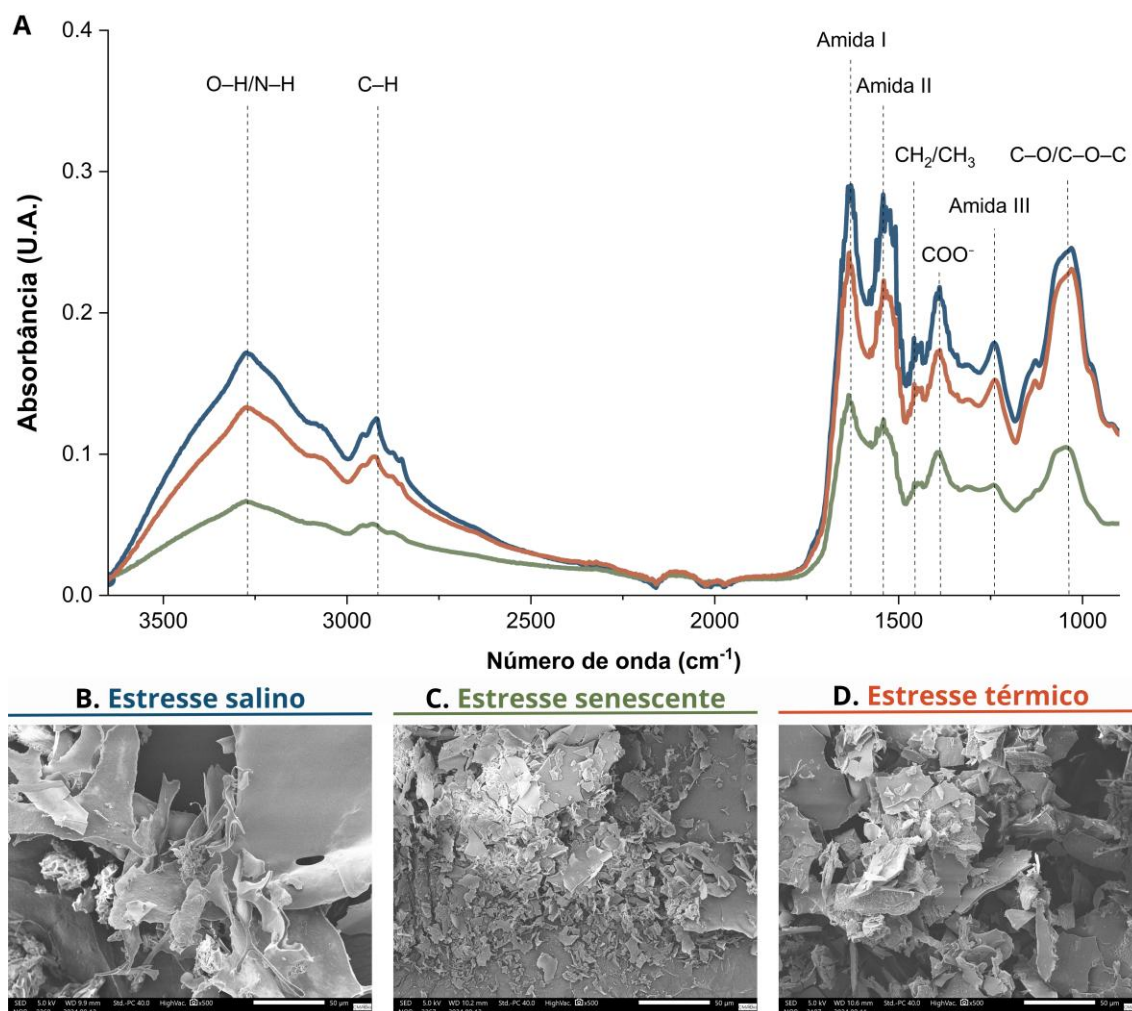
8.3.2. Caracterização estrutural dos extratos

A análise por FTIR-ATR revelou bandas de absorção em aproximadamente 3280, 2920, 1630, 1540, 1400, 1240 e 1050 cm^{-1} , compatíveis com grupos funcionais característicos de moléculas de natureza proteica (Figura 2A). Entre os tratamentos avaliados, o extrato obtido sob estresse salino apresentou maior intensidade de absorbância ao longo de praticamente todo o espectro, seguido pelo estresse térmico e senescente. Essas diferenças podem refletir variações na composição química dos extratos, mas também podem estar relacionadas a características físicas das amostras, como o tamanho e o grau de agregação das partículas.

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura corroboram essas observações, evidenciando diferenças morfológicas entre os extratos (Figura 2B–D). O

extrato proveniente do estresse salino apresentou partículas mais agregadas, organizadas em estruturas lamelares compactas (Figura 2B). De modo semelhante, o estresse térmico também resultou em partículas aglomeradas, embora com aspecto menos compacto (Figura 2D). Em contraste, o extrato proveniente do estresse senescente apresentou maior fragmentação, com predominância de partículas menores e menos agregadas (Figura 2C).

Figura 2 – Espectros de FTIR-ATR dos extratos proteicos de *Ganoderma sichuanense* obtidos sob condições de estresse salino, senescente e térmico (A), e micrografias eletrônicas de varredura dos extratos provenientes do estresse salino (B), senescente (C) e térmico (D).



A análise da região Amida I dos espectros de FTIR-ATR revelou diferenças na composição das estruturas secundárias das proteínas em resposta às diferentes condições de estresse (Tabela 2). As proporções de folhas β e espirais aleatórias mantiveram-se relativamente conservadas entre os tratamentos avaliados. Em contrapartida, alterações mais pronunciadas foram observadas para as frações de α -hélice e voltas β . Uma redução progressiva do conteúdo de α -hélices, acompanhada pelo aumento da proporção de voltas β , foi verificada nos extratos obtidos do cultivo sob estresse salino, senescente e térmico, respectivamente.

Tabela 2 – Composição percentual das estruturas secundárias das proteínas presentes nos extratos de *G. sichuanense*, estimada por deconvolução da região Amida I dos espectros obtidos por FTIR-ATR.

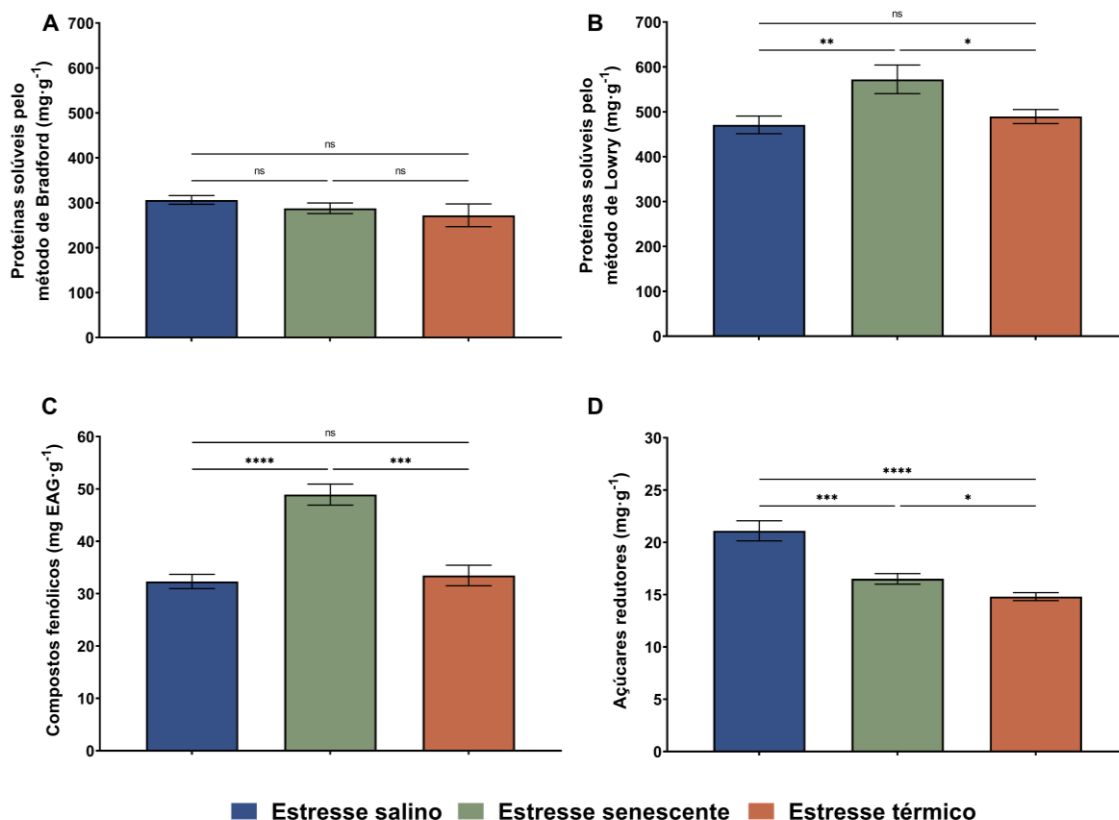
Condição	Estruturas secundárias (%)				Estruturas aleatórias	R ²
	α -hélice	Folhas β	Voltas β	β -antiparalelo		
Estresse salino	17,65	46,04	21,51	7,90	6,88	0,938
Estresse senescente	12,67	44,59	25,42	11,05	6,25	0,953
Estresse térmico	4,52	45,76	31,45	10,84	7,41	0,949

8.3.3. Caracterização bioquímica dos extratos

A quantificação de proteínas pelo método de Bradford não demonstrou alterações estatísticas significativas entre os extratos obtidos sob as diferentes condições de estresse, com valores médios em torno de 300 mg de proteínas por g de extrato (Figura 3A). Em contraste, pelo método de Lowry, o extrato proveniente do estresse senescente apresentou maiores valores ($572,28 \pm 31,82 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), em relação ao estresse térmico ($489,35 \pm 15,64 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) e salino ($470,80 \pm 19,67 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) (Figura 3B).

O teor de compostos fenólicos totais foi significativamente superior no extrato proteico obtido do estresse senescente ($48,92 \pm 2,00 \text{ mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$), quando comparado aos extratos provenientes dos estresses térmico ($33,46 \pm 1,96 \text{ mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$) e salino ($32,33 \pm 1,36 \text{ mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$) (Figura 3C). O conteúdo de açúcares, por sua vez, foi maior no extrato proveniente do estresse salino ($21,11 \pm 0,96 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), seguido por estresse senescente ($16,51 \pm 0,50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) e térmico ($14,81 \pm 0,38 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) (Figura 3D).

Figura 3 – Quantificação de proteínas solúveis pelos métodos de Bradford (A) e Lowry (B), compostos fenólicos (C) e açúcares redutores (D) nos extratos proteicos de *G. sichuanense* cultivado em diferentes condições de estresse.

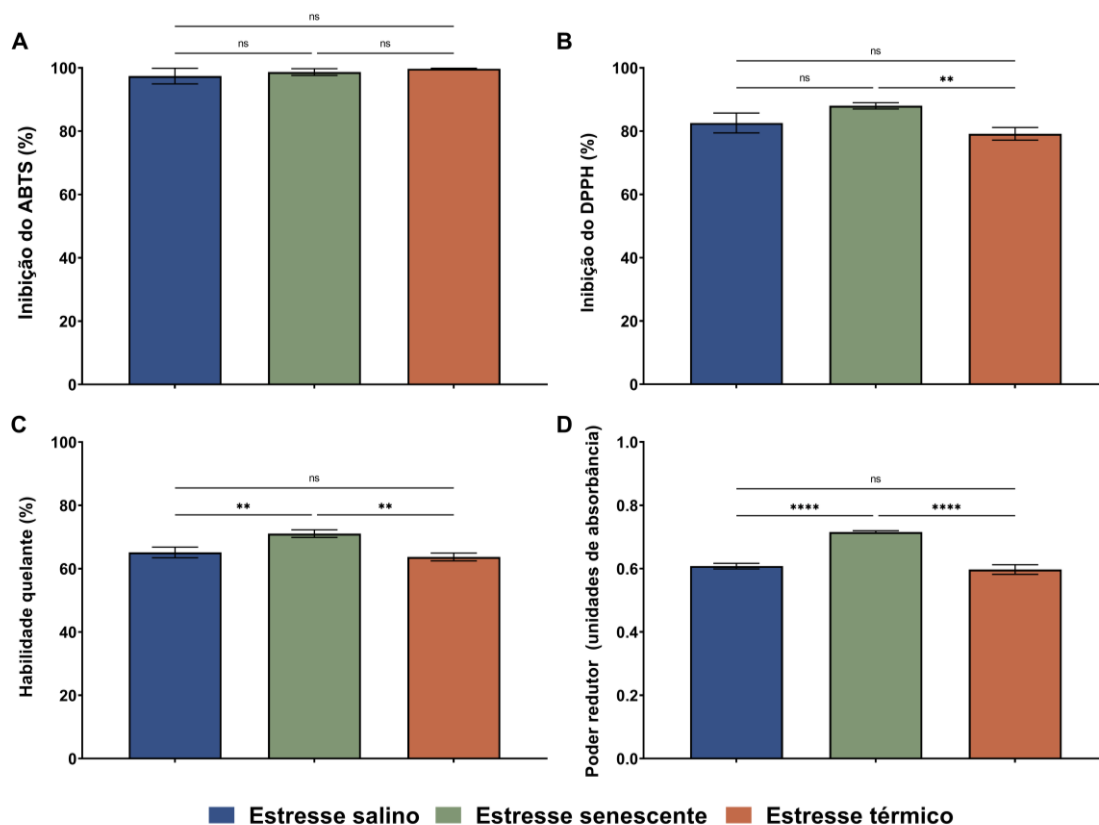


Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$ repetições independentes). Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações, de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (ns = diferenças estatísticas não significativas; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

8.3.4. Atividade Antioxidante

No ensaio de sequestro do radical ABTS^{•+}, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, sendo todos os extratos capazes de promover aproximadamente 98% de inibição do radical (Figura 4A). Na inibição do DPPH[•], por sua vez, os extratos proteicos provenientes do estresse senescente ($88,01 \pm 0,99$ %) e salino ($82,59 \pm 3,14$ %) apresentaram maior capacidade de sequestro de radicais livres em comparação ao extrato obtido sob estresse térmico ($79,16 \pm 2,00$ %) (Figura 4B). Já com relação à capacidade de interação das amostras com íons de ferro, destacou-se o extrato proteico obtido do estresse senescente, tanto para habilidade quelante ($71,08 \pm 1,21$ %) quanto para poder redutor ($0,716 \pm 0,004$ U.A.) (Figura 4C–D).

Figura 4 – Atividade antioxidante avaliada pelos métodos de ABTS^{•+} (A), DPPH[•] (B), habilidade quelante (C) e poder redutor (D) nos extratos proteicos de *G. sichuanense* cultivado em diferentes condições de estresse.

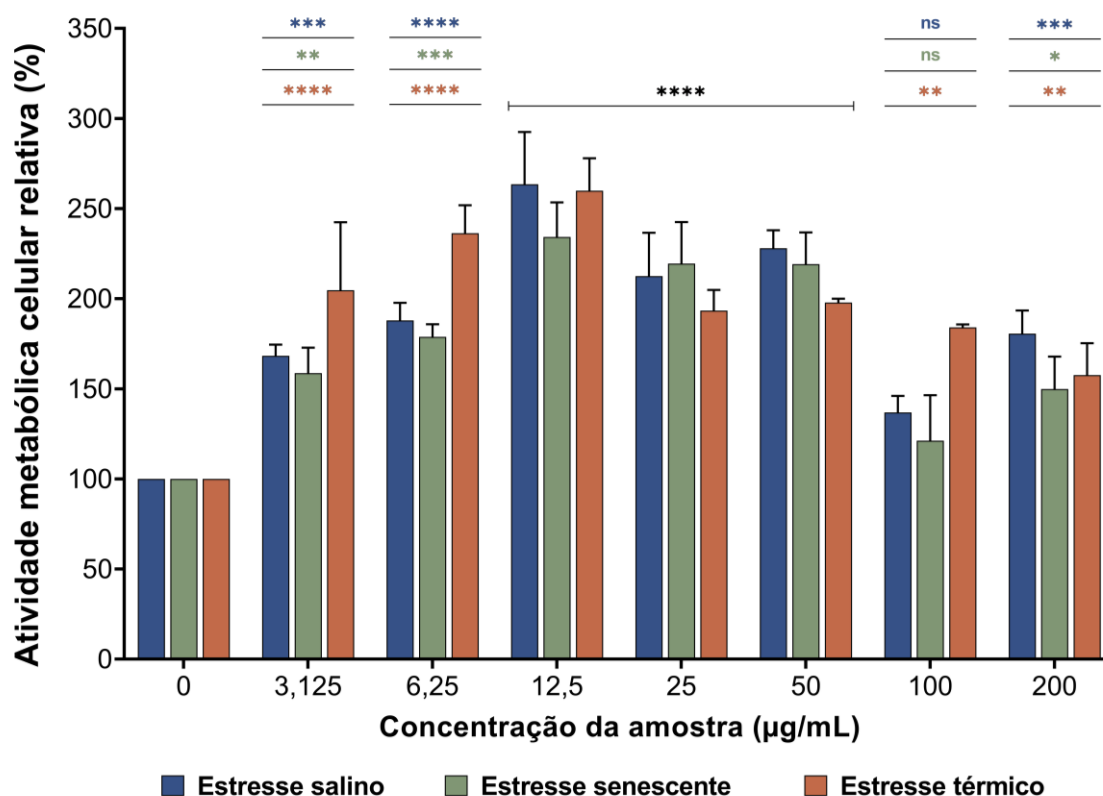


Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 3 repetições independentes). Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações, de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (ns = diferenças estatísticas não significativas; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001).

8.3.5. Efeito dos extratos proteicos em PBMCs

Frente às PBMCs saudáveis, os extratos proteicos não promoveram redução da atividade metabólica celular em nenhuma das concentrações avaliadas, indicando ausência de efeito citotóxico. Pelo contrário, o tratamento das células com os extratos resultou em aumento do metabolismo celular em relação ao controle, com destaque para o extrato proteico obtido do cultivo em estresse térmico (Figura 5).

Figura 5 – Atividade metabólica relativa de PBMCs tratadas com diferentes concentrações dos extratos proteicos de *G. sichuanense* cultivado sob diferentes condições de estresse.

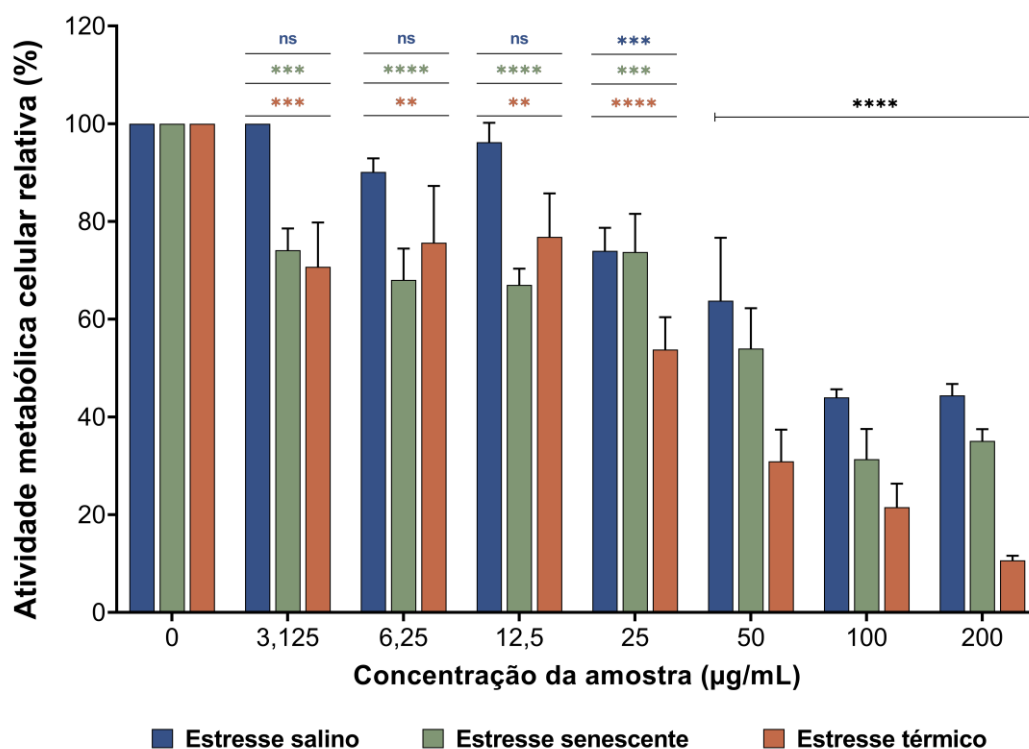


Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$ repetições independentes). Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett; ns = diferenças estatísticas não significativas; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

8.3.6. Efeito dos extratos proteicos sobre a linhagem MT-2

Frente à linhagem MT-2, os extratos proteicos promoveram redução da atividade metabólica celular de maneira dose-dependente (Figura 6). Entre as condições avaliadas, destacou-se o extrato obtido de cultivos submetidos ao estresse térmico, que apresentou a maior redução da atividade metabólica celular a partir da concentração de $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 6).

Figura 6 – Atividade metabólica relativa de células da linhagem MT-2 tratadas com diferentes concentrações dos extratos proteicos de *G. sichuanense* cultivado sob diferentes condições de estresse.



Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$ repetições independentes). Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett; ns = diferenças estatísticas não significativas; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Para avaliar de forma mais precisa o potencial individual das amostras, foi estimada a concentração inibitória de 50% (CI₅₀) por meio da modelagem das curvas dose-resposta obtidas nos ensaios de atividade metabólica. Os resultados demonstraram que o extrato proteico de *G. sichuanense* obtido sob condição de estresse térmico apresentou maior potencial citotóxico, necessitando de menores concentrações para para reduzir em 50% a atividade metabólica das células MT-2 (Tabela 3).

Tabela 3 – Estimativa da concentração inibitória de 50% (CI₅₀) dos extratos proteicos de *G. sichuanense* sobre a atividade metabólica da linhagem MT-2.

Condição	CI ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	Intervalo de confiança (95%)	logCI ₅₀	CI ₅₀ normalizada (µg de proteína·mL ⁻¹)*	R ²
Estresse salino	106,70	83,18 – 145,1	2,028	50,24	0,8897
Estresse senescente	54,73	38,31 – 82,52	1,738	31,32	0,8270
Estresse térmico	27,77	23,16 – 33,22	1,444	13,59	0,9494

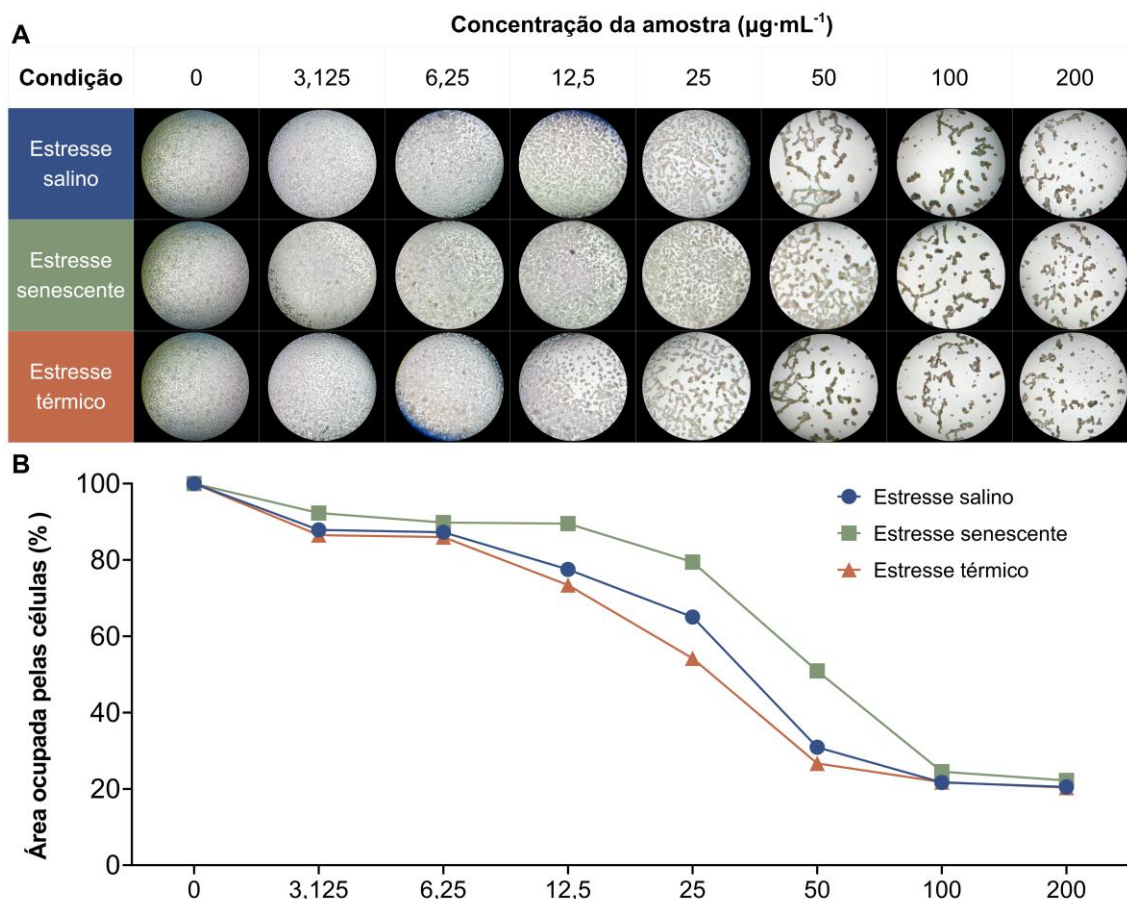
*Calculada com base no teor proteico determinado pelo método de Lowry.

8.3.7. Efeito dos extratos proteicos sobre a densidade celular da linhagem MT-2

A análise morfológica da linhagem MT-2 revelou alterações na área ocupada pelas células após o tratamento com os extratos proteicos, apresentando um comportamento dependente da concentração e consistente com o perfil observado no ensaio de atividade metabólica (MTT). Nas menores concentrações, os agregados celulares característicos da linhagem permaneceram preservados, sem alterações morfológicas evidentes. Entretanto, o aumento da concentração dos extratos promoveu redução progressiva da área ocupada pelas células, acompanhada pela diminuição da densidade dos agregados celulares e pelo aumento de regiões livres de células (Figura 7A).

Entre os tratamentos avaliados, o extrato obtido sob estresse térmico promoveu a redução mais pronunciada da área celular, com efeito perceptível a partir da concentração de 12,5 µg·mL⁻¹ e intensificado nas concentrações subsequentes. Em contraste, o extrato proveniente do estresse senescente apresentou maior preservação da área ocupada pelas células ao longo das concentrações avaliadas, enquanto o extrato obtido sob estresse salino exibiu comportamento intermediário (Figura 7B).

Figura 7 – Efeito dos extratos proteicos de *G. sichuanense* cultivado em diferentes condições de estresse sobre a densidade das células MT-2, demonstrado por micrografias representativas (A) e pela quantificação da área celular (%) obtida por análise digital de imagens (B).



8.3.8. Atividade Imunomoduladora

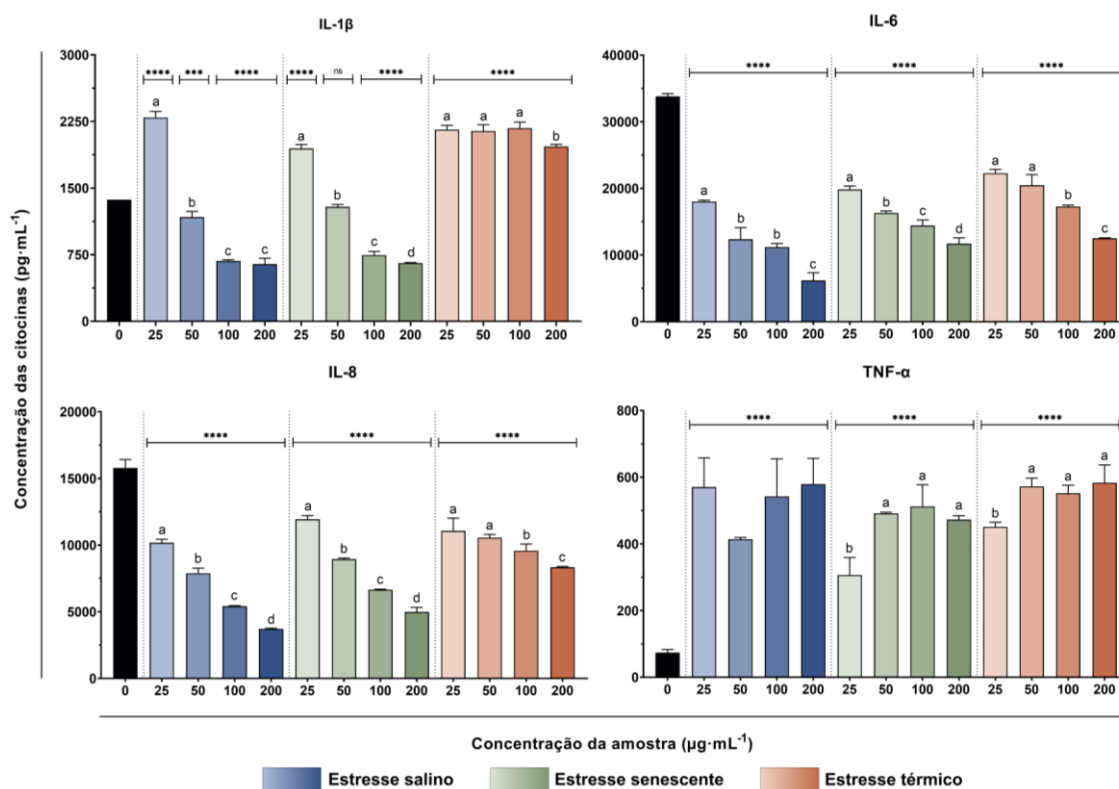
Os extratos proteicos apresentaram perfis imunomoduladores distintos, evidenciando a influência tanto das condições de estresse durante o cultivo quanto da concentração avaliada (Figuras 8–10). Dentre as citocinas associadas à resposta inflamatória (Figura 8), a produção de IL-1 β apresentou comportamentos semelhante entre os extratos do cultivo em estresse salino e senescente, os quais induziram um aumento da produção de IL-1 β na concentração de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, seguido por redução progressiva nas concentrações subsequentes. Em contraste, o extrato obtido sob estresse térmico apresentou concentrações superiores ao controle em todas as doses avaliadas, com uma resposta sustentada em torno de $2,150 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ entre as concentrações de 25 e $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Para IL-6 e IL-8, observou-se uma redução dependente da concentração para todos os extratos avaliados (Figura 8). Entretanto, esse efeito foi mais pronunciado para os extratos produzidos sob estresse salino e senescente, destacando-se o extrato obtido sob

estresse salino, que promoveu uma redução de aproximadamente quatro vezes na concentração dessas citocinas após tratamento com 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Em contraste, os extratos produzidos sob estresse térmico mantiveram níveis mais elevados de IL-6 e IL-8 ao longo das concentrações avaliadas.

A secreção de $\text{TNF-}\alpha$, por sua vez, apresentou o perfil mais distinto dentre as citocinas inflamatórias, uma vez que todos os extratos induziram concentrações superiores às observadas no controle (0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), independentemente da dose avaliada (Figura 8). Entretanto, o comportamento dose-dependente diferiu entre as condições de estresse. Para os extratos produzidos sob estresse salino, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações testadas, evidenciando uma resposta sustentada, caracterizada pela manutenção de um platô de produção de $\text{TNF-}\alpha$ ao longo de todo o intervalo de doses. Em contraste, os extratos produzidos sob estresse senescente e térmico apresentaram perfis semelhantes entre si, nos quais as concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ não diferiram estatisticamente, mantendo valores médios próximos de 560 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto a concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ apresentou níveis significativamente inferiores.

Figura 8 – Modulação da produção de citocinas associadas à resposta inflamatória em PBMCs previamente estimuladas com LPS e tratadas com extratos proteicos de *Ganoderma sichuanense* cultivado sob diferentes condições de estresse.

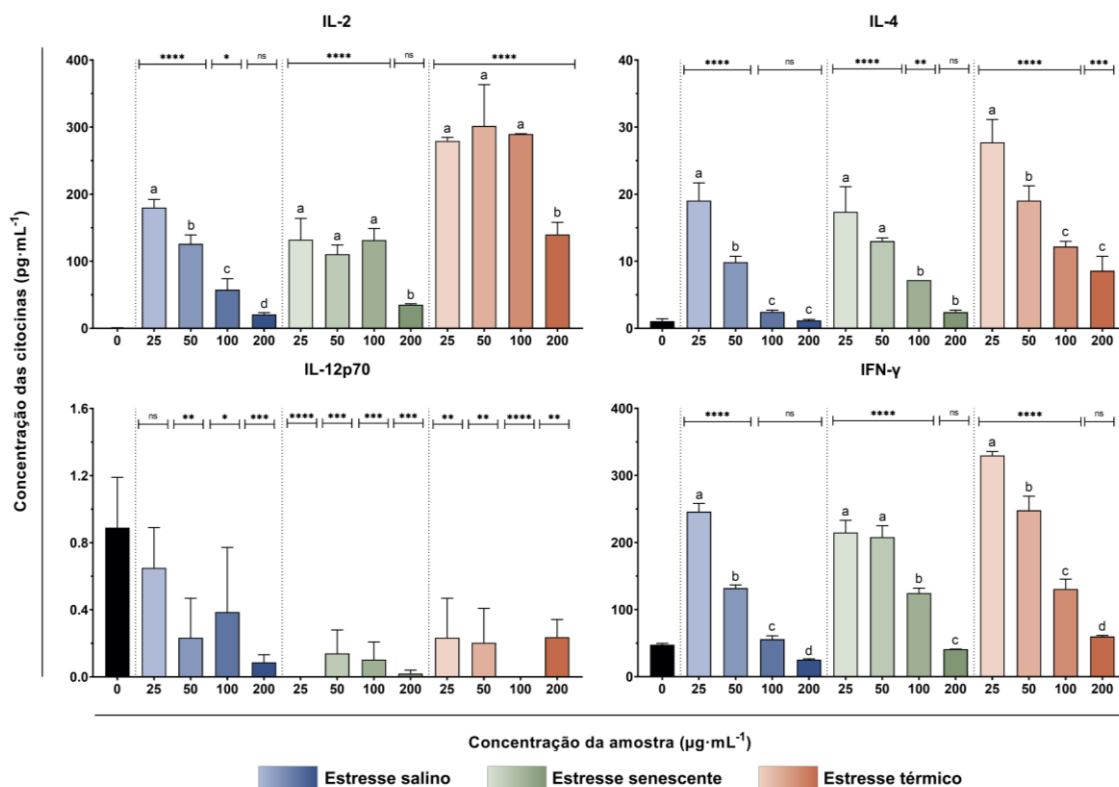


Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$ repetições independentes). Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle, determinadas por ANOVA seguida do pós-teste de Dunnett (ns: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de uma mesma condição experimental, determinadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), enquanto a ausência de letras indica que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações avaliadas.

Em relação às citocinas associadas à resposta imune adaptativa (Figura 9), a produção de IL-2 apresentou um perfil dose-dependente, caracterizado por maiores concentrações nas menores doses dos extratos, seguidas por redução progressiva conforme o aumento da concentração das amostras. Dentre os grupos avaliados, o extrato produzido sob estresse térmico promoveu os maiores níveis de IL-2, mantendo valores médios próximos de $290 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ entre 25 e $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de amostra, sendo também o único em que a concentração de $200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ diferiu significativamente do controle. Perfil semelhante foi observado para IL-4, com maiores concentrações da citocina nas menores doses e redução progressiva nas concentrações subsequentes. Novamente, o extrato obtido sob estresse térmico apresentou a resposta mais pronunciada, destacando a concentração de $25 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de amostra, que atingiu um pico de $27,73 \pm 3,41 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Os níveis de IL-12p70 permaneceram reduzidos em todas as condições experimentais, apresentando tendência de diminuição em relação ao controle, porém sem um padrão consistente de resposta dependente da concentração dos extratos. Em relação a IFN- γ , observou-se comportamento semelhante ao descrito para IL-2 e IL-4, caracterizado por maiores concentrações nas menores doses, seguidas por redução progressiva à medida que a concentração dos extratos aumenta. Entre os tratamentos avaliados, destacou-se o extrato produzido sob estresse térmico na concentração de $25 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, que promoveu o maior nível de IFN- γ ($329,79 \pm 6,03 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

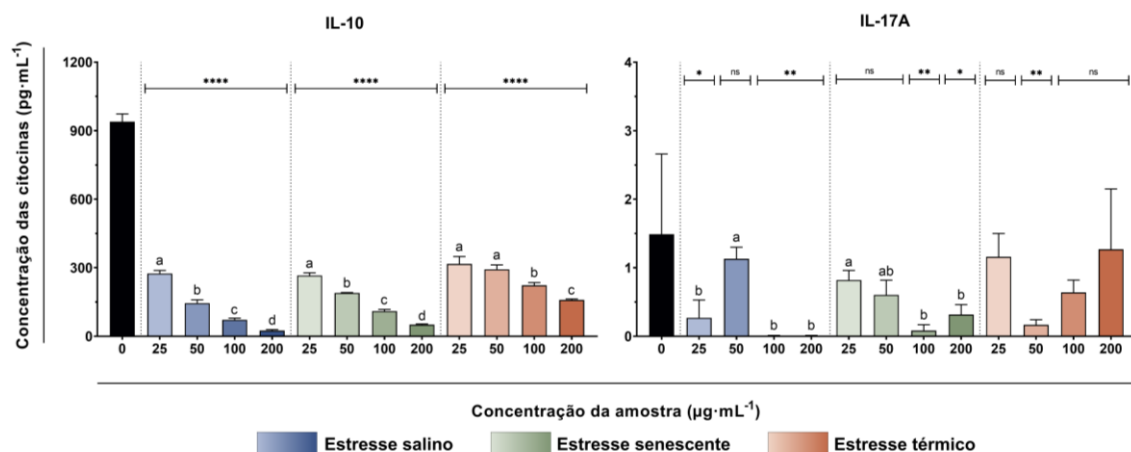
Figura 9 – Modulação da produção de citocinas associadas à resposta imune adaptativa em PBMCs previamente estimuladas com LPS e tratadas com extratos proteicos de *Ganoderma sichuanense* cultivado sob diferentes condições de estresse.



Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$ repetições independentes). Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle, determinadas por ANOVA seguida do pós-teste de Dunnett (ns: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de uma mesma condição experimental, determinadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), enquanto a ausência de letras indica que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações avaliadas.

Entre as citocinas associadas à resposta imune de barreira e mucosas (Figura 10), a produção de IL-10 foi reduzida progressivamente com o aumento da concentração dos extratos, independentemente da condição de estresse, evidenciando um claro padrão dose-dependente. Entretanto, o extrato proteico produzido sob estresse térmico apresentou comportamento distinto em relação aos demais, preservando níveis mais elevados de IL-10 mesmo na maior concentração avaliada. Em contraste, a produção de IL-17A apresentou elevada variabilidade entre as concentrações e condições experimentais, sem evidenciar um padrão consistente de resposta dependente da concentração dos extratos.

Figura 10 – Modulação da produção de citocinas associadas à resposta imune regulatória e Th17 em PBMCs previamente estimuladas com LPS e tratadas com extratos proteicos de *Ganoderma sichuanense* cultivado sob diferentes condições de estresse.



Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$ repetições independentes). Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle, determinadas por ANOVA seguida do pós-teste de Dunnett (ns: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de uma mesma condição experimental, determinadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), enquanto a ausência de letras indica que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações avaliadas.

8.4. Discussão

Condições de estresse são capazes de alterar a fisiologia e o metabolismo de cogumelos, favorecendo o acúmulo de compostos bioativos e remodelando o proteoma fúngico (Liu et al., 2018; Luo et al., 2021; Zhao et al., 2021). Nesse contexto, o estresse salino empregado no presente estudo foi baseado no trabalho de Mahmoud, Mohamed e Elzaher (2007), que observaram alterações no conteúdo de polissacarídeos e nos níveis de prolina, um importante marcador bioquímico da resposta ao estresse salino, sem prejuízos à produção de biomassa e proteínas durante o cultivo submerso de *Ganoderma resinaceum* na presença de 0,35 mM de NaCl, corroborando a elevada sensibilidade dos basidiomicetos à presença de cloreto de sódio (Pyeon et al., 2022).

O estresse senescente, por sua vez, caracteriza-se pelo prolongamento do período de cultivo, acompanhado pela redução do crescimento micelial em decorrência da limitação de nutrientes disponíveis no meio de cultivo e do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (He et al., 2019). A escolha dessa condição foi baseada na curva de crescimento previamente estabelecida para *G. sichuanense*, na qual se observou que, após 12 dias de cultivo líquido, cerca de 75% da fonte de carbono já havia sido consumida. Concomitantemente, registrou-se redução do pH do meio para 4,5, situação indicativa de limitação nutricional e de estresse fisiológico compatível com o início do processo de senescência celular (Pessoa et al., 2026).

O estresse térmico, por sua vez, é amplamente descrito por sua capacidade de promover alterações no metabolismo fúngico, resultando em mudanças morfológicas, aumento da síntese de metabólitos associados à defesa celular e ativação de vias de sinalização dependentes de Ca^{2+} . Esses mecanismos regulam a expressão de diferentes proteínas relacionadas à resposta ao estresse, incluindo as proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSPs), conforme descrito para *Ganoderma lucidum* (Zhang et al., 2016). Assim, a aplicação dessa condição experimental foi baseada no modelo de estresse térmico contínuo proposto por Yan et al. (2020) para *Pleurotus ostreatus*, no qual 48 horas de exposição a temperaturas elevadas induziram intensas respostas metabólicas e proteicas, incluindo a síntese de proteases e HSPs.

Apesar do impacto descrito dessas condições sobre o crescimento e o metabolismo fúngico, não foram observadas diferenças significativas na produção de biomassa seca entre os tratamentos avaliados. Os valores obtidos também foram semelhantes aos previamente relatados para o cultivo de *G. sichuanense* em condições não estressantes, cuja produção média situou-se em torno de $4,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Pessoa et al., 2023, 2026). Embora sem diferenças estatísticas, a homogeneidade observada para o estresse senescente pode estar associada ao estabelecimento de um platô de crescimento decorrente da limitação nutricional. Em contraste, o estresse térmico apresentou maior variabilidade entre as repetições, sugerindo uma resposta fisiológica menos uniforme.

O espectro de FTIR dos extratos proteicos demonstrou a presença de bandas de absorção características de proteínas isoladas, semelhantes às descritas para extratos proteicos obtidos tanto do basidioma quanto da biomassa micelial de espécies de *Ganoderma* (Chevreuil et al., 2025; Pessoa et al., 2026). As diferenças observadas na intensidade das bandas de absorbância podem estar associadas ao conteúdo de biomoléculas presentes nos extratos, bem como às características físicas das amostras, incluindo o tamanho e a agregação das partículas (Udvardi et al., 2017).

As micrografias obtidas por MEV corroboram essa hipótese, demonstrando maior agregação e diferenças no tamanho de partículas de acordo com a condição de estresse. De forma semelhante, Karabulut et al. (2024) observaram alterações na organização das partículas associadas às mudanças nos espectros de FTIR de proteínas extraídas de *Agaricus bisporus*. Segundo os autores, diferenças na agregação e organização física das partículas podem influenciar a intensidade das bandas espectrais em decorrência de alterações nas interações intermoleculares, especialmente nas ligações de hidrogênio envolvendo grupos hidroxila e amida. Além disso, essas modificações estruturais podem

afetar propriedades funcionais das proteínas, como a solubilidade, uma vez que o grau de agregação das partículas influencia diretamente sua interação com o meio aquoso.

As diferenças observadas na composição das estruturas secundárias dos extratos proteicos podem estar associadas tanto a modificações conformacionais em proteínas individuais quanto a alterações no perfil de expressão proteica induzidas pelas condições de cultivo, considerando que a análise por FTIR reflete a contribuição conjunta das proteínas presentes na amostra. O padrão das alterações observadas na estrutura secundária também foi relatado para a polifenol oxidase de *A. bisporus*, apresentando efeito progressivo em resposta ao aumento da temperatura (Baltacıoğlu; Bayındırlı; Severcan, 2017). Essas mudanças estruturais estão associadas à alterações nas ligações de hidrogênio e nas interações de van der Waals, podendo favorecer a exposição de segmentos polipeptídicos e regiões hidrofóbicas das proteínas (Baltacıoğlu et al., 2015).

É importante destacar que, a interação das proteínas com outras moléculas presentes nos extratos também pode levar a alterações na sua conformação (Yang et al., 2019). Nesse sentido, os ensaios de quantificação destacam as proteínas como componentes majoritários, com menor contribuição de açúcares redutores e compostos fenólicos. Em comparação ao trabalhos anteriores, em que adotou-se o mesmo meio de cultura e mesmas estratégias de incubação, o conteúdo de proteínas solúveis no presente trabalho apresentou uma redução de cerca de 25% (Pessoa et al., 2023), ao passo que o teor de compostos fenólicos se mostrou relativamente estável (Pessoa et al., 2026).

A maior concentração de compostos fenólicos observada no estresse senescente pode estar relacionada ao estágio de crescimento do fungo, uma vez que a síntese de metabólitos secundários tende a ser intensificada durante a fase estacionária. Resultado semelhante foi descrito para o cultivo estático de *Fomitopsis betulina*, no qual o maior conteúdo de compostos fenólicos foi observado aos 14 dias de cultivo, coincidindo com o momento em que a biomassa havia atingido o platô de crescimento (Zaichenko et al., 2026). O maior conteúdo de açúcares redutores observado no extrato proteico obtido sob estresse salino, por sua vez, pode estar associado ao acúmulo de solutos compatíveis, incluindo glicose e outros carboidratos, resposta frequentemente relatada em fungos cultivados na presença de sais (Venâncio et al., 2017).

O maior conteúdo de compostos fenólicos observado no extrato obtido sob estresse senescente pode ter contribuído para a maior atividade antioxidante verificada nessa condição, em comparação aos demais tratamentos. Entretanto, todas as estratégias de estresse avaliadas resultaram em aumento da atividade antioxidante em relação ao cultivo controle descrito anteriormente. Mesmo utilizando uma concentração de extrato

correspondente à metade da previamente testada ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), observou-se a manutenção da capacidade de inibição dos radicais $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e $\text{DPPH}^{\bullet}$, além de um aumento de aproximadamente 30% na capacidade quelante (Pessoa et al., 2026).

Todos os extratos proteicos promoveram aumento da atividade metabólica das PBMCs, com destaque para o extrato obtido sob estresse térmico, que apresentou maior efeito nas menores concentrações avaliadas. Esse comportamento é semelhante ao descrito para extratos de *G. lucidum* (Gill; Rieder, 2008) e pode estar relacionado à presença de proteínas imunomoduladoras e lectinas, reconhecidas por seus efeitos mitogênicos, imunoestimuladores e ativadores da resposta imune efetora (Jeurink et al., 2008).

Frente à linhagem MT-2, o extrato proteico obtido sob estresse térmico destacou-se novamente por apresentar o menor valor de CI_{50} para a redução da atividade metabólica. Esse desempenho superou o observado no capítulo anterior para os extratos de *G. sichuanense* produzidos sob condições convencionais de cultivo, nos quais valores de CI_{50} semelhantes foram alcançados apenas após 72 h de exposição às células. Quando comparados no mesmo período experimental (24 h), o extrato proveniente do cultivo sob estresse térmico apresentou atividade citotóxica aproximadamente quatro vezes superior àquela observada para o extrato obtido em condições convencionais (capítulo 3).

Além da redução da atividade metabólica, típica da atividade citotóxica, os extratos promoveram diminuição da densidade celular e da formação de agregados observadas nas micrografias, com destaque para a redução observada nas concentrações de $12,5$ e $25 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ do extrato do cultivo em estresse térmico. Esse resultado sugere um possível mecanismo adicional de limitação da disseminação viral, uma vez que a transmissão do HTLV-1 depende fortemente do contato célula-célula, da formação de agregados celulares e da produção de biofilme viral (Arone; Dutartre; Muriaux, 2024). No entanto, estudos específicos são necessários para confirmar essa hipótese.

Após tratamento com as maiores concentrações dos extratos proteicos, as células apresentaram uma tendência de clusterização e escurecimento, o que pode estar relacionado ao mecanismo de morte celular. Durante o processo de apoptose, estruturas como vesículas extracelulares, corpos apoptóticos e outros marcadores celulares podem modular o microambiente, levando à ativação linfocitária e favorecendo o processo de agregação e reorganização celular local (Dieudé; Kaci; Hébert, 2021).

Os resultados dos ensaios de imunomodulação demonstraram que a condição de estresse empregada exerceu papel determinante no direcionamento do perfil imunomodulador dos extratos. De maneira geral, os extratos provenientes dos estresses

salino e senescente promoveram maior redução de citocinas pró-inflamatórias, enquanto o extrato produzido sob estresse térmico manteve concentrações mais elevadas de diversos mediadores inflamatórios e da resposta imune adaptativa.

No conjunto de citocinas dosadas, o extrato obtido sob estresse térmico destacou-se por manter níveis elevados de IL-1 β , TNF- α , IL-2 e IFN- γ nas menores concentrações, sugerindo um perfil predominantemente imunoestimulador. Esse perfil também foi consistente com os ensaios de viabilidade celular realizados nas PBMCs, onde o extrato produzido sob estresse térmico apresentou o maior estímulo metabólico nessas células. Considerando que a IL-2 constitui o principal fator de crescimento para linfócitos T e que o IFN- γ está diretamente relacionado à ativação da resposta imune celular (Ross; Cantrell, 2018), esses resultados sugerem que o aumento da atividade metabólica das PBMCs pode estar associado à maior ativação funcional dessas células, embora estudos específicos sejam necessários para confirmar essa relação.

Ademais, embora os ensaios de imunomodulação e citotoxicidade tenham sido conduzidos independentemente, o extrato obtido sob estresse térmico apresentou perfil imunológico coincidente com a maior citotoxicidade observada anteriormente frente à linhagem MT-2 infectada pelo HTLV-1. O aumento concomitante de IL-2, IFN- γ e TNF- α sugere a indução de um ambiente imunológico compatível com mecanismos envolvidos na resposta antiviral e antitumoral (Marimuthu et al., 2025). Dessa forma, uma hipótese é que a modulação dessas citocinas contribua, direta ou indiretamente, para um contexto biológico menos favorável à manutenção de células infectadas pelo HTLV-1. Contudo, essa hipótese deverá ser investigada em estudos mecanísticos futuros.

Em contraste, os extratos produzidos sob estresse salino e senescente apresentaram comportamento distinto ao preservar níveis relativamente mais elevados de IL-10, mesmo nas maiores concentrações avaliadas, ao mesmo tempo em que promoveram reduções expressivas de IL-6 e IL-8, sugerindo uma atividade imunomoduladora mais regulatória. Essas diferenças corroboram com os diferentes perfis estruturais e bioquímicos, e sugerem que as condições de cultivo modificaram não apenas a quantidade de proteínas produzidas, mas também sua composição e, consequentemente, seu potencial farmacológico.

Em comparação ao extrato proteico de *G. sichuanense* no cultivo controle, apresentado no capítulo 3, os extratos produzidos sob estresse, especialmente o térmico, modificaram não apenas a intensidade da resposta imunológica, mas também o comportamento dose-dependente de diversos mediadores. Enquanto o extrato controle apresentou um padrão caracterizado por resposta máxima em 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ seguida de

redução progressiva, o extrato produzido sob estresse térmico manteve níveis elevados ao longo de uma faixa mais ampla de concentrações. Esse comportamento sugere que as alterações metabólicas induzidas pelo estresse modificaram o perfil imunomodulador dos extratos proteicos.

Em suma, embora os extratos obtidos sob condições de estresse tenham apresentado menor conteúdo proteico em comparação ao cultivo controle descrito anteriormente, observou-se aumento expressivo da atividade antioxidante, imunomoduladora e da citotoxicidade frente à linhagem MT-2 infectada pelo HTLV-1. Esses resultados sugerem que os efeitos observados não estão relacionados apenas à quantidade de proteínas produzidas, mas possivelmente a alterações qualitativas no perfil proteico. Dessa forma, sugere-se que os mecanismos de estresse tenham favorecido a expressão de proteínas específicas ou promovido alterações estruturais capazes de aumentar a atividade biológica dos extratos, mesmo diante da redução do conteúdo proteico total.

8.5. Conclusão

As condições de estresse propostas no presente trabalho foram capazes de modular as características estruturais, bioquímicas e bioativas dos extratos proteicos de *G. sichuanense* sem comprometer a produção de biomassa micelial. As alterações observadas refletiram-se no potencial antioxidante, imunomodulador e citotóxico dos extratos frente à linhagem MT-2 infectada pelo HTLV-1, evidenciando a influência das condições de cultivo sobre a composição e funcionalidade das proteínas produzidas.

Dentre os tratamentos avaliados, o estresse térmico destacou-se por possibilitar a obtenção de extratos com elevadas atividades antioxidantes e imunomoduladoras, além de maior citotoxicidade frente à linhagem MT-2, constituindo uma estratégia promissora para a obtenção de biomoléculas de interesse biotecnológico. Assim, esses resultados dão suporte para estudos futuros voltados à identificação das proteínas envolvidas e à elucidação dos mecanismos celulares e moleculares associados às atividades observadas.

Referências

- ARONE, Coline; DUTARTRE, Hélène; MURIAUX, Delphine. Isolation of Viral Biofilms From HTLV-1 Chronically Infected T Cells and Integrity Analysis. **Bio-protocol**, v. 14, n. 24, 2024.
- BALTACIOĞLU, Hande *et al.* Effect of thermal treatment on secondary structure and conformational change of mushroom polyphenol oxidase (PPO) as food quality related enzyme: A FTIR study. **Food Chemistry**, v. 187, p. 263–269, 2015.

- BALTACIOĞLU, Hande; BAYINDIRLI, Alev; SEVERCAN, Feride. Secondary structure and conformational change of mushroom polyphenol oxidase during thermosonication treatment by using FTIR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 214, p. 507–514, 2017.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.
- BURCHACKA, E.; PIĘTA, P.; ŁUPICKA-SŁOWIK, A. Recent advances in fungal serine protease inhibitors. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112523, 2022.
- CAI, Manjun *et al.* Comparative proteomic analysis of two divergent strains provides insights into thermotolerance mechanisms of *Ganoderma lingzhi*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 167, p. 103796, 2023.
- CHEVREUIL, Larissa Ramos *et al.* Recovery of Proteases and Protease Inhibitors from *Ganoderma* spp. Cultivated in Amazonian Lignocellulose Wastes. **Current Protein and Peptide Science**, v. 26, n. 1, p. 76–88, 2025.
- DIEUDÉ, Mélanie; KACI, Imane; HÉBERT, Marie-Josée. The Impact of Programmed Cell Death on the Formation of Tertiary Lymphoid Structures. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.
- DU, Yupeng *et al.* Unveiling the Spatiotemporal Landscape of *Ganoderma lingzhi*: Insights into Ganoderic Acid Distribution and Biosynthesis. **Engineering**, 2025.
- GILL, Simperal K.; RIEDER, Michael J. Toxicity of a traditional Chinese medicine, *Ganoderma lucidum*, in children with cancer. **The Canadian Journal of Clinical Pharmacology**, v. 15, n. 2, p. e275-285, 2008.
- HE, Peixin *et al.* Effect of Aging on Culture and Cultivation of the Culinary-Medicinal Mushrooms *Morchella importuna* and *M. sextelata* (Ascomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 21, n. 11, 2019.
- JEURINK, Prescilla V. *et al.* Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 8, p. 1124–1133, 2008.
- KARABULUT, Gulsah *et al.* Sustainable fungi-based protein extraction from agro-waste mushroom stem using deep eutectic solvents. **Food Chemistry: X**, v. 24, p. 101931, 2024.
- KROLL, Kristin; PÄHTZ, Vera; KNIEMEYER, Olaf. Elucidating the fungal stress response by proteomics. **Journal of Proteomics**, Special Issue: Trends in Microbial Proteomics. v. 97, p. 151–163, 2014.
- LI, Qiang; HARVEY, Linda M.; MCNEIL, Brian. Oxidative stress in industrial fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 199–213, 2009.
- LI, Qi-Zhang *et al.* Cloning and Characterization of Promoters of the Fungal Immunomodulatory Protein Genes from *Ganoderma* spp. (Agaricomycetes) and Their Response to Methyl Jasmonate and Salicylic Acid. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 20, n. 2, 2018.

- LIU, Jing-yu *et al.* A Comparative Proteome Approach Reveals Metabolic Changes Associated with *Flammulina velutipes* Mycelia in Response to Cold and Light Stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 14, p. 3716–3725, 2018.
- LIU, Yusi; BASTIAAN-NET, Shanna; WICHERS, Harry J. Current Understanding of the Structure and Function of Fungal Immunomodulatory Proteins. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, 2020.
- LOWRY, Oliver H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.
- LUO, Lu *et al.* Heat stress in macrofungi: effects and response mechanisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 20, p. 7567–7576, 2021.
- MAHMOUD, Yehia A. G.; MOHAMED, Eman H. F. A.; ELZAHER, E. H. F. Abd. Response of the Higher Basidiomycetic *Ganoderma resinaceum* to Sodium Chloride Stress. **Mycobiology**, v. 35, n. 3, p. 124–128, 2007.
- MARIMUTHU, Mathan Muthu Chinakannu *et al.* Cytokine-based immunotherapy for gastric cancer: targeting inflammation for tumor control. **Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy**, v. 6, p. 1002312, 2025.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1 mar. 1959.
- OLIVEIRA-JUNIOR, S. D. *et al.* Adding-value to *Ganoderma lingzhi* by producing enzymes and antioxidant compounds under submerged fermentation using different culture media. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e283882, 2024.
- PESSOA, V. A. *et al.* Production of mycelial biomass, proteases and protease inhibitors by *Ganoderma lucidum* under different submerged fermentation conditions. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e270316, 2023.
- PESSOA, Vítor Alves *et al.* Impact of Submerged Fermentation Parameters on Proteins Extracted from *Ganoderma sichuanense* and Their Antioxidant Potential. **Microorganisms**, v. 14, n. 1, p. 133, 2026.
- POCKLEY, A. Graham; HENDERSON, Brian. Extracellular cell stress (heat shock) proteins—immune responses and disease: an overview. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 373, n. 1738, p. 20160522, 2017.
- PYEON, Ha-Young *et al.* Transcriptomic Analysis of Salt Stress Response in *Pleurotus ostreatus*. **Horticulturae**, v. 8, n. 12, p. 1147, 2022.
- ROMERO, Juan Carlos Ferrer *et al.* Edible Mushroom Cultivation in Liquid Medium: Impact of Microparticles and Advances in Control Systems. **Processes**, v. 13, n. 8, p. 2452, 2025.
- ROSS, Sarah H.; CANTRELL, Doreen A. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. **Annual Review of Immunology**, v. 36, n. Volume 36, 2018, p. 411–433, 2018.

SABOTIČ, Jerica; OHM, Robin A.; KÜNZLER, Markus. Entomotoxic and nematotoxic lectins and protease inhibitors from fungal fruiting bodies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 1, p. 91–111, 2016.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, Joseph A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

UDVARDI, Beatrix *et al.* Effects of Particle Size on the Attenuated Total Reflection Spectrum of Minerals. **Applied Spectroscopy**, v. 71, n. 6, p. 1157–1168, 2017.

VENÂNCIO, C. *et al.* Salinity induced effects on the growth rates and mycelia composition of basidiomycete and zygomycete fungi. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 1633–1641, 2017.

YAN, Zhiyu *et al.* Metabolic Response of *Pleurotus ostreatus* to Continuous Heat Stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2020.

YANG, Chen *et al.* Effect of pyrogallol (1,2,3-benzenetriol) polyphenol-protein covalent conjugation reaction degree on structure and antioxidant properties of pumpkin (*Cucurbita sp.*) seed protein isolate. **LWT**, v. 109, p. 443–449, 2019.

ZAICHENKO, Tetiana *et al.* Free radical inhibition and total phenolic content in *Fomitopsis betulina* mycelium extract under different cultivation conditions. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 7, 2026.

ZHANG, Xue *et al.* Heat Stress Modulates Mycelium Growth, Heat Shock Protein Expression, Ganoderic Acid Biosynthesis, and Hyphal Branching of *Ganoderma lucidum* via Cytosolic Ca²⁺. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 14, p. 4112–4125, 2016.

ZHAO, Yi *et al.* Enhancement of carotenoid production and its regulation in edible mushroom *Cordyceps militaris* by abiotic stresses. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 148, p. 109808, 2021.

9. CONCLUSÕES INTEGRATIVAS E PERSPECTIVAS FUTURAS

De forma integrada, os resultados obtidos nesta tese demonstram o potencial biotecnológico dos extratos proteicos de *Ganoderma sichuanense* e *Ganoderma multiplicatum*, diretamente associado às condições de cultivo empregadas. Os Capítulos 1, 2 e 4, em particular, evidenciam que a fermentação submersa constitui uma plataforma viável não apenas para a produção de biomassa fúngica, mas também para modular o metabolismo dos cogumelos e direcionar a síntese de proteínas bioativas de interesse.

Outro aspecto a ser destacado foi o potencial farmacológico observado, dando suporte ao estudo das proteínas de *Ganoderma* como candidatas ao desenvolvimento de novas terapias. Nesse contexto, a seleção dos extratos proteicos com maior atividade antioxidante mostrou-se uma estratégia eficiente, particularmente para *G. sichuanense*, cuja mesma condição de cultivo resultou em maior teor proteico, elevada atividade antioxidante, pronunciada citotoxicidade frente à linhagem MT-2 e perfil imunomodulador predominantemente regulatório.

Embora estudos adicionais ainda sejam necessários para identificar as proteínas responsáveis pelos efeitos observados e elucidar seus mecanismos de ação, os resultados estabelecem uma base conceitual para futuras investigações utilizando abordagens proteômicas. Além disso, a validação desses achados em modelos experimentais mais complexos poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas voltadas não apenas ao HTLV-1, mas também a outras patologias imunomediadas.

Assim, a presente tese demonstra que a modulação do metabolismo proteico de espécies de *Ganoderma* por meio da fermentação submersa é possível e representa uma estratégia promissora para a obtenção de proteínas com potencial aplicação farmacêutica. Além disso, relata, pela primeira vez, a atividade citotóxica seletiva de proteínas obtidas de espécies do gênero *Ganoderma* frente a uma linhagem celular infectada pelo HTLV-1, ampliando as perspectivas para a bioprospecção de proteínas fúngicas como candidatas ao desenvolvimento de novas terapias antivirais.

10. DECLARAÇÕES

10.1. Financiamento

O desenvolvimento desta pesquisa contou com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio da concessão de bolsa de doutorado (Processo nº 141036/2022-2).

10.2. Conflito de interesse

O autor declara não possuir conflitos de interesses financeiros, comerciais ou pessoais que possam ter influenciado os resultados ou as conclusões desta tese.

10.3. Uso de Inteligência Artificial

Durante a elaboração desta tese, foram utilizadas ferramentas de inteligência artificial generativa (ChatGPT, Gemini e NotebookLM) exclusivamente como suporte à revisão textual/paráfrase, tradução, organização de informações e auxílio à programação. As ferramentas não foram utilizadas para gerar, manipular ou interpretar dados experimentais, nem para elaborar conclusões científicas. Todo o conteúdo, incluindo o planejamento da pesquisa, a análise dos resultados e as conclusões apresentadas, são de responsabilidade do autor.

11. ANEXOS

11.1. Material Suplementar do Capítulo 2

Tabela Suplementar 1. Sequências utilizadas na construção da árvore filogenética.

Espécie	Código da linhagem	Origem geográfica	Código no NCBI	Referência
<i>Ganoderma sp.</i>	1962	Amazonas, Brasil	OQ695553	Presente estudo
<i>G. sichuanense</i>	CC22	Ásia	OQ691631	Próprio autor
<i>G. acaciicola</i>	Cui 16815 (tipo)	Austrália	NR182900.1	Sun et al., (2022)
<i>G. alpinum</i>	Cui 17467 (tipo)	Yunnan, China	NR182901.1	Sun et al., (2022)
<i>G. angustisporum</i>	Cui 13817 (holótipo)	Fujian, China	MG279170.1	Xing et al., (2018)
<i>G. applanatum</i>	SFC20141001–24	Coreia do Sul	KY364255.1	Jargalmaa et al., (2017)
<i>G. aridicola</i>	Dai 12588 (holótipo)	Durban, África do Sul	KU572491.1	Xing et al., (2016)
<i>G. australe</i>	URM 83325	Brasil	JQ514106.1	Gomes-Silva et al., (2015)
<i>G. bubalinomarginatum</i>	Dai 20075 (tipo)	Guangxi, China	NR182905.1	Sun et al., (2022)
<i>G. carocalcareus</i>	DMC 322 (holótipo)	Camarões, África	EU089969.1	Douanla-Meli e Langer (2009)
<i>G. castaneum</i>	Cui 17283 (tipo)	Hainan, China	NR182903.1	Sun et al., (2022)
<i>G. casuarinicola</i>	Dai 16336 (holótipo)	Guangdong, China	MG279173.1	Xing et al., (2018)
<i>G. chaliceum</i>	URM 80457	Pernambuco, Brasil	JX310812	Lima Júnior, Baptista Gibertoni e Malosso, (2014)
<i>G. chocoense</i>	QCAM 3123 (tipo)	Equador	MH890527	Crous et al., (2018)
<i>G. cocoicola</i>	Cui 16791 (tipo)	Austrália	NR182910.1	Sun et al., (2022)
<i>G. destructans</i>	CBS 139793 (tipo)	Pretória, África do Sul	NR132919.1	Coetzee et al., (2015)
<i>G. dianzhongense</i>	L4331 (tipo)	Yunnan, China	NR177159.1	He et al., (2021)
<i>G. eickeri</i>	CMW49692 (tipo)	África do Sul	MH571690	Tchoumi et al., (2019)
<i>G. ellipsoideum</i>	GACP14080966 (holótipo)	Hainan, China	MH106867.1	Hapuarachchi et al., (2018)
<i>G. enigmaticum</i>	CBS 139792 (tipo)	Pretória, África do Sul	NR132918.1	Coetzee et al., (2015)
<i>G. guangxiense</i>	Cui 14453 (tipo)	Guangxi, China	NR182906.1	Sun et al., (2022)
<i>G. hochiminhense</i>	MFLU 19-2224 (holótipo)	Vietnã	MN398324.1	Luangharn et al., (2021)
<i>G. knysnamense</i>	CMW47755 (tipo)	África do Sul	MH571681	Tchoumi et al., (2019)
<i>G. leucocontextum</i>	GDGM 40200 (holótipo)	Tibete, China	KF011548	Li et al., (2015)
<i>G. lingzhi</i>	Wu 1006-38 (holótipo)	Hubei, China	JQ781858.1	Cao, Wu e Dai, (2012)

Espécie	Código da linhagem	Origem geográfica	Código no NCBI	Referência
<i>G. lucidum</i>	MT26/10	República Checa	KJ143912.1	Zhou et al., (2015)
<i>G. lucidum</i>	Rivoire 4195	França	KJ143909.1	Zhou et al., (2015)
<i>G. martinicense</i>	LIP SWMart08-55 (tipo)	Martinica, França	KF963256.1	Weli e Courtecuisse (2010)
<i>G. meredithae</i>	CBS 271.88	Louisiana, EUA	NR164435.1	Vu et al. (2019)
<i>G. mizoramense</i>	UMN-MZ4 (holótipo)	Índia	KY643750.1	Crous et al. (2017)
<i>G. mbrekobenum</i>	MIN 850481	Gana, África	NR147647.1	Crous et al. (2016)
<i>G. multiplicatum</i>	URM 83346	Paraíba, Brasil	JX310823	Lima Júnior, Baptista Gibertoni e Malosso (2014)
<i>G. myanmarensense</i>	MFLU19-2167 (holótipo)	Myanmar	MN396330.1	Luangharn et al. (2021)
<i>G. nasalanense</i>	GACP17060211 (holótipo)	Laos	MK345441.1	Hapuarachchi et al. (2019)
<i>G. neojaponicum</i>	AS5.541	Taiwan	AY593866.1	Wang e Yao (2005)
<i>G. aff. oerstedii</i>	URM 83400	Pernambuco, Brasil	JX310824	Lima Júnior, Baptista Gibertoni e Malosso (2014)
<i>G. orbiforme</i>	URM 83332	Pernambuco, Brasil	JX310813	Lima Júnior, Baptista Gibertoni e Malosso (2014)
<i>G. oregonense</i>	GO	Washington, EUA	MT196417	Viceconte et al. (2021)
<i>G. oviporum</i>	HKAS123193	China	NR182704.1	Yang et al. (2022)
<i>G. parvulum</i>	URM 83339	Pernambuco, Brasil	JX310817	Lima Júnior, Baptista Gibertoni e Malosso (2014)
<i>G. podocarpense</i>	QCAM6422 (holótipo)	Equador	MF796661.1	Crous et al. (2017)
<i>G. resinaceum</i>	MUCL52253	França	MK554786.1	Cabarro-Hernández et al. (2019)
<i>G. ryvaridenii</i>	HKAS 58053 (tipo)	Camarões, África	HM138671.1	Kinge e Mih (2011)
<i>G. sanduense</i>	GACP18012501 (holótipo)	China	MK345450.1	Hapuarachchi et al. (2019)
<i>G. shanxiense</i>	BJTC FM423 (holótipo)	China	MK764268	Liu et al. (2019)
<i>G. sessile</i>	111TX	EUA	MG654306.1	Loyd et al. (2018)
<i>G. sichuanense</i>	HMAS 42798 (holótipo)	Sichuan, China	JQ781877.1	Cao, Wu e Dai, (2012)
<i>G. sinense</i>	Wei 5327	Hainan, China	KF494998.1	Xing et al., (2018)
<i>G. subangustisporum</i>	Cui 18592 (tipo)	Yunnan, China	NR182909.1	Sun et al., (2022)
<i>G. subflexipes</i>	Cui 17257 (tipo)	Guangdong, China	NR182904.1	Sun et al., (2022)
<i>G. sublobatum</i>	Cui 16804 (tipo)	Australia	NR182907.1	Sun et al., (2022)
<i>G. thailandicum</i>	HKAS104640 (holótipo)	Tailândia	MK848681.1	Luangharn et al. (2021)
<i>G. tongshanense</i>	Cui 17168 (tipo)	Hubei, China	NR182908.1	Sun et al., (2022)
<i>G. tropicum</i>	KUMCC 18-0046	Chiang Rai, Tailândia	MH823539.1	Luangharn et al. (2021)
<i>G. tropicum</i>	BCRC 37122	Taiwan, China	EU021457.1	Wang et al. (2009)
<i>G. weberianum</i>	CBS128581	Taiwan	MK603805.1	Cabarro-Hernández et al. (2019)

Espécie	Código da linhagem	Origem geográfica	Código no NCBI	Referência
<i>G. weixiensis</i>	HKAS100649 (holótipo)	Yunnan, China	NR166271.1	Ye et al. (2019)
<i>G. wiicroense</i>	MIN 938704 (tipo)	Gana, África	NR158480.1	Crous et al. (2015)
<i>G. yunlingense</i>	Cui 16288 (tipo)	Yunnan, China	NR182902.1	Sun et al., (2022)
<i>Tomophagus colossos</i>	TC-02	Vietnam	KJ143923.1	Zhou et al., (2015)
<i>T. colossos</i>	URM 83330	Paraíba, Brasil	JQ618247	Lima Júnior, Baptista Gibertoni e Malosso (2014)

11.2. Material Suplementar dos Capítulos 3 e 4

Documentos suplementares. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOAM e Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação Sorológica e Molecular da Infecção por HTLV-1 e HTLV-2 do Amazonas.

Pesquisador: Allyson Guimarães da Costa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 96247226.0.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 8.320.006

Apresentação do Projeto:

O projeto visa investigar do ponto de vista sorológico e molecular da infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em indivíduos atendidos no Hemocentro do Amazonas. O HTLV afeta principalmente os linfócitos T CD4+ e indivíduos infectados enfrentam uma persistente negligência em diversas localidades, em grande parte devido ao seu quadro assintomático, o que dificulta sua detecção e visibilidade. Essa invisibilidade gera graves consequências para as Pessoas Vivendo com HTLV (PVHTLV), incluindo a possibilidade de agravamento do quadro imunológico dos diagnosticados frente outras infecções. Neste contexto, o estudo propõe a investigação e o diagnóstico sorológico e molecular de HTLV-1 e HTLV-2 em indivíduos atendidos na Fundação HEMOAM, caracterizando o perfil epidemiológico e a prevalência de ambos os subtipos. Serão analisados resultados sorológicos indeterminados nos testes de triagem para HTLV e suas possíveis associações com outras infecções detectadas na triagem. O projeto também inclui a validação de uma nova metodologia diagnóstica como alternativa promissora para futuras investigações, buscando avaliar também os métodos atuais. Eticamente, o estudo garantirá acolhimento, aconselhamento (pré e pós-teste), e conscientização aos participantes diagnosticados e seus contatos familiares, visando o manejo e prevenção da transmissão. Os achados irão subsidiar a otimização dos fluxos de

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)

Bairro Chapada **CEP:** 69.050-002

UF: AM **Município** MANAUS

Telefone (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 8.320.006

diagnóstico e acompanhamento na Fundação HEMOAM, impactando positivamente a qualidade de vida das PVHTLV e contribuindo para a redução do estigma e da negligência na população Amazonense.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

Realizar a investigação sorológica e molecular do HTLV-1 e HTLV-2 em indivíduos atendidos na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM).

Objetivo Secundário:

Oferecer acolhimento, aconselhamento (pré e pós-teste) e atividades de conscientização sobre o HTLV a indivíduos diagnosticados com a infecção e seus contatos familiares, com foco na prevenção da transmissão e no manejo da condição;

- Caracterizar o perfil sociodemográfico e clínico laboratorial dos indivíduos avaliados no estudo e determinar a prevalência da infecção por HTLV-1 e HTLV-2 nas populações de doadores de sangue voluntários e pacientes atendidos na Fundação HEMOAM;

- Promover a divulgação de informações atualizadas sobre o HTLV, suas formas de transmissão, prevenção e manejo, direcionadas a profissionais de saúde e à população em geral, visando reduzir a negligência e o estigma associados à infecção;

- Validar o desempenho do ensaio imunológico FC-Duplex IgG1 HTLV-1/2 para o diagnóstico diferencial da infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em amostras da população estudada na Fundação HEMOAM;

- Analisar a frequência e os fatores associados a resultados sorológicos indeterminados para HTLV nos testes de triagem realizados na Fundação HEMOAM, buscando compreender os desafios diagnósticos existentes;

- Investigar a associação entre resultados indeterminados no Western Blot para HTLV e a presença de outras infecções simultâneas detectadas na triagem de doadores de sangue da Fundação HEMOAM;

- Propor recomendações para otimização dos fluxos de diagnóstico diferencial e de acompanhamento de indivíduos com HTLV-1 e HTLV-2 na Fundação HEMOAM, com base nos achados do estudo.

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)

Bairro Chapada

CEP: 69.050-002

UF: AM

Município

MANAUS

Telefone (92)3655-0114

Fax: (92)3655-0112

E-

cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 8.320.006

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos inerentes aos procedimentos são os mesmos identificados em qualquer coleta de sangue venoso, como hematomas, inchaços ou dor na região da coleta.

Os benefícios de sua participação estão direcionados ao auxílio no diagnóstico de indivíduos que convivem com o vírus, bem como incentivo a políticas de combate ao HTLV no Amazonas, não trazendo nenhum tipo de benefício direto ou remuneração de nenhuma espécie para os participantes desta pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Local de realização da pesquisa: O estudo será realizado na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) em parceria com o Instituto René Rachou - FIOCRUZ Minas, em Belo Horizonte, junto ao Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores coordenado pelo Dr. Olindo Martins Filho. População a ser estudada: Serão recrutados doadores de sangue voluntários e pacientes atendidos na Fundação HEMOAM, conforme critérios de inclusão e exclusão. Particularmente, será dada atenção especial à inclusão de indivíduos com resultados sorológicos positivos e/ou indeterminados para HTLV, para aprofundar a investigação das causas desses resultados. Além disso, o estudo abrangerá contatos familiares de indivíduos diagnosticados com HTLV no decorrer do estudo, para as atividades de acolhimento e conscientização, conforme detalhado nos objetivos específicos. Inclusão dos participantes: O processo de recrutamento de participantes na Fundação HEMOAM iniciará com o levantamento de relatórios de sorologias reativas para HTLV da triagem de bolsas de sangue, coletando informações essenciais para contato. O contato inicial será realizado por telefone, mensagem de texto (WhatsApp e/ou SMS), e-mail ou, se necessário, durante novas tentativas de doação pela equipe do ciclo do sangue. Após o contato, os candidatos serão convidados a retornar à Fundação HEMOAM para uma sessão individual de acolhimento e aconselhamento pré-teste, em que a investigação sorológica para diagnóstico diferencial e os objetivos do estudo serão apresentados. Será fornecido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), garantindo tempo e esclarecimentos para uma decisão voluntária e informada, com a participação formal no estudo ocorrendo somente após a assinatura do TCLE. Os

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município** MANAUS
Telefone (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-** cep@hemoam.am.gov.br

07
Página 03 de

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 8.320.006

resultados diagnósticos, incluindo a tipagem diferencial de HTLV-1 e HTLV-2, serão entregues em sessão de aconselhamento pós-teste por membro da equipe multiprofissional (médico, enfermeiro e/ou biomédico), assegurando confidencialidade e conforto do participante. Em caso de resultados positivos, a decisão de convidar contatos familiares para investigação caberá exclusivamente ao indivíduo diagnosticado. Para apoiar esta decisão e oferecer segurança, a equipe do estudo fornecerá suporte técnico e profissional ao indivíduo, incluindo materiais informativos claros e orientações sobre como abordar seus familiares, garantindo que o processo seja conduzido de forma confidencial e respeitosa, sem expor sua condição sorológica desnecessária. Por fim, PVHTLV identificadas neste estudo serão encaminhadas para acompanhamento clínico na Fundação HEMOAM ou serviço especializado, se aplicável, reforçando o compromisso com a continuidade do cuidado à saúde. Modelo de estudo: Trata-se de um estudo prospectivo, multicêntrico, para investigação e diagnóstico de infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2 em doadores de sangue e pacientes atendidos na Fundação HEMOAM. As amostras diagnosticadas diferencialmente em HTLV serão utilizadas para validação de nova metodologia de ensaio para diagnóstico diferencial o FC-Duplex IgG1 HTLV-1/2. Cálculo da amostragem: A amostragem será por conveniência, compreendendo todas as amostras de doadores de sangue e pacientes atendidos na Fundação HEMOAM que se enquadrarem nos critérios de inclusão no período de janeiro de 2026 a dezembro de 2030. Esta abordagem se justifica pela característica multicêntrica do estudo e pela necessidade de captar a demanda real de triagem e diagnóstico na instituição. Estimamos a inclusão de aproximadamente 100 indivíduos vivendo com HTLV, sendo a maioria (n^o 80) com HTLV-1 e uma menor proporção (n^o 20) com HTLV-2, com base em estudos epidemiológicos anteriores na região. Esta dimensão amostral é considerada suficiente para os objetivos de caracterização epidemiológica e validação do ensaio FC-Duplex IgG1 HTLV-1/2.

Critério de Inclusão:

Serão incluídos voluntários para doação de sangue e pacientes atendidos na Fundação HEMOAM no período de janeiro de 2026 a dezembro de 2030. Além disso, iremos seguir com atendimentos anuais indivíduos reativos para HTLV no ensaio de

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município** MANAUS
Telefone (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-** cep@hemoam.am.gov.br

07
Página 04 de

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 8.320.006

triagem realizado na Fundação HEMOAM, bem como investigar os seus contatos familiares de Pessoas Vivendo com HTLV identificados durante o processo de investigação sorológica. Todos os participantes devem assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) após serem devidamente informados e esclarecidos sobre o estudo.

Critério de Exclusão:

Amostras impossibilitadas a realização dos testes de participantes que decidirem não realizar nova coleta.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Folha de Rosto
- Termo de Anuência Institucional
- Termo de Garantia de Ressarcimento dos Participantes da Pesquisa
- Termo de garantia de retorno de benefícios aos participantes da Pesquisa
- Cronograma da Pesquisa
- Orçamento da Pesquisa
- Carta de Anuência dos setores envolvidos
- Carta de Anuência dos Pesquisadores
- Instrumento de coleta de dados secundários (prontuários eletrônicos)
- Termo de Responsabilidade do Pesquisador
- Declaração de Coparticipação
- Termo De Compromisso Para Utilização De Dados E Prontuários - (TCUD)
- Declaração de Infraestrutura
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)
- Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE)

Recomendações:

Vide conclusões.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Do ponto de vista ético e de acordo com a Res. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), após a análise do pedido contido nos documentos submetidos na PB, considero a proposta aprovada para deliberação pelo colegiado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Após avaliação, esse CEP julga o projeto como APROVADO. No entanto, salienta-se

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município** MANAUS
Telefone (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 8.320.006

que os pesquisadores irão encaminhar os relatórios/resultados da pesquisa à Diretoria de Ensino e Pesquisa/Gerência de Pesquisa HEMOAM ao término do Estudo ou conforme solicitados.

Em adicional, em conformidade com a Resolução CNS no 466/12, cabe ao pesquisador:

- Desenvolver o projeto conforme delineado;
- Apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- Justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados;
- Encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto. Salvo melhor juízo, esse é o parecer.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2739834.pdf	13/03/2026 16:38:18		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HTLV_doador_.pdf	13/03/2026 16:37:55	FELIPE ARAUJO DOS SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HTLV_familiar_pedido_medico.pdf	13/03/2026 16:37:04	FELIPE ARAUJO DOS SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_HTLV_6_12anos.pdf	13/03/2026 16:36:39	FELIPE ARAUJO DOS SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_13_17_HTLV.pdf	13/03/2026 16:36:23	FELIPE ARAUJO DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_colaboradores_HTLV_2026.pdf	11/03/2026 18:19:37	FELIPE ARAUJO DOS SANTOS	Aceito
Outros	05_Modelo_Declaracao_de_Compromisso_do_Pesquisadorassinado.pdf	11/03/2026 18:15:52	FELIPE ARAUJO DOS SANTOS	Aceito

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município** MANAUS
Telefone (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 8.320.006

Outros	TCUD_HTLV_Investigacao_Doadores_a assinado.pdf	11/03/2026 18:11:53	FELIPE ARAUJO DOS SANTOS	Aceito
Outros	06_Declaracao_de_Coparticipacao.pdf	11/03/2026 18:11:10	FELIPE ARAUJO DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	06_Modelo_Declaracao_de_Infraestrutur a_assinado.pdf	11/03/2026 18:08:39	FELIPE ARAUJO DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	MEMO_N_007_2026_GP_HEMOAM_C arta_de_Anuencia.pdf	03/03/2026 18:25:55	FELIPE ARAUJO DOS SANTOS	Aceito
Outros	anuencia_setores.pdf	03/03/2026 18:18:17	FELIPE ARAUJO DOS SANTOS	Aceito
Outros	Questionario_HTLV_positivo.pdf	03/03/2026 17:56:48	FELIPE ARAUJO DOS SANTOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_cep_doadores.pdf	03/03/2026 17:49:51	FELIPE ARAUJO DOS SANTOS	Aceito
Folha de Rosto	MEMO_N_007_2026_GP_HEMOAM_Fo lha_de_Rosto.pdf	23/02/2026 12:27:38	FELIPE ARAUJO DOS SANTOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 30 de Março de 2026

Assinado por:
NILBERTO DIAS DE ARAUJO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município** MANAUS
Telefone (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-** cep@hemoam.am.gov.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Investigação Sorológica e Molecular da Infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em Indivíduos Atendidos no Hemocentro do Amazonas.

Centro de Pesquisa: Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

Pesquisador: Dr. Allyson Guimarães da Costa

Ao procurar a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM para doação de sangue, através da triagem sorológica do setor de sorologia da instituição, o Sr(a) testou positivo para o vírus HTLV. Dessa forma, convidamos o Sr(a) a participar deste estudo que tem por objetivo realizar investigação sorológica para HTLV em candidatos a doação que foram reativos para o vírus na triagem sorológica de bolsas de sangue, o intuito do estudo é realizar o diagnóstico para HTLV e acompanhamento de pessoas vivendo com o vírus na nossa região.

A sua participação é voluntária, portanto, se não concordar em participar ou alterar a sua decisão pode retirar o consentimento a qualquer momento do estudo, de modo que o seu atendimento junto a Fundação HEMOAM não será prejudicado. Será possível fazer todas as perguntas que quiser em qualquer momento do estudo. Você tem todo o tempo que quiser para decidir e discutir a situação com pessoas de sua confiança.

Para sua participação será necessário o preenchimento deste termo de consentimento, onde será realizado uma breve entrevista com o Sr(a), desde já esclarecemos que caso aceite participar, será necessário a realização da coleta de sangue para a investigação sorológica, por punção venosa (coleta no braço), sem necessidade de internação ou qualquer outro procedimento mais invasivo. As amostras coletadas farão parte do grupo experimental da pesquisa, onde serão empregados ensaios diagnósticos para investigação do HTLV. Os testes ocorrerão na Fundação HEMOAM, as amostras serão processadas e poderão ser submetidas a estudos adicionais para o HTLV.

Os riscos inerentes aos procedimentos são os mesmos identificados em qualquer coleta de sangue venoso, como hematomas, inchaços ou dor na região da coleta. No caso de amostra insuficiente, quebra do tubo, hemólise, o senhor será avisado para que retorne à Fundação HEMOAM para uma nova coleta de sangue para a realização dos testes. A doação da amostra não levará muito tempo, se você sofrer algum dano ou intercorrência proveniente da coleta de sangue, deverá comunicar alguém da equipe da pesquisa imediatamente.

Os benefícios de sua participação estão direcionados ao auxílio no diagnóstico de indivíduos que convivem com o vírus, bem como incentivo a políticas de combate ao HTLV no Amazonas, não trazendo nenhum tipo de benefício direto ou remuneração de nenhuma espécie para os participantes desta pesquisa. Os testes e coletas realizados exclusivamente com fins de pesquisa não implicarão qualquer custo para você, se necessário, você receberá um ressarcimento pelos gastos relacionados à sua participação no estudo. Apesar de não haver compensação financeira, ao assinar este termo de consentimento você não renunciará a nenhum dos seus direitos legais, garantidos na regulamentação brasileira de pesquisa envolvendo seres humanos, sendo um de seus direitos a solicitação de indenização.

Você poderá ser excluído do estudo através de sua solicitação ou se os pesquisadores considerarem oportuno, tanto por razões de segurança, ou por qualquer desconforto que ocorra pela doação. Em todos os casos, você receberá uma explicação adequada do motivo que ocasionou a sua retirada do estudo. Além disso, o estudo

Hemoam.am.gov.br
Twitter.com/fhemoam
Facebook.com/hemoam
Instagram/hemoam

presidencia@hemoam.am.gov.br
Fone: (92) 3655-0100
Certificação ISO 9001:2015
Avenida Constantino Nery, 4397 –
Chapada - Manaus - AM
CEP: 69036-110



também pode ser cancelado por razões administrativas. Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você se compromete a cumprir com os procedimentos do estudo que foram explicados.

Para obter mais informações sobre este estudo ou para qualquer informação adicional sobre os seus direitos como participante, ou se você quiser fazer uma reclamação, estimulamos que entre em contato com o pesquisador responsável do estudo, Dr. Allyson Guimarães da Costa, telefone: (92) 98153-5233; e-mail: allyson.gui.costa@gmail.com; endereço: Av. Constantino Nery, 4397 - Chapada, Bloco A, 2º andar, Sala 17. Em caso de dúvidas, denúncias ou reclamações sobre a sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) da Fundação HEMOAM; telefone: (92) 3655-0114; e-mail: cephemoam@gmail.com; endereço: na Av. Constantino Nery, 4397 - Chapada, Bloco A, 2º andar, Sala 13, Chapada. O horário de funcionamento do CEP é de 8 às 14 horas, de segunda à sexta-feira.

Além da equipe da pesquisa da qual você receberá suporte, os registros referentes a você poderão ser consultados pelo Comitê de Ética da Fundação HEMOAM e equipe de pesquisadores envolvidos. Ademais, seu nome não será revelado em nenhum momento, ainda que as informações de seu registro sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que poderão ocorrer.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

- ☐ Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas.
- ☐ Eu, por meio deste documento, dou livremente meu consentimento para participar do estudo. Entendo que poderei ser submetido a exames laboratoriais caso necessários para a coleta de amostra e não receberei de forma alguma qualquer compensação monetária por minha participação neste estudo.
- ☐ Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

Consentimento após-informação

Eu _____, por me considerar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste documento e da pesquisa a ser desenvolvida, livremente dou meu consentimento para inclusão como participante da pesquisa e atesto que me foi entregue uma cópia desse documento.

_____	ou		_____
Assinatura do participante		Impressão polegar	Data
_____			_____
Pesquisador responsável / membro equipe			Data

Hemoam.am.gov.br
Twitter.com/fhemoam
Facebook.com/hemoam
Instagram/hemoam

presidencia@hemoam.am.gov.br
Fone: (92) 3655-0100
Certificação ISO 9001:2015
Avenida Constantino Nery, 4397 –
Chapada - Manaus - AM
CEP: 69036-110



12. APÊNDICES

12.1. Atividades desenvolvidas durante o doutorado

Durante o período de realização do curso de Doutorado em Biotecnologia (08/2022–07/2026), foram desenvolvidas atividades de pesquisa, formação de recursos humanos e divulgação científica. Parte da produção resultante está sintetizada a seguir:

- ✓ Artigos científicos publicado (n = 15)
- PEREIRA, D. B.; LIMA-SILVA, G.; SOARES, L. B. N.; AGUIAR, L. V. B.; VASCONCELOS, A. S.; **PESSOA, V. A.**; *et al.* Precision Fermentation as a Frontier in Biofuel Production: Advances, Challenges, and Integration into Biorefineries. *Fermentation*, v. 12, p. 35, 2026.
- **PESSOA, V. A.**; CHEVREUIL, L. R.; NUNES, R. R.; PEREIRA, D. B.; LIMA-SILVA, G.; SOARES, L. B. N.; *et al.* Impact of Submerged Fermentation Parameters on Proteins Extracted from *Ganoderma sichuanense* and Their Antioxidant Potential. *Microorganisms*, v. 14, p. 133, 2026.
- LIMA-SILVA, G.; MARTÍNEZ-BURGOS, W. J.; PEREIRA, D. B.; SOARES, L. B. N.; VASCONCELOS, A. S.; **PESSOA, V. A.**; *et al.* Catabolite Repression and Substrate Induction as Strategies for Protease Production in Edible Mushrooms. *Macromol*, v. 6, p. 9, 2026.
- SILVA, J. F.; **PESSOA, V. A.**; SILVA, D. F.; CHEVREUIL, L. R.; VALDEZ, A. F.; *et al.* Intrapolysaccharides from Amazonian *Panus lecomtei* Induce Pro-inflammatory Responses and Adhere to Macrophage Surface. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 57, p. 57–70, 2026.
- VASCONCELOS, A. S.; AGUIAR, L. V. B.; **PESSOA, V. A.**; CARMO, I. B.; SOARES, L. B. N.; *et al.* Toxicological and Environmental Risk Assessment of Biopolymeric Coatings for Horticultural Produce: A Comprehensive Review on Biosafety, Degradation, and Ecological Risks. *Coatings*, v. 16, p. 452, 2026.
- **PESSOA, V. A.**; LIMA-SILVA, G.; VASCONCELOS, A. S.; AGUIAR, L. V. B.; ASSUNÇÃO, E. N.; *et al.* An Amazonian *Ganoderma* Isolate as a Source of Antioxidant Proteins: Influence of Submerged Fermentation Conditions on Mycelial Architecture and Bioactivity. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 57, p. 120, 2026.
- SOARES, L. B. N.; OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; **PESSOA, V. A.**; LIMA-SILVA, G.; PEREIRA, D. B.; *et al.* Mycelial Biomass of Amazonian Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) as a Biotechnological Platform for Digestive Enzyme Modulation. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, v. 6, p. 84, 2026.
- AGUIAR, L. V. B.; SOARES, L. B. N.; LIMA-SILVA, G.; PEREIRA, D. B.; **PESSOA, V. A.**; *et al.* Functional Foods from Edible Mushrooms and Mycelia: Processing Technologies, Health Benefits, Innovations, and Market Trends. *Fermentation*, v. 12, p. 173, 2026.
- CHEVREUIL, L. R.; **PESSOA, V. A.**; LIMA-SILVA, G.; GOUVÊA, P. R. S.; SOARES, L. B. N.; SALES-CAMPOS, C. Recovery of Proteases and Protease Inhibitors from *Ganoderma* spp. Cultivated in Amazonian Lignocellulosic Wastes. *Current Protein & Peptide Science*, v. 26, p. 76–88, 2025.
- LIMA-SILVA, G.; VASCONCELOS, A. S.; AGUIAR, L. V. B.; **PESSOA, V. A.**; PEREIRA, D. B.; *et al.* Highlighting the Potential of an Amazonian Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) through Comparison with Commercial Strains: Mycelial

- Growth and Protease Production in Different Culture Media. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 2025, p. 1, 2025.
- GOUVÊA, P. R. S.; SOARES, L. B. N.; **PESSOA, V. A.**; OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; AGUIAR, L. V. B.; *et al.* Amazonian Residue Effect on the Production and Centesimal Composition of *Ganoderma* spp. *International Journal of Agriculture and Biology*, v. 31, p. 77–83, 2024.
 - OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; LIMA-SILVA, G.; **PESSOA, V. A.**; VASCONCELOS, A. S.; SILVA, D. F.; *et al.* Adding Value to *Ganoderma lingzhi* by Producing Enzymes and Antioxidant Compounds under Submerged Fermentation Using Different Culture Media. *Brazilian Journal of Biology*, v. 84, p. e283882, 2024.
 - **PESSOA, V. A.**; NASCIMENTO, L. B. B.; LIMA-SILVA, G.; VASCONCELOS, A. S.; SILVA, J. F.; *et al.* Production of Mycelial Biomass, Proteases and Protease Inhibitors by *Ganoderma lucidum* under Different Submerged Fermentation Conditions. *Brazilian Journal of Biology*, v. 83, p. e270316, 2023.
 - GOUVÊA, P. R. S.; OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; **PESSOA, V. A.**; COSTA, C. L. S. C.; SALES-CAMPOS, C.; CHEVREUIL, L. R. Agro-wastes Bioconversion by an Amazonian Isolate of *Ganoderma* sp. and a Commercial Strain of *Ganoderma lingzhi*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 1, p. 102959, 2023.
 - SOARES, L. B. N.; VASCONCELOS, A. S.; AGUIAR, L. V. B.; LIMA-SILVA, G.; PEREIRA, D. B.; SOARES, T. M. P.; **PESSOA, V. A.**; *et al.* Edible Mushroom-Enriched Beverages as Functional Strategies for the Prevention and Management of Non-Communicable Chronic Diseases. *Beverages*. Aceito para publicação, 2026.
- ✓ Capítulos de livros publicado (n = 2)
- PEREIRA, D. B.; CHEVREUIL, L. R.; **PESSOA, V. A.**; VASCONCELOS, A. S.; SILVA, G. L.; SOARES, L. B. N.; SALES-CAMPOS, C. Inibidores de proteases: uma abordagem integrada com o potencial dos cogumelos. In: MISSIAS-MOREIRA, R. (Org.). *Aprova Saberes: construindo pontes entre as áreas do conhecimento científico*. v. 1. Sevilha: Aprova Docentes, 2024. p. 39–55.
 - SILVA, G. L.; CHEVREUIL, L. R.; SOARES, L. B. N.; PEREIRA, D. B.; **PESSOA, V. A.**; SALES-CAMPOS, C. Basidiomicetos amazônicos: potencial biotecnológico, sustentabilidade e conservação diante das mudanças climáticas. In: MISSIAS-MOREIRA, R. (Org.). *Aprova Saberes: construindo pontes entre as áreas do conhecimento científico*. v. 1. Sevilha: Aprova Docentes, 2024. p. 24–38.
- ✓ Palestras e comunicações orais (n = 4)
- **PESSOA, V. A.** *Amazonian mushroom Pleurotus ostreatus: A functional food with antioxidant and protease-modulating benefits for people living with HIV-1*. Comunicação oral apresentada no **36th Brazilian Congress of Virology & 20th Mercosur Virology Meeting**, 2025.
 - **PESSOA, V. A.** *Stress-Induced Metabolic Modulation Enhances Antiviral Activity of Ganoderma sichuanense Protein Extracts against HTLV-1*. Comunicação oral apresentada no **I Congresso Brasileiro de Diversidade Microbiana (CBDMicro)**, 2026.
 - **PESSOA, V. A.** *Exploring Mushroom Biotechnology for HTLV-1 Therapy: Dual Antiviral Action of Ganoderma-Derived Proteins as Cytotoxic and Immunostimulatory Agents*. Comunicação oral apresentada no **XVII Simpósio Internacional sobre HTLV no Brasil (SIHTLVbr)**, 2025.

- PESSOA, V. A. *Biomoléculas de cogumelos amazônicos como estratégia para o desenvolvimento de novos agentes antivirais*. Apresentação oral realizada na **Jornada de Jovens Pesquisadores**, durante o seminário científico **Conexões Amazônicas – Pesquisas Colaborativas entre o Brasil e a França**, 2025.
- ✓ Prêmios e distinções (n = 3)
 - **1º Lugar – Melhor Comunicação Oral**, área **Antimicrobianos**, I Congresso Brasileiro de Diversidade Microbiana (CBDMicro), 2026. Trabalho: *Stress-Induced Metabolic Modulation Enhances Antiviral Activity of Ganoderma sichuanense Protein Extracts against HTLV-1*.
 - **1º Lugar – Prêmio Carlos Maurício de Castro Costa**, XVII Simpósio Internacional sobre HTLV no Brasil, 2025. Trabalho: *Exploring Mushroom Biotechnology for HTLV-1 Therapy: Dual Antiviral Action of Ganoderma-derived Proteins as Cytotoxic and Immunostimulatory Agents*.
 - **Menção Honrosa**, VII Semana Acadêmica de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Amazonas (SEMEALI-UFAM), 2023. Trabalho: *Propriedades Coagulantes de Leite por Ganoderma spp. Cultivados em Diferentes Resíduos Agroindustriais*.

✓ Atuação editorial e revisão por pares

Editor convidado de edição especial (n = 1)

- *Frontiers in Molecular Biosciences* – Editor convidado (*Guest Associate Editor*) da *Research Topic "Discovery, Function, and Translational Applications of Bioactive Compounds Against Pathogens via Sustainable Approaches"* (2026–atual).

Revisor de periódicos científicos (n = 3)

- *Journal of Biotechnology* – Revisor ad hoc (2026 – atual).
- *PLOS ONE* – Revisor ad hoc (2026 – atual).
- *LWT* – Revisor ad hoc (2026 – atual).

✓ Participação em eventos científicos (n = 13)

Eventos internacionais (n = 6)

- Brazil VERDE: Vitalizing Efforts to Resist Diseases Effectively in Traditional Amazonian Communities (2024).
- I Congresso Internacional de Alimentos Funcionais da Amazônia (CIAFA) (2024).
- 36th Brazilian Congress of Virology & 20th Mercosur Virology Meeting (2025).
- Jornada de Jovens Pesquisadores – Seminário Conexões Amazônicas: Pesquisas Colaborativas entre o Brasil e a França (2025).
- XVII Simpósio Internacional sobre HTLV no Brasil (2025).
- 9th HITMeeting Amazon (2026).

Eventos nacionais (n = 5)

- 20ª Semana Nacional de Ciência e Tecnologia (2023).

- X Congresso Brasileiro de Micologia (2024).
- 21ª Semana Nacional de Ciência e Tecnologia (2024).
- 22ª Semana Nacional de Ciência e Tecnologia (2025).
- I Congresso Brasileiro de Diversidade Microbiana (CBDMicro) (2026).

Eventos regionais (n = 2)

- 5º Congresso Pan-Amazônico de Hematologia e Hemoterapia (2025).
- 8º Congresso Pan-Amazônico de Oncologia (2025).

✓ **Coorientações**

- Iniciação científica (n = 2)

PINHEIRO, E. G. Q. Potencial antineoplásico *in vitro* de extratos proteicos de uma linhagem amazônica de *Ganoderma* frente à linhagem celular de leucemia promielocítica aguda. Iniciação Científica (Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas). Coorientação. Início em 2026.

NUNES, R. R. Proteínas antioxidantes sintetizadas por *Ganoderma* spp. e seu potencial citoprotetor frente ao estresse oxidativo. Iniciação Científica (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – CNPq). Coorientação. Concluída em 2024.