



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE



CULTIVO E PROSPECÇÃO DE LECTINAS E OUTRAS PROTEÍNAS
BIOATIVAS DE *Pleurotus ostreatus* EM DIFERENTES SUBSTRATOS

LORENA VIEIRA BENTOLILA DE AGUIAR

MANAUS-AM

2022

LORENA VIEIRA BENTOLILA DE AGUIAR

**CULTIVO E PROSPECÇÃO DE LECTINAS E OUTRAS PROTEÍNAS
BIOATIVAS DE *Pleurotus ostreatus* EM DIFERENTES SUBSTRATOS**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

Orientadora: Dra. Ceci Sales-Campos

MANAUS – AM

08/2022

A283a Aguiar, Lorena Vieira Bentolila De
Cultivo e prospecção de lectinas e outras proteínas bioativas de
Pleurotus ostreatus em diferentes substratos / Lorena Vieira Bentolila de
Aguiar; orientadora: Ceci Sales-Campos; Manaus: [s. l.], 2022.

3,7 MB

174 p. : il. color.

Tese (Doutorado -Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e
Biotecnologia da Rede BIONORTE) - Coordenação do Programa de Pós-
Graduação, INPA, 2022.

1. Fungicultura. 2. Atividade hemaglutinante. 3. Cogumelo ostra. I.
Campos, Ceci Sales. II.Título

CDD 579.616 32

LORENA VIEIRA BENTOLILA DE AGUIAR

**CULTIVO E PROSPECÇÃO DE LECTINAS E OUTRAS PROTEÍNAS
BIOATIVAS DE *Pleurotus ostreatus* EM DIFERENTES SUBSTRATOS**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, comorequisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em 31/08/2022

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 CECI SALES DA GAMA CAMPOS
Data: 25/11/2022 17:21:48-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Ceci Sales-Campos (Orientadora)
Presidente (INPA)

Documento assinado digitalmente
 JOAO VICENTE BRAGA DE SOUZA
Data: 16/12/2022 08:03:57-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Membro Titular Interno (INPA)

Documento assinado digitalmente
 ANTONIA QUEIROZ LIMA DE SOUZA
Data: 19/12/2022 16:33:40-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza
Membro Titular Interno (UFAM)

Documento assinado digitalmente
 MARCIA QUEIROZ LATORRACA
Data: 02/12/2022 18:06:05-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Márcia Queiroz Latorraca
Membro Titular Externo (UFMT)

Documento assinado digitalmente
 MARLI CAMASSOLA
Data: 02/12/2022 13:15:30-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Marli Camassola
Membro Titular Externo (UCS)

Ao meu amado filho Fernando, fonte imensurável de amor, alegria e força, para quem estive ausente durante incontáveis horas. Você é o reflexo mais perfeito da existência de Deus;

À minha amada mãe Izolina, por ser minha base, meu espelho e minha primeira orientadora na vida;

A minha amada filha Alice (in memoriam) e minha avó (in memoriam), que moram num espaço que vai das estrelas até o meu coração.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM pelo financiamento da pesquisa;

À CAPES pela bolsa de estudos de doutorado concedida;

À Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – REDE BIONORTE, pela oportunidade de realizar este curso de doutorado e pelo suporte prestado pela coordenação e pela secretaria do curso durante todos esses anos;

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, pela infraestrutura utilizada na execução do trabalho;

À Dra. Ceci Sales-Campos, que já foi orientadora e coorientadora na nossa jornada que vêm desde a época da iniciação científica, agradeço por me apresentar aos cogumelos e ao seu cultivo, que tanto aprecio. Agradeço também pelos ensinamentos e apoio acadêmico e pessoal prestados não somente durante o desenvolvimento dessa tese, mas durante todos esses anos de parceria;

À Dra. Larissa Ramos Chevreuil, coorientadora do coração, agradeço por me trazer conhecimentos fundamentais na idealização e concretização desse trabalho. Agradeço também por todo o suporte nas correções desse manuscrito e pelo apoio constante, sem os quais esse trabalho não poderia ter sido realizado;

Ao Dr. Sérgio Dantas de Oliveira Junior que me auxiliou em inúmeras etapas, que foram desde as atividades simples, como ligar o liofilizador no fim de semana, até as atividades mais complexas, como auxiliar na organização e divisão dos dados em artigos. Gratidão, vida;

À mestrandia Larissa Batista, parceira de dezenas de baterias de ensaios de lectina, pelo auxílio nesses e nos ensaios enzimáticos realizados;

Ao doutorando Vitor Alves, companheiro em vários ensaios realizados nos extratos proteicos e auxiliar criterioso na escrita;

À doutoranda Paula Romenya, pela assistência nas análises de FDA, FDN e lignina e por compartilhar o sofrimento dos carbonos comigo;

A todos os meus companheiros do Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis do INPA, já citados (Dra Larissa, Sérgio, Vítor, Larissa, Paula) e ainda não citados (Danielle, Jefte, Aldi, Gio), pelos cafezinhos, docinhos e momentos compartilhados. A eles que sempre tinham uma referência, uma mão para auxiliar em um experimento ou uma palavra de conforto, com uma natureza infinita de contribuições, agradeço pelo apoio espiritual e por outras coisas que não poderia descrever aqui, mas que estão gravadas em mim. Obrigada por contribuírem nesse trabalho e na minha vida;

A todos que literalmente doaram seu sangue para esse projeto. Gratidão.

“E naquele dia, sem nenhuma razão especial, eu decidi fazer uma pequena corrida. Eu corri até o fim da estrada e quando cheguei, pensei em correr até o fim da cidade. Quando cheguei lá, pensei em correr pelo condado de Greenbow. Pensei, já que eu cheguei até aqui, vou correr pelo grande estado do Alabama. E foi o que eu fiz. Corri pelo estado do Alabama inteiro sem nenhuma razão especial... E corri até chegar ao oceano... E quando cheguei lá pensei, já que cheguei até aqui eu vou voltar e continuar correndo. Quando cheguei no outro oceano pensei, já que cheguei até aqui é melhor voltar e continuar correndo...”

– Forrest Gump – O contador de histórias.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1- Ligação das lectinas aos carboidratos presentes nos eritrócitos e visualização da presença e ausência de atividade hemaglutinante.	24
Figura 2- Hemaglutinação e inibição da hemaglutinação por carboidratos..	26
Figura 3- Estruturas de lectinas presentes em macrofungos.	28
Figura 4 - Classes de lectinas baseadas na quantidade e tipo de domínio na sua estrutura.	32

CAPÍTULO 2 - Production of commercial and Amazonian strains of *Pleurotus ostreatus* in plant waste

Figure 1. Yield of native and commercial strains of <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivated in different regional lignocellulosic wastes.....	48
Figure 2. Biological efficiency (BE) of native and commercial strains of <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivated in different regional lignocellulosic wastes.....	49
Figure 3. Loss of organic matter (LOM) of native and commercial strains of <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivated in different regional lignocellulosic wastes.....	50

CAPÍTULO 3 – Influência das características físico-químicas dos resíduos utilizados como substrato no cultivo de *Pleurotus ostreatus*

Figure 1 - Scanning electron microscopy (SEM) of the initial substrates and after cultivation of strains 474 and 542 of <i>Pleurotus ostreatus</i> , with a 200x magnification.....	70
Figure 2 - Diffractograms of the initial substrates (A) and after the cultivation of <i>P. ostreatus</i> 474 (B) and 542 (C).....	72

CAPÍTULO 4 – Cultivo sólido de duas linhagens de *Pleurotus ostreatus* em resíduos lignocelulósicos

Figure 1 Biological efficiency (BE) of strains 474 and 542 of <i>Pleurotus ostreatus</i> grown on substrates based on pineapple crown (PC), açai seeds (AS) and a mixture of pineapple crown + açai seeds (PC + AS).....	86
Figure 2 - Biological efficiency (BE) of strain 542 of <i>Pleurotus ostreatus</i> by production flush, cultivated in substrates based on pineapple crown (PC), açai seeds (AS) and a mixture of pineapple crown + açai seeds (PC + AS).....	87
Figure 3 - Biological efficiency (BE) of strain 474 of <i>Pleurotus ostreatus</i> by production flush, cultivated in substrates based on pineapple crown (PC), açai seeds (AS) and a mixture of pineapple crown + açai seeds (PC + AS).....	88

Figure 4 – Yield of strains 474 and 542 of <i>Pleurotus ostreatus</i> grown on substrates based on pineapple crown (PC), açai seeds (AS) and a mixture of pineapple crown + açai seeds (PC + AS).....	89
Figure 5 – Yield of strain 542 of <i>Pleurotus ostreatus</i> by production flush, cultivated in substrates based on pineapple crown (PC), açai seeds (AS) and a mixture of pineapple crown + açai seeds (PC + AS).....	89
Figure 6 – Yield of strain 474 of <i>Pleurotus ostreatus</i> by production flush, cultivated in substrates based on pineapple crown (PC), açai seeds (AS) and a mixture of pineapple crown + açai seeds (PC + AS).....	90
Figure 7 - Loss of Organic Matter (LOM) of strains 474 and 542 of <i>Pleurotus ostreatus</i> grown on substrates based on pineapple crown (PC), açai seeds (AS) and a mixture of pineapple crown + açai seeds (PC + AS).....	91

CAPÍTULO 5 – Crescimento e desenvolvimento de *Pleurotus ostreatus* em biomassas lignocelulósicas

Figure 1 - Colonization of cultivation substrates by different <i>Pleurotus ostreatus</i> strains (474 and 542) when cultivated in residues of pineapple, açai and mixture of pineapple + açai.....	109
Figure 2 – Primordia formation of the different <i>Pleurotus ostreatus</i> strains (474 and 542), when cultivated in pineapple, açai and mixture of pineapple + açai residues.....	110
Figure 3 – Mature basidiocarps of different <i>Pleurotus ostreatus</i> strains (474 and 542), when cultivated in pineapple, açai and mixture of pineapple + açai residues.....	111
Figure 4 – Total fresh mass (g) of basidiocarps produced by <i>Pleurotus ostreatus</i> strains (474 and 542), when cultivated in pineapple, açai and mixture of pineapple + açai residues.....	112

CAPÍTULO 6 - Prospecção de lectinas produzidas por *Pleurotus ostreatus* cultivado em resíduos lignocelulósicos

Figura 1 - Ensaio de hemaglutinação dos extratos proteicos aquosos e em tampão fosfato do 1467 cultivado em açai, em suspensão de eritrócitos humanos a 2% dos tipos sanguíneos “A”, “AB”, “B” e “O”	125
Figura 2 - Ensaio de hemaglutinação dos extratos proteicos aquosos e em tampão fosfato do 1467 cultivado em marupá, em suspensão de eritrócitos humanos a 2% dos tipos sanguíneos “A”, “AB”, “B” e “O”.....	126
Figura 3 - Perfil eletroforético dos extratos de <i>Pleurotus ostreatus</i> (474, 542, 1467 e 885) em diferentes solventes extratores.....	131

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1- Famílias de lectinas vegetais: características, especificidade de ligação e presença de lectinas fúngicas..... 33

CAPÍTULO 2 - Production of commercial and Amazonian strains of *Pleurotus ostreatus* in plant waste

Table 1. Moisture, ash, carbon (C), nitrogen (N), C:N ratio, proteins and lipids of the initial and post-cultivation (spent) substrates of native (1467 and 474) and commercial (542 and 885) strains of *Pleurotus ostreatus*, cultivated in different local lignocellulosic wastes.....44

Table 2. Total fibers, cellulose, hemicellulose, lignin, total carbs (carbohydrates), available carbs (carbohydrates) and energy values of the initial and final substrates of *Pleurotus ostreatus* native and commercial strains, cultivated in different local lignocellulosic wastes.....47

Table 3. Moisture, ash, carbon (c), nitrogen (n), C:N ratio, proteins and lipids of the basidiocarps of *Pleurotus ostreatus* native and commercial strains, cultivated in different regional lignocellulosic waste.....52

Table 4. Ash, total fibers, proteins, lipids, total carbs (carbohydrates), disponible carbs (carbohydrates) and energy values of the basidiomas of native and commercial strains of *Pleurotus ostreatus* cultivated in different local lignocellulosic wastes.....53

CAPÍTULO 3 – Influência das características físico-químicas dos resíduos utilizados como substrato no cultivo de *Pleurotus ostreatus*

Table 1 - Physicochemical parameters of residues, initial substrates and post-cultivation of two *Pleurotus ostreatus* strains (474 and 542).....64

Table 2 - Centesimal composition of residues, initial and post-cultivation substrates of two *Pleurotus ostreatus* strains (474 and 542).....67

Table 3 - Crystallinity Index (IC) by X-Ray Diffraction (XRD) of the initial substrates and after cultivation of strains 474 and 542 of *P. ostreatus*.....73

CAPÍTULO 4 – Cultivo sólido de duas linhagens de *Pleurotus ostreatus* em resíduos lignocelulósicos

Tabela 1 - Physicochemical characterization of basidiocarps of strains 474 and 542 of *Pleurotus ostreatus*, by production flush, when cultivated in substrates based on pineapple crown (PC), açai seeds (AS) and mixture of pineapple crown and açai seeds (PC + AS).....92

Tabela 2 - Centesimal composition of basidiocarps of strains 474 and 542 of *Pleurotus ostreatus*, by production flush, when cultivated in substrates based on pineapple crown (PC), açai seeds (AS) and mixture of pineapple crown and açai seeds (PC + AS).....95

Tabela 3 – Contents of chemical elements by Energy Dispersion X-ray Spectroscopy (EDS) of basidiocarps of strains 474 and 542 of *Pleurotus ostreatus*, by production flush, when cultivated in substrates based on pineapple crown (PC), açai seeds (AS) and a mixture of pineapple crown and açai seeds (PC + AS).....98

CAPÍTULO 6 - Prospecção de lectinas e outras proteínas produzidas por *Pleurotus ostreatus* cultivado em resíduos lignocelulósicos

Tabela 1 - Teor proteico e unidade/título hemaglutinante dos extratos de 1467, 885, 474 e 542.....124

Tabela 2 - Teor proteico e inibição da AHE do extrato aquoso de *Pleurotus ostreatus* 1467 cultivado em açai e em marupá.....127

Tabela 3 - Teor proteico e unidade/título hemaglutinante dos extratos de 474 e 542 (segundo cultivo).....130

CAPÍTULO 7 - Prospecção de proteínas bioativas em diferentes linhagens de *Pleurotus ostreatus*

Tabela 1 - Atividade proteolítica e de inibidores de tripsina nos extratos proteicos das diferentes linhagens de *Pleurotus ostreatus*.....144

Tabela 2 - Atividade antioxidante dos extratos proteicos das linhagens de *Pleurotus ostreatus*, provenientes do segundo cultivo, mensurada através de diferentes ensaios in vitro.146

Tabela 3 - Quantificação de compostos fenólicos nos extratos proteicos das diferentes linhagens de *Pleurotus ostreatus*.....149

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHE	Atividade Hemaglutinante Específica
BSM	Mucina submaxilar bovina
Fru	Frutose (monossacarídeo)
Fuc	Fucose
Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 4Glc	2'-fucosilactose (2'-FL)
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetilgalactosamina (amino açúcar derivado da galactose)
Glc	Glicose
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
KDa	“kilodalton” – unidade de medida de massa molecular
Lac	Lactose
Man	Manose
Mal	Maltose
Me- α -GalNAc	Metil-alfa-N-Acetilgalactosamina
Melib	Melibiose (dissacarídeo redutor de galactose e glicose)
NeuNAc	Ácido acetilneuramínico (ácido siálico)
GlcNAc	N-acetilglicosamina (derivado de glicosamina)
POL	Lectina de <i>Pleurotus ostreatus</i>
PSM	Mucina submaxilar suína
Raf	Rafinose (trissacarídeo formado de galactose, frutose e glicose)
Rib	Ribose
Sac	Sacarose
SDS-PAGE	Dodecil Sulfato de Sódio - Eletroforese em gel de poliacrilamida
Xil	Xilose

AGUIAR, Lorena Vieira Bentolila de. **Cultivo e prospecção de lectinas e outras proteínas bioativas de *Pleurotus ostreatus* em diferentes substratos**. 2022. 167 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Amazonas, 2022.

RESUMO

Características relacionadas ao cultivo de fungos comestíveis podem influenciar a composição dos cogumelos produzidos, tanto em seus aspectos nutricionais quanto na presença de enzimas e proteínas bioativas como as lectinas, cuja expressão pode variar conforme o substrato e a linhagem utilizada. Para verificar a influencia desses processos, foram cultivadas as linhagens 474, 542, 885 e 1467 de *Pleurotus ostreatus* utilizando como substratos formulações com sementes de açaí, capim-elefante, abacaxi, marupá e serragem de pinus. As modificações nos substratos pré e pós cultivo, a produtividade de cogumelos, a influencia dos substratos e linhagens nas características nutricionais dos cogumelos e atividades biológicas de proteínas foram avaliadas. Para os parâmetros produtivos, as linhagens 542 e 1467, cultivadas em abacaxi e capim-elefante destacaram-se quando à produção de basidiocarpos. Quanto às características nutricionais, foram observadas diferenças nos basidiocarpos (proteínas/fibras) de acordo com a linhagem e o substrato utilizado, com ênfase para os substratos de açaí, abacaxi e pinus. Os cogumelos produzidos foram submetidos a extração proteica em água, solução salina e tampão fosfato (com indícios de lectinas) e os extratos obtidos foram submetidos à detecção de lectinas, proteases e proteínas antioxidantes, bem como de inibidores. Nas atividades proteicas, para atividade hemaglutinante (AHE), somente a linhagem 1467 apresentou AHE no extrato aquoso e em tampão fosfato, provenientes do cultivo em açaí e marupá, sendo observada a inibição da AHE somente nos extratos aquoso e em fosfato de 1467 cultivado em açaí, diante de lactose. Com relação a atividade antioxidante, os extratos aquosos apresentaram o maior potencial por ABTS•+ e o extrato aquoso de 474 em abacaxi para DPPH•, os extratos salinos para quelação e os extratos salinos de 542 no poder redutor. Quanto a atividade proteolítica, os extratos salinos apresentaram a maior atividade, destacando-se 474 em açaí, com maior inibição da tripsina nos extratos aquosos, destacando-se 474 em abacaxi e 542 em açaí e abacaxi. Não foram observadas atividades de inibição de α -amilase, α -glicosidase e lipase. Destaca-se a influência do método de extração, bem como do substrato e da linhagem utilizada, tendo as linhagens de *P. ostreatus* apresentado proteínas diferentes de acordo com a combinação desses fatores, demonstrando que essas variações interferem na qualidade do cogumelo como alimento e fonte de biomoléculas.

Palavras-Chave: Cogumelo ostra; Fungicultura; Atividade hemaglutinante; Extração proteica.

AGUIAR, Lorena Vieira Bentolila de. **Cultivation and prospection of lectins and other bioactive proteins from *Pleurotus ostreatus* in different substrates.** 2022. 167 f. Thesis (PhD in Biotechnology) – National Institute of Amazonian Research, Amazonas, AM-Brazil, 2022.

ABSTRACT

Characteristics related to the cultivation of edible fungi can influence the composition of the mushrooms produced, both their nutritional aspects and the presence of enzymes and bioactive proteins such as lectins, whose expression may vary according to the substrate and strain used. To verify the influence of these processes, strains 474, 542, 885, and 1467 of *Pleurotus ostreatus* were cultivated using substrates formulations with açai seeds, elephant grass, pineapple, marupá, and pine sawdust. Changes in substrates pre and post-cultivation, mushroom productivity, the influence of substrates and strains on the nutritional characteristics of mushrooms, and biological activities of proteins were evaluated. For production parameters, 542 and 1467 strains, cultivated in pineapple and elephant grass, stood out in terms of basidiocarp production. As for the nutritional characteristics, differences were observed in the basidiocarps (proteins/fibers) according to the strain and the substrate used, with emphasis on açai, pineapple, and pine substrates. The mushrooms produced were subjected to protein extraction in water, saline, and phosphate buffer (with signs of lectins), and the extracts obtained were subjected to the detection of lectins, proteases, and antioxidant proteins, as well as inhibitors. In the protein activities, for hemagglutinating activity (AHE), only the 1467 strain showed AHE in the aqueous extract and phosphate buffer, from the cultivation in açai and marupá, being observed the inhibition of AHE only in the aqueous extracts and in phosphate of 1467 cultivated in açai, in front of lactose. Regarding the antioxidant activity, the aqueous extracts showed the greatest potential for ABTS•+ and aqueous extract of 474 in pineapple for DPPH•, the saline extracts for chelation, and the saline extracts of 542 in the reducing power. As for proteolytic activity, the saline extracts showed the highest activity, 474 in açai, with greater inhibition of trypsin in aqueous extracts, with 474 in pineapple and 542 in açai and pineapple. No α -amylase, α -glucosidase, and lipase inhibiting activities were observed. The influence of the extraction method, as well as the substrate and the strain used, is highlighted, with the *P. ostreatus* strains showing different proteins according to the combination of these factors, demonstrating that these variations interfere with the quality of mushroom as food and font of biomolecules.

Keywords: Oyster mushroom; Fungiculture; Hemagglutinating activity; Protein extraction.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
1.1. OBJETIVO GERAL	12
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
2. CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. Fungos e cogumelos	14
2.1.1. Cultivo de cogumelos	14
2.1.2. Resíduos utilizados no cultivo	15
2.1.3. Gênero <i>Pleurotus</i>	15
2.1.3.1. Cultivo de <i>Pleurotus</i>	17
2.2. Proteínas	17
2.2.1 Lectinas	18
2.2.1.1. Breve histórico	18
2.2.1.2. Definição e principais características	20
2.2.1.3. Uso das lectinas	21
2.2.1.4. Extração/obtenção de lectinas e proteínas em geral	23
2.2.1.5. Detecção de lectinas	23
2.2.1.6. Especificidade da lectina	25
2.2.1.7. Lectinas fúngicas: características	26
2.2.1.8. Lectinas do gênero <i>Pleurotus</i>	30
2.2.1.9. Classificação das lectinas	31
2.2.2. Proteases e inibidores de proteases	34
2.2.3. Lipases, amilases e glicosidases	35
2.2.4. Proteínas antioxidantes	36
3. CAPÍTULO 2 - Production of commercial and Amazonian strains of <i>Pleurotus ostreatus</i> in plant waste	37
4. CAPÍTULO 3 – Influência das características físico-químicas dos resíduos utilizados como substrato no cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	58
5. CAPÍTULO 4 – Cultivo sólido de duas linhagens de <i>Pleurotus ostreatus</i> em resíduos lignocelulósicos	82
6. CAPÍTULO 5 – Crescimento e desenvolvimento de <i>Pleurotus ostreatus</i> em biomassas lignocelulósicas	106
7. CAPÍTULO 6 – Prospecção de lectinas produzidas por <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivado em resíduos lignocelulósicos	117
8. CAPÍTULO 7 - Prospecção de proteínas bioativas em diferentes linhagens de <i>Pleurotus ostreatus</i> 138	
CONCLUSÕES	155
REFERÊNCIAS	156

INTRODUÇÃO

Há centenas de anos os fungos comestíveis, também denominados cogumelos, têm sido reconhecidos por algumas culturas por suas propriedades medicinais e valor nutricional, sendo a eles creditadas uma série de benefícios à saúde humana, bem como a promoção da qualidade de vida (HASSAN *et al.*, 2015). Os cogumelos são largamente utilizados na medicina tradicional oriental, com enfoque para o tratamento e/ou prevenção do câncer, doenças virais, hipercolesterolemia, coagulação sanguínea e hipertensão, entre outros (ZHOU *et al.*, 2019).

Segundo Hawksworth e Lücking (2017), até o momento, estima-se a existência de cerca de 2,2 a 3,8 milhões de espécies de fungos. Desse total, 140.000 seriam fungos formadores de basidiomas e ascomas. Kumar, Mishra e Kaur (2019) relatam que, do total de espécies de macrofungos, somente 14.000 são conhecidas e taxonomicamente identificadas. Desse montante conhecido, 2.000 são comestíveis, sendo 80 cultivadas experimentalmente e 20 cultivadas comercialmente. Diante da diversidade de cogumelos existentes, é possível inferir que esses macrofungos ainda são uma fonte pouco explorada de substâncias potencialmente úteis, incluindo as proteínas bioativas (HASSAN *et al.*, 2015) e até mesmo de alimento, visto que poucas das espécies descritas como comestíveis são cultivadas e o conhecimento sobre linhagens locais ainda é escasso.

Durante o cultivo de cogumelos, ocorre um processo de bioconversão onde variados resíduos lignocelulósicos agrícolas, florestais e vegetais atuam como substratos e são degradados pelas enzimas fúngicas (SINGH, 2019), podendo gerar cogumelos com composições diferentes, de acordo com o resíduo utilizado (WANG *et al.*, 2014). Sabe-se que o desenvolvimento e a composição nutricional dos cogumelos dependem da absorção de nutrientes do material orgânico utilizado no cultivo (OLIVEIRA; NAOZUKA, 2019). Por esse motivo, visando um maior teor proteico dos cogumelos, é desejável que os substratos utilizados no cultivo sejam detentores de compostos e elementos como o nitrogênio, que pode fornecer o aporte necessário para a síntese de proteínas e compostos nitrogenados no cogumelo (SALES-CAMPOS, 2008). Pouco se sabe ainda sobre a influência da combinação entre substratos e linhagens fúngicas na obtenção de características nutricionais desejáveis para os cogumelos e de como essa combinação pode influenciar ou facilitar a obtenção de compostos bioativos.

Análises acerca do valor nutricional mostram que os cogumelos (em base seca) apresentam valores de proteína que podem variar de 19 a 35%, sendo esse teor muitas vezes

superior ao encontrado em vegetais. Contudo, essa composição pode variar não somente conforme o substrato utilizado, como também de acordo com a espécie, linhagem, método de cultivo e fatores ambientais (SINGH *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2014). Ainda nesse aspecto, os cogumelos têm sido descritos por produzir uma variedade de proteínas, enzimas e peptídeos com bioatividade ou potencial industrial. Entre estas proteínas estão incluídas lectinas, lacases, proteases, enzimas hidrolíticas e ligninolíticas, entre outras (ZHOU *et al.*, 2019; NG *et al.*, 2016; ERGUN; UREK, 2017).

As lectinas, em particular, compreendem um grupo de proteínas caracterizadas por exibir propriedades moleculares e fisiológicas únicas, incluindo diversidade estrutural e especificidade por carboidratos (ERJAVEC *et al.*, 2012). Essas proteínas têm sido extensivamente isoladas de plantas, animais e bactérias e, mais recentemente, têm sido investigadas em fungos (LIU; NG; WANG, 2013). Dentre as lectinas fúngicas estudadas, 82% são provenientes de cogumelos, 15% de microfungos e 3% de leveduras (VARROT; BASHERR; IMBERTY, 2013). Adicionalmente, essas proteínas exercem importantes funções no ciclo de vida dos fungos e, podem desempenhar várias atividades biológicas que incluem atividade antiproliferativa, antitumoral, imunomodulatória, inibitória da transcriptase reversa do HIV-1 (LIU; NG; WANG, 2013), bactericida, fungicida, inseticida e antiviral (SINGH; WALIA, 2016; ZHOU *et al.*, 2019).

Assim, esse grupo de moléculas tem despertado bastante interesse da comunidade científica visando a descoberta de novos princípios ativos de aplicação fármaco-industrial (LIU; NG; WANG, 2013). Essas proteínas têm sido isoladas em diferentes espécies de cogumelos e apresentam variação quanto à massa molecular, número de subunidades e especificidade por carboidratos. Complementarmente, as lectinas têm sido purificadas a partir de diferentes estruturas desses macrofungos, incluindo píleo, estipe e micélio, sendo o nível de expressão dessas proteínas variáveis quanto à idade do cogumelo, estrutura morfológica e condições de cultivo (HASSAN *et al.*, 2015). Uma problemática importante a ser destacada é que, muitas vezes, lectinas em trabalhos da literatura costumam ser isoladas de cogumelos obtidos na natureza, o que pode levar a uma série de heterogeneidades na sua obtenção, sendo fundamental o conhecimento de todo o processo, da seleção de substratos e linhagens até o cultivo *in vitro*.

Não menos importantes que as lectinas, as enzimas como lipases, alfa amilases e, principalmente, as proteases também são de interesse mundial e sua busca em microrganismos segue em alta, devido à sua importância em uma série de processos industriais. Segundo

Papadaki *et al.* (2020), o mercado global de enzimas em 2017 atingiu um valor de US\$ 7,1 bilhões com estimativa para atingir US\$ 10,5 bilhões em 2024.

De valor farmacêutico, cosmético e alimentício, bem como fundamentais nas indústrias têxtil, de biocombustíveis, couro e detergentes, essas enzimas são produzidas industrialmente, em sua maior parte (58%), a partir de leveduras e fungos, 30% por bactérias, 8% por animais e 4% por plantas (RIGO *et al.*, 2021). Assim, torna-se fundamental a busca por novas fontes enzimáticas, bem como o estudo de suas formas de obtenção, visto que a otimização dos fatores que envolvem o cultivo é essencial para um aumento na produtividade do fungo e, conseqüentemente, na obtenção de proteínas de interesse.

Nesse sentido, a bioprospecção de lectinas e outras proteínas bioativas de valor industrial, produzidas por fungos comestíveis, a partir do cultivo em diferentes resíduos vegetais, torna-se pertinente, uma vez que pouco se conhece acerca do cultivo de cogumelos de ocorrência na Amazônia e suas potencialidades. Adicionalmente, produtos (proteínas bioativas) derivados desses fungos podem apresentar importante aplicação nas áreas da biotecnologia, farmacologia e indústria. Assim, além de ser uma importante ferramenta quanto à busca de biomoléculas naturais, o cultivo de fungos comestíveis em resíduos vegetais também contribui para a redução de impactos ocasionados pela geração de resíduos de outras fontes de exploração, devido à possibilidade de utilização desses materiais como substratos de cultivo de cogumelos, e gera uma fonte alimentar valorosa.

Desta maneira, estudos envolvendo desde o cultivo de cogumelos como atividade econômica até a prospecção inicial e ajustes de protocolos visando a obtenção de lectinas e/ou outras proteínas bioativas são os primeiros passos para uma otimização do processo de produção de cogumelos como fonte alimentar e como fonte de proteínas bioativas, visando uma futura aplicação e desenvolvimento de produtos na região.

1.1.OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da utilização de diferentes substratos lignocelulósicos no cultivo de linhagens de *Pleurotus ostreatus*, na composição centesimal dos basidiocarpos e resíduos pós-cultivo, bem como sua ação na síntese de lectinas e outras proteínas bioativas.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter basidiocarpos provenientes do cultivo sólido de 4 diferentes linhagens (474, 542, 885 e 1467) de *Pleurotus ostreatus* utilizando resíduos vegetais, constatando as diferenças apresentadas por cada linhagem;
- Avaliar métodos de extração proteica para obtenção e maximização do rendimento de lectinas e/ou proteínas desejadas, variando temperatura, tempo e solvente/solução extrator(a);
- Detectar a atividade hemaglutinante – AHE (lectinas) frente a diferentes eritrócitos e caracterizar essa AHE quanto à termoestabilidade e a especificidade a diferentes açúcares;
- Buscar atividades de outras proteínas (proteases, inibidores de proteases α -amilase, α -glicosidase, lipase e antioxidantes) nos extratos proteicos produzidos;
- Averiguar o efeito dos resíduos vegetais de açaí, marupá, pinus, capim-elefante e abacaxi sobre o crescimento/produção das linhagens fúngicas, bem como a influência em suas características nutricionais, verificando as mudanças observadas nesses resíduos;
- Verificar a influência das combinações entre os resíduos vegetais e as linhagens na presença/concentração de lectinas e outras proteínas (proteases, inibidores de proteases α -amilase, α -glicosidase, lipase e antioxidantes).

2. CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fungos e cogumelos

Os fungos são um grupo de seres heterotróficos fundamentais na ciclagem de nutrientes, com organizações celulares que variam de organismos unicelulares aos detentores de filamentos complexos capazes de formar estruturas macroscópicas (NARANJO-ORTIZ E GABALDÓN, 2019). Esses organismos são divididos em grupos definidos por características morfológicas associadas à reprodução, sendo o reino Fungi constituído por oito filos: fungos zoospóricos com os filos Cryptomycota/Microsporidia, Blastocladiomycota e Chytridiomycota; fungos zigomicetos com os filos Zoopagomycota e Mucoromycota e fungos pertencentes ao sub-reino Dikarya, com os filos Ascomycota e Basidiomycota (SPATAFORA *et al.*, 2018).

Esses seres possuem importância comercial, servindo para a produção de antibióticos, pigmentos, ácidos orgânicos e outros produtos oriundos da fermentação. A quantidade de compostos e metabólitos que possuem diversidade é tão significativa quanto a sua diversidade (FERREIRA *et al.*, 2016).

Os cogumelos, estruturas de reprodução presentes em alguns tipos de fungos, são usados para uma variedade de aplicações biotecnológicas, como a produção de alimentos, enzimas, suplementos dietéticos, compostos farmacêuticos e suplementos alimentares. Fungos comestíveis têm sido conhecidos por seus valores nutricionais e podem ser considerados como alimentos funcionais, fornecendo benefícios para a saúde, além dos nutrientes. Contudo, os cogumelos representam uma fonte pouco explorada de produtos farmacêuticos novos e potentes (MADHANRAJ *et al.*, 2019).

2.1.1. Cultivo de cogumelos

O cultivo de cogumelos vem recebendo ainda mais atenção nas últimas décadas, apresentando-se como um agronegócio promissor, (LIU; ZHANG; KUANG, 2018). Além da possibilidade de geração de renda e emprego, em diversas localidades a fungicultura é um meio de subsistência familiar, além da possibilidade de converter resíduos descartados e não comestíveis em um produto comestível (LEKHA e MURALIDHARAN, 2021).

No mundo, mais de 50 espécies de fungos comestíveis são cultivadas, contemplando os gêneros *Agaricus*, *Agrocybe*, *Auricularia*, *Flammulina*, *Ganoderma*, *Hericium*, *Lentinula*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Tremella* e *Volvarellia* (KUMLA *et al.*, 2020). Entretanto, entre todos os

cogumelos, as espécies mais representativas comercialmente são *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* (KUMLA *et al.*, 2020). A produção desses cogumelos depende de uma série de condições adequadas para que seja alcançando o desenvolvimento e a produtividade desejados em seu cultivo em escala comercial (MAHARI *et al.*, 2020).

De uma forma geral, o cultivo de cogumelos é realizado em temperaturas de 20 a 35 °C, em substratos com 65 a 70 % de umidade (MAHARI *et al.*, 2020). Contudo, há uma série de fatores que afetam a produtividade e o crescimento de cogumelos, como a umidade do substrato e do ambiente de cultivo, o tipo de substrato, pH, teor de carbono, teor de nitrogênio, relação C:N e temperatura (MAHARI *et al.*, 2020).

2.1.2. Resíduos utilizados no cultivo

Uma grande quantidade de resíduos é produzida pela agricultura e pelas indústrias, cujo descarte gera uma série de problemas ambientais, se não aproveitados (KUMLA *et al.*, 2020). Esses resíduos, referidos como “materiais lignocelulósicos” são constituídos por celulose, hemicelulose e lignina, podendo ser degradados pelos macrofungos através de suas enzimas lignocelulósicas, podendo fazer parte de um processo de conversão de subprodutos em produtos de valor agregado (KUMLA *et al.*, 2020).

Diversos resíduos agroindustriais podem ser aproveitados como substrato para o cultivo de fungos comestíveis. Resíduos como palha de arroz, palha de trigo, casca de algodão, sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar e serragem são comumente utilizados no cultivo de cogumelos (TESFAY *et al.*, 2020). No entanto, o elevado desempenho de produção de outros substratos, já relatado na literatura, demonstra a possibilidade de utilização de outros resíduos agroindustriais, incluindo resíduos disponíveis localmente, a fim de maximizar rendimentos e diminuir custos (KUMLA *et al.*, 2020; LEKHA e MURALIDHARAN, 2021).

2.1.3. Gênero *Pleurotus*

O nome *Pleurotus* vem do grego “Pleuro”, que tem como significado “formado lateralmente” ou “em posição lateral”, denominação relacionada à posição do estipe em relação ao píleo. Muitas espécies desse gênero são consumidas, cultivadas e comercializadas, porém, as mais representativas são *Pleurotus ostreatus*, *P. eryngii*, *P. citrinopileatus* e *P. djamor* (TÉLLEZ-TÉLLEZ; DIAZ-GODINEZ, 2019).

Não se sabe ao certo a quantidade de espécies de *Pleurotus* existentes. Contudo, há cerca de 800 táxons descritos para o gênero nas bases de dados Index Fungorum e Mycobank. Segundo Corrêa *et al.* (2016), desse total, existe em torno de 200 espécies, excluindo-se os registros que representam uma mesma espécie e os que foram reclassificados em gêneros e espécies diferentes. Entre estas, estão inclusas aquelas com alto valor econômico e nutricional, como *P. ostreatus*.

Pleurotus é um gênero de fungos presentes em todo o mundo, em florestas temperadas e tropicais. Na natureza, se estabelecem e se desenvolvem de forma assexuada e sexuada. (ANJANA; SAVITA, 2017). Esses fungos podem ser utilizados na ciclagem de nutrientes através da degradação que promovem em resíduos agroindustriais e em processos como biorremediação e biodegradação de compostos (ANJANA; SAVITA, 2017), sendo produtores de enzimas hidrolíticas e ligninolíticas importantes como amilase, xilanase, lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, promissoras para diversas aplicações biotecnológicas nas indústrias de celulose e papel, alimentos, têxtil e cosméticos (ERGUN; UREK, 2017).

Pleurotus spp. ganharam atenção considerável devido às suas propriedades nutracêuticas e riqueza em compostos bioativos de alto (polissacarídeos, peptídeos e proteínas) e baixo peso molecular (terpenoides, ácidos, esteroides, ésteres de ácidos graxos e polifenóis), sendo reportado para a espécie *P. ostreatus* cerca de 100 compostos bioativos (NG *et al.*, 2016; GOLAK-SIWULSKA *et al.*, 2018; TESFAY *et al.*, 2020). Essas substâncias bioativas, contidas no micélio e nos cogumelos das espécies de *Pleurotus*, apresentam propriedades imunoestimulantes, antineoplásicas, antidiabéticas, anti-inflamatórias, antibacteriana/antimicrobiana, hipocolesterolêmica, antioxidante, anti-artrítico, anti-carcinogênico/antitumoral, hepatoprotetora, antivirais e vasodilatadora (KUMAR, 2019; MADHANRAJ *et al.*, 2019).

A presença de componentes bioativos, como β -glucanas, ácido ascórbico, lectinas, componentes fenólicos, antioxidantes e complexo de polissacarídeos-proteínas, tornam-os adequados para serem utilizados como ingrediente para o enriquecimento nutricional de alimentos funcionais, podendo ser extraídos e encapsulados de modo a alcançar os benefícios terapêuticos máximos (KUMAR, 2019). Além disso, nutricionalmente, as espécies de *Pleurotus* são ricas fontes de proteínas, fibras alimentares, vitaminas do complexo B, vitamina C e minerais, além de conter proporções mais elevadas de certos aminoácidos, como metionina e cistina, em comparação à outras espécies de cogumelos comestíveis (KUMAR, 2019).

2.1.3.1. Cultivo de *Pleurotus*

Sob o aspecto econômico-alimentar, *Pleurotus* é um dos cinco gêneros que constituem 85% do suprimento comercial de cogumelos, no mundo. *Agaricus* (principalmente *Agaricus bisporus* e, em menor número, *Agaricus blazei*) é o maior gênero, correspondendo a 30% dos cogumelos cultivados no mundo. *Pleurotus* (*P. ostreatus*, *Pleurotus cornucopiae* e *P. eryngii*), corresponde ao segundo maior gênero, com 5 a 6 espécies cultivadas, contribuindo com cerca de 27%, *Lentinula* (*Lentinula edodes*) equivale a 17% e *Auricularia* e *Flammulina* são responsáveis por 6% e 5%, respectivamente (ROYSE; BAARS; TAN, 2017).

No cultivo, *Pleurotus* spp. são fungos de fácil manuseio e menos dispendiosos na produção, em relação a outros cogumelos, permitindo um cultivo mais acessível e em larga escala, crescendo em uma variedade de resíduos lignocelulósicos (ANJANA; SAVITA, 2017; LEKHA E MURALIDHARAN, 2021), em um menor período de tempo (MAHARI *et al.*, 2020). Em comparação às outras espécies de *Pleurotus* spp. também é menos susceptível ao ataque de pragas e tem a capacidade de se desenvolver em uma faixa mais ampla de temperatura (BELLETINI *et al.*, 2019), não requerendo condições ambientais muito controladas (RAMAM *et al.*, 2021).

Por serem fungos saprofitas, crescem com maior facilidade em substratos ricos em lignina e celulose, permitindo seu cultivo em uma série de resíduos como palhas e serragens, tendo a capacidade de utilizar os substratos de forma eficiente, podendo obter altas taxas de eficiência biológica (CARRASCO-CABRERA; BELL; KERTESZ, 2019). Dentro da espécie, diferentes linhagens podem se comportar de formas variadas ao serem cultivadas em substratos com composições diferentes, podendo apresentar uma série de modificações no rendimento e qualidade dos basidiocarpos produzidos, por possuírem metabolismos e características genéticas diferentes (MARTINS *et al.*, 2018).

2.2. Proteínas

A palavra proteína deriva do grego "proteios", que significa primeiro ou primário (WU, 2016), devido ao seu papel como componente fundamental nos seres vivos, sustentando todas as funções celulares (RESTREPO-PERÉZ; JOO; DEKKER, 2018). Estruturalmente, consiste em aminoácidos ligados por ligações peptídicas (WU, 2016), com uma diversidade de estruturas e tamanhos moleculares (NG *et al.*, 2016).

Tanto as proteínas em si quanto os peptídeos têm sido foco de pesquisas visando novos fármacos, devido à crescente resistência de micro-organismos, o que tem levado a uma demanda para o desenvolvimento de medicamentos (NG *et al.*, 2016). Sob o aspecto econômico, proteínas terapêuticas como anticorpos monoclonais (mAbs), hormônios do crescimento, insulina, vacinas, enzimas, citocinas e glicoproteínas tem um mercado estimado de mais de US\$ 165 bilhões (KHOURY *et al.*, 2015). Enzimas industriais, utilizadas em vários segmentos da indústria como alimentício e têxtil, tem um rendimento estimado em 17,5 bilhões até 2024 (RODRIGUES *et al.*, 2017).

Os fungos apresentam uma grande variedade de proteínas com diferentes funções na aquisição de nutrientes e proteção contra organismos ou mesmo na proteção contra condições ambientais desfavoráveis (KIM *et al.*, 2016). Entre todas as proteínas bioativas de cogumelos comestíveis, as lectinas têm sido uma das mais investigadas (ZHOU *et al.*, 2019). Entretanto, há uma série de proteínas e peptídeos presentes nos fungos que apresentam um conjunto de atividades distintas, incluindo atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e anticâncer. Proteases, proteínas inativadoras de ribossomos, defensinas, hemolisinas, lectinas, lacases, ribonucleases e proteínas imunomoduladoras são algumas dessas (NG *et al.*, 2016).

Independentemente do tipo de proteínas, é importante salientar que as condições gerais de uma cultura fúngica tem efeito direto na regulação da expressão proteica do organismo, alterando a composição do transcriptoma e proteoma, sendo que, o tipo de fermentação, semissólida ou submersa, também altera e influencia essa composição (TÉLLEZ-TÉLLEZ; DIAZ-GODINEZ, 2019).

2.2.1 Lectinas

2.2.1.1. Breve histórico

A identificação de proteínas capazes de promover a aglutinação de células ocorreu no final do século XIX, quando entre 1887 e 1888, Stillmark, ao investigar sementes de Euphorbiaceae, testou os efeitos de um extrato proteico parcialmente purificado em sangue, observando que, após a adição da preparação, os eritrócitos ficaram juntos "como em uma coagulação" (KOCOUREK, 1986). Essa lectina, a primeira descrita, foi denominada de ricina, e era originária da mamona (*Ricinus communis*). Testada por Stillmark com outras quatro plantas da família Euphorbiaceae, permitiu a observação inicial de que essa substância reagia de maneira diferente à eritrócitos de animais distintos (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

A palavra "hemaglutinina", utilizada inicialmente para denominar as lectinas, foi introduzido em 1898 por Elfstrand, a fim de nomear as proteínas citotóxicas e hemaglutinante presentes em plantas (KOCOUREK, 1986). O termo "lectina", do latim *Legere* (escolher) foi criado por Boyd e Shapleigh somente em 1954, originalmente para se referir apenas às hemaglutininas de sementes de plantas (GOLDSTEIN; PORETZ, 1986). Contudo, como as lectinas também foram encontradas em outros organismos, optou-se por definir "lectina" como uma proteína de ligação à carboidratos, com origem não imune, capaz de aglutinar células ou precipitar polissacarídeos e glicoconjugados, reconhecendo especificamente e mantendo ligações reversíveis com esses carboidratos, aplicando-se a definição dada por Goldstein *et al.* (1980).

Todavia, essa definição exclui proteínas que apresentam capacidade de ligação a carboidratos de modo semelhante às lectinas, mas que possuem apenas um sítio de ligação ao carboidrato e, portanto, não apresenta capacidade aglutinante, como ocorre com a ricina e as heveínas, lectinas oriundas de *Hevea* sp. (MOREIRA *et al.*, 1991; POVINELI e FINARDI, 2002). Dessa forma, é mais correto conceituar as lectinas como proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico, capaz de se ligar de forma reversível a mono ou oligossacarídeos específicos (SHARON e LIS, 1990; POVINELI e FINARDI, 2002).

Comumente, lectinas podem ser chamadas também de hemaglutininas, devido à sua capacidade de aglutinar eritrócitos. Contudo, essa denominação é simplificada, pois nem todas as hemaglutininas são lectinas. Ou seja, nem todas as hemaglutininas aglutinam eritrócitos e apenas lectinas possuem esta atividade (ROUF *et al.*, 2011; HASSAN *et al.*, 2015).

De uma série de marcos históricos acerca das lectinas, dois merecem destaque e abriram novas perspectivas para essas proteínas na pesquisa biológica, especialmente envolvendo estudos relacionados ao câncer. Nowell observou que uma lectina proveniente de *Phaseolus vulgaris* estimulava a mitose de linfócitos, ao passo que Aub relatou que a lectina do *Triticum vulgaris* aglutinava apenas células malignas, em comparação às células normais, devido às suas diferenças estruturais (KOCOUREK, 1986).

Para os macrofungos, especificamente, somente em 1910 foi demonstrada a presença de hemaglutininas/lectinas, inicialmente, encontrada na espécie *Amanita muscaria* (GUILLOT, KONSKA, 1997). Em fungos comestíveis, a primeira lectina foi descoberta em 1912 na espécie *Boletus edulis* (GUILLOT, KONSKA, 1997).

2.2.1.2. Definição e principais características

Conceitualmente, lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, que possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a monossacarídeos específicos ou oligossacarídeos, podendo aglutinar células e precipitar glicoconjugados, com alto grau de seletividade e especificidade (GOLDSTEIN *et al.*, 1980; ZHOU *et al.*, 2019). Majoritariamente, as lectinas se ligam com maior intensidade a oligossacarídeos do que a monossacarídeos (GRAVEL, 2009).

As lectinas apresentam atividade pró e anti-inflamatória, nociceptiva, vasodilatadora, antiproliferativa/antitumoral, mitogênica/imunoestimulatória, antiviral, antifúngica, antimicrobiana, antidepressiva, neuroprotetora e inseticida (CAVADA *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2019). As atividades das lectinas são atribuídas às suas interações com carboidratos, de ocorrência na fisiologia celular, incluindo processos como adesão celular, desenvolvimento celular embrionário, diferenciação, regulação do crescimento, reconhecimento e interação entre células, sinalização celular, interações patógeno-hospedeiro durante uma infecção, resposta imune do hospedeiro, desenvolvimento de enfermidades, metástase, localização, transporte celular e índice de degradação e rigidez da membrana, eliminação de glicoproteínas, diferenciação e segmentação de proteínas para compartimentos celulares (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2012; HASSAN *et al.*, 2015).

As lectinas isoladas de fontes diferentes variam em relação às suas características físico-químicas como peso molecular, pH, temperatura e especificidade à açúcares, podendo até mesmo depender de certos íons metálicos para expressar atividade (KHAN; KHAN, 2011). Peumans e Van Damme (1998) relatam que as lectinas de plantas, ainda que diferentes estruturalmente, podem se ligar ao mesmo açúcar e, muitas vezes, tem especificidade por carboidratos que não são naturais do tipo de organismo do qual essa lectina teve origem. Essas propriedades também estão presentes nas lectinas fúngicas e lectinas de outras origens.

Um exemplo dessa característica pode ser demonstrado por uma série de lectinas que se ligam à lactose, que são oriundas de organismos nos quais esse carboidrato não está presente naturalmente. Há vários relatos de lectinas fúngicas (YOSHIDA *et al.* 1994; WANG; GAO; NG, 2000), lectinas de plantas (BONDAR; TOLE; PATIL, 2016; COSTA *et al.*, 2018), lectinas de peixes e poríferos (ARAVINDAKSHAN; NAREDDY; KUMAR, 2017; MARQUES *et al.*, 2018) e até mesmo lectinas de insetos (VELAYUTHAM *et al.*, 2017) que se ligam à lactose.

2.2.1.3. Uso das lectinas

O papel das lectinas no organismo no qual tem origem é muito variado. Pelo fato de possuírem sítios ativos específicos para determinados padrões de carboidratos com complexidades distintas, essas proteínas estão envolvidas e desencadeiam uma série de reações celulares que culminam em uma resposta direcionada (GUILLOT; KONSKA, 1997).

Como ferramenta, as lectinas podem auxiliar no estudo dos glicoconjugados da membrana e da parede celular, bem como no papel destes na evolução do crescimento cancerígeno (GUILLOT; KONSKA, 1997). A alteração da glicosilação está associada ao desenvolvimento e à progressão do câncer. Por se interligarem à carboidratos, as lectinas apresentam potenciais valores prognósticos, diagnósticos e terapêuticos para vários tipos de câncer (WU *et al.*, 2017).

As lectinas também podem ser utilizadas na estimulação mitogênica de linfócitos, incentivando sua divisão, bem como em processos de aglutinação e diferenciação de células cancerosas, devido à maior aglutinabilidade das células anormais (SHARON; LIS, 1989). Uma das outras possibilidades mediadas por lectinas antitumorais é a apoptose em diferentes linhagens de células cancerosas (LAM; NG, 2010). Adicionalmente, apresentam possibilidade de utilização na separação de tipos celulares, incluindo células tumorais, não somente através de suas propriedades tóxicas, onde atacam as células cancerígenas, mas também a partir da identificação das diferenças de conformação de carboidratos das superfícies celulares (GUILLOT; KONSKA, 1997).

Devido às suas propriedades e atividades multifacetadas, as lectinas podem ser aplicadas como sondas para investigar as estruturas e funções de superfícies celulares, bem como para a identificação clínica e até mesmo na classificação taxonômica de microrganismos (SLIFKINI; DOYLE, 1990). Na virologia, as lectinas têm sido empregadas para a detecção de glicoproteínas virais em células purificadas e infectadas, para a purificação viral e para a obtenção de informações sobre a estrutura das glicoproteínas virais, fatores que permitem a compreensão da sua patogenicidade e a utilização de métodos diagnósticos únicos, que possibilitam a identificação específica de agentes virais. Tudo isso é possível devido ao seu espectro de especificidades e pesos moleculares, que são ferramentas substanciais para aplicações diagnósticas da microbiologia em geral (SLIFKINI; DOYLE, 1990).

Com atividade antiviral já relatada, destaca-se a inibição da transcriptase reversa do HIV, sendo que diferentes lectinas podem ter mecanismos diferentes de ação anti-HIV, podendo ser

consideradas drogas potenciais no tratamento da AIDS (LAM; NG, 2010). As lectinas também podem ser utilizadas em estratégias “drug delivery”, a fim de aumentar a biodisponibilidade, já que a absorção de uma droga é dependente de sua solubilidade, disponibilidade e difusão passiva. A absorção das drogas é, geralmente, lenta e inadequada, exibindo tempo de permanência relativamente curto no lúmen intestinal, não havendo a absorção completa. Assim, as lectinas, por terem maior resistência e por apresentarem afinidade a oligossacarídeos, têm potencial para serem ferramentas valiosas na nanomedicina (BRUSCHI, 2019).

A participação de lectinas na ativação do sistema imunológico, no recrutamento de neutrófilos, na promoção de efeitos pró-inflamatórios em células, na indução da liberação de citocinas e na proliferação de fibroblastos dão a essas proteínas o potencial para utilização no tratamento de feridas cutâneas (CORIOLANO *et al.*, 2014). Também já foi descrita para as lectinas a atividade antidepressora, sendo um dos estudos relatados o de uma lectina isolada da alga *Solieria filiformis*, que foi testada em ratos, com resultados positivos, sem efeitos psicoestimulantes e ansiolíticos, presentes em algumas substâncias utilizadas para esse fim (ABREU *et al.*, 2018).

Lectinas têm sido relatadas como um dos agentes promissores contra pragas agrícolas, utilizadas com sucesso em uma variedade de culturas, incluindo trigo, arroz e batata, podendo auxiliar no manejo de pragas de forma mais natural, já que outros métodos podem causar efeitos negativos consideráveis ao meio ambiente e/ou ao ser humano. Em sua atividade inseticida, as lectinas aumentam a mortalidade ou atrasam o desenvolvimento de insetos (LAM; NG, 2010). As lectinas presentes em *Solanum integriflorum* foram testadas como inseticida, atividade na qual ocasionaram modificações na membrana mitocondrial de células de insetos (CHEN *et al.*, 2018).

Com relação à sua atividade antifúngica, as lectinas poderiam ser introduzidas em plantas a fim de proteger de um ataque fúngico. As lectinas não inibem diretamente o crescimento do fungo, mas podem ter efeito indireto nos carboidratos da parede celular fúngica (LAM; NG, 2010). Essas atividades antifúngicas já são comprovadas. Um exemplo são as lectinas de *Solanum integrifolium*, com resultados positivos para a atividade antifúngica frente à *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*, causadores de doenças comuns em solanáceas (CHEN *et al.*, 2018). Lectinas extraídas de sementes amazônicas apresentaram atividade antifúngica frente ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, possivelmente por ligação ao DNA dos esporos fúngicos, afetando sua integridade (RAMOS *et al.*, 2018).

Há registros de atividade bactericida contra bactérias gram positivas e gram negativas, para as espécies de macrofungos *Gymnopilus spectabilis* e *Sparassis latifolia* (ZHOU *et al.*, 2019). Além disso, possuem atividade pro e anti inflamatória, nociceptiva, vasodilatadora, antidepressiva e neuroprotetora (CAVADA *et al.*, 2019). As lectinas também são uma excelente opção para impedir a formação de biofilmes, visto que algumas lectinas possuem a capacidade interagir com os constituintes da matriz polimérica do biofilme, responsável por sua resistência, e desestabilizá-la, sem problemas relacionados à resistência de antibióticos ou mesmo à toxicidade provocada pela utilização de uma grande quantidade de medicamento, para tentar erradicar um biofilme formado (FERREIRA *et al.*, 2018).

2.2.1.4. Extração/obtenção de lectinas e proteínas em geral

Desde os primeiros ensaios de hemaglutininas relatados, a maioria das hemaglutininas/lectinas foram extraídas em extratos salinos, mesmo em protocolos de precipitação fracionária (KOCOUREK, 1986), e esse ainda é o método muito utilizado nos trabalhos atuais. Há muitas formas de extração para a obtenção de proteínas, no geral, e lectinas. Segundo Rugider (1993), muitas vezes os extratos são preparados em solução salina sem tamponamento, podendo o pH ser ajustado caso haja necessidade, para garantir a extração total e evitar hemólise.

Também podem ser adicionados íons na extração, pois algumas lectinas precisam de íons metálicos para exercer sua atividade. Entretanto, é preciso utilizar um sal adequado visto que alguns sais podem precipitar esses íons (RUGIDER, 1993).

2.2.1.5. Detecção de lectinas

Desde a descoberta da capacidade de aglutinação de eritrócitos mediada pelas lectinas, a maioria dos investigadores vem detectando a sua presença através da hemaglutinação (GOLDSTEIN; PORETZ, 1986). Há outras formas de detecção da atividade de lectina como ensaio fotométrico, precipitação de polissacarídeos ou glicoproteínas e eletroforese de afinidade (KENNEDY *et al.*, 1995).

O ensaio de atividade hemaglutinante detecta a presença de lectinas em uma determinada amostra através da incubação de proteínas com eritrócitos. Esses eritrócitos podem ser utilizados em seu estado natural ou podem ser tratados enzimaticamente (tripsina e papaína) (NASCIMENTO *et al.*, 2020) e quimicamente (glutaraldeído) (TORRES *et al.*, 2019). Esse

processo leva à exposição dos carboidratos da superfície celular dos eritrócitos, aumentando a sensibilidade das células à lectina (KENNEDY *et al.*, 1995).

É comum a utilização de eritrócitos humanos. Entretanto, células de sangue animal (coelhos, ovelhas, gado etc.) também podem ser usadas (RUGIDER, 1993). A aplicação do ensaio para verificar a atividade hemaglutinante específica é um método semiquantitativo que permite a obtenção de informações sobre a ligação e a especificidade de uma lectina, que, após o contato com o eritrócito, forma um “tapete” em suspensão (SANO; OGAWA, 2014). Quando não ocorre a hemaglutinação, um círculo sedimentado de eritrócitos pode ser visto no final do poço (Figura 1).

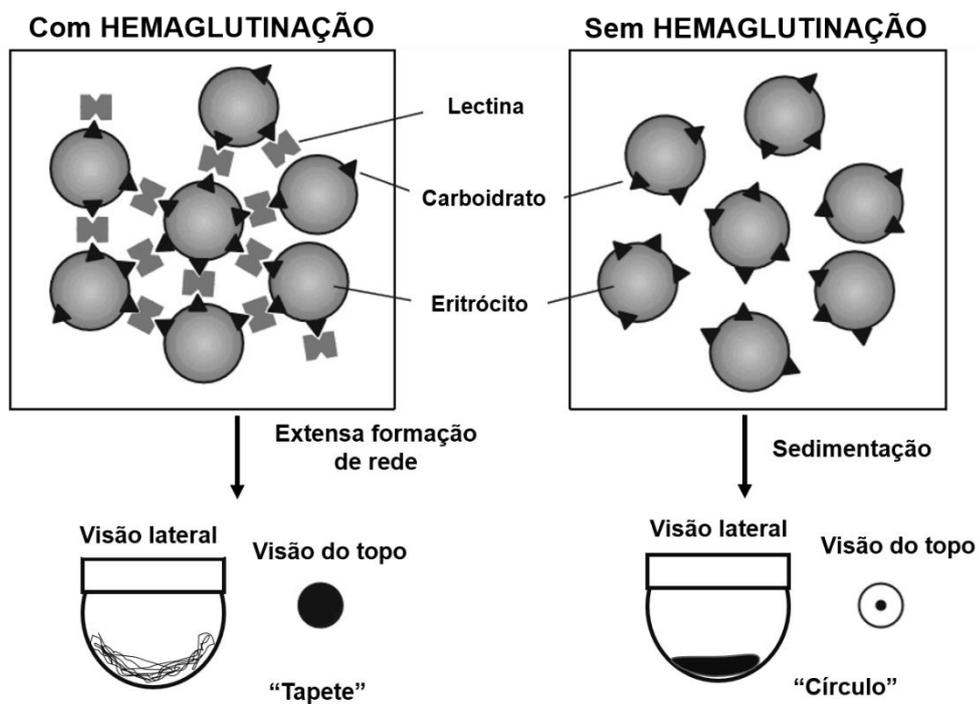


Figura 1- Ligação das lectinas aos carboidratos presentes nos eritrócitos e visualização da presença e ausência de atividade hemaglutinante. Adaptado de Sano e Ogawa, 2014.

A sensibilidade dos eritrócitos de diferentes espécies ou grupos sanguíneos humanos em relação à hemaglutinação de uma lectina pode diferir consideravelmente (RUGIDER, 1993), sendo que algumas lectinas podem demonstrar preferência na aglutinação das células sanguíneas de um ou vários tipos sanguíneos, sejam animais ou humanos (GOLDSTEIN; PORETZ, 1986).

A lectina reconhece um ou mais carboidratos presentes na superfície celular do eritrócito, geralmente distinguindo as células, porém, muitas vezes se ligam a um tipo específico de carboidrato. As cadeias de açúcar na superfície celular variam de acordo com o tipo celular e a espécie da qual a célula é oriunda (SANO; OGAWA, 2014) e, muitas vezes, eritrócitos de coelho são mais sensíveis que os humanos, mas isso não é uma regra em todos os casos (RUGIDER, 1993).

A superfície dos eritrócitos humanos é recoberta por carboidratos, glicolipídios e glicoproteínas, estando presentes galactose, N-acetilglucosamina, ácido siálico e N-acetilgalactosamina. Nessa superfície eritrócitaria, estão os determinantes dos grupos sanguíneos do sistema ABO, os antígenos, que caracterizam os grupos sanguíneos humanos (VIITALA; JÄRNEFELT, 1985).

Algumas lectinas não reagem com os eritrócitos nativos, a menos que sejam tratados com proteases (tripsina ou papaína), melhorando a sua capacidade de aglutinação (RUGIDER, 1993). Essas enzimas clivam proteínas presentes na superfície dos eritrócitos, deixando os carboidratos mais expostos e permitindo que as lectinas tenham maior acesso a esses, aumentando os títulos de hemaglutinação (PEREIRA JÚNIOR, 2014) ou mesmo permitindo que essa hemaglutinação ocorra.

Demonstrando o efeito da ligação de lectinas com eritrócitos de origens distintas, Banerjee *et al.* (1982) examinaram a atividade hemaglutinante de sete espécies de cogumelos (*Volvariella volvacea*, *Termitomyces clypeatus*, *Panafolus papillionaceus*, *Gymnopilus chrysimyces*, *Lentinus squarrosulus*, *Coprinus lagopus* e *Coprinus atramentarius*), onde seis das sete espécies testadas apresentaram maior atividade hemaglutinante diante de eritrócitos de ovinos, enquanto *C. atramentarius* apresentou maior atividade ao ser testado frente a eritrócitos de ratos.

2.2.1.6. Especificidade da lectina

Para confirmar a presença da lectina e verificar sua especificidade por carboidratos, após a detecção da atividade hemaglutinante, a lectina deve ser testada frente a vários carboidratos, para averiguar se ocorre a inibição da atividade hemaglutinante específica (AHE) (SLIFKINI; DOYLE, 1990). A especificidade das lectinas é, geralmente, definida com base em testes de inibição da AHE, em que vários mono ou dissacarídeos são testados com relação à sua capacidade em inibir a hemaglutinação de eritrócitos, podendo a ligação de muitas lectinas ser

efetivamente inibida com mais de um carboidrato (SLIFKINI; DOYLE, 1990). Nesse ensaio, ao ter seu(s) sítios de ligação conectado(s) a um ou mais carboidratos ligantes, a lectina não consegue se ligar aos eritrócitos testados e tem sua atividade de hemaglutinação inibida, confirmando sua natureza de lectina (SANO; OGAWA, 2014) (Figura 2).

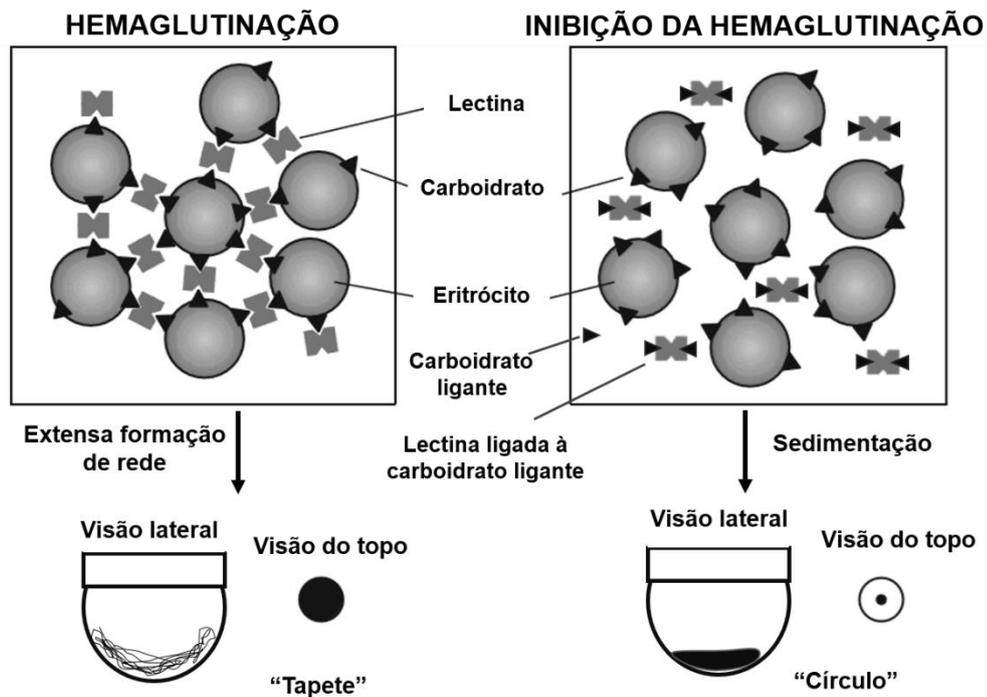


Figura 2- Hemaglutinação e inibição da hemaglutinação por carboidratos. Adaptado de Sano e Ogawa, 2014.

Outros compostos como taninos, alguns lipídios e íons podem aglutinar células (RUGIDER, 1993). Somados a estes, a presença de inibidores, glicoproteínas com ácido siálico e aminas heterocíclicas podem levar a um resultado falso, bem como a inacessibilidade e a baixa quantidade de receptores para os carboidratos (TOMS, 1981, *apud* CHEVREUIL *et al.*, 2009). Por esse motivo, é importante descobrir se algum mono ou oligossacarídeo é capaz de inibir a aglutinação, para confirmar a presença da lectina. Entretanto, é importante destacar que algumas lectinas não reconhecem açúcares simples, interagindo somente com estruturas complexas (RUGIDER, 1993), fator que pode dificultar a detecção da lectina pelo teste de inibição de aglutinação.

2.2.1.7. Lectinas fúngicas: características

Entre todas as fontes de lectinas, as plantas têm sido mais extensivamente estudadas. Entretanto, recentemente, as lectinas fúngicas têm atraído atenção especial, devido às suas atividades biológicas (HASSAN *et al.*, 2015). Em fungos inferiores, lectinas já foram detectadas no caldo de cultura de algumas espécies, incluindo *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium* sp. e *Penicillium chrysogenum*. Também há relatos de lectinas nos esporos fúngicos (KOBAYASHI; KAWAGISHI, 2014).

Os macrofungos são fontes de novas lectinas com especificidade única e potencial para aplicações biomédicas e biotecnológicas. Mais de 60 lectinas de cogumelos já foram identificadas e apresentaram atividades antitumoral, mitogênica e imunoestimulatória (ZHOU *et al.*, 2019). Entre as várias lectinas relatadas na literatura, as lectinas de cogumelos comestíveis ainda são pouco conhecidas, especialmente em relação à sua caracterização estrutural e funcional (SINGH *et al.*, 2015). Adicionalmente, considerando que apenas 10% das espécies de cogumelos são conhecidas, esses organismos representam uma enorme fonte inexplorada de lectinas, potencialmente úteis e novas (HASSAN *et al.*, 2015).

O uso potencial dessas lectinas, entretanto, exigirá a produção em larga escala da proteína pura. Atualmente, a maioria das lectinas de macrofungos relatadas são isoladas de cogumelos recolhidos na natureza, fato que leva não somente a rendimentos baixos, como torna o processo demorado, além de conduzir a uma série de variações não desejadas (HASSAN *et al.*, 2015). Nesse aspecto, o cultivo do fungo no substrato e nas condições onde ele expressa a lectina, é fundamental. Para tal, a seleção de substratos, o cultivo e tratamentos pós-colheita devem ser mais estudados e padronizados, visando reduzir a heterogeneidade do fungo produzido.

Considerando que o estudo das lectinas vegetais, animais e bacterianas têm sido ativos e multifacetados, poucos trabalhos têm sido feitos com lectinas de fungos superiores. Uma análise da literatura disponível mostra que estudos de lectinas oriundas de basidiomicetos foram feitos, principalmente, no isolamento de lectinas de cogumelos e, pouquíssimos trabalhos abordaram as lectinas de basidiomicetos oriundas do estágio de micélio, que é o principal estágio de crescimento do fungo como um organismo biológico, sendo escassos os trabalhos que investigam lectinas de basidiomicetos relacionadas ao ciclo de vida dos fungos (NIKITINA; LOSHCHININA; VETCHINKINA, 2017).

As lectinas de cogumelos já relatadas na literatura variam em peso molecular e número de subunidades (SINGH *et al.*, 2015), sendo comumente independentes de ativação por íons

metálicos (KHAN; KHAN, 2011). Geralmente, essas lectinas compreendem duas a quatro subunidades idênticas ou não idênticas, mantidas juntas por interações não covalentes (HASSAN *et al.*, 2015). Algumas dessas lectinas são monoméricas, enquanto outras são diméricas, triméricas ou até mesmo tetraméricas (WANG; NG; OOI, 1998) (Figura 3), sendo a maior parte diméricas (SINGH *et al.*, 2015). Seu peso molecular varia de 12 a 190 kDa (WANG; NG; OOI, 1998), sendo que a maioria das lectinas isoladas tem peso molecular mais baixo, variando de 12 a 68 kDa, segundo Singh *et al.* (2015), e de 15 a 90 kDa, segundo Khan e Khan (2011).

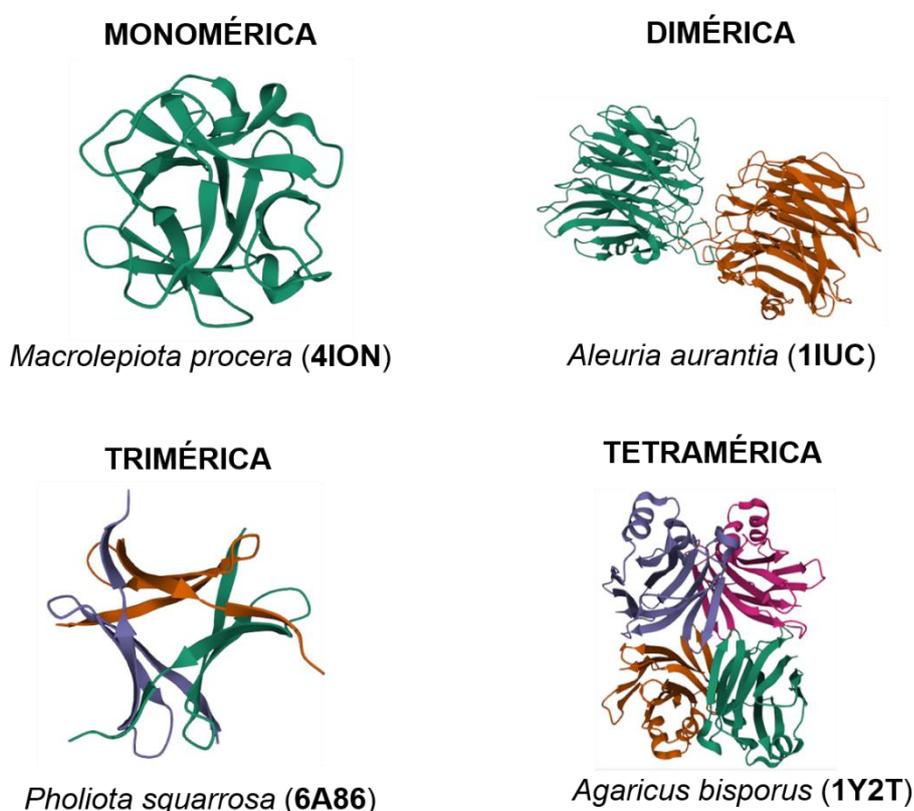


Figura 3- Estruturas de lectinas presentes em macrofungos. Códigos em parenteses correspondem ao registro no PDB – Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>)

As lectinas podem ser obtidas de diferentes estruturas do cogumelo (píleo, estipe e micélio), sendo descrito que sua expressão pode variar de acordo com a espécie, linhagem, idade, fase de crescimento e estrutura morfológica do fungo, bem como método de cultivo e meio de crescimento utilizado (HASSAN *et al.*, 2015; NIKITINA; LOSHCHININA; VETCHINKINA, 2017). Na maioria dos casos, as lectinas de macrofungos foram isoladas dos

basidiomas e caracterizadas. Em algumas das espécies já estudadas, foram observadas diferenças no conteúdo de lectinas ao comparar píleo e estipe de cogumelos, sendo, geralmente, mais rico em lectinas o píleo (GUILLOT; KONSKA, 1997). Adicionalmente, também é possível encontrar lectinas nas hifas miceliais e no próprio meio de cultura (GUILLOT; KONSKA, 1997).

Quanto ao micélio, especificamente, fungos dos gêneros *Armillaria*, *Agrocybe*, *Cerrena*, *Coprinus*, *Fomes*, *Funalia*, *Ganoderma*, *Grifola*, *Gymnopilus*, *Kuehneromyces*, *Lactarius*, *Lentinus*, *Laetiporus*, *Panaeolus*, *Pholiota*, *Pleurotus*, *Punctularia*, *Pycnoporus*, *Schizophyllum*, *Termitomyces*, *Trametes*, *Tricholoma* e *Volvariella* já foram identificados como sintetizadores de lectinas miceliais (NIKITINA; LOSHCHININA; VETCHINKINA, 2017). O estágio de crescimento e desenvolvimento morfológico tem substancial influência sobre a presença de lectinas, sendo possível que lectinas presentes no micélio fúngico sejam idênticas às obtidas no basidioma/ascoma ou que ambas sejam completamente diferentes em relação às suas propriedades e funções (NIKITINA; LOSHCHININA; VETCHINKINA, 2017). Ao passo que, algumas lectinas são encontradas no cogumelo, mas não no micélio vegetativo (NIKITINA; LOSHCHININA; VETCHINKINA, 2017).

Verificando a presença de lectinas em *Lentinula edodes*, Vetchinkina *et al.* (2008) observaram que em diferentes estágios do ciclo de vida do fungo (micélio, filme micelial, primórdio e cogumelo), as lectinas diferiram em relação a sua massa molecular, composição da subunidade, atividade e especificidade. Todos os estágios de ciclo de vida do fungo apresentaram atividade hemaglutinante, porém essa atividade aumentou de acordo com a pigmentação do micélio e atingiu seu pico na fase marrom do filme micelial, sendo maior em relação aos primórdios e cogumelos.

Outra característica importante das lectinas, além das diferenciações estruturais e locais de origem, é a sua especificidade à carboidratos (SINGH *et al.*, 2015). Segundo Wang, Ng e Ooi (1998), galactose (Gal), lactose (Lac) e N-acetilgalactosamina (GalNAc) são açúcares bastante comuns de ligação das lectinas de cogumelos, muito embora haja registro de vários outros açúcares, como fucose (Fuc), rafinose (Raf) e ácido acetilneuramínico (NeuNAc). Adicionalmente, é importante salientar que algumas das lectinas de cogumelos comestíveis têm, muitas vezes, sua especificidade mais relacionada a carboidratos complexos ao invés de açúcares simples (SINGH *et al.*, 2015).

Muitas vezes as lectinas de cogumelos têm a sua aglutinação inibida por mais de um tipo de açúcar/derivado de açúcar e até mesmo por glicoproteínas, sendo que, muitas vezes, entre os vários carboidratos que podem inibir uma mesma lectina, um deles se apresenta como o inibidor mais potente (SINGH *et al.*, 2015). Para exemplificar a ligação com mais de um açúcar e até mesmo glicoproteínas, podem ser citadas algumas lectinas, já relatadas na literatura, *Cyclocybe cylindracea* (lactose e inulina), *Boletus edulis* (melibiose e xilose), *Ganoderma capense* (D-(+)-galactose e D-(+)-galactosamina), *Ganoderma lucidum* (lectina micelial - glicoproteína asialomucina e fetuina; lectina do cogumelo- glucosamina, galactosamina e glicoproteínas asialoBSM e fetuina) e *Lentinula edodes* (N-acetilgalactosamina e N-acetilglucosamina) (SINGH *et al.* 2015).

2.2.1.8. Lectinas do gênero *Pleurotus*

Há alguns registros de lectinas do gênero *Pleurotus* na literatura. Entretanto, ainda são poucas as informações disponíveis. Oguri, Ando e Nagata (1996) analisaram a presença de lectinas em duas linhagens de *Pleurotus citrinopileatus* (KC-1 e KC-2), em quatro estágios de desenvolvimento dos fungos: estágio 0 (micélio cultivado em meio líquido), estágio I (micélio cultivado em meio sólido em 5, 10, 16 e 23 dias), estágio II (primórdios ou cogumelos imaturos) e estágio III (cogumelos maduros). Nenhuma atividade hemaglutinante foi encontrada nos extratos miceliais do estágio 0, porém foi observada hemaglutinação no micélio cultivado em meio sólido (estágio I), em ambas as linhagens, a partir de 16 dias de crescimento micelial. A atividade nos estágios II e III aumentou para a linhagem KC-1 e diminuiu para a KC-2, sendo que a KC-2 não produziu lectina no cogumelo maduro.

Yoshida *et al.* (1994) encontraram para *Pleurotus cornucopiae* cultivado em substrato à base de serragem e farelo de arroz, três isolectinas com tamanhos entre 15 e 16 kDa, sem inibição da atividade hemaglutinante por Fuc (fucose), Rib (ribose), Xil (xilose), Fru (frutose), Gal (galactose), Glc (glicose), Man (manose), O-galactosamina, O-glucosamina, GalNAc, GlcNAc, Lac (lactose), Mal (maltose), Melib (melibiose), Sac (sacarose), N-acetilgalactosamina e Raf (rafinose). As atividades foram inibidas pelas glicoproteínas BSM e PSM, bem como por fetuina, sendo mais fortemente inibidas pelo PSM.

Li *et al.* (2008) isolaram uma lectina dimérica de *P. citrinopileatus*. Essa lectina apresentou especificidade para Mal (maltose), O-nitrofenil- β -d-galactopiranosídeo, O / *p*-nitrofenil- β -d-glucuronídeo e insulina. Além disso, apresentou atividade antissarcoma e

mitogênica em esplenócitos de ratos e de inibição da transcriptase reversa do HIV-1. Kawagishi *et al* (2000) obtiveram uma lectina da espécie de *P. ostreatus* com inibição mais forte por Me- α -GalNAc e Fuca1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 4Glc, sendo o Fuca1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 4Glc o inibidor mais potente, sendo cinco vezes superior, comparada à Me- α -GalNAc. Wang, Gao e Ng (2000) encontraram em *P. ostreatus* uma lectina dimérica com subunidades de 40 e 41 kDa e testaram a atividade hemaglutinante frente a eritrócitos de coelhos, sendo a inibição da atividade testada com 21 carboidratos diferentes. Os autores observaram a inibição diante de D-Melib, Lac (lactose), D-Gal (galactose), α -metil-D-galactopiranosídeo, NeuNAc, Raf (rafinose) e inulina, sendo o D-Melib o carboidrato que inibiu a atividade de forma mais robusta.

Davitashvili *et al.* (2010) obtiveram, de *P. ostreatus* cultivado em palha de trigo e efluente de destilaria, diferentes resultados conforme o desenvolvimento fúngico. Os primórdios apresentaram atividade hemaglutinante baixa. Entretanto, os cogumelos maduros e o micélio vegetativo exibiram alta atividade. Frações de proteínas, com atividade de lectina e massa molecular variando 3,5 a 105 kDa foram obtidas dos cogumelos maduros e frações de proteínas de 1,5 a 125 kDa do micélio. Os carboidratos GlcNAc, GalNAc e galactose inibiram mais fortemente a atividade hemaglutinante do cogumelo. As lectinas miceliais exibiram especificidade maior à manose.

2.2.1.9. Classificação das lectinas

Lectinas podem ser classificadas a partir da especificidade do carboidrato inibidor mais eficaz, por sua própria estrutura molecular (GRAVEL, 2009) e propriedades bioquímicas e físico-químicas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Da mesma forma, a nomenclatura das lectinas pode vir do nome científico das espécies onde foram encontradas, como a lectina da *Vicia faba*, denominada de favina), pela identificação do sacarídeo pelo qual têm afinidade e até mesmo pelo protocolo utilizado na purificação (como a concanavalina A, lectina obtida da *Canavalia ensiformis*). Preferencialmente, a nomeação das lectinas deve ter como padrão a utilização do nome científico da espécie de origem (KENNEDY *et al.*, 1995).

De acordo com o número de domínios de ligação à carboidratos e na ausência ou presença de domínio que exerça atividade biológica, as lectinas podem ser classificadas em: merolectinas, que apresentam apenas um domínio de ligação a carboidratos; hololectinas, que têm mais de um domínio de ligação a carboidratos e são capazes de realizar aglutinação e precipitação; quimerolectinas, que têm um domínio que atua independentemente da lectina e

um ou mais domínios de ligação a carboidratos e, superlectinas, que possuem 2 ou mais domínios ligantes a carboidratos, domínios esses com especificidade para açúcares estruturalmente e funcionalmente diferentes (PEUMANS E VAN DAMME, 1995).

Não somente as lectinas vegetais, mas também fungos e outros microrganismos tem representantes em cada uma dessas classes de lectinas. Apenas nas superlectinas não há registros de representantes fúngicos nos bancos de dados, sendo conhecidas poucas superlectinas no geral (Figura 4).

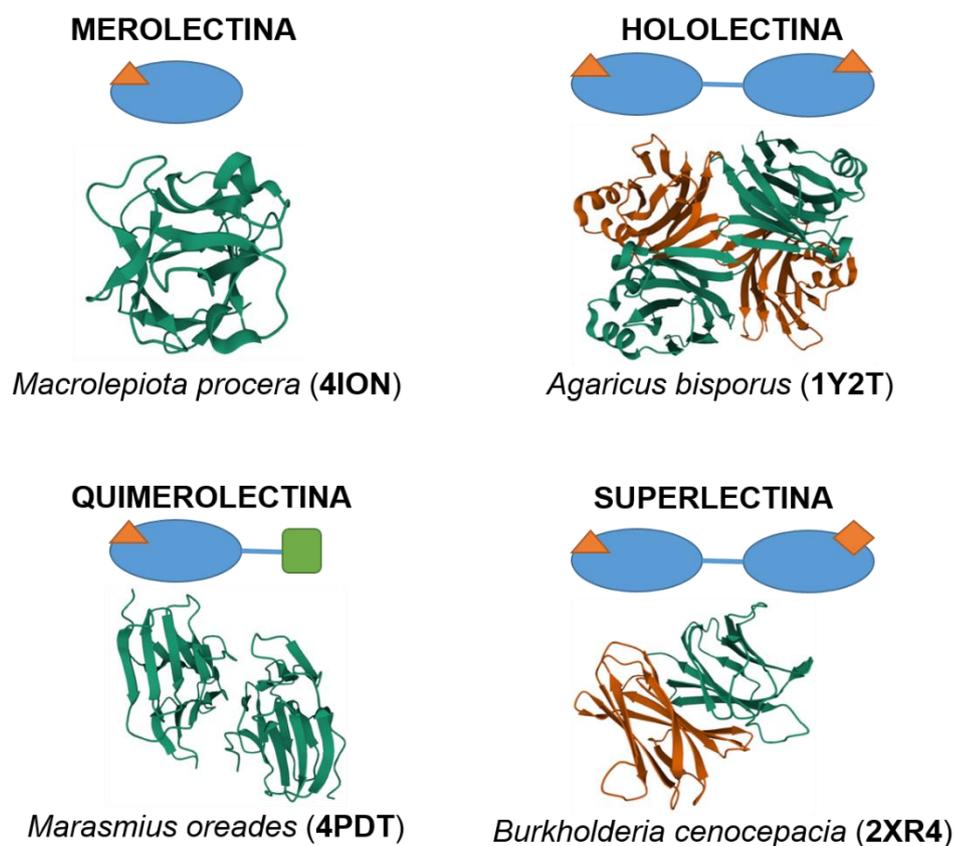


Figura 4 - Classes de lectinas baseadas na quantidade e tipo de domínio na sua estrutura. Merolectina, hololectina e quimerolectina representadas na figura são provenientes de fungos. A superlectina foi isolada uma bactéria. Códigos em parênteses correspondem ao registro no PDB – Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>)

Com base em sua ligação a carboidratos, as lectinas podem ser categorizadas em lectinas de galactose/N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), manose/glicose, fucose, e específicas do ácido siálico (HASHIM; JAYAPALAN; LEE, 2017). Outra classificação pode ser feita a partir das similaridades entre as proteínas, originando 12 famílias de lectinas, incluindo a família das aglutininas de *Agaricus bisporus* (ABA), primeira

classificação organizada a partir de uma lectina fúngica. Algumas das lectinas fúngicas nessas famílias são homólogas à várias lectinas encontradas em plantas (Tabela 1) (VAN DAMME; LANNO; PEUMANS, 2008). Adicionalmente, as famílias das lectinas podem ser classificadas também com base na estrutura de seu domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) ou pela dobra / característica estrutural. Nesse contexto, há, no mínimo, 7 grupos de lectinas, correspondendo à calnexina, tipo L (β -sanduíche β), tipo P (rico em estruturas β), tipo C (estrutura α / β mista), galectinas (β -sanduíche), Tipo I e tipo R/ricina (β -trevo) (ISMAYA; TJANDRAWINATA; RACHMAWATI, 2020).

Tabela 1- Famílias de lectinas vegetais: características, especificidade de ligação e presença de lectinas fúngicas

Famílias	Características	Especificidade	Representantes fúngicos
<i>Agaricus bisporus</i> (ABA)	Fúngicas. Homólogos em Ascomycota e Basidiomycota	GlcNAc, GalNAc	Sim
<i>Euonymus europaeus</i> (EEA)	Inclui similares a lectina de <i>Euonymus europaeus</i>	N-glicanas, Carboidratos com manose	Não
<i>Galanthus nivalis</i> (GNA)	Antiga família de lectinas ligantes de manose	Man, Oligomanosídeos, ácido siálico	Sim
<i>Nicotiana tabacum</i> (Nictaba)	Lectinas do floema de Cucurbitaceae. Lectinas similares à da <i>Nicotiana tabacum</i>	N-glicanas, Man	Não
Aglutininas relacionadas à quitinase (CRA)	Capacidade de se ligar à quitina	N-glicanas, Carboidratos com resíduos de Manose	Não
Amarantina	Presentes em espécies de <i>Amaranthus</i>	Gal β (1,3), GalNAc	Não
Cianovirinas	Lectina antiviral de uma cianobactéria, com lectinas homólogas	Carboidratos com resíduos de Manose	Sim
Heveínas	Lectinas com domínio heveína. Também tem especificidade à quitina	(GlcNAc) _n , N-glicanas	Sim

Jacalinas (JRL)	Similares à jacalina, lectina galactose específica da jaca	Man, Gal, GalNAc, Gal β (1,3)	Sim
Leguminosas	Propriedades físico-químicas semelhantes e fisiológicas diferentes	Glicanas, Man, GalNAc, Gal, GlcNAc, Fuc, glicoproteínas	Sim
Lisinas (LysM)	Encontrada em todos os eucariotos	Quitina, Peptideoglicanas	Sim
Ricina – B	Proteínas inativadoras de ribossomos	Gal, GalNAc ou glicanas sialiladas	Sim

Segundo Kobayashi e Kawagishi (2014), a classificação específica para lectinas fúngicas é feita baseada na sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional, assim como as lectinas de plantas e animais. Entretanto, a classificação de lectinas de fungos ainda não é muito clara e várias lectinas fúngicas são classificadas nas mesmas famílias que as lectinas animais e vegetais, como a da jacalina (Tabela 1). Contudo, algumas lectinas fúngicas não possuem nenhuma semelhança com as lectinas de animais e plantas, fazendo parte de outras famílias como a das lectinas específicas de fucose e a das lectinas específicas de ácido siálico.

2.2.2. Proteases e inibidores de proteases

Outras classes de proteínas presentes nos fungos incluem proteases e inibidores de proteases. Proteases (EC 3.4), peptídeo-hidrolases ou peptidases, são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de ligações peptídicas (ANTÃO; MALCATA, 2005). Essas proteínas, presentes em todos os organismos vivos, apresentam uma diversidade de estruturas e mecanismos de ação na hidrólise de peptídeos e são classificadas com base em sua ação catalítica ou natureza do seu sítio catalítico (KIDRIC *et al.*, 2014).

As proteases seguem como o grupo de enzimas de maior interesse industrial, correspondendo a pelo menos 60% do mercado mundial de enzima (RAMAKRISHNA; RAJASEKHAR; REDDY, 2010). Essas enzimas são fundamentais na síntese de uma série de proteínas, regulando sua constituição, reações de hidrólise e sua eliminação, com ação específica, capaz de quebrar certas sequências de aminoácidos em condições específicas (SCHALLER, 2004).

Os inibidores de proteases, por sua vez, são proteínas capazes de reduzir a velocidade da reação catalisada pelas proteases, levando à inibição reversível e/ou irreversível da atividade

dessas enzimas, ao competir pelo sítio ativo da enzima alvo (SABOTIC; KOS, 2012). Estas proteínas são fundamentais na regulação da atividade proteolítica e tem ação diretamente relacionada à protease a qual inibem (SABOTIC; KOS, 2012), sendo classificadas de acordo com o seu mecanismo de ação, estrutura, origem e até mesmo pela classe de proteases que são capazes de inibir e de acordo com a região do substrato sobre a qual atuam (DUNAEVSKY *et al.*, 2014).

2.2.3. Lipases, amilases e glicosidases

As lipases (triacilglicerol acilidrolases, EC 3.1.1.3) são biocatalisadores fundamentais nas indústrias alimentícias, de detergente, têxtil, farmacêutica, cosmética e de energia (RIGO *et al.*, 2021). Essenciais em processos industriais, são o terceiro maior e mais valioso grupo de enzimas, atrás apenas das proteases e carboidrases (PHUKON *et al.*, 2020; RIGO *et al.*, 2021), como as amilases. Essas enzimas estão presentes em plantas, animais e microrganismos, variando suas características conforme sua origem e, sua produção a partir de fungos pode sofrer modificações de acordo com a linhagem utilizada e a composição do meio de crescimento fúngico (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019).

A lipase é essencial na digestão de gorduras dos alimentos no lúmen intestinal. Assim, secretada pelo pâncreas, é responsável por catalisar a hidrólise de triglicerídeos (TAG) em ácidos graxos livres, monoglicerídeos e diglicerídeos (MUKHERJEE, 2003), sendo a inibição dessa enzima capaz de reduzir a absorção dos TAG (SOSNOWSKA *et al.*, 2015).

As amilases também possuem um potencial comercial e aplicação industrial e biotecnológicas significativas, representando cerca de 25% do mercado enzimático (KUMAR, SAHAI, BISARIA, 2012). Adicionalmente, há registros da presença de amilases em diversos basidiomicetos como *Hericium erinaceum* (DU; WANG, NG, 2013), *Ganoderma lucidum* (SOEKA; ILYAS, 2021), *Pleurotus ostreatus* (ERGUN; UREK, 2017) e outras espécies do gênero.

Segundo Ercan e El (2016), α -amilases (EC 3.2.1.1) e α -glicosidases (EC 3.2.1.20) são fundamentais na hidrólise de carboidratos complexos. A α -amilase é responsável por hidrolisar polissacarídeos em oligossacarídeos, enquanto a α -glicosidase continua o processo, catalisando monossacarídeos (TRINH; STAERK; JÄGER, 2016), sendo interessante a busca de inibidores dessas enzimas, com o objetivo de reduzir a absorção de glicose, podendo ser utilizados no tratamento de obesidade e diabetes (XU *et al.*, 2018; HAMEED *et al.*, 2019).

2.2.4. Proteínas antioxidantes

Com a finalidade de combater os radicais livres e reduzir o estresse oxidativo, as moléculas antioxidantes têm a capacidade de diminuir os danos causados pelos radicais livres às biomoléculas (RAO *et al.*, 2011; STONE; BASIT; MOHIUDDIN, 2019). Dentre os diferentes tipos de antioxidantes como algumas vitaminas, carotenoides, aminoácidos, peptídeos, coenzimas, flavonoides, fenóis e polifenóis, também se encontram proteínas com capacidade antioxidante (AKLAKUR, 2018; LORENZO *et al.*, 2018).

As proteínas antioxidantes podem agir neutralizando e removendo os radicais livres, sendo de grande interesse farmacológico (BUTT; RASOOL; KHAN, 2019), podendo ser encontradas nos cogumelos (XU *et al.*, 2011). Estima-se que a indústria de fármacos de origem peptídica e proteica represente 10% do mercado farmacêutico, visualizando-se um aumento crescente em relação à indústria de moléculas de menor peso molecular (BRUNO; MILLER; LIM, 2013).

3. CAPÍTULO 2 - Production of commercial and Amazonian strains of *Pleurotus ostreatus* in plant waste

(Publicado - <https://doi.org/10.34117/bjdv8n6-299>)

Production of commercial and Amazonian strains of *Pleurotus ostreatus* in plant waste
Produção de linhagens comerciais e amazônicas de *Pleurotus ostreatus* em resíduos de plantas

Lorena Vieira Bentolila de Aguiar

Doctoral student

Post-Graduate Program in Biodiversity and Biotechnology – BIONORTE, University of the State of Amazonas (UEA), Manaus, Amazonas 69065-001, Brazil
lorenabentolila01@gmail.com

Paula Romenya dos Santos Gouvêa

Doctoral student

Post-Graduate Program in Biotechnology, Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas 69067-005, Brazil
paulagouvea.bio@gmail.com

Sérgio Dantas de Oliveira Júnior

Institutional Training Scholarship

Edible Mushroom Cultivation Laboratory, National Institute for Amazonian Research (INPA), Manaus, Amazonas 69067-375, Brazil
sergiodantas100@hotmail.com

Ceci Sales-Campos

Researcher

Edible Mushroom Cultivation Laboratory, National Institute for Amazonian Research (INPA), Manaus, Amazonas 69067-375, Brazil
ceci@inpa.gov.br

Larissa Ramos Chevreuil

Technique

Edible Mushroom Cultivation Laboratory, National Institute for Amazonian Research (INPA), Manaus, Amazonas 69067-375, Brazil
larissachevreuil@gmail.com

ABSTRACT

Pleurotus spp. have the ability to grow on a wide variety of lignocellulosic materials, which opens up a range of options to be explored. The use of locally available residues and native strains can reduce production costs, thus making fungiculture a potential economic activity in developing regions, such as northern Brazil. The aim of this research was to compare the production and nutritional characteristics of different strains of *P. ostreatus*, cultivated on lignocellulosic residues available in Amazonas state, Brazil. The native (474 and 1467) and commercial (542 and 885) strains were cultivated in marupá (*Simarouba amara*) and pine (*Pinus* sp.) sawdust, açai (*Euterpe oleracea*) seeds and elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) straw. Productivity was evaluated according to biological efficiency, yield and loss of organic matter. Some physicochemical and nutritional parameters were also evaluated. In general, among the residues evaluated for mushroom cultivation, the elephant grass substrates (EG) showed better physicochemical properties in terms of moisture, ash content (minerals), hemicellulose and lignin. Additionally, the EG-based substrate resulted in the best productive parameters (yield and EB) for all strains studied, with emphasis on strain 1467, which is native to the Amazon. The basidiocarps of the native strains (474 and 1467) presented a nutritional composition that is similar to the commercial strains (885 and 542), and the mushrooms grown in EG-based residue, in general, presented the best nutritional compositions. Thus, strain 1467 of *Pleurotus ostreatus*, native to the Amazon, shows promise for commercial purposes, when cultivated in elephant grass residue.

Keywords: edible mushrooms, bioconversion, biological efficiency, solid fermentation, alternative substrates, basidiomycetes.

RESUMO

Pleurotus spp. têm capacidade de crescer em uma grande variedade de materiais lignocelulósicos, abrindo um leque de opções para serem explorados. A utilização de resíduos disponíveis localmente e de linhagens nativas podem reduzir os custos de produção, colocando a fungicultura como uma atividade econômica em regiões em desenvolvimento. O objetivo desta pesquisa foi comparar a produção e características nutricionais de diferentes linhagens de *P. ostreatus*, cultivadas em resíduos lignocelulósicos disponíveis localmente. As linhagens nativas (474 e 1467) e comerciais (542 e 885) foram cultivadas em serragem de marupá (MS) e pinus (PS), sementes de açai (AS) e palha de capim-elefante (EG). A produtividade foi avaliada a partir da eficiência biológica (EB), rendimento e perda de matéria orgânica (PMO). Alguns parâmetros físico-químicos e nutricionais também foram avaliados. Em geral, dentre os resíduos avaliados para o cultivo de cogumelos, os substratos à base de EG apresentou melhores propriedades físico-químicas quanto à umidade, conteúdo de cinzas (minerais), hemicelulose, lignina. Adicionalmente, o substrato EG resultou nos melhores parâmetros produtivos (rendimento e EB), para todas as linhagens estudadas, com ênfase para 1467, nativa da Amazônia. Os basidiomas das linhagens nativas (474 e 1467) apresentaram composição nutricional semelhantes às linhagens comerciais (885 e 542), sendo os cogumelos cultivados em resíduo de EG, em geral, os que apresentaram as melhores composições nutricionais. Desta maneira, a linhagem 1467 de *Pleurotus ostreatus*, nativa da Amazônia, mostra-se promissora para fins comerciais, quando cultivada em resíduo de capim-elefante.

Palavras-chave: cogumelos comestíveis, bioconversão, eficiência biológica, fermentação sólida, substratos alternativos, basidiomicetos.

1 Introduction

The Amazon has a vast biodiversity of living organisms, including fungi (Pereira *et al.*, 2017). In nature, fungi play a fundamental role in nutrient cycling, mainly in the degradation of lignin and cellulose from plant substrates (Soares *et al.*, 2014). Among these fungi, *Pleurotus* is one of the genera of macrofungi that occur in the Amazon Rainforest; however, little is known about the diversity and potential of native strains, which have several different genotypes and are adapted to local growth conditions, thus allowing cultivation at different times of the year (Yamashita and Hirose, 2016; Melanouri *et al.*, 2022).

The genus *Pleurotus* is the second most cultivated mushroom in the world due to its adaptability in nature or in artificial development since it presents low demands on the cultivation substrate, and is able to be produced in different temperature conditions and in the most varied lignocellulosic materials (Melanouri *et al.*, 2022).

The main residues used in mushroom cultivation are wheat and rice straw, cotton husk, corn cob, rice and wheat bran (Jeznabadi *et al.*, 2016). However, other alternative substrates have also been applied in order to maximize mushroom production. Additionally, using locally available waste products not only reduces mushroom production costs, but also helps in the recycling of locally discarded vegetable waste, thus reducing their environmental impacts and making this a sustainable practice (Sadh *et al.*, 2018).

Among some of the residues available in the state of Amazonas, Brazil, which come from agro-industrial and wood processing and have potential for use as a substrate in mushroom cultivation, elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.), pine (*Pinus* sp.), marupá (*Simarouba amara*) and açai (*Euterpe* sp.) can be cited. Elephant grass is an important forage plant for animal feed, is capable of growing in tropical and subtropical regions, and is characterized by having a high content of dry matter, carbohydrates, fiber and proteins, with high mass production per area (Haldar and Purkait, 2020; Monção *et al.*, 2020).

The pine, despite not being a native species of the Amazon, is processed by local industries in the manufacture of pallets, boxes and doors. It is an essential wood species for several areas of the timber industry and is widely planted or used throughout Brazil (Lima *et al.*, 2016). Marupá is a woody species native to the Amazon that can be an alternative option for the wood industries, for example, for the manufacture of furniture, and the interest has grown in this species and, consequently, its use (Souza *et al.*, 2020). Açai is a traditional palm from the northern region of Brazil, much appreciated for the pulp of its fruit, which provides

several food products; however, it presents many losses during the processing of this pulp, with about 93% of the fruit correspond to the seed, which is discarded and generates a high volume of waste (Maranho and Paiva, 2012; Lima *et al.*, 2021).

As such, determining suitable substrates, added to the use of adapted fungal strains with high performance, can lead to a profitable cultivation (Melanouri *et al.*, 2022). Thus, this study aimed to cultivate different strains of *Pleurotus ostreatus*, both native to the Amazon and commercial strains, in different regional residues, and evaluate production parameters in order to enable greater use of Amazonian species, mainly for commercial purposes, as well as verify the nutritional quality of these mushrooms.

2 Material and methods

2.1 Biological material

The native (codes 474 and 1467) and commercial (codes 542 and 885) strains of *Pleurotus ostreatus* were acquired from the Collection of Microorganisms of Agrosilvicultural Interest, at the National Institute for Amazonian Research (INPA). Marupá (*Simarouba amara*) sawdust – MS, pine sawdust (mixture of *Pinus elliottii* and *P. taeda*) – PS, açai (*Euterpe precatoria*) seeds – AS and elephant grass (*Pennisetum purpureum*) straw – EG were obtained from agro-industries and wood industries in the city of Manaus (3° 06' 06" S, 60° 01' 29" W), state of Amazonas, Brazil. The residues were dried in the open air, milled and then stored until use in the cultivation of the mushrooms.

2.2 Cultivation of mushrooms

P. ostreatus strains in PDA medium (potato dextrose agar) were used as a pre-inoculum in the production of spawns, which was prepared using residues supplemented with rice, wheat and corn bran (75:20:5), humidified and adjusted to pH 6.0 by adding CaCO₃, and then incubated at 25 °C. Mushroom cultivation was carried out in polypropylene bags and using the respective spawns as inoculum. The bags were incubated at 25 °C, 90% air humidity and under a 12-hour photoperiod. The basidiocarps produced were collected, lyophilized and ground.

2.3 Physicochemical and nutritional parameters

The moisture content was obtained by drying the samples at 105 °C, and the ash content by the calcination of the samples at 550 °C for 4 h (IAL, 2008). Carbon (Walkley-Black method)

was determined by mixing the samples in a $K_2Cr_2O_7$ and H_2SO_4 solution, with subsequent heating at 60 °C for 10 minutes, followed by the addition of an indicator and H_3PO_4 , and then titrated with ammoniacal ferrous sulfate solution (Tedesco *et al.*, 1995).

In the nitrogen analysis (Kjeldahl's method), the samples were digested in H_2SO_4 at 350 °C, distilled in NaOH, collected in an H_3BO_3 solution containing indicators, and titrated with HCl solution (Tedesco *et al.*, 1995). The protein content was obtained by multiplying the N value by the conversion factor 4.38 for mushrooms and 6.25 for substrates (Furlani and Godoy, 2005). The lipids were quantified using extraction in a chloroform, methanol, water and Na_2SO_4 solution. Afterwards, the samples were filtered, dried until the evaporation of the chloroform and then weighed (IAL, 2008).

For the quantification of fiber, the samples were digested in a neutral detergent solution and dried at 105 °C. Subsequently, the samples were digested in an acid detergent solution and dried at 105 °C (Van Soest, 1963). Then, the samples were submitted to lignin determination, with incubation in $KMnO_4$ for 2 h, followed by incubation in demineralizing solution for 30 min. After this step, the materials were dried at 105 °C and calcined at 550 °C (Van Soest and Wine, 1968). The total fiber value was obtained from the sum of all fiber classes obtained. Available carbohydrates were obtained by subtracting the moisture, protein, lipid, ash and fiber contents. While the total carbohydrates (TC) were determined from the subtraction of the moisture, protein, lipids and ash contents. Energy values (kcal/100g) were calculated using the Atwater conversion factor (Nepa, 2011).

2.4 Production parameters

Biological efficiency (BE) was calculated from the ratio between the fresh mass of the basidiocarps and the dry mass of the initial substrates. The yield, based on the ratio between the fresh mass of the basidiocarps and the fresh mass of the substrates after cultivation and the loss of organic matter (LOM), was calculated by the difference between the initial and residual dry mass (spent) of the substrates divided by the initial dry mass of the substrates (Sales-Campos and Andrade, 2011).

2.5 Statistical analysis

The experiment was arranged in a completely randomized design, in a 4x4 factorial scheme, corresponding to 4 fungal strains (474, 542, 885 and 1467) of *P. ostreatus* and 4

residues (marupá, pine, açai and elephant grass), with 11 repetitions. Physicochemical and nutritional analyses were performed in three replications. All data were submitted to ANOVA and compared using Tukey's test ($p < 0.05$) using the Sisvar 5.6 program (Ferreira, 2019).

3 Results and discussion

3.1 Physicochemical parameters of substrates

The physicochemical parameters were determined in the initial and post-cultivation (spent) substrates of the native and commercial strains of *P. ostreatus*. The moisture, a factor of fundamental importance in mushroom cultivation, was higher in the elephant grass (EG) substrate (74.70%), and remained around 70% for most other substrates, except for the substrate composed of açai (AS) residue, which presented a moisture content of 52.44% (Table 1). This value is within the range described by Chang and Miles (2004), in which the moisture levels of mushroom growing substrates should vary from 50 to 75% so that they can help in the development of the basidiocarps but not affect the oxygen supply and, consequently, not cause mushroom mortality. However, the 60-65% moisture range is considered the most desirable in solid mushroom cultivation (Mahari *et al.*, 2020).

For Gaitán-Hernández *et al.* (2017), under indoor cultivation conditions, the moisture content of the substrate should vary between 70 and 80% in order to promote the absorption of nutrients by the fungal hyphae and facilitate the occurrence of metabolic reactions involved in the formation and development of hyphae, which comprises the phase of colonization of the substrate and, later, the formation of basidiocarps.

In the post-cultivation substrates (spent), there was no pattern in the percentage of moisture. In general, the pine sawdust (PS) showed a reduction in moisture content, while the AS substrate showed an increase in the percentage of moisture, after the cultivation of all strains (Table 1).

The ash content demonstrates the mineral contribution of the material, and corresponds to the fixed mineral residue that is obtained after the decomposition of all organic components (Sales-Campos *et al.*, 2011). In this study, the EG substrate had the highest ash content, both in the initial (8.18%) and in the spent substrate, with emphasis on strain 1467, which was cultivated in EG (19.36%) (Table 1). Additionally, an increase in the percentages of ash was observed in all spent substrates when compared to the initial substrates (Table 1). The increase in ash content in spent substrates may be related to the bioconversion process that occurs during

growth. With the constant use of organic matter, which is consumed during cultivation, inorganic elements become more evident, increasing the ash content (Singh, 2000).

As for the carbon content, the initial substrates of marupá sawdust (MS) and pine sawdust (PS) presented the highest percentages, while the highest nitrogen content was obtained in the initial substrate of AS, and the C:N ratio was higher in the initial MS substrate (Table 1). Carbon is one of the fundamental elements for the growth of basidiocarps, and is used in the synthesis of macromolecules and as a source of energy (Anike *et al.*, 2016). In this sense, the AS substrate, which presented the lowest carbon content among all the evaluated substrates, possibly provided the lowest energy, which may be one of the factors responsible for its low production.

In the spent substrates, there was a reduction in the levels of carbon for most substrates, compared to the values present in the initial substrates (Table 1). This gradual reduction in the carbon content of the substrates after mushroom cultivation occurs due to the accumulation of carbon in the process of basidiocarp formation itself (formation of structures and cellular composition), in addition to the loss that occurs during the process of cellular respiration. (Chanakya *et al.*, 2015).

Analyzing the C% between the strains, the highest levels were observed in the spent of the cultures of 474 strain in the substrates EG and MS (Table 1). For strain 542, MS obtained the most significant content (Table 1). The same occurred for 885, with 47.52% for the MS substrate, while the substrates MS and PS exhibited the highest carbon values after the cultivation of strain 1467 (Table 1). Thus, the spent marupá sawdust (MS) substrate stands out, since it obtained the highest carbon contents, regardless of the *P. ostreatus* strain evaluated.

Table 1. Moisture, ash, carbon (C), nitrogen (N), C:N ratio, proteins and lipids of the initial and post-cultivation (spent) substrates of native (1467 and 474) and commercial (542 and 885) strains of *Pleurotus ostreatus*, cultivated in different local lignocellulosic wastes. AS: açai seeds; EG: elephant grass; MS: marupá sawdust; PS: pine sawdust.

		Moisture (%)	Ashes (%)	C (%)	N (%)	C/N	Proteins (%)	Lipids (%)
Initial substrate	AS	52.44 d ± 0.62	5.69 b ± 0.53	44.12 c ± 0.92	1.44 a ± 0.02	30.61 d ± 1.06	9.01 a ± 0.13	2.17 c ± 0.33
	EG	74.70 a ± 0.21	8.18 a ± 0.24	46.95 b ± 1.09	1.03 b ± 0.02	45.55 c ± 0.40	6.44 b ± 0.11	3.61 b ± 0.13
	MS	72.51 b ± 0.24	3.68 c ± 0.38	53.60 a ± 1.31	0.51 d ± 0.01	104.74 a ± 3.25	3.20 d ± 0.04	1.05 d ± 0.28
	PS	71.43 c ± 0.17	3.34 c ± 0.13	53.05 a ± 0.52	0.64 c ± 0.02	83.36 b ± 2.41	3.98 c ± 0.16	5.91 a ± 0.27
474	AS	72.20 Aabcde ± 5.92	8.38 Bde ± 0.58	41.04 Cef ± 1.53	2.17 Aa ± 0.04	18.94 Dg ± 1.07	13.55 Aa ± 0.26	0.81 Be ± 0.38
	EG	74.85 Aabcd ± 3.58	13.14 Ab ± 0.12	47.05 Aab ± 0.62	1.71 Bb ± 0.03	27.54 Cf ± 0.47	10.67 Bc ± 0.21	1.19 Bde ± 0.03
	MS	72.98 Aabcde ± 1.72	6.75 Cgh ± 0.06	46.24 Aabc ± 0.00	0.97 Ce ± 0.03	47.90 Bde ± 1.32	6.03 Cg ± 0.17	0.83 Be ± 0.13
	PS	56.24 Bf ± 2.81	6.33 Ch ± 0.06	43.65 Bcde ± 1.49	0.75 Df ± 0.05	58.27 Abc ± 6.26	4.71 Dh ± 0.33	3.33 Ab ± 0.14
Spent substrate	AS	78.53 Aab ± 3.55	7.45 Bfg ± 0.06	44.45 Abbcd ± 0.66	1.56 Ac ± 0.01	28.43 Cf ± 0.35	9.77 Ad ± 0.03	0.92 Be ± 0.21
	EG	74.03 Aabcd ± 5.32	19.36 Aa ± 0.26	42.58 Bdef ± 0.68	0.70 Bfg ± 0.03	60.14 Bb ± 1.45	7.41 Bf ± 0.00	1.42 Bcde ± 0.35
	MS	79.55 Aa ± 4.24	5.44 Dj ± 0.32	44.62 ABabcd ± 0.36	0.69 Bfg ± 0.02	65.00 Bb ± 2.98	4.30 Chi ± 0.16	1.03 Bde ± 0.28
	PS	34.95 Bg ± 4.44	6.19 Chi ± 0.24	46.47 Aabc ± 0.60	0.57 Cgh ± 0.03	81.83 Aa ± 3.59	4.39 Chi ± 0.02	3.64 Aab ± 0.24
885	AS	73.05 Aabcde ± 3.43	6.46 Bh ± 0.24	41.16 Cef ± 1.13	1.55 Ac ± 0.09	26.55 Cfg ± 1.16	9.70 Ad ± 0.54	0.93 Ce ± 0.06
	EG	68.03 ABcde ± 11.34	12.19 Ac ± 0.45	44.27 Bbcd ± 1.51	1.56 Ac ± 0.05	28.45 Cf ± 1.07	9.73 Ad ± 0.29	1.73 Bcd ± 0.36
	MS	65.90 Bde ± 10.78	5.50 Cij ± 0.08	47.52 Aa ± 1.45	0.92 Be ± 0.05	51.74 Acd ± 3.09	5.75 Bi ± 0.31	1.08 Cde ± 0.08
	PS	42.33 Cg ± 3.47	6.52 Bh ± 0.14	41.91 Cdef ± 0.98	0.98 Be ± 0.01	42.49 Be ± 1.43	6.17 Bg ± 0.10	3.87 Aab ± 0.14
542	AS	76.35 Aabc ± 10.44	8.87 Bd ± 0.15	34.20 Cg ± 0.03	1.84 Ab ± 0.09	18.58 Cg ± 0.93	11.53 Ab ± 0.58	1.26 Cde ± 0.06
	EG	64.37 Bef ± 8.62	18.65 Aa ± 0.22	39.63 Bf ± 0.29	1.40 Bd ± 0.02	28.43 Bf ± 0.66	8.71 Be ± 0.14	2.00 Bc ± 0.17
	MS	70.07 ABbcde ± 3.73	6.21 Dhi ± 0.07	46.38 Aabc ± 1.42	0.62 Cfgh ± 0.02	75.35 Aa ± 5.35	3.85 Di ± 0.15	1.03 Ce ± 0.09
	PS	40.82 Cg ± 3.70	8.04 Cef ± 0.10	40.90 Bef ± 0.86	0.54 Ch ± 0.00	75.30 Aa ± 1.12	4.63 Chi ± 0.02	4.27 Aa ± 0.41

Means ± standard deviation followed by uppercase letters compare post-cultivation substrates within each strain and lowercase letters compare all substrates and strains, separated into initial and post-cultivation substrates of mushrooms.

As for nitrogen content, there was an increase in N% in the spent substrates, except for strain 542 in PS (Table 1). The increase in the concentrations of N in substrates after mushroom cultivation is commonly reported, and is a fact that can be explained by different hypotheses, such as the excretion of hydrolytic enzymes in the culture medium during fungal metabolism, the presence of fungal mycelium in the final substrate or even by the possibility that some species of macrofungi fix atmospheric nitrogen when associated with diazotrophic organisms, as already reported for several species of *Pleurotus* (Jayasinghearachchi and Seneviratne, 2004; Andrade *et al.*, 2013).

In the C and N values obtained, there was a narrowing of the C:N ratio in all spent substrates, with the highest C:N ratio obtained for strain 542 in MS and PS (Table 1). Investigations into the C:N ratio are important, since it plays an important role in mushroom growth, and physicochemical properties (size, porosity and gas exchange) influence mycelial colonization rate and substrate bioconversion in the mushroom (Cueva *et al.*, 2017).

In nature, *Pleurotus* species grow on wood, which normally presents a C:N ratio ranging from 350-500:1. However, to achieve the desired productivity in a cultivation, this ratio must be more equal, with a ratio of 19:1 to 22:1 up to a maximum of 70-80:1 (Chang and Miles, 2004; Mahari *et al.*, 2020), which are values that are close to those found for the AS and EG initial substrates.

The nitrogen present in the substrates is essential for protein synthesis in the basidiocarps; however, this nitrogen-protein-mushroom ratio is close and levels ranging from 0.65 to 1.30% stimulate protein synthesis, while values between 1.75 and 2.20% inhibit fungal colonization in the substrate (Cueva *et al.*, 2017). The AS substrates (initial and spent) and the basidiocarps produced on this substrate showed the highest content of N and proteins, thus corroborating the influence of nitrogen on protein synthesis. Furthermore, nitrogen is used not only in protein synthesis, but also in cellular activities (Anike *et al.*, 2016).

As observed for ash, the protein content increased in spent substrates, with the AS substrate showing the highest percentages, both in the initial substrate and after mushroom cultivation (Table 1). On the other hand, lipid levels decreased in spent substrates when compared to initial substrate concentrations, with PS substrates showing the highest concentrations (Table 1). These higher levels of lipids found in the PS substrate may be related to the presence of greases, resins and essential oils (Vogelmann *et al.*, 2015).

Regarding the fibrous constitution of the materials, the MS initial substrate had the highest cellulose content (Table 2), while AS and EG showed the highest values of hemicellulose, with 30.85 and 32.39%, respectively (Table 2). Whereas, the lignin content was prominent in the MS and PS substrates (Table 2).

Lignin is an unwanted resistant material, as it has an inhibitory effect on microorganisms, and acts as a physical barrier to cellulose degradation (Shin *et al.*, 2019). Corroborating this, the EG substrate, which corresponds to the substrate with the lowest lignin content, showed the highest productivity rate for all strains tested. Thus, high concentrations of lignin in the substrate can be a limiting factor in the productive yield of mushrooms. On the other hand, hemicellulose is more easily degraded compared to cellulose, since it is more easily available to the fungus (Annepu *et al.*, 2019).

There is some conjecture about the relationship between the contents of cellulose, hemicellulose, lignin and mushroom production. Öztürk and Atila (2021) observed a correlation between cellulose degradation, yield and biological efficiency. In fact, strains 1467 and 542 cultivated in EG, with higher BE (102.93% and 86.18%, respectively), showed a significant reduction in cellulose content when compared to the other residues.

In regards to yield, this same cellulose reduction ratio is observed in strain 1467 EG, strain 542 EG and strain 1467 AS, but not in strain 474 PS and strain 474 EG. Characteristics, such as the accessibility of these fibrous components in the substrate and the enzymatic contribution present in the cultivated fungus, may be some of the factors responsible for a greater EB in certain substrates and when using certain strains.

As for total fibers, the initial and spent substrates based on MS and PS had the highest levels (Table 2), with the high fiber content being characteristic of wood residues (Aguiar *et al.*, 2021). The type of wood, its metabolites and the availability of its fibrous constituents, such as cellulose, are essential for successful cultivation (Alfianti *et al.*, 2021). Thus, it is not enough for the material to be rich in nutrients, they must also be available for use.

Table 2. Total fibers, cellulose, hemicellulose, lignin, total carbs (carbohydrates), available carbs (carbohydrates) and energy values of the initial and final substrates of *Pleurotus ostreatus* native and commercial strains, cultivated in different local lignocellulosic wastes. AS: açai seeds; EG: elephant grass; MS: marupá sawdust; PS: pine sawdust; ASM: mushroom from açai seeds; EGM: mushroom from elephant grass; MSM: mushroom from marupá sawdust; PSM: mushroom from pine sawdust.

		Total fibers (%)	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)	Total carbs (%)	Disponibile carbs (%)	Energy (kcal 100 g ⁻¹)	
Initial substrate	AS	36.77 bc ± 1.17	38.63c ± 1.23	30.85 a ± 3.99	6.41b ± 0.12	78.78 c ± 0.73	42.01 a ± 1.63	223.68 a ± 7.53	
	EG	35.63 c ± 0.33	37.43c ± 0.35	32.39a ± 0.40	4.90c ± 0.73	78.03 c ± 0.43	42.40 a ± 0.14	227.86 a ± 1.21	
	MS	53.12 a ± 3.45	55.62a ± 3.61	23.13b ± 3.88	10.81a ± 0.33	87.56 a ± 0.25	35.45 b ± 3.58	160.04 b ± 6.60	
	PS	41.05 b ± 0.19	44.03b ± 0.20	23.04b ± 0.48	10.00a ± 0.22	81.53 b ± 0.46	40.48 a ± 0.48	231.01 a ± 1.01	
Spent substrate	474	AS	35.69 Dfg ± 0.27	38.91 Cfg ± 0.30	21.86 Aa ± 0.89	4.54 BCgh ± 0.24	68.95 Bf ± 0.39	33.8 Aghi ± 0.63	194.61 Adef ± 5.05
		EG	38.09 Cef ± 0.46	40.81 Cef ± 0.49	14.97 Bef ± 0.48	3.08 Ch ± 0.06	68.35 Bf ± 0.40	30.25 Bi ± 0.72	174.42 Bgh ± 2.31
		MS	48.16 Ab ± 0.52	51.40 Aa ± 0.23	13.06 Cgh ± 0.17	6.52 Afg ± 0.54	79.05 Ac ± 0.50	30.65 Bi ± 0.99	154.18 Ci ± 3.05
		PS	44.24 Bc ± 0.21	47.01 Bbc ± 0.55	9.04 Di ± 0.42	5.83 Abg ± 0.45	78.72 Ac ± 0.74	34.49 Afgh ± 0.81	186.74 Afg ± 3.20
	1467	AS	30.09 Ch ± 1.51	30.40 Cij ± 0.64	19.79 Ab ± 0.21	21.93 Aa ± 0.48	78.24 Bc ± 0.32	48.15 Aa ± 1.21	239.99 Aa ± 7.50
		EG	26.88 Di ± 0.98	28.35 Cj ± 1.04	16.53 Bde ± 0.96	8.43 Def ± 0.51	66.60 Cg ± 0.16	39.73 Bbcd ± 1.14	201.33 Bcdef ± 6.27
		MS	47.13 Abc ± 0.46	50.62 Aa ± 0.49	14.63 Cfg ± 0.18	13.69 Bc ± 0.52	82.34 Ab ± 0.61	35.21 Cefg ± 0.56	167.29 Chi ± 3.05
		PS	40.71 Bde ± 0.37	43.69 Bde ± 0.39	11.81 Dh ± 0.27	10.63 Cde ± 0.45	78.94 Bc ± 0.32	38.24 Bcde ± 0.42	203.33 Bcde ± 2.98
	885	AS	48.21 Bb ± 0.97	49.89 Aab ± 1.00	18.56 Abc ± 0.21	6.50 Afg ± 0.33	79.53 Bc ± 0.53	31.32 Chi ± 0.65	172.50 Cgh ± 3.64
		EG	34.47 Dg ± 0.68	33.42 Ch ± 0.66	17.47 Acd ± 1.27	5.37 Agh ± 0.33	74.53 Cd ± 0.91	40.06 Abcd ± 0.84	214.79 Abc ± 1.07
		MS	52.39 Aa ± 1.25	51.62 Aa ± 1.23	12.64 Bh ± 0.06	6.81 Afg ± 1.34	82.55 Ab ± 1.04	30.16 Ci ± 1.56	153.69 Di ± 4.48
		PS	41.19 Cd ± 1.56	44.20 Bcd ± 1.68	12.41 Bh ± 0.02	6.95 Afg ± 1.52	75.50 Cd ± 0.59	34.31 Bfgh ± 2.11	196.70 Bdef ± 9.07
542	AS	33.96 Bg ± 1.28	36.52 Bg ± 1.38	19.78 Ab ± 0.53	12.06 BCcd ± 1.80	71.34 Ce ± 0.54	37.38 Cdef ± 1.64	206.97 Ccd ± 5.11	
	EG	20.34 Dj ± 0.16	22.05 Dk ± 0.17	3.46 Dj ± 0.43	18.60 Ab ± 0.88	62.87 Dh ± 0.13	42.53 Bb ± 0.29	222.95 Bb ± 2.26	
	MS	44.23 Ac ± 0.77	45.78 Acd ± 0.80	11.79 Bh ± 0.60	11.58 Ccd ± 0.96	85.50 Aa ± 0.16	41.7 Bbc ± 0.71	189.81 Def ± 2.94	
	PS	30.92 Ch ± 1.87	32.39 Chi ± 1.96	8.25 Ci ± 0.35	13.82 Bc ± 0.81	78.52 Bc ± 0.67	47.59 Aa ± 1.81	247.35 Aa ± 8.21	

Means ± standard deviation followed by uppercase letters compare post-cultivation substrates within each strain and lowercase letters compare all substrates and strains, separated into initial and post-cultivation substrates of mushrooms.

3.2 Productive parameters

Comparing all the combinations of strains and substrates, the yield was statistically different only for strains 474, 542 and 885, when grown on AS substrate (Figure 1). Under these conditions, it can be inferred that these three strains did not obtain a yield considered commercially profitable, since to be considered a substrate with good productivity, the minimum yield must be 100 g (mushroom) /kg (substrate), are those that exceed this value are desirable (Siqueira *et al.*, 2011).

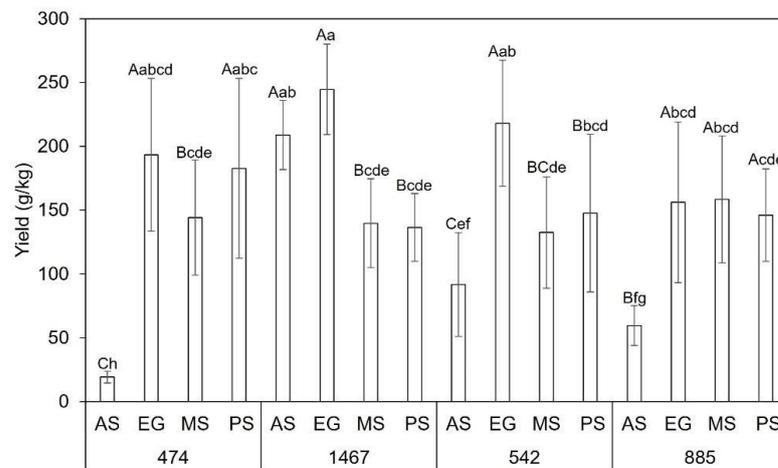


Figure 1. Yield of native and commercial strains of *Pleurotus ostreatus* cultivated in different regional lignocellulosic wastes. AS: açai seeds; EG: elephant grass; MS: marupá sawdust; PS: pine sawdust. Bars with the same lowercase letter for all combinations (strains and substrates) and with the same uppercase letter, when comparing each strain in all substrates, do not differ statistically from one another as per the Tukey test at a level of significance of 5%.

In the other experimental conditions, there was a tendency towards higher yields among the different strains (1467, 474 and 542) when cultivated in EG (Figure 1). In this sense, it is important to emphasize that the presence of sugars and other readily available components in the residue are essential for greater productivity (Cardoso *et al.*, 2013), while materials that are difficult to decompose by the fungus can generate the reverse effect (Pedra and Marino, 2006), which can be seen in the characteristics of the materials selected for this cultivation.

The highest values found are similar to those obtained by Otieno *et al.* (2022), for *P. ostreatus*, which showed yields of 53 g of mushroom in 100 g of dry orange peel and 55 g of mushroom in 100 g of dry watermelon peel, which would correspond to approximately 400 g of dry substrate in the present study (1 kg of residue with 60% moisture), which produced 212 g/400 g and 220 g/400 g.

The variation in productivity in the substrates can demonstrate the presence of nutrients in greater quantity or even of nutrients of superior quality in the substrates (Gume *et al.*, 2013). It is noted that, of the 4 strains of *P. ostreatus*, 3 did not show good yields from açai residue, which may reflect its nutritional composition, since it was not suitable for most of the strains tested.

Biological efficiency (BE) expresses the ability of the fungus to convert the substrate into basidiocarps and, as observed for yield, there is also a desired BE value in order to be considered an economically profitable cultivation (Sadar *et al.*, 2017). For the cultivation of *P. ostreatus*, those that reach at least 40% BE are considered economically viable substrates (Ríos *et al.*, 2010; Gume *et al.*, 2013). Thus, of the 16 combinations of substrates and strains, only 5 are not suitable for cultivation (474 AS, 1467 AS, 1467 PS, 542 AS and 885 AS), since the BE was below or very close to 40% (Figure 2).

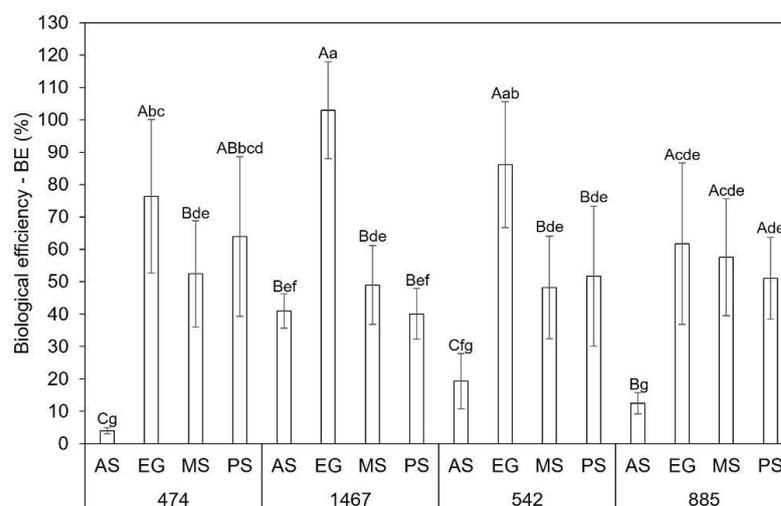


Figure 2. Biological efficiency (BE) of native and commercial strains of *Pleurotus ostreatus* cultivated in different regional lignocellulosic wastes. AS: açai seeds; EG: elephant grass; MS: marupá sawdust; PS: pine sawdust. Bars with the same lowercase letter for all combinations (strains and substrates) and with the same uppercase letter, when comparing each strain in all substrates, do not differ statistically from one another as per the Tukey test at a level of significance of 5%.

Piña-Guzmán *et al.* (2016) report that BE must present values close to 100% in order to obtain high mushroom productivity. In this study, the highest biological efficiencies obtained were for 1467 EG (102.93%) and 542 EG (86.18%), which correspond to a native and commercial strain, respectively (Figure 2). The results for BE in this study corroborate Toro *et al.* (2018) who evaluated different strains of *Pleurotus* spp. grown on *Yucca schiedigera*

residues, for which they obtained BE values ranging from 107.7 to 125.6%. Koutrotsios *et al.* (2017) observed BE values ranging from 43.89 to 109.38% for other species of *Pleurotus* spp., when grown on wheat grains. Comparing BE among the cultivation substrates studied herein, it was found that EG residue provided a higher BE for all strains evaluated. While, among the strains, 1467 (native strain from the Amazon) showed better performance (Figure 2).

In a study evaluating the effect of different substrates (wheat, rice and soybean meal) on the production of *Pleurotus* spp., BE varied from 67.23 to 236.32%, indicating that it was significantly affected by the combination and supplementation of substrates (Jeznabadi *et al.*, 2017). This fact can be explained by the structural differences between the substrates, including the composition and structures of the fibers (hemicellulose, cellulose and lignin), as these characteristics influence the development and mycelial penetration into the substrate, which reflects on the formation of the basidiocarps (Jeznabadi *et al.*, 2016; 2017).

The loss of organic matter (LOM) showed the same pattern described for yield and BE, in which fungi grown on the AS substrate exhibited the lowest LOM. Conversely, fungi grown on the EG and PS substrates had the highest LOM, especially strain 1467 (Figure 3).

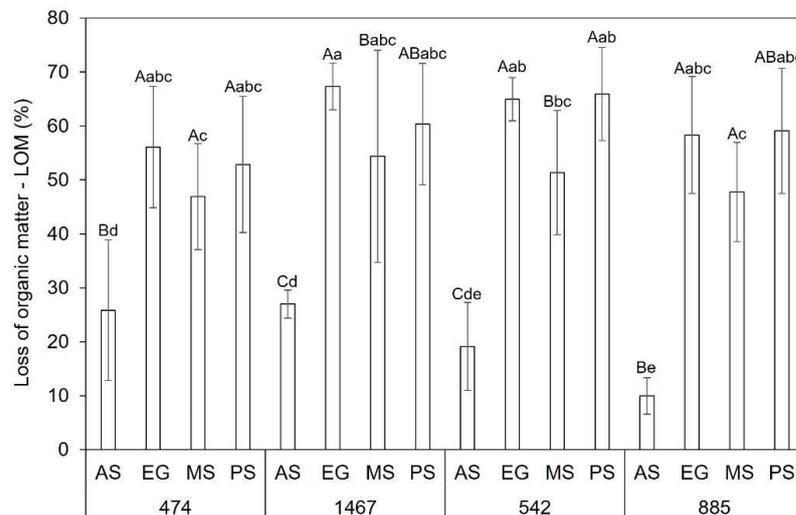


Figure 3. Loss of organic matter (LOM) of native and commercial strains of *Pleurotus ostreatus* cultivated in different regional lignocellulosic wastes. AS: açai seeds; EG: elephant grass; MS: marupá sawdust; PS: pine sawdust. Bars with the same lowercase letter for all combinations (strains and substrates) and with the same uppercase letter, when comparing each strain in all substrates, do not differ statistically from one another as per the Tukey test at a level of significance of 5%.

A correlation between BE, yield and LOM can be observed for the two treatments with the highest BE, which also showed some of the highest LOM and yield. However, one of the

highest yields obtained, in the combination of the 1467 strain cultivated in AS (208.91 g/Kg), a low LOM (27%) was observed (Figures 1 and 3), indicating that there is not always a relationship between productivity and LOM. An explanation for this low ratio may be the loss of CO₂ and H₂O during fungal metabolism, which does not necessarily indicate the degradation of lignocellulosic material for the formation of basidiocarps (Carvalho *et al.*, 2012).

3.3 Nutritional parameters of mushrooms

In the basidiocarps, the moisture ranged from 73.46% (1467 MS) to 91.08% (474 PS), and most mushrooms presented moisture in the range of 80%. These values obtained are within or close to the expected moisture in mushrooms, which range from 85 to 95% (Singh and Singh, 2021).

The average ash value (indicative of minerals) was 6%, and the basidiocarps of strain 474 presented the lowest (3.48%) and highest (8.70%) ash content when cultivated in AS and PS, respectively (Table 3). Singh and Singh (2021) highlight that mushrooms have a significant amount of minerals, evidenced by the amount of ash and describe that the ash content in *Pleurotus* species varies from 5 to 15% of its dry base, which is within the range found for the different strains of this study.

The analyses of the centesimal composition of the mushrooms produced showed carbon and nitrogen contents of around 40% and 5%, respectively, for all the conditions evaluated, which resulted in an average C:N of 8.6 (Table 3). Furthermore, mushrooms from cultivation in the EG substrate showed the highest C:N, which may justify the best production parameters for this experimental condition (Table 3).

The protein content of the basidiocarps varied from 13.27 to 30.07%, with the AS substrate providing the highest protein content for all the evaluated mushroom strains, thus corroborating the results obtained for the initial substrates, in which the açaí residues exhibited the highest protein content (Table 3). The lipid contents of the mushrooms ranged from 3 to 4.98%, while the fungi grown on the EG substrate had some of the highest levels of total and available carbohydrates (Table 3). Usually, mushrooms of species of the genus *Pleurotus* are reported to have protein concentrations of up to 27 g/100 g on a dry weight basis and lipids ranging from 1.1 to 8.3% on a dry weight basis, while carbohydrates, which correspond to the main constituents of the dry weight of a mushroom, vary from 46.6 to 81.8% (Singh and Singh, 2021).

Table 3 – Moisture, ash, carbon (c), nitrogen (n), C:N ratio, proteins and lipids of the basidiocarps of *Pleurotus ostreatus* native and commercial strains, cultivated in different regional lignocellulosic waste. ASM: mushroom from açai seeds; EGM: mushroom from elephant grass; MSM: mushroom from marupá sawdust; PSM: mushroom from pine sawdust. Means followed by the same lowercase letter in the columns and same uppercase letter in columns, when comparing each strain in all substrates, do not differ statistically from one another by Tukey at 5% significance.

Basidiomes	Moisture (%)	Ashes (%)	C (%)	N (%)	C:N	Proteins (%)	Lipids (%)	
474	ASM	82.32 Babcd ± 4.16	3.48 Dg ± 0.00	41.60 Aabc ± 0.41	5.61 Ad ± 0.05	7.41 Dhi ± 0.01	24.60 Ad ± 0.22	3.79 Abcd ± 0.21
	EGM	89.10 ABab ± 2.56	7.29 Cb ± 0.17	41.33 ABabcd ± 0.23	3.28 Dhi ± 0.01	12.60 Ab ± 0.05	14.37 Dhi ± 0.03	4.23 Aabc ± 0.20
	MSM	90.58 Aab ± 1.81	7.93 Bb ± 0.06	40.00 Bbcde ± 1.03	4.99 Be ± 0.07	8.01 Cg ± 0.09	21.87 Be ± 0.32	4.40 Aab ± 0.31
	PSM	91.08 Aa ± 2.74	8.70 Aa ± 0.12	42.01 Aab ± 0.74	4.60 Cf ± 0.05	9.14 Bd ± 0.24	20.13 Cf ± 0.21	4.02 Aabc ± 0.60
1467	ASM	84.52 Aabc ± 6.51	5.55 Bdef ± 0.25	40.54 Abcd ± 0.73	6.21 Bc ± 0.13	6.53 Cj ± 0.06	27.20 Bc ± 0.58	2.15 Be ± 0.26
	EGM	85.55 Aabc ± 6.05	6.12 Acd ± 0.05	37.80 Bf ± 0.71	4.04 Dg ± 0.12	9.35 Ad ± 0.16	17.70 Dg ± 0.54	2.26 Be ± 0.27
	MSM	73.46 Bd ± 8.65	6.21 Acd ± 0.09	38.03 Bef ± 1.24	6.53 Ab ± 0.24	5.83 Dk ± 0.13	28.60 Ab ± 1.07	3.32 Acd ± 0.31
	PSM	86.91 Aabc ± 4.38	6.21 Acd ± 0.11	40.66 Abcd ± 1.10	5.09 Ce ± 0.07	7.98 Bg ± 0.24	22.31 Ce ± 0.31	3.00 Ade ± 0.13
885	ASM	80.45 Abcd ± 8.58	5.68 ABcdef ± 0.18	40.89 Aabcd ± 0.10	6.86 Aa ± 0.06	5.96 Dk ± 0.04	30.07 Aa ± 0.27	3.66 Bbcd ± 0.31
	EGM	85.74 Aabc ± 8.61	6.15 Acd ± 0.50	39.27 Bcdef ± 0.57	3.58 Dh ± 0.04	10.98 Ac ± 0.19	15.67 Dh ± 0.19	4.12 Babc ± 0.14
	MSM	85.20 Aabc ± 6.95	5.25 BCef ± 0.19	40.13 Aabcd ± 0.72	5.20 Be ± 0.18	7.72 Cgh ± 0.40	22.77 Be ± 0.80	4.98 Aa ± 0.32
	PSM	87.88 Aab ± 4.65	5.11 Cf ± 0.43	37.89 Cf ± 0.62	4.40 Cf ± 0.05	8.61 Bef ± 0.06	19.27 Cf ± 0.22	3.75 Bbcd ± 0.07
542	ASM	77.06 Bcd ± 8.31	6.09 Acd ± 0.02	39.87 Ccdef ± 0.41	5.78 Ad ± 0.02	6.90 Dij ± 0.06	25.30 Ad ± 0.07	3.83 Abcd ± 0.73
	EGM	81.94 ABabcd ± 6.22	6.42 Ac ± 0.58	41.95 ABab ± 0.66	3.03 Di ± 0.01	13.85 Aa ± 0.24	13.27 Di ± 0.03	4.18 Aabc ± 0.20
	MSM	85.84 Aabc ± 3.79	6.03 Acd ± 0.08	42.81 Aa ± 0.00	5.26 Be ± 0.01	8.14 Cfg ± 0.01	23.03 Be ± 0.03	4.52 Aab ± 0.27
	PSM	81.69 Ababcd ± 4.73	5.96 Acde ± 0.14	41.27 BCabcd ± 0.23	4.61 Cf ± 0.10	8.95 Bde ± 0.23	20.20 Cf ± 0.43	4.19 Aabc ± 0.21

Means ± standard deviation followed by uppercase letters compare basidiocarps within each strain and lowercase letters compare basidiocarps between all substrates and strains.

The total fiber content in species of the genus *Pleurotus* ranges from 7.5 to 27.6% on a dry weight basis (Singh and Singh, 2021). Except for 542 AS and 542 EG, which presented a content of 4.60 and 6.84% of total fiber, respectively, the other 14 combinations of strains and cultivation substrates are within this mentioned range (Table 4). Additionally, among all combinations, the highest total fiber content in mushrooms was obtained for 1467 PS (23.05%), which was the cultivation substrate with the second highest total fiber content (Table 4).

Table 4 – Ash, total fibers, proteins, lipids, total carbs (carbohydrates), disponible carbs (carbohydrates) and energy values of the basidiomas of native and commercial strains of *Pleurotus ostreatus* cultivated in different local lignocellulosic wastes. ASM: mushroom from açai seeds; EGM: mushroom from elephant grass; MSM: mushroom from marupá sawdust; PSM: mushroom from pine sawdust.

Basidiomes	Total fibers (%)	Total carbs (%)	Disponibile carbs (%)	Energy (kcal 100 g ⁻¹)	
474	AS	12.59 Acdefg ± 0.82	63.30 Bcd ± 0.78	50.71 Abcde ± 1.29	335.23 Aab ± 2.90
	EG	12.09 Adefg ± 0.96	65.45 Abc ± 0.21	53.37 Abc ± 0.22	309.02 Bcde ± 4.49
	MS	13.01 Abcde ± 0.64	56.77 Cfgh ± 0.74	43.76 Cgh ± 1.29	302.03 Bde ± 2.57
	PS	9.33 Bgh ± 0.23	57.07 Cfg ± 0.88	47.73 Bdefg ± 0.81	307.67 Bcde ± 4.71
1467	AS	12.79 Cbdef ± 1.20	56.65 Cfgh ± 0.62	43.86 Bgh ± 1.74	303.56 Ade ± 5.03
	EG	15.24 BCbcd ± 2.11	67.67 Aab ± 0.66	52.44 Abc ± 1.59	300.94 Ade ± 10.09
	MS	16.22 Bb ± 1.56	54.18 Dhi ± 1.24	37.96 Ci ± 2.75	296.12 Ae ± 6.26
	PS	23.05 Aa ± 1.52	61.83 Bde ± 0.57	38.78 Ci ± 1.63	271.32 Bf ± 5.72
885	AS	12.23 ABCdefg ± 0.99	53.62 Di ± 2.40	41.40 Chi ± 2.99	318.76 Abcd ± 11.85
	EG	13.79 Abcde ± 0.30	69.86 Aa ± 0.37	56.07 Ab ± 0.62	324.09 Abc ± 3.15
	MS	10.69 Befg ± 1.54	56.41 Cghi ± 1.22	45.72 Bfgh ± 0.39	318.87 Abcd ± 6.00
	PS	13.56 Abcde ± 1.61	61.30 Bde ± 0.66	47.75 Bdefg ± 2.16	301.84 Bde ± 9.81
542	AS	4.60 Ci ± 0.12	56.55 Dgh ± 0.81	51.96 Bbcd ± 0.52	343.57 Aa ± 4.07
	EG	6.84 Bchi ± 1.39	70.43 Aa ± 0.74	63.59 Aa ± 0.69	345.00 Aa ± 6.06
	MS	9.34 Bfgh ± 0.29	59.44 Cef ± 0.23	50.09 BCcdef ± 0.31	333.18 Aab ± 0.31
	PS	15.64 Abc ± 0.24	62.50 Bd ± 0.27	46.86 Cefg ± 0.99	305.96 Bcde ± 0.53

Means ± standard deviation followed by uppercase letters compare basidiocarps within each strain and lowercase letters compare basidiocarps between all substrates and strains.

The efficiency in converting lignocellulosic residues into basidiocarps depends mainly on the structural and/or nutritional composition of the substrate used in mushroom cultivation, as well as on factors that are intrinsic to the fungus species (genetic factors, including their strains). Therefore, it is essential to carry out studies aimed at selecting highly productive strains and substrates that provide high productivity (Koutrotsios *et al.*, 2017).

4 Conclusion

When cultivated in elephant grass residue, strain 1467 of *Pleurotus ostreatus*, which is native to the Amazon, presented the best productive performance and showed satisfactory nutritional quality, and is promising for commercial purposes. However, investigations into new lignocellulosic residues are recommended, aiming to maximize and optimize mushroom production, as well as nutrient contents in order to provide a product with high nutritional content.

Acknowledgments

We thank the Ministry of Science, Technology, Innovation and Communications (MCTIC) and the National Institute for Amazonian Research (INPA) and the research promotion agencies CAPES (Project Pró-Amazônia n° 3251/2013) and FAPEAM (Project n° 062.00648/2015) for financing the research, post-graduate scholarships and for providing technical support.

References

- Aguiar, L.V.B.; Sales-Campos, C.; Gouvêa, P.R.S.; Vianez, B.F.; Dias, E.S.; Chevreuil, L.R. Substrate disinfection methods on the production and nutritional composition of a wild oyster mushroom from the Amazon. *Ciência e Agrotecnologia*, 2021; 45:e010321.
- Alfianti, F.; Murti, A.C.; Adenan, M.B.; Sutarman. Pasteurization of coconut water and rice washing water as a supplement for extending the life of oyster mushroom cultivation media. *Agritech*, 2021; XXIII (12021): 1-8.
- Andrade, M.C.N.; Jesus, J.P.F.; Vieira, F.R.; Viana, S.R.F.; Spoto, M.H.F.; Minhoni, M.T.A. Dynamics of the chemical composition and productivity of composts for the cultivation of *Agaricus bisporus* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013; 44(4): 1139-1146.
- Anike, F.N.; Yusuf, M.; Isikhuemhen, O.S. Co-substrating of peanut shells with cornstalks enhances biodegradation by *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 2016; 7(1):1-7.
- Annepu S. K.; Sharma, V. P.; Barh, A.; Kumar, S.; Shirur, M.; Kamal, S. Effects of genotype and growing substrate on bio-efficiency of gourmet and medicinal mushroom, *Lentinula Edodes* (Berk.) Pegler. *Bangladesh Journal of Botany*, 2019; 48(1): 129-138.
- Cardoso, J.C.P.; Demenjour, P.; Louis, M.M.; Paz, M.F. Cultivo do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* em bagaço de baciauva e de cana-de-açúcar pela técnica JUN-CAO. *Evidência*, 2013; 13(1): 31-40.
- Carvalho, C.S.M.; Aguiar, L.V.B.; Sales-Campos, C.; Minhoni, M.T.A.; Andrade, M.C.N. Applicability of the use of waste from different banana cultivars for the cultivation of the oyster mushroom. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012; 819-826.
- Chanakya, H.N.; Malayil, S.; Vijayalakshmi, C. Cultivation of *Pleurotus* spp. on a combination of anaerobically digested plant material and various agro-residues. *Energy for Sustainable Development*, 2015; 27: 84-92.
- Chang, S.T.; Miles, P.G. *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. 2 ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 451 p. 2004.
- Cueva, M.B.R.; Hernández, A.; Niño-Ruiz, Z. Influence of C/N ratio on productivity and the protein contents of *Pleurotus ostreatus* grown in different residue mixtures. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, 2017; 49(2): 331-344.

Ferreira, D.F. Sisvar: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. *Revista brasileira de biometria*, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. ISSN 1983-0823. 2019.

Furlani R.P.Z.; Godoy, H.T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 2005; 64(2): 149-154.

Gaitán-Hernández, R.; Zavaleta, M.A.B.; Aquino-Bolaños, E.N. Productivity, physicochemical changes, and antioxidant activity of shiitake culinary- medicinal mushroom *Lentinus edodes* (Agaricomycetes) cultivated on lignocellulosic residues. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2017; 19(11): 1041-1052.

Gume, B.; Muleta, D.; Abate, D. Evaluation of locally available substrates for cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in Jimma, Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research*, 2013; 7(20):2228-2237.

Haldar, D.; Purkait, M.K. Thermochemical pretreatment enhanced bioconversion of elephant grass (*Pennisetum purpureum*): insight on the production of sugars and lignin. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2022; 12: 1125–1138.

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

Jayasinghearachchi, H.S.; Seneviratne, G. Can mushrooms fix atmospheric nitrogen? *Journal of Biosciences*, 2004; 29(3): 293-296.

Jeznabadi, E.K.; Jafarpour, M.; Eghbalsaied, S. King oyster mushroom production using various sources of agricultural wastes in Iran. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 2016; 5(17): 17-24.

Jeznabadi, E.K.; Jafarpour, M.; Eghbalsaied, S.; Pessarakli, M. Effects of various substrates and supplements on king oyster (*Pleurotus ostreatus*). *Compost Science & Utilization*, 2017; 25(S1): S1-S10.

Koutrotsios, G.; Kalogeropoulos, N.; Stathopoulos, P.; Kaliora, A.C.; Zervakis, G.L. Bioactive compounds and antioxidant activity exhibit high intraspecific variability in *Pleurotus ostreatus* mushrooms and correlate well with cultivation performance parameters. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017; 33: 1-14.

Lima, M.C.D.; Barreto-Garcia, P.A.B.; Sanquetta, C.R.; Novaes, A.B.; Melo, L.C. Biomass and carbon stock from *Pinus caribaea* var. *hondurensis* under homogenous stands in southwest Bahia, Brazil. *Ciência Rural*, 2016; 46(6):957-962.

Lima, E.C.S.; Manhães, L.R.T.; Santos, E.R.; Feijó, M.B.S.; Sabaa-Srur, A.U.O. Optimization of the inulin aqueous extraction process from the açai (*Euterpe oleracea*, Mart.) seed. *Food Science and Technology*, 2021; 41(4): 884-889.

Mahari, W.A.W.; Peng, W.; Nam, W.L.; Yang, H.; Lee, X.Y.; Lee, Y.K.; Liew, R.K.; Ma, N.L.; Mohammad, A.; Sonne, C.; Le, Q.V.; Show, P.L.; Chen, W.-H.; Lam, S.S. A review on valorization of oyster mushroom and waste generated in the mushroom cultivation industry, *Journal of Hazardous Materials*, 2020; 400: 123156.

Maranho, A.S.; Paiva, A.V. Produção de mudas de *Physocalymma scaberrium* em substratos compostos por diferentes porcentagens de resíduo orgânico de açaí. *Revista Floresta*, 2012; 42(2):399-408.

Melanouri, E.M.; Dedousi, M.; Diamantopoulou, P. Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part II: Effect on productivity and quality of carposomes. *Carbon Resources Conversion*, 2022; 5(1): 52-60.

Monção F.P.; Rocha Júnior, V.R.; Silva, J.T.; Jesus, N.G.; Marques, O.F.C.; Rigueira, J.P.S.; Sales, E.C.J.; Silva Jr., A.A.G.; Alves, D.D.; Carvalho, C.C.C.; Gomes, V.M.; Leal, D.B. Nutritional value of BRS capiaçu grass (*Pennisetum purpureum*) silage associated with cactus pear. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 2020; 10(1): 25-29.

NEPA - Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. *Tabela de Composição de Alimentos/TACO-UNICAMP*. Campinas, São Paulo. 4ª ed. 164p. 2011.

Otieno, O.D.; Mulaa, F.J.; Obiero, G.; Midiwo, J. Utilization of fruit waste substrates in mushroom production and manipulation of chemical composition. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2022; 39: 102250.

Öztürk, C.; Atila, F. Changes in lignocellulosic fractions of growing substrates during the cultivation of *Hypsizygus ulmarius* mushroom and its effects on mushroom productivity. *Scientia Horticulturae*, 2021; 288(110403): 1-6.

Pedra, W.N.; Marino, R.H. Cultivo axênico de *Pleurotus* spp. em serragem da casca de coco (*Cocos nucifera* linn.) suplementada com farelo de arroz e/ou de trigo. *Arquivos do Instituto Biológico*, 2006; 73(2): 219-225.

Pereira, J.O.; De Souza, A.Q.L.; De Souza, A.D.L.; De Castro, S.F.; De Oliveira, L.A. Overview on biodiversity, chemistry, and biotechnological potential of microorganisms from the Brazilian Amazon. In: de Azevedo, J.; Quecine, M. (Ed.). *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics*, 71-103. Springer International Publishing. 2017.

Piña-Guzmán, A.B.; Nieto-Monteros, D.A.; Robles-Martínez, F. Utilización de residuos agrícolas y agroindustriales en el cultivo y producción del hongo comestible seta (*Pleurotus* spp.). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 2016; 32: 141-151.

Ríos, M.P.; Hoyos, J.L.Y; Mosquera, S.A. Evaluación de los parámetros productivos de la semilla de *Pleurotus ostreatus* propagada en diferentes medios de cultivo. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2010; 8(2): 86-94, 2010.

Sadh, P.K.; Duhan, S.; Duhan, J.S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 2018; 5(1): 1-15.

Sales-Campos, C.; Andrade, M.C.N. Aproveitamento de resíduos madeireiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. *Acta Amazonica*, 2011; 41(1): 1-8.

Sales-Campos, C.; Araújo, L.M.; Minhoni, M.T.A.; Andrade, M.C.N. Physico-chemical analysis and centesimal composition of *Pleurotus ostreatus* mushroom grown in residues from the Amazon. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2011; 31(2): 456-461.

Shin, S.K.; Ko, Y.J.; Hyeon, J.E.; Han, S.O. Studies of advanced lignin valorization based on various types of lignolytic enzymes and microbes. *Bioresource Technology*, 2019; 289(121728): 1-8.

Singh, M.P. Biodegradation of lignocellulosic wastes through cultivation of *Pleurotus sajor-caju*. *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Maastricht, Netherlands, 2000, p. 517-521.

Singh, A.; Singh, S. Nutritional and health importance of fresh and dehydrated oyster mushroom (*Pleurotus florida*). *Journal of Current Research in Food Science*, 2021; 2(2):10-14.

Siqueira, F.G.; Martos, E.T.; Silva, R.; Dias E.S. Cultivation of *Pleurotus sajor-caju* on banana stalk and Bahia grass based substrates. *Horticultura Brasileira*, 2011; 29(2):199-204.

Soares, A.M.S.; Sotão, H.M.P.; Medeiros, P.S.; Gilbertoni, T.B. Riqueza de fungos poliporoides (Agaricomycetes, Basidiomycota) em uma floresta ombrófila densa no Amapá, Amazônia Brasileira. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, 2014; 35: 5-18.

Souza, M.M.; Bufalino, L.; Gomes, L.G. Caracterização da madeira de marupá (*Simarouba amara* Aubl, Simaroubaceae) visando utilização na indústria moveleira. *Brazilian Journal of Development*, 2020; 6(12): 98163-98185.

Tedesco, M.J.; Gianello, C.; Bissani, C.A.; Bohnen, H.; Volkweiss, S.J. *Análises de solo, plantas e outros materiais*. Porto Alegre, UFRGS.1995, 88p.

Toro, G.V.; Ramírez-Ortiz, M.E.; Flores-Ramírez, G.; Costa-Manzano, M.R.; Robles-Martínez, F.R.; Garín-Aguilar, M.E.; Leal-Lara, H. Effect of *Yucca schiedigera* bagasse as substrate for oyster mushroom on cultivation parameters and fruit body quality. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 2018; 3(17): 835-846.

Van Soest, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 1963; 46: 829-835.

Van Soest, P.J.; Wine, R.H. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 1968; 51: 780-785.

Vogelmann, E.S.; Prevedello, J.; Reichert, J.M. Origem dos compostos hidrofóbicos e seus efeitos em florestas de Pinus e Eucalyptus. *Ciência Florestal*, 2015; 25(4):1067-1079.

Yamashita, S.; Hirose, D. Phylogenetic analysis of *Ganoderma austral* complex in a Bornean tropical rainforest and implications for mechanism of coexistence of various phylogenetic types. *Fungal Ecology*, 2016; 24: 1-6.

4. CAPÍTULO 3 – Influência das características físico-químicas dos resíduos utilizados como substrato no cultivo de *Pleurotus ostreatus*

(Publicado - <https://doi.org/10.53660/CONJ-1756-2K64>)

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF LIGNOCELLULOSIC WASTES USED IN THE CULTIVATION OF *Pleurotus ostreatus*

Lorena Vieira Bentolila de Aguiar^{1,2}, Aldenora dos Santos Vasconcelos^{2,3}, Sérgio Dantas de Oliveira Júnior², Carla Laize dos Santos Cruz Costa⁴, Ceci Sales-Campos², Larissa Ramos Chevreuil²

1 Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, BIONORTE, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Amazonas 69065-001, Brazil

2 Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas 69067-375, Brazil

3 Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas 69067-005, Brazil

4 Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Rio Grande do Norte 59064-741, Brazil

ABSTRACT

Lignocellulosic residues can be used as substrates for mushroom cultivation. However the choice of residue to be used in the cultivation of a fungal species must take into account the structural and chemical composition of the material in order to be successful in the cultivation of the mushrooms. Thus, this study evaluated the physical and chemical characteristics of pineapple and açai residues and their alterations after the cultivation of two *Pleurotus ostreatus* strains (474 and 542). The fungi were cultivated in pineapple, açai, and pineapple + açai residues, which were added to a mixture of rice, wheat and corn bran, and CaCO₃ in the proportion of 78:20:2 w/w/w. The physical and chemical parameters and proximate composition of the residues, and the initial and post-cultivation substrates of mushrooms were determined, in addition to being analyzed using scanning electron microscopy and X-ray diffraction. In general, among the residues tested, the pineapple-based substrate showed more interesting nutritional characteristics for mushroom cultivation, as well as structural conformation and greater availability of nutrients. The substrate composed of açai was not suitable for fungal cultivation due to its structural characteristics and high tannin content. In this sense,

knowing the characteristics of the material used as a support for mushroom growth is of paramount importance in order to achieve successful cultivation.

Keywords: Structural features; Lignocellulosic degradation; Fungiculture; Productivity; Nutritional aspects.

RESUMO

Resíduos lignocelulósicos podem ser usados como substratos para o cultivo de cogumelos. No entanto, a escolha do resíduo a ser utilizado no cultivo de uma espécie fúngica deve levar em consideração a composição estrutural e química do material para que haja sucesso no cultivo dos cogumelos. Assim, este estudo avaliou as características físicas e químicas dos resíduos de abacaxi e açaí e suas alterações após o cultivo de duas linhagens de *Pleurotus ostreatus* (474 e 542). Os fungos foram cultivados em resíduos de abacaxi, açaí e abacaxi + açaí, que foram adicionados a uma mistura de arroz, trigo e farelo de milho, e CaCO₃ na proporção de 78:20:2 p/p/p. Foram determinados os parâmetros físico-químicos e a composição centesimal dos resíduos e os substratos inicial e pós-cultivo dos cogumelos, além de serem analisados por microscopia eletrônica de varredura e difração de raios-X. De maneira geral, dentre os resíduos testados, o substrato à base de abacaxi apresentou características nutricionais mais interessantes para o cultivo de cogumelos, além de conformação estrutural e maior disponibilidade de nutrientes. O substrato composto de açaí não foi adequado para o cultivo de fungos devido às suas características estruturais e alto teor de tanino. Nesse sentido, conhecer as características do material utilizado como suporte para o crescimento de cogumelos é de suma importância para o sucesso do cultivo.

Palavras-chaves: Características estruturais; Degradação lignocelulósica; Fungicultura; Produtividade; Aspectos nutricionais.

1 Introduction

Lignocellulosic residues, such as rice and wheat straw/bran, sugarcane bagasse, sawdust, corn cobs and straw, and coffee husks, have been used as substrates for mushroom cultivation, including in the cultivation of *Pleurotus* species, due to their low costs and accessibility (Otieno *et al.*, 2022). Among the lignocellulosic residues of incipient use in the Amazon region are those from the processing of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) and açaí (*Euterpe* spp.) (Correa *et al.*, 2019; Hamzah *et al.*, 2021).

Pineapple is one of the most representative products of Brazilian national fruit production. Brazil being one of the largest pineapple producers in the world and the state of Amazonas one of the largest national producers (Pinheiro *et al.*, 2020; Sousa *et al.*, 2020). In pineapple plants, only about 22.5% of the fruit is used and, of the remainder, 4.5% corresponds to the skin and 73% to the vegetative part (leaves, stem and crown) (Carvalho *et al.*, 1991; Paula; Faria Júnior, 2019).

Açaí is a crop of economic and social value in the Amazon region. In the national scenario in Brazil, the state of Amazonas is the second largest producer of açaí and, in addition to supplying the Brazilian market, it also exports to other countries such as France and Switzerland (Melo; Costa; Silva, 2021). However, the edible part of the fruit corresponds to only 17% of its weight, and thus its cultivation generates a considerable amount of waste, which is composed of fibers and seeds (Barbosa *et al.*, 2019; Boeira *et al.*, 2020).

Residues from agro-industrial activities have a great potential for use and many are underused. In this sense, studies related to the use of plant residues in mushroom cultivation may demonstrate an improvement in productive yield, in addition to contributing to the nutritional and chemical composition of the mushroom produced (Tavarwisa *et al.*, 2021; Suwannarach *et al.*, 2022). Moreover, the use of lignocellulosic residues as cultivation substrates implies the reduction of environmental impacts generated by the residues, in addition to bringing economic benefits, such as the fungiculture itself (Gowda; Manvi, 2020).

Choosing a suitable substrate is essential for successful mushroom cultivation, since characteristics, such as carbon content, nitrogen and C/N ratio (Sales-Campos; Andrade, 2011; Mahari *et al.*, 2020), lignin, hemicellulose and cellulose (Annepu *et al.*, 2019; Shin *et al.*, 2019) and the availability, composition and structure of fibrous components (Alfianti *et al.*, 2021), are essential for productivity. These factors can also influence mycelial development (Ivarsson *et al.*, 2021) and basidiocarp formation (Jeznabadi; Jafarpour; Eghbalsaied, 2016; Jeznabadi *et al.*, 2017); therefore, it is essential to discover the physicochemical characteristics of lignocellulosic residues in order to choose a suitable growing substrate for a particular fungal species.

Another point to be highlighted is that, generally, the residues used in mushroom cultivation tend to be fibrous products of low digestibility, with low nutritional contents and a complex fibrous structure, which makes it difficult to use them for other purposes. One way to improve the nutritional quality and digestibility of the residue is by treatment with basidiomycetes, which degrade cellulose, hemicellulose and lignin and enrich the post-culture substrate, cause increments in protein and N, and alterations in the fibrous constitution, as well as promoting the accessibility of nutrients, making it more suitable for other uses such as in animal feed and as an organic fertilizer (Gonçalves *et al.*, 2010). Thus, the present study aimed to evaluate the physical and chemical characteristics of

lignocellulosic residues and their alterations after the cultivation of two *Pleurotus ostreatus* strains (474 and 542) in order to infer about the most suitable residue for the production of this fungus.

2 Materials and Methods

2.1 Biological Material

Açaí seeds (*Euterpe* sp.) and pineapple crowns (*Ananas comosus* (L.) Merrill) were acquired in the city of Manaus, Amazonas (3° 06' 06" S, 60° 01' 29" W), dried, crushed, and stored for fungal cultivation. Two strains of *Pleurotus ostreatus* (474 and 542), obtained from the Collection of Microorganisms of Agrosilvicultural Interest (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA), were used for cultivation.

2.2 Mushroom cultivation

Spawn production was carried out in flasks containing 78% açaí seeds (AS), pineapple crown (PC) or açaí seeds + pineapple crowns (AS+PC, 1:1 m/m) supplemented with a 20% mixture of rice, wheat and corn bran (60:20:20 w/w/w) and 2% of CaCO₃ (w/w). The flasks were autoclaved at 121 °C, and the mycelium inoculum (5% w/w) of the strains in PDA (potato dextrose agar) media were transferred from Petri dishes. After incubation (25 °C) and growth, 5% of the spawn was transferred to the cultivation bags containing each substrate (1 kg), prepared in the same way as described for the spawn formulation. The bags were incubated at 25 °C and subjected to 90% humidity and a photoperiod of 12 hours after colonization (Aguiar *et al.*, 2022).

2.3 Centesimal composition of substrates

The evaluation of the proximate composition was carried out on the residues, initial substrates (pre-cultivation) and spent mushroom substrate (post-cultivation substrates) of the mushrooms (spent). Initially, the moisture content was obtained by drying the samples at 105 °C, while the pH was determined from 1 g of the samples using a potentiometer (IAL, 2008).

To obtain the total tannin content, the residues were previously dried for 16 hours at 60 °C, with subsequent extraction in a solution of ethanol, methanol and chloroform for 10 days in the absence of light (Pansera *et al.*, 2003). For quantification, the extracts (or tannic acid standard) were incubated with distilled water, Folin-Ciocalteu reagent and Na₂CO₃ solution (10%); then, the reaction mixture was read at 725 nm in a microplate reader.

In the carbon analysis (Walkley-Black), the residues were titrated with ammoniacal ferrous sulfate, after being previously heated (60 °C for 10 minutes) with potassium dichromate and sulfuric acid and having a diphenylamine indicator and phosphoric acid added. For nitrogen determination (Kjeldahl), the samples were digested with sulfuric acid in a digester block (350 °C), distilled with

sodium hydroxide, collected in a boric acid solution with indicators and titrated with hydrochloric acid solution (Tedesco *et al.*, 1995). The protein content was obtained by multiplying the value of N by the conversion factor 6.25 (Furlani; Godoy, 2005).

For the quantification of total fibers, the samples were digested in solutions of sulfuric acid and sodium hydroxide, dried at 105 °C and calcined at 550 °C (IAL, 2008). Neutral detergent fiber (NDF) content was obtained from the digestion of samples in a neutral detergent solution and dried at 105 °C. Then, samples were digested in acid detergent solution (ADF) and dried at 105 °C (Van Soest, 1963). The lignin content was determined from samples from the NDF and ADF analysis, that were in contact with potassium permanganate for 2 h, followed by incubation for 30 minutes in the demineralizing solution. Subsequently, the samples were dried at 105 °C and calcined at 550 °C (Van Soest; Wine, 1968). Ashes were determined from calcination at 550 °C for 4 h (IAL, 2008).

For the lipid content, the samples were subjected to extraction in chloroform, methanol, water and sodium sulfate solution, filtered, and dried until the evaporation of the chloroform (IAL, 2008). Finally, the available carbohydrate was obtained by difference, from the subtraction of the moisture, protein, lipid, ash and fiber contents, from a total of 100, while the total carbohydrate content was obtained by subtracting the moisture, protein, lipid and ash content from a total of 100 (NEPA, 2011).

2.4 Structural characterization

Scanning electron microscopy (SEM) and X-Ray diffraction (XRD) analyses were performed on the residues and the initial and spent mushroom substrates. In the SEM analyses, the samples were observed under a microscope (Phillips XL - 30ESEM) using a 15 kV electron beam. XRD was evaluated using a diffractometer (XRD-6000, Shimadzu), copper K α radiation, with a voltage of 30.0 kV and an electrical current of 15 mA, at a rate of 2.0 degrees per minute, for a continuous scan of 2θ with range of 4.0 – 70.0 °C. The fiber crystallinity index was calculated according to Segal *et al.* (1959).

2.4 Statistical analysis

The experiment consisted of two *P. ostreatus* strains (474 and 542) and three substrates (AS, PC and AS+PC), in a completely randomized design, in a 2 x 3 factorial scheme, with 14 repetitions, in which each repetition corresponded to a grow bag. Physicochemical analyses were performed in triplicate. Data were submitted to ANOVA and then compared using the Scott-Knott test ($p > 0.05$), using the Sisvar 5.6 software (Ferreira, 2019).

3 Results and discussion

3.1 Centesimal composition

The initial substrates presented humidity that varied between 63.34% and 67.17%. In the spent mushroom substrates, the moisture varied from 29.55% (strain 542 in açai residues) to 55.84% (strain 542 in pineapple residues) (Table 1). Additionally, the pineapple-based substrate presented the highest moisture content both when grown with strain 542 and when grown with strain 474 (Table 1).

Moisture is responsible for affecting the availability of nutrients in the cultivation substrate, as well as access to oxygen by the fungus, in addition to favoring the presence of contaminants when in excess. Thus, the substrate moisture must be in a range of 50 to 75% in order to benefit mushroom cultivation (Chang; Miles, 2004), with a range of 60 to 65% being ideal (Mahari *et al.*, 2020).

Analyzing the pH, all residues and substrates showed acidic values, ranging from 6.00 to 6.24 for the residues and from 6.59 to 6.69 for initial substrates (Table 1). Due to the presence of short-chain fatty acids, lignocellulosic residues commonly have acidic pH (Xiros; Shahab; Studer, 2019; Solanilla-Duque; Salazar-Sánchez; Herrera, 2021). After cultivation, a decrease in pH values was observed for all (Table 1). Acidification of the pH after cultivation may be due to the production of secondary metabolites by the fungus during its growth, such as low molecular weight organic acids (Liu *et al.*, 2021). Kainthola *et al.* (2019) evaluated the growth of *P. ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Ganoderma lucidum* in rice straw, and found a decrease in pH from 7.5 to 5.5 and attributed this to the ability of white rot fungi to degrade the lignocellulosic wall in plant biomass.

Thus, if the pH is not suitable for cultivation, even if the conditions of temperature and amount of nutrients in the substrate are ideal, a decrease in growth or a complete inhibition of the fungus may occur (Sánchez; Royse, 2001). Therefore, the range of pH values suitable for fungal growth can vary from 5 to 7, though optimal values should be from 5.0 to 6.5 for mycelial growth and from 6.5 to 7.0 for basidiome formation (Mahari *et al.*, 2020).

TABLE 1 – Physicochemical parameters of residues, initial substrates and spent mushroom substrates of two *Pleurotus ostreatus* strains (474 and 542).

		Moisture (%)	pH	Tannins (µg/mg)	Carbon (%)	Nitrogen (%)	C/N	Ashes (%)
Residues	PC	6.48c ± 0.07	6.00c ± 0.01	8.51c ± 0.30	43.26a ± 0.41	0.56a ± 0.00	77.38c ± 0.74	5.22a ± 0.21
	AS	11.88a ± 0.14	6.24a ± 0.01	13.88a ± 0.51	38.61c ± 0.72	0.19c ± 0.00	207.11a ± 3.89	1.22c ± 0.12
	PC+AS	9.45b ± 0.11	6.12b ± 0.01	11.21b ± 0.31	41.35b ± 0.41	0.37b ± 0.00	110.98b ± 1.10	3.12b ± 0.06
Initial substrates	PC	63.34b ± 0.44	6.59c ± 0.01	-	44.85a ± 0.33	0.65a ± 0.01	68.74 c ± 0.51	11.62a ± 0.34
	AS	67.17a ± 1.91	6.69a ± 0.01	-	42.34b ± 0.58	0.37c ± 0.00	113.59 a ± 1.59	4.07c ± 0.02
	PC+AS	64.43b ± 1.16	6.61b ± 0.01	-	41.56b ± 0.49	0.47b ± 0.01	89.24 b ± 1.05	5.29b ± 0.18
Spent mushroom substrates	474 PC	54.85Aa ± 3.22	5.75Bb ± 0.01	-	39.05Dc ± 0.33	0.84Ba ± 0.00	46.54Ec ± 0.38	10.29Ba ± 0.17
	474 AS	38.20Bb ± 4.34	5.79Aa ± 0.01	-	41.37Bb ± 0.41	0.56Ec ± 0.00	74.01Ba ± 0.61	7.59Ec ± 0.04
	474 PC+AS	40.43Bb ± 2.19	5.50Ec ± 0.01	-	42.15Aa ± 0.41	0.65Db ± 0.00	64.62Cb ± 0.54	9.39Cb ± 0.24
	542 PC	55.84Aa ± 5.12	5.52Db ± 0.01	-	36.54Ec ± 0.00	0.93Aa ± 0.00	39.18Fc ± 0.02	13.38Aa ± 0.19
	542 AS	29.55Dc ± 4.22	5.50Ec ± 0.01	-	42.34Aa ± 0.00	0.47Fc ± 0.00	90.83Aa ± 0.03	8.32Dc ± 0.09
	542 PC+AS	37.75Cb ± 7.46	5.64Ca ± 0.01	-	40.21Cb ± 0.33	0.65Cb ± 0.00	61.58Db ± 0.53	10.32Bb ± 0.01

PC: Pineapple crowns; AS: Acai seeds; PC + AS: Pineapple crowns + Acai seeds (1:1 w/w). Averages followed by lowercase letters compare all residues and all initial and spent mushroom substrates. Capital letters compare spent mushroom substrates within each strain. Averages were compared using the Scott-Knott Test ($p < 0.05$).

The tannin content in the residues is one of the variables that may have influenced the mushroom production, since the açai residue had a higher tannin content (Table 1). The high tannin content in residues is undesirable in mushroom cultivation, as it is an anti-nutritional factor that is harmful to mycelial development and, consequently, affects the nutritional quality of the basidiomes (Ivarsson *et al.*, 2021).

As for carbon, the three types of residue (PC, AS and PC+AS) and the pineapple-based initial substrate (PC) showed the highest levels; though, after fungal growth, the pineapple-based initial substrate (PC) exhibited the greatest reductions in their content (Table 1). Carbon is essential as an energy source in mushroom development, and participates in the formation of fungal cell structures and chemical reactions (Chang; Miles, 2004; Anike *et al.*, 2016). Thus, the PC-based substrate provided greater energy input for the cultivation of the fungal strains studied, which may be one of the reasons for its higher productivity.

As with the carbon content, nitrogen was also higher in the three types of residue and PC-based initial substrate and, after the growth of the fungi, there was an increase in the nitrogen levels in all spent mushroom substrates (Table 1). The C/N ratio in the residues ranged from 77:1 to 207:1, while, in the initial substrates, it ranged from 68:1 to 113:1, with the highest ratios observed for the açai (AS) residue (Table 1). After mushroom cultivation, a reduction of about 30% of C/N was observed for all spent mushroom substrates (Table 1). The values obtained for the residue and PC-based substrate are in the most suitable ranges for the cultivation of *Pleurotus* spp.

The increase in nitrogen content in all the substrates after mushroom cultivation may be associated with the presence of the mycelium of the fungus, resulting from its growth and development, since the fungus normally has a greater amount of nitrogen in relation to substrates, in addition to the excretion of hydrolytic enzymes from fungal metabolism (Andrade *et al.*, 2013; Oztürk and Atila, 2021). There is also the possibility of fixing atmospheric nitrogen through the association of *Pleurotus* sp. with diazotrophic organisms (Jayasinghearachchi; Seneviratne, 2004).

Pleurotus spp. can grow in different wood species in nature, with a C/N ratio of 350 to 500:1; however, for high productivity, they need a greater amount of N (Chang; Miles, 2004; Sales-Campos; Andrade, 2011). The nitrogen content and the C/N ratio of the substrate correspond to one of the essential factors for mushroom cultivation. According to Mahari *et al.* (2020), the ideal C/N ratio should vary between 19:1-22:1. However, an initial C/N ratio of around 70-80:1 is also efficient for a productive crop (Chang; Miles, 2004).

Another characteristic that may also have influenced production is the ash content, since the three types of residue and the PC-based initial substrate had the highest ash contents, with 5.22% and

11.62%, respectively, while the three types of residue and the AS-based initial substrate exhibited the lowest ash contents (Table 1). Thus, PC provided greater mineral supply to the mushrooms.

After mushroom cultivation, an increase in ash content was observed in spent mushroom substrates, except for in strain 474 when cultivated in PC (Table 1). This increase is caused by the process of consumption of the substrate, since the organic matter is degraded by the fungus during cultivation, releasing inorganic elements in the medium, represented by ash (Singh, 2000).

Grimm *et al.* (2021) cultivated *Pleurotus ostreatus* in substrates with different concentrations of residues from the paper industry, and noticed that fungal development was affected by the ash content of the substrates. Thus, the substrates with higher ash contents provided a shorter collection time of the first productive flush, in addition to presenting faster mycelial development. Therefore, the ash content of a material provides an indication of its mineral contribution, as it corresponds to the fixed mineral residue, which is obtained after the decomposition of the organic components (Sales-Campos *et al.*, 2010).

As for the total fibers, the three types of residue and AS-based initial substrate showed the highest levels. A decrease of 28% and 22% in AS-based substrate occurred after the cultivation of strains 474 and 542, respectively (Table 2). Otieno *et al.* (2022) used various fruit residues as a substrate for the cultivation of different *Pleurotus* strains and observed higher total fiber contents for wheat straw, with a value of 41.60%.

The profile of the lignocellulolytic composition of the residues shows that the substrate most degraded by the strains was PC-based substrate, with a reduction of over 50% of the cellulose, hemicellulose and lignin contents after mushroom cultivation. On the other hand, the AS-based substrate showed the lowest consumption of these lignocellulosic compounds by strains 474 and 542 (Table 2). In general, the lignocellulosic composition of waste is 35-50% cellulose, 20-35% hemicellulose and 10-25% lignin, varying according to the origin and type of material (Santos *et al.*, 2012; Gong *et al.*, 2019).

Regarding the protein content, as observed for nitrogen, the residue and initial and spent mushroom PC-based substrates had the highest protein content (Table 2). Additionally, in the formulation of the initial substrates, there was a contribution in the protein content that was probably from the supplementation with corn, wheat and rice bran, as well as after the cultivation of strains 474 and 542. It is possible that this was due to the presence of fungal hyphae (Table 2). The protein present in the substrate is essential for adequate enzymatic activity of the fungus, both for the production of the enzymes responsible for substrate degradation and for those related to mycelial development (Atoji-Henrique *et al.*, 2017).

TABLE 2 – Centesimal composition of residues, and initial and spent mushroom substrates of two *Pleurotus ostreatus* strains (474 and 542).

		Total fibers (%)	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)	Total protein (%)	Lipids (%)	Total carbohydrates (%)	Available carbohydrates (%)
Residues	PC	29.58c ± 0.43	36.70c ± 1.13	29.24a ± 0.73	6.49a ± 1.26	3.49a ± 0.00	4.11a ± 0.01	80.69c ± 0.27	51.11a ± 0.16
	AS	42.90a ± 0.37	62.88a ± 1.63	30.27a ± 0.49	4.46a ± 0.85	1.16c ± 0.00	3.23b ± 0.06	82.50a ± 0.20	39.61c ± 0.57
	PC+AS	35.62b ± 0.10	45.40b ± 1.82	29.83a ± 0.47	5.52a ± 0.34	2.33b ± 0.00	3.21b ± 0.00	81.88b ± 0.06	46.26b ± 0.04
Initial substrates	PC	28.30c ± 0.30	37.78b ± 0.98	26.36a ± 0.49	7.01a ± 0.75	4.08a ± 0.00	3.39b ± 0.11	77.77c ± 0.45	49.47a ± 0.14
	AS	40.96a ± 0.53	48.96a ± 2.64	25.17a ± 1.56	5.42a ± 0.18	2.33c ± 0.00	3.41b ± 0.35	84.56a ± 0.11	43.59b ± 0.64
	PC+AS	32.82b ± 0.24	49.96a ± 3.25	23.06b ± 1.07	5.22a ± 0.40	2.91b ± 0.00	4.20a ± 0.13	82.49b ± 0.48	49.68a ± 0.24
Spent mushroom substrates	474 PC	11.69Fc ± 0.49	18.95Cc ± 1.57	10.38Cb ± 0.27	2.86Ab ± 0.25	5.24Ba ± 0.00	4.52Aa ± 0.08	72.85Dc ± 0.07	61.16Aa ± 0.56
	474 AS	29.47Ba ± 0.35	41.79Aa ± 1.52	16.82Ba ± 0.46	4.01Aa ± 0.23	3.49Ec ± 0.00	1.93Ec ± 0.05	82.62Aa ± 0.13	53.15Bb ± 0.22
	474 PC+AS	27.20Db ± 0.37	35.48Bb ± 2.31	16.65Ba ± 2.05	3.53Ab ± 0.07	4.07Db ± 0.00	2.27Db ± 0.06	80.09Bb ± 0.05	52.90Bb ± 0.49
	542 PC	16.59Ec ± 0.01	8.58Db ± 0.35	16.10Bb ± 2.44	3.43Aa ± 0.46	5.83Aa ± 0.00	3.72Ba ± 0.20	70.24Ec ± 0.35	53.65Ab ± 0.34
	542 AS	31.78Aa ± 0.26	40.84Aa ± 0.52	22.40Aa ± 0.79	3.61Aa ± 0.36	2.91Fc ± 0.00	3.42Cb ± 0.19	78.51Cb ± 0.25	50.17Dc ± 0.31
	542 PC+AS	27.96Cb ± 0.12	38.75Aa ± 2.03	16.73Bb ± 0.91	3.66Aa ± 0.27	4.08Cb ± 0.00	1.92Ec ± 0.04	80.15Ba ± 0.28	52.19Cb ± 0.17

PC: Pineapple crowns; AS: Acai seeds; PC + AS: Pineapple crowns + Açaí seeds (1:1 w/w). Averages followed by lowercase letters compare all residues, and initial and spent mushroom substrates.

Capital letters compare spent mushroom substrates within each strain. Averages were compared using the Scott-Knott Test ($p < 0.05$).

The PC residue presented the highest lipid content; however, after the formulation of the initial substrates, the pineapple crowns + açai seeds (PC + AS) provided the highest lipid supply (Table 2). After mushroom cultivation, it was observed that strain 474 consumed a greater amount of lipids from the substrates when compared to strain 542 (Table 2).

Peter *et al.* (2019) used cassava peels, banana leaves, sawdust, yam peels and groundnut shells in the cultivation of *P. ostreatus*, and obtained mushrooms that ranged from 1.83 to 4.62% lipids. This variation is believed to be linked to the nature of the substrate used. The use of lipids as an energy source by the fungus is indicative of a preference for the soluble fraction of the substrate, which is more easily metabolized (Hidayat *et al.*, 2022). According to Yulistiani, Puastuti and Wina (2012), mushrooms primarily use the soluble sources of the medium as an energy source for their metabolism.

The total carbohydrates of the residues varied from 80.69% for the PC to 82.50% for the AS, with the AS residue having the highest amount of total carbohydrates. Similar behavior was observed for the initial substrates produced with these residues. Analyzing the spent mushroom substrate, it is possible to notice a reduction in the total carbohydrate content in all substrates (Table 2).

As for available carbohydrates, the residue, PC-based initial substrate and PC-based spent mushroom substrate showed greater availability of carbohydrates, with an increase in the amount of available carbohydrates in the spent mushroom substrates of strains 474 and 542 (Table 2). One of the basic criteria for the formulation of a good substrate for mushroom cultivation is to present an adequate carbohydrate and nitrogen content in order to provide energy and structural support for the growth, as substrates with high nutritional content shorten the propagation time of the mycelium and accelerate substrate colonization (Ogundele; Abdulazeez; Bamidele, 2014; Khoo *et al.*, 2022). Increases in available carbohydrates, ash and other factors, such as nitrogen, are interesting for the reuse of these substrates in animal feed (Ivarsson *et al.*, 2021), in a new mushroom cultivation (Lisiecka, Prasad; Jasinska, 2021), or in planting when used as a bio-fertilizer (Carmo *et al.*, 2021).

3.2 Structural analysis

The aspects of the lignocellulosic fibers of the initial and spent mushroom substrates of strains 474 and 542 were obtained using scanning electron microscopy (SEM). It was observed

that the initial substrates of pineapple crowns (PC), açai seeds (AS) and pineapple crowns + açai seeds (PC + AS) did not present consistent structural arrangements, which is a common characteristic associated with the heterogeneity of biomass (Figure 1). In addition, the structural irregularity of the residue may be related to the process used to grind the substrate, as well as the friction between the particles (Costa *et al.*, 2015; Barbosa *et al.*, 2019).

As for the characteristics reported in the literature, açai seeds have a porous surface and an irregular structure (Figure 1B), with fibers of different shapes and dimensions, as well as small silica spheres (Figure 1E) (Mesquita *et al.*, 2018; Martins *et al.*, 2021). Oliveira *et al.* (2019) describe these silica spheres as granular structures found on the external and internal surfaces of pit channels in açai seeds. The presence of silica in plant biomass increases fiber rigidity, and protects against predators and diseases, in addition to increasing resistance to water stress and temperature fluctuations (Silva; Potiguara, 2008).

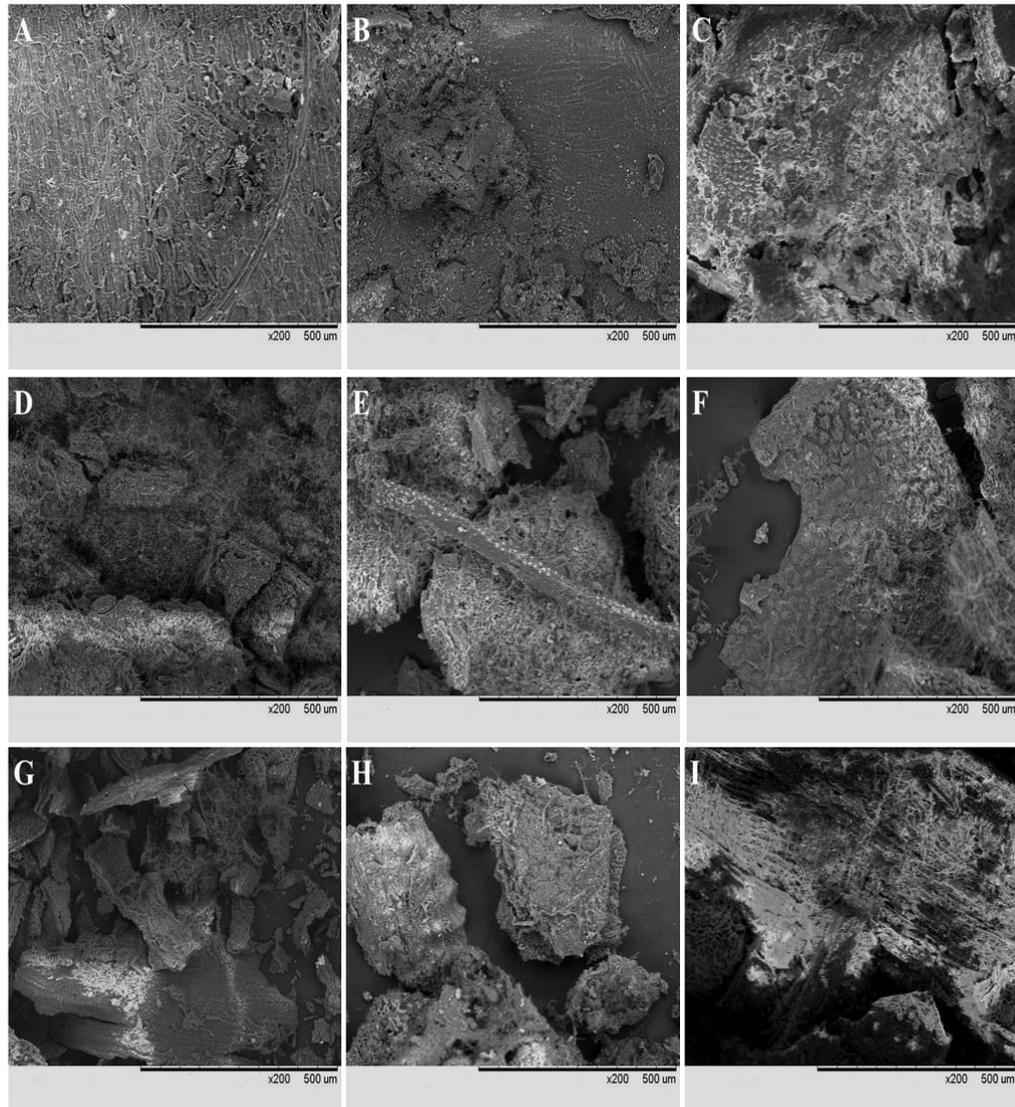
The pineapple crown presents flattened fragments arranged mainly towards the smooth surface and has extractives, such as waxes (Figure 1A) (Pereira; Ornaghi Júnior; Coutinho, 2020). After mushroom cultivation, it was possible to observe the presence of pores with surface roughness in the growth substrates of strain 474 (Figures 1 D, E and F), while the growth substrates of strain 542 showed irregular surfaces with aggregates and porosity (Figures 1 G, H and I).

The structural modification of the spent mushroom substrates in relation to the initial substrates is evident, with differences between the degradation promoted by strains 474 and 542. Among them, the presence of smaller particles in 542-PC (Figure 1G), compared to 474-PC (Figure 1D) and more pores in 542-AS (Figure 1H) in relation to 474-AS (Figure 1E), as well as the high degree of fiber fragmentation in 542 PC+AS (Figure 1I) suggest that the degradation promoted by strain 542 was superior.

Regarding the substrates used, the most visible signs of degradation were found in spent mushroom substrates based on pineapple (Figures 1D and 1G) and açai (Figures 1E and 1H), as there was degradation of the plant cell wall, with an increase in the cellulose contact, resulting from particle size regression. Similar results were observed by Palangi *et al.* (2022), who cultivated *Agaricus bisporus* in plant biomass, and found a reduction in the size of lignocellulosic fibers. The presence of highly irregular pores on the surface of the material and loosening of the fibers, observed after mushroom cultivation, is reported as a possible sign of

substrate delignification caused by the fungal development itself, and is associated with the action of delignifying enzymes (Rezende *et al.*, 2011; Grimaldi *et al.*, 2015).

FIGURE 1 - Scanning electron microscopy (SEM) of the initial substrates and spent mushroom substrates of strains 474 and 542 of *Pleurotus ostreatus* (200x magnification).



Initial substrates: pineapple crown (A), açai seeds (B) and pineapple crown + açai seeds (C). Spent mushroom substrates: 474-pineapple (D), 474-açai (E), 474-pineapple+açai (F), 542-pineapple (G), 542-açai (H) and 542-pineapple+açai (I).

The increase in irregular shapes observed in spent mushroom substrates (Figure 1D - I) may be related to the production of lignocellulolytic enzymes by *P. ostreatus*. A similar result

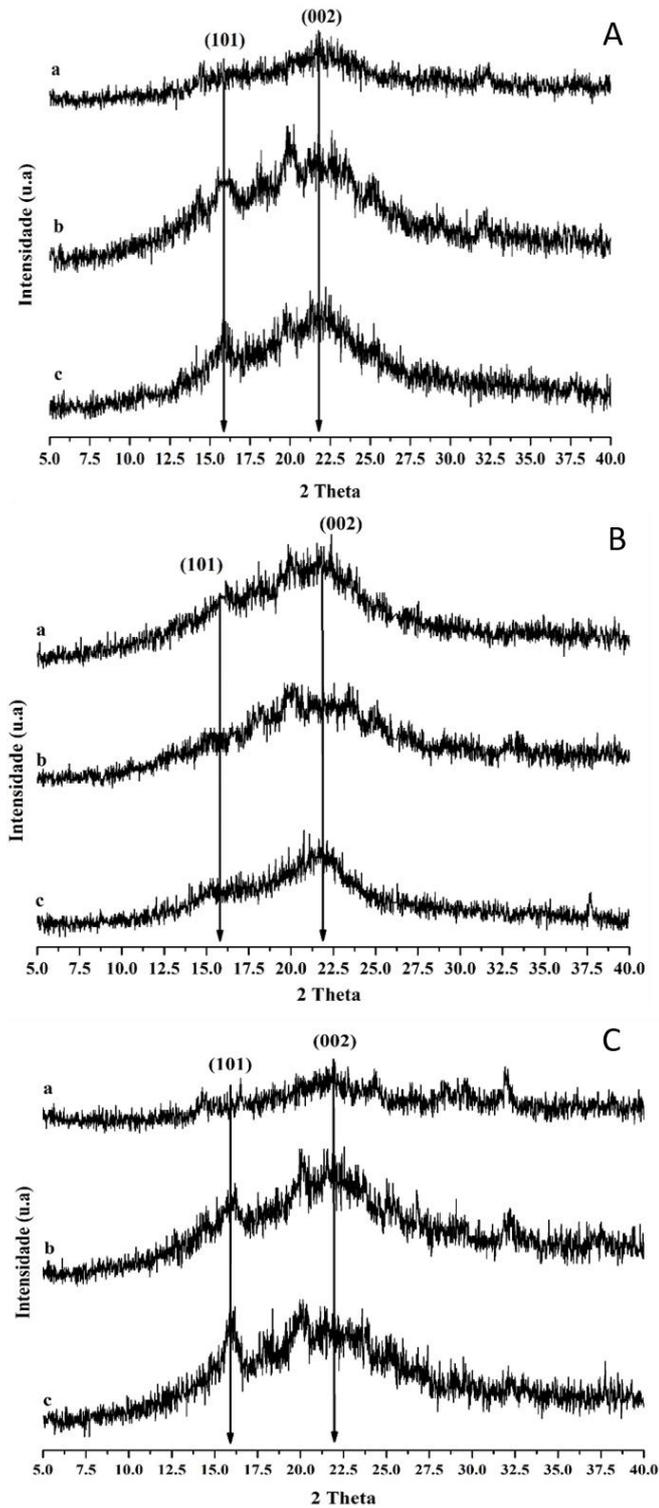
was obtained by Faria *et al.* (2020) who evaluated the degree of degradation of sugarcane bagasse after fermentation of *Hemicella grisea* var. *thermoidea*, and detected an increase in cracking, spacing, fragmentation, and loosening of lignocellulosic fibers, and associated this to the action of cellulases and xylanases.

Sivaramakrishnan *et al.* (2021) observed that the surface of rice bran untreated with *Rhizopus oligosporus* is smooth when compared to pre-treated rice bran. The fungal pretreatment led to the formation of cracks, erosion and the appearance of rough structures, which suggests that these modifications are associated with the delignification and depolymerization of the plant biomass.

The X-ray diffraction (XRD) technique was used to compare the degree of crystallinity of the sample before and after the cultivation of strains 474 and 542 of *P. ostreatus*. Cellulose can exist in a highly structured form, known as microcrystalline cellulose, or in disordered regions, known as amorphous cellulose (Okolie *et al.*, 2021). Furthermore, the amorphous region found in lignocellulose may be composed of hemicellulose, lignin, pectin and extractives (Solikhin *et al.*, 2018).

When analyzing the diffractograms (XRD) of the initial and spent mushroom substrates of different strains of *P. ostreatus* (474 and 542), peaks were revealed in similar regions. For 2θ at approximately 16° , crystallographic plane 101 was observed, which is characteristic of the amorphous region of cellulose, and for $2\theta = 22^\circ$, the 002 crystallographic plane was observed, which is characteristic of the crystalline region of cellulose (Figure 2) (Suman *et al.*, 2022). Lu *et al.* (2022) found a similar diffraction pattern for maize stem lignocellulosic residue.

FIGURE 2 - Diffractograms of the initial substrates (A) and spent mushroom substrates of *P. ostreatus* strains 474 (B) and 542 (C). Pineapple crowns (a), açai seeds (b) and pineapple crowns + açai seeds (c).



When comparing the crystallinity index (CI) of the initial substrates (Table 3), it is possible to observe that the lowest degree of crystallinity was detected in the pineapple residue. This indicates that this substrate is more easily hydrolysable, since the presence of highly crystalline regions results in a slower rate of enzymatic metabolism (Karimi; Taherzadeh, 2016). Zhao, Zhang and Liu (2012) confirm that crystalline cellulose is more recalcitrant to microbial and enzymatic attacks when compared to amorphous attacks. The other initial substrates had a CI of around 40%, which similar to that found in cornhusks (41.2%) (Zhang *et al.*, 2021).

The CI, due to the relationship between the crystalline phase around $2\theta = 22^\circ$ and the amorphous phase at 2θ between 18° and 19° , was reduced in the spent mushroom substrates from the two *P. ostreatus* strains studied. This suggests a possible change in crystallinity after enzymatic hydrolysis. Bala and Singh (2019) observed that enzymatic hydrolysis, after saccharification of the residue, caused a decrease in the CI of the cellulose. Hu *et al.* (2021) found a reduction in the crystallinity of residues after fermentation of *P. geesteranus*, and attributed this fact to the degradation and absorption of cellulose as a source of nutrients by the fungus.

TABLE 3 – Crystallinity Index (CI) by X-ray diffraction (XRD) of the initial substrates and spent mushroom substrates of strains 474 and 542 of *P. ostreatus*.

	Substrates	CI (%)
Initial substrates	PC	31.25
	AS	44.23
	PC + AS	41.07
Spent mushroom substrates	474 PC	23.81
	474 AS	24.29
	474 PC + AS	10.42
	542 PC	27.27
	542 AS	29.23
	542 PC + AS	16.67

PC: Pineapple crowns; AS: Açai seeds; PC + AS: Pineapple crowns + Açai seeds (1:1 w/w).

Conclusion

The pineapple-based substrate was the most suitable for mushroom cultivation since it has a lower tannin and cellulose content, which facilitates the degradation of the residue, in addition to providing greater energy input for the fungus.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI)/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) and to the research support agencies CAPES (Project Pró-Amazônia No. 3251/2013), CNPQ (Project Universal No. 461729/2014-8) and FAPEAM (Project No. 062.00648/2015 and No. 062.00143/2020) for funding research and granting technical support grants. We are also grateful to POSGRAD 2021/FAPEAM for financial support for the translation of this manuscript.

REFERENCES

- AGUIAR, L. V. B.; GOUVÊA, P. R. S.; OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; SALES-CAMPOS, C.; CHEVREUIL, L. R. Production of commercial and Amazonian strains of *Pleurotus ostreatus* in plant waste. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 6, p. 47299–47321, 2022. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv8n6-299>.
- ANDRADE, M. C. N.; JESUS, J. P. F.; VIEIRA, F. R.; VIANA, S. R. F.; SPOTO, M. H. F.; MINHONI, M. T. A. Dynamics of the chemical composition and productivity of composts for the cultivation of *Agaricus bisporus* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1139–1146, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000400016>.
- ANIKE, F. N.; YUSUF, M.; ISIKHUEMHEN, O. S. Co-substrating of peanut shells with cornstalks enhances biodegradation by *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, 7(1):1-7, 2016.
- ANNEPU, S.; K.; SHARMA, V. P.; BARH, A.; KUMAR, S.; SHIRUR, M.; KAMAL, S. Effects of genotype and growing substrate on bio-efficiency of gourmet and medicinal mushroom, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 48, n. 1, p. 129–138, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3329/bjb.v48i1.47431>.
- ALFIANTI, F.; MURTI, A. C.; SUTARMAN, M. B. A. Pasteurization of coconut water and rice washing water as a supplement for extending the life of oyster mushroom cultivation media. **Agritech: Jurnal Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Purwokerto**, v. 23, n. 1, 2021. DOI: <https://doi.org/10.30595/agritech.v23i1.10194>
- ATOJI-HENRIQUE, K.; HENRIQUE, D. S.; GLÓRIA, L. S.; MAZARO, S. M.; CASAGRANDE, M. Influence of substrate composition on beta-glucans production and growth of *Ganoderma lucidum*. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 5, p. 190–199, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5539/jas.v9n5p190>.

BALA, A.; SINGH, B. Development of an environmental-benign process for efficient pretreatment and saccharification of *Saccharum* biomasses for bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 130, p. 12 – 24, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.06.033>.

BARBOSA, A. M.; REBELO, V. S. M.; MARTORANO, L. G.; GIACON, V. M. Caracterização de partículas de açaí visando seu potencial uso na construção civil. **Matéria**, v. 24, n. 3, p. 1–11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-707620190003.0750>

BOEIRA, L. S.; FREITAS, P. H. B.; UCHÔA, N. R.; BEZERRA, J. A.; CÁD, S. V.; DUVOISIN JUNIOR, S.; ALBUQUERQUE, P. M.; MAR, J. M.; RAMOS, A. S.; MACHADO, M. B.; MACIEL, L. R. Chemical and sensorial characterization of a novel alcoholic beverage produced with native acai (*Euterpe precatoria*) from different regions of the Amazonas state. **LWT-Food Science and Technology**, v. 117, p. 108632, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108632>.

CARMO, C. O.; RODRIGUES, M. S.; SILVA, F.; IRINEU, T. G. M.; SOARES, A. C. F. Spent mushroom substrate of *Pleurotus ostreatus* kummer increases basil biomass and essential oil yield. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 34, n. 3, p. 548-558, 2021, <https://doi.org/10.1590/1983-21252021v34n306rc>.

CARVALHO, V. D.; PAULA, M. B.; ABREU, C. M. P.; CHAGAS, S. J. R. Efeito da época de colheita da planta na composição química das folhas do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 10, p. 1655–1661, 1991.

CORREA, B. A.; PARREIRA, M. C.; MARTINS, D. S.; RIBEIRO, C.; SILVA, E. M. D. Reaproveitamento de resíduos orgânicos regionais agroindustriais da Amazônia Tocantina como substratos alternativos na produção de mudas de alface. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 9, n. 1, 2019. DOI: <https://doi.org/10.21206/rbas.v9i1.7970>

COSTA, R. G.; ANDREOLA, K.; MATTIETTO, R. A.; FARIA, L. J. G.; TARANTO, O. P. Effect of operating conditions on the yield and quality of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) powder produced in spouted bed. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1196–1203, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.027>.

CHANG, S. T.; MILES, P.G. **Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact**. 2 ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 451 p, 2004.

FARIA, S. P.; MELO, G. R.; CINTRA, L. C.; RAMOS, L. P.; JESUINO, R. S. A.; ULHOA, C. J.; FARIA, F. P. Production of cellulases and xylanases by *Humicola grisea* var. *thermoidea* and application in sugarcane bagasse arabinoxylan hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 158, p. 112968, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112968>.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, p. 529–535, 2019. DOI: <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>.

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

GONG, X.; LI, S.; CARSON, M. A.; CHANG, S. X.; WU, Q.; WANG, L.; AN, Z.; SUN, X. Spent mushroom substrate and cattle manure amendments enhance the transformation of garden waste into vermicomposts using the earthworm *Eisenia fetida*. **Journal Environmental Management**, v. 248, p. 109263, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109263>

GRIMM, A.; EILERTSEN, L.; CHEN, F.; HUANG, R.; ATTERHEM, L.; XIONG, S. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* mushroom on substrates made of cellulose fibre rejects: product quality and spent substrate fuel properties. **Waste Biomass Valor**, v. 12, p. 4331–4340, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01311-y>

GONÇALVES, C. C. M.; PAIVA, P. C. A.; DIAS, E. S.; HENRIQUE, F. Avaliação do cultivo de *Pleurotus sajor-caju* (fries) Sing. sobre o resíduo de algodão da indústria têxtil para a produção de cogumelos e para alimentação animal. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 220–225, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000100028>.

GOWDA, N. A. N.; MANVI, D. agriculture crop residues disinfection methods and their effects on mushroom growth. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 86, n. 3, p. 1177–1190, 2020. DOI: <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2020/154396>

GRIMALDI, M. P.; MARQUES, M. P.; LALUCE, C.; CILLI, E. M.; SPONCHIADO, S. R. P. Evaluation of lime and hydrothermal pretreatments for efficient enzymatic hydrolysis of raw sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, n. 8, v. 1, p. 1–14, 2015. DOI: [10.1186/s13068-015-0384-y](https://doi.org/10.1186/s13068-015-0384-y).

GUME, B.; MULETA, D.; ABATE, D. Evaluation of locally available substrates for cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in Jimma, Ethiopia. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n.20, p. 2228–2237, 2013.

HAMZAH, A. F. A.; HAMZAH, M. H.; MAN, H. C.; JAMALI, N. S.; SIAJAM, S. I.; ISMAIL, M. H. Recent Updates on the Conversion of Pineapple Waste (*Ananas comosus*) to Value-Added Products, Future Perspectives and Challenges. **Agronomy**, v. 11, n. 2221, p. 1-27, 2021. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112221>

HIDAYAT, T.; AL-MAJID, F.; WAJIZAH, S.; USMAN, Y.; SAMADI. Evaluation of nutritive values and digestibility's cacao (*Theobroma cacao* L.) pod husk fermented with lingzhi mushroom (*Ganoderma lucidum*) at different concentration and incubation time. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. **IOP Publishing**, v. 951, n. 1, p. 012024, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/951/1/012024>.

HU, M.; YUAN, L.; CAI, Z.; ZHANG, J.; JI, D.; ZANG, L. Ammonia Fiber Expansion Combined with White Rot Fungi to Treat Lignocellulose for Cultivation of Mushrooms. **ACS Omega**, v. 6, n. 47, p. 31689–31698, 2021, <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c04388>.

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

IVARSSON, E.; GRUDÉN, M.; SÖDERGREN, J.; HULTBERG, M. Use of faba bean (*Vicia faba* L.) hulls as substrate for *Pleurotus ostreatus* – Potential for combined mushroom and feed production. **Journal of Cleaner Production**, v. 313, p. 127969, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127969>.

JAYASINGHEARACHCHI, H. S.; SENEVIRATNE, G. Can mushrooms fix atmospheric nitrogen? **Journal of Biosciences**, v. 29, n. 3, p. 293–296, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02702611>.

JEZNABADI, E. K.; JAFARPOUR, M.; EGHBALSAIED, S. King oyster mushroom production using various sources of agricultural wastes in Iran. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, v. 5, n. 17, p. 17–24, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40093-015-0113-3>.

JEZNABADI, E. K.; JAFARPOUR, M.; EGHBALSAIE, S.; PESSARAKLI, M. Effects of various substrates and supplements on king oyster (*Pleurotus ostreatus*). **Compost Science & Utilization**, v. 25, p. S1–S10, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/1065657X.2016.1238787>

KAINTHOLA, J.; KALAMDHAD, A. S.; GOUDA, V. V.; GOEL, R. Fungal pretreatment and associated kinetics of rice straw hydrolysis to accelerate methane yield from anaerobic digestion. **Bioresource technology**, v. 286, p. 121368, 2019, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121368>.

KARIMI, K.; TAHERZADEH, M. J. A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 348–356, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.022>.

KHOO, S. C.; MA, N. L.; PENG, W. X.; NG, K. K.; GOH, M. S.; CHEN, H. L.; TAN, S. H.; LEE, C. H.; LUANG-IN, V.; SONNE, C. Valorisation of biomass and diaper waste into a sustainable production of the medical mushroom Lingzhi *Ganoderma lucidum*. **Chemosphere**, v. 286, p. 131477, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131477>.

LISIECKA, J.; PRASAD, R.; JASINSKA, A. The Utilisation of *Pholiota nameko*, *Hypsizygus marmoreus*, and *Hericiium erinaceus* Spent Mushroom Substrates in *Pleurotus ostreatus* Cultivation. **Horticulturae**, v. 7, n. 10, p. 1–13, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100396>.

LIU, J.; SUN, S.; HAN, Y.; MENG, J.; CHEN, Y.; YU, J.; ZHANG, X.; MA, F. Lignin waste as co-substrate on decolorization of azo dyes by *Ganoderma lucidum*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 122, p. 85–92, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2021.04.039>.

LU, X.; LI, F.; ZHOU, X.; HU, J.; LIU, P. Biomass, lignocellulolytic enzyme production and lignocellulose degradation patterns by *Auricularia auricula* during solid state fermentation of corn stalk residues under different pretreatments. **Food Chemistry**, v. 384, p. 132622, 2022, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132622>.

MAHARI, W. A. W.; PENG, W.; NAM, W. L.; YANG, H.; LEE, X. Y.; LEE, Y. K.; LIEW, R. K.; MA, N. L.; MOHAMMAD, A.; SONNE, C.; LE, Q. V.; SHOW, P. L.; CHEN, W-H.; LAM, S. S. A review on valorization of oyster mushroom and waste generated in the mushroom cultivation industry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 400, p. 123156, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123156>.

MARTINS, L. S.; SILVA, N. G. S.; CLARO, A. M.; AMARAL, N. C.; BARUD, H. S.; MULINARI, D. S. Insight on açai seed biomass economy and waste cooking oil: Eco-sorbent castor oil-based. **Journal of Environmental Management**, v. 293, n. 112803, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112803>.

MELO, G. S.; COSTA, F. S.; SILVA, L. C. O cenário da produção do açai (*Euterpe spp.*) no estado do Amazonas. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 7, p. 71536–71549, 2021. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n7-365>

MESQUITA, A. L.; BARRERO, N. G.; FIORELLI, J.; CHRISTOFORO, A. L.; FARIA, L. J. G.; LAHR, F. A. R. Eco-particleboard manufactured from chemically treated fibrous vascular tissue of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) Fruit: a new alternative for the particleboard industry with its potential application in civil construction and furniture. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 644–651, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.074>

NEPA. NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **TACO: tabela brasileira de composição de alimentos**. 4. ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011.

OGUNDELE, G.; ABDULAZEEZ, R.; BAMIDELE, O. Effect of pure and mixed substrate on oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) cultivation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 2, p. 2S, 2014.

OLIVEIRA, D. N. P. S.; CLARO, P. I. C.; FREITAS, R. R.; MARTINS, M. A.; SOUZA, T. M.; SILVA, B. M. S.; MENDES, L. M.; BUFALINO, L. Enhancement of the Amazonian açai waste fibers through variations of alkali pretreatment parameters. **Chemistry & Biodiversity**, v. 16, n. 9, p. e1900275, 2019, DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900275>.

OTIENO, O. D.; MULAA, F. J.; OBIERO, G.; MIDIWO, J. Utilization of fruit waste substrates in mushroom production and manipulation of chemical composition. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 39, p. 102250, 2022, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102250>.

OKOLIE, J. A.; NANDA, S.; DALAI, A. K.; KOZINSKI, J. A. Chemistry and specialty industrial applications of lignocellulosic biomass. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, v. 5, p. 2145-2169, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01123-0>.

ÖZTÜRK, C.; ATILA, F. Changes in lignocellulosic fractions of growing substrates during the cultivation of *Hypsizygus ulmarius* mushroom and its effects on mushroom productivity. **Scientia Horticulturae**, v. 288, p. 110403, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110403>.

PAULA, K. S.; FARIA JÚNIOR, O. L. Utilização dos restos culturais e resíduos da industrialização de abacaxi na alimentação de ruminantes: Revisão. **PubVet**, v. 13, n. 2, p. 1–7, 2019. DOI: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n2a271.1-7>.

PALANGI, V.; KAYA, A.; KAYA, A.; GIANNENAS, I. Usability of mushroom cultivation substrate as a ruminant feed: anaerobic digestion using gas production techniques. **Animals**, v. 12, n. 12, p. 1583, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani12121583>.

PANSERA, M. R.; SANTOS, A.C.A.; PAESE, K.; WASUM, R.; ROSSATO, M.; ROTA, L. D.; PAULETTI, G. F.; SERAFINI, L. A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13 n.1, p. 17–22, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2003000100002>.

PEREIRA, P. H. F., ORNAGHI JÚNIOR, H. L., COUTINHO, L. V. Obtaining cellulose nanocrystals from pineapple crown fibers by free-chlorite hydrolysis with sulfuric acid: physical, chemical and structural characterization. **Cellulose**, v. 27, p. 5745–5756, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03179-6>.

PETER, O. E.; PETER, G. R.; OBELE, I. I.; OWUNA, G.; DANLADI, M. M.; OBIKIEZE, S.; AKWASHIKI, O. Utilization of Some Agro-Wastes for Cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Oyster Mushroom) in Keffi Nigeria. **Frontiers in Environmental Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 60-69, 2019. DOI: 10.11648/j.fem.20190502.13.

PINHEIRO, J. O. C.; GARCIA, M. V. B.; CYSNE, A. Q.; GARCIA, T. B.; ABREU, S. C. D.; SOUZA, L. V. **Avaliação econômico-financeira da produção de abacaxi na mesorregião central do Amazonas, AM**. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 2020, p. 26.

REZENDE, C. A.; LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E. R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n.1, p. 1–19, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-54>.

SALES-CAMPOS, C.; ARAUJO, L. M.; MINHONI, M. T. A.; ANDRADE, M. C. Análise físico-química e composição nutricional da matéria prima e de substratos pré e pós cultivo de *Pleurotus ostreatus*. **Interciencia**, v. 35, n. 1, p. 70–76, 2010.

SALES-CAMPOS, C.; ANDRADE, M. C. N. Aproveitamento de resíduos madeireiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 1, p. 1–8, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000100001>.

SÁNCHEZ, J. E. V.; ROYSE, D. J. **La biología y el cultivo de Pleurotus spp.** ECOSUR, Chiapas, México, 290p., 2001.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol.

Quimica Nova, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000500025>.

SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN, A. E.; CONRAD, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786–794, 1959. DOI: <https://doi.org/10.1177%2F004051755902901003>.

SHIN, S. K.; KOA, Y. J.; HYEON, J. E.; HAN, S. O. Studies of advanced lignin valorization based on various types of lignolytic enzymes and microbes. **Bioresource Technology**, v. 289, n. 121728, p. 1–8, 2019.

SINGH, M. P. **Biodegradation of lignocellulosic wastes through cultivation of *Pleurotus sajor-caju***. Science and Cultivation of Edible Fungi, Maastricht, Netherlands, 2000, p. 517–521.

SOLANILLA-DUQUE, J. F.; SALAZAR-SÁNCHEZ, M. D. R.; HERRERA, R. R. Potential of lignocellulosic residues from coconut, figue, and sugar cane as substrates for *Pleurotus* and *Ganoderma* in the development of biomaterials. **Environmental Quality Management**, p. 1–11, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1002/tqem.21826>.

SOLIKHIN, A.; HADI, Y. S.; MASSIJAYA, M. Y.; NIKMATIN, S.; SUZUKI, S.; KOJIMA, Y.; KOBORI, H. Properties of poly (vinyl alcohol)/chitosan nanocomposite films reinforced with oil palm empty fruit bunch amorphous lignocellulose nanofibers. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 8, p. 3316–3333, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1215-6>.

SOUSA, R. S.; NOVAIS, T. S.; BATISTA, F. O.; ZUÑIGA, A. D. G. Sensory analysis of cookie developed with pineapple shell flour (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, p. e45942816, 2020. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i4.2816>.

SIVARAMAKRISHNAN, R.; RAMPRAKASH, B.; RAMADOS, G.; SURESH, S.; PUGAZHENDHI, A.; INCHAROENSAKDI, A. High potential of *Rhizopus* treated rice bran waste for the nutrient-free anaerobic fermentative biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 319, n. 124193, p. 1-7, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124193>.

SILVA R. J. F.; POTIGUARA R. C. V. Substâncias ergásticas foliares de espécies amazônicas de *Oenocarpus* Mari. (Arecaceae): caracterização histoquímica e ultra-estrutural. **Acta Amazonica**, v. 39, n.4, p.793–798, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-4392201804751>.

SUMAN, S. K.; MALHOTRA, M.; KURMI, A. K.; NARANI, A.; BHASKAR, T.; GHOSH, S.; JAIN, S. I. Jute sticks biomass delignification through laccase-mediator system for enhanced saccharification and sustainable release of fermentable sugar. **Chemosphere**, v. 286, p. 131687, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131687>.

SUWANNARACH, N.; KUMLA, J.; ZHAO, Y.; KAKUMYAN, P. Cultivation Substrate and Microbial Community on Improving Mushroom Productivity: A Review. **Biology**, v. 11, n. 4, p. 569, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology11040569>.

TAVARWISA, D. M.; GOVERA, C.; MUTETWA, M.; NGEZIMANA, W. Evaluating the Suitability of Baobab Fruit Shells as Substrate for Growing Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*). **International Journal of Agronomy**, v. 2021, p. 1- 7, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/6620686>.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2ª ed. UFRGS, 1995, 174 p.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v. 46, p. 829–835, 1963.

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v. 51, p. 780–785, 1968.

XIROS, C.; SHAHAB, R. L.; STUDER, M. H. P. A cellulolytic fungal biofilm enhances the consolidated bioconversion of cellulose to short chain fatty acids by the rumen microbiome. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 8, p. 3355-3365, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09706-1>

YULISTIANI, D.; PUASTUTI, W.; WINA, E. Effect of processing on nutritive value of corn cobs: Chemical composition and in vitro digestibility. **Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner**, v. 17, n. 1, p. 59–66, 2012.

ZHANG, F.; LAN, W.; LI, Z.; ZHANG, A.; TANG, B.; WANG, H.; WANG, X.; REN, J.; LIU, C. Co-production of functional xylo-oligosaccharides and fermentable sugars from corn stover through fast and facile ball mill-assisted alkaline peroxide Pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 337, p. 125327, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125327>.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part II: fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocelluloses. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, p. 561–579, 2012.

5. CAPÍTULO 4 – Cultivo sólido de duas linhagens de *Pleurotus ostreatus* em resíduos lignocelulósicos

(Artigo a ser submetido após tradução)

CULTIVO SÓLIDO DE DUAS LINHAGENS DE *Pleurotus ostreatus* EM RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS DA AMAZÔNIA

Lorena Vieira Bentolila de Aguiar^{1,3}, Vítor Alves Pessoa², Paula Romenya dos Santos Gouvêa^{2,3}, Sérgio Dantas de Oliveira Júnior³, Carla Laize dos Santos Cruz Costa⁴, Ceci Sales-Campos³, Larissa Ramos Chevreuil³

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, BIONORTE, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Amazonas 69065-001, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas 69067-005, Brasil

³Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas 69067-375, Brasil

⁴Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Rio Grande do Norte 59064-741, Brasil

ABSTRACT

Pleurotus is a fungus present all over the world, known for having lower requirements regarding the substrate and temperature of cultivation, in addition to being more adaptable than other fungal species. However, each fungal strain may present a series of characteristics and nutritional and environmental preferences of its own. Thus, the objective of this research was to evaluate the productivity of different strains of *Pleurotus ostreatus* (codes 474 and 542), cultivated in lignocellulosic residues from the Amazon. *Pleurotus* strains were cultivated in substrates based on açai seed residues, pineapple crown and a mixture between these (1:1 m/m). Yield parameters and physicochemical and nutritional aspects of mushrooms were evaluated. In general, strain 542 showed higher biological efficiency (114.02%) and yield (379.68 g of mushroom per kg of substrate), being higher in all treatments tested. Among the productive flush, there was a decrease in biological efficiency and productivity between the first and the other flush, as well as variations in some nutritional characteristics of the mushrooms produced. The results obtained demonstrate the importance of choosing a good strain in obtaining a

productive crop, going beyond the choice of substrate for cultivation, as well as demonstrating, through the values of productivity and biological efficiency, the unfeasibility of the third production flush.

Keywords: Mushrooms; Fungiculture; Basidiomycetes; Productivity; Nutritional Aspects.

RESUMO

Pleurotus é um fungo presente em todo o mundo, conhecido por apresentar menores exigências quanto ao substrato e temperatura de cultivo, além de ser mais adaptável que outras espécies fúngicas. Entretanto, cada linhagem fúngica pode apresentar uma série de características e preferências nutricionais e ambientais próprias. Dessa forma, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar a produtividade de diferentes linhagens de *Pleurotus ostreatus* (códigos 474 e 542), cultivadas em resíduos lignocelulósicos da Amazônia. As linhagens de *Pleurotus* foram cultivadas em substratos à base de resíduos de semente de açaí, coroa de abacaxi e uma mistura entre esses (1:1 m/m). Parâmetros de produtividade e aspectos físico-químicos e nutricionais dos cogumelos foram avaliados. De modo geral, a linhagem 542 apresentou maior eficiência biológica (114,02%) e rendimento (379,68 g de cogumelo por Kg de substrato), sendo superior em todos os tratamentos testados. Entre os fluxos produtivos, observou-se um decréscimo da eficiência biológica e da produtividade entre o primeiro e os demais fluxos, bem como variações em algumas características nutricionais dos cogumelos produzidos. Os resultados obtidos demonstram a importância da escolha de uma boa linhagem na obtenção de um cultivo produtivo, indo além da própria escolha de substrato de cultivo, bem como demonstra, através dos valores de produtividade e eficiência biológica, a inviabilidade do terceiro fluxo de produção.

Palavras-chave: Cogumelos; Fungicultura; Basidiomicetos; Produtividade; Aspectos nutricionais.

1 Introduction

Os fungos são um grupo de seres heterotróficos fundamentais na ciclagem de nutrientes, com organizações celulares que variam de organismos unicelulares aos detentores de filamentos complexos capazes de formar estruturas macroscópicas, popularmente chamadas de cogumelos (NARANJO-ORTIZ E GABALDÓN, 2019). Denominados como macrofungos, os cogumelos, compreendidos em ascomicetos e basidiomicetos, são utilizados em uma variedade de aplicações biotecnológicas, como a produção de alimentos, enzimas e compostos farmacêuticos. Além disso,

devido ao valor nutricional e medicinal, podem ser considerados como alimentos suplementares e funcionais, fornecendo benefícios para a saúde além dos nutrientes (MADHANRAJ *et al.*, 2019).

O gênero *Pleurotus*, pertencente aos basidiomicetos, possui várias espécies que são consumidas, cultivadas e comercializadas, sendo *Pleurotus ostreatus* a mais representativa e de maior valor econômico (TÉLLEZ-TÉLLEZ; DIAZ-GODINEZ, 2019). Adicionalmente, *P. ostreatus* tem a capacidade de crescer mais rapidamente, se comparado a outros macrofungos, utilizando um espaço menor que diversas outras culturas agrícolas, com consumo de água reduzido (MUSWATI *et al.*, 2021). Entretanto, dentro da espécie, há uma variedade enorme de linhagens, com características e preferências únicas, sendo fundamental conhecer sobre suas particularidades para melhor aproveitamento (BAHR *et al.*, 2019).

Diante disso, aliar os conhecimentos acerca das variações entre as linhagens de *P. ostreatus*, bem como as alterações durante os fluxos produtivos, podem auxiliar na obtenção de uma maior produtividade, permitindo o desenvolvimento de estratégias de cultivo mais eficientes, bem como a obtenção de cogumelos com melhores características nutricionais. Assim, o presente estudo avaliou o desempenho de crescimento e o desenvolvimento de basidiocarpos de duas linhagens de *P. ostreatus*, cultivadas em diferentes resíduos lignocelulósicos, ao longo de 3 fluxos produtivos, verificando variações na produtividade e características nutricionais dos basidiocarpos produzidos.

2 Material e métodos

2.1 Material biológico

As linhagens de *Pleurotus ostreatus* (códigos 474 e 542) foram obtidas da Coleção de Microorganismos de Interesse Agrossilvicultural, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). A cepa 474 corresponde a um *P. ostreatus* isolado em Presidente Figueiredo-Amazonas, e 542 é proveniente de Mogi das Cruzes-São Paulo. Os resíduos de coroa de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill.) e semente de açaí (*Euterpe* sp. Mart.) foram coletados em feiras da cidade de Manaus-AM (3°06'06" S, 60°01'29" O), secos, triturados e armazenados.

2.2 Cultivo dos basidiomas

Para o preparo do *spawn* (pré-inóculo do cultivo sólido), discos de micélios de *P. ostreatus*, oriundos de placas de Petri com meio batata-dextrose-ágar (BDA), foram transferidos para frascos contendo os substratos (78%) compostos de resíduos de açaí, abacaxi ou açaí + abacaxi (1:1 m/m), suplementados com 20% de uma mistura de farelos de arroz, trigo e milho (60:20:20 m/m/m) e acrescidos de 2% de CaCO₃, ajustando o pH para 6. Antes da inoculação dos fungos, os substratos foram autoclavados a 121 °C. Após incubação desses frascos a 25 °C e colonização fúngica, 5% de

spawns foram transferidos para sacos de cultivo (preparados na mesma formulação do *spawn*), incubados a 25 °C e submetidos a 90% de umidade e fotoperíodo de 12 horas após a colonização. Os basidiomas produzidos foram coletados, liofilizados e moídos, separados por fluxo de produção.

2.3 Parâmetros de produção

A eficiência biológica (EB) foi calculada a partir da razão entre a massa fresca dos basidiocarpos e a massa seca dos substratos iniciais. O rendimento foi obtido a partir da razão entre a massa fresca dos basidiocarpos e a massa fresca dos substratos pós-cultivo e, a perda de matéria orgânica (PMO) foi determinada pela diferença entre a massa seca inicial e pós-cultivo dos substratos, dividida pela massa seca inicial dos substratos (SALES-CAMPOS; ANDRADE, 2011).

2.4 Parâmetros físico-químicos e nutricionais

A avaliação da composição centesimal foi realizada nos basidiocarpos (cogumelos) produzidos. O teor de umidade foi obtido por dessecação das amostras a 105 °C. Para o pH, 1 g de cogumelo triturado e liofilizado foi analisado em potenciômetro (IAL, 2008).

Para a determinação do carbono (Walkley-Black) amostras aquecidas (60 °C por 10 minutos) em $K_2Cr_2O_7$ e H_2SO_4 P.A, foram acrescidas de indicador difenilamina e H_3PO_4 após resfriamento e tituladas com $Fe (NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ (TEDESCO *et al.*, 1995). A determinação de nitrogênio (Kjeldahl) foi obtida a partir da digestão das amostras com H_2SO_4 em bloco digestor (350 °C), seguida de destilação com NaOH, recolhimento em solução de H_3BO_3 com indicadores vermelho de bromocresol e verde de metila e titulação com solução de HCl (TEDESCO *et al.*, 1995). O teor de proteína foi determinado a partir da conversão do valor de nitrogênio pelo fator 4,38 (FURLANI; GODOY, 2005) e a partir da proporção entre o teor de C e N foi obtida a relação C/N.

Na determinação das fibras totais, as amostras foram digeridas em soluções de H_2SO_4 e NaOH, secas a 105 °C e calcinadas a 550 °C por 4h (IAL, 2008). O teor de cinzas foi obtido a partir da calcinação das amostras a 550 °C por 4 h (IAL, 2008). Os lipídios foram quantificados a partir da extração a frio em clorofórmio, metanol e água, seguida de filtração e secagem até a evaporação do clorofórmio. Os carboidratos disponíveis foram obtidos por diferença, a partir da subtração dos teores de umidade, proteínas, lipídios, cinzas e fibras. Os carboidratos totais foram obtidos por diferença, a partir da subtração dos teores de umidade, proteína, lipídios e cinzas. A energia foi calculada usando o fator de conversão Atwater (NEPA, 2011).

A espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) foi utilizada para análise elementar e determinação da composição química das amostras, sendo realizada com o auxílio do

MEV, utilizando um espectrômetro de energia dispersiva de raios X modelo Hitachi SwiftED 3000, com detector de silício, resolução de 161 eV, com tensão de 15 kV.

2.5 Análise estatística

O experimento foi composto por duas linhagens fúngicas (474 e 542) de *P. ostreatus* e 3 substratos (Abacaxi – PC, Açaí – AS, Açaí + Abacaxi – PC + AS), em um esquema fatorial 2 x 3 com 14 repetições, totalizando 84 sacos (repetições). As análises físico-químicas e nutricionais das amostras foram realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos à ANOVA e comparados pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando o Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2019), a 5% de probabilidade.

3 Resultados e discussão

3.1 Cultivo das linhagens de *Pleurotus ostreatus*

O substrato à base de abacaxi (PC) foi o mais eficiente na conversão da biomassa vegetal em cogumelos, independentemente da linhagem avaliada. As duas linhagens, quando cultivadas em PC apresentaram maior eficiência biológica (EB) (Figura 1), maior rendimento de cogumelos por Kg de substrato cultivado (Figura 4) e maior perda de matéria orgânica (PMO) (Figura 7), com o substrato composto pela mistura de abacaxi e açaí (PC + AS) apresentando uma produção intermediária.

Quanto à EB dos cultivos em PC, a linhagem 542 foi 2 vezes superior comparada à 474 (Figura 1). Adicionalmente, os três tratamentos de 542 (PC, AS, PC + AS), juntamente com o melhor tratamento de 474 (474 PC), apresentaram eficiências biológicas adequadas para o cultivo de cogumelos comestíveis.

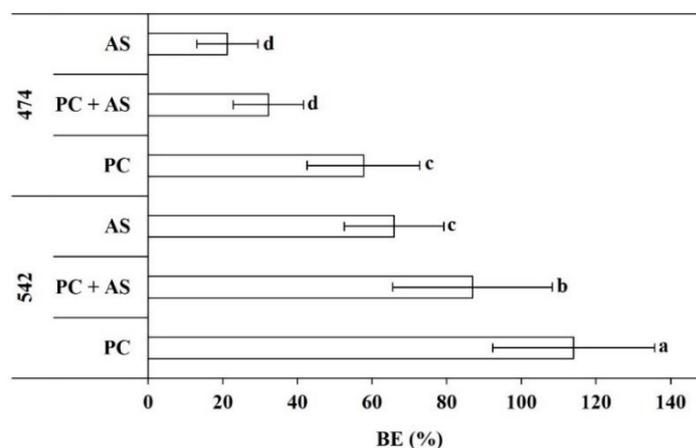


Figure 1 - Biological efficiency (BE) of strains 474 and 542 of *Pleurotus ostreatus* cultivated in substrates based on pineapple crown (PC), açaí seeds (AS) and a mixture of pineapple crown + açaí seeds (PC + AS).

A eficiência biológica, leva em consideração o total de produção de cogumelos, do início ao fim do cultivo, onde, na maioria das vezes, ocorre em dois ou 3 fluxos de produção. Esses fluxos são caracterizados pela frutificação dos cogumelos, seguido por uma breve estagnação da frutificação e, posterior retomada de um novo ciclo de produção de basidiomas. Assim, nesse estudo foi observado que alguns tratamentos apresentaram 2 fluxos (474 PC + AS e 474 AS) e outros 3 fluxos produtivos (542 PC, 542 PC + AS, 542 AS e 474 PC).

Ao verificar-se a linhagem 542 é nítida a diminuição da produção de basidiocarpos durante os fluxos, principalmente entre o primeiro e segundo fluxo. Ao passo que, 542 cultivado em PC + AS e AS não apresentaram diferença estatística na EB entre o segundo e o terceiro fluxo (Figura 2).

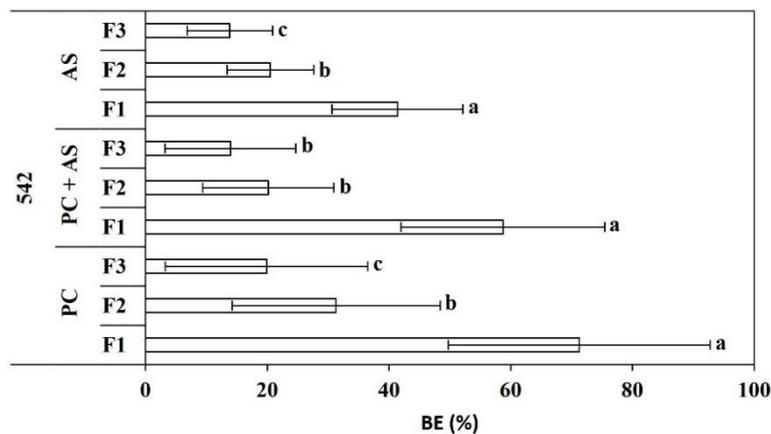


Figure 2 - Biological efficiency (BE) of strain 542 of *Pleurotus ostreatus* by production flush, cultivated in substrates based on pineapple crown (PC), açai seeds (AS) and a mixture of pineapple crown + açai seeds (PC + AS). F1: Flush 1; F2: Flush 2; F3: Flush 3.

Verificando-se a EB, por fluxo, para a linhagem 474 também é possível perceber que há uma diminuição da produção do primeiro ao último fluxo de cada tratamento, porém com menor diferença entre eles (Figura 3). Para a linhagem 474 cultivada em PC, o decréscimo é observado entre o segundo e o terceiro fluxo, enquanto 474 em PC + AS e AS apresentaram apenas dois fluxos produtivos, com decréscimo de 30% do primeiro para o segundo fluxo em PC + AS e de cerca de 20% do primeiro para o segundo fluxo em AS (Figura 3). Segundo Xu *et al.* (2020) os 1° e 2° fluxos são os que contribuem de forma significativa para o valor de BE, sendo claramente visível ao se observar a evolução da EB no decorrer dos fluxos de produção das linhagens 474 e 542 (Figura 2 e 3).

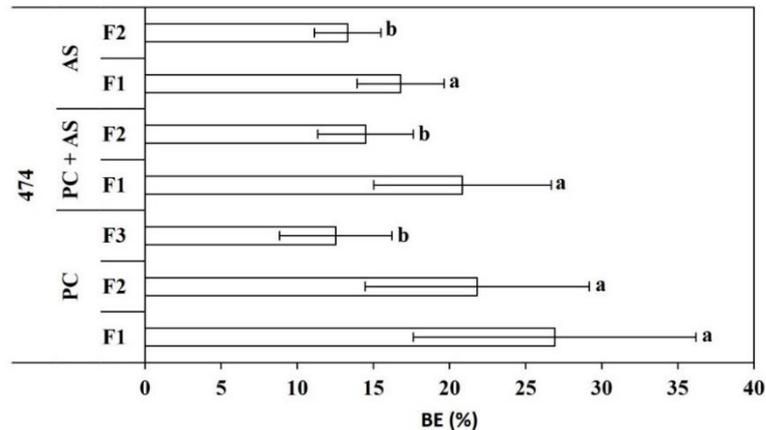


Figure 3 - Biological efficiency (BE) of strain 474 of *Pleurotus ostreatus* by production flush, cultivated in substrates based on pineapple crown (PC), açai seeds (AS) and a mixture of pineapple crown + açai seeds (PC + AS). F1: Flush 1; F2: Flush 2; F3: Flush 3.

Segundo Gume, Muleta e Abate (2013), substratos que apresentem uma eficiência biológica de pelo menos 40% podem ser recomendados para o cultivo de cogumelos do gênero *Pleurotus*. Ríos *et al.* (2010) relatam que uma EB deveria apresentar o valor mínimo de 40% para que possa ser considerado economicamente rentável um cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Entretanto, para Piña-Guzmán, Nieto-Monteros, Robles-Martínez (2016) uma EB adequada deve estar em torno ou maior que 100%, visto que os produtores de cogumelos visam a obtenção de alto rendimento.

Muswati *et al.* (2021) obtiveram eficiências biológicas que variaram de 42,5% para Trt6 (composto por 50% de palha de trigo e 50% de cascas de frutos de baobá) a 86,15% para Trt1 (composto por 100% de resíduo de algodão), valores próximos aos obtidos para a maioria dos tratamentos nesse estudo. Holgado-Rojas *et al.* (2019) observaram que o tipo de substrato utilizado influenciou a EB de *P. ostreatus*, apresentando 43% de EB quando cultivado em cascas de milho e, ao acrescentar sabugo de milho e cascas de feijão, observou-se um aumento na produção de cogumelos, atingindo 52,2% de eficiência.

Com relação ao rendimento de cogumelos em gramas por Kg de substrato de cada tratamento, assim como em EB, a linhagem 542 obteve os maiores rendimentos de cogumelo, principalmente quando cultivado em PC (379,7 g/Kg). Este substrato também proporcionou o maior rendimento de 474, com valores de 191,0 g/Kg (Figura 4). Os valores obtidos nos tratamentos da linhagem 542 (PC, PC + AS e AS) e de 474 (PC) demonstram que essas combinações são adequadas para o cultivo de cogumelos, com destaque para PC.

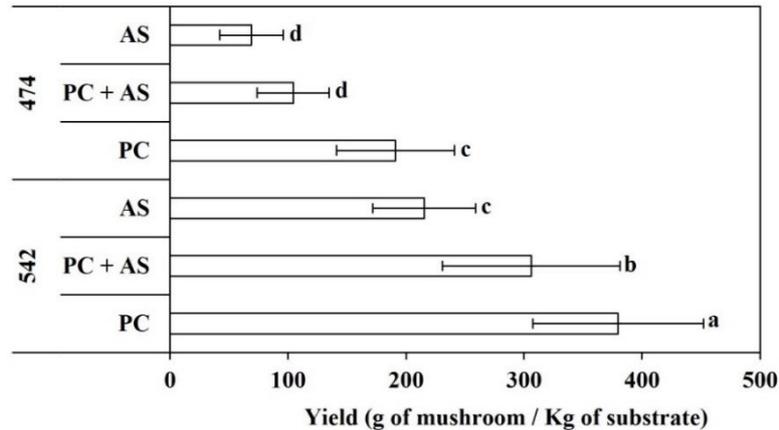


Figure 4 - Yield of strains 474 and 542 of *Pleurotus ostreatus* cultivated in substrates based on pineapple crown (PC), açai seeds (AS) and a mixture of pineapple crown + açai seeds (PC + AS).

Quanto ao rendimento por fluxos, a linhagem 542 apresentou diminuição do rendimento de cogumelos de acordo com o avanço dos fluxos de produção, com decréscimo progressivo ao longo dos 3 fluxos quando cultivado em PC e AS, ao passo que em PC + AS não houve diferença estatística entre o fluxo 1 (F1) e 3 (F3), com redução de 65% do rendimento entre F1 e o fluxo 2 (F2) (Figura 5). Segundo Xiong *et al.* (2018), o fluxo 1 de seus tratamentos, que também apresentaram um total de 3 fluxos, obteve de 60-75% do total de rendimento dos 3 fluxos. Da mesma forma, a linhagem 542 obteve cerca de 60% do rendimento em F1 para os três substratos avaliados (Figura 5).

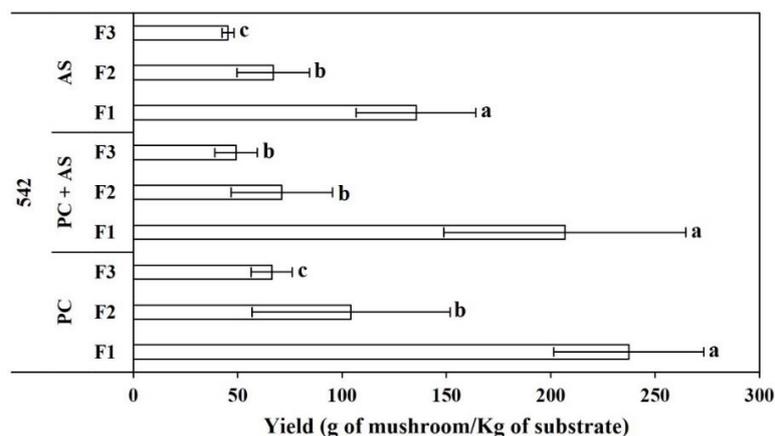


Figure 5 - Yield of strain 542 of *Pleurotus ostreatus* by production flush, cultivated in substrates based on pineapple crown (PC), açai seeds (AS) and a mixture of pineapple crown + açai seeds (PC + AS). F1: Flush 1; F2: Flush 2; F3: Flush 3.

O rendimento por fluxos da linhagem 474, conforme observado para a linhagem 542, também reduziram com o decorrer dos fluxos produtivos, exceto para o tratamento em AS, cujo rendimento foi estatisticamente equivalente entre F1 e F2. O tratamento 474 PC apresentou um decréscimo de

cerca de 45% entre F1 e F3, enquanto em 474 PC + AS, a diminuição do rendimento de F1 para F2 representa uma perda de cerca de 20% em relação à produção no início do cultivo, não sendo economicamente viável o terceiro fluxo (Figura 6).

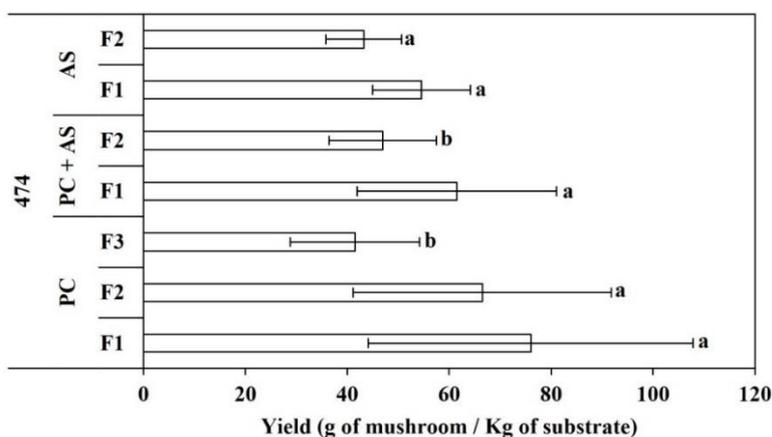


Figure 6 - Yield of strain 474 of *Pleurotus ostreatus* by production flush, cultivated in substrates based on pineapple crown (PC), açai seeds (AS) and a mixture of pineapple crown + açai seeds (PC + AS). F1: Flush 1; F2: Flush 2; F3: Flush 3.

Segundo Banasik *et al.* (2017), um mesmo substrato pode ser utilizado para obter vários fluxos de produção de cogumelos, não podendo ser utilizado por mais de 3 fluxos devido ao aumento dos riscos de contaminações e pragas. Adicionalmente, a produtividade do substrato reduz a cada fluxo de produção, devendo o cultivo de cogumelos ser conduzido até dois fluxos produtivos, visando obter lucro máximo (BANASIK *et al.* 2017; BANASIK *et al.* 2019).

Outro aspecto importante a ser analisado é que, geralmente, considera-se que o substrato tem um bom índice de rendimento/produtividade de cogumelos quando este apresenta valores superiores a 10% (ou g/100 g) de cogumelos frescos em relação ao substrato úmido (SIQUEIRA *et al.*, 2011). De acordo com Gume, Muleta e Abate (2013), variações significativas no rendimento entre os substratos demonstram a qualidade e quantidade de componentes nutritivos dos substratos.

Muswati *et al.* (2021) constataram que misturar substratos pode auxiliar o aumento do rendimento de cogumelos, pois, obtiveram excelentes resultados em uma das misturas testadas, o que pode permitir a melhoria da composição e características como retenção de água, a porosidade e estrutura desse substrato, permitindo uma melhor troca gasosa, podendo até mesmo melhorar a relação C/N dos substratos escolhidos.

Ainda que PC + AS não tenha proporcionado o melhor rendimento e a melhor eficiência biológica, a mistura apresentou um resultado superior ao substrato composto somente por açai (AS), possivelmente, por ter melhorado a aeração e retenção de água, visto que as características da semente

de açaí podem tornar o substrato mais compactado, além de ser um material de baixa capacidade de absorção de água. Além disso, como relatado por Muswati *et al.* (2021), pode ser uma excelente opção para um produtor que não esteja com quantidade suficiente de um determinado material.

Quanto à perda de matéria orgânica (PMO) após o cultivo das duas linhagens de *Pleurotus ostreatus*, assim como observado para os demais parâmetros produtivos, 542 quando cultivado em PC destacou-se com a maior PMO (59,70%), seguido de 474 PC (44,11%). Nos demais substratos a PMO foi reduzida em 72% em 542 PC + AS e 85% em 542 AS, em relação à 542 PC, enquanto para a linhagem 474 as reduções foram de 54% para PC + AS e 75% para AS, comparado ao valor de obtido em PC (Figura 7). Zadrazil (1978) relatou que a PMO não somente envolve a degradação do material pelo fungo, devido a formação do cogumelo, mas também pode aumentar por uma série de fatores, como à perda de CO₂ e H₂O durante todo o processo de cultivo.

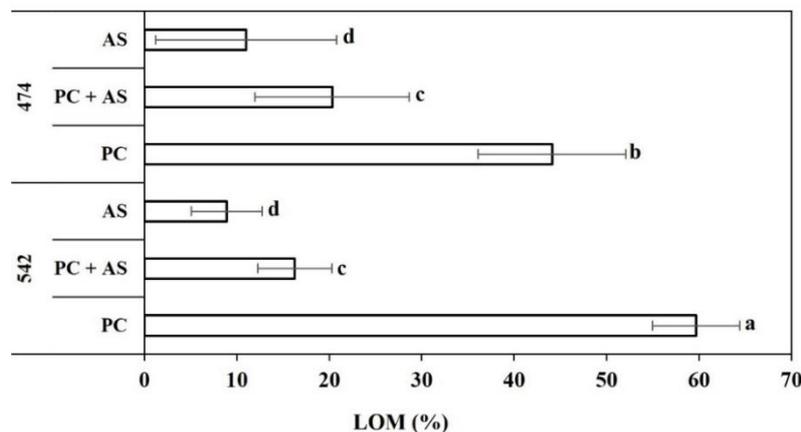


Figure 7 - Loss of Organic Matter (LOM) of strains 474 and 542 of *Pleurotus ostreatus* grown on substrates based on pineapple crown (PC), açaí seeds (AS) and a mixture of pineapple crown + açaí seeds (PC + AS). F1: Flush 1; F2: Flush 2; F3: Flush 3.

3.2 Caracterização dos cogumelos produzidos por fluxos

A composição dos substratos lignocelulósicos é um dos fatores que podem afetar o crescimento do micélio, a produção e a qualidade dos cogumelos (Rezaeian *et al.*, 2021). Adicionalmente, o substrato também pode influenciar o valor nutricional e o conteúdo bioativo dos cogumelos (Atila *et al.*, 2017; Carrasco *et al.*, 2018).

A Tabela 1 demonstra a redução gradual nos teores de umidade dos cogumelos durante os fluxos produtivos, com os cogumelos do F3 apresentando teores de umidade de 79,34% para 542 AS a 86,49% para 542 PC, enquanto os cogumelos do primeiro fluxo (F1) apresentaram teores de 87,22% para 542 PC a 94,73% para 474 AS.

Table 1 – Physicochemical characterization of basidiocarps of strains 474 and 542 of *Pleurotus ostreatus*, by production flush, when cultivated in substrates based on pineapple crown (PC), açai seeds (AS) and mixture of pineapple crown and açai seeds (PC + AS).

		Moisture (%)	pH	Carbon (%)	Nitrogen (%)	C/N	Ashes (%)	
Flush 1	474	PC	90.06Ac ± 3.73	6.08Ke ± 0.01	41.18Ec ± 0.00	5.22Bc ± 0.00	7.89Id ± 0.00	7.87Aa ± 0.07
		AS	94.73Aa ± 2.98	6.33Aa ± 0.01	31.32Ie ± 0.58	4.47Fe ± 0.00	6.22Ke ± 0.11	6.06Cb ± 0.09
		PC + AS	92.41Ab ± 3.67	6.11Jd ± 0.01	39.05Fd ± 0.84	5.03Cd ± 0.00	8.73Fb ± 0.19	6.86Bb ± 0.02
		PC	87.22Bd ± 1.40	6.33Aa ± 0.01	45.13Ba ± 0.33	3.92Hf ± 0.00	11.52Ca ± 0.08	6.22Cb ± 1.11
		AS	91.63Ab ± 2.43	6.32Bb ± 0.01	45.13Ba ± 0.33	5.60Aa ± 0.00	8.06Hc ± 0.06	6.15Cb ± 0.10
		PC + AS	88.02Bd ± 3.15	6.29Cc ± 0.01	42.61Db ± 0.33	5.23Bb ± 0.00	8.16Hc ± 0.06	6.18Cb ± 0.05
Flush 2	474	PC	87.47Ba ± 0.44	6.20Fd ± 0.00	36.44He ± 1.08	5.22Ba ± 0.00	6.98Jf ± 0.00	7.48Aa ± 0.46
		AS	85.32Ba ± 7.34	6.21Fd ± 0.01	41.37Ed ± 0.88	4.85Db ± 0.00	8.54Ge ± 0.18	6.08Cd ± 0.02
		PC + AS	86.36Ba ± 1.91	6.24Db ± 0.01	37.89Ge ± 0.33	4.29Ge ± 0.00	8.84Fd ± 0.08	6.38Cc ± 0.02
		PC	88.93Ba ± 1.68	6.19Ge ± 0.01	46.68Aa ± 0.33	3.91Hf ± 0.00	11.92Ba ± 0.08	6.46Cc ± 0.10
		AS	90.87Aa ± 3.39	6.23Ec ± 0.01	42.61Dc ± 0.33	4.66Ec ± 0.00	9.14Ec ± 0.08	5.81Ce ± 0.09
		PC + AS	90.36Aa ± 1.28	6.32Ba ± 0.00	43.97Cb ± 0.33	4.47Fd ± 0.00	9.83Db ± 0.07	6.68Bb ± 0.05
Flush 3	474	PC	79.39Ca ± 1.86	6.16Ic ± 0.01	37.77Gb ± 0.00	4.85Da ± 0.00	7.79Id ± 0.00	6.69Bc ± 0.06
		PC	86.49Ba ± 3.04	6.17Hb ± 0.01	45.32Ba ± 0.00	3.73Ic ± 0.00	12.16Aa ± 0.01	6.89Bb ± 0.08
		AS	79.34Ca ± 8.47	6.18Hb ± 0.00	38.35Gb ± 0.58	4.66Eb ± 0.00	8.23Hc ± 0.12	6.06Cd ± 0.02
		PC + AS	85.43Ba ± 5.49	6.22Ea ± 0.00	45.13Ba ± 0.33	4.85Da ± 0.00	9.31Eb ± 0.07	7.02Ba ± 0.01

Means ± standard deviation followed by uppercase letters compare basidiocarps within each strain and lowercase letters compare basidiocarps across all substrates and strains. Means were compared using the Scott-Knott Test ($p < 0.05$)

Os valores de umidade entre os cogumelos do primeiro e do segundo fluxo estão dentro da faixa relatada por Silva *et al.* (2020), que ao estudarem *Pleurotus ostreatus* obtiveram valores de umidade de 92,36%. De modo geral, pode-se observar uma redução na umidade dos cogumelos de acordo com os fluxos de produção, possivelmente ligada à perda de água para o ambiente e ao próprio consumo da água oriunda da formulação do substrato, durante toda a produção, visto que também houve perdas de água no substrato durante os fluxos.

Para os cogumelos, os valores de pH entre os fluxos variaram de 6,08 para 474 PC F1 a 6,33 para 474 AS F1 e 542 PC F1 (Tabela 1). Normalmente, o desenvolvimento do corpo de frutificação é estabelecido em substratos com pH na faixa de 6,0 - 7,0, enquanto os basidiocarpos produzidos costumam apresentar pH entre 6 - 6,5 (BELLETTINI *et al.*, 2019).

O teor de carbono (C%) foi superior nos basidiocarpos da cepa 542, para todos os substratos avaliados, com aumento na concentração no decorrer dos fluxos produtivos, exceto em AS. A cepa 474 não apresentou um padrão entre os fluxos, com diminuição dos teores em PC e aumento em AS, ao passo que em PC + AS observou-se um aumento no conteúdo de C% no F2 e, diminuição em PC F3, sendo o único substrato que proporcionou uma produção de 474 até o terceiro fluxo (Tabela 1).

Nos cogumelos, o teor de carbono se manteve na faixa de 30-45% enquanto os valores de nitrogênio variaram de 3,73% para 542 PC F3 a 5,60% para 542 AS F1 (Tabela 1). A linhagem 474 apresentou maiores teores de C e N ao ser cultivada em PC, ao passo que 542 apresentou maiores teores desses elementos quando cultivada em AS, tanto no F1 quanto no F2. No entanto, PC é o substrato que apresenta maior teor de C e N em relação aos outros substratos (PC + AS e AS) (dados não publicados). Esse fato demonstra que as linhagens apresentam diferentes formas de aproveitamento dos substratos na formação dos seus basidiomas.

Já é relatada na literatura a variação da composição nutricional dos basidiocarpos em função das variações genéticas que ocorrem entre linhagens de uma mesma espécie, bem como a presença de um aporte enzimático diferenciado em cada uma dessas linhagens (Jin *et al.*, 2018; Singh; Pradhan, 2020). Esses fatores podem influenciar na forma como o substrato é degradado, permitindo ao fungo utilizar de forma mais efetiva um resíduo em relação ao outro.

O carbono é um elemento de suma importância para os cogumelos, sendo essencial no crescimento fúngico, fornecendo aporte energético para a formação dos basidiocarpos e síntese de macromoléculas. Complementarmente, o nitrogênio exerce papel fundamental na síntese proteica desses cogumelos (Chang; Miles, 2004; Anike; Yusuf; Isikhuemhen, 2016). Assim, de modo geral, a produção de basidiocarpos demanda carbono, nitrogênio e compostos inorgânicos (cinzas/minerais) como fontes nutricionais (Besufekad *et al.*, 2020).

Nos basidiocarpos, o teor de cinzas variou de 5,81 a 7,87% entre todos os fluxos, sendo os maiores valores observados nos fluxos 1 e 2 da cepa 474 cultivada em PC. Em 542, a tendência foi aumentar o teor de cinzas ao longo dos fluxos de produção, exceto para os basidiocarpos produzidos em AS (Tabela 1). Os teores obtidos no presente estudo foram próximos aos relatados por Bach *et al.* (2017), ao avaliarem 4 espécies de *Pleurotus* obtidas no mercado, em que observaram variação de 6,93 a 8,17% no percentual de cinzas, estando dentro da faixa comumente descrita para as espécies de *Pleurotus*. Para Goswami *et al.* (2021), o teor de cinzas obtido por *P. ostreatus* demonstra a presença de uma quantidade considerável de minerais, fundamentais na constituição dos basidiocarpos.

Quanto às fibras totais, o substrato à base de sementes de açaí proporcionou cogumelos com maiores teores de fibras. Dentre as linhagens estudadas, 542 apresentou maiores teores de fibras, variando de 8,65 a 14,12%, com reduções desses percentuais ao longo dos fluxos de produção (Tabela 2). Em contrapartida, os cogumelos produzidos no substrato PC apresentaram os menores teores de fibras totais, variando de 5,24 para 474 a 11,69% para 542, no fluxo 1 (Tabela 2).

De modo geral, houve decréscimo nos teores de fibras totais com o decorrer dos fluxos de produção, independente do fungo ou substrato utilizado, onde os basidiocarpos produzidos no primeiro fluxo apresentaram maior teor de fibras totais em relação aos basidiocarpos do último fluxo de produção de cada tratamento. Silva *et al.* (2020) observaram teores de fibras variando de 12,4% a 15,4 % no cultivo de *P. ostreatus* em resíduos do processamento do mesocarpo do fruto de palma e da casca da amêndoa do cacau, sendo esses valores próximos aos obtidos para a maioria dos basidiocarpos de 542. É importante ressaltar que, enquanto fonte alimentícia, os cogumelos comestíveis são ricos em fibras solúveis e insolúveis e seu consumo na dieta ocasiona efeitos fisiológicos benéficos ao organismo, promovendo a saúde intestinal (Sardar *et al.*, 2022; Usman, Murtaza, Ditta, 2021).

Os teores proteicos, assim como observado para o nitrogênio, sofreram redução no decorrer dos 3 fluxos de produtivos para todos os tratamentos, independente da linhagem cultivada e do substrato utilizado. Os basidiocarpos de 474 cultivados em PC apresentaram maiores conteúdos proteicos, enquanto o substrato AS proporcionou maiores teores de proteínas em 542 (Tabela 2).

Table 2 – Centesimal composition of basidiocarps of strains 474 and 542 of *Pleurotus ostreatus*, by production flush, when cultivated in substrates based on pineapple crown (PC), açai seeds (AS) and mixture of pineapple crown and açai seeds (PC + AS).

		Total fibers (%)	Total proteins (%)	Lipids (%)	Total Carbohydrates (%)	Available Carbohydrates (%)	Energy (kcal / 100g)	
Flush 1	474	PC	5.24Ge ± 0.65	22.86Cc ± 0.00	2.84Gd ± 0.05	59.74Gb ± 0.29	54.17Ca ± 0.42	333.69Ba ± 1.94
		AS	13.43Bb ± 0.43	22.04Dd ± 0.01	4.50Aa ± 0.08	59.86Gb ± 0.09	46.43Hc ± 0.36	314.37Ed ± 0.83
		PC + AS	7.71Fd ± 0.12	19.59Ge ± 0.00	4.12Cb ± 0.02	60.46Fb ± 0.57	52.75Da ± 0.45	326.50Cb ± 1.62
	542	PC	11.69Cc ± 0.05	17.15If ± 0.01	3.84Dc ± 0.05	64.89Ca ± 1.41	53.20Da ± 1.36	315.95Ed ± 5.17
		AS	14.12Aa ± 0.27	24.51Aa ± 0.01	3.91Dc ± 0.05	59.71Gb ± 0.22	45.59Hc ± 0.49	315.58Ed ± 2.12
		PC + AS	13.10Bb ± 0.58	22.89Bb ± 0.01	4.46Aa ± 0.09	60.58Fb ± 0.34	47.48Gb ± 0.54	321.67Dc ± 2.83
Flush 2	474	PC	5.37Ge ± 0.04	22.86Ca ± 0.01	3.84Db ± 0.07	58.88Gd ± 0.11	53.51Db ± 0.08	340.00Aa ± 0.31
		AS	7.32Fd ± 0.09	21.22Eb ± 0.02	2.80Gd ± 0.06	63.21Db ± 0.34	55.89Ba ± 0.25	333.67Bb ± 0.47
		PC + AS	6.12Ge ± 0.06	18.77He ± 0.01	4.16Ca ± 0.07	62.40Ec ± 0.27	56.27Ba ± 0.33	337.67Aa ± 0.94
	542	PC	10.41Dc ± 0.80	17.15If ± 0.01	4.10Ca ± 0.05	67.49Aa ± 0.05	57.08Aa ± 0.81	333.84Bb ± 3.21
		AS	13.93Aa ± 0.76	20.42Fc ± 0.02	3.31Ec ± 0.05	63.64Db ± 0.09	49.71Fd ± 0.83	310.34Fd ± 3.55
		PC + AS	11.81Cb ± 0.73	19.58Gd ± 0.00	3.85Db ± 0.09	63.44Db ± 0.22	51.63Ec ± 0.51	319.50Dc ± 1.97
Flush 3	474	PC	5.37Gd ± 0.30	21.23Ea ± 0.01	3.95Db ± 0.04	59.45Gc ± 0.20	53.94Cb ± 0.47	336.21Aa ± 2.16
		PC	8.65Ec ± 0.06	16.33Jc ± 0.01	3.05Fc ± 0.06	65.64Ba ± 0.09	56.99Aa ± 0.05	320.72Db ± 0.44
	542	AS	13.44Ba ± 0.32	20.41Fb ± 0.02	2.76Gd ± 0.06	64.54Cb ± 0.25	51.14Ec ± 0.26	311.05Fd ± 1.62
		PC + AS	11.81Cb ± 0.86	21.23Ea ± 0.02	4.29Ba ± 0.06	59.92Gc ± 0.67	48.12Gd ± 0.41	316.05Ec ± 2.07

Means ± standard deviation followed by uppercase letters compare basidiocarps within each strain and lowercase letters compare basidiocarps across all substrates and strains. Means were compared using the Scott-Knott Test ($p < 0.05$).

O teor proteico de cogumelos varia conforme sua estrutura física (tamanho do píleo) e genética, entre espécies e entre linhagens, além de fatores como a composição do substrato de cultivo e o tempo de colheita (BANO; RAJARATHNAM; STEINKRAUS, 1988). Silva *et al.* (2007) verificaram que no cultivo de *P. sajor-caju*, quando cultivados em substratos com maiores teores de N e, conseqüentemente, proteína, possuíam também os maiores teores de N e proteína, sendo diretamente proporcionais, corroborando com o observado para os cogumelos 474 e 542 cultivado em PC e AS, respectivamente (Tabela 2). Vale destacar que, as proteínas oriundas dos basidiocarpos, além de servirem como fonte suplementar de proteínas na alimentação, contendo cerca de 20 a 25% de proteínas por kilo de cogumelo seco, possuem todos os 9 aminoácidos essenciais para o organismo humano, além de aminoácidos não essenciais como o neurotransmissor GABA (ASSEMIE; ABAYA, 2022).

Para os lipídios, houve pouca variação entre as cepas e os substratos avaliados, durante os diferentes fluxos. Para tanto, pode-se inferir que houve aumento no conteúdo de lipídios em 474 cultivado em PC do F1 ao F3 e, quando cultivado na mistura PC + AS o teor lipídico foi constante entre os fluxos. Ao passo que 542 em AS apresentou redução no conteúdo de lipídios ao longo dos fluxos produtivos (Tabela 2). Muitos fatores ambientais podem afetar o conteúdo lipídico em cogumelos, estando essas variações associadas às condições de crescimento, oxigênio disponível, temperatura (SUUTARI, 1995) e, principalmente, dependentes da natureza do substrato (RAMAN *et al.*, 2021). Os teores de lipídios presentes em diferentes espécies de *Pleurotus* variam de 0,9 a 7,5% no cogumelo seco (LAVELLI *et al.*, 2018). Adicionalmente, do ponto de vista alimentar, os lipídios dos cogumelos apresentam vários ácidos graxos fundamentais como ácido linoleico, oleico e palmítico (ASSEMIE; ABAYA, 2022).

Os basidiocarpos produzidos apresentaram aumento no conteúdo de carboidratos totais (CT) para a maioria dos tratamentos, principalmente em 474 PC + AS, 474 AS e 542 AS, do primeiro ao último fluxo. O teor de carboidratos totais foi constante para os fluxos de 474 PC, enquanto 542 em PC e PC + AS tiveram um aumento do F1 para F2 e, posterior declínio em F3 (Tabela 2). Fozia *et al.* (2022) cultivaram linhagens de *Pleurotus* em resíduo de algodão e observaram teor de carboidratos totais entre 58% e 62,66%, corroborando com os valores encontrados no presente trabalho. Adicionalmente, nas espécies de *Pleurotus*, os carboidratos são os maiores constituintes químicos, compreendendo cerca de 46.6 a 81.8% em relação à base seca (SINGH; SINGH, 2021).

Em relação aos fluxos de produção, os cogumelos apresentaram aumento nos valores de carboidratos disponíveis (CD) entre o F1 e F2. A cepa 542, para todos os substratos avaliados, exibiu aumento no teor de CD entre os fluxos F1 e F2, seguido de decréscimo entre F2 e F3, exceto em AS (Tabela 2). Segundo Nadjombé *et al.* (2022), as variações nos teores de carboidratos disponíveis estão relacionadas às características dos substratos (tipo, disponibilidade de elementos/nutrientes e conteúdo de minerais) e dos cogumelos (capacidade de absorção do fungo, características genéticas e idade). No âmbito da nutrição, os carboidratos são basais na alimentação humana, sendo os cogumelos uma fonte de carboidratos digeríveis (glicose, manitol, glicogênio) e não digeríveis (trealose, mananas e β -glucanas) (Usman; Murtaza; Ditta, 2021).

Quanto ao valor energético, constatou-se um aumento nos valores de energia (kcal/100g) nos basidiocarpos de 474, em todos os substratos avaliados, no decorrer dos fluxos. Contrariamente, para 542 verificou-se uma diminuição dos valores energéticos entre os fluxos produtivos, quando cultivados em AS e PC + AS, variando de 321,67 a 310,34 kcal / 100g (Tabela 2). Os valores de energia dos cogumelos são normalmente baixos, sendo benéficos para a saúde (Vetter, 2019).

Akyüz, İnci, Kirbağ (2022) obtiveram valores similares para *Pleurotus pulmonarius* cultivado em 3 diferentes formulações de substratos à base de alfafa, cujas energias metabolizáveis variaram de 311 a 313 kcal. Oka *et al.* (2020) obtiveram basidiocarpos de *P. geesteranus* que variaram de 346,6 a 350,7 kcal / 100g, aumentando conforme o tempo de colheita, assim como observado para o fungo 474.

No que diz respeito à composição de elementos químicos dos basidiocarpos, o potássio (K) foi detectado em todos os fluxos (F1 e F2), com os maiores valores verificados nos primeiros fluxos de 474 e 542 cultivados em PC. Cloro (Cl) e magnésio (Mg) foram encontrados apenas em alguns basidiocarpos, sendo observado para 542 a presença de Cl apenas em F2 no substrato PC, ao passo que o Mg não foi detectado em PC + AS. O carbono (C) foi o elemento em maior concentração nos basidiocarpos, com destaque para 474 em PC. A presença de fósforo (P) foi observada em todos os fluxos e, assim como para o carbono, 474 em PC exibiu os maiores teores de P. O alumínio (Al), por sua vez, foi detectado apenas nos primeiros fluxos (F1) de 474 em PC + AS e de 542 AS, podendo a presença desse elemento estar associada ao espalhamento das amostras no *stub* (porta amostra), que possui natureza metálica (Tabela 3).

Table 3 – Contents of chemical elements by Energy Dispersion X-ray Spectroscopy (EDS) of basidiocarps of strains 474 and 542 of *Pleurotus ostreatus*, by production flush, when cultivated in substrates based on pineapple crown (PC), açai seeds (AS) and a mixture of pineapple crown and açai seeds (PC + AS). F1: Flush 1; F2: Flush 2.

Elements	Atomic Concentration (%)											
	474						542					
	PC		AS		PC + AS		PC		AS		PC + AS	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2
K	9.55	4.44	2.84	3.18	5.67	3.49	7.24	3.75	5.44	5.16	3.73	4.44
Cl	0.22	0.78	-	-	-	0.41	-	0.20	-	-	-	-
Mg	0.25		-	3.09	0.63	0.42	-	0.35	0.17	0.68	-	-
C	60.21	20.82	17.43	15.33	-	23.08	-	22.53	7.89	9.18	7.46	10.22
P	2.38	1.14	1.36	1.54	2.11	1.29	1.83	1.31	1.89	2.05	1.39	1.71
S	0.70	0.32	0.56	0.79	0.60	0.44	0.39	0.22	0.51	0.54	0.15	0.59
Al	-	-	-	-	0.31	-	-	-	0.34	-	-	-

K (Potassium), Cl (Chlorine), Mg (Magnesium), C (Carbon), P (Phosphorus), S (Sulfur), Al (Aluminium).

A composição mineral de *P. ostreatus* apresenta uma série de microelementos que representam um aporte dessas substâncias para a alimentação humana. Entre os minerais presentes em *P. ostreatus*, o mais representativo é o K, que corresponde à metade do teor de cinzas dos cogumelos (SINGH; SINGH, 2021), estando atrás apenas do carbono. Adicionalmente, os elementos K, P, Mg Na e Ca constituem até 70% do teor total de cinzas dos basidiocarpos (SINGH; SINGH, 2021), corroborando com os resultados obtidos pela técnica de EDS, onde foram detectados os elementos K, P e Mg (Tabela 3).

O potássio é um mineral essencial para os seres humanos manterem as funções normais de todas as células, incluindo as células nervosas e musculares (FALANDYSZ *et al.*, 2020). O cloro presente na constituição dos basidiomas é um dos principais minerais do meio extracelular do plasma sanguíneo humano (MIGUEL *et al.*, 2018). A presença de magnésio em cogumelos é de grande importância na dieta alimentar, auxiliando na ativação da vitamina D, além de participar da síntese proteica e auxiliar no ganho de massa muscular (DRONKELAAR *et al.*, 2018). A presença de carbono (C) nos alimentos na forma de hidratos é uma fonte energética na dieta alimentar (WANG *et al.*, 2022). A presença de fósforo nos basidiocarpos é valorosa, pois esse elemento, quando ingerido na dieta humana, pode auxiliar na redução da fraqueza muscular (DRONKELAAR *et al.*, 2018). O enxofre detectado nos cogumelos, por sua vez, é

capaz de potencializar a ação de vitaminas essenciais ao nosso organismo, além de constituir proteínas e aminoácidos (ROLIM *et al.*, 2020).

Priyadarshni *et al.* (2022) destacam que *Pleurotus florida* forneceu uma quantidade valorosa de minerais em comparação a alguns vegetais, encontrando minerais como potássio, fósforo, magnésio e cálcio, com vestígios de sódio, ferro e zinco. Esses minerais podem ser empregados para aumentar o perfil nutricional de cogumelos produzidos visando consumo alimentar, por meio de abordagens de biofortificação. Adicionalmente, a literatura relata que os cogumelos são bioconversores e bioacumuladores de diversos elementos (MLECZEK *et al.*, 2020).

A técnica de EDS, apesar de ser vantajosa devido à sua capacidade de fornecer uma análise qualitativa e semiquantitativa com rapidez e maior agilidade, apresenta limitações, como baixa sensibilidade a oligoelementos (VIEIRA *et al.*, 2021). Ademais, durante a excitação eletrônica pode haver perda de elementos voláteis (VIEIRA *et al.*, 2021). Sendo assim, as variações e não detecções de elementos presentes neste estudo também podem estar associadas às limitações da técnica de EDS.

5 Conclusão

O presente estudo avaliou o desempenho de crescimento e o desenvolvimento de basidiocarpos de duas linhagens de *P. ostreatus* cultivadas em resíduos lignocelulósicos distintos, durante 3 fluxos de produção, verificando variações na produtividade e em características nutricionais dos basidiocarpos produzidos. Dentre as duas linhagens testadas, 542 apresentou maior desempenho produtivo, principalmente quando cultivado em resíduos de abacaxi, recomendando-se a produção de basidiocarpos até o segundo fluxo. Quanto aos parâmetros nutricionais, a cepa 474 sobressaiu em relação aos teores de proteínas, carboidratos disponíveis, teor calórico e minerais, contudo, a cepa 542 também apresentou características nutricionais adequadas para suplementação alimentar.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTIC) / Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e às agências de fomento à pesquisa CAPES (Projeto Pró-Amazônia nº 3251/2013), CNPQ (Projeto Universal nº

461729/2014-8) e FAPEAM (Projeto n° 062.00648/2015), pelo financiamento e concessão de bolsas de pós-graduação e apoio técnico.

Referências

AGUIAR, L. V. B.; GOUVÊA, P. R. S.; OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; SALES-CAMPOS, C.; CHEVREUIL, L. R. Production of commercial and Amazonian strains of *Pleurotus ostreatus* in plant waste. *Brazilian Journal of Development*, v. 8, n. 6, p. 47299-47321, 2022, DOI:10.34117/bjdv8n6-299.

ABREU, C. G. DE *et al.* Spent mushroom substrate *Agaricus bisporus* in the production of pepper seedlings. *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 19, n. 2, p. 161–167, 2020.

AKYÜZ, M. İNCI, S.; KIRBAĞ, S. Nutrient Content of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. Grown on Some Local Lignocellulosic Wastes. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg*, 25 (1): 25-30, 2022, <https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.890663>

ANIKE, F. N.; YUSUF, M.; ISIKHUEMHEN, O. S. Co-substrating of peanut shells with cornstalks enhances biodegradation by *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 7(1):1-7, 2016.

ASSEMIE, A.; ABAYA, G. The Effect of Edible Mushroom on Health and Their Biochemistry. *International Journal of Microbiology*, Volume 2022, Article ID 8744788, 7 pages, 2022, <https://doi.org/10.1155/2022/8744788>

Atila, F. Evaluation of suitability of various agro-wastes for productivity of *Pleurotus djamor*, *Pleurotus citrinopileatus* and *Pleurotus eryngii* mushrooms. *J. Exp. Agric. Int.*, 17 (2017), pp. 1-11, 10.9734/JEAI/2017/36346.

BACH, F; HELM, C.V; BELLETTINI, M.B; MACIEL, G.M; WINDSON, C; HAMINIUK, I. Edible mushrooms: a potential source of essential amino acids, glucans and minerals. *International Journal of Food Science and Technology*. p. 1-11, 2017.

BAHR, A.; SHARMA, V. P.; ANNEPU, S. K.; KAMAL, S.; SHARMA, S.; BHATT, P. Genetic improvement in *Pleurotus* (oyster mushroom): a review. *3 Biotech*, 9 (332): 1-14, 2019.

BANASIK, A.; KANELLOPOULOS, A.; CLAASSEN, G. D. H.; BLOEMHOF-RUWAARD, J. M.; VAN DER VORST, J. G. A. J. Closing loops in agricultural supply chains using multi-objective optimization: A case study of an industrial mushroom supply chain. *International Journal of Production Economics*, 183, 409–420, 2017. doi:10.1016/j.ijpe.2016.08.012

BANASIK, A., KANELLOPOULOS, A., BLOEMHOF-RUWAARD, J. M., & CLAASSEN, G. D. H. Accounting for uncertainty in eco-efficient agri-food supply chains: a case study for mushroom production planning. *Journal of Cleaner Production*. 2019. doi:10.1016/j.jclepro.2019.01.153

BANO, Z. A.; RAJARATHNAM, S.; STEINKRAUS, K. H. *Pleurotus* mushrooms. Part II. Chemical composition, preservation, ad role and human food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 27, n. 2, p. 87-158, 1988. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398809527480>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

BELLETTINI, M.B.; FIORDA, F.A.; MAIEVES, H.A.; TEIXEIRA, G.L.; ÁVILA, S.; HORNUNG, P.S.; MACCARI JÚNIOR, A.; RIBANI, R.H. Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi Journal of Biological Sciences*, Riyadh, v.26, n.4, p.633-646, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.005>

BESUFEKAD, Y.; MEKONNEN, A.; GIRMA, B.; DANIEL, R.; TASSEMA, G.; MELKAMU, J.; ASEFA, M.; FIKIRU, T.; DENBOBA, L. Selection of appropriate substrate for production of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Journal of Yeast and Fungal Research*, v. 11, n. 1, p. 15-25, 2020. DOI: 10.5897/JYFR2019.0187

CARRASCO, J.; ZIED, D.C.; PARDO, J.E.; PRESTON, G.M.; PARDO GIMENEZ, A. Supplementation in mushroom crops and its impact on yield and quality. *AMB Expr*, 8 (2018), p. 146, 10.1186/s13568-018-0678-0.

CHANG, S.-T.; MILES, P.G. 2004. *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. 2 ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 451 p.

DRONKELAAR, C.; VELZEN, A.; ABDELRAZEK, M.; STEEN, A.; WEIJS, P. J. M.; TIELAND, M. Minerals and Sarcopenia; The Role of Calcium, Iron, Magnesium, Phosphorus, Potassium, Selenium, Sodium, and Zinc on Muscle Mass, Muscle Strength, and Physical Performance in Older Adults: A Systematic Review. *Journal of the American Medical Directors Association*, v. 19, n. 1, p. 6-11.e3, 2018, ISSN 1525-8610, <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2017.05.026>.

FALANDYSZ, J.; WANG, J. SANIEWSKI, M.; FERNANDES, A. R. 137Caesium, 40Potassium and potassium in raw and deep-oil stir-fried mushroom meals from Yunnan in China. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 91, p. 103538, 2020.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. *Revista Brasileira de Biometria*, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. ISSN 1983-0823. 2019.

FOZIA; ZAHID, A.; ALHARBI, N. K.; KHAN, M. I.; NOREEN, A.; KHAN, A. A.; QAMAR, S.; KHAN, I.; RAMZAN, M.; BAHATHEQ, A. M.; AHMED, A. E. Thiourea enriched cotton waste enhances biomass and nutrition contents in (White oyster) and (Phoenix oyster) mushrooms. *Journal of King Saud University - Science*, 2022, 102054, ISSN 1018-3647, <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102054>.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. 2005. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão *Rev Inst Adolfo Lutz*, 64(2): 149-154.

GOSWAMI, B.; MAJUMDAR, S.; DAS, A.; BARUI, A.; BHOWAL, J. Evaluation of bioactive properties of *Pleurotus ostreatus* mushroom protein hydrolysate of different degree of

hydrolysis. LWT, Volume 149, 2021, 111768, ISSN 0023-6438, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111768>.

GUME, B.; MULETA D.; ABATE, D. 2013. Evaluation of locally available substrates for cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in Jimma, Ethiopia. African Journal of Microbiology Research, 7(20): 2228-2237.

HOLGADO-ROJAS, M. E. *et al.* Cultivo de *Pleurotus* sp. y *Lentinula edodes* bajo condiciones artesanales en comunidades campesianas de la región Cusco/Perú. Ecología Aplicada, v. 18, n. 2, p. 125, 2019.

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

JIN, Z.; LI, Y.; REN, J.; QIN, N. Yield, Nutritional Content, and Antioxidant Activity of *Pleurotus ostreatus* on Corncoobs Supplemented with Herb Residues. Mycobiology, v.46, n. 1, p. 24-32, 2018.

LAVELLI, V.; PROSERPIO, C.; GALLOTTI, F.; LAUREATI, M.; PAGLIARINI, E. Circular reuse of bio-resources: the role of *Pleurotus* spp. in the development of functional foods. Food Funct.,9(3):1353–1372, 2018.

MADHANRAJ, R.; RAVI, K. K.; MAYA, M. R.; RAMANAIAH, I; VENKATAKRISHNA, K; RAMESHKUMAR, K.; VEERAMANIKANDAN, V.; EYINI, M.; BALAJI, P. Evaluation of anti-microbial and anti-haemolytic activity of edible basidiomycetes mushroom fungi. Journal of Drug Delivery and Therapeutics, v. 9, n. 1, p. 132-135, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.22270/jddt.v9i1.2277>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MIGUEL, M. C.; CARVALHO, S. M. S.; FREIRE, V. F. Redução e Consumo de Sódio: Trama entre Cidade, Alimentação e Cidadania. v. 28, p. 124-138, 2018.

MLECZEK, M.; BUDKA, A.; SIWULSKI, M.; MLECZEK, P.; GAŞECKA, M.; JASIŃSKA, A.; KALAČ, P.; SOBIERALSKI, K.; NIEDZIELSKI, P.; PROCH, J.; RZYMSKI, P. Investigation of differentiation of metal contents of *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus* sold commercially in Poland between 2009 and 2017. Journal of Food Composition and Analysis, v. 90, p. 103488, 2020.

MUSWATI, C.; SIMANGO, K.; TAPFUMANEYI, L.; MUTETWA, M.; NGEZIMANA, W. The Effects of Different Substrate Combinations on Growth and Yield of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*). International Journal of Agronomy, v. 2021, Article ID 9962285, 10 pages, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/9962285>

NADJOMBÉ, P.; MÉLILA, M.; KAMOU H.; MAGAMANA, E.; VERBEKEN, A.; GUELLY, K. A. Nutritional potential of edible *Russula* species from Alédjo Wildlife Reserve (AWR). Journal of the Indian Chemical Society, v. 99, n. 6, p. 100407, 2022.

NARANJO-ORTIZ, M. A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, v. 94, p. 2101-2137, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/brv.12550>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

NEPA - Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação -.2011. Tabela de Composição de Alimentos/TACO-UNICAMP. Campinas, São Paulo. 4ª ed. 164p.

OKA, N. K. C.; COULIBALY, A.; KOUAMÉ, A. C.; N'DRI, Y. D.; AMANI, N. G. Nutritional Profile of *Pleurotus geesteranus* from different Harvests. *European Journal of Nutrition & Food Safety*, 12(9): 147-154, Article no 61569, 2020.

PIÑA-GUZMÁN, A. B.; NIETO-MONTEROS, D. A.; ROBLES-MARTÍNEZ, F. Utilización de residuos agrícolas y agroindustriales en el cultivo y producción del hongo comestible seta (*Pleurotus* spp.). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, n. 32, p. 141-151, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.20937/RICA.2016.32.05.10>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

PRIYADARSHNI, K. C.; KRISHNAMOORTHY, R.; MUMTHA, C.; MAHALINGAM, P. U. Biochemical analysis of cultivated mushroom, *Pleurotus florida* and synthesis of silver nanoparticles for enhanced antimicrobial effects on clinically important human pathogens. *Inorganic Chemistry Communications*, v. 142, p. 109673, 2022.

RAMAN, J.; JANG, K-Y.; OH, Y-L.; OH, M.; IM, J-H.; LAKSHMANAN, H.; SABARATNAM, H. Cultivation and Nutritional Value of Prominent *Pleurotus* spp.: An Overview, *Mycobiology*, 49:1, 1-14, 2021 DOI: 10.1080/12298093.2020.1835142

REZAEIAN, S.; POURIANFAR, H. R.; DOWOM, S. A. Quantitative changes in the biochemical and mineral composition of the substrate in solid state cultivation of enoki Mushroom. *Waste Biomass Valorization* (2021), 10.1007/s12649-020-01340-7.

RÍOS, M. P.; HOYOS, J. L. Y; MOSQUERA, S. A. Evaluación de los parámetros productivos de la semilla de *Pleurotus ostreatus* propagada en diferentes medios de cultivo. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, v. 8, n. 2, p. 86-94, 2010.

ROLIM, C. S. S.; OLIVEIRA, R. T.; ROLIM, L. N.; SARAIVA-BONATTO, E. C.; SARAIVA, M. G. G.; OLIVEIRA, R. P. M.; SILVA, C. C.; LAMARÃO, C. V. Análise da composição centesimal, físico-química e mineral da polpa e casca do fruto de *Endopleura uchi* / quantitative analysis of bioactive compounds of *Endopleura uchi* pulp and peel extracts. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, p.16368-16383, 2020.

SALES-CAMPOS, C.; ANDRADE, M. C. N. Aproveitamento de resíduos madeireiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. *Acta Amazonica*, v. 41, n. 1, p. 1-8, 2011, <https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000100001>.

SARDAR, H.; ANJUM, M. A.; HUSSAIN, S.; ALI, S.; SHAHEEN, M. R.; AHSAN, M.; EJAZ, S.; AHMAD, K. S.; NAZ, S.; SHAFIQUE, M. Deciphering the role of moringa leaf powder as a supplement in the cotton waste substrate for the growth and nutrition of king oyster mushroom. *Scientia Horticulturae*, Volume 293, 110694, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110694>

SILVA, E. G.; DIAS, E. S.; SIQUEIRA, F. G.; SCHWAN, R. F. Análise química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 1, p. 72-75, 2007.

SILVA, R. M.; CARMO, C. O.; OLIVEIRA, T. A. S.; FIGUEIRÊDO, V. R.; DUARTE, E. A. A.; SOARES, A. C. F. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated in agroindustrial wastes of palm oil fruits and cocoa almonds. **Agricultural Microbiology**, v.87, 1-10, 2020.

SINGH, S. K.; PRADHAN, S. Transcriptomics in fruit crops: present status and future prospects. *Indian J. Hort.*, 77(4), p. 563-581, 2020.

SINGH, A.; SINGH, S. Nutritional and health importance of fresh and dehydrated oyster Mushroom (*Pleurotus florida*). *Journal of Current Research in Food Science*, 2(2): 10-14. 2021

SIQUEIRA, F. G.; MARTOS, E. T.; SILVA, R.; DIAS, E. S. Cultivation of *Pleurotus sajor-caju* on banana stalk and Bahia grass based substrates. *Horticultura Brasileira*, v. 29, p. 199-204, 2011.

SUUTARI, Merja. Effect of growth temperature on lipid fatty acids of four fungi (*Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, and *Trichoderma reesei*). *Archives of Microbiology*, v. 164, p. 212–216, 1995.

TÉLLEZ-TÉLLEZ, M.; DIAZ-GODINEZ, G. Omic Tools to Study Enzyme Production from Fungi in the *Pleurotus* genus. *Bioresources*, v. 14, n. 1, p. 2420-2457, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.15376/biores.14.1.2420-2457>>. Acesso em: 15 jan. 2022.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. 1995. Análises de solo, plantas e outros materiais. 2ª ed. UFRGS, 174 p

USMAN, M.; MURTAZA, G.; DITTA, A. Nutritional, Medicinal, and Cosmetic Value of Bioactive Compounds in Button Mushroom (*Agaricus bisporus*): A Review. *Appl. Sci.* 2021, 11, 5943. <https://doi.org/10.3390/app11135943>
-785, 1968.

VIEIRA, M. E. M.; SILVA, M. L. S.; OLIVEIRA, L. F. C.; PERRONE, Í. T.; STEPHANI, R. X-ray energy dispersive spectroscopy (EDS) coupled with scanning electron microscope (SEM): fundamentals and applications in dairy products. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 10, p. 262101018622, 2021.

VETTER, J. Biological values of cultivated mushrooms – a review. *Acta Alimentaria*, Vol. 48 (2), pp. 229–240 (2019). DOI: 10.1556/066.2019.48.2.1

WANG, J.; LAN, K.; WU, G.; WANG, Y.; ZHOU, C.; LIN, H.; MA, Z. Effect of dietary carbohydrate level on growth, feed utilization, energy retention, body composition, and digestive and metabolic enzyme activities of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture Reports*, v. 25, 2022, 101211.

XIONG, S., MARTÍN, C., EILERTSEN, L., WEI, M., MYRONICHEVA, O., LARSSON, S. H., JÖNSSON, L. J. Energy-efficient substrate pasteurisation for combined production of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) and bioethanol. *Bioresource Technology*, 2018. doi:10.1016/j.biortech.2018.11.071

XU, S.; WANG, F.; FU, Y.; LI, D.; SUN, X.; LI, C.; SONG, B.; LI, Y. Effects of mixed agro-residues (corn crop waste) on lignin-degrading enzyme activities, growth, and quality of *Lentinula edodes*. DOI: 10.1039/C9RA10405D. *RSC Adv.*, 2020, 10, 9798-9807.

ZADRAZIL, F. Cultivation of *Pleurotus*. In: CHANG, S. T; Hayes, W. A. *The biology and cultivation of edible mushrooms*. New York: Academic Press. p. 521-557, 1978.

6. CAPÍTULO 5 – Crescimento e desenvolvimento de *Pleurotus ostreatus* em biomassas lignocelulósicas

(Publicado - <https://doi.org/10.53660/CLM-521-610>)

Growth of different strains of *Pleurotus ostreatus* in lignocellulosic biomasses

Crescimento de diferentes linhagens de *Pleurotus ostreatus* em biomassas lignocelulósicas

Lorena Vieira Bentolila de Aguiar^{1*}, Paula Romenya dos Santos Gouvêa², Sérgio Dantas de Oliveira Júnior³, Ceci Sales-Campos³, Larissa Ramos Chevreuil³

ABSTRACT

Agro-industrial waste has been widely applied in bioprocesses, among which fungiculture has been highlighted for its ability to transform waste into value-added products. Thus, this study observed two strains (474 and 572) of *Pleurotus ostreatus* when cultivated in residues of pineapple crown, açai seeds and mixture of pineapple crowns and açai seeds, and evaluated the colonization of the substrates, formation of structures and quantity of mushrooms produced. In all the substrates, it was possible to observe complete colonization, with the emergence of primordia up to 20 days. In the treatments with the 474 strain, only in the pineapple crown substrate were there three flushes of production, while in the açai seeds and pineapple crowns and açai seeds, there were only two flushes. As for strain 542, all treatments showed three flushes. The pineapple crown substrate provided greater production of basidiocarps (fresh mass) in strains 474 and 542. Therefore, the capacity of adaptation and development of *P. ostreatus* strains in different substrates was evidenced, since mushrooms were produced with characteristics similar to those reported in the literature.

Keywords: Basidiocarps; Oyster mushrooms; Agro-industrial residues.

RESUMO

Os resíduos agroindustriais têm sido amplamente aplicados em bioprocessos, dentre os quais a fungicultura tem se destacado por sua capacidade de transformar resíduos em produtos de valor agregado. Assim, este estudo observou duas linhagens (474 e 572) de *Pleurotus ostreatus* quando cultivadas em resíduos de coroa de abacaxi, sementes de açai e mistura de coroas de abacaxi e sementes de açai, e avaliou a colonização dos substratos, formação de estruturas e quantidade de cogumelos produzidos. Em todos os substratos, foi possível observar colonização completa, com surgimento de primórdios até 20 dias. Nos tratamentos com a linhagem 474, apenas no substrato de coroa de abacaxi houve três fluxos de produção, enquanto no de sementes de açai e coroas de abacaxi e sementes de açai, houve apenas dois fluxos. Quanto à linhagem 542, todos os tratamentos apresentaram três fluxos. O substrato de coroa de abacaxi proporcionou maior produção de basidiocarpos (massa fresca) nas linhagens 474 e 542. Portanto, evidenciou-se a capacidade de adaptação e desenvolvimento de linhagens de *P. ostreatus* em diferentes substratos, uma vez que foram produzidos cogumelos com características semelhantes às relatadas na literatura.

Palavras-chave: Basidiomas; Cogumelo ostra; Resíduos agroindustriais.

¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – BIONORTE

* lorenabentolila01@gmail.com

² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

³ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

INTRODUCTION

Lignocellulosic biomass is the most abundant, low-cost, renewable and energy-dense raw material. It is underutilized and often there is no adequate treatment for its final destination (VU *et al.*, 2020). Lignocellulosic biomasses are residues from agricultural and/or industrial process that have little or no sustainable way of using them, and they contribute to a huge fraction of the stream of urban solid waste, especially in underdeveloped countries (SADH; DUHAN; DURAN, 2018; OMRAN; BAEK, 2022). Thus, these bio-residues are an alternative for use as a carbon source and growth substrate for mushroom cultivation (ZAKIL *et al.*, 2022).

Of the variety of microorganisms capable of degrading lignocellulosic material, white-rot fungi stand out, since they are widely report for their ability to degrade various structures of plant cell walls (BARI *et al.*, 2015). *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm., a white-rot basidiomycete fungus, also known as oyster mushroom, is one of the most popular edible mushrooms in Brazil and worldwide (SILVA *et al.*, 2019; ZIED *et al.*, 2019). This mushroom is flexible in terms of growing conditions, and is able to grow in a wide variety of substrates, different types of climates and in installations that do not require strict environmental control when compared to other species of mushrooms (CARRASCO-GONZÁLEZ *et al.*, 2017; SARDAR *et al.*, 2017).

In this sense, the objective of this study was to evaluate the development of two strains of *Pleurotus ostreatus*, when cultivated in pineapple crowns (PC), açai seeds (AS), and a mixture of PC + AS, aiming at the valorization of different lignocellulosic biomasses as cultivation substrates for mushroom production.

MATERIAL AND METHODS

Biological Material

Two strains of *Pleurotus ostreatus* (474 and 542) were acquired from the Collection of Microorganisms of Agrosilvicultural Interest, from the Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Strain 474 corresponds to a *P. ostreatus* isolated in the Amazon and strain 542 corresponds to a commercial strain from mushroom producers in São Paulo. Açai seed (*Euterpe precatoria* Mart) and pineapple crown (*Ananas comosus*) residues were acquired from street markets in the city of Manaus, AM, Brazil (3° 06' 06" S, 60° 01' 29" W). These materials were dried, crushed and stored in plastic bags at room temperature (± 27 °C).

Mushroom cultivation

For the preparation of the spawns of each cultivation substrate, fungal mycelium discs from Petri dishes with potato-dextrose-agar (PDA) medium were transferred to flasks containing 78%

pineapple crowns, 78% açai seeds or pineapple crowns + açai seeds (1:1 w/w), 20% of a mixture of bran (rice, wheat and corn in the proportion 60:20:20 w/w/w, respectively) and 2% of CaCO₃ (78:20:2 w/w/w), previously autoclaved at 121 °C. After incubation of these flasks (25 °C) and growth of these fungi, 5% of the spawn was transferred to culture bags, prepared with the same formulation as the spawn, and incubated at 25 °C, 90% humidity and a photoperiod of 12 hours after colonization (AGUIAR *et al.*, 2022).

Evaluation of basidiocarp production

The strains of *P. ostreatus* (474 and 542) cultivated in substrates based on pineapple (PC), açai seeds (AS) and in their mixture (PC + AS) were monitored daily for 120 days. The colonization of substrates, emission of primordia and basidiocarp formation were photographed throughout the cultivation. All basidiocarps were weighed and the fresh mass of all the mushrooms produced among the evaluated combinations (strains and substrates) was calculated to obtain the productive parameter.

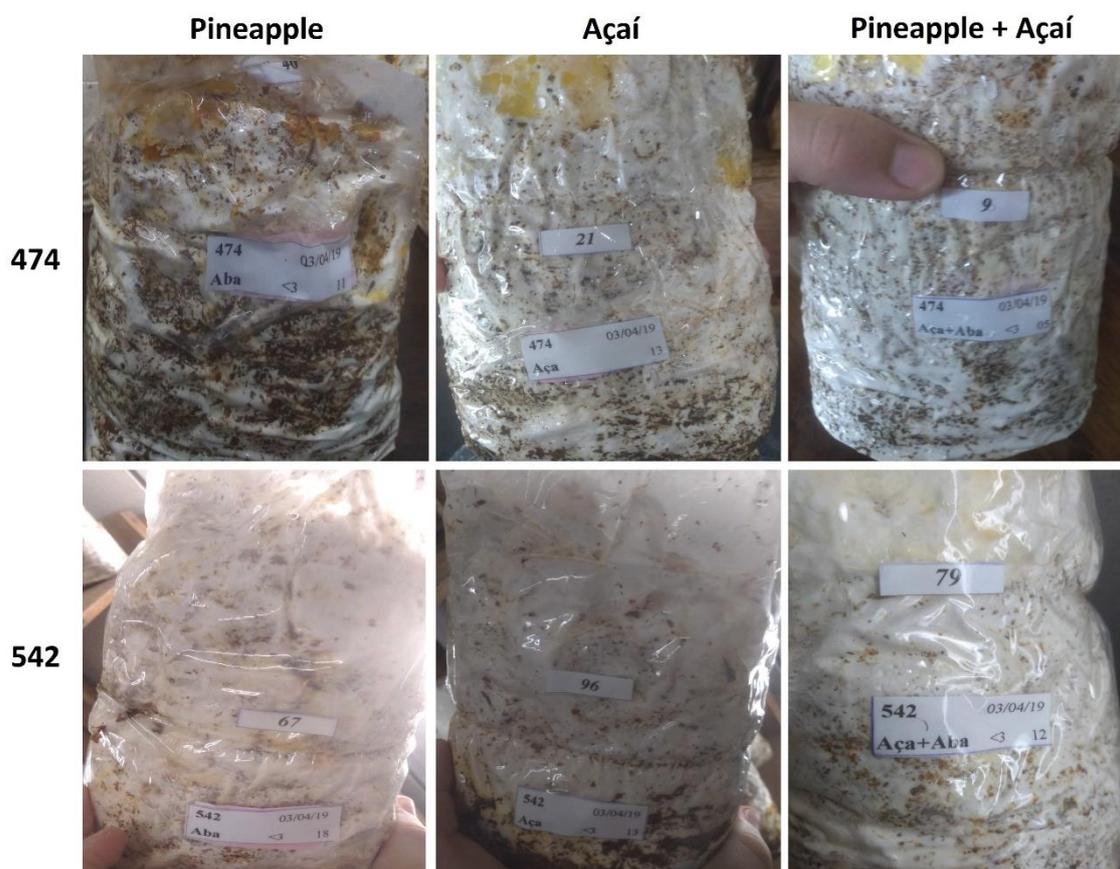
RESULTS AND DISCUSSION

When cultivated on substrates based on pineapple, açai seeds and pineapple + açai seeds, the *P. ostreatus* strains (474 and 542) completed the total colonization of the substrates in between 15 and 18 days, showing vigorous and whitish mycelia, which is typical of *P. ostreatus*. Vigor did not differ between substrates, and all showed mycelium that were densely adhered to the substrate and had a cottony texture (Figure 1).

The length of time required for complete colonization of the cultivation bags varied among the mushroom strains and substrates evaluated, with colonization being faster in the pineapple substrate in relation to the other substrates tested. Overall, strain 542 colonized substrates faster than strain 474, with some replicates completing colonization in around 15 days.

Melanouri *et al.* (2022a; 2022b) cultivated *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* in 10 different agro-industrial residues and observed the influence of the fungus x substrate interaction, and complete colonization was obtained between 16 and 38 days for *P. ostreatus* and 26 to 60 days for *P. eryngii*. This demonstrates the precocity of *P. ostreatus* regarding myceliation in relation to the other species, which is a desired characteristic in a commercial cultivation, since the production time is shorter. Koutrotsios *et al.* (2017) studied 16 strains of *P. ostreatus* under the same conditions, using pasteurized wheat straw as a substrate, and all of them completed colonization in 18 days, similar to the results obtained in the present work.

Figure 1 – Colonization of cultivation substrates by different *Pleurotus ostreatus* strains (474 and 542) when cultivated in residues of pineapple, açai seeds and a mixture of pineapple + açai seeds.



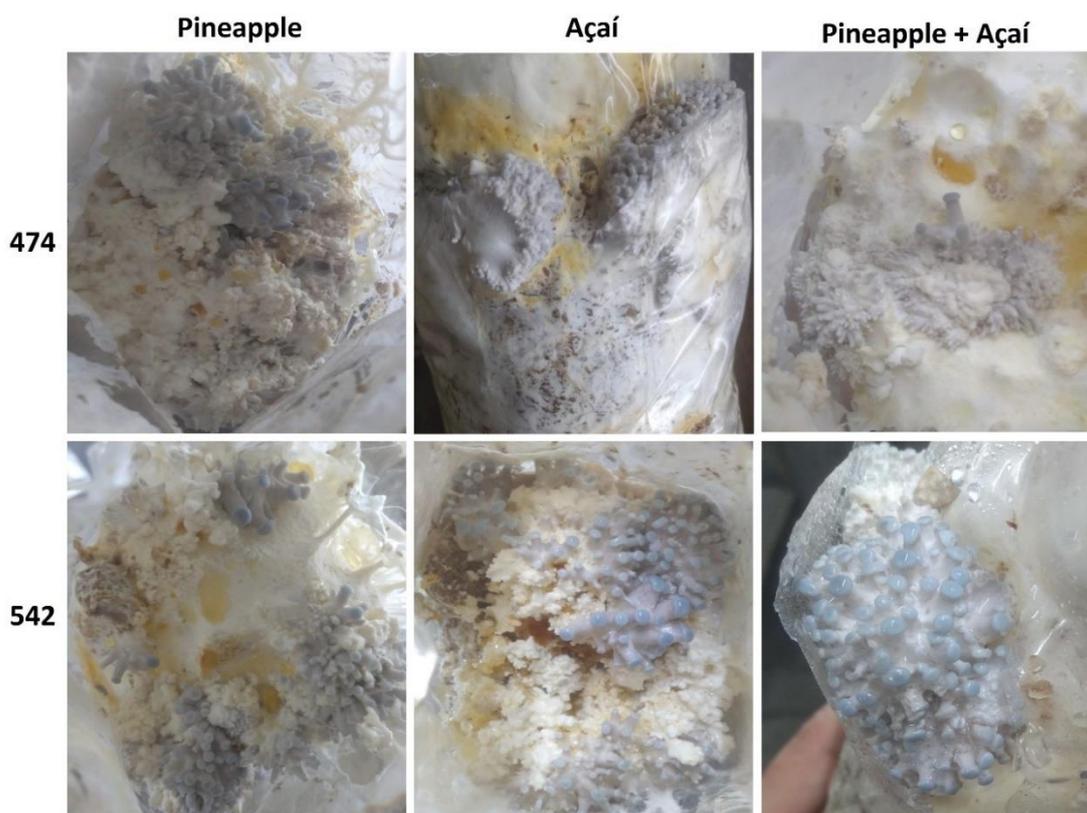
Photos: Lorena Vieira Bentolila de Aguiar

Kazige *et al.* (2022) evaluated *Pleurotus ostreatus* when cultivated in corn, bean and cassava residues and obtained better results when the fungus was cultivated in a substrate based on corn residues and combined with cow manure as an additive. This demonstrates the importance of studying waste available close to where production occurs and the reuse of waste from harvesting and processing in the production of mushrooms, which can increase economic gains. Otieno *et al.* (2022) formulated substrates based on fruit residues and wheat straw as a control for the production of *P. ostreatus* and *P. eryngii* and observed that the use of fruit residues presented higher production in relation to the control, in addition to obtaining mushrooms with a higher content of antioxidants and phenolic compounds, which demonstrates the potential and possibility of using fruit residues in fungiculture.

The emission of the first primordia of the strains 474 and 542 in the pineapple, açai seed and pineapple + açai seed substrates were observed up to 20 days after the start of cultivation. The first primordia appeared in the cultivation bags of strain 542. The primordia formed by both strains showed

similar morphological characteristics, particularly the coloration in shades of light gray and a “pinhead” shape (Figure 2).

Figure 2 – Primordia formation by the different *Pleurotus ostreatus* strains (474 and 542), when cultivated in pineapple, açai seed and mixture of pineapple + açai seed residues.



Photos: Lorena Vieira Bentolila de Aguiar

Otieno *et al.* (2022), when cultivating *Pleurotus sajor-caju*, *P. ostreatus* and *P. eryngii* in substrates with residues from mango, pineapple, orange, avocado, watermelon and banana, observed variation in primordia emergence time according to mushroom species and substrate used. Primordia were obtained in a shorter time (11 days) when *P. ostreatus* was cultivated on orange peel and *P. sajor-caju* cultivated on wheat straw (control). However, the longest time was observed when cultivating *P. sajor-caju* in mango and avocado peel, and *P. eryngii* in mango peel. These authors associated longer time to primordia formation to the constitutive antifungal properties of the fruit residues. However, the development of basidiocarps was faster on fruit peel-based residues, thus demonstrating the adaptability of mushrooms.

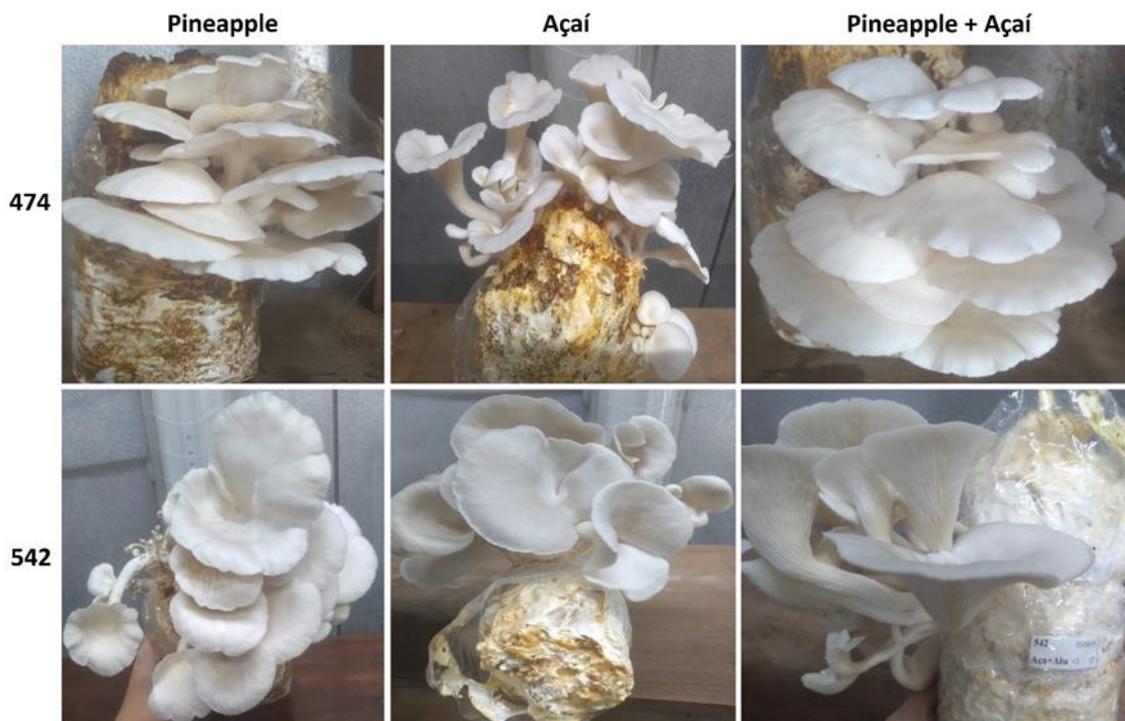
Melanouri *et al.* (2022b) observed that *P. ostreatus* strains, in addition to colonizing substrates before *P. eryngii* strains, also presented a shorter time interval (19-36 days) between inoculation and the

emergence of primordia, when compared to *P. eryngii* strains. The latter required 40-57 days for primordia formation, which varied according to substrate and strain tested. Additionally, both showed “pinhead” primordia.

Koutrotsios *et al.* (2017) observed that although their 16 strains of *P. ostreatus* completed the colonization of the substrate in the same time interval when cultivated in a substrate based on pasteurized wheat straw, they differed in relation to the time of emergence of the first primordia and formation of basidiocarps. For 5 of the 16 studied strains, the emergence of primordia was observed between 20 to 26 days from the beginning of cultivation, while other strains took from 28 to 71 to emit the first primordia. In addition, after the emergence of primordia, there was a significant variation in the total time for basidiocarp production, ranging from 12 to 44 days.

During development, strains 474 and 542 lost their gray color and the conical shape of the cap (“pinhead” shape), resulting in the classical oyster/shell shape. This is widely reported in the literature and usually takes 2 to 4 days to complete development. Other characteristics inherent to this species, such as a laterally located stipe, formation of taller cap and a shorter stipe, were also observed. Furthermore, the basidiocarps showed a color that changed from light gray, in the period of emergence of the primordia, to a whitish color, becoming lighter during the maturation process (Figure 3).

Figure 3 – Mature basidiocarps of different *Pleurotus ostreatus* strains (474 and 542), when cultivated in pineapple, açai, and a mixture of pineapple + açai residues.



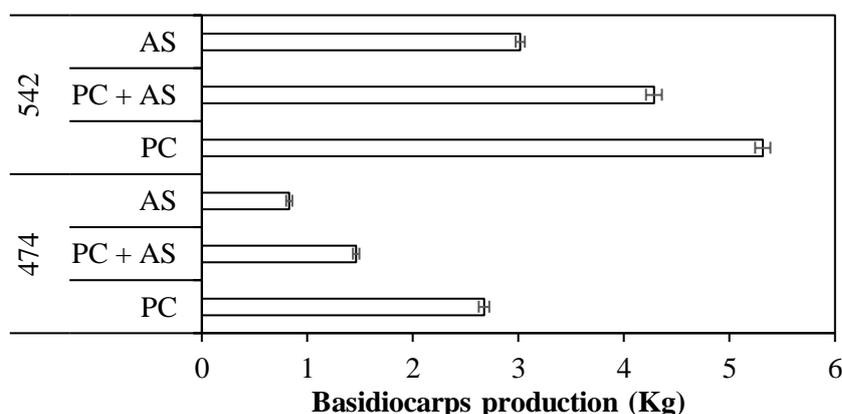
Photos: Lorena Vieira Bentolila de Aguiar

The name *Pleurotus* derives from the Latin “pleuro”, which means “formed laterally” or “in a lateral position”, and this designation is related to the position of the stipe in relation to the cap and the attachment of the stipe to the substrate/wood (TÉLLEZ-TÉLLEZ; DIAZ-GODINEZ, 2019). Both the scientific name “*Pleurotus ostreatus*” and the common name “oyster mushroom” refer to the shape of the cap (pileus), which resembles the bivalve of the same name (DEEPALAKSHMI; MIRUNALINI, 2014).

Morphologically, *P. ostreatus* basidiocarps have a wide, fan/oyster-shaped cap, measuring from 5 to 25 cm, which varies according to age/collection time. As for the color, they can vary from white to gray. In addition, the edge of the mushroom cap is curled when the basidiocarp is young, and presents a smooth and lobulated/wavy appearance (DEEPALAKSHMI; MIRUNALINI, 2014). All these characteristics were observed during the development of the two *Pleurotus* strains, with a small variation in shape according to the growth substrate (Figure 3). These characteristics have also been reported in the literature (MELANOURI *et al.*, 2022b).

The basidiocarps were produced and collected for about 4 months (23rd to 113th day of cultivation). All treatments with strain 542 (pineapple, açai seeds, pineapple + açai seeds) resulted in three production flushes, while strain 474 showed three flushes only when cultivated in pineapple crowns (PC). As for the quantity of mushrooms produced, strain 542 produced the highest quantity of mushrooms based on the total fresh mass of basidiocarps, and was about 2.5 times higher than the production of strain 474 (Figure 4). Each flush corresponds to a continuous period of production of basidiomes, with the end of a flush being characterized as the moment when production of basidiomes stops (BERNARDI; MINOTTO; NASCIMENTO, 2008), and a new flush is when a new continuous basidiome production occurs.

Figure 4 – Total fresh mass (g) of basidiocarps produced by two strains of *Pleurotus ostreatus* (474 and 542), when cultivated in pineapple crown (PC), açai seed (AS), and a mixture of pineapple crown + açai seed residues.



Naim *et al.* (2020) investigated the development of *P. ostreatus* in substrates based on wheat straw and residual substrates from oyster mushroom cultivation, supplemented with nano urea as a source of N (3 and 5 g per kg of substrate). The authors obtained three production flushes in most treatments, which suggests that the flushes are related to the nutritional variation of the substrates. They also observed that the supplementation with nano urea accelerated or delayed the formation of primordia in the second flush, with intervals that varied from 3 to 8 days.

Regarding the influence of the substrates on the cultivation of different *P. ostreatus* strains, the PC-based substrate stands out for having the highest productivity values, while strain 542 showed a production of around 2 times higher than strain 474 (Figure 4). The second substrate with the highest production of basidiocarps was the PC + AS mixture, which also had higher values for strain 542; about 3 times higher than strain 474 (Figure 4).

Melanouri *et al.* (2022a; 2022b) obtained different productivity results according to the substrate used. *P. ostreatus* showed higher production in substrates based on wood shavings, corncob, rice husks, and the combination of barley straw and oats. While the coffee residue, corncob, and bagasse from olive oil processing showed the highest production for *P. eryngii*. The corncob substrate was efficient regardless of the fungus used. Thus, corroborating the data present in this study, the PC substrate was also the most efficient, regardless of the strain tested.

Zakil *et al.* (2022) used agricultural residues of palm oil, sugarcane and corn in substrate formulations with varying residue concentrations in the cultivation of *P. ostreatus* and observed that the mixtures of residues resulted in a better adjustment of nitrogen and carbon concentrations. The change in the C/N ratio in the cultivation substrates resulted in higher productivity of mushrooms.

Given the above, for a successful cultivation, both the development of basidiocarps and productivity are important factors. It is known that naturally occurring strains can offer a variety of genotypes that are already adapted to local conditions of cultivation, which causes the mushrooms to present variations in shape, color, texture and aroma during production. Thus, the selection of suitable substrates in combination with strains can affect fungal efficiency as well as mushroom composition, appearance and quality (MELANOURI *et al.*, 2022a).

Both the strains in this study showed developmental characteristics in accordance with those reported in the literature for the species *Pleurotus ostreatus*, which highlights the potential of using local strains (in this case strain 474) in fungiculture, and this should be further investigated in order to increase their productivity.

CONCLUSIONS

The northern region of Brazil generates residual biomass that is still underutilized. Given this scenario, it is essential to search for new alternatives that add value to biomass from agriculture and industrial processing, and fungiculture is an alternative for increasing income and reducing environmental impacts. Thus, *P. ostreatus* showed the ability to adapt to and develop in different substrates, presenting morphological characteristics similar to those reported in the literature, which demonstrates the potential for mushroom cultivation in the region.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI)/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) and to the research support agencies CAPES (Project Pró-Amazônia No. 3251/2013), CNPQ (Project Universal No. 461729/2014-8) and FAPEAM (Project No. 062.00648/2015 and No. 062.00143/2020) for funding research and granting technical support grants. We are also grateful to POSGRAD 2021/FAPEAM for financial support for the translation of this manuscript.

REFERENCES

- AGUIAR, L. V. B.; GOUVÊA, P. R. S.; OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; SALES-CAMPOS, C.; CHEVREUIL, L. R. Production of commercial and Amazonian strains of *Pleurotus ostreatus* in plant waste. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 6, p. 47299-47321, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.34117/bjdv8n6-299>>. Acesso em: jul. 2022.
- BARI, E.; NAZARNEZHAD, N.; KAZEMI, S. M.; GHANBARY, M. A. G.; MOHEBBY, B.; SCHMIDT, O.; CLAUSEN, C. A. Comparison between degradation capabilities of the white rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* in beech wood. **International Biodeterioration Biodegradation**, v. 104, p. 231 - 237, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.03.033>>. Acesso em: jul. 2022.
- BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Aproveitamento de resíduo de curtume como suplemento no cultivo de *Pleurotus ostreatus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 2, p. 243-246, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1808-1657v75p2432008>>. Acesso em: jul. 2022.
- CARRASCO-GONZÁLEZ, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A. Nutritional composition and nutraceutical properties of the *Pleurotus* fruiting bodies: potential use as food ingredient. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 58, p. 69-81, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.016>>. Acesso em: jul. 2022.
- DEEPALAKSHMI, K.; MIRUNALINI, S. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. **Journal of Biochemistry and Technology**, v. 5, n. 2, p.

718-726, 2014. Disponível em:

<<https://jbiochemtech.com/storage/models/article/NG23jvirki6MsPU83nHuA6CbEMW8XcyYx1abn0BuLtqBOKsnuWPknyki9rj5/pleurotus-ostreatus-an-oyster-mushroom-with-nutritional-and-medicinal-properties.pdf>>. Acesso em: jul. 2022.

KAZIGE, O. K.; CHUMA, G. B.; LUSAMBYA, A. S.; MONDO, J. M.; BALEZI, A. Z.; MAPATANO, S.; MUSHAGALUSA, G. N. Valorizing staple crop residues through mushroom production to improve food security in eastern Democratic Republic of Congo. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 8, p. 100285, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100285>>. Acesso em: jul. 2022.

KOUTROTSIOS, G.; KALOGEROPOULOS, N.; STATHOPOULOS, P.; KALIORA, A.; ZERVAKIS, G. I. Bioactive compounds and antioxidant activity exhibit high intraspecific variability in *Pleurotus ostreatus* mushrooms and correlate well with cultivation performance parameters. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 98, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-017-2262-1>>. Acesso em: jul. 2022.

MELANOURI, E. M.; DEDOUSHI, M.; DIAMANTOPOULOU, P - a. Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part I: Screening for growth, endoglucanase, laccase and biomass production in the colonization phase. **Carbon Resources Conversion**, v. 5, p. 61 - 70, 2022a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.crcon.2021.12.004>>. Acesso em: jul. 2022.

MELANOURI, E. M.; DEDOUSHI, M.; DIAMANTOPOULOU, P - b. Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part II: Effect on productivity and quality of carposomes. **Carbon Resources Conversion**, v. 5, p. 52 - 60, 2022b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.crcon.2021.12.005>>. Acesso em: jul. 2022.

NAIM, L.; ALSANAD, M. A.; SEBAALY, Z. E.; SHABAN, N.; FAYSSAL, S. A.; SASSINE, Y. N. Variation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) P. Kumm. (1871) performance subjected to different doses and timings of nano-urea. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, p. 1573 - 1579, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.03.019>>. Acesso em: jul. 2022.

OMRAN, B. A.; BAEK, K. H. Valorization of agro-industrial biowaste to green nanomaterials for wastewater treatment: Approaching green chemistry and circular economy principles. **Journal of Environmental Management**, v. 311, p. 114806, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114806>>. Acesso em: jul. 2022.

OTIENO, O. D.; MULAA, F. J.; OBIERO, G.; MIDIWO, J. Utilization of fruit waste substrates in mushroom production and manipulation of chemical composition. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 39, p. 102250, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102250>>. Acesso em: jul. 2022.

SADH, P. K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources Bioprocessing**, v. 5, p. 1, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>>. Acesso em: jul. 2022.

SARDAR, H.; ALI, M. A.; ANJUM, M. A.; NAWAZ, F.; HUSSAIN, S.; NAZ, S.; KARIMI, S. M. Agro-industrial residues influence mineral elements accumulation and nutritional composition of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*). **Scientia Horticulturae**, v. 225, p. 327 - 334, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.010>>. Acesso em: jul. 2022.

SILVA, I. F.; LUZ, J. M. R.; OLIVEIRA, S. F.; QUEIROZ, J. H.; KASUYA, M. C. M. High-yield cellulase and LiP production after SSF of agricultural wastes by *Pleurotus ostreatus* using different surfactants. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101428, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101428>>. Acesso em: jul. 2022.

TÉLLEZ-TÉLLEZ, M.; DIAZ-GODINEZ, G. Omic Tools to Study Enzyme Production from Fungi in the *Pleurotus* genus. **Bioresources**, v. 14, n. 1, p. 2420-2457, 2019. Disponível em: <<https://bioresources.cnr.ncsu.edu/resources/omic-tools-to-study-enzyme-production-from-fungi-in-the-pleurotus-genus/>>. Acesso em: jul. 2022.

VU, H. P.; NGUYEN, L. N.; VU, M. T.; JOHIR, M. A. H.; MCLAUGHLAN, R.; NGHIEM, L. D. A comprehensive review on the framework to valorise lignocellulosic biomass as biorefinery feedstocks. **Science of The Total Environment**, v. 743, p. 140630, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140630>>. Acesso em: jul. 2022.

ZAKIL, F. A.; XUAN, L. H.; ZAMAN, N.; ALAN, N. I.; SALAHUTHEEN, N. A. A.; SUEB, M. S. M.; ISHA, R. Growth performance and mineral analysis of *Pleurotus ostreatus* from various agricultural wastes mixed with rubber tree sawdust in Malaysia. **Bioresource Technology Reports**, v. 17, p. 100873, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100873>>. Acesso em: jul. 2022.

ZIED, D. C.; PARDO-GIMÉNEZ, A.; OLIVEIRA, G. A.; CARRASCO, J.; ZERAIK, M. L. Study of waste products as supplements in the production and quality of *Pleurotus ostreatus* var. Florida. **Indian Journal Microbiology**, v. 59 p. 328 - 335, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12088-019-00805-1>>. Acesso em: jul. 2022.

Recebido em: 2022

Aprovado em: 2022

Publicado em: 2022

7. CAPÍTULO 6 – Prospecção de lectinas produzidas por *Pleurotus ostreatus* cultivado em resíduos lignocelulósicos

Parte dos dados de lectinas já foram publicados no artigo “Sales-Campos, C.; Silva, J. F.; Nascimento, L. B. B.; Gouvêa, P. R. S.; Aguiar, L. V. B.; Chevreuil, L. R.; Fariña, J. I.; Pontes, G. S. **Nutritional and Bioactive Properties of an Amazon Wild Oyster Culinary-Medicinal Mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes): Contributions to Functional Food and Human Health**”. Volume 23, Edição 7, 2021, pp. 79-90, International Journal of Medicinal Mushrooms. DOI:10.1615/IntJMedMushrooms.2021038780

O restante dos dados referente a lectinas ainda será publicado
(Artigo a ser submetido após ajuste, correção e tradução)

Prospecção de lectinas produzidas por *Pleurotus ostreatus* cultivado em resíduos
lignocelulósicos

**Lorena Vieira Bentolila de Aguiar^{1,2}, Larissa Batista de Brito do Nascimento³,
Sérgio Dantas de Oliveira Júnior², Ceci Sales-Campos², Larissa Ramos Chevreuil²**

1 Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, BIONORTE, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Amazonas 69065-001, Brasil

2 Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas 69067-375, Brasil

3 Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas 69067-005, Brasil

RESUMO

As lectinas são proteínas que participam de uma série de atividades biológicas nos organismos onde estão presentes e, por esse motivo, podem ser utilizadas em estudos fisiológicos, genéticos, estruturais e moleculares. Presentes também nos fungos, variam conforme sua origem, sendo essencial realizar a prospecção de lectinas em diferentes linhagens, espécies e condições de cultivo, a fim de auxiliar na sua obtenção e entender melhor sobre as variáveis relacionadas, incluindo as formas de extração de proteínas. Nesse sentido, o objetivo da pesquisa foi prospectar lectinas produzidas por diferentes linhagens de *Pleurotus ostreatus*, cultivadas em distintos resíduos vegetais locais, bem como avaliar condições de extração na obtenção dessas proteínas. Para tal, foram cultivadas as linhagens 474, 542, 885 e 1467 de *Pleurotus ostreatus*, utilizando como

substrato formulações com sementes de açaí, capim-elefante, coroa de abacaxi e serragens de marupá e pinus. Os cogumelos produzidos foram extraídos em água, solução salina e tampão fosfato (apenas para extratos onde houve indícios de lectinas) e os extratos obtidos foram submetidos a atividade hemaglutinante (AHE). Dentre os extratos testados, 2 extratos aquosos e 2 em tampão fosfato aglutinaram a suspensão de eritrócitos, sendo esses referentes à linhagem 1467 de *P. ostreatus* cultivado em açaí e marupá, mas somente 1467 cultivado em açaí teve sua atividade hemaglutinante inibida pelos carboidratos testados, ligando-se a lactose. Destaca-se a influência do método de extração na obtenção de proteínas, bem como do substrato e da linhagem utilizada no cultivo, tendo as linhagens de *P. ostreatus* testadas apresentado resultados distintos de acordo com a combinação desses parâmetros.

Palavras-chave: cogumelos comestíveis; extração proteica; atividade hemaglutinante; linhagens.

ABSTRACT

Lectins are proteins that participate in a series of biological activities in the organisms where they are present and, for this reason, can be used in physiological, genetic, structural and molecular studies. Also present in fungi, they vary according to their origin, being essential to carry out the prospection of lectins in different strains, species and cultivation conditions, in order to assist in obtaining them and better understand the related variables including protein extraction forms. In this sense, the objective of the research was to prospect lectins produced by different strains of *Pleurotus ostreatus*, cultivated in different local plant residues, as well as to evaluate extraction conditions to obtain these proteins. For this, strains 474, 542, 885 and 1467 of *Pleurotus ostreatus* were cultivated, using formulations with açaí seeds, elephant grass, pineapple crown and marupá and pine sawdust as substrate. The mushrooms produced were extracted in water, saline solution and phosphate buffer (only for extracts where there was evidence of lectins) and the extracts obtained were submitted to hemagglutinating activity (AHE). Among the tested extracts, 2 aqueous extracts and 2 in phosphate buffer agglutinate the suspension of erythrocytes, being these referring to the strain 1467 of *P. ostreatus* cultivated in açaí and marupá, but only 1467 cultivated in açaí had its hemagglutinating activity inhibited by the tested carbohydrates, binding to lactose. The influence of the extraction method in obtaining proteins, as well as the substrate and the strain used in the

cultivation, is highlighted, with the *P. ostreatus* strains tested showing different results according to the combination of these parameters.

Keywords: edible mushrooms; protein extraction; hemagglutinating activity, strains.

1. Introdução

Pleurotus spp. são fungos que apresentam mais de 100 compostos bioativos descritos, incluindo uma série de proteínas (NG *et al.*, 2016; GOLAK-SIWULSKA *et al.*, 2018; TESFAY *et al.*, 2020). Entre essas encontram-se as lectinas (KUMAR, 2019), proteínas capazes de se ligar reversivelmente e especificamente a carboidratos. Adicionalmente, algumas lectinas tem a capacidade de interagir com glicanos da superfície celular, podendo aglutinar células, habilidade que permite a sua exploração visando aplicações biomédicas (COELHO *et al.*, 2018; SINGH; WALIA; KENNEDY, 2020).

De uma forma geral, as lectinas apresentam inúmeras atividades biológicas como: anti-inflamatória, antiproliferativa, antitumoral, imunoestimulatória, antiviral, antifúngica e antimicrobiana (CAVADA *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2019), todas relacionadas às suas interações com carboidratos em processos de fisiologia celular, incluindo adesão, desenvolvimento, diferenciação, reconhecimento, sinalização, interação, metástase, localização e transporte (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2012; HASSAN *et al.*, 2015).

Essas proteínas podem ser obtidas de diferentes estruturas de *Pleurotus* (píleo, estipe e micélio), com sua expressão variando de acordo com a espécie, linhagem, idade e estrutura morfológica fúngica, bem como método de cultivo e meio de crescimento utilizado (HASSAN *et al.*, 2015; NIKITINA; LOSHCHININA; VETCHINKINA, 2017).

Todavia, o uso dessas lectinas para fins biomédicos exige uma produção em larga escala e a maioria das lectinas de macrofungos relatadas são isoladas de cogumelos obtidos diretamente da natureza, levando à baixos rendimentos e a variações indesejáveis (HASSAN *et al.*, 2015). Por esse motivo, o cultivo com fins de obtenção de lectinas deve ser mais estudado, visando reduzir a heterogeneidade do fungo produzido. Além disso, a padronização de um processo de extração proteica também pode auxiliar na obtenção dessas proteínas, para maximizar sua obtenção, sendo comumente utilizada nos trabalhos da literatura a extração salina.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo prospectar lectinas em basidiocarpos de quatro linhagens de *Pleurotus ostreatus*, provenientes de cultivos com diferentes substratos, avaliando diferentes tipos de processos de extração de proteínas, para verificar a influencia de substratos, linhagens fúngicas, e processos de extração proteica na atividade hemaglutinante.

2. Material e métodos

2.1. Material biológico

Os basidiomas utilizados nos ensaios foram obtidos a partir dos cultivos sólidos de cogumelos de Aguiar *et al.* (2022), correspondente a 4 linhagens de *P. ostreatus* (474, 542, 885 e 1467) cultivadas em substratos de semente de açaí, marupá, pinus e capim-elefante e de um segundo cultivo de cogumelos relativo à duas linhagens de *P. ostreatus* (474, 542) cultivadas em substratos a base de coroa de abacaxi, semente de açaí e uma mistura de ambos (1:1 m/m).

2.2. Preparação dos extratos proteicos

As extrações de proteínas foram realizadas a partir da metodologia modificada de Codina-Torrella; Guamis; Trujillo (2015). A primeira extração proteica foi feita a partir de 5 g dos cogumelos liofilizados e triturados, os quais foram homogeneizados em água destilada na proporção 1:20 (m/v) e agitados em shaker a 140 rpm por 2 h, a 10 °C. Posteriormente, foram centrifugados a 10.000 x g durante 20 minutos a 4 °C e filtrados para separar o sobrenadante, o qual foi liofilizado.

Para a segunda extração utilizou-se 5g de cogumelos liofilizados e triturados, que foram homogeneizados em uma solução salina (NaCl 0,15 M) na proporção de 1:20 (m/v), sendo repetido o processo de agitação e filtração supracitados. O sobrenadante recolhido após a filtração foi dialisado por 48 h em água destilada e liofilizado.

2.2.1. Extrações-teste focadas na atividade de lectinas

Adicionalmente, de acordo com os resultados obtidos no primeiro teste de atividade hemaglutinante, foi feita uma nova extração proteica afim de avaliar a influência de diferentes condições de temperatura e tempo de extração no (s) extrato (s) onde houve atividade hemaglutinante. Nessa extração, o cogumelo liofilizado e triturado (5 g) foi homogeneizado com água destilada na proporção 1:20 (m/v). Em seguida, foi agitado em

shaker a 140 rpm, variando as temperaturas (8 a 25 °C) e tempos de extração (30 a 240 min). Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 10.000 g durante 20 minutos a 4 °C, seguido de filtração para separar o sobrenadante, o qual foi liofilizado.

As amostras que apresentaram atividade hemaglutinante fraca ou mesmo confirmada, foram submetidas a extração com tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, visando verificar alterações na intensidade dessa atividade

2.3. Proteínas solúveis

A concentração de proteínas nos extratos proteicos foi estimada pelo método de Bradford (1976), a partir da incubação das amostras com o reagente de Bradford (Sigma) em microplacas, durante 10 minutos a 25 °C. O teor de proteínas foi determinado a partir de leitura espectrofotométrica à 595 nm em leitora de microplacas, utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA).

2.4. Eletroforese: SDS-PAGE

O perfil eletroforético das proteínas foi obtido a partir da metodologia descrita por Walker (2009), baseada no método clássico de Laemmli.

2.5. Detecção da atividade hemaglutinante (AHE)

A primeira etapa para realizar a atividade hemaglutinante específica (AHE), para todas as amostras testadas, foi o preparo da solução de eritrócitos a 2%, para a qual, amostras de sangue (3 mL), obtidas a partir do CEP/CAAE (00547018.8.0000.0009), foram coletadas e homogeneizadas com 30 µL de heparina em tubos Falcon de 50 mL. Posteriormente, o sangue foi lavado com NaCl 0,15M seguido de centrifugação a 3.000 rpm, 10 min, 4 °C, repetindo-se este procedimento 3 vezes, descartando-se o sobrenadante entre as lavagens. O precipitado foi ressuspenso em solução de NaCl 0,15 M, de modo a obter uma suspensão final de eritrócitos a 2% (v/v) (MOREIRA; CAVADA, 1984). A AHE foi determinada pelo método de diluição seriada em placas de microtitulação de fundo “U”, conforme Moreira e Perrone (1977), e os resultados foram expressos como unidade/título hemaglutinante, o qual é o ponto da maior diluição das amostras testadas que é capaz de exibir atividade de hemaglutinação visível (NG *et al.*, 2015).

2.5.1. Inibição da AHE

As amostras que apresentaram AHE foram submetidas aos ensaios de inibição da AHE visando determinar a especificidade das lectinas presentes nos fungos que já foram testados, quando à interação com diferentes carboidratos. Inicialmente, 25 µL de NaCl 0,15M foi adicionado a cada poço, bem como 25 µL de soluções a 0,1 M de diferentes carboidratos, sendo esses a Frutose (Frut), Fucose (Fuc), Galactose (Gal), Glicose (Glic), Lactose (Lac), Maltose (Malt), Manose (Man), e Sacarose (Sac), em diluição seriada a partir do segundo poço. Os extratos proteicos (25 µL) ressuspensos em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 contendo NaCl 0,15 M também foram adicionados. As placas seguiram para pré-incubação à 37 °C durante 1 h e, posteriormente, foram adicionados 25 µL da solução de eritrócitos a 2% (v/v) em cada um dos poços, prosseguindo-se uma incubação à 37 °C durante 30 min. Os resultados foram analisados a vista desarmada após 30 min e 24 h de incubação (RAMOS, 1997).

2.6. Análises estatísticas

As análises de proteína foram realizadas em triplicata e, os resultados submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2019). As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3. Resultados e discussão

3.1. Quantificação proteica e unidade/título hemaglutinante dos extratos dos basidiomas de linhagens de *Pleurotus ostreatus* submetidos à diversos solventes extratores.

Os extratos proteicos testados são oriundos de dois cultivos de *Pleurotus ostreatus*. Em um trabalho anterior, Sales-Campos *et al.* (2021) analisaram a atividade hemaglutinante de 4 dos 32 extratos do cultivo 1 das linhagens 474, 542, 885 e 1467 de *Pleurotus ostreatus*. Esses 4 extratos proteicos foram oriundos do 1467 cultivado em sementes de açaí e capim-elefante, extraídos em água e em solução salina (NaCl 0,15 M), os quais foram testados em eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, AB e O. O extrato do 1467 cultivado em açaí e extraído em água foi o único que apresentou atividade hemaglutinante. Essa atividade foi visualizada nos 3 tipos sanguíneos, não diferindo entre estes, apresentando unidade hemaglutinante (UH) de 8.

No presente trabalho, paralelamente, foram realizadas extrações com variações de temperatura (8 a 25 °C) e o tempo de extração (30 a 240 min) para verificar se a mudança

de parâmetros ocasionava variações na atividade na obtenção de proteínas e na atividade hemaglutinante de *Pleurotus ostreatus* (1467) cultivado em açai e extraído em água, amostra onde houve atividade hemaglutinante. A partir disso, foram obtidas quantidades de proteína que variaram de 0,20 a 0,38 mg/mL e a maioria dos extratos de 1467 cultivado em açai e extraído em água continuaram apresentaram atividade, com exceção do extraído a 25 °C, seguindo-se com a extração padrão já adotada, para os demais extratos.

Os 28 extratos restantes, assim como os 4 primeiros extratos testados no trabalho anterior (Sales-Campos *et al.*, 2021), foram submetidos novamente a avaliação da atividade hemaglutinante em eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, AB, e O, sendo adicionado à testagem o tipo B. O extrato inicial apresentou uma atividade similar de hemaglutinação nos eritrócitos do tipo B, com 8 UH. Entre os 28 extratos restantes, somente 1467 cultivado em marupá e pinus extraído em água apresentaram um aspecto que se assemelhava a uma aglutinação muito fraca, na suspensão de eritrócitos, ao ser comparado com a atividade do extrato de 1467 cultivado em açai e extraído em água (Sales-Campos *et al.*, 2021), não deixando clara a atividade.

Após a observação desses resultados, foram feitas 3 novas extrações, utilizando fosfato como solução extratora, nas amostras *P. ostreatus* 1467 cultivado em açai, *P. ostreatus* 1467 cultivado em marupá e *P. ostreatus* 1467 cultivado em pinus, para verificar se a mudança de solução extratora poderia modificar a possível atividade dos extratos que apresentaram resultados inconclusivos e do extrato que apresentou atividade hemaglutinante no trabalho anterior (Sales-Campos *et al.*, 2021). Após a verificação da AHE, foi visualizada aglutinação em *P. ostreatus* (1467) cultivado em açai e extraído em fosfato e *P. ostreatus* (1467) cultivado em marupá e extraído em fosfato (**Tabela 1**). O extrato de 1467 em pinus não apresentou atividade independentemente do método de extração (água ou fosfato) (**Tabela 1**).

Nenhum extrato salino (NaCl 0,15 M) apresentou atividade, embora esse seja o método de extração mais comumente utilizado. Dessa forma, a água pode ser considerada eficaz como solvente extrator, visto que, juntamente com fosfato, conseguiu recuperar proteínas que apresentaram atividade hemaglutinante e é um extrator de baixo custo. Segundo informações da literatura, as lectinas podem estar presentes tanto nos extratos salinos quanto nos extratos aquosos (GÓMEZ, 1976; MOREIRA; AINOZ, 1981), ambos testados no presente trabalho.

Leal *et al.* (2016) observaram atividade hemaglutinante para sementes de *Acacia farnesiana* tanto em extratos ácidos e alcalinos, quanto em extrações salinas, não encontrando lectinas nas extrações aquosas e etanolicas. Os autores relataram que o extrato de base salina era mais rico em proteínas e apresentava maior atividade hemaglutinante, demonstrando que a presença de lectinas em determinados extratos pode variar conforme o organismo testado. Da mesma forma, no presente trabalho, a extração salina recuperou uma maior quantidade de proteínas, ainda que não hemaglutinantes.

O título hemaglutinante obtido no extrato em fosfato de 1467 cultivado em açaí, frente aos eritrócitos testados, foi de 2^3 e a unidade hemaglutinante, conseqüentemente, foi 8 (Tabela 1). A atividade hemaglutinante ficou visualmente mais intensa no extrato com fosfato, ainda que tenha apresentado os mesmos título e unidade hemaglutinante do extrato aquoso de 1467 cultivado em açaí, testado por Sales-Campos *et al.* (2021).

Tabela 1 - Teor proteico e unidade/título hemaglutinante dos extratos de 1467, 885, 474 e 542

Linagem	Substrato	Extrator	Proteínas solúveis (mg/mL)	Unidade/ Título hemaglutinante	
1467	Açaí	Fosfato	0.13f ± 0.01	8 / 2 ³	
		Água	0.04i ± 0.00	8 / 2 ³	
	Marupá	NaCl	0.34c ± 0.00	-	
		Fosfato	0.09g ± 0.02	8 / 2 ³	
	Pinus	Água	NaCl	0.04i ± 0.00	-
			Fosfato	0.32d ± 0.05	-
		NaCl	Água	0.12f ± 0.02	-
			Fosfato	0.09g ± 0.01	-
885	Açaí	Água	0.09g ± 0.01	-	
		NaCl	0.09g ± 0.01	-	
	Capim-elefante	Água	0.11g ± 0.01	-	
		NaCl	0.08h ± 0.01	-	
	Marupá	Água	NaCl	0.06h ± 0.01	-
			Fosfato	0.30d ± 0.03	-
		Pinus	Água	0.12f ± 0.01	-
			NaCl	0.36b ± 0.03	-
474	Açaí	Água	0.11g ± 0.01	-	
		NaCl	0.40a ± 0.02	-	
	Capim elefante	Água	0.06h ± 0.01	-	
		NaCl	0.36b ± 0.02	-	
	Marupá	Água	NaCl	0.07h ± 0.01	-
			Fosfato	0.39a ± 0.02	-
		Pinus	Água	0.04i ± 0.01	-
			NaCl	0.34c ± 0.00	-
542	Açaí	Água	0.15e ± 0.01	-	
		NaCl	0.38a ± 0.00	-	
	Capim elefante	Água	0.05i ± 0.01	-	
		NaCl	0.34c ± 0.01	-	

Marupá	Água	0.09g ± 0.02	-
	NaCl	0.38b ± 0.01	-
Pinus	Água	0.11g ± 0.01	-
	NaCl	0.39a ± 0.02	-

Letras representam o teste de comparação de médias (Scott-Knott) a 5%. Valores após ± correspondem ao desvio padrão; (-) não houve atividade hemaglutinante.

Os resultados obtidos nesses ensaios, como observado no trabalho anterior (Sales-Campos *et al.*, 2021), também não variaram de acordo com o tipo sanguíneo testado, obtendo-se título hemaglutinante semelhantes frente aos eritrócitos dos tipos A, AB, B e O.

Um “tapete” difuso de eritrócitos aglutinados foi observado quando a atividade hemaglutinante foi positiva para os 4 extratos de *P. ostreatus* (1467), não havendo nenhum tipo de sedimentação. A presença de um ponto vermelho claro sedimentado na parte inferior do poço indicou os resultados negativos (NG *et al.*, 2015) e o controle, como pode ser observado nas **Figuras 1 e 2**.

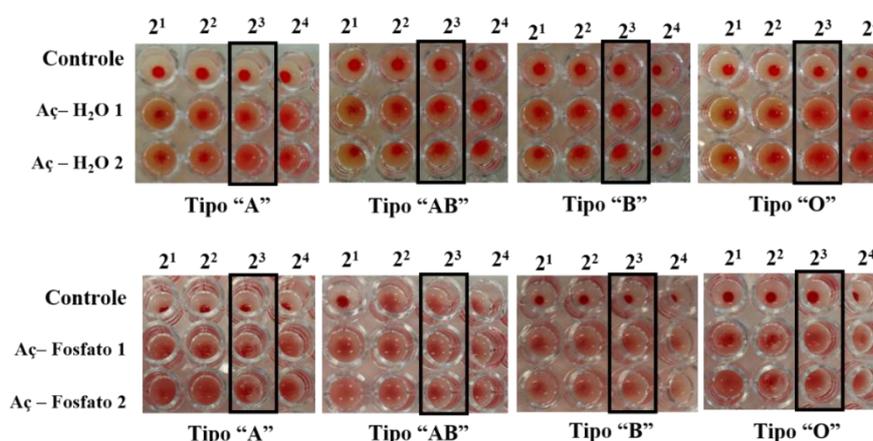


Figura 1 - Ensaio de hemaglutinação dos extratos proteicos aquosos e em tampão fosfato do 1467 cultivado em açaí, em suspensão de eritrócitos humanos a 2% dos tipos sanguíneos “A”, “AB”, “B” e “O”. Aç -H₂O 1 e Aç -H₂O 2 – repetições 1467 açaí em água; Aç-Fosfato 1^a e 2^a repetições 1467 açaí em fosfato; 2¹, 2², 2³, 2⁴, referem-se ao título hemaglutinante.

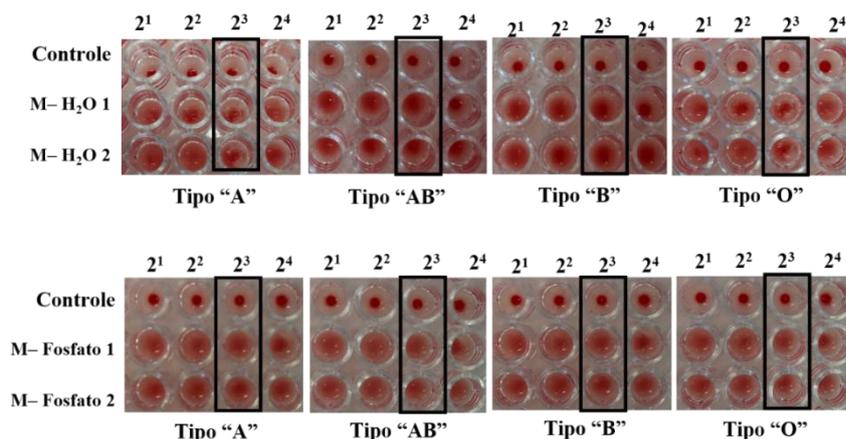


Figura 2 - Ensaio de hemaglutinação dos extratos proteicos aquosos e em tampão fosfato do 1467 cultivado em marupá, em suspensão de eritrócitos humanos a 2% dos tipos sanguíneos “A”, “AB”, “B” e “O”. M - H₂O 1 e M -H₂O 2 – repetição 1 e 2 do 1467 marupá em água; e Aç-Fosfato 1^a e 2^a repetições 1467 açai em fosfato.; 2¹, 2², 2³, 2⁴, referem-se ao título hemaglutinante.

Independente da forma de extração ou do micro-organismo de origem, com o objetivo de verificar a atividade hemaglutinante específica (AHE) em um extrato, geralmente são utilizados eritrócitos de diferentes tipos e origens (GOLDSTEIN; PORETZ, 1986). Segundo Moreira e Ainouz (1981), lectinas oriundas de extrato aquoso não tem especificidade para os grupos do sistema ABO e Oguri, Ando e Nagata (1996) ao testarem uma lectina obtida do micélio de *P. citrinopileatus*, oriunda de extração salina também observaram a aglutinação inespecífica dos eritrócitos de sangue humano.

Em alguns estudos já relatados, não foi possível observar atividade hemaglutinante frente aos eritrócitos humanos, ocorrendo atividade hemaglutinante apenas diante de eritrócitos de coelho e outros animais. Isso ocorre devido a presença de carboidratos complementares nas células animais, que não estão presentes nos eritrócitos humanos, independente do seu fenótipo (GUILLOT; KONSKA, 1997). Entretanto, a composição de carboidratos de cada tipo sanguíneo humano é diferente, ainda que esses não sejam tão variados quanto os de origem animal (GUILLOT; KONSKA, 1997).

Outro ponto a ser levado em consideração, em especial para eritrócitos humanos é que os eritrócitos podem ser utilizados de forma natural ou podem receber tratamento enzimático (com tripsina e papaína, por exemplo) (NASCIMENTO *et al.*, 2020) e químico (com glutaraldeído, por exemplo) (TORRES *et al.*, 2019), que cliva as proteínas presentes na superfície dos eritrócitos. Esse processo leva a uma maior exposição dos carboidratos da superfície celular dos eritrócitos humanos, o que pode aumentar a sensibilidade das células à lectina e permitir ou melhorar a capacidade de aglutinação,

umentando os títulos de hemaglutinação (KENNEDY *et al.*, 1995; PEREIRA JÚNIOR, 2014; RUGIDER, 1993).

Com relação ao teor de proteínas solúveis estimado através de Bradford, como observado na **Tabela 1**, nota-se que o extrato salino recupera um maior teor de proteínas para a maior parte dos extratos proteicos, exceto para 885 em açai e 885 no capim-elfante. De forma geral, os extratos variaram de 0,04 a 0,40 mg/mL de proteínas solúveis totais (**Tabela 1**). Entretanto, é possível destacar que não há uma relação direta entre o teor proteico e a presença/ausência de lectinas, visto que os extratos que apresentaram atividade hemaglutinante não foram os que apresentaram maior teor de proteínas.

Além da atividade hemaglutinante, também foi verificada a termostabilidade dos extratos de *P. ostreatus* que apresentaram AHE. Esses extratos foram submetidos a um aquecimento a 100 °C por 10 minutos. Com o aquecimento, foi observada redução nos teores proteicos de todas as amostras e observou-se uma redução da atividade nos extratos aquecidos, que passaram a ter título hemaglutinante de 2² e 4 UH, apresentando uma atividade hemaglutinante menor em relação aos extratos não aquecidos (**Tabela 2**). Os extratos aquosos e em fosfato de 1467 cultivado em açai e marupá continuaram exibindo atividade hemaglutinante mesmo com a redução do teor proteico.

Tabela 2 - Teor proteico e inibição da AHE do extrato aquoso de *Pleurotus ostreatus* 1467 cultivado em açai e em marupá

Extrato	Proteínas (mg/mL)	Título	Carboidratos testados							
			Glc	Gal	Fru	Fuc	Lac	Mal	Man	Sac
Açai A – NAQ	0.13a ± 0.01	2 ³	-	-	-	-	+	-	-	-
Açai A – AQ	0.05d ± 0.01	2 ²	-	-	-	-	+	-	-	-
Açai F – NAQ	0.13a ± 0.01	2 ³	-	-	-	-	+	-	-	-
Açai F – AQ	0.07c ± 0.00	2 ²	-	-	-	-	+	-	-	-
Marupá A – NAQ	0.04d ± 0.00	2 ^{3*}	-	-	-	-	-	-	-	-
Marupá A – AQ	0.02e ± 0.00	2 ^{2*}	-	-	-	-	-	-	-	-
Marupá F – NAQ	0.09b ± 0.00	2 ³	-	-	-	-	-	-	-	-
Marupá F – AQ	0.04d ± 0.01	2 ²	-	-	-	-	-	-	-	-

Letras representam o teste de comparação de médias (Scott-Knott) a 5%. O sinal (+) indica que houve inibição da hemaglutinação. O sinal (-) indica que não houve inibição da hemaglutinação. Glicose (**Glc**), Galactose (**Gal**), Frutose (**Fru**), Lactose (**Lac**), Maltose (**Mal**), Manose (**Man**), Sacarose (**Sac**), Fucose

(**Fuc**). Valores após \pm correspondem ao desvio padrão. A: água; F: fosfato; NAQ: não aquecida; AQ: aquecida a 100 °C, 10 min * atividade muito fraca.

A termoestabilidade é uma característica muito importante para determinação nas lectinas, bem como o pH, sendo cruciais para a purificação da lectina (CORREIA; COELHO, 1995). Todavia, é importante salientar que apresentar termoestabilidade não demonstra, por si só, que a substância testada é uma lectina, não havendo uma faixa de temperatura e/ou pH, por exemplo, que identifique que o composto é uma lectina. Há uma série de relatos na literatura de lectinas com termoestabilidade e estabilidade à níveis de pH em faixas muito distintas, independente do organismo do qual a lectina é obtida.

Os extratos que apresentaram atividade hemaglutinante demonstraram uma certa termoestabilidade, visto que há relatos de lectinas termossensíveis e termoestáveis, com aumento da atividade ou com perda parcial/total de atividade de acordo com a temperatura avaliada. A lectina do cogumelo *Laetiporus sulphureus* avaliada por Wang *et al.* (2018), avaliada diante de temperaturas variadas, exibiu um declínio da atividade hemaglutinante de acordo com o aumento da temperatura, sendo inativada a 80 °C. Pan e Ng (2015) testaram uma lectina de *Phaseolus coccineus* que apresentou estabilidade em faixas de temperatura de 20 a 70 °C. A lectina de *Adenia hondala* apresentou termo estabilidade até 60 °C (SHARMA *et al.*, 2018).

Comparando-se especificamente as mudanças do título hemaglutinante e a unidade hemaglutinante (U) de lectinas estudadas por outros autores, submetidas à testes de termoestabilidade, pode-se destacar as variações observadas por Zhang *et al.* (2014), que obtiveram título 26 e 64 U para a lectina do cogumelo *Stropharia rugosoannulata*. Sua atividade hemaglutinante permaneceu estável entre 10 °C e 60 °C, apresentando-se com 50% da atividade a 70 °C e 25% da atividade entre 80 e 90 °C, não sendo detectada nenhuma atividade a 100 °C. Por esse motivo, essa lectina foi considerada pelos autores como moderadamente termoestável.

Quanto a aglutinação em si, que é utilizada para identificar a presença ou ausência de lectinas, é importante destacar que outros compostos também têm a capacidade de aglutinar eritrócitos. Esses compostos são os fosfolipídios (TSIVION; SHARON, 1981) e os taninos (MAKELA, 1957). Dessa forma, para identificar que a aglutinação é realmente mediada por uma lectina, é essencial aplicar o teste de inibição da atividade hemaglutinante, realizado com carboidratos. Somente a aglutinação realizada por lectinas pode ser inibida por açúcares (GRANGEIRO *et al.* 1990). A elucidação do carboidrato

ligante é um dos principais passos iniciais para caracterização de uma lectina, avaliada através da inibição da atividade de aglutinação na presença de monossacarídeos e dissacarídeos distintos (MOURA, 2019).

Ao testar a inibição da AHE do extrato das frações aquosa e de fosfato de *P. ostreatus* (1467) cultivado em açai e em marupá, frente a fucose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manose e sacarose, na concentração de 0,1 M, após 30 min e 24 h de incubação a 37 °C, somente os extratos em água e em fosfato de 1467 cultivado em açai se ligaram aos carboidratos testados, tanto aquecido quanto não aquecido. O único carboidrato, dentre os testados, que promoveu a inibição da atividade hemaglutinante nesses extratos foi a lactose, independentemente do tempo de incubação testado (**Tabela 2**). Não foi possível detectar, entre os carboidratos testados, um que promovesse a inibição da AHE para os extratos de *P. ostreatus* 1467 cultivado em marupá.

A lactose, açúcar dentre os testados, que conseguiu inibir a AHE do extrato em água e em fosfato de *P. ostreatus* (1467) cultivado em açai, também foi um dos açúcares inibidores encontrados por Wang, Gao e Ng (2000) e Davitashvili *et al.* (2010) ao testarem lectinas oriundas da mesma espécie fúngica, *P. ostreatus*.

A lactose é um dissacarídeo formado por glicose e galactose. Entretanto, não houve hemaglutinação diante desses monossacarídeos de forma isolada. Moura (2019) obteve o mesmo resultado para a lectina isolada do fungo *Langermannia bicolor* (LLB), que também não foi inibida por esses carboidratos separadamente. A autora sugere que possivelmente o domínio reconhecedor de carboidratos dessa lectina requer os dois resíduos de monossacarídeos ligados glicosidicamente, para que ocorra a interação.

Outras lectinas de basidiomicetos possuem especificidade para lactose foram encontradas nas espécies *Agrocybe aegerita*, *Agrocybe cylindracea*, *Boletus subtomentosus*, *Laccaria amethystine*, *Schizophyllum commune*, *Tricholoma mongolicum*, *Boletus edulis*, *Clitocybe nebularis*, *Macrolepiota procera*, *Laetiporus sulphureus*, *Lactarius flavidulus* (BOVI *et al.*, 2012; POHLEVEN *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2018, WU *et al.*, 2011; ŽURGA *et al.*, 2014). Esse pode ser um indício da importância desse domínio de reconhecimento da lactose para os fungos, visto sua ampla presença em diferentes gêneros (MOURA, 2019).

O *screening* de lectinas do segundo cultivo foi feito para 6 extratos oriundos do fungo 474 cultivado em 3 diferentes meios (açai, abacaxi e mix entre açai e abacaxi na proporção 1:1) e extraídos em água e solução salina a 0,15M, semelhante aos primeiros

extratos do primeiro cultivo. Também foram testados 6 extratos do fungo 542 cultivados e extraídos nas mesmas condições de 474.

O material foi testado diante de suspensões de eritrócitos dos grupos sanguíneos humanos A, B, AB e O para determinação da AHE e com relação aos extratos do segundo cultivo, para *P. ostreatus* (474) o teor proteico dos extratos (Bradford) variou de 0,08 a 0,24 mg/mL de proteínas solúveis totais (Tabela 3). Para *P. ostreatus* (542) o teor proteico dos extratos (Bradford) variou de 0,04 a 0,19 mg/mL de proteínas solúveis totais (Tabela 3). Não houve um padrão e em alguns tratamentos a extração com água recuperou mais proteínas. Em outros a extração salina foi mais bem-sucedida na obtenção de maiores teores proteicos ou, ainda, não houve diferenças entre as duas. Nenhuma das amostras das linhagens 474 e 542 de *P. ostreatus* apresentaram atividade hemaglutinante, não possuindo Unidade ou Título Hemaglutinante (Tabela 3).

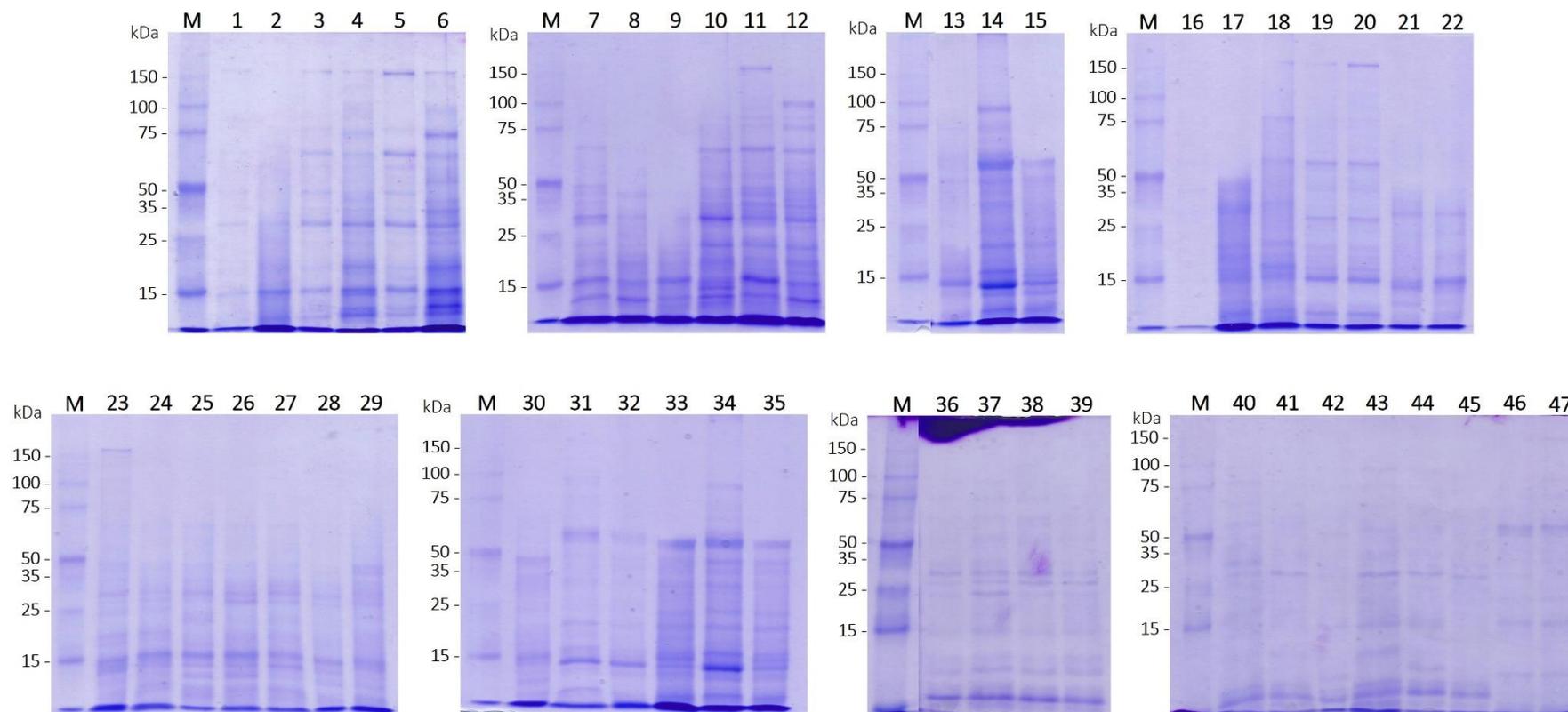
Tabela 3 - Teor proteico e unidade/título hemaglutinante dos extratos de 474 e 542 (segundo cultivo)

Linhagem	Substrato	Extrator	Proteínas solúveis (mg/mL)	Unidade/ Título Hemaglutinante
474	Abacaxi	Água	0.24a ± 0.02	-
		NaCl	0.09e ± 0.01	-
	Abacaxi+Açaí	Água	0.08e ± 0.02	-
		NaCl	0.20b ± 0.00	-
	Açaí	Água	0.08e ± 0.00	-
		NaCl	0.08e ± 0.01	-
542	Abacaxi	Água	0.04f ± 0.01	-
		NaCl	0.13c ± 0.01	-
	Abacaxi+Açaí	Água	0.05f ± 0.00	-
		NaCl	0.19b ± 0.00	-
	Açaí	Água	0.04f ± 0.01	-
		NaCl	0.11d ± 0.00	-

Letras representam o teste de comparação de médias (Scott-Knott) a 5%. Valores após ± correspondem ao desvio padrão; (-) não houve atividade hemaglutinante.

Afim de obter mais informações sobre as proteínas extraídas nos dois cultivos, os extratos proteicos foram analisados por eletroforese em SDS-PAGE (**Figura 3**). Essa análise demonstrou que os extratos proteicos apresentam bandas que variam de 10 a 150 kDa, mas, no geral, apresentam uma maior concentração na faixa de 15 a 50 kDa, destacando-se as extrações salinas, as quais apresentaram um maior número de bandas. No entanto, o perfil eletroforético das amostras não trouxe informações sobre uma possível lectina, uma vez que lectinas fúngicas não seguem um padrão de massa molecular.

Figura 3 – Perfil eletroforético dos extratos de *Pleurotus ostreatus* (474, 542, 1467 e 885) em diferentes solventes extratores



Cultivo 2: 474 Abacaxi – Água (1); 474 Abacaxi – NaCl (2); 474 Abacaxi + açai – Água (3); 474 Abacaxi + açai – NaCl (4); 474 Açai – Água (5); 474 Açai – NaCl (6); 542 Abacaxi – Água (7); 542 Abacaxi – NaCl (8); 542 Abacaxi + açai – Água (9); Abacaxi + açai – NaCl (10); 542 Açai – Água (11); 542 Açai – NaCl (12). **Cultivo 1:** 1467 Açai – Água (13); 1467 Açai – NaCl (14); 1467 Capim-elefante – Água (15); 1467 Capim-elefante – NaCl (16); 885 Açai – Água (17); 885 Açai – NaCl (18); 885 Capim-elefante – Água (19); 885 Capim-elefante – NaCl (20); 474 Açai – Água (21); 474 Capim-elefante – Água (22); 474 Marupá – Água (23); 474 Pinus – Água (24); 542 Açai – Água (25); 542 Capim-elefante – Água (26); 542 Marupá – Água (27); 542 Pinus – Água (28); 885 Marupá – Água (29); 885 Pinus – Água (30); 1467 Marupá – Água (31); 1467 Pinus – Água (32); 1467 Marupá – Fosfato (33); 1467 Açai – Fosfato (34); 1467 Pinus – Fosfato (35); 474 Açai – NaCl (36); 474 Capim-elefante – NaCl (37); 474 Marupá – NaCl (38); 474 Pinus – NaCl (39); 542 Açai – NaCl (40); 542 Capim-elefante – NaCl (41); 542 Marupá – NaCl (42); 542 Pinus NaCl (43); 885 Marupá – NaCl (44); 885 Pinus – NaCl (45); 1467 Marupá – NaCl (46); 1467 Pinus – NaCl (47).

Segundo Khan e Khan (2011), lectinas fúngicas são, em sua maioria, proteínas de baixa massa molecular, com a maioria das lectinas isoladas de fungos presentes na faixa de 15 a 90 kDa. Singh *et al.* (2015) relatam que as lectinas de cogumelos comestíveis já descritas variam de 12 kDa a 68 kDa. Entretanto, há relatos de lectinas de cogumelos em faixas maiores, como as lectinas de *P. ostreatus* de 110 e 125 kDa, encontrada por Davitashvili *et al.* (2010) e uma das lectinas de *Cerrena unicolor* de 160 kDa, encontrada por Davitashvili *et al.* (2015). Além disso, lectinas em faixas menores, como uma das lectinas encontradas por Davitashvili *et al.* (2010), com banda de 1,5 - 2 kDa também são relatadas.

CONCLUSÃO

Os métodos de extração de proteínas, bem como os substratos de cultivo testados foram fatores determinantes na observação da atividade hemaglutinante, obtendo-se variações na AHE conforme a combinação desses fatores, recomendando-se as extrações aquosa e em fosfato para a obtenção de lectinas. Assim, os dados obtidos oferecem informações para futuros estudos de prospecção de lectinas com linhagens de *P. ostreatus*, seguindo a observação de fatores determinantes, recomendando-se a avaliação complementar em outros tipos sanguíneos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTIC) / Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e às agências de fomento à pesquisa CAPES (Projeto Pró-Amazônia n° 3251/2013), CNPQ (Projeto Universal n° 461729/2014-8) e FAPEAM (Projeto n° 062.00648/2015), para financiamento e concessão de bolsas de pós-graduação e apoio técnico.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, L. V. B.; GOUVÊA, P. R. S.; OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; SALES-CAMPOS, C.; CHEVREUIL, L. R. Production of commercial and Amazonian strains of *Pleurotus ostreatus* in plant waste. Brazilian Journal of Development, v. 8, n. 6, p. 47299-47321, 2022. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv8n6-299>

BOVI, M.; CENCI, L.; PERDUCA, M. CAPALDI, S.; CARRIZO, M. E.; CIVIERO, L.; CHIARELLI, L. R.; GALLIANO, M.; MONACO, H. L. BEL β -trefoil: A novel lectin with antineoplastic properties in king bolete (*Boletus edulis*) mushrooms, Glycobiology, v. 23, n. 5, p. 578–592, 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/glycob/cws164>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

BRADFORD, MARION M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)>. Acesso em: 05 jan. 2022.

CAVADA, B. S.; PINTO-JUNIOR, V. R.; OSTERNE, V. J. S.; NASCIMENTO, K. S. ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships. International Journal of Molecular Sciences, v. 20, n. 30, p. 1-24, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms20010030>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

CODINA-TORRELLA, I.; GUAMIS, B.; TRUJILLO, A. J. Characterization and comparison of tiger nuts (*Cyperus esculentus* L.) from different geographical origin: Physico-chemical characteristics and protein fractionation. Industrial Crops and Products, v. 65, p. 406-414, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.007>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart. (Camaratu Bean). Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 55, n. 3, p. 261-273, 1995.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, P. M. S.; OLIVEIRA, W. F.; MOURA, M. C.; PONTUAL, E. V.; GOMES, F. S.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S. Lectins as antimicrobial agents. Journal of applied microbiology, v. 125, n. 5, p. 1238-1252, 2018.

DAVITASHVILI, E.; KAPANADZE, E.; KACHLISHVILI, E.; METREVELI, E.; ELISASHVILI, V. Comparative Study of the Hemagglutinating Activity of Lectins Isolated from Different Developmental Stages of Culinary-Medicinal Oyster Mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. (Agaricomycetidae). International Journal of Medicinal Mushrooms, v. 12, n. 1, p. 43-50, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v12.i1.40>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

DAVITASHVILI, E.; KAPANADZE, E.; KACHLISHVILI, E.; MIKIASHVILI, N.; ELISASHVILI, V. Isolation and Characterization of Lectins Formed by *Cerrena unicolor* (Higher Basidiomycetes) in Solid State Fermentation of Sorghum and Wheat Straw. International Journal of Medicinal Mushrooms, v. 17, n. 5, p. 427-434, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1615/INTJMEDMUSHROOMS.V17.I5.20>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. Revista brasileira de biometria, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. ISSN 1983-0823. 2019.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins, and implications in cancer therapeutics. Acta Histochemical, v. 113, p. 236-247, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2010.02.004>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

GOLAK-SIWULSKA, I.; KAŁUŻEWICZ, A.; SPIŻEWSKI, T.; SIWULSKI, M.; SOBIERALSKI, M. Bioactive compounds and medicinal properties of Oyster mushrooms (*Pleurotus* sp.). Folia Horticulturae, v. 30, n. 2, p. 191-201, 2018.

GOLDSTEIN, I. J.; PORETZ, R. D. Isolation, physico-chemical characteristics, and carbohydrate binding specificity of lectins. In: LIENER, I.E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. *The Lectins. Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. Orlando: Academic Press, 1986. p. 33-247.

GÓMEZ, Geraldo Pérez. Estudio preliminar de la fitohemoagutinina de la *Canavalia brasiliensis*. Revista Colombiana de Química, v. 6, p. 13-26, 1976.

GRANGEIRO, T. B.; OLIVEIRA, I. T. A.; MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Atividade hemaglutinante em sementes de *Dioclea rostrata* Benth. Acta Botanica Brasilica, v. 4, n. 2, p. 61-68, 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-33061990000300007>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

GUILLOT, J.; KONSKA, G. Lectins in Higher Fungi. Biochemical Systematics and Ecology, v. 25, n. 3, p. 203-230, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(96\)00110-X](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(96)00110-X)>. Acesso em: 10 jan. 2022.

HASSAN, M. A. A.; ROUF, R.; TIRALONGO, E.; MAY, T. W.; TIRALONGO, J. Mushroom Lectins: Specificity, Structure and Bioactivity Relevant to Human Disease. International Journal of Molecular Sciences, v. 16, p. 7802-7838, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms16047802>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

KENNEDY, J. F., PALVA, P. M. G., CORELLA, M. T. S., CAVALCANTI, M. S. M., COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. Carbohydrate Polymers, v. 26, n. 3, p. 219-230, 1995. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)00091-7](https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)00091-7)>. Acesso em: 10 jan. 2022.

KHAN, F.; KHAN, M. I. Fungal lectins: current molecular and biochemical perspectives. International Journal of Biological Chemistry, v. 5, pp. 1-20, 2011.

KUMAR, K. Nutraceutical Potential and Processing Aspects of Oyster Mushrooms (*Pleurotus* Species). Current Nutrition & Food Science, v. 15, n. 3, p. 1-12, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2174/1573401314666181015111724>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

LEAL, L.S.S.; SILVA, R.O.; ARAUJO, T.S.L.; SILVA, V.G., BARBOSA, A.L.R.; MEDEIROS, J.V.R.; OLIVEIRA, J.S.; VENTURA, C.A. The anti-inflammatory and antinociceptive effects of proteins extracted from *Acacia farnesiana* seeds. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.18, n.1, p. 38-47, 2016.

MAKELA, O. Studies in hemagglutinins of leguminosae seeds. Annales Medicinæ Experimentalis et Biologiae Fenniae, v. 35, n. 11, p. 1-133, 1957.

MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiology, v. 59, p. 783-787, 1977.

MOREIRA, R. A.; AINOUZ, I. L. Lectins from seeds of jack fruit (*Artocarpus integrifolia* L.): isolation and purification of two isolectins from the albumin fraction. Biologia Plantarum, v. 23, n. 3, p. 186-192, 1981.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (MART.): isolation, characterization and behavior during germination. Biologia Plantarum, v. 26, n. 2, p. 113-120, 1984.

MOURA, Geovanna Maria de Medeiros. Uma nova lectina lactose-específica isolada do fungo *Langermannia bicolor* com propriedades antibiofilme. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte. 95 p., 2019.

NASCIMENTO, K. S.; ANDRADE, M. L. L.; SILVA, I. B.; DOMINGUES, D. L.; CHICAS, L. S.; SILVA, M. T. L.; BRINGEL, P. H. S. F.; MARQUES, G. F. O.; MARTINS, M. G. Q.; LÓSSIO, C. F.; NASCIMENTO, A. P. M.; WOLIN, I. A. V.; LEAL, R. B.; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S. Heterologous production of α -chain of *Dioclea sclerocarpa* lectin: Enhancing the biological effects of a wild-type lectin. International Journal of Biological Macromolecules, v. 156, p. 1-9, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.009>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

NG, T. B.; CHAN, Y. S.; NG, C. C.; WONG, J. H. Purification and characterization of a lectin from green split peas (*Pisum sativum*). Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 177, n. 6, p. 1374-1385, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12010-015-1821-x>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

NIKITINA, V. E.; LOSHCININA, E. A.; VETCHINKINA, E. P. Lectins from Mycelia of Basidiomycetes. International Journal of Molecular Sciences, v. 18, n. 7, p. 1-17, 2017. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3390%2Fijms18071334>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

OGURI, S.; ANDO, A.; NAGATA, Y. A Novel Developmental Stage-Specific Lectin of the Basidiomycete *Pleurotus cornucopiae*. Journal of Bacteriology, v. 178, n. 19, p. 5692-5698, 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/jb.178.19.5692-5698.1996>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

PAN, W. L.; NG, T. B. 2015. A dimeric *Phaseolus coccineus* lectin with anti-oxidative, anti-proliferative and cytokine-inducing activities. International Journal of Biological Macromolecules, v. 81, p. 960-966, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.034>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

PEREIRA JÚNIOR, Francisco N. Caracterização estrutural parcial e biológica de uma lectina de sementes de *Dioclea reflexa* Hook F. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará. 103 p., 2014.

POHLEVEN, J.; OBERMAJER, N.; SABOTIČ, J.; ANŽLOVAR, S.; SEPČIĆ, K.; KOS, J.; KRALJ, B.; ŠTRUKELJ, B.; BRZIN, J. Purification, characterization and cloning of a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic T cells. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1790, n. 3, p. 173-181, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.11.006>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

RAMOS, M. V. Biosynthesis and structural lectin features of the Phaseoleae, Diocleinae and the Viciae (Leguminosae = Fabaceae) under a phylogenetic perspective. Journal of Comparative Biology, v. 2, p. 129-136, 1997.

RUGIDER, H. Isolation of plant lectins. In: GABIUS HJ., GABIUS S. (ed). Lectins and Glycobiology. Springer Laboratory. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 31-46, 2003.

SALES-CAMPOS, C.; SILVA, J. F.; NASCIMENTO, L. B. B.; GOUVÊA, P. R. S.; AGUIAR, L. V. B.; CHEVREUIL, L. R.; FARIÑA, J. I.; PONTES, G. S. Nutritional and Bioactive Properties of an Amazon Wild Oyster Culinary-Medicinal Mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes): Contributions to Functional Food and Human Health. Volume 23, Edição 7, 2021, pp. 79-90, International Journal of Medicinal Mushrooms. DOI:10.1615/IntJMedMushrooms.2021038780

SHARMA, M.; HEGDE, P.; HIREMATH, K.; VISHWANATH, H. R.; KAMALANATHAN, A. S.; SWAMY, B. M.; INAMDAR, S. R. Purification, characterization and fine sugar specificity of a N-Acetylgalactosamine specific lectin from *Adenia hondala*. Glycoconjugate Journal, v. 35, n. 6, p. 511–523, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10719-018-9843-6>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

SINGH, S. S.; WANG, H.; CHAN, Y. S.; PAN, W.; DAN, X.; YIN, C. M.; AKHOUF, O.; NG, T. B. Lectins from Edible Mushrooms. Molecules, v. 20, p. 446-469, 2015. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3390%2Fmolecules20010446>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

SINGH, R. S.; WALIA, A. K.; KENNEDY, J. F. Mushroom lectins in biomedical research and development. International journal of biological macromolecules, v. 151, p. 1340-1350, 2020.

TESFAY, T.; GODIFEY, T.; MESFIN, R.; KALAYU, G. Evaluation of waste paper for cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with some added supplementary materials. AMB Express, v. 10, n. 15, p. 1-8, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13568-020-0945-8>>. Acesso em: 15 jan. 2022.

TORRES, M. E. L. M.; BRANDÃO-COSTA, R. M. P.; SANTOS, J. V. O.; CAVALCANTI, I. M. F.; SILVA, M. M., SILVA; NASCIMENTO, T. P.; NASCIMENTO, C. O.; PORTO, A. L. F. DdeL, a novel thermostable lectin from *Dypsis decaryi* seeds: Biological properties. Process Biochemistry, v. 86, p. 169-176, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.07.021>>. Acesso em: 10 fev. 2022.

TSIVION, Y.; N. SHARON. Lipid mediated hemagglutination and its relevance to lectin - mediated agglutination. Biochemica at Biophysica Acta, v. 642, n. 2, p. 336-344, 1981. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90450-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90450-8)>. Acesso em: 07 jan. 2022.

WANG, H.; GAO, J.; NG, T. B. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the Oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 275, p. 810–816, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3373>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

WANG, Y.; WU, B.; SHAO, J.; JIA, J.; TIAN, Y.; SHU, X.; REN, X. GUAN, Y. Extraction, purification and physicochemical properties of a novel lectin from *Laetiporus sulphureus* mushroom. LWT, v. 91, p. 151-159, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.032>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

WALKER, Jonh M. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In: WALKER, Jonh M. (ed). The Protein Protocols Handbook. Hertsfordshire: Humana Press, p. 177-186, 2009.

WU, Y. WANG, H.; NG, T. B. Purification and characterization of a lectin with antiproliferative activity toward cancer cells from the dried fruit bodies of *Lactarius flavidulus*. Carbohydrate Research, v. 346, n. 16, p. 2576-2581, 2011.

ZHOU, R.; LIU, Z. K.; ZHANG, Y. N.; WONG, J. H.; NG, T. B.; LIU, F. Research progress of bioactive proteins from the edible and medicinal mushrooms. Current Protein and Peptide Science, v. 20, n. 3, p. 196-219, 2019.

ZHANG, W.; TIAN, G.; GENG, X.; ZHAO, Y.; NG, T.B.; ZHAO, L.; WANG, H. Isolation and characterization of a novel lectin from the edible mushroom *Stropharia rugosoannulata*. Molecules, v. 19, p. 19880-19891, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules191219880>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

ŽURGA, S.; POHLEVEN, J.; RENKO, M.; BLEULER-MARTINEZ, S.; SOSNOWSKI, P.; TURK, D.; KÜNZLER, M.; KOS, J.; SABOTIČ, J. A novel β -trefoil lectin from the parasol mushroom (*Macrolepiota procera*) is nematotoxic. The Febs Journal, v. 281, n. 15, p. 3489-3506, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/febs.12875>>. Acesso em: 07 fev. 2022.

8. CAPÍTULO 7 - Prospecção de proteínas bioativas em diferentes linhagens de *Pleurotus ostreatus*

(Artigo a ser submetido após ajuste, correção e tradução)

Prospecção de proteínas bioativas em diferentes linhagens de *Pleurotus ostreatus*

Lorena Vieira Bentolila de Aguiar^{1,2}, Vítor Alves Pessoa³, Sérgio Dantas de Oliveira Júnior², Larissa Batista de Brito do Nascimento³, Ceci Sales-Campos², Larissa Ramos Chevreuil²

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, BIONORTE, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Amazonas 69065-001, Brasil

²Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas 69067-375, Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas 69067-005, Brasil

RESUMO

Os cogumelos produzem uma variedade de proteínas com potencial industrial e medicinal, cujo teor pode variar conforme a espécie, linhagem, substrato e métodos de cultivo, tornando fundamental a busca por novas fontes e formas de extração para maximizar sua obtenção. Nesse sentido, o objetivo geral da pesquisa foi prospectar proteínas como proteases, inibidores enzimáticos e proteínas antioxidantes produzidas por duas diferentes linhagens de *Pleurotus ostreatus*, cultivadas em distintos resíduos vegetais locais. Para isso, os basidiocarpos das linhagens 542 e 474 de *Pleurotus ostreatus*, cultivadas em açaí, abacaxi e uma mistura dos dois (1:1 m:m), foram extraídos em água e solução salina, sendo posteriormente submetidos a avaliação da atividade proteolítica total, inibição da tripsina, α -amilase, α -glicosidase e lipase pancreática, bem como a mensuração da capacidade antioxidante pelas metodologias de ABTS, DPPH, habilidade quelante, poder redutor e quantificação de compostos fenólicos. Quanto a atividade proteolítica, os extratos salinos apresentaram a maior atividade, destacando-se 474 em açaí. A inibição da tripsina foi superior nos extratos aquosos, destacando-se 474 em abacaxi

e 542 em açaí e abacaxi. Não foram observadas atividades de inibição sobre a α -amilase, α -glicosidase e lipase. Com relação a atividade antioxidante, no ensaio com ABTS^{•+}, o potencial foi maior nos extratos aquosos, enquanto para DPPH[•] destacou-se o extrato aquoso de 474 em abacaxi. A maioria das amostras apresentaram potencial de quelação, com destaque para os extratos salinos e no poder redutor destacaram-se os extratos salinos de 542. As amostras apresentaram ainda uma alta concentração de compostos fenólicos, possivelmente em complexo com as proteínas da amostra. Assim, destaca-se a influência do método de obtenção dos extratos na bioatividade das proteínas, bem como do substrato e da linhagem utilizada no cultivo, tendo as linhagens de *Pleurotus ostreatus* testadas apresentado proteínas distintas conforme a mudança desses parâmetros.

Palavras-chave: cogumelos comestíveis; extração proteica; inibidores enzimáticos, proteínas antioxidantes.

ABSTRACT

Mushroom produce a variety of proteins with industrial and medicinal potential, with content that can vary according to species, strains, substrate and cultivation methods, making it essential to search for new sources and forms of extraction to maximize its obtainment. In this sense, the general objective of the research was to prospect proteins such as proteases, enzyme inhibitors and antioxidant proteins produced by two different strains of *Pleurotus ostreatus*, cultivated in different local plant residues. For this, the basidiocarps of strains 542 and 474 of *Pleurotus ostreatus*, cultivated in açaí, pineapple and a mixture of both (1:1 w:w), were extracted in water and saline solution, being later submitted to the evaluation of the total proteolytic activity, inhibition on trypsin, α -amylase, α -glucosidase and pancreatic lipase, as well as the measurement of antioxidant capacity by methodologies of ABTS, DPPH, chelating ability, reducing power and quantification of phenolic compounds. As for the proteolytic activity, the saline extracts showed the highest activity, highlighting 474 cultivated in açaí. Trypsin inhibition was higher in aqueous extracts, especially for 474 cultivated in pineapple and 542 cultivated in açaí and pineapple mixture. No inhibition activities were observed on α -amylase, α -glucosidase and lipase. Regarding the antioxidant activity, in the assay with ABTS, the potential was higher in the aqueous extract, while for DPPH the aqueous extract of 474 in pineapple stood out. Most samples showed chelation potential, with emphasis on saline extracts and in reducing power, saline extracts of 542 stood out. The samples also showed a high

concentration of phenolic compounds, possibly in complex with the proteins of the sample. Thus, the influence of the method of obtaining extracts on the bioactivity of the proteins, as well as the substrate and the strain used in the cultivation, is highlighted, with the *Pleurotus ostreatus* strains tested showing different proteins according to the change in these parameters.

Keywords: edible mushrooms; protein extraction; enzyme inhibitors; antioxidant proteins.

1. Introdução

As espécies do gênero *Pleurotus* são descritas como produtoras de uma variedade de peptídeos e proteínas bioativas, com potencial aplicação na área da saúde. Nesse contexto, já são descritos polipeptídeos com atividade antiviral, anticancerígena, antifúngica, antibacteriana, anti-hipertensiva, antioxidante, hipoglicêmica, imunomoduladora e inibitória frente a enzimas de importância clínica (GOLAK-SIWULSKA *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2019).

Dentre o grupo de proteínas bioativas, encontram-se as proteases, enzimas capazes de catalisar a hidrólise de proteínas, levando à liberação de peptídeos e aminoácidos. Esse grupo de enzimas apresenta um papel industrial fundamental, tendo em vista às várias aplicações químicas e bioquímicas, além da sua especificidade, biodegradabilidade e atividade sob condições brandas. Sua aplicabilidade compreende as indústrias de detergente, couro, alimentos, papel e biorremediação, em adição à possibilidade de utilização no tratamento de inflamações e lesões (GIMENES; SILVEIRA; TAMBOURGI, 2021; NAVEED *et al.*, 2021).

Os inibidores enzimáticos, por sua vez, compreendem proteínas e peptídeos com ação regulatória sobre a atividade catalítica de enzimas, por exemplo amilases, glicosidades, lipases e proteases, cujo controle do processo de hidrólise pode contribuir para o tratamento de diversas condições clínicas (ÁVILA-ALVAREZ *et al.* 2022). Nesse sentido, a inibição da α -amilase, α -glicosidase e lipase pancreática representam alternativas no tratamento de distúrbios metabólicos, como é o caso da diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), enquanto a regulação de proteases serínicas pode apresentar benefícios terapêuticos no tratamento do câncer, distúrbios de coagulação sanguínea e infecções virais (HARISH; UPPULURI, 2018; AWOSIKA; ALUKO, 2019).

No contexto da atividade antioxidante, as proteínas possuem a capacidade de restringir o processo de oxidação utilizando mecanismos biologicamente projetados, como as proteínas ligantes de ferro e enzimas antioxidantes, ou ainda por meio de mecanismos inespecíficos. À vista disso, diversos estudos têm demonstrado que diferentes proteínas antioxidantes

apresentam mecanismos de ação antioxidante distintos, incluindo a limitação da oxidação lipídica, redução de hidroperóxidos, eliminação de radicais livres, inativação de espécies reativas de oxigênio e quelação de metais de transição pró-oxidativos (SOHAIB *et al.*, 2017; SHAO *et al.* 2018).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico de extratos proteicos de *Pleurotus ostreatus* através de diferentes ensaios biológicos e químicos. Em adição a isso, o trabalho descreve de forma comparativa as atividades proteicas de quatro linhagens fúngicas, provenientes de cultivos em diferentes substratos lignocelulósicos, bem como a utilização de diferentes solventes na extração das proteínas.

2. Material e métodos

2.1. Material biológico

Os basidiocarpos utilizados nos ensaios foram obtidos a partir dos cultivos sólidos das linhagens 474 e 542 de *P. ostreatus*, ambas cultivadas em substratos a base de coroa de abacaxi (*Ananas comosus*), semente de açaí (*Euterpe precatoria*) e uma mistura de ambos (1:1 m/m).

2.2. Preparação dos extratos proteicos

As extrações de proteínas foram realizadas a partir da metodologia modificada de Codina-Torrella; Guamis; Trujillo (2015). A extração proteica foi realizada a partir de 5 g dos cogumelos liofilizados e triturados, os quais foram homogeneizados em água destilada ou NaCl (0,15 M) na proporção 1:20 (m/v) e agitados em shaker a 140 rpm por 2 h, a 10 °C. Posteriormente, foram centrifugados a 10.000 x g, durante 20 minutos a 4 °C, e filtrados e o sobrenadante foi liofilizado. No caso da extração salina, os extratos foram dialisados por 48 h em água destilada antes da liofilização.

2.3. Atividade Proteolítica e Inibidores de Tripsina

A atividade proteolítica total nos extratos proteicos foi determinada em microplacas, a partir da metodologia adaptada de Hamada, Kubota e Sagisaka (2017). A atividade dos inibidores de tripsina foi verificada com a utilização do substrato BAPNA, específico para a tripsina, utilizando a metodologia adaptada de Machado *et al.* (2013).

2.4. Atividade inibitória sobre enzimas digestivas

A inibição da α -amilase foi verificada de acordo com a metodologia modificada de Subramanian, Asmawi e Sadikun (2008), sendo utilizado como controle positivo de inibição da α -amilase a acarbose. A atividade inibitória da enzima α -glicosidase foi verificada a partir da metodologia modificada de Andrade-Cetto, Becerra-Jiménez e Cárdenas-Vázquez (2008). Para a inibição enzimática da lipase pancreática foi utilizada a metodologia modificada de SLANC *et al.* (2017).

2.5. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada de acordo com os métodos de DPPH[•], ABTS^{•+}, poder redutor e habilidade quelante, conforme metodologias adaptadas para microplacas de 96 poços, por Khatua, Ghosh e Acharya (2017).

2.5.1. DPPH[•]

Na inibição de radicais livres DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), 180 μ L de DPPH[•] (4 mg.mL⁻¹) foram incubados com 20 μ L dos extratos, durante 30 minutos, no escuro. Decorrido o tempo de incubação, as absorvâncias foram obtidas no comprimento de onda de 595 nm. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão do percentual de inibição.

2.5.2. ABTS^{•+}

Para a determinação do potencial antioxidante pelo método de inibição do radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)), inicialmente, uma solução estoque de ABTS radicalar foi preparada pela reação de ABTS (7 mM) e persulfato de potássio (K₂S₂O₈, 2,45 mM) por 16 horas, no escuro, em temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi diluída em etanol até obter uma absorvância entre 0,8 e 1,0 a 754 nm. O ensaio consistiu na incubação de 180 μ L de ABTS^{•+} com 20 μ L dos extratos por 5 minutos, no escuro, com posterior registro da absorvância à 754 nm. Os resultados foram expressos por média \pm desvio padrão do percentual de inibição.

2.5.3. Habilidade quelante

A determinação da habilidade quelante sobre o íon Fe^{2+} foi realizada pela incubação de 100 μL das amostras com 5 μL de cloreto de ferro II (3 mM), 10 μL de solução de ferrozina (0,12 mM) e 85 μL de água destilada, durante 15 minutos, com posterior leituras espectrofotométricas a 595 nm. Os resultados foram expressos por média \pm desvio padrão do percentual quelante.

2.5.4. Poder redutor

Para a determinação do poder redutor sobre íon férrico (Fe^{3+}), 10 μL das amostras foram incubados com 25 μL de tampão fosfato (0,2 M, pH 6,6) e 25 μL de ferrocianeto de potássio (1%), durante 20 minutos, em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Posteriormente, foram adicionados 25 μL de ácido tricloroacético (10% v/v), 85 μL de água destilada e 8,5 μL de cloreto de ferro III, realizando uma incubação por mais 15 minutos e consecutiva leitura a 750 nm. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância, onde um maior valor indica maior poder de redução das amostras.

2.6. Quantificação de Compostos fenólicos totais (CFT)

O teor de compostos fenólicos totais nos extratos proteicos foi determinado a partir da metodologia descrita por Pires *et al.* (2017), utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Para isso, as amostras (20 μL), água (200 μL), reagente Folin-Ciocalteu (20 μL) e solução de carbonato de sódio à 10% (60 μL) foram homogeneizados e deixados em repouso, ao abrigo da luz durante 20 minutos, com posterior leitura no comprimento de onda de 760 nm. Os dados obtidos foram utilizados para estimar as concentrações de CFT a partir de uma curva padrão de ácido gálico, sendo os resultados expressos em microgramas de equivalência de ácido gálico (EAG) por mg de amostra.

2.7. Análises estatísticas

As análises de atividades de inibição enzimáticas e antioxidantes foram realizadas em triplicata e, os resultados submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o programa estatístico Statistica v.7.0 (Statsoft, USA). As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3. Resultados e discussão

3.1. Atividade proteolítica e Inibitória frente a tripsina

A produção de proteases por micro-organismos é diretamente influenciada por componentes do meio, especialmente fontes de carbono e nitrogênio, e fatores físicos tais como temperatura, pH, tempo de incubação, agitação e a densidade do inóculo (PESSOA, 2016). A **Tabela 1** apresenta a atividade proteases e inibidores de proteases dos extratos proteicos dos basidiocarpos de *Pleurotus ostreatus* 474 e *P. ostreatus* 542.

Tabela 1. Atividade proteolítica e de inibidores de tripsina nos extratos proteicos das diferentes linhagens de *Pleurotus ostreatus*

Linhagem	Substrato	Extrator	Atividade proteolítica	Inibição da tripsina
			(UA/mL)	(%)
474	Açaí	H ₂ O	3.75 ± 0.35g	71.67 ± 3.58c
		NaCl	49.10 ± 1.20 ^a	60.44 ± 2.99f
	Abacaxi	H ₂ O	1.60 ± 0.60g	98.84 ± 1.33a
		NaCl	45.00 ± 1.44b	84.59 ± 3.01b
	Açaí+Abacaxi	H ₂ O	5.67 ± 0.59g	67.24 ± 5.21d
		NaCl	44.90 ± 1.40b	84.70 ± 4.29b
542	Açaí	H ₂ O	15.20 ± 3.00f	71.68 ± 1.35c
		NaCl	29.65 ± 2.95d	52.02 ± 7.13f
	Abacaxi	H ₂ O	19.50 ± 1.28e	85.61 ± 0.89b
		NaCl	43.93 ± 2.97b	63.20 ± 0.82d
	Açaí+Abacaxi	H ₂ O	15.97 ± 0.61f	97.04 ± 0.80 ^a
		NaCl	37.43 ± 2.11c	55.32 ± 7.65f

Letras representam o teste de comparação de médias (Scott-Knott) a 5%. Valores após ± correspondem ao desvio padrão.

No que diz respeito a atividade proteolítica das amostras, os extratos proteicos provenientes da extração com solução salina foram os que apresentaram os maiores valores de unidades de atividade, destacando-se a linhagem 474, principalmente quando cultivada em resíduos a base de sementes de açaí (**Tabela 1**). Nessa vertente, Machado *et al.* (2017) ao trabalharem com a espécie *P. ostreatoroseus* cultivada em tubérculos amazônicos, obtiveram valores de atividade proteolítica da faixa de $18,0 \pm 0,6$ a $142, 2 \pm 0,68$ UA/mL, dados os quais variavam conforme o substrato e a proporção/tipo de suplementação utilizada, indicado que a produção dessas enzimas no gênero *Pleurotus* é diretamente influenciada pelo substrato

utilizado. Ademais, Inácio *et al.* (2015) ao estudar mais de 6 espécies de basidiomicetos do gênero *Pleurotus*, constatou que a maior atividade proteolítica era verificada em fermentações realizadas com *P. eryngii*.

A inibição da protease tripsina, por sua vez, apresentou maiores percentuais nos extratos proteicos provenientes de extração aquosa, destacando-se as amostras da linhagem 474 cultivada em substratos a base de resíduo de abacaxi e a linhagem 542 cultivada no substrato referente a mistura dos resíduos de açaí e abacaxi (Tabela 2). Além disso, é possível verificar que as atividades de inibição foram inversamente proporcionais às atividades proteolíticas, permitindo recomendar extrações aquosas quando objetivada atividade inibitória, ao passo que a extração salina é mais viável para a atividade proteolítica.

Em trabalho anterior, Sales-Campos *et al.* (2021) verificaram o potencial de inibição da tripsina pela linhagem 1467 de *P. ostreatus* cultivada em açaí e capim-elefante, relatando também uma menor atividade inibitória por parte dos extratos provenientes de extração salina, dependendo do substrato de cultivo. Além disso, na literatura científica já é possível encontrar a descrição da inibição da tripsina por moléculas de baixa massa *molecular* de *P. ostreatus*, em adição ao isolamento de um inibidor de tripsina de origem proteica proveniente da espécie *P. floridanus*, o qual apresentou atividade de inibição de proteases de origem microbiana e de inseto (ALI *et al.*, 2014; PANNIPARA; KESAV; RAGHAVAN, 2020).

3.2. Atividade de inibição de enzimas digestivas

Para as amostras das linhagens 542 e 474, extraídas com água e solução salina, foi realizada a verificação da atividade de inibição sobre as enzimas α -amilase, α -glicosidase e lipase pancreática. No entanto, não foram observadas variações da atividade enzimática na concentração inicial testada (10 mg/mL), não se obtendo valores estatisticamente diferentes do controle negativo. Nesse sentido, Tamboli, Bhatnagar & Mishra (2018) ao trabalharem com extratos clorofórmicos, acetônicos, metanólicos e aquosos do micélio de *Pleurotus* sp., também não verificaram inibição da α -amilase pelo extrato aquoso.

Já a inibição da enzima α -glicosidase é também relatada em espécies do gênero *Pleurotus*, como *P. cystidiosus* e *P. eryngii*, porém com essa atividade sendo associada à presença de sesquiterpenoides e polissacarídeos, respectivamente, e não às suas proteínas (TAO *et al.*, 2016; ZHENG *et al.*, 2020). Ainda nesse seguimento, a inibição da lipase pancreática é relatada para a espécie *P. eryngii*, no entanto, em extratos etanólicos, metanólicos e

hidrometanólicos (PALANISAMY *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2020). À vista disso, sugere-se que a ausência de atividade inibitória das amostras do presente trabalho possa ser em decorrência do método e solventes de extração empregados, isso porque podem não ser efetivos para a prospecção das moléculas responsáveis por essa atividade.

3.3. Atividade antioxidante

A **Tabela 2** apresenta a atividade antioxidante dos extratos proteicos dos basidiocarpos de *Pleurotus ostreatus* (474 e 542). As amostras provenientes dos dois solventes extratores foram testadas em ensaios *in vitro* para verificar o potencial de suas proteínas em exercer outras atividades biológicas, incluindo antioxidante.

Tabela 2. Atividade antioxidante dos extratos proteicos das linhagens de *Pleurotus ostreatus*, provenientes do segundo cultivo, mensurada através de diferentes ensaios *in vitro*.

Linagem	Substrato	Extrator	ABTS (%)	DPPH (%)	Habilidade quelante (%)	Poder redutor (ABS à 750 nm)
474	Açaí	H ₂ O	99.30 ± 2.49a	58.55 ± 3.08b	76.38 ± 9.22c	0.167 ± 0.019d
		NaCl	99.52 ± 0.48a	78.50 ± 5.93a	84.88 ± 1.36b	0.140 ± 0.011e
	Abacaxi	H ₂ O	99.84 ± 0.16a	80.35 ± 1.62a	91.20 ± 0.51a	0.232 ± 0.004b
		NaCl	85.32 ± 2.17d	N.D.	77.26 ± 0.26c	0.139 ± 0.013e
	Açaí+Abacaxi	H ₂ O	99.84 ± 0.80a	40.83 ± 7.40b	87.13 ± 1.79b	0.152 ± 0.002d
		NaCl	79.55 ± 0.34e	N.D.	94.53 ± 3.47a	0.157 ± 0.013d
542	Açaí	H ₂ O	99.73 ± 0.24a	40.37 ± 2.31b	89.05 ± 2.74b	0.164 ± 0.004d
		NaCl	99.04 ± 0.96a	N.D.	35.67 ± 4.85d	0.254 ± 0.014 ^a
	Abacaxi	H ₂ O	99.20 ± 1.12a	61.94 ± 3.47b	88.21 ± 1.03b	0.129 ± 0.001e
		NaCl	91.50 ± 1.60c	N.D.	93.89 ± 0.26a	0.207 ± 0.007c
	Açaí+Abacaxi	H ₂ O	99.84 ± 0.28a	75.04 ± 1.96a	85.86 ± 1.08b	0.122 ± 0.001e
		NaCl	94.23 ± 0.96b	N.D.	88.83 ± 0.7b	0.194 ± 0.015c

Letras representam o teste de comparação de médias (Scott-Knott) a 5%. Valores após ± correspondem ao desvio padrão; N.D.: Não determinado.

Com relação à atividade antioxidante dos extratos proteicos das linhagens de *Pleurotus ostreatus* foi observado através da metodologia de inibição do radical ABTS⁺, um maior potencial por parte dos extratos proveniente da extração aquosa, em relação a extração com solução salina, com exceção para as amostras provenientes do cultivo no substrato a base de resíduo de açaí, onde a utilização de diferentes extratores não apresentou diferenças estatísticas. No que diz respeito às diferentes linhagens, não foram observadas grandes diferenças quanto aos resultados (Tabela 2).

Já para o ensaio de inibição do DPPH^{*}, foram observadas maiores variações conforme a linhagem e o solvente extrator, com destaque para o extrato proteico proveniente de extração aquosa da linhagem 474 cultivada em substrato a base de resíduos de abacaxi (Tabela 2). Além disso, para algumas amostras não foi possível determinar o valor do percentual de inibição, levantando-se a hipótese de que sejam problemáticas inerentes a metodologia, isso porque o solvente metanol, utilizado no ensaio para a diluição do reagente DPPH^{*}, levava a precipitação das proteínas das amostras e, de fato, esse solvente já é relatado na literatura científica por sua capacidade de desnaturar e precipitar proteínas, dependendo de sua concentração (SHAO, 2014; NIU *et al.*, 2018).

Ademais, por mais que as metodologias empregando ABTS^{**} e DPPH^{*} possuam o mesmo princípio de mensuração da capacidade de sequestro de radicais livres, o mecanismo de ação dos antioxidantes pode variar, isso porque o radical DPPH^{*} é dito, na literatura científica, como capaz de aceitar um elétron ou próton para se estabilizar, ao passo que o ABTS^{**} apenas aceita prótons (BOLIGON; MACHADO; ATHAYDE, 2014; NIMSE; PAL, 2015). Ainda nesse sentido, outro fator que pode explicar as diferenças dos resultados obtidos destes ensaios é o fato do ABTS^{**} apresentar maior sensibilidade, uma que é mais reativo e necessita de um menor tempo de reação, quando comparado ao DPPH^{*} (MARTYSIAK- ŻUROWSKA; WENTA, 2012).

Para o ensaio de habilidade quelante, a maior parte das amostras apresentou potencial de quelação, com destaque para as amostras provenientes da extração com solução salina que, em geral, apresentaram os maiores resultados. Os dados obtidos nesse ensaio demonstraram-se mais promissores do que o obtido em trabalho anterior por Sales-Campos *et al.* (2021), onde ao se utilizar extratos metanólicos de *P. ostreatus* cultivado em açaí e marupá, obteve-se percentuais de quelação de 45,38 e 74,34%, respectivamente, indicando que as proteínas dessa espécie podem ser mais eficientes nessa atividade. É importante destacar que a mensuração da capacidade antioxidante a partir de sua habilidade quelante é dita como de grande importância, tendo em vista que íons de ferro são considerados alguns dos mais poderosos pró-oxidantes, podendo levar a peroxidação lipídica e acelerar a dissociação de hidroperóxidos lipídicos (VAMANU, 2012).

O ensaio de poder redutor, por sua vez, demonstrou um maior potencial por parte dos extratos da linhagem 542 quando extraídas com solução salina, destacando-se a amostra proveniente do cultivo no substrato a base de resíduos de açaí. No entanto, no geral, os

resultados obtidos para esse ensaio podem ser considerados baixos quando comparados com trabalhos da literatura, como o de Torres-Martínez *et al.* (2021), onde obtiveram valor de absorvância de $0,43 \pm 0,02$ em extratos aquosos de *P. ostreatus* na concentração de 0,1 mg/mL.

Em trabalho realizado por Goswami *et al.* (2021) com extratos provenientes da extração aquosa de *P. ostreatus*, os autores obtiveram, na concentração de 10 mg/mL de amostra, valores de inibição do radical ABTS^{•+} de $51,00 \pm 0,79$ %, inibição do DPPH[•] de $52,00 \pm 0,89$ %, habilidade quelante de $67,84 \pm 1,62$ % e poder redutor de $1,330 \pm 0,005$. Dessa forma, pode-se inferir um grande potencial antioxidante das linhagens de *P. ostreatus* cultivadas em resíduos locais no presente trabalho, principalmente quanto ao sequestro de radicais livres e quelação de íons metálicos, contrastando com uma baixa atividade redutora.

3.4. Quantificação de Compostos Fenólicos Totais (CFT)

O processo de extração de proteínas é frequentemente relatado como susceptível a contaminação com terpenos, pigmentos, carboidratos, compostos fenólicos, dentre outras substâncias (Wu *et al.* 2014). Nesse sentido, a formação de complexos proteínas-fenóis ocorre naturalmente na maior parte dos sistemas alimentares, principalmente através de ligações reversíveis mediadas por interações não covalentes, como as ligações de hidrogênio, pontes hidrofóbicas, forças de van der Waals e interações iônicas (BUTIMEA-CANTÚA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2018).

Esse tipo de interação pode apresentar vantagens estratégicas para ambas as biomoléculas, sendo as proteínas capazes de atuar como um veículo de entrega, protegendo os compostos fenólicos na passagem pelo trato intestinal, aumentando sua biodisponibilidade, ao passo que os compostos fenólicos, enquanto excelentes doadores de prótons, são capazes de proteger as proteínas da oxidação, além de serem capazes de inibir enzimas pró-oxidativas. Ademais, a literatura relata que durante a formação desses complexos, a interação com a proteína pode tanto mascarar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos quanto aumentá-la, o que permite associar a ação antioxidante *in vitro* também às proteínas (ADRAR, MADANI; ADRAR, 2019; JAKOBEK, 2015).

No presente trabalho, foi possível observar a presença de compostos fenólicos em todos os extratos proteicos, principalmente nas amostras extraídas com NaCl, com exceção para ambas as linhagens cultivadas em abacaxi, onde o extrato aquoso apresentou maiores valores. É possível destacar a amostra da linhagem 542 cultivada na combinação de açaí e abacaxi, bem

como a amostra da linhagem 474 cultivada em açaí, ambas extraídas em solução salina, como as condições que proporcionaram uma maior concentração dessa classe de substâncias, demonstrando-se semelhantes estatisticamente (**Tabela 3**).

Tabela 3. Quantificação de compostos fenólicos nos extratos proteicos das diferentes linhagens de *Pleurotus ostreatus*

Linhagem	Substrato	Extrator	$\mu\text{g EAG.mg}^{-1}$ de amostra
474	Açaí	H ₂ O	110.39 \pm 15.45d
		NaCl	194.64 \pm 3.42a
	Abacaxi	H ₂ O	157.61 \pm 14.42b
		NaCl	119.57 \pm 11.68d
	Açaí+Abacaxi	H ₂ O	147.42 \pm 5.24c
		NaCl	162.45 \pm 12.98b
542	Açaí	H ₂ O	131.80 \pm 13.69d
		NaCl	147.46 \pm 2.68c
	Abacaxi	H ₂ O	141.99 \pm 14.43c
		NaCl	72.43 \pm 10.50e
	Açaí+Abacaxi	H ₂ O	125.97 \pm 0.61d
		NaCl	212.05 \pm 8.66a

Letras representam o teste de comparação de médias (Scott-Knott) a 5%. Valores após \pm correspondem ao desvio padrão.

É possível encontrar na literatura científica trabalhos que descrevem o aumento na recuperação de compostos fenólicos ao se utilizar soluções com baixa concentração de NaCl (GÓMEZ-CRUZ *et al.*, 2020; THAMMAPAT; MEESO; SIRIAMORNPUN, 2015). Dados esses que corroboram com o observado para a maior parte das amostras do presente trabalho, onde a extração com solução salina apresentou maiores teores de compostos fenólicos totais (CFT).

Comparando os dados de quantificação obtidos com os dados da literatura, é possível verificar um maior potencial das amostras do presente trabalho como fonte de CFT. À exemplo disso, Martínez-Flores *et al.* (2021) ao trabalharem com *P. ostreatus* e *P. djamor* cultivados em uma combinação de resíduos de aveia, trigo e milho, obtiveram valores de 41.60 ± 1.17 e $11.02 \pm 0.49 \mu\text{g EAG.mg}^{-1}$, respectivamente, em extratos aquosos.

Ainda neste sentido, GAŞECKA *et al.* (2016) ao trabalharem com extratos hidrometanólicos de *P. ostreatus* e *P. eryngii* cultivados em trigo e enriquecidos com selênio e

zinco, obtiveram valores de 13.38 ± 0.58 e 10.86 ± 1.4 $\mu\text{g EAG.mg}^{-1}$, respectivamente. González *et al.* (2021), por sua vez, ao trabalharem com um concentrado proteico de *P. ostreatus*, obtiveram valor de 24.2 ± 0.8 $\mu\text{g EAG.mg}^{-1}$.

Apesar da alta concentração de CFT nas amostras, foi necessário a utilização destas à 10 mg/mL para obter resultados na faixa de 100% no ensaio antioxidante empregando o ABTS⁺, 40 a 90% para o ensaio com DPPH^{*} e de habilidade quelante, além de um verificado baixo potencial de redução. Uma hipótese que pode explicar isso é a supracitada redução da atividade antioxidante dos CFT quando ligados às proteínas.

Ademais, é possível inferir que as linhagens de *Pleurotus ostreatus* cultivadas em resíduos de açaí e abacaxi se apresentam como promissoras também quando o foco for a obtenção de compostos fenólicos. Já no que diz respeito as proteínas, a depender da aplicação desejada, pode ser necessária a realização de etapas de purificação, bem como a verificação de outras metodologias de extração, de forma a evitar possíveis interferências pela formação de complexos entre as moléculas.

4. Conclusão

Os métodos de extração de proteínas, bem como os substratos de cultivo testados foram fatores determinantes na obtenção de proteínas bioativas, obtendo-se variações das atividades conforme a combinação desses fatores. A partir disso, recomenda-se extração aquosa para a obtenção de antioxidantes e inibidores de proteases, ao passo que a extração salina é mais eficiente na recuperação de proteases. Adicionalmente, os dados obtidos fornecem informações para futuros estudos com linhagens de *P. ostreatus*, quando objetivada a obtenção de extratos proteicos com potencial biotecnológico.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTIC) / Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e às agências de fomento à pesquisa CAPES (Projeto Pró-Amazônia n° 3251/2013), CNPQ (Projeto Universal n° 461729/2014-8) e FAPEAM (Projeto n° 062.00648/2015), para financiamento e concessão de bolsas de pós-graduação e apoio técnico.

REFERÊNCIAS

ADRAR, N. S.; MADANI, K.; ADRAR, S. Impact of the inhibition of proteins activities and the chemical aspect of polyphenols-proteins interactions. PharmaNutrition, p. 100142, 2019.

ALI, P. P. M.; SAPNA, K.; MOL, K. R. R.; BHAT, S. G.; CHANDRASEKARAN, M.; ELYAS, K. K. Trypsin inhibitor from edible mushroom *Pleurotus floridanus* active against proteases of microbial origin. Applied biochemistry and biotechnology, v. 173, n. 1, p. 167-178, 2014.

ANDRADE-CETTO, A.; BECERRA-JIMÉNEZ, J.; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. Journal of ethnopharmacology, v. 116, n. 1, p. 27-32, 2008.

ÁVILA-ALVAREZ, K. T.; CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. L.; SEGURA-CENICEROS, E. P.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, J. L.; ARREDONDO-VALDES, R.; GOVEA-SALAS, M.; NAVA-REYNA, E.; ILYINA, A.; RAMOS-GONZÁLEZ, R. Trends in the enzymatic inhibition by natural extracts: a health and food science and technology approach. In: Value-Addition in Food Products and Processing Through Enzyme Technology. Academic Press, 2022. p. 413-425.

AWOSIKA, T. O.; ALUKO, R. E. Inhibition of the in vitro activities of α -amylase, α -glucosidase and pancreatic lipase by yellow field pea (*Pisum sativum* L.) protein hydrolysates. International Journal of Food Science & Technology, v. 54, n. 6, p. 2021-2034, 2019.

BOLIGON, A. A.; MACHADO, M. M.; ATHAYDE, M. L. Technical evaluation of antioxidant activity. Medicinal Chemistry, v. 4, n. 7, p. 517-522, 2014.

BUITIMEA-CANTÚA, N. E.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Phenolic - protein interactions: Effects on food properties and health benefits. Journal of Medicinal Food, v. 21, n. 2, p. 188-198, 2018.

CODINA-TORRELLA, I.; GUAMIS, B.; TRUJILLO, A. J. Characterization and comparison of tiger nuts (*Cyperus esculentus* L.) from different geographical origin: Physico-chemical characteristics and protein fractionation. Industrial Crops and Products, v. 65, p. 406-414, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.007>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

GAŞECKA, M.; MLECZEK, M.; SIWULSKI, M.; NIEDZIELSKI, P. Phenolic composition and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* enriched with selenium and zinc. European Food Research and Technology, v. 242, n. 5, p. 723-732, 2016.

GIMENES, N. C.; SILVEIRA, E.; TAMBOURGI, E. B. An overview of proteases: production, downstream processes and industrial applications. Separation & Purification Reviews, v. 50, n. 3, p. 223-243, 2021.

GOLAK-SIWULSKA, I.; KAŁUŻEWICZ, A.; SPIŻEWSKI, T.; SIWULSKI, M.; SOBIERALSKI, M. Bioactive compounds and medicinal properties of Oyster mushrooms (*Pleurotus* sp.). Folia Horticulturae, v. 30, n. 2, p. 191-201, 2018.

GÓMEZ-CRUZ, I.; CARA, C.; CONTRERAS, M. M.; ROMERO, I. Recovery of Bioactive Compounds from Exhausted Olive Pomace. Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings, v. 79, n. 1, p. 1-7, 2020.

GONZÁLEZ, A.; NOBRE, C.; SIMÕES, L. S.; LOREDO, M. C. A.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; CONTRERAS, J.; TEXEIRA, J.; BELMARESA, R. Evaluation of functional and nutritional potential of a protein concentrate from *Pleurotus ostreatus* mushroom. Food Chemistry, v. 346, p. 128884, 2021.

GOSWAMI, B.; MAJUMDAR, S.; DAS, A.; BARUI, A.; BHOWAL, J. Evaluation of bioactive properties of *Pleurotus ostreatus* mushroom protein hydrolysate of different degree of hydrolysis. LWT, v. 149, p. 111768, 2021.

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

HARISH, B. S.; UPPULURI, K. B. Microbial serine protease inhibitors and their therapeutic applications. International Journal of Biological Macromolecules, v. 107, p. 1373-1387, 2018.

INÁCIO, F. D.; FERREIRA, R. O.; ARAUJO, C. A. V.; BRUGNARI, T.; CASTOLDI, R.; PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M. Proteases of Wood Rot Fungi with Emphasis on the Genus *Pleurotus*. BioMed Research International, v. 2015, Article ID 290161, p. 1-10, 2015.

JAKOBEK, Lidija. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. Food chemistry, v. 175, p. 556-567, 2015.

KHATUA, S.; GHOSH, S.; ACHARYA, K. A simplified method for microtiter based analysis of in vitro antioxidant activity. Asian Journal of Pharmaceutics, v. 11, n. 2, p. S327-S335, 2017.

KIM, D. H.; PARK, Y. H.; LEE, J. S.; JEONG, H. I.; LEE, K. W.; KANG, T. H. Anti-obesity effect of DKB-117 through the inhibition of pancreatic lipase and α -amylase activity. Nutrients, v. 12, n. 10, p. 3053, 2020.

MACHADO, A. R. G.; MARTIM, S. R.; ALECRIM, M. M.; TEIXEIRA, M. F. S. Production and characterization of proteases from edible mushrooms cultivated on amazonic tubers. African Journal of Biotechnology, v. 16, n. 46, p. 2160-2166, 2017.

MARTYSIAK-ŻUROWSKA, D.; WENTA, W. 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.

MARTÍNEZ-FLORES, H.E., CONTRERAS-CHÁVEZ, R.; GARNICA-ROMO, M.G. Effect of extraction processes on bioactive compounds from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus djamor*:

Their applications in the synthesis of silver nanoparticles. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials, v. 31, n. 3, p. 1406-1418, 2021.

NAVEED, M.; NADEEM, F.; MEHMOOD, T.; BILAL, M.; ANWAR, Z.; AMJAD, F. Protease—a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. Catalysis Letters, v. 151, n. 2, p. 307-323, 2021.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. RSC Advances, v. 5, n. 35, p. 27986-28006, 2015.

NIU, L.; ZHANG, H.; WU, Z.; WANG, Y.; LIU, H.; WU, X.; WANG, W. Modified TCA/acetone precipitation of plant proteins for proteomic analysis. PloS one, v. 13, n. 12, p. e0202238, 2018.

PALANISAMY, M.; GIL-RAMÍREZ, A.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; MARÍN, F. R. REGLERO, G.; SOLER-RIVAS, C. Testing edible mushrooms to inhibit the pancreatic lipase activity by an in vitro digestion model. International Journal of Food Science & Technology, v. 47, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

PANNIPPARA, M. A.; KESAV, S.; RAGHAVAN, R. M. K. N.; MATHEW, A.; BHAT, S. G.; KOZHIYIL, E. K. Characterization and Potent Application of *Pleurotus floridanus* Trypsin Inhibitor (PFTI). Natural Product Sciences, v. 26, n. 3, p. 207-213, 2020.

PESSOA, F. B. Extração e Caracterização Química de Polissacarídeos de Basidiomicetos Comestíveis de Ocorrência na Amazônia. 2016. 95f. Tese de doutorado (Programa MultiInstitucional de Pós-Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2016.

PIRES, J. S.; TORRES, P. B.; SANTOS, D.Y.A.C.; CHOW, F. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2017. ISBN: 978-85-85658-70-0.

SALES-CAMPOS, C.; SILVA, J. F.; NASCIMENTO, L. B. B.; GOUVÊA, P. R. S.; AGUIAR, L. V. B.; CHEVREUIL, L. R.; FARIÑA, J. I.; PONTES, G. S. Nutritional and Bioactive Properties of an Amazon Wild Oyster Culinary-Medicinal Mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes): Contributions to Functional Food and Human Health. Volume 23, Edição 7, 2021, pp. 79-90, International Journal of Medicinal Mushrooms. DOI:10.1615/IntJMedMushrooms.2021038780

SHAO, Q. Methanol concentration dependent protein denaturing ability of guanidinium/methanol mixed solution. The Journal of Physical Chemistry B, v. 118, n. 23, p. 6175-6185, 2014.

SHAO, L.; GAO, H.; LIU, Z.; FENG, J.; TANG, L.; LIN, H. Identification of antioxidant proteins with deep learning from sequence information. Frontiers in Pharmacology, v. 9, p. 1036, 2018.

SLANC, P.; DOLJAK, B.; KREFT, S.; LUNDER, M.; JANEŠ, D.; ŠTRUKELJ, B. Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, v. 23, n. 6, p. 874-877, 2009.

SOHAIB, M.; ANJUM, F. M.; SAHAR, A.; ARSHAD, M. S.; RAHMAN, U. U.; IMRAN, A.; HUSSAIN, S. Antioxidant proteins and peptides to enhance the oxidative stability of meat and meat products: A comprehensive review. International Journal of Food Properties, v. 20, n. 11, p. 2581-2593, 2017.

SUBRAMANIAN, R.; ASMAWI, M. Z.; SADIKUN, A. In vitro alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. Acta Biochimica Polonica, v. 55, n. 2, p. 391-398, 2008.

TAMBOLI, E.; BHATNAGAR, A.; MISHRA, A. Alpha-amylase inhibitors from mycelium of an oyster mushroom. Preparative Biochemistry and Biotechnology, v. 48, n. 8, p. 693-699, 2018.

TAO, Q.-Q.; MA, K.; BAO, L.; WANG, L.; HAN, J.-J.; ZHANG, J.-X.; HUANG, C.-Y.; LIU, H.-W. New sesquiterpenoids from the edible mushroom *Pleurotus cystidiosus* and their inhibitory activity against α -glucosidase and PTP1B. Fitoterapia, v. 111, p. 29-35, 2016.

THAMMAPAT, P.; MEESO, N.; SIRIAMORNUN, S. Effects of NaCl and soaking temperature on the phenolic compounds, α -tocopherol, γ -oryzanol and fatty acids of glutinous rice. Food Chemistry, v. 175, p. 218-224, 2015.

TORRES-MARTÍNEZ, B. M.; VARGAS-SÁNCHEZ, R. D.; IBARRA-ARIAS, F. J.; IBARRA-TORRES, V.; TORRESCANO-URRUTIA, G. R.; SÁNCHEZ-ESCALANTE, A. Effect of extraction solvent on chemical composition, physicochemical and biological properties of edible mushrooms extracts. TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, v. 24, 2021.

VAMANU, E. Biological activities of the polysaccharides produced in submerged culture of two edible *Pleurotus ostreatus* mushrooms. Journal of Biomedicine and Biotechnology, v. 2012, p. 1-8, 2012.

WU, X.; XIONG, E.; WANG, W.; SCALI, M.; CRESTI, M. Universal sample preparation method integrating trichloroacetic acid/acetone precipitation with phenol extraction for crop proteomic analysis. Nature Protocols, v. 9, n. 2, p. 362, 2014.

ZHENG, X.; SUN, H.; WU, L.; KONG, X.; SONG, Q.; ZHU, Z. Structural characterization and inhibition on α -glucosidase of the polysaccharides from fruiting bodies and mycelia of *Pleurotus eryngii*. International Journal of Biological Macromolecules, v. 156, p. 1512-1519, 2020.

ZHOU, R.; LIU, Z. K.; ZHANG, Y. N.; WONG, J. H.; NG, T. B.; LIU, F. Research progress of bioactive proteins from the edible and medicinal mushrooms. Current Protein and Peptide Science, v. 20, n. 3, p. 196-219, 2019.

CONCLUSÕES

As 4 diferentes linhagens de *Pleurotus ostreatus* apresentaram comportamentos distintos diante dos substratos de cultivo, degradando os materiais lignocelulósicos de forma diferente, demonstrando variações possivelmente inerentes ao seu aporte genético. Além disso, houve diferenças entre os parâmetros produtivos, com as linhagens 542 e 1467, cultivadas em abacaxi e capim-elefante destacando-se quanto a produção de basidiocarpos.

Verificou-se modificações na composição nutricional dos substratos, que, de uma forma geral, apresentaram um aumento nos teores nutricionais como proteínas, fibras e/ou carboidratos e uma redução nos teores de celulose, hemicelulose e lignina, possibilitando sua utilização para outros fins após o tratamento com os fungos.

Os cogumelos produzidos apresentaram características nutricionais relacionadas as características nutricionais dos substratos, e os substratos com melhores teores de proteínas/fibras produziram cogumelos com maiores teores de proteínas/fibras, com ênfase para os substratos à base de resíduos de açaí, abacaxi e pinus.

As combinações entre os resíduos vegetais e as linhagens influenciou a presença e a concentração de lectinas e das outras proteínas (proteases, inibidores de proteases α -amilase, α -glicosidase, lipase e antioxidantes). A linhagem 1467 foi a única que apresentou AHE e somente quando cultivada nos substratos de açaí e marupá, sendo essencial não somente a linhagem utilizada, mas a sua combinação com determinados meios de cultivo.

Os métodos de extração proteica influenciaram no rendimento de proteínas e nas atividades observadas, de acordo com o solvente/solução extrator(a) utilizado. As atividades observadas variaram conforme método de extração, com os extratos aquosos apresentando maior potencial por ABTS^{•+} e DPPH[•] e maior inibição de tripsina e os extratos salinos se destacaram para quelação, poder redutor e atividade proteolítica. Complementarmente, para a AHE, o resultado só foi observado no extrato aquoso e em fosfato de 1467 cultivado em açaí e marupá, não apresentando resultados no extrato salino.

Recomenda-se, para novos estudos, especialmente com relação à atividade hemaglutinante, a utilização de eritrócitos animais e/ou o tratamento químico/enzimático dos eritrócitos humanos.

REFERÊNCIAS

ABREU, T. M.; MONTEIRO, V. S.; MARTINS, A. B. S.; TELES, F. B.; RIVANOR, R. L. C.; MOTA, E. F.; MACEDO, D. S.; VASCONCELOS, S. M. M.; JÚNIOR, J. E. R. H.; BENEVIDES, N. M. B. Involvement of the dopaminergic system in the antidepressant-like effect of the lectin isolated from the red marine alga *Solieria filiformis* in mice. International Journal of Biological Macromolecules, v. 111, p. 534-541, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.132>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

AKLAKUR, Mohammad. Natural antioxidants from sea: a potential industrial perspective in aquafeed formulation. Reviews in Aquaculture, v. 10, n. 2, p. 385-399, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/raq.12167>>. Acesso em: 09 jan. 2022.

ANJANA, S.; SAVITA, J. Oyster Mushroom: Answer To Human Ailments. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, v. 10, n. 4, p. 24-27, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i4.16867>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

ANTÃO, C. M.; MALCATA, F. X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. Plant Physiology and Biochemistry, v. 43, n. 7, p. 637-650, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.05.001>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

ARAVINDAKSHAN, A. K.; NAREDDY, P. K.; KUMAR, N. S. Affinity Purification of a New Lactose Specific Lectin from *Asterias rubens* and its Specific Interaction with Cation Independent Mannose 6-phosphate Receptor. Trends in Carbohydrate Research, v. 9 n. 2, p. 47-53, 2017.

BANERJEE, P. C.; GHOSH, A. K.; SENGUPTA, S. Hemagglutinating Activity in Extracts of Mycelia from Submerged Mushroom Cultures. Applied and Environmental Microbiology, v. 44, n. 4, p. 1009-1011, 1982. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aem.44.4.1009-1011.1982>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

BELLETTINI, M.B.; FIORDA, F.A.; MAIEVES, H.A.; TEIXEIRA, G.L.; ÁVILA, S.; HORNUNG, P.S.; MACCARI JÚNIOR, A.; RIBANI, R.H. Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. Saudi Journal of Biological Sciences, Riyadh, v.26, n.4, p.633-646, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.005>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 22, n. 101368, p. 1-10, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101368>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

BONDAR, A. T.; TOLE, S. B.; PATIL, S. M. Isolation and Purification of Lectin from Soybean (*Glycine Max*) Mahabeej Js-335. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, v. 5, n. 6, p. 89-92, 2016.

BRUSCHI, Marcos Luciano. Lectins and Nanostructured Drug Delivery Systems. Current Drug Delivery, v. 16, n. 3, p. 268-269, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/1567201816666181122105548>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

BRUNO, B. J.; MILLER, G. D.; LIM, C. S. Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. Therapeutic delivery, v. 4, n. 11, p. 1443-1467, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.4155/tde.13.104>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

BUTT, A. H.; RASOOL, N.; KHAN, Y. D. Prediction of antioxidant proteins by incorporating statistical moments based features into Chou's PseAAC. Journal of theoretical biology, v. 473, p. 1-8, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2019.04.019>>. Acesso em: 09 jan. 2022.

CARRASCO-CABRERA, C.P.; BELL, T.L; KERTESZ, M.A. Caffeine metabolism during cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with spent coffee grounds. Appl Microbiol Biotechnol, 103, 5831 - 5841, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09883-z>.

CAVADA, B. S.; PINTO-JUNIOR, V. R.; OSTERNE, V. J. S.; NASCIMENTO, K. S. ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships. International Journal of Molecular Sciences, v. 20, n. 30, p. 1-24, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms20010030>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

CHEN, C. S.; CHEN, C-Y.; RAVINATH, D. M.; BUNGAHOT, A.; CHENG, C-P.; YOU, R-I. Functional characterization of chitin-binding lectin from *Solanum integrifolium* containing anti-fungal and insecticidal activities. BMC Plant Biology, v. 18, n. 3, p. 1-11, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12870-017-1222-0>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

CHEVREUIL, L. R.; GONÇALVES, J. F. C.; BARIANI, A.; RODRIGUES, J. V. F. C.; PANDO, S. C. Detecção de inibidores de tripsina e atividade hemaglutinante em sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia. Acta Amazonica, v. 39, n. 1, p. 199 - 206, 2009.

CORIOLOANO, M. C.; MELO, C. M. L.; SILVA, F. O.; SCHIRATO, G. V.; PORTO, C. S.; SANTOS, P. J. P.; CORREIA, M. T.; PORTO, A. L.; CARNEIRO-LEAO, A. M.; COELHO, L. C. B. *Parkia pendula* seed lectin: potential use to treat cutaneous wounds in healthy and immunocompromised mice. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 172, p. 2682-2693, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12010-013-0692-2>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

CORRÊA, R. C. G.; BRUGNARI, T.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. Trends in Food Science & Technology, v. 50, p. 103-117, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.012>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

COSTA, R. B.; CAMPANA, P. T.; CHAMBERGO, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; PEREIRA, H. J. V.; OLIVA, M. L.; GOMES, F. S. Purification and characterization of a lectin with refolding ability from *Genipa americana* bark. International Journal of Biological

Macromolecules, v. 119, p. 517-523, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.178>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

DAVITASHVILI, E.; KAPANADZE, E.; KACHLISHVILI, E.; METREVELI, E.; ELISASHVILI, V. Comparative Study of the Hemagglutinating Activity of Lectins Isolated from Different Developmental Stages of Culinary-Medicinal Oyster Mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. (Agaricomycetidae). International Journal of Medicinal Mushrooms, v. 12, n. 1, p. 43–50, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v12.i1.40>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

DU, F.; WANG, H. X.; NG, T. B. An amylase from fresh fruiting bodies of the monkey head mushroom *Hericium Erinaceum*. Applied Biochemistry and Microbiology, v. 49, p. 23-27, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.7868/s0555109913010042>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

DUNAEVSKY, Y. E.; POPOVA, V. V.; SEMENOVA, T. A.; BELIAKOVA, G. A.; BELOZERSKY, M. A. Fungal inhibitors of proteolytic enzymes: Classification, properties, possible biological roles, and perspectives for practical use. Biochimie, v. 101, p. 10-20, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.12.007>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

ERCAN, P.; EL, S. N. Inhibitory effects of chickpea and Tribulus terrestris on lipase, α -amylase and α -glucosidase. Food Chemistry, v. 205, p. 163–169, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.012>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

ERGUN, S. O.; UREK, R. O. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. Annals of Agrarian Science, v. 15, n. 2, p. 273-277, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aasci.2017.04.003>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

ERJAVEC, J.; KOS, J.; RAVNIKAR, M.; DREO, T.; SABOTIC, J. Proteins of higher fungi – from forest to application. Trends in Biotechnology, v. 30, n. 5, p. 259-273, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.004>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

FERREIRA, J. A.; MAHBOUBI, A.; LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: present status and future prospects. Bioresource technology, v. 215, p. 334-345, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.018>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

FERREIRA, G. R. S.; BRITO, J. S.; PROCÓPIO, T. F.; SANTOS, N. D. L.; LIMA, B. J. R. C.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAIVA, P. M. G.; SOARES, T.; MOURA, M. C.; NAPOLEÃO, T. H. Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. Microbial Pathogenesis, v. 124, p. 152-162, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.027>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins, and implications in cancer therapeutics. Acta Histochemical, v. 113, p. 236-247, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2010.02.004>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

GOLAK-SIWULSKA, I.; KAŁUŻEWICZ, A.; SPIŻEWSKI, T.; SIWULSKI, M.; SOBIERALSKI, K. Bioactive compounds and medicinal properties of Oyster mushrooms (*Pleurotus* sp.). Folia Horticulturae, v. 30, n. 2, p. 191-201, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2478/fhort-2018-0012>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? Nature, v. 285, p. 66, 1980.

GOLDSTEIN, I. J.; PORETZ, R. D. Isolation, physico-chemical characteristics, and carbohydrate binding specificity of lectins. In: LIENER, I.E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. The Lectins. Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine. Orlando: Academic Press, 1986. p. 33-247.

GRAVEL, P. Identification of Glycoproteins on Nitrocellulose Membranes Using Lectin Blotting. In: The Protein Protocols Handbook. Hertsfordshire: Humana Press, p.755-770, 2009.

GUILLOT, J.; KONSKA, G. Lectins in Higher Fungi. Biochemical Systematics and Ecology, v. 25, n. 3, p. 203-230, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(96\)00110-X](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(96)00110-X)>. Acesso em: 10 jan. 2022.

HAMEED, S.; KANWAL; SERAJ, F.; RAFIQUE, R.; CHIGURUPATI, S.; WADOOD, A.; REHMAN, A. U.; VENUGOPAL, V.; SALAR, U.; TAHA, M.; KHAN, K. M. Synthesis of benzotriazoles derivatives and their dual potential as α -amylase and α -glucosidase inhibitors in vitro: Structure-activity relationship, molecular docking, and kinetic studies. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 183, p. 111677, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111677>>. Acesso em: 10 fev. 2022.

HASHIM, O. H.; JAYAPALAN, J. J.; LEE, C.-S. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. PeerJ, 5:e3784, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7717/peerj.3784>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

HASSAN, M. A. A.; ROUF, R.; TIRALONGO, E.; MAY, T. W.; TIRALONGO, J. Mushroom Lectins: Specificity, Structure and Bioactivity Relevant to Human Disease. International Journal of Molecular Sciences, v. 16, p. 7802-7838, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms16047802>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. Microbiology Spectrum, v. 5, n. 4, p. 1-17, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0052-2016>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

ISMAYA, W. T.; TJANDRAWINATA, R. R.; RACHMAWATI, H. Lectins from the Edible Mushroom *Agaricus bisporus* and Their Therapeutic Potentials. Molecules, v. 25, n. 10, 2368, p. 1-16, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules25102368>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

KAWAGISHI, H.; SUZUKI, H.; WATANABE, H.; NAKAMURA, H.; SEKIGUCHI, T.; MURATA, T.; USUI, T.; SUGIYAMA, K.; SUGANUMA, H.; INAKUMA, T.; ITO, K.; HASHIMOTO, Y.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; NAGATA, T. A lectin from an edible

mushroom *Pleurotus ostreatus* as a food intake-suppressing substance. Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects, v. 1474, n. 3, p. 299–308, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(00\)00027-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(00)00027-1)>. Acesso em: 10 jan. 2022.

KENNEDY, J. F., PALVA, P. M. G., CORELLA, M. T. S., CAVALCANTI, M. S. M., COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. Carbohydrate Polymers, v. 26, n. 3, p. 219-230, 1995. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)00091-7](https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)00091-7)>. Acesso em: 10 jan. 2022.

KHAN, F.; KHAN, M. I. Fungal lectins: current molecular and biochemical perspectives. International Journal of Biological Chemistry, v. 5, pp. 1-20, 2011.

KHOURY, G. E.; KHOGEER, B.; CHEN, C.; NG, K. T.; JACOB, S.; LOWE, C. R. Bespoke affinity ligands for the purification of therapeutic protein. Pharmaceutical Bioprocessing, v. 3, n. 2, p. 139–152, 2015.

KIDRIC, M.; KOS, J.; SABOTIC, J. 2014. Proteases and their endogenous inhibitors in the plant response to abiotic stress. Botanica Serbica, 38: 139-158.

KIM, K. -T.; JEON, J.; CHOI, J.; CHEONG, K.; SONG, H.; CHOI, G.; KANG, S.; LEE, Y. -H. Kingdom-wide analyses of fungal small secreted proteins (SSPs) reveals their potential role in host association. Frontiers in Plant Science, v. 7, p. 186-198, 2016.

KOBAYASHI, Y.; KAWAGISHI, H. Fungal Lectins: A Growing Family. *In*: HIRABAYASHI, J. Lectins Methods and Protocols. Tsukuba, Japan: Humana press, p. 15-38, 2014.

KOCOUREK, Jan. Historical Background. *In*: LIENER, I.E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. The Lectins. Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine. Orlando: Academic Press, p. 33-247. 1986.

KUMAR, V.; SAHAI, V.; BISARIA, V. S. Production of amylase and chlamydozoospores by *Piriformospora indica*, a root endophytic fungus. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 1, n. 2, p. 124-128, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2012.02.002>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

KUMAR, K. Nutraceutical Potential and Processing Aspects of Oyster Mushrooms (*Pleurotus* Species). Current Nutrition & Food Science, v. 15, n. 3, p. 1-12, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2174/1573401314666181015111724>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

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

KUMLA, J.; SUWANNARACH, N.; SUJARIT, K.; PENKHRUE, W.; KAKUMYAN, P.; JATUWONG, K.; VADTHANARAT, S.; LUMYONG, S. Cultivation of Mushrooms and Their Lignocellulolytic Enzyme Production Through the Utilization of Agro-Industrial Waste. Molecules, v. 25, n. 12, p. 2811, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules25122811>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 89, n. 1, p. 45–55, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2892-9>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

LEKHA, G.; MURALIDHARAN, P. Matchwood (*Ailanthus exelsa*) Saw Dust as an Alternative Substrate for Oyster Mushroom (*Pleurotus florida*) Cultivation. J Krishi Vigyan, v. 9, n. 2, p. 134-137, 2021, DOI: 10.5958/2349-4433.2021.00026.X

LI, Y. R.; LIU, Q. H.; WANG, H. X.; NG, T. B. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1780, n. 1, p. 51–57, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.09.004>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

LIU, Q.; NG, T.; WANG, H. Isolation and characterization of a novel lectin from the wild mushroom *Oudemansiella radicata* (Relhan.: Fr.) Sing. Biotechnology and Bioprocess Engineering, v. 18, p. 465-471, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12257-012-0699-5>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

LIU, S.-R.; ZHANG, W.-R.; KUANG, Y.-B. Production of stalk spawn of an edible mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in liquid culture as a suitable substitute for stick spawn in mushroom Cultivation. Scientia Horticulturae, v. 240, p. 572-577, ISSN 0304-4238, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.068>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

LORENZO, J. M.; MUNEKATA, P. E. S.; GÓMEZ, B.; BARBA, F. J.; MORA, L.; PÉREZ-SANTAESCOLÁSTICA, C.; TOLDRÁD, F. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review. Trends in food science & technology, v. 79, p. 136-147, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.003>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MADHANRAJ, R.; RAVI, K. K.; MAYA, M. R.; RAMANAIAH, I.; VENKATAKRISHNA, K.; RAMESHKUMAR, K.; VEERAMANIKANDAN, V.; EYINI, M.; BALAJI, P. Evaluation of anti-microbial and anti-haemolytic activity of edible basidiomycetes mushroom fungi. Journal of Drug Delivery and Therapeutics, v. 9, n. 1, p. 132-135, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.22270/jddt.v9i1.2277>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MAHARI, W. A. W.; PENG, W.; NAM, W. L.; YANG, H.; LEE, X. Y.; LEE, Y. K.; LIEW, R. K.; MA, N. L.; MOHAMMAD, A.; SONNE, C.; LE, Q. V.; SHOW, P. L.; CHEN, W.-H.; LAM, S. S. A review on valorization of oyster mushroom and waste generated in the mushroom cultivation industry. Journal of Hazardous Materials, v. 400, p. 123156, 2020, ISSN 0304-3894, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123156>.

MARQUES, D. N.; ALMEIDA, A. S.; SOUSA, A. R. O.; PEREIRA, R.; ALEXANDRE; ANDRADE, A. L.; CHAVES, R. P.; CARNEIRO, R. F.; VASCONCELOS, M. A.; NASCIMENTO-NETO, L. G.; PINHEIRO, U.; VIDEIRA, P. A.; TEIXEIRA, E. H.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H. Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. International Journal of Biological Macromolecules, v. 109, p. 1292-

1301, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.140>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MARTINS, O. G.; ABILIO, D. P.; SIQUEIRA, O. A. P. A.; RONCHESEL, M.; ANDRADE, M. C. N. Sobra de alimentos como alternativa para a formulação de novos substratos para o cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Basidiomycota, Fungi). Revista em Agronegócio e Meio Ambiente, v. 11, n. 2, p. 505-518, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.17765/2176-9168.2018v11n2p505-518>

MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; AINOUS, I.L. **Plant Lectins**. In Brazilian Congress on Proteins, 1st, Proceedings. Campinas, UNICAMP, p. 77-96, 1991.

MUKHERJEE, M. Human digestive and metabolic lipases - a brief review. Journal of molecular catalysis, v. 22, n. 5-6, p. 369-376, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00052-3)>. Acesso em: 27 jan. 2022.

NARANJO-ORTIZ, M. A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. Biological Reviews, v. 94, p. 2101-2137, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/brv.12550>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

NASCIMENTO, K. S.; ANDRADE, M. L. L.; SILVA, I. B.; DOMINGUES, D. L.; CHICAS, L. S.; SILVA, M. T. L.; BRINGEL, P. H. S. F.; MARQUES, G. F. O.; MARTINS, M. G. Q.; LÓSSIO, C. F.; NASCIMENTO, A. P. M.; WOLIN, I. A. V.; LEAL, R. B.; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S. Heterologous production of α -chain of *Dioclea sclerocarpa* lectin: Enhancing the biological effects of a wild-type lectin. International Journal of Biological Macromolecules, v. 156, p. 1-9, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.009>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

NG, T. B.; CHEUNG, R. C. F.; WONG, J. H.; CHAN, Y. S.; DAN, X.; PAN, W.; WANG, H.; GUAN, S.; CHAN, K.; YE, X.; LIU, F.; XIA, L.; CHAN, W. Y. Fungal proteinaceous compounds with multiple biological activities. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 100, p. 6601-6617, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7671-9>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

NIKITINA, V. E.; LOSHCHININA, E. A.; VETCHINKINA, E. P. Lectins from Mycelia of Basidiomycetes. International Journal of Molecular Sciences, v. 18, n. 7, p. 1-17, 2017. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3390%2Fijms18071334>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

OGURI, S.; ANDO, A.; NAGATA, Y. A Novel Developmental Stage-Specific Lectin of the Basidiomycete *Pleurotus cornucopiae*. Journal of bacteriology, v. 178, n. 19, p. 5692-5698, 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/jb.178.19.5692-5698.1996>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

OLIVEIRA, A. P.; NAOZUKA, J. Preliminary results on the feasibility of producing selenium-enriched pink (*Pleurotus djamor*) and white (*Pleurotus ostreatus*) oyster mushrooms: Bioaccumulation, bioaccessibility, and Se-proteins distribution. Microchemical Journal, v. 145, p. 1143-1150, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2018.12.046>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

PAPADAKI, E.; KONTOGIANNOPOULOS, N. K.; ASSIMOPOULOU, A. N.; MANTZOURIDOU, F. T. Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process. Bioresource Technology, v. 309, n. 123317, p. 1-11, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123317>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

PEREIRA JÚNIOR, Francisco N. Caracterização estrutural parcial e biológica de uma lectina de sementes de *Dioclea reflexa* Hook F. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará. 103 p., 2014.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant Lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, v. 15, p. 199-227, 1998.

PHUKON, L. C.; CHOURASIA, R.; KUMARI, M.; GODAN, T. K.; SAHOO, D.; PARAMESWARAN, B.; RAI, A. K. Production and characterisation of lipase for application in detergent industry from a novel *Pseudomonas helmanticensis* HS6. Bioresource Technology, v. 309, 123352, ISSN 0960-8524, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123352>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

POVINELI, K. L.; FINARDI FILHO, F. As múltiplas funções das lectinas vegetais. Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, v. 24, p. 135-156, 2002.

RAMOS, M. V.; BRITO, D.; FREITAS, C. D. T.; GONÇALVES, J. F. C.; PORFRIO, C. T. M. N.; LOBO, M. D. P.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; SOUZA, L. A. C.; FERNANDES, A. V. Proteomic identification and purification of seed proteins from native Amazonian species displaying antifungal activity. Planta, v. 248, p. 197–209, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00425-018-2893-y>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

RAMAKRISHNA, V.; RAJASEKHAR, S.; REDDY, L. S. Identification and Purification of Metalloprotease from Dry Grass Pea (*Lathyrus sativus* L.) Seeds. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 160, p. 63 – 71, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12010-009-8523-1>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

RAMAN, J.; JANG, K.-Y.; OH, Y.-L.; OH, M.; IM, J.-H.; LAKSHMANAN, H.; SABARATNAM, V. Cultivation and Nutritional Value of Prominent *Pleurotus* spp.: An Overview. Mycobiology, 49:1, 1-14, 2021. DOI: 10.1080/12298093.2020.1835142

RAO, P. S.; KALVA, S.; YERRAMILI, A.; MAMIDI, S. FREE radicals and tissue damage: role of antioxidants. Free radicals and antioxidants, v. 1, n. 4, p. 2-7, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.5530/ax.2011.4.2>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

RESTREPO-PÉREZ, L.; JOO, C.; DEKKER, C. Paving the way to single-molecule protein sequencing. Nature Nanotechnology, v. 13, p. 786–796, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41565-018-0236-6>>. Acesso em: 15 jan. 2022.

RIGO, D.; GAYESKI, L.; TRES, G. A.; CAMERA, F. D.; ZENI, J.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T. Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão. Brazilian Journal

of Development, v. 7, n. 1, p. 9232-9254, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-624>>. Acesso em: 15 jan. 2022.

RODRIGUES, E. F.; FICANHA, A. M. M.; DALLAGO, R. M.; TREICHEL, H.; REINEHR, C.O.; MACHADO, T. P.; NUNES, G. B.; COLLA, L. M. Production and purification of amylolytic enzymes for saccharification of microalgal biomass. Bioresource Technology, v. 225, p. 134-141, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.047>>. Acesso em: 15 jan. 2022.

ROUF, R.; TIRALONGO, E.; KRAHL, A.; MAES, K.; SPAAN, L.; WOLF, S.; MAY, T. W.; TIRALONGO, J. Comparative study of hemagglutination and lectin activity in Australian medicinal mushrooms (higher Basidiomycetes). International Journal of Medicinal Mushrooms, v. 13, p. 493-504, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1615/intjmedmushr.v13.i6.10>>. Acesso em: 15 jan. 2022.

ROYSE, D. J.; BAARS, J.; TAN, Q. Current Overview of Mushroom Production in the World. In: ZIED, D. C.; PARDO-GIMÉNEZ, A. (ed). Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications, John Wiley & Sons Ltd, 13p., 2017.

RUGIDER, H. Isolation of plant lectins. In: GABIUS HJ., GABIUS S. (ed). Lectins and Glycobiology. Springer Laboratory. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 31-46, 2003.

SALES-CAMPOS, Ceci. Aproveitamento de resíduos madeireiros e da agroindústria regional para o cultivo de fungos comestíveis de ocorrência na região amazônica. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 182 p., 2008.

SABOTIČ, J.; KOS, J. Microbial and fungal protease inhibitors - current and potential applications. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 93, p. 1351-1375, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3834-x>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

SANO, K.; OGAWA, H. Hemagglutination (Inhibition) Assay. In: HIRABAYASHI, J. Lectins Methods and Protocols. Tsukuba, Japan: Humana press, p 47-52, 2014.

SCHALLER, Andreas. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. Planta, v. 220, p. 183–197, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00425-004-1407-2>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. Science, v. 246, p. 227-234, 1989. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.2552581>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. FASEB Journal, v. 4, p. 3198-3207, 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.1096/fasebj.4.14.2227211>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

SINGH, S. S.; WANG, H.; CHAN, Y. S.; PAN, W.; DAN, X.; YIN, C. M.; AKHOUF, O.; NG, T. B. Lectins from Edible Mushrooms. Molecules, v. 20, p. 446-469, 2015. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3390%2Fmolecules20010446>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

SINGH, R. S.; WALIA, A. K. New mycelial lectins from penicilli with complex carbohydrate specificity. Biologia, v. 71, n. 4, p. 388-395, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1515/biolog-2016-0058>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

SINGH, Mohan P. Mushroom Biotechnology: The rise of the fallen. Proceedings of SPIE 11020 - Smart Biomedical and Physiological Sensor Technology XV, v. 11020, p. 1102003-1 - 1102003-5, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1117/12.2511366>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

SLIFKINI, M.; DOYLE, R. J. Lectins and Their Application to Clinical Microbiology. Clinical Microbiology Reviews, v. 3, n. 3, p. 197-218, 1990. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128%2Fcmr.3.3.197>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

SOEKA, Y. S.; ILYAS, M. Mycelial Amylase and Cellulase Characterization as well as Basidioma Physicochemical Analysis of Lingzhi Mushroom. Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia, v. 8, n. 1, p. 77-88, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.29122/jbbi.v8i1.4296>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

SOSNOWSKA, D. *et al.* Effects of Fruit Extracts on Pancreatic Lipase Activity in Lipid Emulsions. Plant Foods for Human Nutrition, v. 70, n. 3, p. 344-350, 2015. Disponível em: Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11130-015-0501-x>>. Acesso em: 10 fev. 2022.

SPATAFORA, J. W.; AIME, M. C.; GRIGORIEV, I. V.; MARTIN, F.; STAJICH, J. E.; BLACKWELL, M. The Fungal Tree of Life: From Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies. In: HEITMAN, J.; HOWLETT, B. J.; CROUS, P. W.; STUKENBROCK, E. H.; JAMES, T. Y.; GOW, N. A. R. (eds.). The Fungal Kingdom. Washington: American Society for Microbiology, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0053-2016>>. Acesso em: 15 jan. 2022.

STONE, W. L.; BASIT, H.; MOHIUDDIN, S. S. Biochemistry, Antioxidants. In: StatPearls, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541064/?report=classic>>. Acesso em: 01 jun 2019.

TESFAY, T.; GODIFEY, T.; MESFIN, R.; KALAYU, G. Evaluation of waste paper for cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with some added supplementary materials. AMB Express, v. 10, n. 15, p. 1-8, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13568-020-0945-8>>. Acesso em: 15 jan. 2022.

TÉLLEZ-TÉLLEZ, M.; DIAZ-GODINEZ, G. Omic Tools to Study Enzyme Production from Fungi in the *Pleurotus* genus. Bioresources, v. 14, n. 1, p. 2420-2457, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.15376/biores.14.1.2420-2457>>. Acesso em: 15 jan. 2022.

TRINH, B. T. D.; STAERK, D.; JÄGER, A. K. Screening for potential α -glucosidase and α -amylase inhibitory constituents from selected Vietnamese plants used to treat type 2 diabetes. Journal of Ethnopharmacology, v. 186, p. 189-195, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.060>>. Acesso em: 10 fev. 2022.

TORRES, M. E. L. M.; BRANDÃO-COSTA, R. M. P.; SANTOS, J. V. O.; CAVALCANTI, I. M. F.; SILVA, M. M., SILVA; NASCIMENTO, T. P.; NASCIMENTO, C. O.; PORTO, A. L. F. DdeL, a novel thermostable lectin from *Dypsis decaryi* seeds: Biological properties. Process Biochemistry, v. 86, p. 169-176, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.07.021>>. Acesso em: 10 fev. 2022.

VAN DAMME, E. J. M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W. J. Plant lectins. Advances in Botanical Research, v. 48, p. 109-177, 2008. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)00403-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)00403-5)>. Acesso em: 07 jan. 2022.

VARROT, A.; BASHERR, S. M.; IMBERTY, A. Fungal lectins: structure, function and potential applications. Current Opinion in Structural Biology, v. 23, p. 678-685, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.07.007>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

VELAYUTHAM, V.; SHANMUGAVEL, S.; SOMU, C.; SUNDARAM, J. Purification, characterization, and analysis of antibacterial activity of a serum lectin from the grub of rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*. Process Biochemistry, v. 53, p. 232-244, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.016>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

VETCHINKINA, E. P.; SOKOLOV, O. I.; NIKITINA, V. E. Intracellular lectins of *Lentinus edodes* at various developmental stages of the fungus. Microbiology, v. 77, n. 4, p. 441-445, 2008.

VIITALA, J.; JARNEFELT, J. The red cell surface revisited. Trends In Biochemical Sciences, v. 10, n. 10, p. 392-395, 1985. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0968-0004\(85\)90067-2](https://doi.org/10.1016/0968-0004(85)90067-2)>. Acesso em: 07 jan. 2022.

WANG, H.; NG, T. B.; OOI, V. E. C. Lectins from mushrooms. Mycological Research, v. 102, n. 8, p. 897-906, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0953756298006200>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

WANG, H.; GAO, J.; NG, T. B. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the Oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 275, p. 810-816, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3373>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

WANG, X-M; ZHOU *et al.*, 2019, J.; WU, L-H.; ZHAO, Y-L; LI, T.; LI, J-Q; WANG, Y-Z.; LIU, H-G. A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. Food Chemistry, v. 151, p. 279-285, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.062>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

WU, Guoyao. Dietary protein intake and human health. Food & Function, v. 7, p. 1251-1265, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/c5fo01530h>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

XU, X.; YAN, H.; CHEN, J.; ZHANG, X. Bioactive proteins from mushrooms. Biotechnology advances, v. 29, n. 6, p. 667-674, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.003>>. Acesso em: 09 jan. 2022.

XU, Y.; GUO, Y.; GAO, Y.; NIU, X.; WANG, L.; LI, X.; CHEN, H.; YU, Z.; YANG, Y. Separation, characterization and inhibition on α -glucosidase, α -amylase and glycation of a polysaccharide from blackcurrant fruits. LWT, v. 93, p. 16-23, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.023>>. Acesso em: 10 fev. 2022.

YOSHIDA, M. KATO, S-I.; OGURI, S.; NAGATA, Y. Purification and Properties of Lectins from a Mushroom, *Pleurotus cornucopiae*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v. 58, n. 3, p. 498-501, 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1271/bbb.58.498>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

ZHOU, R.; LIU, Z. K.; ZHANG, Y. N.; WONG, J. H.; NG, T. B.; LIU, F. Research Progress of Bioactive Proteins from the Edible and Medicinal Mushrooms. Current Protein and Peptide Science, v. 20, p. 196-219, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/1389203719666180613090710>>. Acesso em: 07 jan. 2022.