

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELLE CAROLINE PEITER

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E COMPOSTOS BIOATIVOS DOS EXTRATOS
LIOFILIZADOS DO COGUMELO GIGANTE *Macrocybe titans* (H.E Bigelow & Kimbr)
Pegler, Lodge & Nakasoneo

PALOTINA

2022

GABRIELLE CAROLINE PEITER

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E COMPOSTOS BIOATIVOS DOS EXTRATOS
LIOFILIZADOS DO COGUMELO GIGANTE *Macrocybe titans* (H.E Bigelow & Kimbr)
Pegler, Lodge & Nakasoneo

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rogério Rosado

Coorientador: Prof. Dr^a. Adriana Fiorini Rosado

PALOTINA

2022

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.
Biblioteca UFPR Palotina.

P379 Peiter, Gabrielle Caroline
Atividade antimicrobiana e compostos bioativos dos extratos
liofilizados do cogumelo gigante *Macrocybe titans* (H.E Bigelow
& Kimbr) Pegler, Lodge & Nakasone / Gabrielle Caroline Peiter.
– Palotina, PR, 2022.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rogério Rosado.

Coorientador: Prof. Dra. Adriana Fiorini Rosado.

1. *Macrocybe titans*. 2. Atividade antimicrobiana.
3. Metabólitos secundários. I. Rosado, Fábio Rogério.
II. Rosado, Adriana Fiorini. III. Universidade Federal do Paraná.
IV. Título.

CDU 579

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **GABRIELLE CAROLINE PEITER** intitulada: **Atividade antimicrobiana e compostos bioativos dos extratos liofilizados do cogumelo gigante *Macrocybe titans* (H.E Bigelow & Kimbr.) Pegler, Lodge & Nakasone**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

PALOTINA, 09 de Dezembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

13/12/2022 14:02:24.0

FÁBIO ROGÉRIO ROSADO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

14/12/2022 11:36:07.0

JOSÉ LUIS DA CONCEIÇÃO SILVA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

17/12/2022 08:44:37.0

EDIVAN RODRIGO DE PAULA RAMOS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

14/12/2022 14:06:29.0

TANIA SILA CAMPIONI MAGON

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

16/12/2022 11:56:36.0

THIAGO CINTRA MANIGLIA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho ao meu amado marido
Gustavo Henrique Wagner, sem ele nada
disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

“Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém; é reconhecer que o homem, jamais poderá lograr para si o dom de ser autossuficiente. Ninguém nem nada cresce sozinho: sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor” (AUTOR DESCONHECIDO).

A Deus pela dádiva da vida, e ao meu anjo da guarda por me guiar, sustentar e sempre encher meu coração de fé, amor e gratidão.

Aos meus pais, por tudo que abdicaram por mim.

A minha irmã, Mariane, por ser exatamente como é.

Ao meu marido, Gustavo, pelo amor, paciência e claro, por todos os chocolates com os quais me presenteou para me ajudar a concluir mais esta etapa.

À minha família, por torcerem por mim.

Aos meus amigos por entenderem a minha ausência, e me ajudarem a tornar o fardo mais leve nas horas difíceis.

A Universidade Federal do Paraná pela formação acadêmica pública de qualidade.

Ao Laboratório Multiusuário Central Analítica - LABCA e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná - TD pela infraestrutura e apoio durante o doutorado.

Ao meu orientador Fábio, por acreditar no meu potencial, antes mesmo de eu passar na prova do doutorado. Minha sincera gratidão por encontrar uma forma de me orientar, nunca me esquecerei dessa porta que me abriu. Obrigada pelas oportunidades, pela paciência, confiança e amizade.

A minha coorientadora Adriana por toda paciência, confiança e ensinamentos durante os anos em que trabalhamos juntas. Sua liderança, conhecimento e generosidade tem sido motivo de inspiração constante.

Ao Professor Thiago que sempre me tratou como igual e me acolheu como sua aluna, me ensinando, ajudando e incentivando, não tenho palavras para agradecer tudo o que fez por mim.

A Professora Kádima, amiga e parceira de projetos, que sempre me ajudou, escutou meus lamentos.

Ao Professor Ricardo Zara, melhor chefinho do mundo, que me deu toda a liberdade para conciliar meu trabalho na Central Analítica com o meu doutorado.

Aos membros da banca por todas as contribuições.

A todos os professores que contribuíram para meu crescimento profissional/acadêmico.

Aos colegas de laboratório, e em especial a Tatiane, Diego, Leticia e Taise pela ajuda e agradável convivência, vocês foram parte muito importante deste processo.

Agradeço em especial aos meus amigos e colegas do Bloco de Química da UTFPR - Campus Toledo, Iraúza Fonseca, Caroline Aguiar, Danielle Camargo e Rafael Davis, vocês moram no meu coração. As suas companhias, as suas palavras, quando choraram, riram, sentiram, participaram, aconselharam e dividiram; foram expressões de amor profundo.

“É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo do mais importante: nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível. A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser”.

(CHICO XAVIER)

RESUMO

Os fungos são conhecidos como produtores de muitos compostos químicos bioativos, sintetizados em diferentes fases de seus ciclos de vida. Os basidiomicetos são consumidos rotineiramente como alimentos nutracêuticos em muitas culturas orientais. Os compostos bioativos são produzidos tanto nos basidiomas, quanto no micélio vegetativo destes organismos. O objetivo principal desse trabalho foi investigar a ação antibacteriana de diferentes extratos obtidos a partir dos basidiomas de *Macrocybe titans*, e a caracterização química dos compostos fenólicos. Quatro metodologias de extração foram realizadas a partir da biomassa seca do isolado de *M. titans* denominado MT31: Banho de ultrassom, Ponteira ultrassônica, Extração com agitação em *Shaker* e Extração estática a frio. Os extratos liofilizados foram submetidos à testes de atividade biológica contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Os melhores resultados de inibição bacteriana obtidos pelo teste de disco-difusão foram observados contra *S. aureus* e *K. pneumoniae*, com tamanho médio de halo de inibição de 27,8 e 23,1 mm, respectivamente. As análises de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) demonstram uma marcante atividade antimicrobiana para todos os extratos testados. *S. aureus* foi a bactéria mais suscetível à ação do extrato com a CIM de 0,99 mg/mL. Através da (CBM) foi possível confirmar também a atividade bactericida mínima dos extratos em relação às cepas bacterianas testadas. Foram realizadas análises de determinação de fenólicos totais, flavonoides e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de todos os extratos. Os extratos denominados AgBu (10,6 mg/g) e ActPu (2,9 mg/g) apresentaram elevada taxa de compostos fenólicos e flavonoides respectivamente. Os resultados das análises por CLAE demonstram que o isolado MT31 produz compostos que podem estar relacionados com a inibição do crescimento e desenvolvimento das bactérias. Foram identificados e quantificados oito compostos fenólicos, sendo o mais predominante em todos os extratos o ácido clorogênico variando de 0,9302 a 0,4775 mg/g, para ActBu e AgSK, respectivamente. Adicionalmente, realizou-se ensaios de padronização de condições de amplificação do material genético, e testes de anelamento de *primers* para a avaliação preliminar da ativação da expressão de genes relacionados com a produção de Peptídeos Antimicrobianos (PAMs) pela técnica de RT-qPCR, embora ainda preliminares, demonstraram um sinal tardio de amplificação para o gene DLP2 (defensin-like protein) em micélio desafiado com *S. aureus*, quando comparado com a amostra controle.

Palavras-chave: *Macrocybe titans*. Atividade antimicrobiana. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

Fungi are known to produce many bioactive chemical compounds, synthesized at different stages of their life cycles. Basidiomycetes are routinely consumed as nutraceutical foods in many eastern cultures. Bioactive compounds are produced both in the basidiomes and in the vegetative mycelium of these organisms. Bioactive compounds are produced both in the basidiomes and in the vegetative mycelium of these organisms. The main objective of this work was to investigate the antibacterial action of different extracts obtained from the *Macrocybe titans* basidiomes, and the chemical characterization of the phenolic compounds. Four extraction methodologies were performed from the dry biomass of the *M. titans* isolate called MT31: Ultrasonic bath, Ultrasonic tip, Extraction with shaking in Shaker, and Cold static extraction. The lyophilized extracts were submitted to tests of biological activity against the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*. The best bacterial inhibition results obtained by the disk-diffusion test were observed against *S. aureus* and *K. pneumoniae*, with an average size of the inhibition halo of 27.8 and 23.1 mm, respectively. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) analyses demonstrate a marked antimicrobial activity for all tested extracts. *S. aureus* was the bacteria most susceptible to the action of the extract with a MIC of 0.99 mg/mL. Through (MBC) it was also possible to confirm the minimum bactericidal activity of the extracts to the bacterial strains tested. Analyzes were performed to determine the total phenolics, flavonoids, and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) of all extracts. The extracts called AgBu (10.6 mg/g) and ActPu (2.9 mg/g) showed a high rate of phenolic compounds and flavonoids, respectively. The results of HPLC analyses demonstrate that the MT31 isolate produces compounds that may be related to the inhibition of bacterial growth and development. Eight phenolic compounds were identified and quantified, the most prominent in all extracts being chlorogenic acid ranging from 0.9302 to 0.4775 mg/g for ActBu and AgSK, respectively. Additionally, tests were carried out to standardize conditions for amplification of the genetic material, and primer annealing tests for the preliminary evaluation of the activation of the expression of genes related to the production of Antimicrobial Peptides (AMPs) by the RT-qPCR technique, although still preliminary, demonstrated a late amplification signal for the DLP2 gene (defensin-like protein) in mycelium challenged with *S. aureus*, when compared with the control sample.

Key words: *Macrocybe titans*. Antimicrobial activity. Secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - BASIDIOMAS DE <i>Macrocybe titans</i> COLETADOS NO ESTADO DO PARANÁ.....	22
FIGURA 2 - FLUXOGRAMA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	32
FIGURA 3 - ESQUEMA DE MICRODILUIÇÕES EM PLACA DE 96 POÇOS.....	35
FIGURA 4 ELETROFEROGRAMA DE UMA PARTE DA SEQUÊNCIA ITS1-4, DE UM DOS ISOLADOS DE <i>M. titans</i>	44
FIGURA 5 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DA REGIÃO DO ESPAÇADOR INTERNO TRANSCRITO DO GENE RIBOSSOMAL 5.8S DOS ISOLADOS MT 1, 2, 5, 10 e 31 E OUTRAS SEQUÊNCIAS DEPOSITADAS NO GENBANK.....	45
FIGURA 6 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS PARA A BACTÉRIA <i>S. aureus</i> NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO	47
FIGURA 7 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS PARA A BACTÉRIA <i>L. monocytogenes</i> NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO	50
FIGURA 8- ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS PARA A BACTÉRIA <i>K. pneumoniae</i> NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO	52
FIGURA 9 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS PARA A BACTÉRIA <i>E. coli</i> NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO	54
FIGURA 10 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS PARA A BACTÉRIA <i>P. aeruginosa</i> NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO	56
FIGURA 11 - CULTIVO <i>M. titans</i> SOBRE PÉROLAS DE VIDRO	60
FIGURA 12 - CONTROLE DE <i>M. titans</i> APÓS 48 HORAS DE CRESCIMENTO E MICÉLIO DE <i>M. titans</i> APÓS 48 HORAS DE DESAFIO BACTERIANO.....	60
FIGURA 13 - ELETROFORESE DO AMPLICON DO GENE DA TUBULINA.....	61
FIGURA 14 - SINAL RT-qPCR APÓS O DESAFIO	62
FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS TOTAIS DE MT31	66
FIGURA 16 - CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS ANALISADOS POR CLAE UV-VIS	70
FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS MeFr, ActBu, ActPu, IsoBu E ActFr ANALISADOS POR CLAE UV-VIS	72

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NOS EXTRATOS	67
GRÁFICO 2 - FLAVONOIDES PRESENTES NOS EXTRATOS.....	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ALGUNS DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS ANTIBACTERIANOS ISOLADOS DE COGUMELOS.....	25
TABELA 2 - EXTRATOS OBTIDOS DE BASIDIOMAS DE <i>M. titans</i> (MT31).....	31
TABELA 3 - PRIMERS UTILIZADOS NAS REAÇÕES qPCR.....	38
TABELA 4 - RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1-4 DOS ISOLADOS DE <i>M. titans</i>	43
TABELA 5 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS	46
TABELA 6 - MEDIDAS DAS ÁREAS DE INIBIÇÃO PARA A BACTÉRIA <i>S. aureus</i> NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO	49
TABELA 7 - MEDIDAS DAS ÁREAS DE INIBIÇÃO PARA A BACTÉRIA <i>L. monocytogenes</i> NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO	51
TABELA 8 - MEDIDAS DAS ÁREAS DE INIBIÇÃO PARA A BACTÉRIA <i>K. pneumoniae</i> NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO	53
TABELA 9 - MEDIDAS DAS ÁREAS DE INIBIÇÃO PARA A BACTÉRIA <i>E. coli</i> NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO	55
TABELA 10 - MEDIDAS DAS ÁREAS DE INIBIÇÃO PARA A BACTÉRIA <i>P. aeruginosa</i> NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO	57
TABELA 11 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DOS EXTRATOS FRENTE A MICRORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO.....	58
TABELA 12 - PADRÕES DE COMPOSTOS FENÓLICOS UTILIZADOS NA ANÁLISE POR CLAE UV-VIS	71
TABELA 13 - COMPOSIÇÃO (mg/g de amostra) DOS ÁCIDOS FENÓLICOS DOS EXTRATOS ANALISADOS POR HPLC UV-VIS.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

® – Marca registrada

% – Por cento

°C – Graus Celsius

ATCC – *American Type Culture Collection*

Estufa B.O.D - Estufa para Demanda Bioquímica de Oxigênio

cDNA – DNA complementar

cm – Centímetros

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleotídeo trifosfato

ITS – Região do espaçador interno transcrito de genes ribossomais

kDa – Quilodalton

LB – Meio de cultura Luria Bertani

Min – Minutos

mL – Mililitros

mM – Milimolar

mm – Milímetros

µL – Microlitros

nm – Nanômetros

oligo(dT) – Oligo desoxitimidina trifosfato

PAMs – Peptídeos Antimicrobianos

PAMPs – Padrões Moleculares Associados aos Patógenos

pb – Pares de Bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

q.s.p – Quantidade suficiente para

RNA – Ácido Ribonucleico

RNase – Ribonuclease

RT-qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo geral	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 <i>Macrocybe titans</i> UM COGUMELO DE GRANDES DIMENSÕES	20
2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS.....	22
2.2.1 Atividade antioxidante	23
2.2.2 Atividade anticarcinogênica.....	23
2.2.3 Atividade antimicrobiana	24
2.2.4 Peptídeos antimicrobianos (PAMs)	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.....	28
3.2 PROSPECÇÃO E ESCOLHA DO ISOLADO DE <i>M. titans</i>	28
3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS	28
3.3.1 Extração do DNA genômico	28
3.3.2 Identificação molecular e Filogenia	29
3.4 PREPARO DOS EXTRATOS FÚNGICOS	30
3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS.....	32
3.5.1 Microrganismos	32
3.5.2 Padronização do inóculo bacteriano	33
3.5.3 Técnica de disco-difusão para avaliação da atividade antibacteriana dos extratos	33
3.5.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos	33
3.5.5 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	35
3.6 TESTE DA EXPRESSÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS APÓS DESAFIO BACTERIANO	35
3.6.1 Co-cultivo de MT31 e bactérias em sistema semi-líquido contendo pérolas de vidro	36
3.6.2 Extração de RNA total	36
3.6.3 Síntese do cDNA.....	38
3.6.4 Definição dos oligonucleotídeos para PAMs	38

3.6.5 Expressão dos genes através de PCR quantitativa (qPCR).....	39
3.7 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E ANÁLISE POR SDS-PAGE.....	39
3.7.1 Protocolos 1 e 2: Extração com tampão 1 (Tris-EDTA-SDS) e 2 (Redutor).....	39
3.7.2 Protocolo 3: Extração com Trizol (Invitrogen®).....	39
3.7.3 SDS-PAGE.....	40
3.8 ANÁLISE MICOQUÍMICA.....	41
3.8.1 Determinação de compostos fenólicos totais	41
3.8.2 Determinação de flavonoides	41
3.8.3 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos extratos liofilizados (CLAE) 42	
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS FÚNGICOS.....	43
4.2 RENDIMENTO DOS EXTRATOS FÚNGICOS	46
4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS.....	46
4.4 EXPRESSÃO DOS GENES DE PAMS EM SISTEMA DE CO-CULTIVO	59
4.5 AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE MT31 65	
4.6 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDEOS 66	
4.7 COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS, DETECTADOS POR CLAE	69
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	76
REFERÊNCIAS.....	77
APÊNDICE 1 – RESULTADOS DO TESTE CIM EM DUPLICATA UTILIZANDO <i>S. aureus</i> 85	
APÊNDICE 2 – RESULTADOS DO TESTE CIM EM DUPLICATA UTILIZANDO <i>L. monocytogenes</i>.....	86
APÊNDICE 3 – RESULTADOS DO TESTE CIM EM DUPLICATA UTILIZANDO <i>K. pneumonia</i>	87
APÊNDICE 4 – RESULTADOS DO TESTE CIM EM DUPLICATA UTILIZANDO <i>E. coli</i> 88	
APÊNDICE 5 – RESULTADOS DO TESTE CIM EM DUPLICATA UTILIZANDO <i>P. aeruginosa</i>	89

1 INTRODUÇÃO

O cogumelo *Macrocybe titans* é caracterizado pelas dimensões gigantescas de seus basidiomas, sendo considerado pela literatura como um dos maiores cogumelos do mundo. O Gênero *Macrocybe* têm sido objeto de discussão com relação à sua taxonomia, inicialmente classificado como *Tricholoma titans*, foi renomeado para *Macrocybe titans* após considerações morfológicas, genéticas e ecológicas demonstrarem que ele se encaixava melhor no novo gênero *Macrocybe* (KARLSEN-AYALA; SMITH, 2020).

Seu basidioma é considerado o terceiro maior entre os cogumelos lamelados, desenvolvendo em condições ideais seu píleo convexo pode chegar a medir de 8 a 100 centímetros, com tons que variam do creme ao marrom (PEGLER; LODGE; NAKASONE, 1998). O termo basidiomas se refere ao conjunto de hifas originadas do micélio vegetativo do fungo que se diferenciam e se tornam responsáveis pela produção de esporos de origem sexual.

Existem relatos deste cogumelo encontrado no Caribe e no México, na Flórida e Geórgia, nos Estados Unidos, na América Central e na América do Sul (BREWER; DELONG, 2013). Encontrado em regiões tropicais e subtropicais, reportado no Brasil pela primeira vez pelo especialista em taxonomia de macrofungos, André de Meijer, em Antonina, Paraná (WISNIEWSKI *et al.*, 2010).

A maioria dos cogumelos analisados e identificados como macrofungos comestíveis pertencem ao grupo dos basidiomicetos. Muitos apresentam aplicações medicinais para os seres humanos, devido à ampla gama de moléculas produzidas por eles, com atividade antioxidante (GENG *et al.*, 2016), antimicrobiana, antiinflamatória (SHIGESUE; KODAMA; NANBA, 2000) imunomoduladora (GAO *et al.*, 2013), antitumoral (FAN *et al.*, 2011), hepatoprotetora (ZHANG *et al.*, 2002), antidiabética (KIM *et al.*, 2010), dentre outras. Algumas espécies de cogumelos são considerados um recurso comestível há milhares de anos em muitos países. Sendo utilizados como alimentos nutracêuticos, apresentando benefícios à saúde devido à sua grande capacidade preventiva a vários distúrbios (VALVERDE; HERNÁNDEZ-PÉREZ; PAREDES-LÓPEZ, 2015). Vários efeitos benéficos destes cogumelos têm sido atribuídos aos seus polissacarídeos (MILHORINI *et al.*, 2018, MILHORINI *et al.*, 2022). Além dos diversos metabólitos secundários produzidos, como fenóis, policetídeos, esteróides e terpenos, entre eles os fenólicos. O gênero *Macrocybe*

ainda é pouco explorado, e pode constituir um candidato interessante para a busca por novos compostos bioativos.

Durante as últimas décadas, o aumento e a disseminação da resistência bacteriana à maioria dos agentes antimicrobianos clinicamente disponíveis são alarmantes. Com o passar dos anos essa problemática se acentuou e foram agravados pelo uso indiscriminado de antibióticos durante o tratamento da COVID-19. Isso representa um sério desafio para superar, as infecções geralmente são adquiridas em ambientes hospitalares durante o período de internação do paciente, durante procedimentos médicos ou período de hospitalização. Porém estamos cada vez mais vulneráveis às infecções bacterianas, incluindo as infecções mais simples.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou no ano de 2017 uma lista de patógenos prioritários de bactérias resistentes a antibióticos para priorizar a pesquisa e desenvolvimento de antimicrobianos, sendo que nesta, a *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* foram classificadas como prioridade 1 (crítica) e a *Staphylococcus aureus* como prioridade 2 (alta) (TACCONELLI *et al.*, 2017).

Esforços recentes têm sido direcionados para modificar os antibióticos existentes e assim aumentar sua potência, por exemplo, a vancomicina (OKANO, ISLEY; BOGER, 2017). Conseqüentemente, a descoberta de novas fontes de antibióticos é essencial para contornar essa problemática. Outra estratégia alternativa proveitosa pode ser a descoberta e a aplicação de novos compostos antibióticos com um modo de ação diferente dos antibióticos convencionais.

Na literatura atual encontram-se pesquisas sobre a investigação de produtos naturais como fonte de novas moléculas bioativas. Dessa forma, diversas espécies de cogumelos, apresentam uma variedade de moléculas e compostos bioativos os quais podem ser utilizados a fim de promover benefícios à saúde. Considerando um cogumelo comestível, é possível dizer que esse é um fungo promissor para extração e possível isolamento de compostos bioativos e biomoléculas, bem como auxiliar no embasamento para caracterizações e isolamentos futuros.

Além dos polissacarídeos e compostos fenólicos, uma das possibilidades que tem recebido destaque é o estudo de peptídeos antimicrobianos (PAMs), que são peptídeos endógenos, componentes essenciais da imunidade inata e de defesa de muitas plantas, animais e microrganismos (MAHLAPUU *et al.*, 2016; HANCOCK; SAHL, 2006; BROGDEN, 2005). Os PAMs, por serem amplamente produzidos por

diversos organismos, abrem portas para a pesquisa e despertam o interesse clínico, como novas opções terapêuticas para infecções causadas por bactérias e fungos multirresistentes, por representarem uma nova família de antibióticos (HAJJI *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, a pesquisa sobre cogumelos comestíveis e medicinais progrediu exponencialmente, mas ainda há um vasto campo para estudos diversos. Muitas espécies permanecem não estudadas ou subestimadas em termos de suas propriedades farmacológicas. A identificação das moléculas presentes nos extratos, os metabólitos responsáveis por seus efeitos, sua caracterização química e seu mecanismo de ação é importante e necessário, além do estudo das ações bioquímicas individuais dessas moléculas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana e composição micoquímica de diferentes extratos obtidos dos basidiomas de um isolado do cogumelo *Macrocybe titans*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Identificação e caracterização molecular das linhagens isoladas.
- Seleção de uma linhagem de *M. titans* para a obtenção dos extratos.
- Obter diferentes extratos brutos a partir do basidioma em pó do isolado MT31 de *M. titans*;
 - Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos liofilizados por Disco-difusão, Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima;
 - Padronizar o método de extração de RNA total dos micélios do isolado MT31;
 - Testar *primers* para análise da expressão gênica de PAMs, em amostras desafiadas e não desafiadas do isolado MT31;
 - Realizar desafio séptico com as bactérias *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*;

- Padronizar o método de extração de proteínas e analisar o perfil de proteínas totais do corpo de frutificação do isolado MT31;
- Caracterizar os extratos liofilizados por meio de fenólicos totais, flavonoides e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Macrocybe titans* UM COGUMELO DE GRANDES DIMENSÕES

Whittaker (1969) propôs a nova classificação dos organismos em reinos, quando os fungos foram reconhecidos adequadamente como um reino à parte. Anteriormente, os fungos eram estudados e classificados equivocadamente como vegetais, já que não se moviam e desenvolviam seus corpos de frutificação em situações de alta umidade, após as chuvas. Dentro do Reino Fungi podem ser encontrados organismos uni ou pluricelulares sendo na sua totalidade organismos aclorofilados, eucariontes e heterotróficos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; REIS, 2010; CHUDZIK, 2015) que utilizam o glicogênio como polímero de reserva energética (GUIMARÃES, 2011).

O Reino Fungi atualmente está subdividido em 8 filos distintos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Neocallimastigomycota, Glomeromycota, Microsporidia, Blastocladiomycota e Basidiomycota. O Filo Basidiomycota é dividido em 3 sub-filos: Pucciniomycotina, Ustilaginomycotina e Agaricomycotina. O sub-filo Agaricomycotina, por sua vez, possui três classes: Tremellomycetes, Dacrymycetes e Agaricomycetes (KIRK *et al.*, 2008). A classe Agaricomycetes compreende todos os fungos do filo Basidiomycota que formam basidiomas com himênio definido (HIBBETT *et al.*, 2007 apud FONSECA *et al.*, 2015).

O fungo *M. titans* (H.E. Bigelow & Kimbr.) de acordo com Pegler, Lodge e Nakasone (1998), é caracterizado pelas suas dimensões gigantescas, podendo atingir até 1,0 metro de altura e pesar até 20 Kg. Esta espécie pertence ao filo Basidiomycota; Sub-filo: Agaricomycotina; Classe: Agaricomycetes; Ordem: Agaricales; Família: Tricholomataceae; Gênero: *Macrocybe*.

Muitos fungos apresentam funções medicinais para os seres humanos, devido à ampla gama de moléculas produzidas por eles (WASSER, 2010), como atividade antioxidante (GENG *et al.*, 2016), antimicrobiana, anti-inflamatória (SHIGESUE; KODAMA; NANBA, 2000) imunomoduladora (GAO *et al.*, 2013), antitumoral (FAN *et al.*, 2011), hepatoprotetora (ZHANG *et al.*, 2002), antidiabética (KIM *et al.*, 2010), e propriedades pré-bióticas (SINGDEVSACHAN *et al.*, 2016). Também, são considerados como alimentos nutracêuticos, apresentando benefícios à saúde e devido à sua grande capacidade preventiva a vários distúrbios (VALVERDE *et al.*,

2015). Eles concentram diversos metabólitos secundários como fenóis, policetídeos, esteróides e terpenos, entre eles os fenólicos, principal grupo de componentes dietéticos associados à antioxidantes (ACHARYA; KHATUA; SAHID, 2015).

Sendo considerado um recurso comestível e medicinal há milhares de anos em muitos países, muitas espécies de cogumelos são adjuvantes aprovados para terapia e têm sido usados como remédio por diversas culturas, especialmente as orientais. A maioria dos cogumelos analisados e identificados como macrofungos comestíveis pertencem ao grupo dos basidiomicetos. Muitos desses cogumelos são cultivados comercialmente e fazem parte da dieta regular em muitos países, seja por suas características gastronômicas ou por suas propriedades medicinais.

O cogumelo *M. titans* é encontrado em regiões tropicais e subtropicais, recentemente reportado no Brasil pelo especialista em taxonomia de macrofungos, André de Meijer, em Antonina, Paraná (WISNIEWSKI *et al.*, 2010). Pode ser localizado em áreas urbanas, em gramados, áreas arenosas ou em solos perturbados pelo desenvolvimento urbano, ou áreas de cultivo agrícola, geralmente em um ano após a perturbação do solo, onde se desenvolve sozinho ou em grupos durante o outono e inverno.

Existem relatos deste cogumelo encontrado no Caribe e no México, na América Central, na América do Sul, e na Flórida e Geórgia, nos Estados Unidos (BREWER; DELONG; 2013). Sete espécies deste gênero foram relatadas no mundo, entre elas *M. crassa*, *M. gigantea*, *M. lobayensis*, *M. pachymeres*, *M. praegrans*, *M. spectabilis* e *M. titans*. Algumas espécies de basidiomicetos têm sido utilizadas como suplementos alimentares ou iguarias gastronômicas devido ao seu alto valor nutricional e sabor, além do uso terapêutico, fortalecendo o sistema imune e apresentando atividades antioxidante e antimicrobiana (VETCHINKINA *et al.*, 2018). O gênero *Macrocybe* ainda é pouco explorado comercialmente, e pode constituir em um candidato interessante para o cultivo comercial.

Esse gênero *Macrocybe* tem por característica hábito tricolomatóide de seus basidiomas com crescimento cespitosos, com a superfície de seu píleo variando do branco e creme para tons mais escuros; basidiósporos subglobosos a amplamente elipsóide e liso; basídio sem granulação siderófila; pileipellis bem desenvolvida e cútis com hifas reptantes de parede fina; desenvolvimento de gimnocárpico e hábito saprófito (não ectomicorrízico) diferenciando-o de outros gêneros como

Megatricoloma e *Tricoloma* (RAMIREZ *et al.*, 2017), como pode ser conferido na FIGURA 1.

FIGURA 1 - BASIDIOMAS DE *Macrocybe titans* COLETADOS NO ESTADO DO PARANÁ.



FONTE: A autora (2022).

Até o presente momento, podemos considerar que existem poucos dados na literatura sobre o gênero *Macrocybe*, ressaltando a importância singular deste trabalho.

2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS

Os fungos são conhecidos por produzirem diferentes tipos de componentes bioativos, desde compostos fenólicos, polissacarídeos e proteínas, que apresentam muitos benefícios à saúde (BADALYAN, 2014). Essas moléculas são eficazes contra várias doenças, como doenças hepáticas, câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (KUMAR *et al.*, 2014). Esses compostos, estão presentes em diferentes grupos de fungos, e predominam no grupo dos deuteromicetos, basidiomicetos e ascomicetos, apresentando inúmeras características biológicas,

apresentando grande potencial para serem utilizadas em diferentes aplicações biotecnológicas para a preparação de novos fármacos (ERJAVEC *et al.*, 2012). Dependendo do tipo de solvente utilizado para a extração, diferentes constituintes químicos podem ser extraídos e podem ser mais ou menos eficazes, refletindo em resultados diferentes (MATIJAŠEVIĆ *et al.*, 2016).

2.2.1 Atividade antioxidante

As moléculas de espécies altamente reativas de oxigênio podem causar danos extensos às células e tecidos, com vários distúrbios degenerativos, como doenças cardiovasculares, envelhecimento e doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, mutações e câncer (KOSANIC *et al.*, 2012). Considerando diferentes espécies de cogumelos, *Boletus edulis*, apresentou altas propriedades antioxidantes, foram identificados polifenóis, flavonoides, β -caroteno e licopeno, bem como vitamina C (JAWORSKA *et al.*, 2015). Sarikaya e Gulcin (2013) afirmaram que a serotonina é outro importante composto bioquímico que exhibe grande potencial antioxidante. Devido ao seu potencial antioxidante, a serotonina extraída dos cogumelos tem potencial para prevenir a doença de Alzheimer (QUCHI *et al.*, 2009). Khatua e Acharya (2014) utilizando extrato etanólico de *Macrocybe crassa*, identificaram os compostos ácido vanílico, ácido cinâmico e ácido p-cumárico.

2.2.2 Atividade anticarcinogênica

Patel e Goyal (2012) relataram características anticancerígenas nos gêneros *Pleurotus*, *Agaricus*, *Clitocybe*, *Ganoderma*, *Trametes*, *Antrodia*, *Xerocomus*, *Cordyceps*, *Schizophyllum*, *Calvatia*, *Flammulina*, *Inonotus*, *Russula* e *Lactarius*. Baker *et al.* (2008) relataram propriedades antitumorais, imunomoduladoras e antimetástases em *Phellinus linteus*. O extrato aquoso do polissacarídeo de *Pleurotus ostreatus* possui efeitos pró-apoptóticos e antiproliferativos nas células HT-29 do câncer de cólon (LAVI *et al.*, 2006). Além disso, um polissacarídeo extraído de *Agaricus blazei* suprimiu a angiogênese in vivo, comprovando assim o potencial anticancerígeno de polissacarídeos extraídos de cogumelos comestíveis (NIU *et al.*, 2009). Kim *et al.* (2017) relataram que o ácido vulpínico, isolado do extrato de *Pulveroboletus ravenelii*, reduz células cancerígenas humanas induzindo a apoptose

dessas células, incluindo linhagens celulares de adenocarcinoma pulmonar (A549, NCI-H1264, NCIH1299 e Calu-6), linhas celulares de adenocarcinoma (PANC-1 e MIAPaCa-2) e uma linha hepatocelular (Hep G2). Milhorini et al. (2018) caracterizaram um polissacarídeo homogêneo com peso molecular de $14,2 \times 10^3$ g/mol composto por galactose e fucose, de uma fração aquosa de *M. titans*, pelas técnicas de HPSEC-MALLS e GC-MS, além de ^{13}C RMN e estudos de degradação enzimática. As análises de RMN e metilação confirmaram a presença de uma fucogalactana com capacidade de reduzir a migração de células tumorais *in vitro* (MILHORINI *et al.*, 2022).

2.2.3 Atividade antimicrobiana

Apesar da grande diversidade de compostos antibacterianos, a resistência bacteriana a antibióticos de primeira escolha tem aumentado drasticamente. Além disso, a associação entre microrganismos multirresistentes e infecções nosocomiais destacam o problema e a necessidade urgente de soluções. Recursos naturais tem sido grandemente explorados nos últimos anos e entre eles, os cogumelos podem ser uma fonte alternativa de novos antimicrobianos (ALVES *et al.*, 2012). Portanto, a pesquisa de novas substâncias antimicrobianas eficazes contra microrganismos patogênicos resistentes às drogas atuais é crucial.

Os microfungos são conhecidos por produzirem vários compostos antibióticos, como penicilina, amoxicilina, cefalosporina e griseofulvina. No entanto, para macrofungos apenas alguns compostos isolados estão sendo utilizados atualmente em ensaios clínicos, por exemplo, um derivado de illudina S progrediu para ensaios clínicos humanos de fase II (MURGO *et al.*, 1999). Os compostos antimicrobianos isolados de cogumelos podem consistir de moléculas de baixo peso molecular, como metabólitos secundários (sesquiterpenos e outros terpenos, esteróides, antraquinonas, derivados do ácido benzóico e quinolinas), e metabólitos primários como o ácido oxálico.

A maioria dos estudos sobre compostos com atividade antibacteriana de extratos de cogumelos não identifica os componentes responsáveis por essa atividade. No entanto, alguns estudos foram feitos comprovando a ação antibacteriana de compostos extraídos de cogumelos, TABELA 1.

TABELA 1 - ALGUNS DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS ANTIBACTERIANOS ISOLADOS DE COGUMELOS.

Cogumelo	Composto	Bactérias
<i>Lentinus edodes</i>	Oxalic acid (ácido orgânico)	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Pseudolectania nigrella</i>	Plectasin (peptídeo)	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Corynebacterium jeikeium</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , MRSA, <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Albatrellus fletti</i>	Confluentin, Grifolin e Neogrifolin (terpenos lmw)	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> ,
<i>Ganoderma pfeifferi</i>	Ganomycin A e B (lmw)	<i>Micrococcus flavus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Proteus mirabilis</i>
<i>Boletus spp.</i>	Peptaibol (peptídeo)	<i>Corynebacterium lilium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> ,
<i>Cordyceps cinesis</i>	Proteína (CSAP)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Xanthomonas oryzae</i>
<i>Flammulina velutipes</i>	Enokipodins (sesquiterpeno lmw)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Xylaria intracolorata</i>	Cloratin A (derivado de ácido benzóico)	<i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> .

FONTE: Adaptado de Alves et al. (2012).

LEGENDA: lwm (composto de baixa massa molecular - low molecular mass).

2.2.4 Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Os PAMs são moléculas pequenas, apresentando menos de 200 resíduos de aminoácidos e devido a esta característica são sintetizados com baixo consumo energético e de biomassa (ZUCCA *et al.*, 2011; TASSANAKAJON *et al.*, 2013; CAETANO; QUEIROZ, 2014). Os PAMs são capazes de eliminar bactérias e outros patógenos de modo seletivo, rompendo a integridade da membrana da célula-alvo intercalando-se na membrana dessas células. O modo que os PAMs atuam é determinado principalmente pela sua conformação estrutural, carga e anfipaticidade (ROSA; BARRACCO, 2010; FAN *et al.*, 2020).

A expressão de genes relacionados com a síntese destes PAMs pode ser induzida de forma sistêmica no hospedeiro. Estes peptídeos geralmente localizam-se em células ou tecidos específicos e são mais suscetíveis a uma infecção por um

conjunto específico de patógenos. A compartimentalização entre produção/distribuição dos PAMs demonstra ser uma alternativa importante de acordo com o tipo e a especificidade do patógeno invasor, pois isto implica não somente em uma regulação específica em âmbito celular, mas também em uma distribuição polarizada no hospedeiro (TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Os PAMs surgem como uma classe de antibióticos produzidos de forma natural pelos organismos, tornando-os uma alternativa promissora para novos medicamentos contra patógenos diversos, pois possuem mecanismos de ação antimicrobiana diferenciada, devido à sua potência e capacidade mais segura de neutralizar ou eliminar patógenos quando comparado aos antibióticos tradicionais existentes, desta forma, podem ser utilizados no combate de infecções causadas por microrganismos resistentes (ZUCCA *et al.*, 2011; RAVICHANDRAN *et al.*, 2016).

O primeiro fungo filamentosos descrito como um potente produtor de peptídeo antimicrobiano, chamado AFP, foi o *Aspergillus giganteus* (LACADENA, 1995; MARTINÉZ-RUIZ, 1997), outro peptídeo antifúngico, denominado PAF, foi isolado de *Penicillium chrysogenum* (MARX, 1995) e, posteriormente, mais um peptídeo antifúngico, denominado AnAFP, foi identificado a partir de *Aspergillus niger* (GUN LEE *et al.*, 1999). Além disso, o peptídeo NAF foi isolado de *P. nalviogense* e considerado idêntico ao PAF (GEISEN, 2000). O peptídeo antifúngico AcAFP foi isolado da cepa de *A. clavatus* VR1 (SKOURI-GARGOURI, 2008) e um peptídeo de *A. clavatus* ES1 também foi isolado (HAJJI, 2010).

A primeira defensina originada de *Pseudoplectania nigrella*, fungo saprófita ascomiceto foi a plectasina. Plectasina é uma defensina que tem atividade antimicrobiana principalmente contra bactérias Gram-positivas (MYGIND, 2005; SCHNEIDER, 2010). Posteriormente, descobriu-se, sucessivamente, que a Eurocina de *A. oryzae* e o Copsin de *Coprinopsis cinerea* inibiam, efetivamente, o crescimento de uma variedade de bactérias Gram-positivas (OEEMIG, 2012; ESSIG, 2014). Vale ressaltar que a micasina, primeira defensina dermatofítica, apresenta boa eficácia antibacteriana, além de baixa taxa de indução de hemólise e alta estabilidade sérica (ZHU, 2012). A defensina chamada Triintsin foi isolada do fungo dermatófito *Trichophyton interdigitale*, que foi isolado de um paciente com onicomicose, e aumentou os membros da família das defensinas fúngicas (SHEN, 2018).

Esses são alguns dos fungos isolados produtores de moléculas biologicamente ativas caracterizadas como PAMs. A busca por novos PAMs com

estruturas e ações biológicas distintas vem crescendo rapidamente devido à ocorrência de patógenos resistentes e em resposta à procura de novas drogas para o tratamento de doenças.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos (LaBiM) e Laboratório Multiusuário Central Analítica (LABCA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Toledo e no Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina.

3.2 PROSPECÇÃO E ESCOLHA DO ISOLADO DE *M. titans*

Cinco isolados com características fenotípicas do gênero *Macrocybe*, coletados de diferentes regiões do estado do Paraná foram selecionados e identificados como MT1, MT2, MT5, MT10 e MT31. Os isolados MT1, MT2, MT5 e MT10 foram coletados pelo especialista Ednilson Clayton Rogério, em Paraíso do Norte-PR e MT31 foi coletado pela autora, em Toledo-PR. Todos os isolados foram gentilmente cedidos para a coleção de culturas de fungos basidiomicetos do NEMA, UFPR - Setor Palotina.

A disponibilidade de grande volume de biomassa seca (basidiomas em pó) foi o fator decisivo para a escolha do isolado MT31, que foi utilizado para a realização dos ensaios.

3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

3.3.1 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico de cada isolado foi realizada utilizando-se o kit comercial *Plant/fungi DNA Isolation Kit* (Norgen Biotek), seguindo as recomendações do fabricante. A integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TBE 1x (Tris-base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM pH 8,0), corado com SYBR® Safe (Invitrogen), utilizando padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotecnologia) e visualizado utilizando o equipamento

Transiluminador LT-Blue (Loccus). A concentração de DNA foi mensurada por fluorimetria utilizando equipamento Qubit (Thermo Scientific).

3.3.2 Identificação molecular e Filogenia

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA (MIRHENDI *et al.*, 2006), seguiu o protocolo do kit comercial *GoTaq Master Mix Kit* (Promega), com modificações e foi realizada em um volume total de 25 μ l contendo 25 ng do DNA genômico, 0,4 μ M do *primer forward* ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e do *primer reverse* ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), 0,2 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂ e 1 U de *GoTaq* DNA Polimerase no tampão apropriado da enzima. A amplificação foi realizada em termociclador (Thermo Scientific) utilizando a seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos; 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto; extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v) nas mesmas condições descritas no 3.3.1. Os produtos de amplificação foram purificados (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) e quantificados por fluorimetria utilizando equipamento Qubit (Thermo Scientific). As amostras foram secas em estufa a 50 °C e enviadas para sequenciamento na empresa ACTGene Biotecnologia pelo método Sanger utilizando o sequenciador automático ABI-Prism 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

Os eletroferogramas resultantes foram analisados no software *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL *et al.*, 1999) e os resultados comparados com as sequências depositadas no banco de dados GenBank, NCBI (National Center for Biotechnology), utilizando a ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool). O critério adotado para confirmação da espécie foi baseado no valor de cobertura e identidade dos alinhamentos.

Para a análise filogenética foram utilizadas as seguintes sequências do rDNA ITS1-5.8S-ITS2 depositadas no GenBank: MH211846.1, MN017544.1, LR992036.1, MN017547.1, MZ519068.1, MN017545.1, MN017546.1, MN017548.1, MF401956 de *M. titans*; LC006057.1, LC029417.1, LC029415.1, MN017541.1, de *M. crassa*; MH053153.1, MK024240.1, ON794326.1, OM716804.1, OM716805.1, OM716809.1,

OM716807.1 de *M. gigantea*; JX041888.1, JX068526.1, JX068527.1 de *Tricholoma giganteum*; MN017539.1 de *Lyophyllum prasinense*; ON310891.1, ON310887.1, MT636315.1, MZ919967.1, MZ914424.1 de *Calocybe indica*; OW987221.1, LC068798.1, AB097563.1, LC105653.1, de *Coprinopsis cinerea* e mais as amostras sequenciadas desse trabalho, MT1, 2, 5, 10 e 31. As sequências utilizadas na análise filogenética tinham 432 pb. A filogenia foi inferida usando o método Neighbor-Joining (SAITOU e NEI, 1987). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método da Máxima Verossimilhança Composto (TAMURA *et al.*, 2004). Esta análise envolveu 39 sequências de nucleotídeos. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA 11 (KUMAR *et al.*, 2018).

3.4 PREPARO DOS EXTRATOS FÚNGICOS

A linhagem denominada MT31 foi utilizada para as extrações e testes posteriores devido à disponibilidade de biomassa fúngica disponível para os experimentos. Essa linhagem recebeu um pré-tratamento, onde os basidiomas coletados e limpos foram cortados em fatias de aproximadamente 2 cm de espessura e armazenados em ultrafreezer (ColdLab) a -60 °C por 12 horas, e depois liofilizadas em liofilizador (Liotop Liobras) por 6 dias (-50 °C, 150 mmHg). Após a liofilização as amostras foram submetidas à trituração em moinho de facas (Solab) e peneiradas com malhas de 600 µm, 425 µm e 300 µm, sendo utilizadas para análises o material que passou pela malha de 300 µm. As amostras foram então armazenadas a -80 °C até o momento da preparação dos extratos.

Foram utilizadas quatro metodologias extrativas, sendo elas: Banho de ultrassom, Ponteira ultrassônica, Extração com agitação em Incubadora de Agitação Orbital (*Shaker*) e Extração estática a Frio, além de cinco solventes extratores (água destilada, isopropanol 25%, acetona 25%, etanol 25% e metanol 25%) uma vez que diferentes constituintes químicos são extraídos com diferentes tipos de solventes. Cada extração foi realizada adicionando 20 mL de cada solvente à 1 g da amostra pré-tratada, de acordo com as condições que podem ser conferidas na TABELA 2.

TABELA 2 - EXTRATOS OBTIDOS DE BASIDIOMAS DE *M. titans* (MT31)

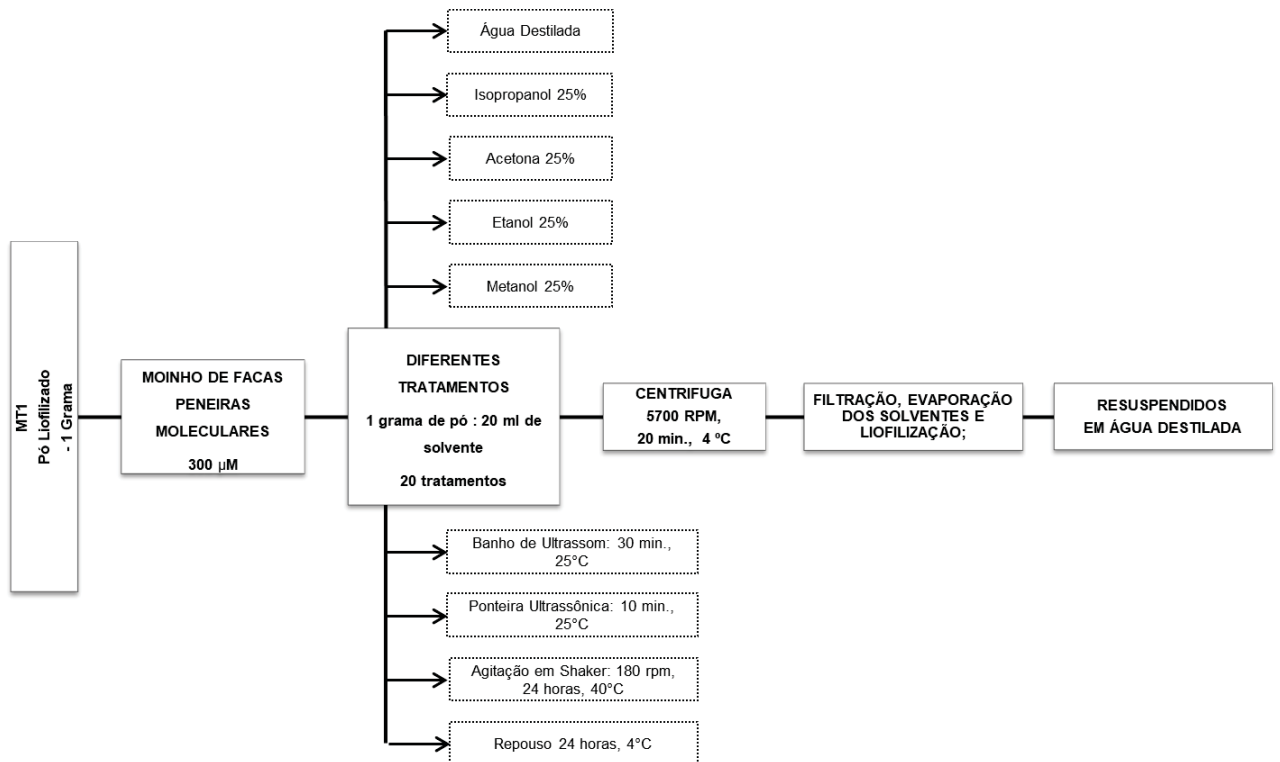
Sigla do extrato	Solvente extrator	Método de extração	Condições
AgBu	Água destilada	Banho de ultrassom	30 min., 25 °C (42Khz, 360 Watts e 50/60hz)
IsoBu	Isopropanol 25%		
ActBu	Acetona 25%		
EtBu	Etanol 25%		
MeBu	Metanol 25%		
AgPu	Água destilada	Ponteira ultrassônica	10 min., 25 °C (20Khz, 170 Watts e 50/60hz)
IsoPu	Isopropanol 25%		
ActPu	Acetona 25%		
EtPu	Etanol 25%		
MePu	Metanol 25%		
AgSk	Água destilada	Extração com agitação em <i>Shaker</i>	Agitação 180 rpm, 24 horas, 40 °C
IsoSk	Isopropanol 25%		
ActSk	Acetona 25%		
EtSk	Etanol 25%		
MeSk	Metanol 25%		
AgFr	Água destilada	Extração estática a frio	Repouso 24 horas, 4 °C
IsoFr	Isopropanol 25%		
ActFr	Acetona 25%		
EtFr	Etanol 25%		
MeFr	Metanol 25%		

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Solvente extrator - Ag: água destilada, Iso: isopropanol 25%, Act: acetona 25%, Et: etanol 25% e Me: metanol 25%. Método de extração - Bu: banho de ultrassom, Pu: ponteira ultrassônica, Sk: extração com agitação em *Shaker*, Fr: extração estática a frio.

Após as extrações as amostras foram centrifugadas a 5700 rpm, durante 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi passado por filtro de voal e posteriormente em filtro qualitativo 40 µm. Os extratos que continham solventes orgânicos foram evaporados e congelados em ultrafreezer a -60 °C por 12 horas, juntamente com os extratos aquosos e depois liofilizadas em liofilizador por 3 dias (-50 °C, 150 mmHg). Ao finalizar o processo de liofilização, os extratos secos foram ressuspensos em água destilada autoclavada na proporção de 200 mg/mL, e armazenados em freezer -20 °C, até a utilização, o fluxograma do processo pode ser observado na FIGURA 2.

FIGURA 2 - FLUXOGRAMA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS



FONTE: A autora (2022).

Para a determinação do rendimento das extrações foi realizado o cálculo, de acordo com a Equação 1:

$$\text{rendimento \%} = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100$$

Onde:

m_{extrato} = massa (g) do extrato seco após liofilização;

m_{amostra} = massa total (g) da amostra utilizada.

3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS

3.5.1 Microrganismos

Foram escolhidas duas bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* 6538 e *Listeria monocytogenes* 19111 e três Gram-negativas *Escherichia coli* 25922,

Pseudomonas aeruginosa 15442 e *Klebsiella pneumoniae* 700603, todas cepas ATCC (American Type Collection Culture).

3.5.2 Padronização do inóculo bacteriano

As bactérias foram mantidas em placas de Petri contendo meio ágar Müller-Hinton (MH) (KASVI®), e incubadas em estufa B.O.D (TECNAL) a 35 °C por 24 horas. Para a padronização do inóculo, cinco colônias isoladas de cada bactéria foram selecionadas e transferidas por alçada para 10 mL de caldo MH e cultivadas sob agitação de 120 rpm, em Shaker por 12 horas a 35 °C. A preparação inicial dos inóculos foi ajustada em conformidade com a solução padrão a 0,5 da escala de *McFarland*. A concentração foi confirmada com leitura em espectrofotômetro (FENTO) em comprimento de onda de 625 nm e absorvância entre 0,08 a 0,10, que corresponde a $1,0 \times 10^8$ UFC/mL.

3.5.3 Técnica de disco-difusão para avaliação da atividade antibacteriana dos extratos

O método de disco-difusão foi realizado com base no protocolo do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) seguindo as recomendações do documento M02-A12 (2015), com algumas modificações para produtos naturais. O ajuste da densidade do inóculo bacteriano foi realizado através da diluição do mesmo em caldo MH conforme item 3.6.2 de acordo com a escala *McFarland* a 0,5. Uma vez ajustada a absorvância 100 µl do inóculo foram espalhados com auxílio de um *swab* em placas de Petri contendo meio ágar MH. Em seguida, discos de celulose de 6 mm, impregnados com 20 µl dos extratos na concentração de 200 mg/mL foram fixados sobre o meio. Como controle positivo, foram utilizados discos antimicrobianos de Ampicilina 10 µg e Cefotaxina 30 µg (SENSIDISC DME®), além do controle negativo com água destilada. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas e a dimensão dos halos formados foi aferida em milímetros com auxílio de um paquímetro.

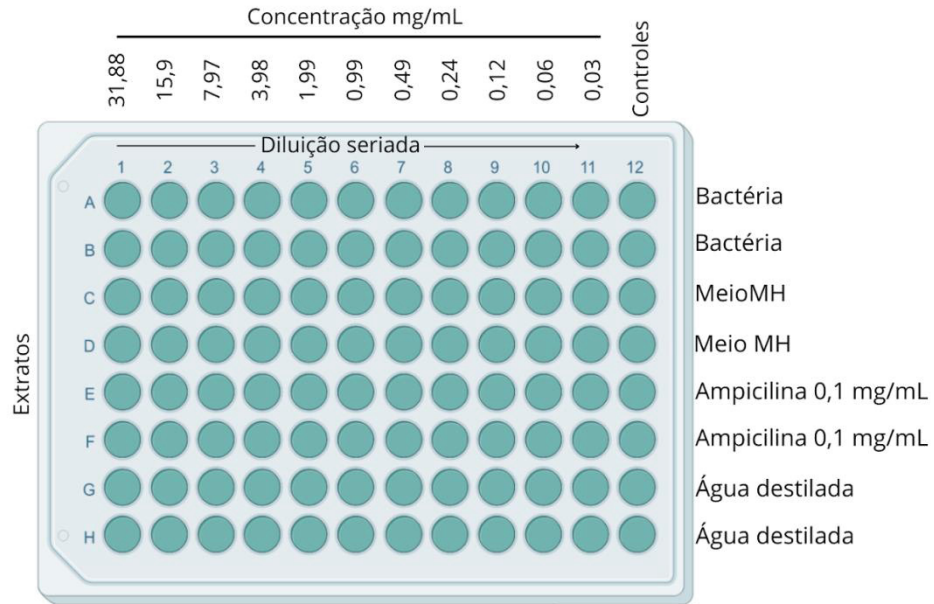
3.5.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos

A CIM foi determinada através da técnica de diluição em microplacas (96 poços) de acordo com as normas do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI), conforme metodologia descrita no documento M7-A6 (2003) - Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico. O ajuste da densidade do inóculo bacteriano foi realizado através da diluição do mesmo em caldo MH conforme item 3.6.2 de acordo com a escala *McFarland* a 0,5. Uma vez ajustada a absorbância, o inóculo foi diluído novamente em caldo MH até a concentração de 4×10^5 UFC/poço.

Para o teste de microdiluição em placas de 96 poços, inicialmente foi adicionado 100 µL de caldo MH em todos os poços, em seguida adicionou-se 100 µL dos extratos na concentração de 63,7 mg/mL nos oito primeiros poços da coluna um. Após a homogeneização, transferiu-se 100 µL de cada poço da coluna um para a coluna dois e assim sucessivamente em uma diluição seriada, descartando 100 µL do poço da coluna onze. Por fim, com as soluções diluídas, adicionou-se uma alíquota de 20 µL da suspensão do inóculo preparado em cada um dos 96 poços.

A coluna doze da microplaca foi reservada para os controles. Como controles negativos tivemos um teste contendo caldo MH mais água destilada, um com caldo MH mais os microrganismos testados, um apenas com o caldo MH a fim de certificar a esterilidade do mesmo. Como controle positivo foi utilizado a ampicilina na concentração de 1 mg/mL. O teste foi realizado em duplicata para todos os extratos, controles e bactérias analisadas, a FIGURA 3 mostra o esquema das microdiluições. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Decorrido o tempo de crescimento, a leitura das placas foi realizada adicionando 10 µL do revelador cloridrato de trifetil tetrazólio (CTT) a 0,5%, em todos os poços, e a microplaca foi incubada a 35 °C por 3 horas. Após o período de incubação, os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana permaneceram incolores, enquanto os poços que coraram de rosa indicam a presença de bactérias. Assim, a concentração inibitória mínima foi definida no último poço que não houve crescimento bacteriano.

FIGURA 3 - ESQUEMA DE MICRODILUIÇÕES EM PLACA DE 96 POÇOS



FONTE: A autora (2022).

3.5.5 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para determinar a CBM, após o período de incubação nos testes de microdiluição, antecipadamente à aplicação do agente revelador, uma alíquota de 2 μ L de cada poço foi retirada e inoculada em placas contendo meio ágar MH. As placas foram incubadas em B.O.D a 37 °C por 24 horas. Após este período, foi observado se houve crescimento bacteriano na placa, para então determinar qual foi a menor concentração dos extratos capaz de causar a morte dos microrganismos.

3.6 TESTE DA EXPRESSÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS APÓS DESAFIO BACTERIANO

Na tentativa de verificar se genes para peptídeos antimicrobianos pudessem ser expressos *in vivo*, realizou-se o desafio de micélios de *M. titans* com algumas espécies de bactérias, extração de RNA total e produção de cDNA, para serem testados *primers* utilizados em *Coprinopsis cinerea*, devido a indisponibilidade de genoma de *M. titans* para consulta.

3.6.1 Co-cultivo de MT31 e bactérias em sistema semi-líquido contendo pérolas de vidro

O MT31 foi cultivado em placas de Petri contendo meio ágar 1,5% (m/v) YMG - *Yeast Glucose Manitol*, 0,4% (m/v) extrato de levedura, 1% (m/v) extrato de malte, 0,4% (m/v) glicose), por 7 dias a 28 °C.

Em seguida, três fragmentos de meio YMG colonizados pelo micélio de MT31 foram transferidos para uma placa com pérolas de vidro a uma distância de 1 cm entre eles, e incubados por 2 dias a 28 °C. A preparação das placas com pérolas de vidro foi adaptada do protocolo de Essig et al. (2014). Resumidamente, 40 g de pérolas de vidro de borosilicato estéreis (5 mm de diâmetro) foram vertidas em uma placa de Petri e 15 mL de meio mínimo foram adicionados (composição por litro de meio: 5 g de glicose, 2 g de asparagina, 50 mg de sulfato de adenina, 1 g de KH₂PO₄, 2,3 g de Na₂HPO₄ (anidro), 0,3g de Na₂SO₄, 0,5 g de C₄H₁₂N₂O₆, 40 µg de tiamina -HCl, 0,25 g de MgSO₄.7H₂O e 5 mg de *p*-ácido aminobenzóico).

Após 60 horas, 4mL de meio mínimo das placas foi substituído por 4 mL de uma suspensão bacteriana, *Bacillus subtilis* ou *Staphylococcus aureus* (cultivadas anteriormente também em meio mínimo até atingir densidade óptica de 0,2, lido em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 600 nm). Ambos os organismos, MT31 e bactéria, foram cultivados em competição por 48 horas a 37 °C.

Para o controle do crescimento fúngico, o meio foi substituído pela mesma quantidade de meio mínimo (4 mL). Como controle para o crescimento bacteriano, as cepas bacterianas foram cultivadas no sistema de pérolas independentemente por 48 horas. Posteriormente ao desafio, o micélio foi coletado e congelado em nitrogênio líquido, para extração do RNA total.

3.6.2 Extração de RNA total

Foram testados, dois protocolos de extração de RNA total de micélio de MT31 descritos abaixo:

Protocolo 1: Kit SV Total RNA Isolation System (Promega®): O procedimento foi realizado com aproximadamente 50 mg de micélio do experimento com o desafio bacteriano, seguindo as instruções do fabricante para a extração de RNA de tecidos. Em resumo, foram adicionados aos micélios em um microtubo 100 µL de solução salina e o material foi incubado por 30 minutos a 30 °C. Foram adicionados 75 µL do

tampão de lise e após agitação foram adicionados 350 μ L de tampão de diluição de RNA, com centrifugação posterior por 10 minutos a 14000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionado 350 μ L de etanol 95% ultrapuro (RNAse free, Sigma-Aldrich). A solução foi transferida para uma microcoluna de filtração e centrifugada a 14000 g por 1 minuto. Após o descarte do filtrado, foram adicionados na microcoluna 600 μ L da solução de lavagem de RNA, e novamente centrifugada a 14000 g por 1 minuto. O filtrado foi novamente descartado e então foi adicionada na microcoluna 50 μ L de uma solução de DNase e mantido por 15 minutos à 25 °C. A reação foi interrompida com a adição de 200 μ L da solução de parada de DNase. Após nova centrifugação a 14000 g por 1 minuto, a coluna foi lavada com 600 μ L da solução de lavagem de RNA por centrifugação a 14000 g por mais 1 minuto e uma segunda lavagem foi realizada com 250 μ L da solução de lavagem de RNA por 2 minutos a 14000 g. O RNA extraído foi eluído adicionando 100 μ L de água ultrapura (livre de nucleases) a microcoluna e coletado em um novo microtubo por centrifugação a 14000 g por 1 minuto. O RNA foi quantificado em Qubit (Thermo Scientific).

Protocolo 2: Extração com Trizol (Invitrogen®): Os micélios foram coletados, após os experimentos com o desafio bacteriano, e armazenados em freezer a -20°C com a solução RNAlater™ Stabilization Solution (Thermo Fisher) até o momento da extração. A solução contendo os micélios foram transferidas para um gral de porcelana e os micélios macerados com pistilo, na presença de nitrogênio líquido até total evaporação. Foram adicionados a um microtubo 2 mL de Trizol, passado em vórtex por 2 minutos, e incubado a 25 °C por 5 minutos. Após foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio e os tubos foram agitados vigorosamente por agitação manual, por 15 segundos e incubados de 15 a 30 °C por 3 minutos. Após centrifugação a 1200 g por 15 minutos, a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo microtubo. Posteriormente o RNA total foi precipitado adicionando 1 mL de álcool isopropílico com incubação em temperatura ambiente por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12000 g por 10 minutos, para coletar o pellet de RNA. O pellet foi lavado com 2 mL de etanol 75%, (v/v) misturado em vórtex e centrifugado a 7500 g por 5 minutos. Após o descarte do etanol, o RNA foi seco à temperatura ambiente, ressuspenso por pipetagem com 100 μ L de água livre de RNase e mantido por 10 minutos a 60 °C, para dissolução total do RNA.

3.6.3 Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit *GoScript™ Reverse Transcriptase* (Promega®), seguindo as instruções do fabricante. A reação foi feita em microtubos, contendo 4 µL de RNA e 0,5 µg de iniciadores randômicos, e incubada por 5 minutos a 70 °C em termociclador (Thermo Scientific), e resfriada por 5 minutos em banho de gelo. Foram adicionados nessa reação 15 µL do mix contendo (4 µL do tampão 5x, 1,5 mM MgCl₂, 2 mM do mix de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), 20 unidades de Inibidor de RNase, 1 µL da enzima *GoScript™ Reverse Transcriptase* e água livre de nucleases q.s. p 20 µL. A reação foi incubada por 5 minutos a 25 °C e 1 hora a 42 °C em termociclador. Após o final da reação a transcriptase reversa foi inativada incubando os microtubos a 70 °C por 15 minutos.

3.6.4 Definição dos oligonucleotídeos para PAMs

Para as análises de expressão gênica foram escolhidos 2 genes (LYS1 e DLP2) que expressam os PAMs lisozima e proteína relacionada à defensina, respectivamente, pelo cogumelo *C. cinerea* (KOMBRINK *et al.*, 2019), pois até o momento, o genoma de *M. titans* e nem sequências de mRNA para peptídeos antimicrobianos nesta espécie estão disponíveis para consulta. O gene da beta-tubulina foi utilizado como gene constitutivo (*housekeeping*) e as sequências dos *primers forward* e *reverse* (Tub) foram desenhadas a partir do mRNA referente à sequência codificante do gene da beta-tubulina de *M. gigantea* (GenBank: KY427746.1). O potencial de auto complementaridade e formação de dímeros foram verificados pelo programa FastPCR (<http://primerdigital.com/fastpccr.html>). A seguir, estão apresentados os genes e as sequências dos *primers* utilizados para a análise TABELA 3.

TABELA 3 – PRIMERS UTILIZADOS NAS REAÇÕES qPCR

Nome	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')
qRT-Tub	TCTCCGACACTGTCGTTGAGCCCTAC	CTAGGTGGTTAAGGTCACCATAAG
qRT- LYS1	CTGGGAACACCGCTACAGGACTATG	GACGTCTTTGTAGGGCGAAGCG
qRT-DLP2	CTGCATCACCCTTCTGACTGCTCA	GCAGAGGCCAGTCAAGACATAGCTT

FONTE: A autora (2022).

3.6.5 Expressão dos genes através de PCR quantitativa (qPCR)

Um total de 4 μL do cDNA (quantidade em massa) foram misturado com 10 μL de *GoTaq® qPCR Master Mix*, 1 μM de cada um dos iniciadores (*primers*) *forward* e *reverse* para cada gene, da TABELA 3 e água livre de nucleases q.s.p. 20 μL . A reação foi realizada em termociclador CFX96™ (Bio-Rad). As condições de ciclagem foram: 94 °C por 2 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 54 °C por 30 segundos e extensão de 60°C por 60 segundos.

3.7 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E ANÁLISE POR SDS-PAGE

Para verificar o melhor protocolo para extração de proteínas a partir de basidiomas secos do isolado MT31, aproximadamente 50 mg do pó foi submetido à extração utilizando três protocolos, o tampão 1 Tris-EDTA-SDS (2% SDS, 10 mM de EDTA pH 0,8 e 0,1 M de Tris-HCL pH 8,0), o tampão 2 redutor (1% de SDS, 9 M de ureia, 25 mM de Tris-HC1 pH 6,8, 1 mM de EDTA, 0,7 M de beta-mercaptoetanol) e extração com Trizol (Invitrogen®).

3.7.1 Protocolos 1 e 2: Extração com tampão 1 (Tris-EDTA-SDS) e 2 (Redutor)

Foi adicionado 1 mL do tampão de extração 1 ou 2 e as amostras foram sonicadas em sonicador de sonda ECO-SONICS (desruptor de células QR-500) por 1 minuto, com amplitude de 72 com banho de gelo. Os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado para a utilização no gel de poliacrilamida 1-D (SDS-PAGE). As proteínas foram quantificadas em Qubit (Thermo Scientific).

3.7.2 Protocolo 3: Extração com Trizol (Invitrogen®)

Em um microtubo contendo a amostra, foi adicionado 1 mL de Trizol e micro pérolas para a lise das amostras, passado em vórtex por 2 minutos, e incubado a 25 °C por 5 minutos. Após foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio e os tubos foram agitados vigorosamente por agitação manual, por 15 segundos e incubados de 15 a

30 °C por 3 minutos. Após centrifugação a 1200 g por 15 minutos, a fase aquosa foi descartada. Posteriormente foi adicionado 0,3 mL de etanol 100% com incubação em temperatura ambiente por 3 minutos. Os tubos foram centrifugados a 2000 g por 5 minutos, e o sobrenadante foi separada em um novo microtubo. Para precipitar as proteínas 1,5 mL de isopropanol foi adicionado ao sobrenadante, incubado por 10 minutos a 25 °C e centrifugado a 12000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com 2 mL de ureia 0,6 M em etanol 95%, (v/v) misturado por inversão, incubado por 20 minutos e centrifugado a 7500 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e as proteínas foram secas à temperatura ambiente, ressuspensas por pipetagem com 200 µL de SDS 1% e mantido por 10 minutos a 50 °C, para dissolução total. A amostra foi armazenada para a utilização no gel da eletroforese e as proteínas foram quantificadas em Qubit (Thermo Scientific).

3.7.3 SDS-PAGE

Os perfis proteicos da amostra foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em sistema vertical Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Biorad), de acordo com o método modificado de Laemmli (1970), sob condições redutoras (2-mercaptoetanol). O gel de empilhamento foi preparado para uma concentração de 5% de acrilamida/bis-acrilamida, 0,5M de Tris-HCl pH 6,8; 0,1% de SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,1% de TEMED (Tetrametiletilenodiamina). O gel de separação foi realizado com 14% de acrilamida/bisacrilamida, 1,5 M de Tris-HCL pH 8,8, 0,1% de SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,1% de TEMED. O tampão de corrida utilizado foi Tris-Glicina 1x (2,5 mM de Tris, 19,2 mM de Glicina e 0,01% de SDS). O conteúdo total de 10 µL de proteínas extraídas foi misturado com a mesma quantidade de tampão de amostra 2x (0,25 M Tris-HCL pH 6.8, 50% glicerol, 0,05% azul de bromofenol contendo β-mercaptoetanol) na proporção de 1:1 e fervido em banho-maria a 95 °C, por 5 minutos, para desnaturação das proteínas. Foi aplicado todo o volume (20 µL) nos poços do gel. Foi utilizado o padrão de tamanho molecular (Sigma Marker™ mol wt 6,500-200,000).

A eletroforese foi conduzida a uma corrente de 20 mA e 80 Volts, por 40 minutos para gel de empilhamento, e 40 mA e 120 Volts, por 2 horas para gel de separação. Após a eletroforese, o gel foi lavado com água destilada, para remoção do

SDS e fixado com 40% (V/V) de metanol, 10% (V/V) de ácido acético por 20 minutos e corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250* coloidal. A descoloração do gel foi realizada com água destilada, até a remoção da coloração de fundo e destaque das bandas de proteínas. O gel foi mantido em solução de fixação (40% metanol, 7% ácido acético) e fotodocumentado.

3.8 ANÁLISE MICOQUÍMICA

3.8.1 Determinação de compostos fenólicos totais

Para a quantificação dos compostos fenólicos totais dos extratos foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu modificado por Boroski et al. (2015). Os extratos foram diluídos em água:metanol (v/v) na proporção de 1:25 e foram coletados 250 µL, adicionando 250 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:1), 500 µL da solução saturada de carbonato de sódio e 4,0 mL de água destilada. As amostras foram agitadas e mantidas a 25 °C por 25 minutos sob proteção da luz, e logo após centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm. O branco foi preparado nas mesmas condições, utilizando 250 µL de metanol no lugar da amostra. O padrão de ácido gálico (0-200 mg/L) foi utilizado para construção da curva de calibração. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 725 nm, em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Todas as amostras foram preparadas em triplicata e os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de amostra.

3.8.2 Determinação de flavonoides

A quantificação de flavonoides foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Down (1959) modificado por Boroski et al. (2015). Os extratos foram diluídos na proporção de 1:25 água:metanol (v/v) e foram coletados 500 µL, adicionando 250 µL da solução de cloreto de alumínio 5% (v/v em metanol) e 4,25 mL de metanol. As amostras foram agitadas e mantidas a 25 °C por 30 minutos sob proteção da luz. O branco foi preparado nas mesmas condições, utilizando 500 µL de metanol no lugar da amostra. A curva de calibração foi realizada usando-se uma solução padrão de quercetina (0-200 mg/L). A absorbância foi medida em

espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 425 nm, em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Todas as amostras foram preparadas em triplicata e os resultados expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de amostra.

3.8.3 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos extratos liofilizados (CLAE)

A análise por CLAE foi feita através de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (UHPLC) Dionex UltiMate 3000 (*Thermo Fisher Scientific*), equipado com um detector UV-VIS (VWD-3400RS), bomba quaternária (LPG-3400SD), forno (TCC-3400RS) e sistema de injeção manual (20 μ L) de acordo com o método de Barros et al. (2009) com modificações. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 μ M; temperatura do forno 40 °C; comprimento de onda de detecção 280, 295 e 260 nm. A taxa de fluxo do solvente foi de 1,0 mL/min. Como fases móveis foram utilizados (A) água ultrapura acidificada com ácido acético 0,5% (pH 3,03), (B) acetonitrila com eluição por gradiente. A composição inicial foi: 10–60% B (0–30 min); 60–95% B (30–38 min); mantendo essa proporção até o final da corrida de 45 minutos.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas para avaliar os resultados dos experimentos foram realizadas por meio do software Microsoft R Open versão 4.1.2, sendo estes submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a nível de significância de 0,05, garantindo 95 % de confiabilidade dos resultados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS FÚNGICOS

A PCR utilizando os *primers* ITS 1-4 gerou fragmentos de aproximadamente 600 pb. A sequência obtida das amostras MT1, MT2, MT5, MT10 e MT31 foram comparadas com outras sequências depositadas no banco de dados GenBank (NCBI), números de acesso MZ519068.1 e LR992036.1 e apresentaram similaridade superior a 98%, TABELA 4.

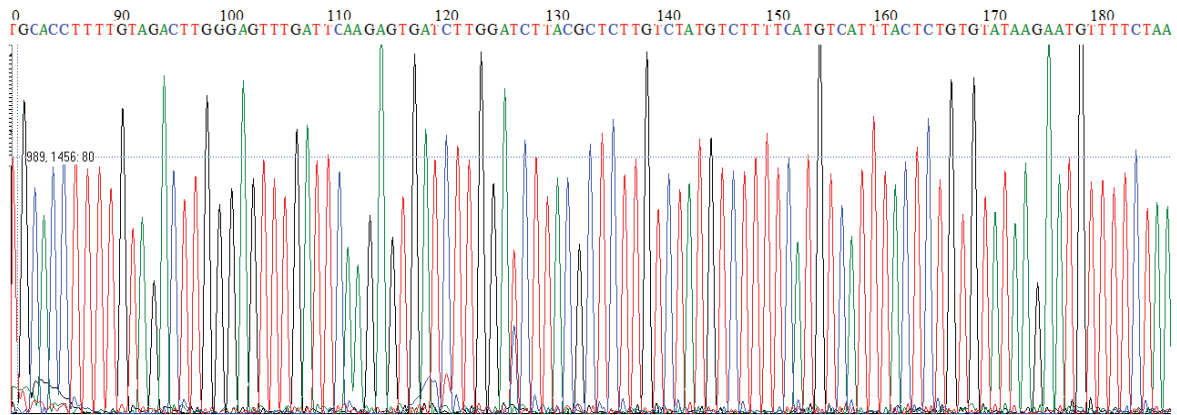
TABELA 4 - RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1-4 DOS ISOLADOS DE *M. titans*

Código amostra	Espécie relacionada obtida GenBank	Porcentagem de similaridade por número de acesso GenBank	
		MZ519068.1	MN017548.1
MT 1	<i>Macrocybe titans</i>	100%	100%
MT 2	<i>Macrocybe titans</i>	100%	100%
MT 5	<i>Macrocybe titans</i>	100%	100%
MT 10	<i>Macrocybe titans</i>	99%	99%
MT 31	<i>Macrocybe titans</i>	100%	100%

FONTE: A autora (2022).

A região ITS é oficialmente reconhecida pelos micologistas para identificação de fungos (SCHOCH *et al.*, 2012). Quando a pesquisa resulta em homologia pela ferramenta BLASTn, em sequências iguais ou superiores a 99%, as espécies são consideradas idênticas (GODINHO *et al.*, 2013). Portanto, podemos afirmar que as amostras analisadas pertencem à espécie em questão, devido à alta qualidade do sequenciamento que pode ser observado na FIGURA 4.

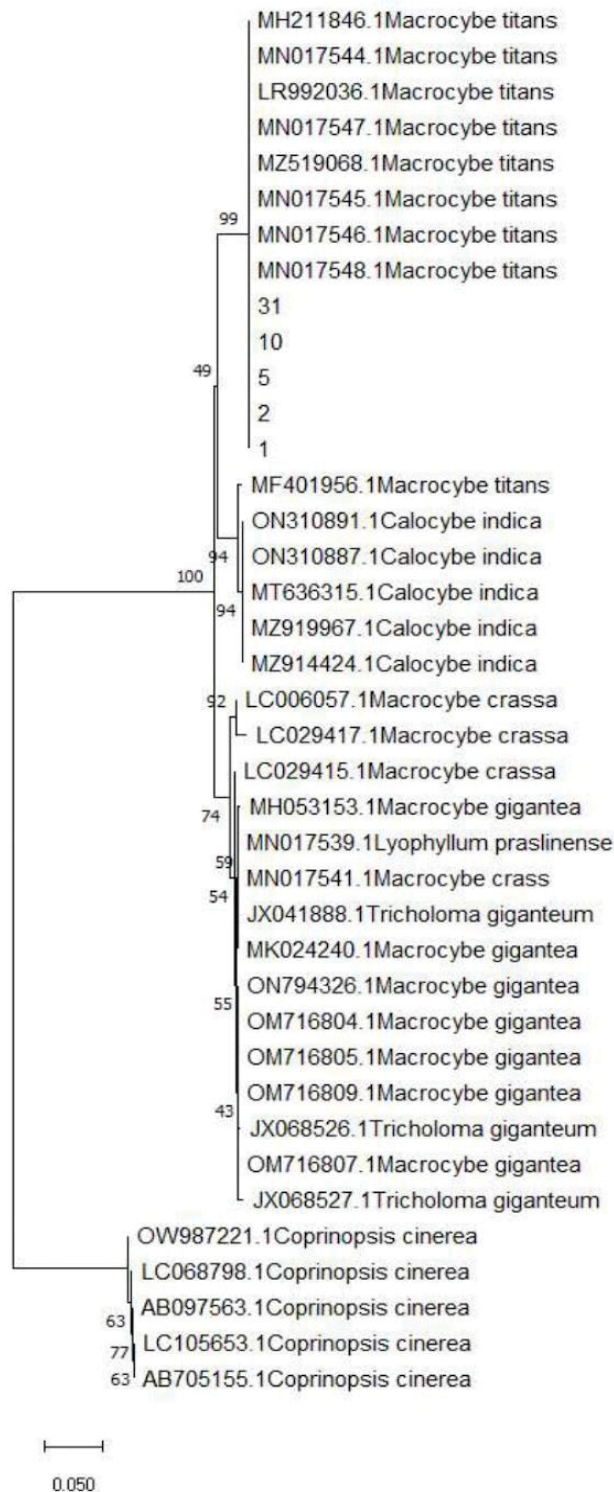
FIGURA 4 - ELETROFEROGRAMA DE UMA PARTE DA SEQUÊNCIA ITS1-4, DE UM DOS ISOLADOS DE *M. titans*



FONTE: A autora (2022).

A análise filogenética foi feita através da construção da árvore filogenética, utilizando os isolados deste trabalho MT1, 2, 5, 10 e 31, e mais vinte sequências de *Macrocybe*. As linhagens isoladas se alocaram no mesmo cluster com outras sequências de *M. titans* do GenBank, suportado pelo *bootstrap* de 99% no ramo principal das espécies, e estão distantes de outras espécies, como pode ser observado pela FIGURA 5, mostrando a importância do sequenciamento da região ITS para determinar com precisão a identificação ao nível de espécie.

FIGURA 5 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DA REGIÃO DO ESPAÇADOR INTERNO TRANSCRITO DO GENE RIBOSSOMAL 5.8S DOS ISOLADOS MT 1, 2, 5, 10 e 31 E OUTRAS SEQUÊNCIAS DEPOSITADAS NO GENBANK



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Filogenia molecular usando o método Neighbor-Joining e distâncias evolutivas calculadas usando o método da Máxima Verossimilhança Composta. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico (Bootstrap, com 10.000 reamostragens) são indicados acima dos ramos. Esta análise envolveu 39 sequências de nucleotídeos. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA 11.

4.2 RENDIMENTO DOS EXTRATOS FÚNGICOS

Os rendimentos obtidos a partir da preparação dos extratos através dos métodos de banho de ultrassom, ponteira ultrassônica, shaker e a frio, além dos cinco solventes extratores, água destilada, isopropanol 25%, acetona 25%, etanol 25% e metanol 25% são apresentados na TABELA 5.

TABELA 5 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS

Nome da amostra	Extrato liofilizado	Peso inicial	Rendimento %
AgSk	0,4489 g	1,0023 g	44,8
EtSk	0,4246 g	1,0034 g	42,3
MeSk	0,4151 g	1,0011 g	41,5
IsoSk	0,3747 g	1,0006 g	37,4
AgPu	0,3717 g	1,0034 g	37,0
AgFr	0,3517 g	1,0004 g	35,2
MeBu	0,3516 g	1,0002 g	35,2
MePu	0,3487 g	1,0000 g	34,9
EtFr	0,3495 g	1,0058 g	34,7
ActSk	0,3434 g	1,0005 g	34,3
AgBu	0,341 g	1,0000 g	34,1
EtBu	0,3399 g	1,0003 g	34,0
ActFr	0,3416 g	1,0066 g	33,9
EtPu	0,3394 g	1,0068 g	33,7
ActPu	0,3321 g	1,0072 g	33,0
IsoBu	0,3198 g	1,0051 g	31,8
IsoFr	0,3176 g	1,0001 g	31,8
IsoPu	0,305 g	1,0012 g	30,5
ActBu	0,3059 g	1,0049 g	30,4
MeFr	0,2383 g	1,0045 g	23,7

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Solvente extrator - Ag: água destilada, Iso: isopropanol 25%, Act: acetona 25%, Et: etanol 25% e Me: metanol 25%. Método de extração - Bu: banho de ultrassom, Pu: ponteira ultrassônica, Sk: extração com agitação em *Shaker*, Fr: extração estática a frio.

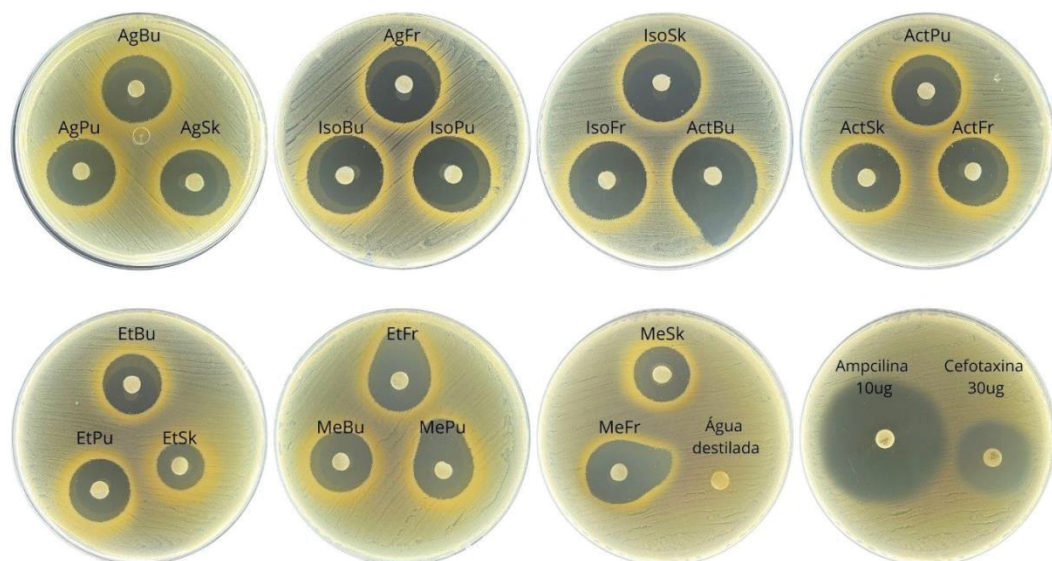
As massas obtidas mostraram-se estáveis e com quantidade suficiente para realização das análises. Em relação ao rendimento dos extratos, observou-se variação de 44,8 a 23,7% dos extratos AgSk e MeFr, respectivamente. O tipo de solvente e o tipo de extração, mostrou influenciar o rendimento da extração, o que está relacionado com o tipo de componentes que cada solvente extrai.

4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS

No ensaio de disco-difusão utilizou discos em triplicata, impregnados com os extratos em placas inoculadas com as bactérias. A dimensão dos halos formados ao redor do disco foi avaliada para determinação do efeito inibitório dos extratos sobre as bactérias, após 24 horas. A atividade antibacteriana dos extratos foi avaliada contra algumas bactérias patogênicas onde a ampicilina e cefotaxima foram usadas como droga padrão para comparação. Verificou-se que todos os extratos inibiram todas as espécies Gram-positivas e Gram-negativas examinadas, sendo uns mais eficazes que o outro dependendo da espécie em questão.

O maior efeito de inibição foi observado contra a bactéria *Staphylococcus aureus*, no grupo das bactérias Gram-positivas. Observou-se a formação de halos de inibição regulares e sem presença de bactérias resistentes, FIGURA 6.

FIGURA 6 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS PARA A BACTÉRIA *S. aureus* NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Solvente extrator - Ag: água destilada, Iso: isopropanol 25%, Act: acetona 25%, Et: etanol 25% e Me: metanol 25%. Método de extração - Bu: banho de ultrassom, Pu: ponteira ultrassônica, Sk: extração com agitação em *Shaker*, Fr: extração estática a frio.

S. aureus é uma bactéria gram-positiva e anaeróbia facultativa que produz diversos fatores de patogenicidade e virulência. Encontrada facilmente na pele e na mucosa, constituindo microbiota normal, porém em casos de patogênicos, provoca desde uma simples infecção até infecções mais graves como, pneumonia e meningite por exemplo. Uma das principais causas por bacteremia em pacientes hospitalares é por essa bactéria, diversas infecções metastáticas, como endocardite infecciosa,

artrite séptica e complicações, como choque séptico e sepse (MONTARELO *et al.*, 2018), representando um problema de saúde global. Hoje diversas cepas de *S. aureus* são resistentes à meticilina, recebendo o nome de MRSA. Os MRSA se disseminaram de forma rápida em hospitais e como consequência, limitaram os antibióticos utilizados no combate a essas bactérias. Em 1980 foram introduzidas as fluoroquinolonas, mas as cepas MRSA também se tornaram rapidamente resistentes a elas. A vancomicina (glicopeptídeo) é eficiente no tratamento contra MRSA, mas apresenta efeitos colaterais graves. Além disso, houve o surgimento de uma cepa de *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) (DOS SANTOS, 2007).

A TABELA 6 traz a comparação entre os extratos testados contra *S. aureus*, e podemos observar que os extratos que tiveram um melhor desempenho foram o AgFr e ActBu, com tamanho médio de halo de $27,8 \pm 0,6$ e $26,3 \pm 0,1$ mm, respectivamente. O extrato que mostrou um menor desempenho foi o EtSk ($15,1 \pm 0,9$ mm). O resultado vai de acordo com resultados anteriores de que, geralmente, as bactérias Gram-positivas são consideradas mais sensíveis a diferentes compostos (KHATUA *et al.*, 2017).

TABELA 6 - MEDIDAS DAS ÁREAS DE INIBIÇÃO PARA A BACTÉRIA *S. aureus* NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO

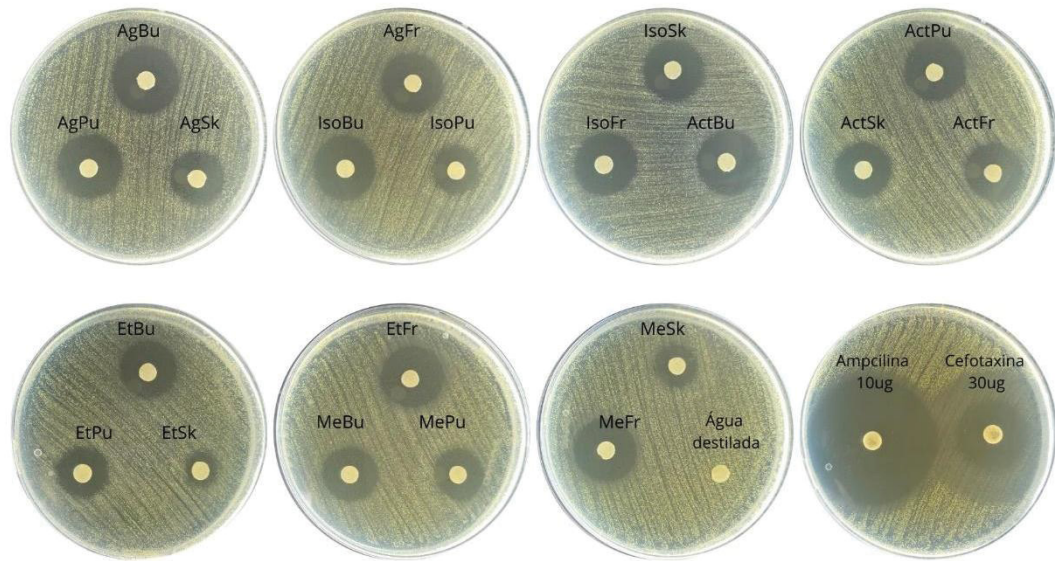
<i>S. aureus</i>						
Amostra testada	Zona de Inibição (mm)			Média*	DP	
Ampicilina 10ug	43	43	43	43,0 a	0,0	
AgFr	27,5	28,5	27,4	27,8 b	0,6	
ActBu	26,3	26,3	26,2	26,3 bc	0,1	
IsoSk	25,8	26,3	25,1	25,7 cd	0,6	
IsoBu	26,1	25,7	24,9	25,6 cd	0,6	
IsoPu	24,7	25,5	24,8	25,0 cde	0,4	
ActSk	24,4	23,4	26	24,6 cde	1,3	
AgPu	23,4	24,8	23,4	23,9 def	0,8	
IsoFr	24,3	24	22,2	23,5 ef	1,1	
ActFr	23,8	22,6	22,8	23,1 efg	0,6	
ActPu	23,4	22,1	22,1	22,5 fg	0,8	
Cefotaxina 30ug	21,5	23	23	22,5 fgh	0,9	
AgBu	22,2	22,2	22,2	22,2 fgh	0,0	
AgSk	22,3	21,1	21,1	21,5 ghi	0,7	
MeBu	21,5	21,5	21,5	21,5 ghi	0,0	
EtFr	20,9	20,8	19,9	20,5 hi	0,6	
EtPu	20,4	20,1	20,1	20,2 i	0,2	
MeFr	20,9	19,9	19,7	20,2 i	0,6	
MePu	20,1	20,3	19,5	20,0 i	0,4	
EtBu	19,6	19,7	19,7	19,7 i	0,1	
MeSk	16,4	17,3	17,7	17,1 j	0,7	
EtSk	16,1	14,6	14,6	15,1 k	0,9	
Água destilada	0	0	0	0,0 l	0,0	

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Solvente extrator - Ag: água destilada, Iso: isopropanol 25%, Act: acetona 25%, Et: etanol 25% e Me: metanol 25%. Método de extração - Bu: banho de ultrassom, Pu: ponteira ultrassônica, Sk: extração com agitação em *Shaker*, Fr: extração estática a frio.

Quando a análise é realizada em relação à bactéria Gram-positiva *L. monocytogenes*, observa-se que a melhor resposta se deu no extrato AgBu, que apresentou tamanho médio do halo de $22 \pm 0,1$ mm, sendo que a resposta menos pronunciada se deu em EtSk que apresentou média de $8,7 \pm 0,1$ mm, FIGURA 7 e TABELA 7. A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva anaeróbia facultativa. Causadora da doença listeriose, ocasionada geralmente por alimentos contaminados pelo patógeno, afetando principalmente indivíduos com o sistema imunológico comprometido. Gestantes entram no grupo de risco gerando em alguns casos, o aborto prematuro. A doença pode se espalhar pela corrente sanguínea chegando no sistema nervoso, ocasionando meningite (DREVETS, 2008).

FIGURA 7 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS PARA A BACTÉRIA *L. monocytogenes* NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Solvente extrator - Ag: água destilada, Iso: isopropanol 25%, Act: acetona 25%, Et: etanol 25% e Me: metanol 25%. Método de extração - Bu: banho de ultrassom, Pu: ponteira ultrassônica, Sk: extração com agitação em *Shaker*, Fr: extração estática a frio.

TABELA 7 - MEDIDAS DAS ÁREAS DE INIBIÇÃO PARA A BACTÉRIA *L. monocytogenes* NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO

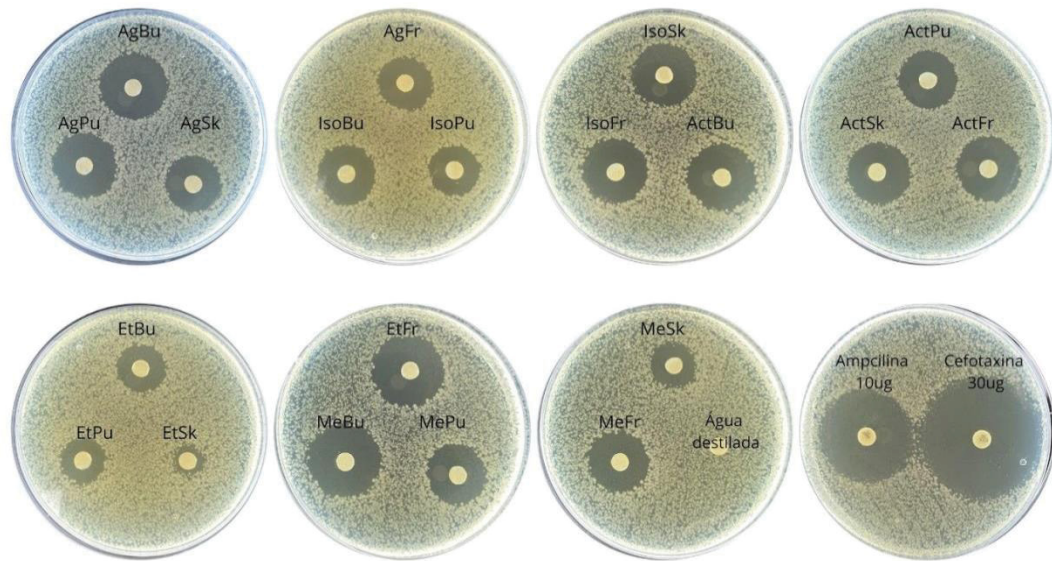
<i>L. monocytogenes</i>						
Amostra testada	Zona de Inibição (mm)			Média*	DP	
Ampicilina 10ug	40,8	40,8	40,8	40,8	a	0,0
AgBu	22,0	21,9	22,0	22,0	b	0,1
EtFr	21,1	21,0	21,1	21,1	c	0,1
Cefotaxina 30ug	21,0	21,0	21,0	21,0	cd	0,0
MeFr	20,9	20,9	20,9	20,9	d	0,0
IsoSk	20,9	20,8	20,9	20,9	d	0,1
ActPu	20,7	20,6	20,7	20,7	e	0,1
IsoBu	20,4	20,3	20,4	20,4	f	0,1
IsoFr	20,3	20,3	20,2	20,3	f	0,1
AgPu	20,0	20,0	19,9	20,0	g	0,1
AgFr	19,8	19,9	19,9	19,9	g	0,1
ActBu	19,5	19,6	19,6	19,6	h	0,1
ActFr	18,5	18,4	18,4	18,4	i	0,1
EtBu	18,2	18,2	18,1	18,2	j	0,1
MeBu	17,9	17,9	17,8	17,9	k	0,1
ActSk	17,8	17,8	17,7	17,8	k	0,1
AgSk	17,3	17,3	17,2	17,3	l	0,1
MePu	16,0	15,9	16,0	16,0	m	0,1
EtPu	15,7	15,6	15,7	15,7	n	0,1
IsoPu	14,9	14,9	14,8	14,9	o	0,1
MeSk	12,7	12,7	12,6	12,7	p	0,1
EtSk	8,6	8,7	8,7	8,7	q	0,1
Água destilada	0,0	0,0	0,0	0,0	r	0,0

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Solvente extrator - Ag: água destilada, Iso: isopropanol 25%, Act: acetona 25%, Et: etanol 25% e Me: metanol 25%. Método de extração - Bu: banho de ultrassom, Pu: ponteira ultrassônica, Sk: extração com agitação em *Shaker*, Fr: extração estática a frio.

Dentre as bactérias Gram-negativas, *Klebsiella pneumoniae* sofreu maior efeito inibitório com halos regulares, bordas bem delimitadas e nenhuma presença de colônias satélites conforme pode ser observado na FIGURA 8.

FIGURA 8– ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS PARA A BACTÉRIA *K. pneumoniae* NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Solvente extrator - Ag: água destilada, Iso: isopropanol 25%, Act: acetona 25%, Et: etanol 25% e Me: metanol 25%. Método de extração - Bu: banho de ultrassom, Pu: ponteira ultrassônica, Sk: extração com agitação em *Shaker*, Fr: extração estática a frio.

A Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram-negativo anaeróbio facultativo. Diversos estudos vêm demonstrando a resistência dessa bactéria em relação a diversos antibióticos. Considerado um patógeno oportunista, implica em diferentes infecções do trato urinário em pacientes hospitalizados ou indivíduos imunocomprometidos. Além disso, é capaz de gerar pneumonia e infecções sanguíneas ou em feridas cirúrgicas (JASIM *et al.*, 2020).

Organismos Gram-negativos são difíceis de serem inibidos devido à estrutura de suas paredes celulares (KHATUA *et al.*, 2017). Contudo, todos os extratos testados contra *K. pneumoniae* tiveram efeito inibitório, como mostrado na TABELA 8. O extrato que apresentou melhor resultado foi o EtFr, com tamanho de halo de $23,1 \pm 0,1$ mm e o extrato que exibiu uma baixa atividade foi o EtSk ($8,4 \pm 0,1$ mm).

TABELA 8 - MEDIDAS DAS ÁREAS DE INIBIÇÃO PARA A BACTÉRIA *K. pneumoniae* NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO

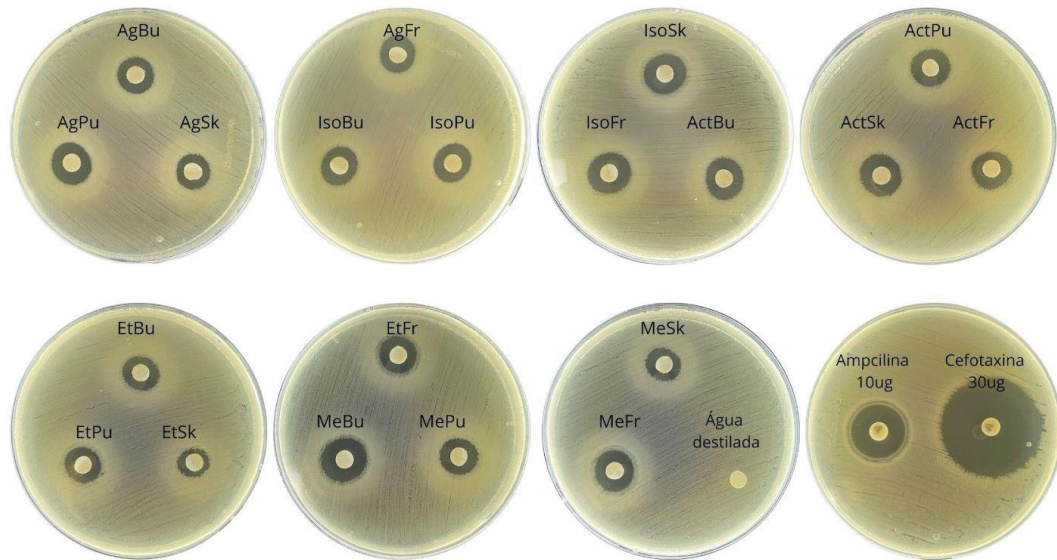
<i>K. pneumoniae</i>						
Amostra testada	Zona de Inibição (mm)			Média*	DP	
Cefotaxina 30ug	37,7	37,7	37,7	37,7 a	0,0	
Ampicilina 10ug	29,6	29,6	29,6	29,6 b	0,0	
EtFr	23,1	23,1	23,0	23,1 c	0,1	
MeBu	22,6	22,6	22,5	22,6 d	0,1	
AgBu	21,9	21,9	21,9	21,9 e	0,0	
ActBu	21,2	21,0	21,2	21,1 f	0,1	
IsoSk	21,0	21,0	20,9	21,0 fg	0,1	
AgPu	20,9	20,8	20,9	20,9 g	0,1	
IsoFr	20,5	20,5	20,5	20,5 h	0,0	
MeFr	19,6	19,6	19,5	19,6 i	0,1	
ActSk	19,4	19,5	19,5	19,5 i	0,1	
MePu	19,4	19,4	19,4	19,4 i	0,0	
ActFr	19,1	19,0	19,1	19,1 j	0,1	
ActPu	18,8	18,8	18,7	18,8 k	0,1	
IsoBu	18,1	18,1	18,0	18,1 l	0,1	
AgSk	17,8	17,8	17,7	17,8 m	0,1	
AgFr	17,8	17,7	17,8	17,8 m	0,1	
IsoPu	16,0	16,0	15,9	16,0 n	0,1	
EtBu	15,9	15,9	15,8	15,9 n	0,1	
MeSk	14,1	14,2	14,1	14,1 o	0,1	
EtPu	14,0	14,1	14,1	14,1 o	0,1	
EtSk	8,4	8,3	8,4	8,4 p	0,1	
Água destilada	0,0	0,0	0,0	0,0 q	0,0	

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Solvente extrator - Ag: água destilada, Iso: isopropanol 25%, Act: acetona 25%, Et: etanol 25% e Me: metanol 25%. Método de extração - Bu: banho de ultrassom, Pu: ponteira ultrassônica, Sk: extração com agitação em *Shaker*, Fr: extração estática a frio.

Com relação aos diferentes extratos utilizando a bactéria *E. coli* como microrganismo com efeito inibitório, podemos observar bordas bem delimitadas FIGURA 9.

FIGURA 9 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS PARA A BACTÉRIA *E. coli* NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Solvente extrator - Ag: água destilada, Iso: isopropanol 25%, Act: acetona 25%, Et: etanol 25% e Me: metanol 25%. Método de extração - Bu: banho de ultrassom, Pu: ponteira ultrassônica, Sk: extração com agitação em *Shaker*, Fr: extração estática a frio.

A *E. coli* é considerada um importante problema de saúde pública devido ao fato de possuir muitos genes de resistência o que dificulta o tratamento. Sendo uma bactéria Gram-negativa um dos principais habitat é o intestino humano, sendo considerada inofensiva, porém mutações a tornam um patógeno perigoso, podendo levar a morte (KAPER, 2004). Atualmente, existem seis grupos de *E. coli* diferenciados de acordo com a virulência e toxinas (GOMES *et al.*, 2016). O extrato MeBu foi o que demonstrou a maior eficiência ($13,9 \pm 0,1$ mm) e o de menor foi o EtSk ($9,7 \pm 0,1$ mm), conforme pode ser observado na TABELA 9.

TABELA 9 - MEDIDAS DAS ÁREAS DE INIBIÇÃO PARA A BACTÉRIA *E. coli* NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO

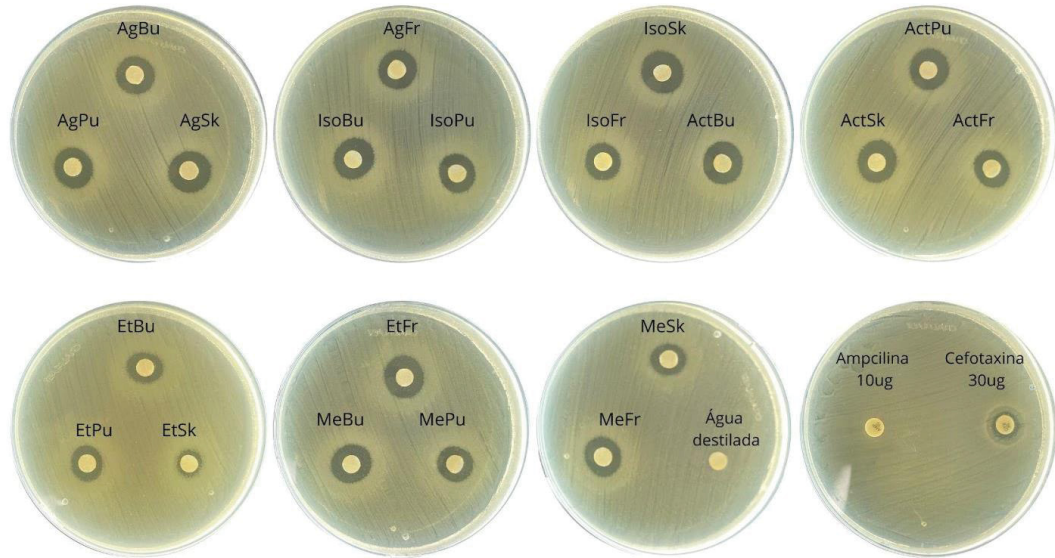
<i>E. coli</i>						
Amostra testada	Zona de Inibição (mm)			Média*	DP	
Cefotaxina 30ug	33,4	33,4	33,4	33,4 a	0,0	
Ampicilina 10ug	16,5	16,5	16,5	16,5 b	0,0	
MeBu	13,9	13,8	13,9	13,9 c	0,1	
MeFr	13,7	13,7	13,6	13,7 d	0,1	
ActBu	13,5	13,4	13,5	13,5 e	0,1	
IsoSk	13,4	13,4	13,3	13,4 e	0,1	
IsoFr	13,3	13,4	13,4	13,4 e	0,1	
IsoPu	12,8	12,7	12,8	12,8 f	0,1	
ActSk	12,8	12,8	12,7	12,8 f	0,1	
ActPu	12,7	12,6	12,7	12,7 fg	0,1	
ActFr	12,5	12,6	12,6	12,6 g	0,1	
AgPu	12,4	12,4	12,3	12,4 h	0,1	
EtBu	12,3	12,2	12,3	12,3 h	0,1	
EtPu	12,3	12,3	12,2	12,3 h	0,1	
AgFr	12	12,1	12	12,0 i	0,1	
IsoBu	12	12	12,1	12,0 i	0,1	
EtFr	12	12	12,1	12,0 i	0,1	
MePu	12,1	12	12	12,0 i	0,1	
AgBu	11,4	11,3	11,4	11,4 j	0,1	
MeSk	11,4	11,3	11,4	11,4 j	0,1	
AgSk	10,8	10,7	10,8	10,8 k	0,1	
EtSk	9,7	9,6	9,7	9,7 l	0,1	
Água destilada	0	0	0	0,0 m	0,0	

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Solvente extrator - Ag: água destilada, Iso: isopropanol 25%, Act: acetona 25%, Et: etanol 25% e Me: metanol 25%. Método de extração - Bu: banho de ultrassom, Pu: ponteira ultrassônica, Sk: extração com agitação em *Shaker*, Fr: extração estática a frio.

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria aeróbia com características morfológicas em forma de bastonetes móveis Gram-negativos, não formadores de esporos. Podem ser responsáveis por infecções do trato respiratório inferior em pacientes hospitalizados, sendo associada ao aumento da mortalidade (YANG *et al.*, 2019). Dentro do gênero *Pseudomonas*, diferentes espécies vêm demonstrando maior habilidade de desenvolvimento de resistência aos antibióticos, como pode ser observado na FIGURA 10. Segundo Figueiredo et al. (2007), *P. aeruginosa* apresenta resistência cruzada aos antimicrobianos, que resulta da co-resistência, ou seja, da presença de múltiplos mecanismos de resistência num único hospedeiro levando à resistência a múltiplos fármacos.

FIGURA 10 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS PARA A BACTÉRIA *P. aeruginosa* NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Solvente extrator - Ag: água destilada, Iso: isopropanol 25%, Act: acetona 25%, Et: etanol 25% e Me: metanol 25%. Método de extração - Bu: banho de ultrassom, Pu: ponteira ultrassônica, Sk: extração com agitação em *Shaker*, Fr: extração estática a frio.

A TABELA 10 traz a comparação entre os extratos testados contra *P. aeruginosa*, e podemos observar que o extrato que teve um melhor desempenho foi IsoSk, com tamanho médio de halo de $13,8 \pm 0,1$. O extrato que mostrou um menor desempenho foi o EtSk ($7,6 \pm 0,1$ mm).

TABELA 10 - MEDIDAS DAS ÁREAS DE INIBIÇÃO PARA A BACTÉRIA *P. aeruginosa* NO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO

<i>P. aeruginosa</i>						
Amostra testada	Zona de Inibição (mm)			Média*	DP	
IsoSk	13,8	13,9	13,9	13,9 a	0,1	
AgBu	12,9	12,8	12,9	12,9 b	0,1	
AgPu	12,9	12,9	12,8	12,9 b	0,1	
AgSk	12,8	12,9	12,9	12,9 b	0,1	
ActBu	12,9	12,9	12,8	12,9 b	0,1	
EtFr	12,9	12,9	12,8	12,9 b	0,1	
MeBu	12,9	12,8	12,9	12,9 b	0,1	
IsoBu	12,8	12,7	12,8	12,8 b	0,1	
ActPu	12,8	12,8	12,7	12,8 b	0,1	
ActSk	12,8	12,7	12,8	12,8 b	0,1	
AgFr	12,1	12,2	12,2	12,2 c	0,1	
MeFr	11,9	11,8	11,9	11,9 d	0,1	
ActFr	11,7	11,6	11,7	11,7 e	0,1	
MePu	11,4	11,4	11,3	11,4 f	0,1	
MeSk	11,4	11,4	11,3	11,4 f	0,1	
IsoPu	11,3	11,2	11,3	11,3 fg	0,1	
IsoFr	11,2	11,1	11,2	11,2 g	0,1	
EtBu	10,9	10,8	10,9	10,9 h	0,1	
EtPu	10,9	10,9	10,8	10,9 h	0,1	
Cefotaxina 30ug	7,7	7,7	7,7	7,7 i	0,0	
EtSk	7,6	7,6	7,5	7,6 i	0,1	
Ampicilina 10ug	6,0	6,0	6,0	6,0 j	0,0	
Água destilada	0,0	0,0	0,0	0,0 k	0,0	

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Solvente extrator - Ag: água destilada, Iso: isopropanol 25%, Act: acetona 25%, Et: etanol 25% e Me: metanol 25%. Método de extração - Bu: banho de ultrassom, Pu: ponteira ultrassônica, Sk: extração com agitação em *Shaker*, Fr: extração estática a frio.

Venturini et al. (2008) em um estudo comparativo de diversos extratos em uma variedade de cogumelo, verificou que os extratos aquosos apresentaram um maior potencial na atividade antimicrobiana por disco-difusão. Embora a metodologia de disco-difusão seja muito utilizada devido a sua praticidade e baixo custo, ela não determina a concentração exata que é capaz de causar a inibição do microrganismo, mas ainda pode ser considerada como uma importante ferramenta complementar para a avaliação rápida de efeitos antimicrobianos.

Uma vez verificado e quantificado a área de inibição dos microrganismos para cada extrato, foram realizadas análises para determinar a menor concentração de cada um dos extratos (CIM) que inibe os microrganismos, através do teste de microdiluição em caldo.

Para a revelação da CIM foi utilizado o corante denominado CTT. Dentre suas aplicações, ele é utilizado para a identificação de células ativas em testes de determinação de CIM, quando a coloração do poço está rosa há crescimento do microrganismo. Quando não há crescimento, a amostra não muda de coloração, uma vez que não há microrganismos para reagir com o corante.

Na TABELA 11 tem-se o resultado da CIM para cada um dos 20 extratos testados no estudo, contemplando os cinco microrganismos estudados. Em cada uma das colunas tem-se a Concentração Inibitória Mínima e a Concentração Bactericida Mínima. As figuras constando as imagens de todas as microplacas de 96 poços, cujo resultado foi apresentado nessa tabela encontram-se nos Apêndices 1, 2, 3, 4 e 5.

TABELA 11 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DOS EXTRATOS FRENTE A MICRORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO

		Bactérias										
		<i>S. aureus</i>		<i>L.monocytogenes</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		
Extratos mg/mL		CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	
	AgBu	0,99	0,99	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98
	AgPu	0,99	0,99	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98
	AgSk	1,99	0,99	7,97	7,97	3,98	3,98	7,97	7,97	7,97	7,97	7,97
	AgFr	0,99	0,99	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	7,97	3,98	3,98	3,98
	IsoBu	0,99	0,99	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98
	IsoPu	7,97	7,97	15,9	15,9	15,9	15,9	15,9	15,9	31,88	31,88	31,88
	IsoSk	1,99	1,99	7,97	7,97	7,97	7,97	7,97	7,97	7,97	7,97	7,97
	IsoFr	0,99	0,99	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	7,97
	ActBu	0,99	0,99	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98
	ActPu	15,9	15,9	31,88	31,88	31,88	31,88	31,88	31,88	31,88	31,88	31,88
	ActSk	1,99	1,99	7,97	7,97	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	7,97
	ActFr	0,99	0,99	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98
	EtBu	0,99	0,99	7,97	7,97	3,98	3,98	7,97	7,97	7,97	7,97	7,97
	EtPu	3,98	3,98	15,9	15,9	7,97	7,97	7,97	7,97	15,9	15,9	15,9
	EtSk	3,98	3,98	15,9	15,9	7,97	7,97	31,88	31,88	15,9	15,9	15,9
	EtFr	0,99	0,99	7,97	7,97	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98
	MeBu	0,99	0,99	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98
	MePu	3,98	3,98	7,97	7,97	7,97	7,97	7,97	15,9	15,9	15,9	15,9
	MeSk	1,99	1,99	7,97	7,97	7,97	7,97	7,97	15,9	7,97	7,97	7,97
MeFr	0,99	0,99	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98	
CP*	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Solvente extrator - Ag: água destilada, Iso: isopropanol 25%, Act: acetona 25%, Et: etanol 25% e Me: metanol 25%. Método de extração - Bu: banho de ultrassom, Pu: ponteira ultrassônica, Sk: extração com agitação em *Shaker*, Fr: extração estática a frio. CP* Controle positivo: Ampicilina.

S. aureus apresentou um efeito inibitório mínimo com 0,99 mg/mL dos extratos (ActBU, ActFr, AgBu, AgFr, AgPu, EtBu, EtFr, IsoBu, IsoFr, MeBu e MeFr). Enquanto o efeito inibitório mínimo para as outras bactérias, foi de 3,98 mg/mL. O extrato que apresentou o menor desempenho de inibição para todas as bactérias foi o ActPu com 15,9 mg/mL do extrato para *S. aureus* e 31,8 mg/mL do extrato para *L. monocytogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*.

O teste de microdiluição em caldo corrobora com os resultados de áreas de inibição verificados nos testes de disco-difusão, mostrando que os 20 extratos testados possuem atividade antimicrobiana, uma vez que proporcionam inibição e morte do crescimento dos microrganismos. Adicionalmente, em complemento ao teste de CIM, foi realizado o CBM através do qual foi possível avaliar visualmente a morte celular.

Testes de microdiluição em caldo foram realizados no gênero *M. lobayensis* por Khatua et al. (2017) utilizando extrato metanólico, o extrato apresentou atividade contra as bacterias *L. monocytogenes*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Salmonella thyphimurium*. Khatua et al. (2018) também avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico contra as bacterias *L. monocytogenes*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella thyphimurium* e se mostraram eficientes contra todas elas.

Dessa forma, os resultados apresentados demonstram que os solventes utilizados podem causar diferentes efeitos na concentração dos compostos presentes no extrato final e, conseqüentemente, o espectro de atividade antimicrobiana.

4.4 EXPRESSÃO DOS GENES DE PAMS EM SISTEMA DE CO-CULTIVO

Em estudos anteriores de desafio, o confronto entre fungos e bactérias era feito principalmente em placas de ágar, muitas vezes sem contato físico dos organismos (DEVEAU et al., 2015; GKARMIRI et al., 2015; LAMACCHIA et al., 2016). Neste estudo utilizamos uma configuração semi-líquida, na qual cultivamos *M. titans* sobre pérolas de vidro submersas, FIGURA 11 (DROCE et al., 2013). Essa configuração permitiu que as bactérias móveis, quando adicionadas à fase líquida

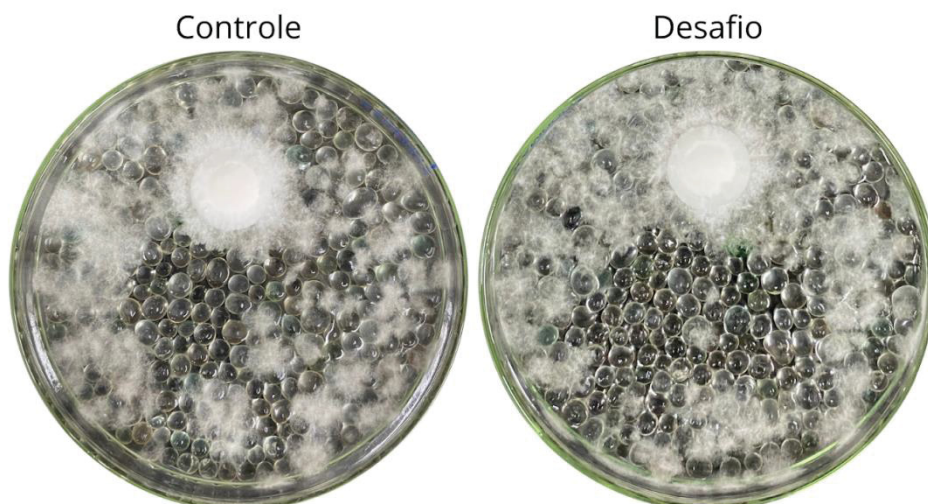
interagissem com o micélio de maneira dinâmica e íntima, FIGURA 12. Dessa forma, este sistema experimental nos permitiu analisar a expressão gênica de *M. titans* em resposta às bactérias de modo mais preciso.

FIGURA 11 - CULTIVO *M. titans* SOBRE PÉROLAS DE VIDRO



FONTE: A autora (2022).

FIGURA 12 - CONTROLE DE *M. titans* APÓS 48 HORAS DE CRESCIMENTO E MICÉLIO DE *M. titans* APÓS 48 HORAS DE DESAFIO BACTERIANO

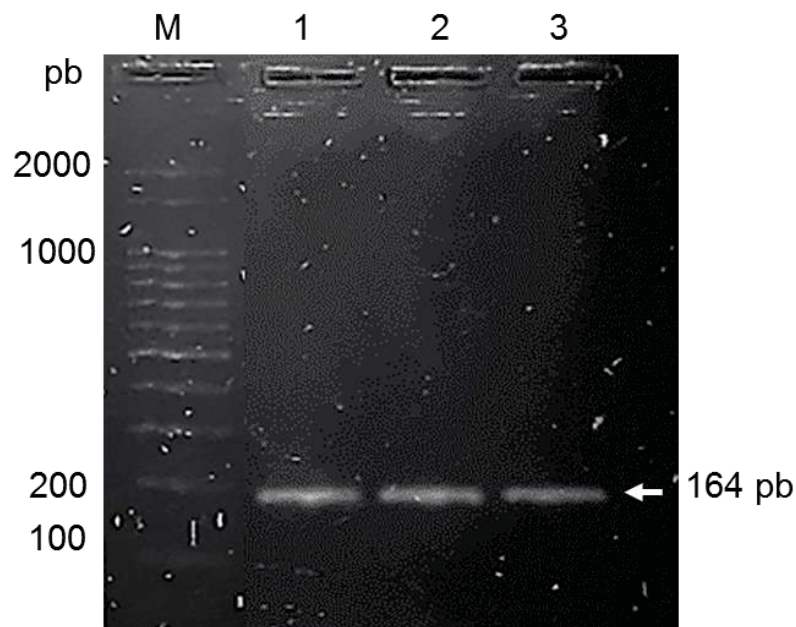


FONTE: A autora (2022).

Estudos moleculares sobre a expressão gênica requerem o isolamento do RNA de boa qualidade. Neste trabalho foram testados dois protocolos de extração de RNA o Protocolo 1: Kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega®) e Protocolo 2: Extração com Trizol (Invitrogen®), combinando protocolos físicos de ruptura celular e técnicas de purificação. O protocolo 1 não foi capaz de extrair o RNA, isso pode ser explicado, pois esse kit não é o melhor para a extração de micélio de fungos. Segundo Schumann et al. (2013), a adição de uma segunda etapa de clorofórmio durante o protocolo melhora notavelmente o rendimento de RNA, presumivelmente devido à remoção de polissacarídeos contaminantes. Já o protocolo 2, foi eficaz na extração do RNA com resultado de 45,2 µg/mL.

A expressão do gene para a tubulina (*housekeeping*) foi observada, com ótimo sinal de amplificação, e confirmada através de eletroforese em gel de agarose, pelo aparecimento de um *amplicon*, FIGURA 13, mesmo tendo sido desenhados *primers* com base na sequência de RNAm para outra espécie (*M. gigantea*).

FIGURA 13 - ELETROFORESE DO AMPLICON DO GENE DA TUBULINA

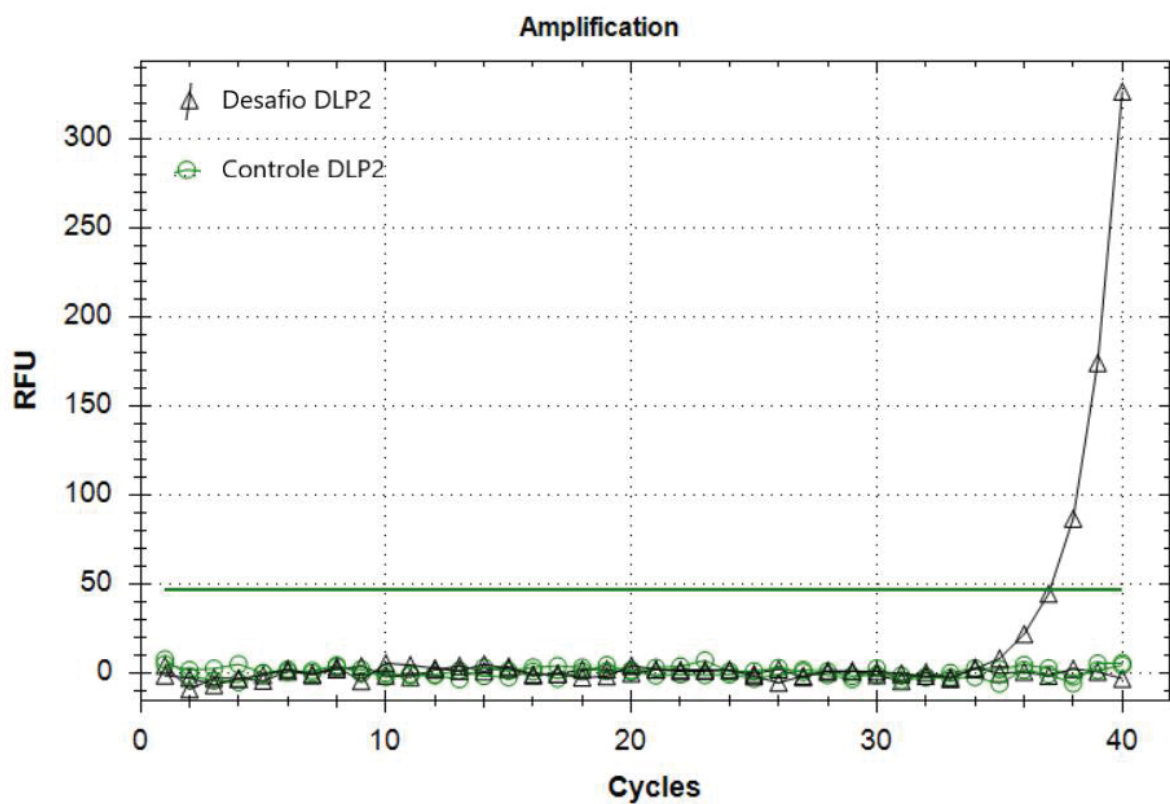


FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação, por RT-qPCR de três amostras de parte do cDNA do gene da tubulina (164 pb). M: Marcador de tamanho molecular 100 pb (Ludwig Biotecnologia).

Os oligonucleotídeos para a amplificação e análise da expressão gênica de PAMs utilizados nesse trabalho foram baseados no artigo de Kombrink et al. (2019), os quais analisaram a expressão de PAMs no cogumelo *C. cinerea*. Foram escolhidos *primers* para dois PAMs (LYS1 e DLP2), que foram utilizados por esses autores para o estudo da expressão de genes para a lisozima e proteína associada com defensina, de *C. cinerea*. No presente estudo, foi possível observar um sinal de fluorescência tardio, relativo à amplificação do gene DLP2, em desafio com *S. aureus* FIGURA 14.

FIGURA 14 - SINAL RT-qPCR APÓS O DESAFIO



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Controle gene DLP2 sem o desafio em verde. Sinal da RT-qPCR amplificado em preto somente quando desafiado com *S. aureus*, quando desafiado com *B. subtilis*, não houve amplificação do sinal.

Até o presente momento, os resultados dos experimentos sugerem que algumas bactérias, como *S. aureus* induzem um tipo de resposta no metabolismo do fungo basidiomiceto *M. titans*. Essa resposta depende predominantemente de proteínas secretadas, muitas apresentando algum nível de atividade antibacteriana. Kombrink et al. (2019) afirmam que a maioria das proteínas fúngicas que são secretadas durante a indução com co-cultivo bacteriano são pequenas, apresentando

menos que 250 aminoácidos e não há anotações gênicas disponíveis para consulta, o que dificulta as previsões de suas funções. Proteínas secretadas por fungos, com ação antimicrobiana, são normalmente uma reminiscência de proteínas efetoras produzidas por patógenos fúngicos e endofíticos, bem como fungos micorrízicos durante a colonização das plantas para estabelecer crescimento fúngico no hospedeiro (ZEILINGER *et al.*, 2016).

No entanto, estes resultados são ainda inconclusivos, e estão em fase de confirmação, para a elucidação do real comportamento em relação à expressão de genes relacionados com o metabolismo de PAMs, frente às diversas situações de desafios e co-cultivos realizados.

Os mecanismos de defesa empregados pelos fungos para enfrentar bactérias concorrentes ou antagonistas são mal compreendidos. Enquanto os fungos são notórios produtores de compostos antibacterianos, não está claro se esses compostos podem ser produzidos como parte de uma resposta de defesa específica contra bactérias.

A região identificada como LYS1 corresponde à um dos cinco genes codificantes para lisozimas expressas por *C. cinerea*, pertencente à um grupo de lisozimas fúngicas (GH24-type lysozymes), que apresentam ação antibacteriana por clivagem do peptidoglicano da parede celular bacteriana (KOMBRINK *et al.*, 2019). Esses mesmos autores identificaram, no cromossomo de *C. cinerea*, dez genes com domínio para proteínas similares à defensinas, identificados como DLP1-10 (defensin like proteins). Embora esses autores tenham detectado a expressão desses DLPs no transcriptoma de *C. cinerea* após desafio com bactérias, não puderam comprovar sua atividade antibacteriana. Os autores relatam que outras espécies de fungos podem apresentar proteínas com funções similares à essas proteínas, mas com diferentes domínios, e podem apresentar atividade antimicrobiana. Análise detalhada da expressão e da função dos genes individuais, pertencentes à essa família gênica sugere que essas proteínas fúngicas desempenham um papel significativo na interação com bactérias.

Como não há, até o presente momento, nenhuma sequência codificante disponível no GenBank de genes para PAMs em *Macrocybe* spp., a análise da expressão gênica, através da RT-qPCR é um desafio, pois foram realizadas nesse trabalho extensivas análises *in silico* no genoma de *M. gigantea*, para se encontrar

sequências homólogas de genes para PAMs já descritos para outros cogumelos basidiomicetos, como *Pleurotus ostreatus*.

A análise da sequência de RNAm, a partir das sequências de aminoácidos da extremidade N-terminal dos peptídeos *Pleurostrin*, *Alveolarin*, *Eryngin*, *Lyophyllum antifungal protein*, *Lentin* e *Agrocybin*, publicadas por Chu et al. (2005), foi verificada *in silico* através da ferramenta de bioinformática tBLASTn. Escolheu-se sequência relativa à extremidade N-terminal do peptídeo *Pleurostrin* de *P. ostreatus*, devido à proximidade taxonômica com *Macrocybe* spp., e por ser uma das maiores sequências (ATRVVYCNRRSGSVVGGDDTVYYEG), foi possível encontrar uma sequência de RNAm com número de acesso XM_036779028.1, descrita como proteína não caracterizada para *P. ostreatus*. Ao fazer o alinhamento, através da ferramenta BLASTn, foram localizadas sequências com alta similaridade (96%) com o genoma de *P. ostreatus*, indicado grande semelhança entre a sequência de RNAm e a sequência codificante do gene. Na tentativa de encontrar similaridade da sequência dessa proteína não caracterizada, no genoma de *M. gigantea*, foi realizado o alinhamento, sendo possível encontrar uma similaridade de 67% no *contig* de número 299 (GenBank SJRY01000299.1) mas o estudo ainda não foi conclusivo, pois o genoma de *M. gigantea* não tem anotação gênica e são apresentadas apenas sequências de *contigs*. A maioria das sequências de aminoácidos de supostos peptídeos antimicrobianos de cogumelos, disponíveis para consulta, representam apenas parte do peptídeo e não há muitas sequências codificantes anotadas no genoma ou são descritas como putativas ou não caracterizadas. O método utilizado pelos autores, para a determinação dessas sequências de aminoácidos de PAMs, é o isolamento prévio dos extratos proteicos por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose, e sequenciamento por degradação de Edman, o que poderia ser uma estratégia futura importante, para a detecção de frações de peptídeos nos extratos analisados nesse trabalho, para MT31.

Como alternativa, se houver alguma amplificação, mesmo que baixa, de algum dos cDNAs obtidos, será necessário o sequenciamento dos *amplicons* e adequação das sequências desses oligonucleotídeos.

Uma super-representação de genes que codificam pequenas proteínas secretadas (SSPs) também foi encontrada entre os genes de *P. anserina* que foram induzidos após a exposição a duas bactérias do gênero *Serratia*, uma das quais mata o fungo (LAMACCHIA *et al.*, 2016). Portanto, parece que a secreção de SSPs

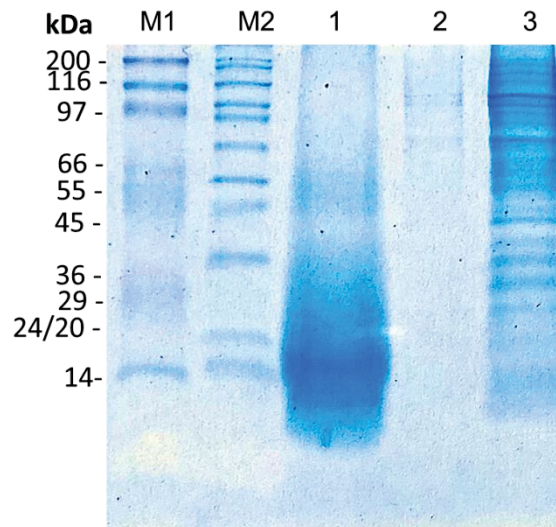
desempenha um papel significativo na interação de fungos com plantas e bactérias, incluindo interações mutualísticas, patogênicas ou competitivas.

4.5 AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE MT31

Foram analisados três diferentes protocolos para extração de proteínas de MT31, utilizando apenas o basidioma seco do cogumelo, FIGURA 15. A extração com o reagente Trizol resultou em uma maior concentração aparente de proteínas obtidas, as quais variaram em tamanho molecular e com bandas bem definidas. Foi realizado um gel a 14%, mas um gel mais concentrado (por exemplo, 18%) poderia permitir uma melhor separação de moléculas menores. Pretende-se utilizar esse protocolo para extração de proteínas de micélios de *M. titans*, em co-cultivo com as bactérias utilizadas para o desafio, visando estimular a produção de possíveis PAMs. Após a extração, as proteínas com menor massa molecular serão separadas por centrifugação utilizando colunas com baixo *cutt-off* e analisadas por métodos de identificação de proteínas, como o MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight), após separação por SDS-PAGE bidimensional, para determinação do pI (ponto isoelétrico) e massa molecular, por comparação dos níveis de expressão entre a amostra desafiada e a controle.

Existem vários bancos de dados para PAMs naturais, abrangendo hoje mais de 2.000 peptídeos (WANG, 2015). A maioria dos PAMs são relativamente curtos, geralmente consistindo em 10 a 60 aminoácidos (média de 33,26) (HUAN *et al.*, 2021).

FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS TOTAIS DE MT31



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 14% mostrando o perfil das proteínas totais extraídas do basidioma seco de MT31. KDa (Quilodaltons). M1 (Marcador de peso molecular Sigma Marker™ 6,5-200 kDa). M2 (Marcador de proteínas pré-corado). Perfil das proteínas extraídas com o tampão 1 (Tris-EDTA-SDS), 2 (Redutor) e 3 (Trizol).

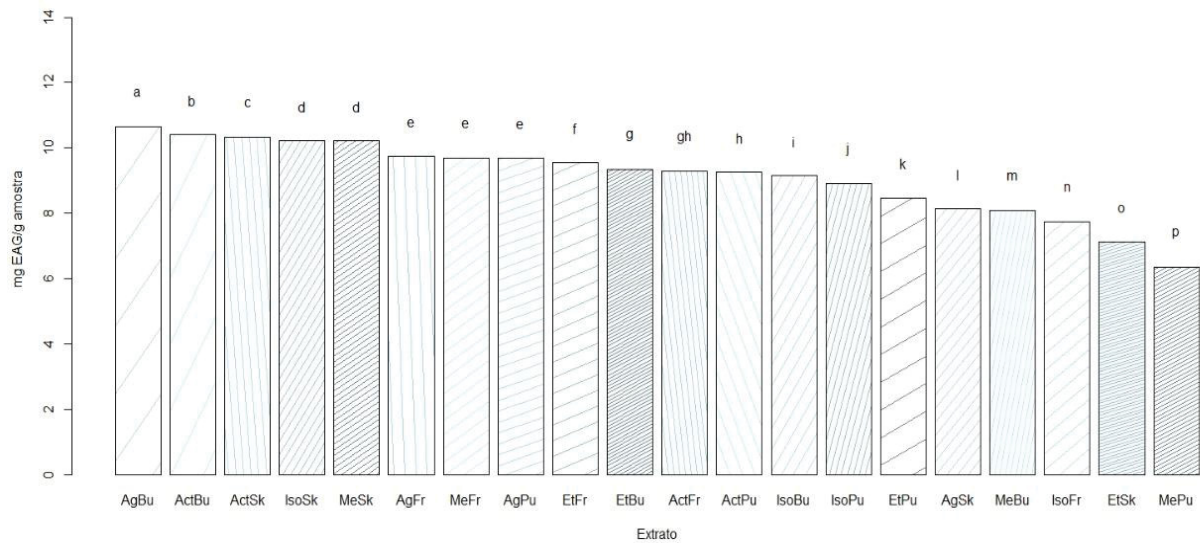
4.6 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES

Diferentes tipos de extratos podem apresentar comportamentos distintos dependendo do tipo do solvente extrator. Os antioxidantes naturais de cogumelos, como fenóis e flavonoides, são de natureza polar, portanto, uma extração eficiente pode definitivamente ser alcançada usando qualquer solvente polar como água, etanol, metanol e acetona.

O ensaio de Folin-Ciocalteu é altamente sensível para fenóis monohídricos, polifenóis, flavonoides e taninos. No entanto, o método pode superestimar o teor de fenólicos totais, devido a outras substâncias facilmente oxidáveis, como açúcares, ácido ascórbico, aminoácidos.

Os resultados são expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de cogumelo seco. Os compostos fenólicos totais dos extratos analisados pelo método Folin-Ciocalteu, variaram entre $10,65 \pm 0,005$ e $6,34 \pm 0,072$ mg EAG/g conforme mostrados no GRÁFICO 1.

GRÁFICO 1 – COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NOS EXTRATOS



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Solvente extrator - Ag: água destilada, Iso: isopropanol 25%, Act: acetona 25%, Et: etanol 25% e Me: metanol 25%. Método de extração - Bu: banho de ultrassom, Pu: ponteira ultrassônica, Sk: extração com agitação em *Shaker*, Fr: extração estática a frio.

O extrato utilizando água como solvente e empregando o banho ultrassônico (AgBu) apresentou o valor mais alto de compostos fenólicos totais ($10,65 \pm 0,005$ mg EAG/g), quando comparado a todos os outros métodos. Uma possível justificativa para esse resultado pode ser devida ao fenômeno de cavitação, onde a impulsão de bolhas de gás podem atingir a matriz sólida e conseguem causar a ruptura das células (ESCLAPEZ *et al.* 2011). Sendo observado que a extração com solvente aquoso puro, foi o melhor método para a extração dos compostos fenólicos. Demonstrando que o uso de solventes aquosos atribuem uma boa extração para esses compostos, devido a polaridade dos mesmos. Contrariamente, a menor concentração de compostos fenólicos obtida ($6,34 \pm 0,072$ mg EAG/g) foi alcançada utilizando-se o solvente metanol e a condição que empregava a ponteira ultrassônica (MePu).

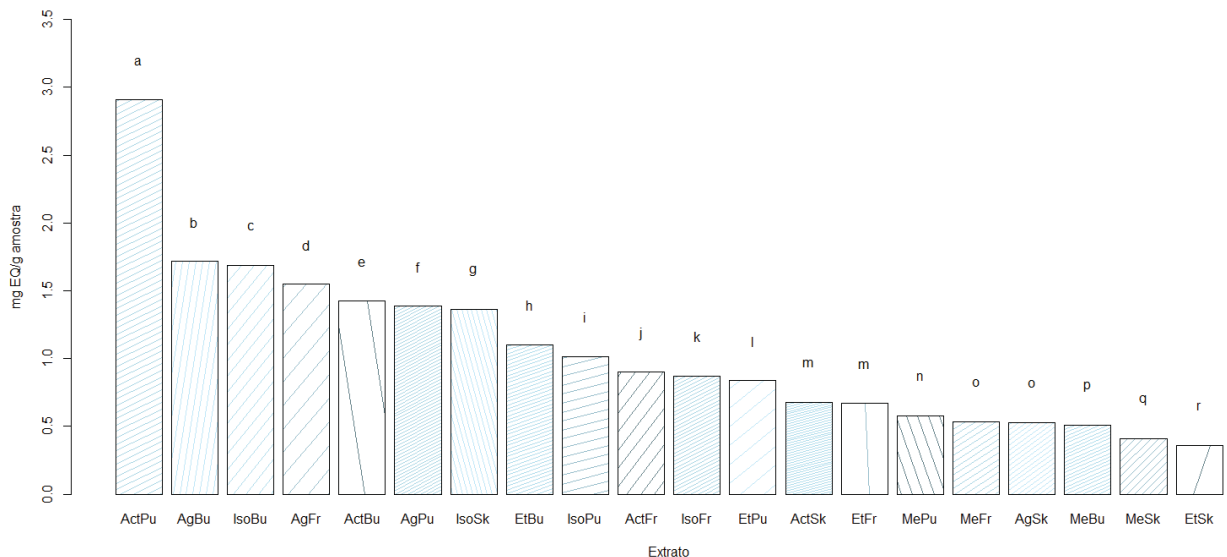
Acharya *et al.* (2015) realizaram análise qualitativa de compostos químicos a partir do extrato metanólico de *M. crassa* e determinaram o teor de fenólicos em $3,31 \pm 0,09$ mg de equivalente de ácido gálico/g de extrato. Khatua *et al.* (2017; 2018) utilizando como solvente extrator, metanol e etanol encontraram valores de $10,96 \pm 0,11$ e $12,58 \pm 0,57$ mg EAG/g, respectivamente. O mais interessante, é que a melhor

extração neste trabalho, utilizando como solvente água destilada, apresentou valores próximos aos valores encontrados por esses autores. Os teores de compostos fenólicos, foram determinados para outros gêneros de cogumelos, segundo Reis et al. (2012) extratos de *A. bisporus*, *P. ostreatus*, *P. eryngii* e *L. edodes*, apresentaram valores de 23,34, 12,54, 7,14 e 8,84 mg EAG/g extrato, respectivamente.

A concentração de flavonoides (GRÁFICO 2) também varia dependendo do solvente extrator e o conteúdo total de flavonoides não se correlaciona com a concentração fenólica. Assim, ActPu ($2,91 \pm 0,006$ mg EAQ/g) apresenta o maior teor e MeSk e EtSk apresentam o menor teor de flavonoides, $0,41 \pm 0,001$ e $0,36 \pm 0,003$ mg EAQ/g, respectivamente.

Acharya et al. (2015) determinaram os teores de flavonoides em extratos metanólicos de *M. crassa*. A análise de flavonoides apresentou valores de $3,53 \pm 0,13$ mg de equivalente de quercetina/g de extrato. Khatua et al. (2017; 2018) encontraram valores de $5,12 \pm 1,51$ e $10,95$ respectivamente. Palacios et al. (2011) determinaram valores baixos de flavonoides em *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius*, *Craterellus cornucopioides*, *Calocybe gambosa* e *Lactarius deliciosus* em torno de $0,02$ mg/g.

GRÁFICO 2 - FLAVONOIDES PRESENTES NOS EXTRATOS



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Solvente extrator - Ag: água destilada, Iso: isopropanol 25%, Act: acetona 25%, Et: etanol 25% e Me: metanol 25%. Método de extração - Bu: banho de ultrassom, Pu: ponteira ultrassônica, Sk: extração com agitação em *Shaker*, Fr: extração estática a frio.

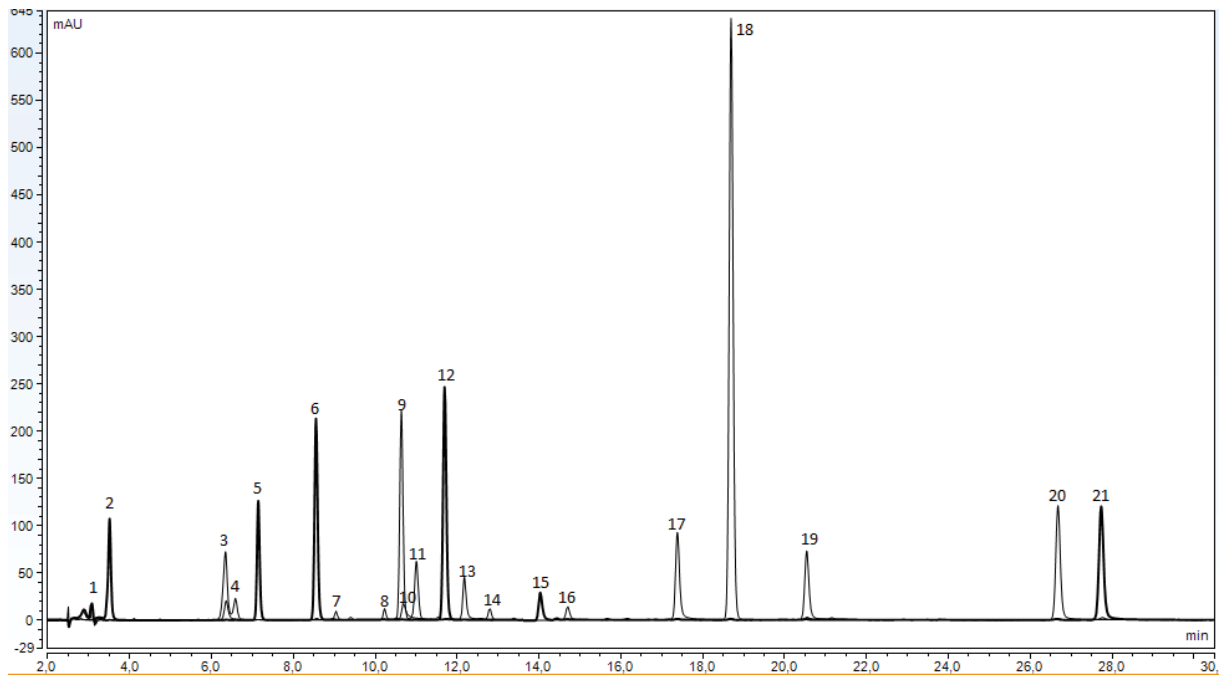
Extrações com solventes orgânicos polares tendem a recuperar maiores valores de compostos fenólicos, visto que cada solvente tem sua especificidade que podem alterar a transferência de elétrons e hidrogênios, das quais misturas aquosas com acetona, por exemplo, podem apresentar maior eficiência de extração (ROCKENBACH *et al.*, 2008). Devido a essa diversidade e variação do rendimento de extração de diferentes compostos, o desempenho dos solventes é avaliado com base na atividade antioxidante total dos extratos e não na contribuição individual de diferentes compostos. É importante considerar que diferentes métodos de extração e diferentes solventes irão expressar resultados diferentes, considerando que a matriz de extração também é relevante, uma vez que o solo, as condições climáticas e hídricas irão afetar a capacidade do cogumelo produzir esses compostos. A importância de determinar os maiores teores de compostos fenólicos, dependerá do solvente ideal, bem como do método de extração (ANTOLOVICH *et al.*, 2000).

4.7 COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS, DETECTADOS POR CLAE

Diversos estudos têm sido realizados com o intuito de identificar e isolar compostos bioativos. Muitos fatores podem afetar a eficiência da solubilidade e extração dos metabólitos secundários, por exemplo, tempo da extração, o tipo de solvente, a temperatura e a proporção de amostra utilizada (PENG *et al.*, 2020). Dessa forma, a escolha do solvente extrator é a chave para explorar essa área, pois tem efeito direto na classe de compostos que são extraídos.

Os resultados foram expressos em mg por grama de peso seco. No total 21 compostos de ácidos fenólicos, foram analisados, sendo eles: ácido fumárico, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido catequina, ácido caféico, ácido siríngico, isoflavona, rutina, ácido p-cumárico, ácido elágico, vanilina, ácido ferúlico, 3,5-dicafeoilquínico, hesperidina, miricetina, propilgalato, quercetina, ácido trans cinâmico, kaempferol, crisina e kaempferide foram analisados. A FIGURA 16 mostra o cromatograma dos padrões analisados.

FIGURA 16 - CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS ANALISADOS POR CLAE UV-Vis



FONTE: A autora (2022).

Dentre os compostos bioativos presentes nos cogumelos, os fenólicos se destacam. O número de padrões de compostos fenólicos utilizados e tempos de retenção estão descritos na TABELA 12.

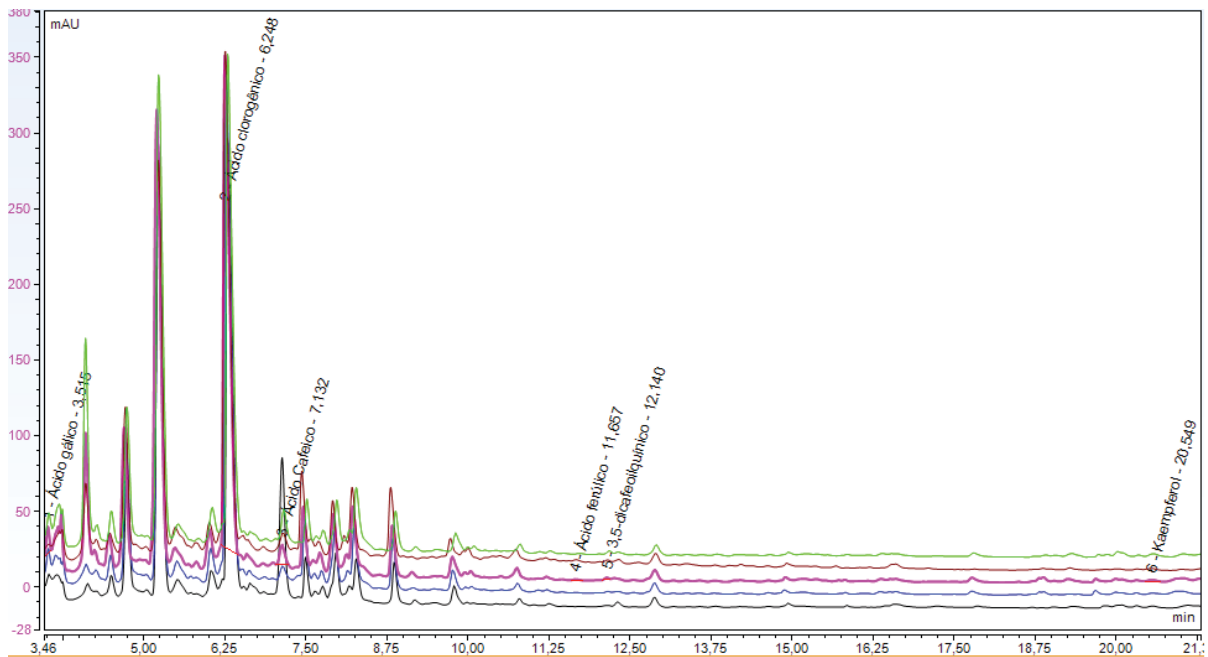
TABELA 12 - PADRÕES DE COMPOSTOS FENÓLICOS UTILIZADOS NA ANÁLISE POR CLAE UV-Vis

Ordem de eluição	Composto	Tempo de retenção (minutos)
1	Ácido fumárico	3,073
2	Ácido gálico	3,507
3	Ácido clorogênico	6,340
4	Catequina	6,582
5	Ácido cafeico	7,140
6	Ácido siríngico	8,549
7	Isoflavona	9,04
8	Rutina	10,224
9	Ácido p-cumárico	10,632
10	Ácido elágico	10,682
11	Vanilina	10,999
12	Ácido ferúlico	11,690
13	3,5-dicafeoilquínico	12,174
14	Hesperidina	12,790
15	Miricetina	14,049
16	Propilgalato	14,699
17	Quercetina	17,382
18	Ácido trans cinâmico	18,690
19	Kaempferol	20,540
20	Crisina	26,674
21	Kaempferide	27,734

FONTE: A autora (2022).

De acordo com os resultados obtidos, o maior teor de compostos fenólicos totais foi nos extratos MeFr (0,9723 mg/g), ActBu (0,9704 mg/g), ActPu (0,9395 mg/g), IsoBu (0,9097 mg/g) e ActFr (0,9083 mg/g), respectivamente. A FIGURA 17 mostra o cromatograma desses extratos.

FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS MeFr, ActBu, ActPu, IsoBu E ActFr ANALISADOS POR CLAE UV-Vis



FONTE: A autora (2022).

De todos os 21 padrões analisados, apenas ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, vanilina, ácido ferúlico, 3,5 dicafeoilquínico e kaempferol foram detectados e quantificados nos diferentes extratos de MT31, e estão sumarizados na TABELA 13.

TABELA 13 - COMPOSIÇÃO (mg/g de amostra) DOS ÁCIDOS FENÓLICOS DOS EXTRATOS ANALISADOS POR HPLC UV-Vis

	Compostos								Total
	Ácido gálico	Ácido clorogênico	Ácido cafeico	Ácido p-cumárico	Vanilina	Ácido ferúlico	3,5-dicafeoilquínico	Kaempferol	
AgBu	0,0061	0,6744	0,0065	ND	ND	0,0010	0,0008	0,0014	0,6838
AgPu	0,0156	0,6852	0,0522	ND	ND	0,0010	0,0010	0,0010	0,7103
AgSk	0,0155	0,4775	0,0318	0,0002	0,0004	0,0009	0,0008	0,0008	0,5483
AgFr	0,0062	0,6419	0,0131	ND	ND	0,0013	0,0008	0,0010	0,6830
IsoBu	0,0100	0,8820	0,0144	ND	ND	0,0007	0,0010	0,0028	0,9097
IsoPu	0,0019	0,8215	0,0180	ND	ND	0,0014	0,0011	0,0026	0,8428
IsoSk	0,0057	0,6808	0,0180	ND	0,0009	0,0017	0,0008	0,0062	0,7141
IsoFr	0,0074	0,8570	0,0219	ND	ND	0,0050	0,0010	0,0046	0,8930
ActBu	0,0126	0,9302	0,0249	ND	ND	0,0011	0,0014	0,0031	0,9704
ActPu	0,0018	0,9078	0,0224	ND	ND	0,0012	0,0013	0,0024	0,9395
ActSk	0,0098	0,6951	0,0382	ND	0,0007	0,0025	0,0033	0,0040	0,7380
ActFr	0,0093	0,8521	0,0060	ND	ND	0,0012	0,0018	0,0056	0,9083
EtBu	0,0095	0,8280	0,0061	ND	ND	0,0010	0,0008	0,0050	0,8502
EtPu	0,0034	0,8162	0,0058	ND	ND	0,0010	0,0009	0,0036	0,8313
EtSk	0,0052	0,5711	0,0040	ND	0,0007	0,0012	0,0006	0,0072	0,5911
EtFr	0,0039	0,8005	0,0379	ND	ND	0,0060	0,0010	0,0107	0,8206
MeBu	0,0067	0,7899	0,0352	ND	ND	ND	0,0010	0,0031	0,8387
MePu	0,0073	0,7750	0,1893	ND	ND	ND	0,0006	0,0032	0,8213
MeSk	0,0132	0,6986	0,1960	0,0002	0,0010	ND	0,0006	0,0033	0,9061
MeFr	0,0040	0,7677	0,0065	ND	0,0006	ND	0,0009	0,0032	0,9723

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Solvente extrator - Ag: água destilada, Iso: isopropanol 25%, Act: acetona 25%, Et: etanol 25% e Me: metanol 25%. Método de extração - Bu: banho de ultrassom, Pu: ponteira ultrassônica, Sk: extração com agitação em *Shaker*, Fr: extração estática a frio. ND: Não detectável.

Os compostos fenólicos, juntamente com outros compostos, atuam na atividade antioxidante. No entanto, o grau de inibição não se correlaciona nem com a quantidade de fenólicos totais nem com o conteúdo de flavonoides, o que pode indicar que cada composto fenólico ou um grupo deles deve possuir atividade antioxidante diferente. Na natureza, os polifenóis se encontram em uma classe difundida de metabólitos e, atualmente, existem um número crescente de publicações sobre a ação de compostos fenólicos em diferentes espécies de cogumelos.

O ácido gálico é um trihidroxiácido benzóico, e estudos demonstraram que o mesmo possui várias bioatividades, incluindo anticâncer, anti-HIV, anti-inflamatório, antimicrobiano e antifúngico. Além disso, o ácido gálico é usado na pele e indústria do couro como agente quelante e conservante em alimentos e bebidas (FERNANDES *et al.*, 2016). O extrato AgPu (0,0156 mg/g) tem o maior teor de ácido gálico, enquanto extrato ActPu (0,0018 mg/g) tem o menor teor de ácido gálico. Isso pode ser explicado devido ao ácido gálico ser um composto com características mais polares, dessa forma a água consegue ser mais eficiente que a acetona na extração, uma vez que a mesma é mais polar.

O ácido clorogênico tem sido amplamente estudado como nutracêutico para o tratamento da síndrome metabólica e distúrbios associados, como diabetes, obesidade, dislipidemia e hipertensão, com alguns resultados positivos. Foi sugerido que esse ácido reduz o risco de desenvolver diabetes tipo 2 pela ativação da adenosina monofosfato quinase (AMPK), na qual a AMPK atua como um interruptor entre o gasto de ATP e a produção de ATP. No entanto, a maioria dos estudos clínicos utilizou o café como fonte de 3-CQA, o que limitou o alcance e a interpretação dos resultados (SANTANA-GALVEZ *et al.*, 2017; SANTOS E LIMA, 2016). O maior teor de ácido clorogênico foi encontrado em ActBu (0,9302 mg/g), enquanto o menor teor foi em AgSk (0,4775 mg/g).

Sabe-se que o ácido cafeico possui atividades antioxidantes e antimicrobianas *in vivo*, que protege contra a aterosclerose e doenças cardiovasculares. Além disso, o ácido cafeico é usado como agente fotoprotetor (MAGNANI *et al.*, 2014). O teor de ácido cafeico foi quantificado em todos os extratos e variou de 0,0040 mg/g a 0,1960 mg/g.

O ácido p-cumárico é conhecido por exibir uma gama de bioatividades, incluindo antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, anti-úlceras, antiplaquetária e

anticancerígena, sendo encontrado na forma livre ou ligada (PEI *et al.*, 2016). O teor de ácido p-cumárico foi de 0,002 mg/g encontrado apenas nos extratos AgSk e MeSk.

A vanilina é utilizada como essência na indústria alimentícia e possui atividades antimicrobiana, anticancerígena e antioxidante (ASHRAF *et al.*, 2015) As quantidades mais baixas e mais altas de vanilina foram encontradas na faixa de 0,0004 a 0,0010 mg/g. Esses valores foram quantificados em AgSk e MeSk, respectivamente.

Estudos indicaram que o ácido ferúlico possui atividades anti-ateroscleróticas e antioxidantes. Além de suas propriedades biológicas, ele possui propriedades protetoras contra a doença de Alzheimer, doenças inflamatórias, diabetes e hipertensão (ZHAO *et al.*, 2008). Os teores de ácido ferúlico dos extratos variaram de 0,0009 a 0,0060 mg/g. O mais baixo e o mais alto nível de ácido ferúlico foi observado em AgSk e EtFr, respectivamente.

Em humanos, o 3,5-dicafeoilquínico têm uma ampla gama de benefícios potenciais com aplicações terapêuticas. Foi relatado que esse composto exibe propriedades neuroprotetoras em células MC65 e SH-SY5Y. Isso foi associado ao aumento da expressão de Nrf2 e seus genes-alvo. O 3,5-dicafeoilquínico também aumentou a respiração mitocondrial e a expressão de genes mitocondriais que codificam enzimas na cadeia de transporte de elétrons, além de apresentar melhora nos déficits de aprendizado e memória no modelo de envelhecimento do camundongo SAMP8 (GRAY *et al.*, 2015; SASAKI *et al.*, 2015). As quantidades mais baixas e mais altas de 3,5-dicafeoilquínico foram encontradas na faixa de 0,0006 a 0,0033 mg/g. Sendo o extrato ActSk apresentando o maior valor.

O kaempferol possui bioatividade promissora, sendo que pode reduzir a oxidação lipídica e tem a capacidade de prevenir e proteger danos a estrutura celular (BANGAR *et al.*, 2022). O teor de kaempferol foi detectado para todos os extratos, variando de 0,008 a 0,0107mg/g.

Para espécies do gênero *Macrocybe*, foram encontrados, quatro estudos realizados pelos mesmos autores, empregando a técnica de cromatografia líquida. Khatua *et al.* (2014) detectaram quatro compostos no extrato etanólico de *M. crassa*, sendo eles o ácido vanílico (0,41 mg/g), ácido p-cumárico(0,04 mg/g), ácido cinâmico (0,16 mg/g) e pirogalol (0,68 mg/g). Acharya *et al.* (2015) utilizando extrato metanólico de *M. crassa* traçaram o perfil cromatográfico, porém não apresentaram a identificação desses picos. Khatua *et al.* (2017) a partir de extrato metanólico de *M.*

lobayensis identificaram e quantificaram ácido p-hidroxibenzóico (0,04 mg/g), ácido p-cumárico (0,06 mg/g), ácido salicílico (0,26 mg/g), ácido cinâmico (0,19 mg/g) e pirogalol (8,04 mg/g), entre eles, o pirogalol foi apontado como constituinte majoritário e apresentado aproximadamente oito vezes superior ao ácido salicílico, o segundo composto mais abundante. Khatua et al. (2018) também avaliou os compostos presentes no extrato etanólico de *M. lobayensis* e encontraram pirogalol (4,72 mg/g), ácido cinâmico (0,25 mg/g), ácido p-cumárico (0,08 mg/g) e ácido p-hidroxibenzóico (0,06 mg/g).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Em conclusão, esse trabalho permitiu verificar que os diferentes extratos obtidos do basidioma de *M. titans* apresentam atividade antimicrobiana acentuada e características antioxidantes consideráveis. Este potencial bioativo pode ser atribuído a diferentes classes de compostos químicos presentes nos diferentes extratos, ou às interações entre os diferentes compostos. Investigações adicionais são necessárias para avaliar e confirmar as atividades antimicrobianas dos extratos contra uma gama maior de microrganismos patogênicos, assim como, para se atribuir um determinado efeito a uma molécula ou grupo de moléculas específicas. Para essa finalidade, é necessária a purificação gradual de cada um dos extratos e testes biológicos com as diferentes frações obtidas.

A proposta inicial deste trabalho foi o estudo dos PAMs, através de análises proteômicas (por SDS-PAGE) e de transcrição gênica (por RT-qPCR), mas os resultados apresentados ainda são preliminares. No entanto, ambas as metodologias foram consideradas essenciais para a continuação de análises futuras. Pretende-se, posteriormente, otimizar o desenho e a temperatura de anelamento dos *primers* utilizados nesse trabalho para a técnica de RT-qPCR. Quanto às frações de proteínas extraídas, pretende-se realizar análise por eletroforese bidimensional, para se determinar o pI e massa molecular das proteínas, para extratos proteicos obtidos de micélios de *M. titans* após desafio microbiano, além da separação de proteínas menores (peptídeos), utilizando colunas de *cut-off* de massa molecular. Após essas análises, pretende-se realizar a espectrometria de massas, para a verificação do perfil de proteínas/peptídeos diferentemente expressos.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, K.; KHATUA, S.; SAHID, S. Pharmacognostic standardization of *Macrocybe crassa*: An imminent medicinal mushroom. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 8, n. 7, p. 860-866, 2015.
- AYALA, E; SMITH, M, E. *Macrocybe titans*: The Mushroom Giant of the Western Hemisphere: PP356, 2/2020. **EDIS**, v. 2020, n. 2, 2020.
- ALVES, M. J.; FERREIRA, I. C.; DIAS, J.; TEIXEIRA, V.; MARTINS, A.; PINTADO M. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. **Planta Medica**, v. ;78, n. 16, p. 1707-1718, 2012.
- ANTOLOVICH, M. et al. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, v. 125, n. 5, p. 989-1009, 2000.
- ASHRAF, Z et al. Kinetic and in silico studies of novel hydroxy-based thymol analogues as inhibitors of mushroom tyrosinase. **European journal of medicinal chemistry**, v. 98, p. 203-211, 2015.
- BADALYAN, S.M. Potential of Mushroom Bioactive Molecules to Develop Healthcare Biotech Products. In Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8), New Delhi, India, 19–22 November 2014; **Yugantar Prakashan Pvt. Ltd.**: New Delhi, India, 2014; pp. 373–378.
- BAKER, J.R.; KIM, J.-S.; PARK, S.-Y. Composition and proposed structure of a water-soluble glycan from the Keumsa Sangwhang mushroom (*Phellinus linteus*). **Fitoterapia** 2008, 79, 345–350.
- BANGAR, S, P. et al. Kaempferol: A flavonoid with wider biological activities and its applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-25, 2022.
- BARROS, L., DUENAS, M., FERREIRA, I.C.F.R., BAPTISTA, P., SANTOS-BUELGA, C., 2009. Phenolic acids determination by HPLC–DAD–ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. **Food Chem. Toxicol.** 47, 1076–1079.
- BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. Antioxidantes: **Princípios e Métodos Analíticos**. Appris: Curitiba, 1ª ed., 141 p., 2015.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature reviews microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238, 2005.
- CAETANO, I. S.; QUEIROZ, E. S. M. Peptídeos Antimicrobianos como Ferramenta Biotecnológica. **Artigo de Revisão**, p. 1-7. 2014.
- CHUDZIK, G. **EDUCAÇÃO NA ERA DO HIPERTEXTO: uma experiência diferenciada na Biologia**. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ensino de Ciências Humanas, Sociais e da Natureza) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4), 2003.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- CHU, K.T.; XIA, L.; NG, T.B. Pleurostrin, an antifungal peptide from the oyster mushroom. **Peptides**, n. 26, v. 11, p. 2098-2103, 2005.
- DELONG, J.; BREWER, M. T. *Macrocybe titans*: Largest Mushroom Species in the Western Hemisphere Found Growing in Georgia. **University of Georgia Extension**, 2013.

- DEVEAU, A.; BARRET, M.; DIEDHIOU, A. G.; LEVEAU, J.; DE BOER, W.; MARTIN, F. FREY K. P. Pairwise transcriptomic analysis of the interactions between the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N and three beneficial, neutral and antagonistic soil bacteria. **Microbial ecology**, v. 69, n. 1, p. 146-159, 2015.
- DOS SANTOS, A. L. *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.
- DREVETS, D. *Listeria monocytogenes*: Epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 151–165, 2008.
- DROCE, A.; SØRENSEN, J. L.; GIESE, H.; SONDERGAARD, T. E. Glass bead cultivation of fungi: Combining the best of liquid and agar media. **Journal of microbiological methods**, v. 94, n. 3, p. 343-346, 2013.
- ERJAVEC, J.; KOS, J.; RAVNIKAR, M.; DREO, T.; SABOTIĆ, J. Proteins of higher fungi—from forest to application. **Trends Biotechnol.** 2012, 30, 259–273.
- ESCLAPEZ, M. D. *et al.* Ultrasound-assisted extraction of natural products. **Food Engineering Reviews**, v. 3, n. 2, p. 108-120, 2011.
- ESSIG, A.; HOFMANN, D.; MÜNCH, D.; GAYATHRI, S.; KÜNZLER, M.; KALLIO, P. T.; AEBI, M. Copsin, a novel peptide-based fungal antibiotic interfering with the peptidoglycan synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M114. 599878, 2014.
- FAN, M. J., LIN, Y. C., SHIH, H. D., YANG, J. S., LIU, K. C., YANG, S. T. Crude extracts of *Agaricus brasiliensis* induce apoptosis in human oral cancer CAL 27 cells through a mitochondria-dependent pathway. **In Vivo Journal**, v. 25, p. 355–366, 2011.
- FAN, X., XU, W., GAO, W., JIANG, X., & WU, G. A facile method to classify clinic isolates with a turn-off sensor array based on graphene oxide and antimicrobial peptides. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 307, p. 127607, 2020.
- FERNANDES, F. H. A.; SALGADO, H. R. N. Gallic acid: review of the methods of determination and quantification. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 46, n. 3, p. 257-265, 2016.
- FIGUEIREDO, E. A. P. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: frequency of resistance to multiple drugs and cross-resistance between antimicrobials in Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, p. 421-427, 2007.
- FONSECA, M. D. P.; OLIVEIRA, C. C. L. S.; SOUZA, A. Q. L.; GIBERTONI, T. B.; SOUZA, A. D. L.; RODRIGUES, M. O.; PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L. Diversidade de Macrofungos da Família Polyporaceae (Basidiomycotina) no Estado do Amazonas, 2015.
- GAO, W., SUN, Y., CHEN, S., ZHANG, J., KANG, J., WANG, Y. Mushroom lectin enhanced immunogenicity of HBV DNA vaccine in C57BL/6 and HBsAg-transgenic mice. **Vaccine Journal**, v. 31, p. 2273–2280, 2013.
- GEISEN, R. P. *nalgiovensis* carries a gene which is homologous to the *paf* gene of *P.chrysogenum* which codes for an antifungal peptide. **International journal of foodmicrobiology**, v. 62, n. 1-2, p. 95-101, 2000.
- GENG, X., TIAN, G., ZHANG, W., ZHAO, Y., ZHAO, L., WANG, H. A tricholoma matsutake peptide with angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. **Scientific Reports**, v. 6, p. 24130, 2016.
- GKARMIRI, K.; FINLAY, R. D.; ALSTRÖM, S.; THOMAS, E.; CUBETA, M. A.; HÖGBERG, N. Transcriptomic changes in the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* AG-3 in response to the antagonistic bacteria *Serratia proteamaculans* and *Serratia plymuthica*. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 1-17, 2015.

GODINHO, V. M.; FURBINO, L. E.; SANTIAGO, I. F.; PELLIZZARI, F. M.; YOKOYA, N. S.; PUPO, D.; ALVES, T. M. A.; JUNIOR, P. A. S.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L.; CANTRELL, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **The ISME Journal**, v. 7, p. 1434–1451, 2013.

GOMES, T.A.T., ELIAS, W.P., SCALETSKY, I.C.A., GUTH, B.E.C., FALCÃO, J., PIAZZA, R.M.F., FERREIRA, L.C., MARTINEZ, M.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Medical Microbiology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p.3-30, 2016.

GRAY NE, SAMPATH H, ZWEIG JA, QUINN JF & SOUMYANATH A (2015) *Centella asiatica* attenuates amyloid- β -induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 45, 933–946.

GUIMARÃES, L. C. **Métodos de preservação de fungos potencialmente toxigênicos**. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de Lavras, Lavras, 2011.

GUN LEE, D.; SHIN, S. Y.; MAENG, C. Y.; JIN, Z. Z.; KIM, K. L.; HAHM, K. S. Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 263, n. 3, p. 646-651, 1999.

HALL, Tom A. et al. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999. p. 95-98.

HAJJI, M.; JELLOULI, K.; HMIDET, N.; BALTI, R.; SELLAMI, K. A.; NASRI, M. A HIGHLY THERMOSTABLE ANTIMICROBIAL PEPTIDE FROM ASPERGILLUS CLAVATUS ES1: BIOCHEMICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION. **JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY**, V. 37, N. 8, P. 805-813, 2010.

HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551, 2006.

HARADA, T. N. Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em *Artemia salina* Leach e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de produtos naturais. Tese de mestrado. 2009.

HUAN, Y.; KONG, Q.; MOU, H.M.; YI, H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, 2021.

JASIM, S. T., SAMI, A. Article Review: *Klebsiella Pneumonia*: epidemiology, virulence factors and treatment. **Journal of University of Anbar for Pure Science**, v. 14, n. 2, p. 5–10, 2020.

JAWORSKA, G.; POGON, K.; SKRZYPCZAK, A.; BERNAS, E. Composition and antioxidante properties of wild mushrooms *Boletus edulis* and *Xerocomus badius* prepared consumption. *Journal of Food Science and Technology*, 2015.

P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KHATUA, S.; ACHARYA, K. Antioxidant and Antimicrobial Potentiality of Quantitatively Analysed Ethanol Extract from *Macrocybe crassa*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 29, n. 2, p. 53-60, 2014.

KHATUA, S; GHOSH, S; ACHARYA, K. Chemical composition and biological activities of methanol extract from *Macrocybe lobayensis*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 10, p. 144-151, 2017.

KHATUA, S.; ACHARYA, K. Functional Ingredients and Medicinal Prospects of Ethanol Extract from *Macrocybe lobayensis*. **Pharmacognosy Journal**, v. 10, n. 6, p.1154-1158, 2018.

- KIM, H. M.; KANG, J. S.; KIM, J. Y.; PARK, S.-K.; KIM, H. S.; LEE, Y. J. Evaluation of antidiabetic activity of polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* in non-obese diabetic mouse. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 72–78, 2010.
- KIM, S.; SO, H. M.; ROH, H. S.; KIM, J.; YU, J. S.; LEE, S.; SEOK, S.; PANG, C. H.; BAEK, K. H.; KIM, K. H. RSC Adv. 2017, 7, 35297-35304.
- KIRK, P.M., CANNON, P.F., DAVID, J.C., STALPERS, J.A. **Dictionary of Fungi**. 10. ed. CABI Publishing, United Kingdom, 2008.
- KOMBRINK, A.; TAYYROV, A.; ESSIG, A.; STÖCKLI, M.; MICHELLER, S.; HINTZE, J.; VAN HEUVEL, Y.; DÜRIG, N.; LIN, C. W.; KALLIO, P. T.; AEBI, M.; KÜNZLER, M. Induction of antibacterial proteins and peptides in the ophiophilous mushroom *Coprinopsis cinerea* in response to bacteria. **ISME Journal**, v. 13, n. 3, p. 588-602, 2019.
- KOSANIĆ, M.; RANKOVIĆ, B.; DAŠIĆ, M. Mushrooms as Possible Antioxidant and Antimicrobial Agents Iran. Journal of Pharmacological Research. 2012; 11(4):1095–1102.
- KUMAR, H. et al. Phenolic compounds and their health benefits: A review. J Food Res Technol, v. 2, p. 46-59, 2014.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018.
- LACADENA, J.; DEL POZO, A. M.; GASSET, M.; PATINO, B.; CAMPOS-OLIVAS, R.; VÁZQUEZ, C.; GAVILANES, J. G. Characterization of the Antifungal Protein Secreted by the Mould *Aspergillus giganteus*. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 324, n. 2, p. 273-281, 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LAMACCHIA, M.; DYRKA, W.; BRETON, A.; SAUPE, S. J.; PAOLETTI, M. Overlapping *Podospira anserina* transcriptional responses to bacterial and fungal non self indicate a multilayered innate immune response. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 471, 2016.
- LAVI, I.; FRIESEM, D.; GERESH, S.; HADAR, Y.; SCHWARTZ, B. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. *Cancer Lett.* 2006, 244, 61–70.
- MAGNANI, C. et al. Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics. **Analytical Methods**, v. 6, n. 10, p. 3203-3210, 2014.
- MAHLAPUU, M.; HÅKANSSON, J.; RINGSTAD, L.; BJÖRN, C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 194, 2016.
- MARTÍNEZ-RUIZ, A.; MARTÍNEZ DEL POZO, A.; LACADENA, J.; MANCHEÑO, J. M.; OÑADERRA, M.; GAVILANES, J. G. Characterization of a natural larger form of the antifungal protein (AFP) from *Aspergillus giganteus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1340, n. 1, p. 81-87, 1997.
- MARX, F.; HAAS, H.; REINDL, M.; STÖFFLER, G.; LOTTSPREICH, F.; REDL, B. Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum paf* gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. **Gene**, v. 167, n. 1-2, p. 167-171, 1995.
- MATIJAŠEVIĆ, D. et al. The antibacterial activity of *Coriolus versicolor* methanol extract and its effect on ultrastructural changes of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Enteritidis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1226, 2016.

MILHORINI, S. S.; SMIDERLE, F. R.; BISCAIA, S. M. P.; ROSADO, F. R.; TRINDADE, E. S.; IACOMINI, M. Fucogalactan from the giant mushroom *Macrocybe titans* inhibits melanoma cells migration. **Carbohydrate polymers**, v. 190, p. 50-56, 2018.

MILHORINI, S. S.; SIMAS, F. F.; SMIDERLE, F. R.; DE JESUS, L. I.; ROSADO, F. R.; LONGORIA, E. L.; IACOMINI, M. β -Glucans from the giant mushroom *Macrocybe titans*: Chemical characterization and rheological properties. **Food Hydrocolloids**, v. 125, p. 107392, 2022.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.

MIRHENDI, H.; MAKIMURA, K.; KHORAMIZADEH, M.; YAMAGUCHI, H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 47, n. 3, p. 225-229, 2006.

MONTARELO, D. P., VIEDMA, E., LARROSA, N., GONZÁLEZ, C. G., GOPEGUI, E. R. GALLEGU, I. M., JUAN, R. S., HIDALGO, N. F., ALMIRANTE, B., CHAVES, F. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteremia: association of molecular factors with the source of infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–11, 2018.

MURGO, A.; CANNON, D.J.; BLATNER, G.; CHESON, B. D. Clinical trials referral resource. *Clinical trials of MGI-114 Oncology (Williston Park, NY)*, v. 13, n. 233, p. 237-238, 1999.

MYGIND, P. H.; FISCHER, R. L.; SCHNORR, K. M.; HANSEN, M. T.; SÖNKSEN, C. P.; LUDVIGSEN, S.; KRISTENSEN, H. H. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. **Nature**, v. 437, n. 7061, p. 975, 2005.

NIU, Y.-C.; LIU, J.-C.; ZHAO, X.-M.; CAO, J. A low molecular weight polysaccharide isolated from *Agaricus Blazei* Murill (LMPAB) exhibits its anti-metastatic effect by down-regulating metalloproteinase-9 and up-regulating Nm23-H1. *Am. J. Chin. Med.* 2009, 37, 909–921.

OEEMIG, J. S.; LYNGGAARD, C.; KNUDSEN, D. H.; HANSEN, F. T.; NØRGAARD, K. D.; SCHNEIDER, T., WIMMER, R. Eurocin, a new fungal defensin: structure, lipid binding and its mode of action. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M112. 382028, 2012.

OKANO, A; ISLEY, N. A.; BOGER, D. L. Peripheral modifications of [Ψ [CH₂NH] Tpg₄] vancomycin with added synergistic mechanisms of action provide durable and potent antibiotics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 26, p. E5052-E5061, 2017.

PALACIOS, I. et al. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 674-678, 2011.

PATEL, S.; GOYAL, A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: A review. *3 Biotech* 2012, 2, 1–15.

PEGLER, D. N., LODGE, D. J., NAKASONE, K. K. The pantropical genus *Macrocybe* gen. nov. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 494-504, 1998.

PENG, W. L.; MOHD-NASIR, H; SETAPAR, S. H. M.; AHMAD, A.; LOKHAT, D. Optimization of process variables using response surface methodology for tocopherol extraction from Roselle seed oil by supercritical carbon dioxide. **Industrial Crops & Products**, v. 143, 2020.

PEI, K. et al. p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 9, p. 2952-2962, 2016.

QUCHI, Y.; YOSHIKAWA, E.; FUTATSUBASHI, M.; YAGI, S.; UEKI, T.; NAKAMURA, K. Altered brain serotonin transporter and associated glucose metabolism in Alzheimer disease. **J. Nucl. Med.** 2009, 50, 1260–1266.

RAMIREZ, N. A.; NIVEIRO, N.; MICHLIG, S. A.; POPOFF, O. S. First Record of *Macrocybe titans* (*Tricholomataceae, Basidiomycota*) in Argentina. **Check List**, v. 13, n. 4, 153–158. 2017.

RAVICHANDRAN, G.; KUMARESAN, V.; ARASU, M. V.; AL-DHABI, N. A.; GANESH, M. R.; MAHESH, A.; AROCKIARAJ, J. Pellino-1 derived cationic antimicrobial prawn peptide: bactericidal activity, toxicity and mode of action. **Molecular immunology**, v. 78, p. 171-182, 2016.

REIS, F. S. D. **Crescimento e caracterização química de fungos micorrízicos e plantas de Pinus pinaster na presença e ausência do simbiote**. 85 f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, 2010.

REIS, F. S.; MARTINS, A.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between *in vivo* and *in vitro* samples. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1201-1207, 2012.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 28 (supl.), p. 238-244, 2008.

ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Antimicrobial peptides in crustaceans. Invertebrate. **Survival Journal**, v. 7, n. 2, p. 262-284, 2010.

SANTANA-GALVEZ J, CISNEROS-ZEVALLOS L & JACOBO-VEL AZQUEZ DA (2017) Chlorogenic acid: recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. **Molecules**, 22, 358.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4 p. 406-425, 1987.

SANTOS RMM & LIMA DRA (2016) Coffee consumption, obesity and type 2 diabetes: a mini-review. **European Journal of Nutrition**, 55, 1345–1358.

SARIKAYA, S.B.O.; GULCIN, I. Radical scavenging and antioxidant capacity of serotonin. **Curr. Bioact. Compd.** 2013, 9, 143–152.

SASAKI K, HAN J, SHIMOZONO H, VILLAREAL MO & ISODA H (2013) Caffeoylquinic acid-rich purple sweet potato extract, with or without anthocyanin, imparts neuroprotection and contributes to the improvement of spatial learning and memory of SAMP8 mouse. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 61, 5037–5045.

SCHNEIDER, T.; KRUSE, T.; WIMMER, R.; WIEDEMANN, I.; SASS, V.; PAG, U.; KRISTENSEN, H. H. Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor Lipid II. **Science**, v. 328, n. 5982, p. 1168-1172, 2010.

SCHOCH, Conrad L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SCHUMANN, U., SMITH, N. A., & WANG, M. B. A fast and efficient method for preparation of high-quality RNA from fungal mycelia. **BMC Research notes**, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2013.

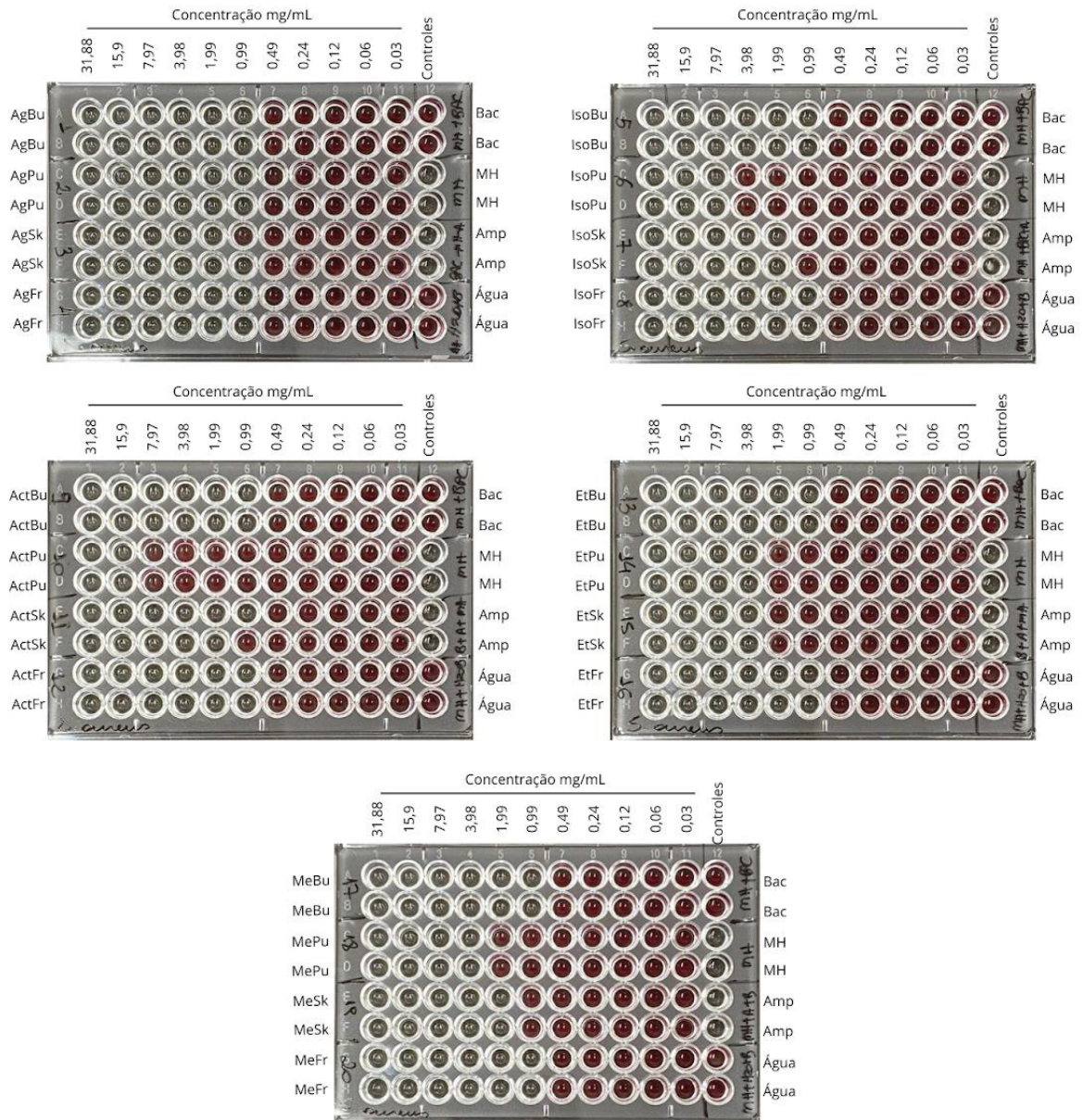
SHEN, B.; SONG, J.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y.; LIU, G.; LI, X.; WU, Y. Triintsin, a human pathogenic fungus-derived defensin with broadspectrum antimicrobial activity. **Peptides**, v. 107, p. 61-67, 2018.

SHIGESUE, K.; KODAMA, N.; NANBA, H. Effects of maitake (*Grifola frondosa*) polysaccharide on collagen-induced arthritis in mice. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 84, p. 293–300, 2000. SINGDEVSACHAN, S. K.; AUROSHREE, P.; MISHRA, J.; BALIYARSINGH, B.; TAYUNG, K.;

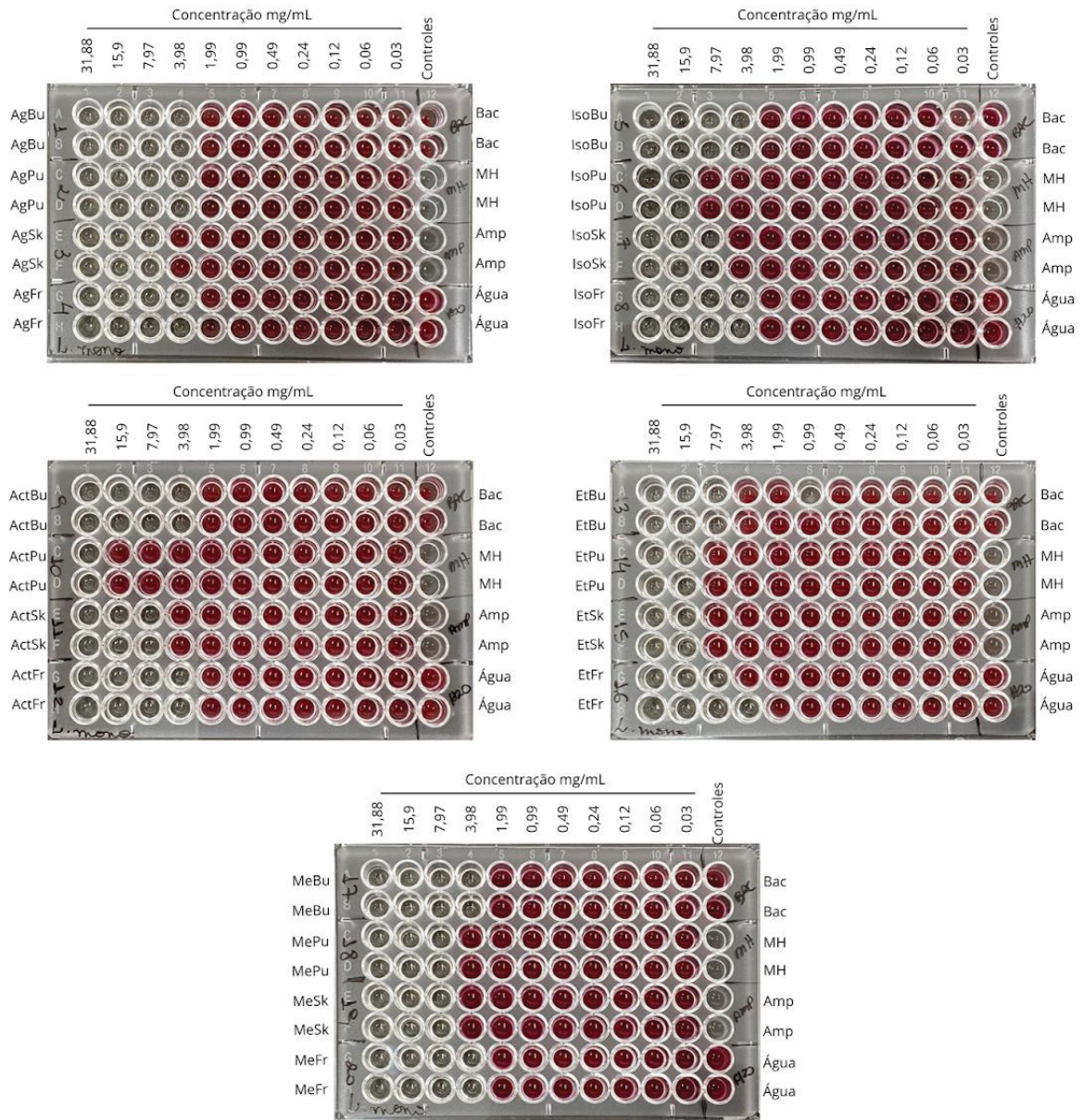
- SKOURI-GARGOURI, H.; GARGOURI, A. First isolation of a novel thermostable antifungal peptide secreted by *Aspergillus clavatus*. **Peptides**, v. 29, n. 11, p. 1871-1877, 2008.
- TACCONELLI, E. et al. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organization, v. 27, p. 318-327, 2017.
- TAMURA K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v. 101, p. 1030-11035, 2004.
- TASSANAKAJON, A.; SOMBOONWIWAT, K.; SUPUNGUL, P.; TANG, S. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. **Fish & shellfish immunology**, v. 34, n. 4, p. 954- 967, 2013.
- TEIXEIRA, V.; FEIO, M. J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in lipid research**, v. 51, n. 2, p. 149-177, 2012.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- VALVERDE, M. E.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T.; PAREDES-LÓPEZ, O. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. **International Journal of Microbiology**, v. 2015, p. 1-14, 2015.
- VENTURINI, M. E., RIVERA, C.S., GONZALEZ, C., BLANCO, D. Antimicrobial activity of extracts of edible wild and cultivated mushrooms against foodborne bacterial strains. *Journal of Food Protection*, v. 71, n. 8, p. 1701–1706, 2008.
- VETCHINKINA, E.; LOSHCHININA, E.; KUPRYASHINA, M.; BUROV, A.; PYLAEV, T.; NIKITINA, V. Green synthesis of nanoparticles with extracellular and intracellular extracts of basidiomycetes. **PeerJ - The Journal of Life and Environmental Sciences**, 2018.
- WANG, G. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. **Methods in Molecular Biology**, v. 1268, p. 43–66, 2015.
- WASSER, S. P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1323-1332, 2011.
- WHITTAKER, R.H. New concepts of Kingdoms of organisms. **Science**, v. 163, p. 150-160, 1969.
- WISNIEWSKI, A. C.; DE ALMEIDA, M. A. L.; PALMAS, M. B.; TAVARES, L. B. B. Produção de enzimas amilolíticas por *Macrocybe titans* em resíduo do processamento de cerveja. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 3, p. 185-293, 2010.
- YANGA, X., LAIB, Y., LIA, C., YANGA, J., JIAA, M., SHENG, J. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from lower respiratory tract of ICU patients. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 2 p. 351–360, 2021.
- ZHANG, G.-L.; WANG, Y.-H.; NI, W.; TENG, H.-L.; LIN, Z.-B. Hepatoprotective role of *Ganoderma lucidum* polysaccharide against BCG-induced immune liver injury in mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 8, p. 728–733, 2002.
- ZEILINGER, S.; GUPTA, V. K.; DAHMS, T. E.; SILVA, R. N.; SINGH, H. B.; UPADHYAY, R. S, et al. Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. **FEMS Microbiololy Reviews**, v. 40, p. 182-207, 2016.
- ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 691-702, 2008.
- ZHU, S. et al. Dermatophytic defensin with antiinfective potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 22, p. 8495-8500, 2012.

ZUCCA, M.; SCUTERA, S.; SAVOIA, D. Antimicrobial peptides: new frontiers in the therapy of infections. Drug Development - A Case Study Based Insight into Modern Strategies. **INTECH Open Access Publisher**, 6: p.123 – 164. 2011.

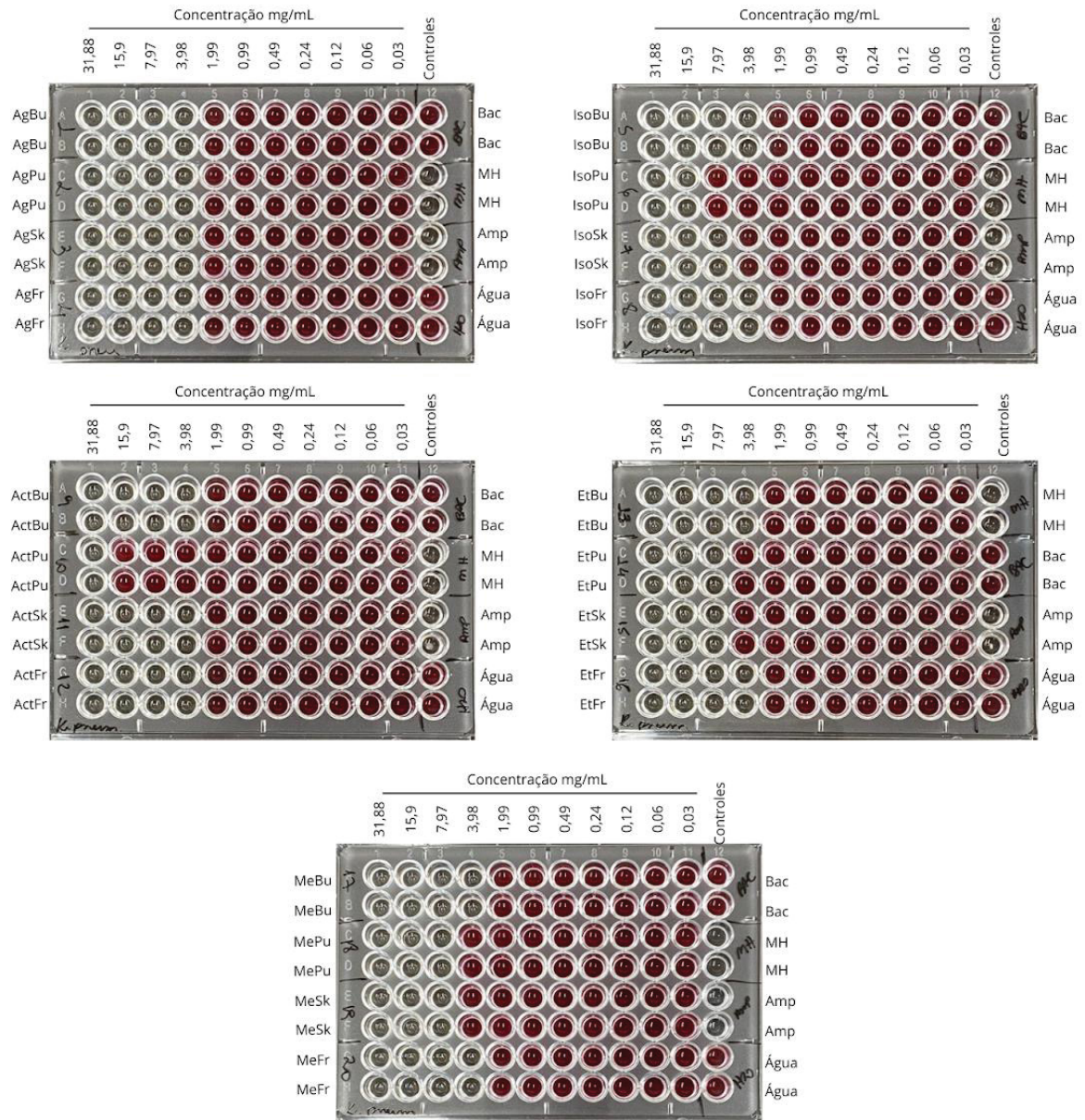
APÊNDICE 1 – RESULTADOS DO TESTE CIM EM DUPLICATA UTILIZANDO *S. aureus*



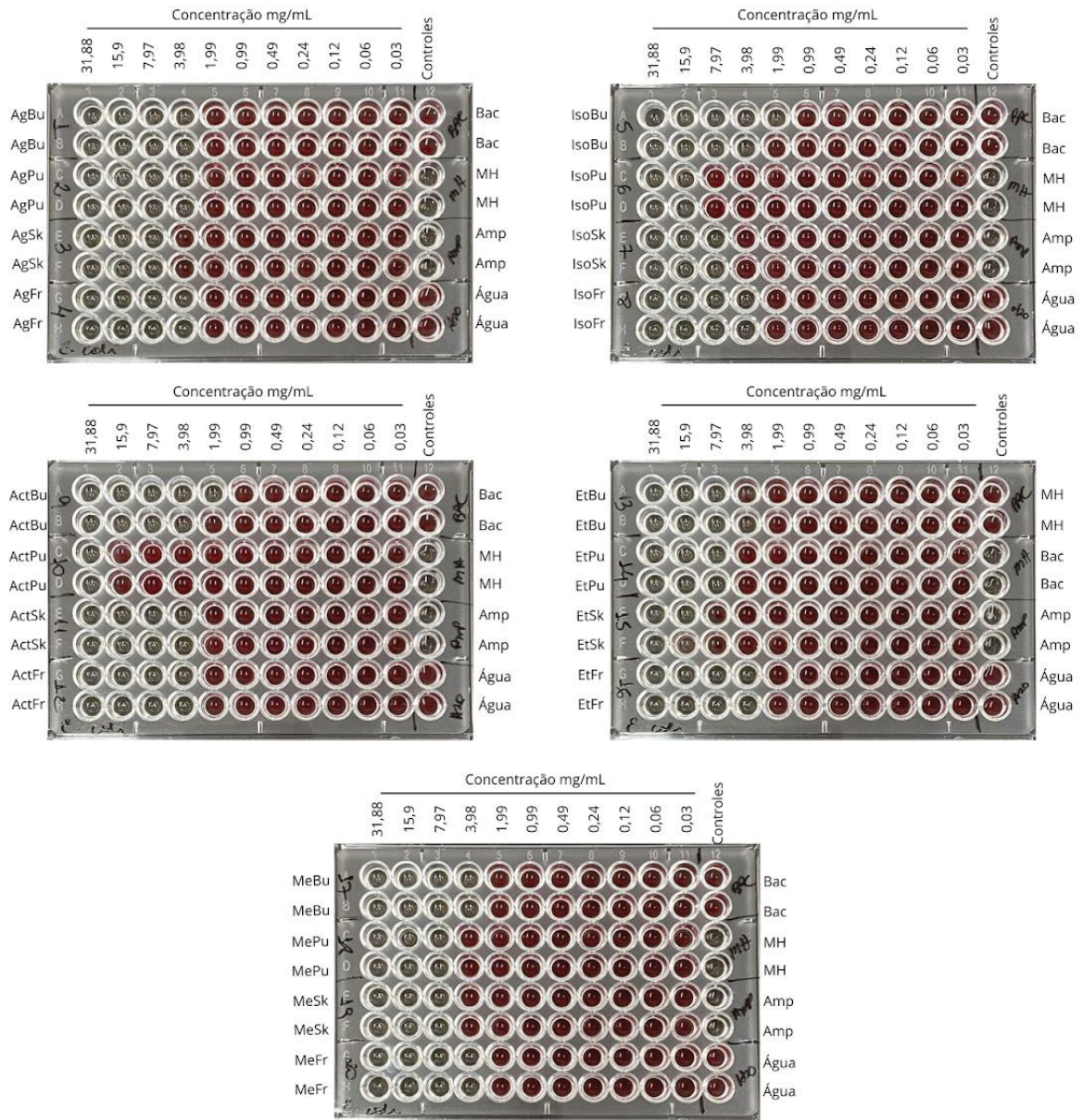
APÊNDICE 2 – RESULTADOS DO TESTE CIM EM DUPLICATA UTILIZANDO *L. monocytogenes*



APÊNDICE 3 – RESULTADOS DO TESTE CIM EM DUPLICATA UTILIZANDO *K. pneumoniae*



APÊNDICE 4 – RESULTADOS DO TESTE CIM EM DUPLICATA UTILIZANDO *E. coli*



APÊNDICE 5 – RESULTADOS DO TESTE CIM EM DUPLICATA UTILIZANDO *P. aeruginosa*

