

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**ISOLAMENTO DE MACROFUNGO ENCONTRADO NO VALE DO
PARAÍBA**

Dilênia Costa Gomes

**Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.**

Orientador(a):

Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado

São Paulo

2024

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1
AGRADECIMENTOS	2
RESUMO	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVO	11
3. MATERIAL E MÉTODOS:	11
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÃO(ÕES)	38
7. REFERÊNCIAS	39
ANEXO 1 – COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO	45

LISTA DE ABREVIATURAS

TCC	Trabalho de conclusão de curso
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
ITS	<i>Internal transcriber spacer</i>
TS	Triptona de soja
SD	Sabouraud
BD	Batata-dextrose
MNM	Merlin-Norkans modificado
LB	Luteria-Bertani
MH	Mueller-Hinton
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais e irmãos, que me deram todo o apoio possível e impossível durante a graduação e minha vida toda.

Agradeço ao Prof. Gabriel Padilla, por não desistir do meu projeto e por ter me dado uma experiência tão boa da ciência no Brasil.

Agradeço aos professores Wellington e Benedito por todo o conhecimento transmitido e pelo auxílio na execução do trabalho, assim como às professoras Lara, Luiziana e Katrine pelos conselhos, orientações e disposição.

Agradeço aos técnicos Leandro e Tatiana pela ajuda e orientações.

Agradeço aos colegas de laboratório Victor, Luiz, Gabrielli, Bianca e Raul, e todos os outros que me ajudaram na execução desse trabalho.

Agradeço à comunidade tradicional de Aparecida por me permitir realizar esta pesquisa.

Agradeço aos amigos Alice, Lara, Maria, Davi, Julia, Bianca, Danilo e Cotelenses que tornaram essa jornada infinitamente mais fácil.

E agradeço aos exes que foram enredo para a vida.

RESUMO

GOMES, D. C. **Isolamento de Macrofungo encontrado no Vale do Paraíba**. 2024. no. f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Palavras-chave: macrofungo, isolamento, cultivo, identificação

INTRODUÇÃO: Segundo a Organização Mundial de Saúde, microrganismos multirresistentes são uma das dez maiores ameaças à saúde pública global, sendo que uma das principais estratégias de combate destes se dá pela criação de novos fármacos; a busca por novas moléculas passa pelo estudo de produtos naturais, priorizando os produzidos por organismos isolados em regiões de alta biodiversidade, e/ou que possuam indícios de atividade, como por meio de conhecimento tradicional. Este trabalho visa identificar, isolar e avaliar a possível atividade biológica de um macrofungo utilizado como antibiótico por uma comunidade rural do Vale do Paraíba, especificamente em Aparecida (SP). **OBJETIVO:** Isolar, cultivar em laboratório e identificar por meio de sequenciamento genético e/ou análises morfológicas a espécie de macrofungo utilizada por moradores do Vale do Paraíba como antibiótico; avaliar atividade biológica contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, assim como leveduras, fungos filamentosos e oomicetos, por meio de antibiograma e teste de antagonismo. **MATERIAL E MÉTODOS:** inoculação de fragmentos do corpo de frutificação em quatro meios de cultura diferentes – batata dextrose, sabouraud dextrose, triptona de soja e Merlin-Norkans modificado – líquidos e sólidos, com realização de subculturas para separação de espécies indesejadas; extração de DNA por meio de kit comercial a partir dos corpos de frutificação e de cultivos específicos, seguido de realização de reação de PCR visando amplificar o fragmento ITS 1-4; envio do material para sequenciamento pelo Instituto do Genoma Humano e comparação da sequência obtida em bases de dados *GenBank* e *Mycobank* para identificação do gênero e/ou espécie; realização de cultivos controlados para realização de testes de antagonismo, assim como para extração e separação de metabólitos utilizados em testes de atividade antimicrobiana por meio de antibiograma. **RESULTADOS:** Foi possível realizar o isolamento do fungo. A extração de DNA e amplificação por PCR, embora bem-sucedidas, não auxiliaram na identificação da espécie. Os testes de atividade biológica indicaram atividade contra *Lasidiopodia theobromae* e *Phytophthium sp.* a partir do sobrenadante puro de um cultivo de 15 dias em meio Merlin-Norkans modificado líquido. **CONCLUSÃO:** Foi possível realizar o isolamento do fungo e observar diferentes características morfológicas, as quais indicam que o microrganismo é do gênero *Pisolithus*; ademais, identificou-se atividade biológica contra uma espécie de fungo e uma de oomiceto. Pesquisas futuras são necessárias para confirmar o gênero e identificar a espécie, assim como os compostos naturais responsáveis pela atividade encontrada, e avaliar presença de outras atividades biológicas.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Panorama geral

Os microrganismos multirresistentes são vistos como uma das dez maiores ameaças à saúde pública global (World Health Organization, 2021). Segundo o “Grupo de Coordenação Interagências sobre Resistência Antimicrobiana”, esses microrganismos podem vir a causar 10 milhões de mortes por ano a partir de 2050 (World Health Organization, 2019).

Há várias soluções para frear o surgimento e a propagação de cepas resistentes a antimicrobianos, como incentivo ao uso racional de medicamentos e aumento do acesso da população global a vacinas e saneamento básico (World Health Organization, 2021). Porém, é preciso também combater por meio de novos fármacos os microrganismos multirresistentes já disseminados (World Health Organization, 2021).

O desenvolvimento de novos antibióticos pode ser feito por meio de produtos naturais ou moléculas sintéticas. A primeira forma representa a grande parte dos medicamentos desenvolvidos nas últimas décadas; o estudo de Newman e Cragg, de 2020, demonstra que das drogas produzidas entre 1981 e 2019, 67% é derivada, replicada sinteticamente ou obtida diretamente de moléculas produzidas por seres vivos (Newman e Cragg, 2020, *Apud* Scheneider, 2021).

Alguns dos critérios para a escolha de organismos para a bioprospecção são o nível de exploração da região em que a espécie foi encontrada - há grande interesse, por exemplo, em microrganismos isolados do ártico e do mar profundo (Scheneider, 2021) - e a probabilidade de geração de novos compostos - como ocorre com as actinobactérias, das quais se originam 90% dos antibióticos comerciais (Jose e Jha, 2016).

O Brasil possui aproximadamente 20% da biodiversidade mundial em termos de flora e fauna (Mittermeier *et al.*, 2005). Dentre seus biomas, a Mata Atlântica se destaca como um dos maiores *hotspots* de biodiversidade do mundo, considerando o número de espécies endêmicas e a baixa conservação da área original, ocupando a quarta posição no *ranking* desenvolvido por Myers *et al.* em 2000. No que diz respeito a microrganismos, há uma clara defasagem

de estudos realizados no país, de forma que pouquíssimas espécies foram categorizadas e há muito a ser explorado (Bruce *et al.*, 2012).

Um dos filios mais úteis na área de produtos naturais é o filo Fungi, que demonstra produção de moléculas com grande espectro de atividade biológica - antibiótica, anti-inflamatória, imunomoduladora, anticoagulante, entre outros (Hyde, 2019).

Para escolher dentre as inúmeras espécies fúngicas encontradas no Brasil e na Mata Atlântica, uma estratégia é o uso de conhecimento popular ou tradicional, chamada de pesquisa etnodirigida (Albuquerque e Hanazaki, 2006).

Segundo Albuquerque e Hanazaki (2006):

“a abordagem etnodirigida consiste na seleção de espécies de acordo com a indicação de grupos populacionais específicos em determinados contextos de uso, enfatizando a busca pelo conhecimento construído localmente a respeito de seus recursos naturais e a aplicação que fazem deles em seus sistemas de saúde e doença”

Embora nem todo conhecimento popular ou tradicional demonstre veracidade em estudos laboratoriais, há evidências de que a seleção por etnofarmacologia é mais eficaz do que a seleção aleatória para obtenção de atividade biológica (Khafagi e Dewedar, 2000; Balick e Cox, 1997).

Estabelecendo-se assim a eficácia de pesquisas etnodirigidas e do estudo de fungos para produção de novos antibióticos, especialmente os encontrados em locais pouco explorados e com grande biodiversidade como a Mata Atlântica, chega-se ao objetivo deste TCC, que é estudar um macrofungo com potencial atividade biológica segundo o conhecimento tradicional da região rural do Vale do Paraíba, especificamente em Aparecida (SP).

1.2 Informações sobre o fungo

1.2.1 Relatos na literatura

Foram consultadas as bases de dados Scielo (Scientific Eletronic Library Online), “Portal de Periódicos da CAPES”, “Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações”, “Sistema de Información Científica Redalyc” e “Bioline International”. Os termos utilizados foram “fungo”, “medicinal”, “tradicional”, ou “Brazil”, “fungi”, “traditional” e “medicinal” (para bases de dados com estudos não brasileiros). A base de dados “Science Direct” também foi consultada, com os

termos “medicinal mushroom AND brazil AND traditional –plant”. Os resumos dos artigos obtidos foram checados, visando identificar se o trabalho tratava de ou citava uso tradicional de fungos de forma medicinal.

Estudos registrando uso tradicional de fungos medicinais no Brasil são escassos. Destaca-se o conhecimento tradicional indígena, que inclui por exemplo o povo Yanomami, considerado uma comunidade micófila (Miliken e Albert, 1996).

Já com relação ao uso tradicional medicinal de fungos por população não-indígena, a tese de Santos E. R., de 2020, contém relatos de uso medicinal de diversos macrofungos pela comunidade rural do Alagoas, assim como uma extensa revisão bibliográfica, citando outros estudos etnomicológicos realizados no Brasil.

Nenhum dos fungos citados nos trabalhos consultados durante a revisão bibliográfica possui aparência similar ao fungo estudado neste trabalho.

1.2.2 Dados sobre o fungo de interesse

Imagem 1: amostra do macrofungo utilizado pelos cidadãos rurais de Aparecida (SP).



Fonte: autoria própria.

Os cidadãos da região rural do Vale do Paraíba, especialmente em Aparecida (SP), aplicam o pó proveniente da fragmentação do cogumelo em infecções da pele, principalmente em animais, mas também em humanos, especialmente em casos graves e purulentos.

O pó é considerado não perecível, e é utilizado de duas a três vezes por dia, até melhora dos sintomas; o tratamento é utilizado em infecções bacterianas, fúngicas e virais (herpes).

Os fungos crescem direto do chão e recebem luz solar por grandes períodos do dia, por não crescerem em mata fechada. Embora não cresçam como “cacho”, ou acumulados, é possível encontrar vários exemplares em distâncias de 1 a 5 metros.

As características morfológicas macroscópicas são:

- Diâmetro de 5 a 20 cm;
- Cor castanha escura a cinza e preto;
- Pó marrom alaranjado, fino;
- Presença de pseudo-pé;
- Chapéu globoso.

Imagem 2: Pó liberado pelo fungo.



Fonte: autoria própria.

Os exemplares podem ser encontrados durante o ano todo, porém surgem com mais frequência quando há chuvas e quando a temperatura se torna mais amena.

Esse conhecimento foi transmitido de geração em geração, porém teve sua relevância reduzida conforme os cidadãos passaram a ter acesso à atendimento médico especializado e antibióticos convencionais; ademais, muitos deixaram de morar na região e migraram para outras cidades.

1.3 Bioprospecção

Para realizar quaisquer estudos comprovando a atividade biológica de um organismo, é preciso identificar a espécie utilizada e, idealmente, isolá-la em laboratório.

Esse processo permite identificar outros relatos similares na literatura, assim como garantir que quaisquer atividades biológicas identificadas sejam da espécie de interesse, e não proveniente de microrganismos contaminantes e outros fatores ambientais, como contaminação por pesticidas e antibióticos.

Ademais, o cultivo em laboratório permite identificar e potencialmente otimizar em quais condições há atividade biológica, assim como indicar possíveis entraves futuros no uso industrial do microrganismo.

1.3.1 Identificação de fungos

Por muitos séculos, utilizou-se apenas características morfológicas e bioquímicas para se determinar a espécie e gênero dos fungos; entretanto, análises genéticas demonstraram que muitas das classificações obtidas exclusivamente por esses métodos eram incorretas, pois várias espécies extremamente similares nem mesmo compartilham o mesmo subfilo (Money, 2016; Senanayake *et al.*, 2020; Raja *et al.*, 2017).

Por outro lado, o isolamento e o sequenciamento de DNA são processos passíveis de erro ou de contaminação, gerando resultados falsos que podem ser identificados pela comparação com características morfológicas.

Em suma, a identificação de fungos é mais rápida e precisa quando se utilizam tanto características morfológicas quanto genéticas, além de outros dados como local de isolamento (Raja *et al.*, 2017).

1.3.1.1 Identificação morfológica de fungos

Os fungos podem ser separados, morfológicamente, em leveduras ou fungos filamentosos; as leveduras são organismos unicelulares, normalmente de formato redondo a oval, que se reproduzem por brotamento (Madigan *et al.*, 2016).

Os fungos filamentosos formam estruturas multicelulares chamadas de hifas; o conjunto de hifas constitui o micélio, que pode ser vegetativo ou reprodutivo (Madigan *et al.*, 2016). O micélio reprodutivo inclui estruturas como

conídios ou esporângios, de reprodução assexual, e basídios ou ascos, de reprodução sexual, chamados também de basidiocarpos ou ascocarpos quando formam macroestruturas (corpos de frutificação) (Madigan *et al.*, 2016). O micélio reprodutivo produz esporos, estruturas de maior resistência que auxiliam a propagação da espécie (Madigan *et al.*, 2016).

Características microscópicas importantes incluem tipo de hifa (septada ou não, hialina ou não, formato reto ou não); presença de conídios ou esporângios e formato e coloração destes; formato, cor, tamanho e formação interna ou externa de esporos, e presença de outras estruturas, como vesículas (Madigan *et al.*, 2016).

Já as características macroscópicas incluem cor, textura e relevo de colônias em meio de cultura (Madigan *et al.*, 2016).

Para identificação de corpos de frutificação, características importantes são formato, tamanho, cor, textura, cheiro, produção de muco, e local de isolamento – ex: organismos vivos ou mortos, solo, entre outros (Madigan *et al.*, 2016). A partir das observações iniciais, faz-se a busca por literatura especializada que possa identificar gênero ou espécie.

1.3.1.2 Identificação genética de fungos

O estudo de Schoch *et al.* (2012), que teve participação de 157 outros pesquisadores, avaliou seis regiões distintas do genoma fúngico e determinou que o melhor segmento para identificação universal é o “ITS” (espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal nuclear), considerando a facilidade de extração, amplificação e sequenciamento, assim como variabilidade inter e intra-espécie (Schoch *et al.*, 2012). Uma das características que facilita a amplificação por PCR (reação em cadeia de polimerase) deste segmento é que o número de cópias por célula pode ultrapassar 200 (Money, 2016).

Os métodos utilizados para extração de DNA bacteriano costumam falhar com fungos devido à robustez da parede celular; por isso, inúmeros novos protocolos foram desenvolvidos nas últimas décadas para resolver esse problema (Van Burik *et al.*, 1998).

Por exemplo, Riffiani *et al.* (2021) discutiram formas de extrair DNA de *Mycocleptodonoides aitchisonii*. Trata-se de um fungo repleto de substâncias que atrapalham a visualização e a extração do DNA, como polifenóis e

polissacarídeos (Riffiani *et al.*, 2021). A estratégia com maior rendimento de DNA foi o crescimento do fungo em meio mínimo, seguida de liofilização e maceração com nitrogênio líquido, e então de duas extrações de DNA: uma com CTAB e outra com o kit comercial de extração da empresa Qiagen “Dneasy Plant Mini Kit” (Riffiani *et al.*, 2021).

1.3.2 Isolamento de fungos

O isolamento de microrganismos é uma atividade complexa. Espécies contaminantes podem ter crescimento mais rápido do que o organismo de interesse, reduzindo os nutrientes do meio de cultura e inviabilizando o isolamento (Senanayake *et al.*, 2020); já o uso de antibióticos e antifúngicos para controlar o problema pode também levar à morte ou inibição do crescimento da cepa de interesse, especialmente quando não se conhece o gênero ou espécie (Senanayake *et al.*, 2020).

É possível reduzir o pH do meio de cultura e a temperatura de cultivo para diminuir ou impedir completamente o crescimento de bactérias contaminantes, por vezes até para benefício da espécie fúngica de interesse (Senanayake *et al.*, 2020). Entretanto, as estratégias para separação de fungos invasores são mais complicadas, e normalmente consistem no isolamento de esporos por meio de diluição seriada em água ou soluções de glicose (Senanayake *et al.*, 2020).

Outra técnica utilizada é a inoculação da amostra em ágar-água (composto apenas de água destilada e ágar), monitorando a germinação de esporos, que são então transferidos para novo meio de cultura. O uso de ágar-água visa reduzir o crescimento de espécies contaminantes que dependam de abundância de nutrientes para se desenvolver (Senanayake *et al.*, 2020).

Com relação aos meios de cultura utilizados, batata-dextrose e sabouraud-dextrose são referência para o cultivo e isolamento de fungos, por serem de baixo custo, fácil preparação e satisfatórios para a maioria das cepas (Senanayake *et al.*, 2020). Entretanto, algumas espécies necessitam de outros componentes, como sais, fósforo, lipídios e vitaminas (Senanayake *et al.*, 2020).

Independentemente do meio utilizado, fungos possuem grande variedade na velocidade de crescimento. Por exemplo, *Pisolithus microcarpus* demora mais de um mês para atingir a fase estacionária de crescimento (Ganeshkumar *et al.*, 2021).

Partindo de amostras profundamente contaminadas e antigas (especialmente quando não estão conservadas em óleo ou glicerol), o isolamento de fungos se mostra demorado e complexo (Senanayake *et al.*, 2020).

2. OBJETIVO

- Isolar o macrofungo;
 - Por meio de inoculação em duplicata em quatro meios de cultura diferentes, com manejo das culturas obtidas visando retirar espécies indesejadas;
- Identificar o macrofungo a nível de espécie ou gênero;
 - Por meio de análises morfológicas, extração do DNA genômico por meio do kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit”; com utilização da técnica de PCR para amplificar segmento de DNA ribossômico nuclear fúngico (especificamente ITS1-5,8S-ITS2), seguido de encaminhamento dos fragmentos obtidos para sequenciamento pelo Instituto do Genoma Humano e comparação da sequência de DNA com dados de MycoBank e GenBank;
- Testar atividade biológica contra bactérias, fungos e oomicetos
 - Por meio de produção de cultivos controlados para extração de metabólitos com acetato de etila e testes de antagonismo.
- Produção de estoques do material isolado.

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 Isolamento e cultivo

Estão disponíveis corpos de frutificação inteiros mantidos em geladeira e um frasco de âmbar fechado com corpo de frutificação fragmentado, mantido em temperatura ambiente.

As amostras foram obtidas no estado de São Paulo, na cidade de Aparecida, especificamente no “Sítio dos Gomes” (propriedade privada), localizado no bairro Itaguaçu. A latitude da coleta foi de 22° 52' 43.65" S, e longitude de 45° 14' 16.57" O. As coletas foram realizadas em novembro de 2019 (inclusive o corpo de frutificação fragmentado), janeiro de 2023 e fevereiro de 2024, sendo as respectivas amostras denominadas F2019, F2023 e F2024.

Imagem 3: Edição com fotografia das três amostras coletadas, ainda no substrato original. A: F2019. B: F2023. C: F2024.



Fonte: autoria própria.

Visto que não se conhece a morfologia deste fungo em todos os seus estágios de desenvolvimento, em dezembro de 2023, uma amostra de um fungo similar foi coletada em localização próxima (coordenadas: 22° 52' 37.74" S e 45° 14' 21.72" O), sendo denominada FS.

Imagem 4: amostra FS em substrato (A) e após coleta (B).



Fonte: autoria própria.

As primeiras amostras foram mantidas em temperatura ambiente antes de serem transferidas para a geladeira; as coletas de F2023, FS e F2024 foram feitas segundo a metodologia de Vargas-Isla, Cabral e Ishikara (2014): retirada do corpo de frutificação do substrato com canivete, conserva em saco de papel de pão, transferência para caixa térmica de isopor com folhas de planta e/ou papel toalha levemente umidificado, e conserva em geladeira.

O isolamento e cultivo do fungo foram feitos com adaptações do método de Oliveira e Foppa (2014).

Os fungos foram inoculados em duplicata em quatro tipos de meio de cultura, batata-dextrose (BD), sabouraud-dextrose (SD), triptona de soja (TS) e Merlin-Norkans modificado (MN), tanto em meio sólido (sufixo A) quanto líquido (sufixo B). Segue composição dos meios de cultura:

- BD: amido de batata (obtido de infusão) a 4 g/L, 20 g/L de dextrose.
- SD: 5 g/L peptona de tecido animal, 5 g/L peptona de caseína e 20 g/L dextrose.
- TS: peptona (pancreática) de caseína (17 g/L), peptona (enzimática) de soja (3 g/L), cloreto de sódio (5 g/L), fosfato dipotássico (2,5 g/L), dextrose (2,5 g/L).
- MNM: glicose (10 g/L), extrato de malte (3 g/L), CaCl_2 (0,05 g/L), NaCl (0,025 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ (0,25 g/L), KH_2PO_4 (0,50 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,15 g/L), tiamina-HCl (100 $\mu\text{g/L}$) e 1,2 mL de FeCl_3 (1% v/v).

Os meios sólidos possuem adição de 20 g/L de ágar.

Foi feita também a inoculação de esporos em um meio líquido composto de 10 g/L de glicose e 10 g/L de solo, retirado de local próximo ao da coleta do fungo, ajustado para pH 6, visando identificar se a composição de micronutrientes do solo era determinante para o crescimento do fungo, assim como para reduzir o crescimento de possíveis contaminantes.

Todos os meios foram esterilizados em autoclave (120 °C, 1 atm, por 15 minutos), exceto o meio MN, que foi esterilizado por 110 °C por 20 minutos (tiamina-HCl foi esterilizada por filtro e adicionada posteriormente).

Os corpos de frutificação foram abertos com estilete esterilizado por fogo – vide umidificação da lâmina com álcool 70% seguido de flambagem em Bico

de Bunsen – e então fragmentos internos foram inoculados diretamente nos meios de cultura – ou com o estilete, ou com uso de alça de platina esterilizada por flambagem.

Para os meios sólidos, cada placa de petri estéril utilizada possui aproximadamente 20 mL de meio de cultura, sendo o cultivo feito a 25 °C, na ausência de luz.

Para os meios líquidos, a inoculação foi feita em erlenmeyers de 50,0 e 125,0 mL, com respectivamente 20 e 50 mL de meio, sendo mantidos a 25 °C, sem agitação e luminosidade, até crescimento formidável de colônias ou indícios de crescimento de mais de uma espécie, ou contaminação.

Cultivos bem-sucedidos em meios líquidos foram transferidos para meios sólidos.

Cultivos líquidos com crescimento de mais de uma espécie, ou contaminados, foram inoculados em novas placas sólidas por meio de sementeira de esgotamento por estrias, com transferência para novas placas após análise em microscópio; o mesmo processo foi feito com cultivos sólidos.

Foi feito uso de antibiótico (tetraciclina a 50 µg/mL) em alguns cultivos líquidos para facilitar o isolamento.

Para observação dos esporos obtidos nas amostras, assim como das colônias que surgirem durante o isolamento, foram feitas análises microscópicas, corando-se com técnica de Gram – em caso de suspeita de crescimento bacteriano – e azul de algodão ou cristal violeta.

3.2.1 Identificação morfológica do fungo

Foram feitas fotografias do desenvolvimento das colônias fúngicas, além de microscopia das hifas desenvolvidas no meio MNMA. Foram feitas também microscopias dos esporos, tanto sem corante quanto com uso de cristal violeta, azul de algodão e KOH 5%.

O corpo de frutificação das amostras F2024 e FS foram medidos com uso de barbante e régua, sendo suas características em geral também avaliadas.

3.2.2 Identificação genética

A extração de DNA foi feita a partir das amostras originais e de materiais obtidos em cultivos específicos.

A extração diretamente dos esporos foi feita pela inoculação de 0,04 a 0,25 g de esporos em 5,00 mL de meio SDB e de TSB adicionados de tetraciclina a 50 µg/mL, em tubos falcon de 50 mL, mantido por 6 dias a 25 °C, sem agitação ou luz. Após esse período, o material foi submetido à filtração à vácuo, e o material sólido restante foi pesado em balança analítica em papel alumínio.

O tempo de inoculação de esporos foi decidido após cultivos em pequena escala – em tubos Eppendorf de 1,5 mL com 0,5 mL de meio e tetraciclina a 50 µg/mL – feitos na mesma condição descrita, com análise de 20 µL por microscopia a cada 24h, determinando se houve germinação ou produção excessiva de hifas – indicando alta probabilidade de germinação de outras espécies fúngicas.

Já a extração feita a partir de fragmentos dos corpos de frutificação foi feita pelo corte e separação de 0,400 g de micélio e esporos, utilizando as amostras F2024, F2019 e FS.

Foram feitas também extrações a partir de micélio de três colônias, sendo uma de F2024, crescida por aproximadamente 30 dias em meio MNMB (após transferência de outro cultivo em MNMB, de 30 dias) e duas provenientes de fungos obtidos durante o isolamento de FS - fragmentos das colônias crescidas em BDA foram transferidos para 5 mL de meio SDB e incubadas a 25 °C, sem agitação, também por 6 dias.

O material coletado foi então congelado com nitrogênio líquido e macerado com pistilo, sendo 0,04 g do material utilizados na extração de DNA com o kit “Wizard Genomic DNA Purification Kit”, da empresa PROMEGA®, seguindo o protocolo para plantas do passo seis em diante.

Após, foi feita amplificação por PCR da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA utilizando-se o primer ITS1-*Forward* e ITS4-*Reverse*, assim como a enzima “*TAQ DNA Polymerase*”, buffer e dNTP's (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados) da empresa PROMEGA®. Cada reação teve volume final de 50 µL, sendo utilizado 1 µL de DNA genômico isolado, 6x buffer da enzima, 0,2 mM de dNTPS, 0,2 µM de cada primer e 2,5 U da enzima. O ciclo usado no termociclador “*Mastercycler Nexus Gradient*”, da empresa Eppendorf®, foi de desnaturação inicial de 2 minutos a 95 °C, e então trinta ciclos de 95 °C por 45 segundos, 55 °C por 55 segundos e 72 °C por 45 segundos, e por fim uma extensão de 5 minutos a 72 °C e redução da temperatura a -4°C.

O sucesso das extrações de DNA, assim como da amplificação por PCR, foi confirmado por meio de eletroforese em gel de agarose, revelada em luz ultravioleta em fotodocumentador L-PIX, da empresa Loccus®.

As amostras colocadas no gel foram coradas com 6xOrange (concentração de 3:1 para cada μL de DNA).

Foram feitos padrões para avaliar visualmente a concentração de DNA e PCR, compostos de 1, 2, 4, 6 e 8 μL de DNA lambda (10 $\mu\text{g/L}$) adicionados de 4, 3, 1, 0 e 0 μL de água livre de nucleases, e 1 μL de 6xBLUE. Para as amostras de PCR, o padrão foi “1Kb Plus LADDER”, sendo 2 μL deste para 3 μL de 6xBLUE.

Por fim, a purificação do material obtido por PCR foi feita com o kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification”, da empresa Illustra®, e este produto foi encaminhado para sequenciamento pelo Genoma USP (Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco), que realizaram o Sequenciamento Sanger com o sistema “ABI 3730 DNA Analyser”, da empresa Thermo Fischer®, após realizar as reações de sequenciamento com o kit “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing”, da mesma empresa.

A sequência de nucleotídeos obtida foi então comparada com as espécies catalogadas na base de dados GenBank utilizando a ferramenta BLAST, selecionando a biblioteca da região ITS de DNA fúngico, otimizando para “Highly Similar Sequences”, e MycoBank, utilizando a ferramenta de MycoID, e selecionando todas as bases de dados exceto GenBank.

3.3 Testes preliminares de atividade biológica

3.3.1 Patógenos selecionados para estudo

Os patógenos utilizados foram *Staphylococcus aureus* (ATCC: 25723), *Escheridia coli* (ATCC: 10536), *Aeromonas hydrophila* (INQRS: 0328), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC: 24853), *Bacillus subtilis* e *Candida auris* (ATCC: 10801), disponíveis na coleção de microrganismos do Laboratório de Bioprodutos.

S. aureus, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram escolhidas por serem parte da lista de bactérias de maior prioridade no desenvolvimento de novos antibióticos (WHO, 2017). *B. subtilis* foi selecionada como um segundo modelo de bactéria gram-positiva. Já *A. hydrophila* foi escolhida por ter resistência natural contra

várias classes de antibióticos, especialmente beta-lactâmicos, cefalosporinas e macrolídeos (Martins D. L. *et al.*, 2023).

De forma similar, *Candida auris* foi escolhida por estar na lista de fungos de maior prioridade no desenvolvimento de novos antifúngicos, classificada como de prioridade crítica devido à alta mortalidade e taxa de resistência a antimicrobianos (WHO, 2022).

Quanto aos fungos filamentosos, foram selecionados dois fitopatógenos: *Lasiodiplodia theobromae*, ascomiceto de grande importância para a agricultura brasileira, visto que é capaz de contaminar mais de 500 espécies de plantas, causando podridão, morte e cancos (Oliveira *et al.*, 2013) e *Neoscytalidium sp.*, ascomiceto fitopatógeno e potencial fungo oportunista causador de onicomioses (Carvalho L. T., 2015).

Ademais, os testes foram realizados também contra *Phytophthium sp.*, sendo este um gênero de oomicetos potenciais causadores de podridão, e com capacidade de infectar várias plantas, incluindo soja e mandioca (Tkaczyk M., 2020). Embora sejam extremamente similares aos fungos, considerando aspectos morfológicos e do ciclo de vida, oomicetos não fazem parte do reino Fungi, mas sim do Stramenopiles-Alveolata-Rhizaria (SAR) (McCarthy e Fitzpatrick, 2017).

Os fitopatógenos foram cedidos pelo Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana, da USP.

3.3.2 Extração e separação de metabólitos

Os cultivos líquidos escolhidos para extração foram transferidos para tubos Falcon de 50 mL e centrifugados a 4500 rpm por 10 minutos. Até 2,0 mL de sobrenadante de cada cultivo, medidos com micropipeta, foram transferidos para tubos de prolipropeno Eppendorf de 2,0 mL e reservados em geladeira. Do restante, até 10,00 mL de meio (com a massa fúngica) foram medidos em tubo Falcon, e foi feita adição de acetato de etila até concentração 1:1. O volume final foi transferido para frascos de reagente de vidro tipo Schott, que foram agitados de forma alternada por 2 horas, sendo 5 minutos de agitação manual seguida de 5 minutos de agitação mecânica, horizontal, a 120 rpm. Quando necessário, a massa fúngica foi também macerada com alças plásticas estéreis em T. Após esse período, o volume foi filtrado com papel de filtro, para retirada de

fragmentos celulares, e separado em tubos Falcon de 15 mL; a fração de acetato de etila foi separada por meio de micropipeta, e até 2,0 mL da fração aquosa da extração também foram retiradas e transferidas para tubos Eppendorf de 2 mL, reservados imediatamente em geladeira. A fração de acetato de etila foi então despejada em béqueres de 80,0 mL e secada em capela. Foram adicionados entre 1 e 2 mL de metanol ao béquer, para ressolubilizar a massa extraída, e foi feita transfusão para tubos Eppendorf de 1,5 mL já pesados em balança analítica (precisão de 0,0001), e então concentrados no equipamento “Eppendorf Vacufuge plus Vacuum Concentrator” da empresa Eppendorf®, por 45 a 75 minutos, a 45 °C.

Todas as manipulações de solvente, assim como maceração, foram feitas dentro de capela própria para solventes químicos, e com uso de EPI adequado.

3.3.3 Cultivos escolhidos para extração

As três primeiras extrações foram feitas a partir dos cultivos feitos pela inoculação direta de esporos de F2024 em meio líquido (SD, MNM e solo), crescidos por 50 dias, em respectivamente 50 mL (erlenmeyer de 125 mL), 20 e 20 mL (erlenmeyer de 50 mL), a 25 °C, em estufa, sem agitação.

A partir desses cultivos em MNMB e SDB, antes da extração, foram inoculados 2 novos meios de cultura (erlenmeyer de 50 mL com 20,0 mL de meio de cultura), e após 1 semana, foi feita nova inoculação em duplicata da mesma forma, visando avaliar possível atividade antibiótica baseada no tempo de cultivo.

Sendo assim, foi feita extração de F2024 crescido em meio MNMB por 50, 27, 15 e 7 dias, meio SDB por 50 e 15 dias, e meio solo por 50 dias, resultando em 21 soluções. Não foi possível realizar extrações em duplicata, pois apresentaram contaminação ou não houve crescimento.

Os sobrenadantes obtidos, assim como as frações aquosas, foram esterilizados por meio de microfiltro em capela de fluxo laminar. Entretanto, pelo baixo rendimento dos extratos de acetato de etila, a massa final foi solubilizada com água destilada estéril até concentração de 12 a 20 mg/mL, reservada em geladeira e então utilizada diretamente nos ensaios, excluindo testes contra *A. hydrophila*, *L. theobromans* e *Phytophthium sp.*

3.3.4 Testes de atividade antibacteriana

Os testes de atividade contra bactérias foram feitos por antibiograma.

Todas as manipulações feitas com bactérias foram realizadas em cabine de fluxo laminar, com reagentes esterilizados e EPI adequado.

Os patógenos foram reativados do estoque a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em tubos de 10 ml (por transferência de $10,0\text{ }\mu\text{L}$ do estoque), com 2,00 mL de meio Luria Bertani (LB) da empresa Difco®, esterilizado em autoclave e ajustado para pH 7,0. O cultivo foi incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24h em 180 rpm de agitação; 5,0 μL foram então inoculados por semeadura de esgotamento em placa sólida de LB, incubada também a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24h, e então reservada em geladeira.

Para os testes de atividade, uma das colônias isoladas nas placas sólidas foi inoculada em 5,00 mL de meio LB, em erlenmeyers de 25 mL, cultivada *overnight* a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, com agitação de 180 rpm. Foi feito então ajuste com solução salina (0,85%) até que a densidade óptica da solução medida á 600 nm estivesse entre 300 e 400. A partir dessa solução ajustada, 100 μL foram despejados em placa de Muller-Hinton (MH), da empresa Difco® (esterilizado em autoclave e com pH 7), e então foram adicionados discos de filtro (esterilizados em autoclave), com pinça esterilizada por flambagem.

5 μL de cada tipo de solução foram adicionados aos discos de filtro, em duplicata. O controle positivo foi feito com canamicina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e o controle negativo pela adição de água destilada estéril. Após cultivo *overnight* a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, os halos foram medidos com régua.

3.3.5 Testes de atividade contra leveduras e fitopatógenos

Para o teste contra leveduras, utilizou-se a metodologia descrita em 3.3.4, exceto que *C. auris* foi reativada em meio TS, inoculada em meio SDB e plaqueada em meio SDA (pH 7).

Para os fitopatógenos, foi feita uma metodologia similar, combinando aspectos de antibiogramas e testes de antagonismos.

A reativação de cada fitopatógeno foi feita pela inoculação de um dos fragmentos do estoque (preservado em água destilada) em meio BDA (pH 7), sendo a placa incubada por 48 a 72 horas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das colônias desenvolvidas, fragmentos do meio de cultura (cortados com ponteira de 1000 μL) foram

transferidas com pinça (esterilizada por flambagem) para o centro de placas sólidas de BDA (pH 6,7), já com discos de filtro adicionados com os extratos, assim como com o controle positivo. Essas placas foram então incubadas à 25 °C por 24 a 72 horas, até o fitopatógeno alcançar o final da placa.

A manipulação dos fitopatógenos foi feita ao redor de Bico de Bunsen, sendo a preparação das placas com extratos feita em fluxo laminar.

O controle positivo foi feito com nistatina a 100 µg/mL.

3.3.6 Testes de antagonismo

Foi feito um teste de atividade antibacteriana por antagonismo. Após crescimento em meio MNM por 27 dias, uma colônia foi transferida para o centro de uma placa de MH (pH 7), na qual foram feitas estrias (com alça de platina, esterilizada por flambagem) de parte das colônias dos patógenos em placa sólida, reservados na geladeira. A placa foi então incubada a 25 °C *overnight*.

Foi feito um teste de antagonismo também entre F2024 e os fitopatógenos, com metodologia similar: uma colônia, crescida em meio MNMB por 27 dias, foi inoculada no centro de uma placa de BDA (pH 6), cultivada a 25 °C por 3 dias. Essa colônia foi retirada com ponteira de 1000 µL e transferida para nova placa de BDA, na qual foram adicionados também um fragmento (cortado da mesma forma) de cada fitopatógeno, com distância de aproximadamente 2 cm do fungo de interesse. A placa foi então incubada a 25 °C por 24 a 72h, buscando identificar halos de inibição entre os fungos.

3.4 Produção de estoque

Fragmentos dos corpos de frutificação (especialmente dos esporos), foram transferidos para tubos Falcon de 50 mL com 5,0 mL de glicerol a 50%, para preservação em freezer; esse processo foi repetido com fragmentos de colônias em SDA e MNMA. O resto dos fragmentos de colônias isoladas (em SDA, MNMA e BDA) foram armazenados em água filtrada (esterilizada por autoclave).

Os materiais foram congelados a -20 °C e então transferidos para freezer a -80°C.

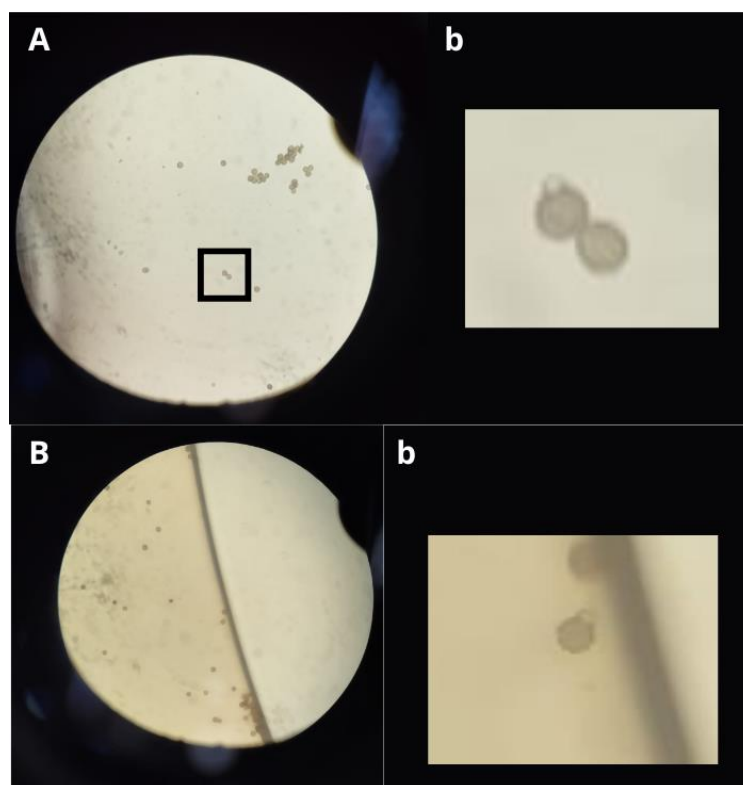
4. RESULTADOS

4.1 Isolamento e cultivo

Nenhuma das tentativas de cultivo de F2019 ou F2023 foi bem-sucedida; também não foi possível observar germinação de esporos, sugerindo que as amostras estavam inviáveis.

Entretanto, foi possível realizar o cultivo e isolamento da amostra F2024, assim como observar germinação.

Imagem 5: Fotos de microscopias em aumento de 400x (A e B) e *close-up* (a e b) de esporos germinados, após 3 dias de cultivo.



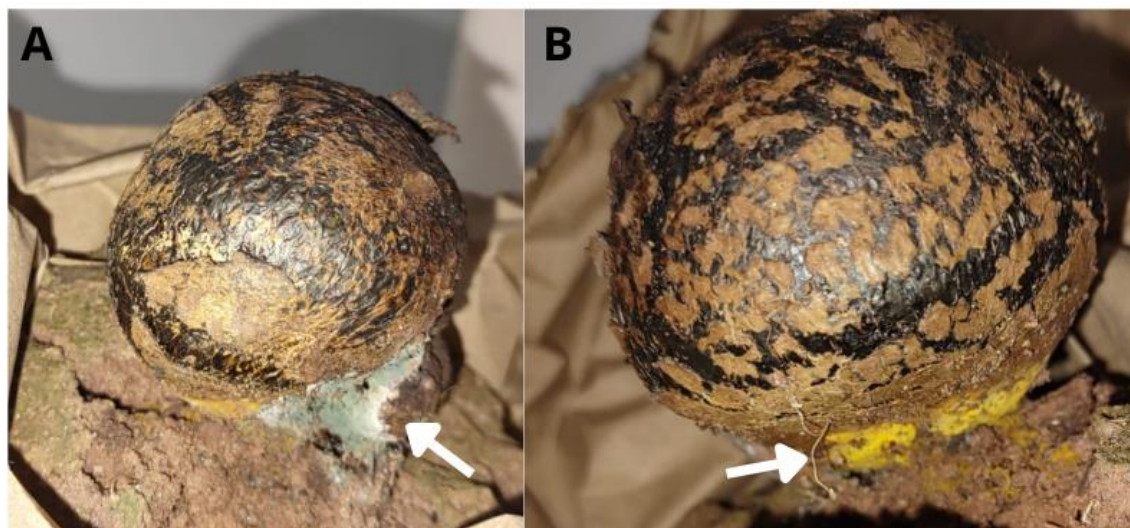
Fonte: autoria própria.

O isolamento das amostras se mostrou uma tarefa extremamente complicada, sendo bactérias gram-positivas e gram-negativas encontradas frequentemente, assim como outros gêneros de fungo, incluindo prováveis *Penicillium spp.*, *Aspergillus ssp.* e *Cladosporium ssp.*

Ademais, foram encontrados nematódeos dentro do corpo de frutificação das amostras F2024 e F2019, assim como leveduras e prováveis protozoários.

A amostra F2024 possuía em seu exterior um provável *Penicillium spp.* e outra espécie que não pôde ser identificada.

Imagem 6: Foto de F2024 com colônia de *Penicillium* sp. (A) e outro crescimento não identificado (B), apontados com seta.



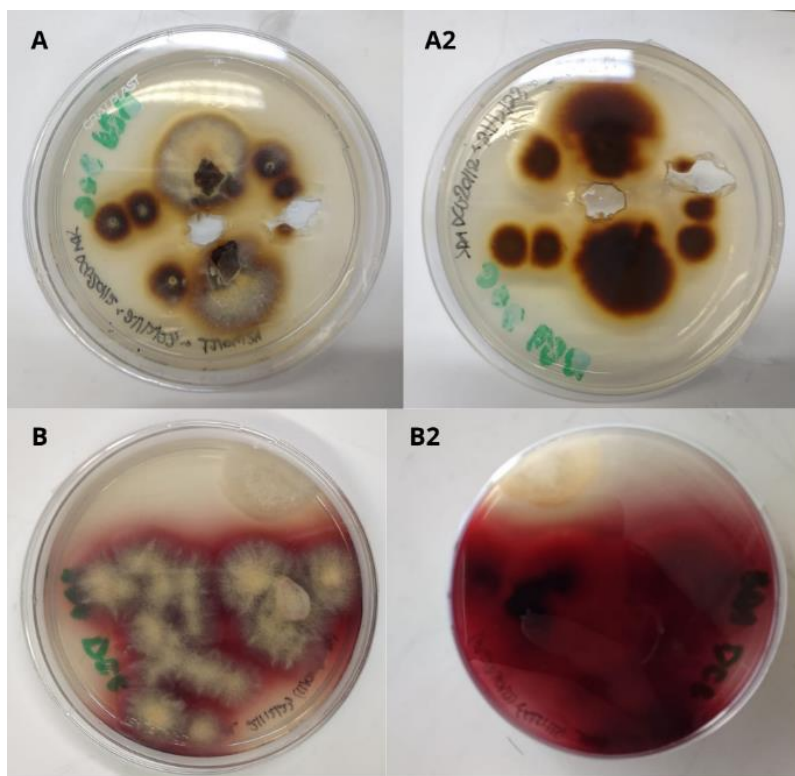
Fonte: autoria própria.

Foi possível obter colônias puras a partir da inoculação de esporos em meio MNMB, meio solo, e pela inoculação de esporos em meio SDA e SDB. Os demais meios apresentaram crescimento de outros microrganismos.

Foi feito um teste de velocidade de esporulação; 0,4 g de esporos foram inoculados em 25 mL de meio MNMB adicionados de tetraciclina, em dois erlenmeyers de 250 mL, cobertos com papel pardo para evitar influência de luz. Os erlenmeyers foram incubados a 30 °C, sendo um em agitação de 180 rpm e o outro sem agitação. Como houve crescimento de mais de uma espécie fúngica em ambos, o teste foi repetido, sendo ambos erlenmeyers inoculados em temperatura ambiente, e um em rotação de 120 rpm. O novo teste falhou da mesma forma.

Foram isolados dois fungos filamentosos a partir da amostra FS, que não puderam ser identificados a nível de gênero por meio de microscopia, visto que não produziram conídios ou outras estruturas notáveis; embora o DNA de um destes tenha sido corretamente extraído, a amplificação por PCR falhou.

Imagem 7: Frente (A e B) e verso (A2 e B2) dos dois fungos isolados a partir da amostra FS, em BDA. Há cortes no ágar da amostra A, que foram usados para transferências da colônia; a amostra B apresenta uma contaminação na parte superior, que não estava presente no material usado para extração de DNA.



Fonte: autoria própria.

4.2 Identificação morfológica

Uma das características mais marcantes do fungo de interesse é a presença do “pseudo-pé” (pseudostirpe), assim como ausência de corpo “carnoso”, sendo o interior do corpo de frutificação composto quase completamente por esporos; concluiu-se que se tratava de um fungo gasteroide.

“Gasteroide” não é uma classificação filogenética, correspondendo a basidiomicetos cujos esporos são difundidos de forma passiva, sendo dependentes da ação de animais e fenômenos meteorológicos – como vento e chuva – para se propagarem (Assis M., 2019).

Por comparação com os dados de Wu, Zhou, Qu e Ge (2023), a amostra FS foi identificada como *Scleroderma* sp., considerando o basidioma globoso, de aproximadamente 5 cm de diâmetro e 3 de altura; perídio de cor amarela clara, com aspecto de “pele de cobra” e significativa espessura; massa de esporos de

cor preto azulado, e presença de pseudoestirpe compacto, com raízes rizomórficas brancas, com tamanho de aproximadamente 2 cm².

As características morfológicas das amostras F2024, F2023 e F2019 foram comparadas com os trabalhos de Misfud e Misfud (2022), Lin, Chang, Tsai e Huang (2016), Lebel, Pennycook e Barret (2018) e Van der Whesthuizen e Eicker (1989), concluindo-se que provavelmente são do gênero *Pisolithus*.

Características do basidiocarpo (F2024): formato globoso, com 16 cm de diâmetro e 8 cm de altura; pseudoestirpe compacto, marrom e de aspecto terroso, localizado próximo do centro, com formato cilíndrico e 2 cm de diâmetro e de altura; perídio fino (1 mm), de aspecto “quebradiço” e similar à pele de cobra, com coloração marrom a preta e cinzenta; formação de gleba com massa pulverulenta de esporos; pseudoperidiolos escassos, brancos.

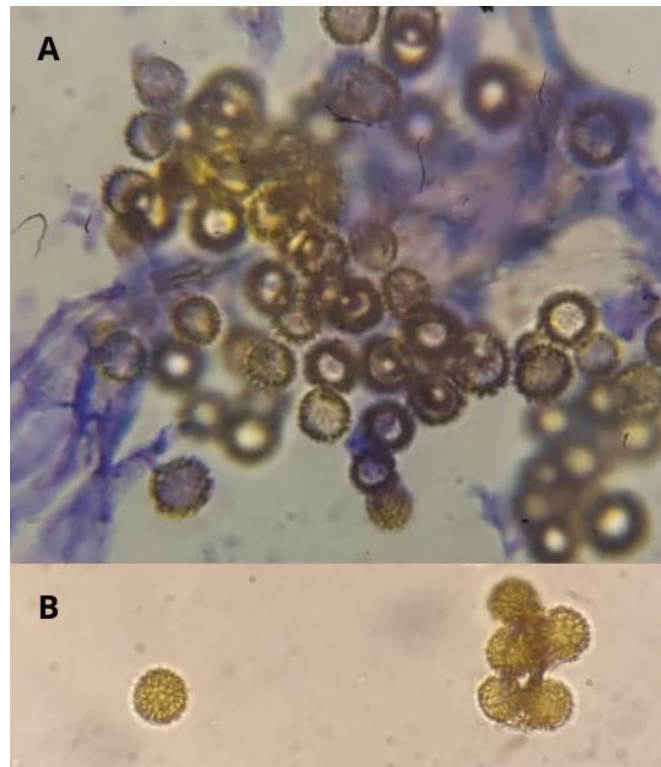
Imagem 8: Colagem com fotografias dos corpos de frutificação. A: Corte vertical da amostra F2024; seta azul mostra massa de esporos pulverulenta na borda, seta verde e círculo dão destaque aos pseudoperidiolos. B: Amostra F2023, seta branca aponta raízes rizomórficas brancas. C: seta e quadrado rosa dão destaque ao pseudopé da amostra F2019.



Fonte: autoria própria.

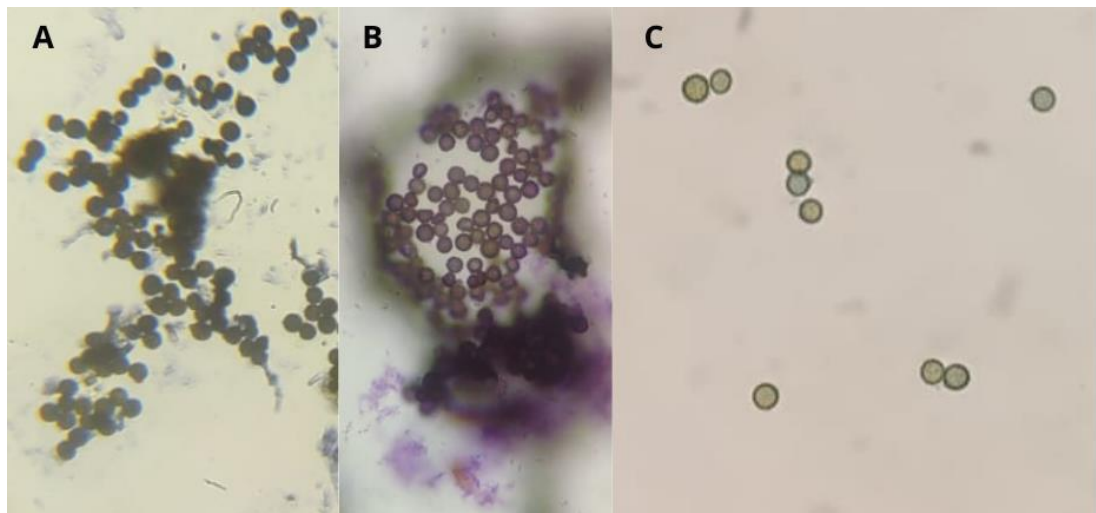
Aspectos microscópicos (F2019, F2023 e F2024): esporos globosos, com espículas/espinhos, de cor amarela a marrom.

Imagem 9: *Close-up* da microscopia de esporos, em aumento de 1000x, da amostra F2019 (A) e F2024 (B), demonstrando formato redondo e presença de “espinhos”.



Fonte: autoria própria.

Imagem 10: *Close-up* de microscopia de esporos, em aumento de 200x, sem corante (A), com cristal violeta (B) e com azul de algodão (C).



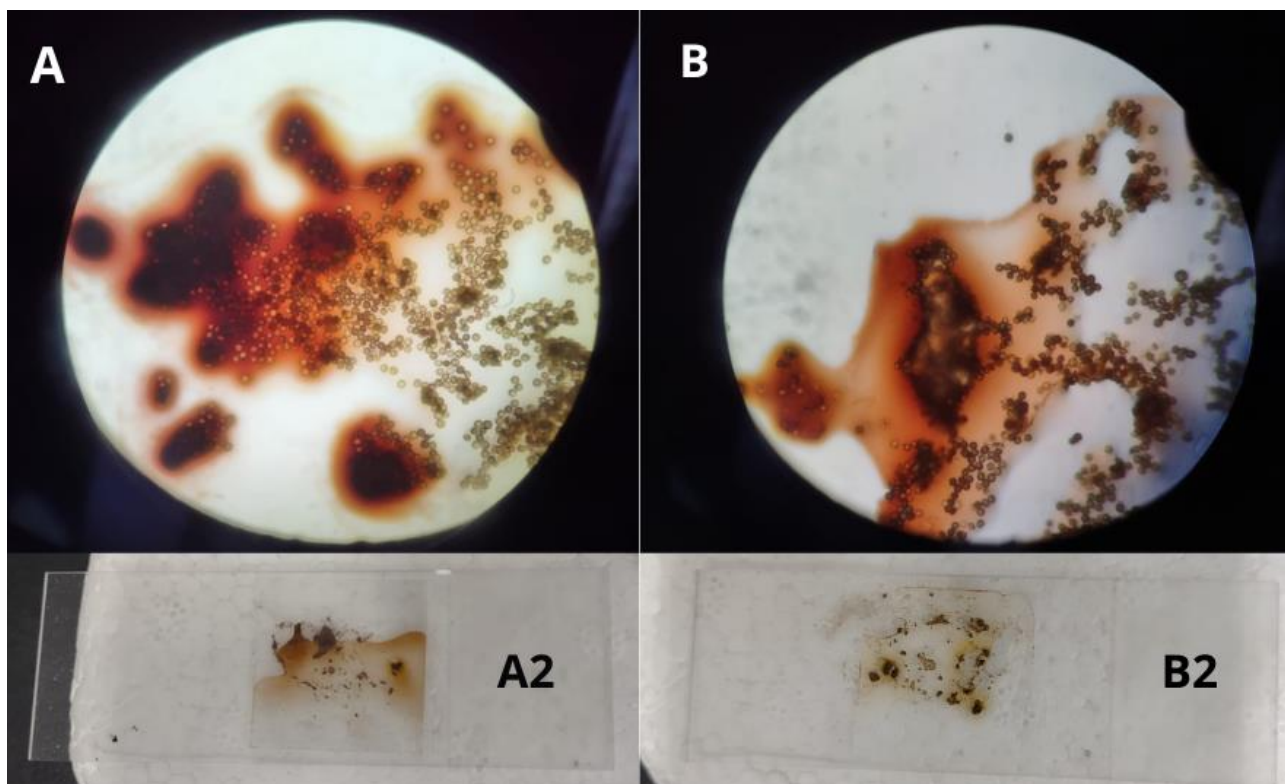
Fonte: autoria própria.

Não foi possível observar os pseudoperidiolos ou basídios em microscopia. A ausência ou baixa quantidade de pseudoperidiolos em todas as amostras sugerem que todas já estavam maduras, de forma que só um dos estágios de desenvolvimento do basidiocarpo foram observados.

Para identificar morfológicamente um fungo do gênero *Pisolithus* a nível de espécie, é preciso realizar microscopia eletrônica dos esporos, determinando assim o tamanho das espículas, formato exato e distribuição destas. Entretanto, uma outra característica útil é a coloração dos esporos com KOH 5%, capaz de diferenciar *P. marmoratus*, *P. arrhizus* e *P. albus* (Misfud e Misfud, 2022).

A coloração de esporos com KOH 5% resultou em cor similar para as amostras F2024 e F2019, sendo a F2019 mais alaranjada e escura. A cor mais clara da amostra F2024 pode ser uma variação natural da espécie.

Imagem 11: Microscopia (200x) de esporos em KOH 5% e foto de lâmina de microscopia, das amostras F2019 (A e A2) e F2024 (B e B2).

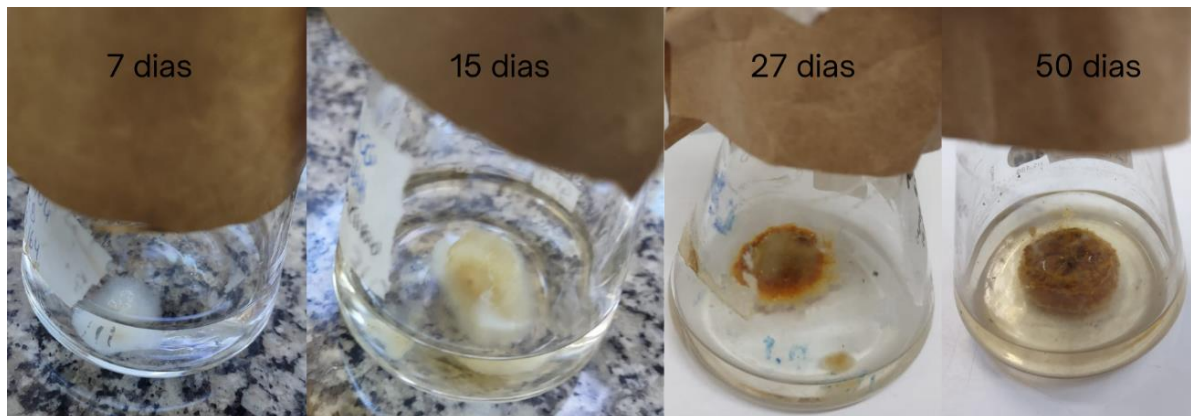


Fonte: autoria própria.

Fungos do gênero *Pisolithus* já foram isolados em várias regiões do Brasil, porém ainda não há relatos de espécies endêmicas, sendo os isolados encontrados associados a plantações de *Eucalipto* e *Pinus* e consideradas espécies exóticas (Martin, Díez, Dell e Delaruelle, 2002).

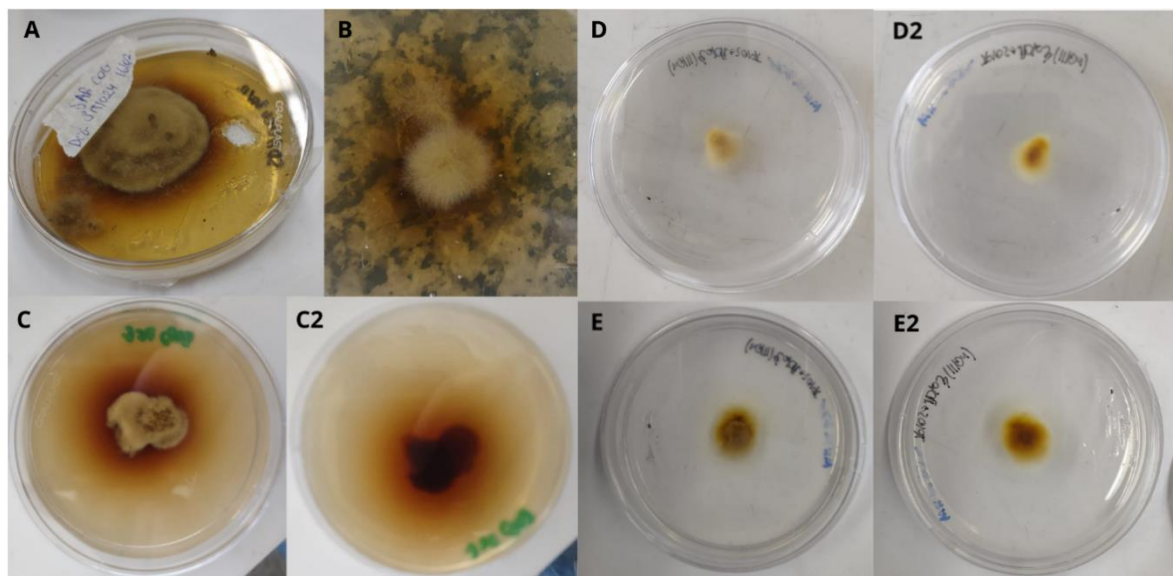
Para determinar se os fungos isolados eram do gênero *Pisolithus*, a morfologia em meio sólido e microscopia das hifas foram comparadas com a literatura, assim como velocidade de crescimento.

Imagem 12: Colagem de fotos mostrando *close-up* de colônias de F2024 em meio MNMB com passar do tempo.



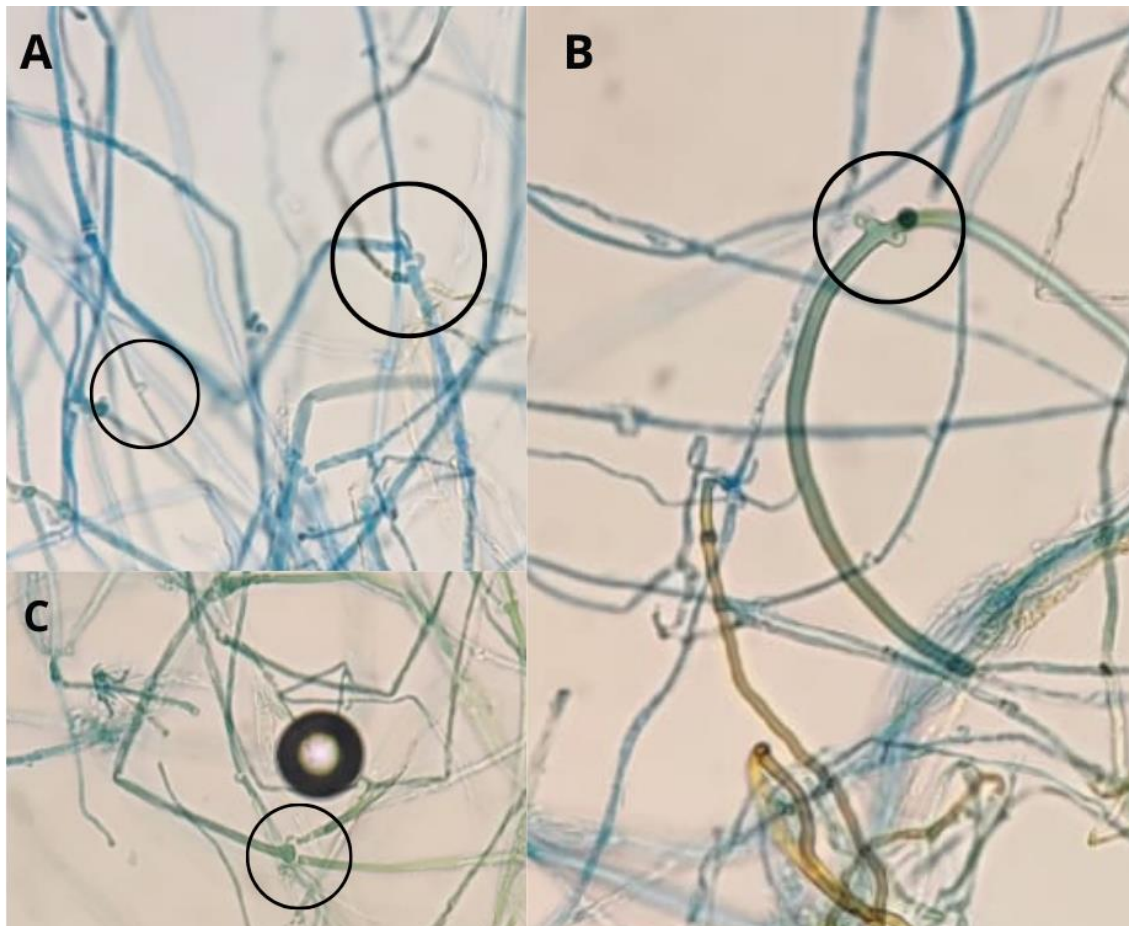
Fonte: autoria própria.

Imagem 13: Colagem de fotos mostrando colônias de F2024 em diferentes meios de cultura e tempos de incubação. A: Meio SDA, 50 dias, colônia crescida direto dos esporos, potencialmente com outros microrganismos. B: Colônia em BDA, 7 dias após transferência de meio MNMB. C e C2: Frente e verso em meio SDA, 15 dias após transferência de outro meio SDA. D e D2: MNMA, 7 dias após transferência de meio MNMB. E e E2: Frente e verso de meio MNMA, 15 dias após transferência de meio MNMB.



Fonte: autoria própria.

Imagem 11: A: *Close-up* de microscopia (400x) de exame direto de hifas crescidas em meio MNMA por 15 dias, coradas com azul de algodão; círculos destacam *clamp* connections (A) e ramificações de parige (B e C). A mudança de cor reflete a mudança de morfologia observada em placa, sendo A tirada da parte mais externa e B e C da parte central das colônias.



Fonte: autoria própria.

4.3 Identificação genética do fungo

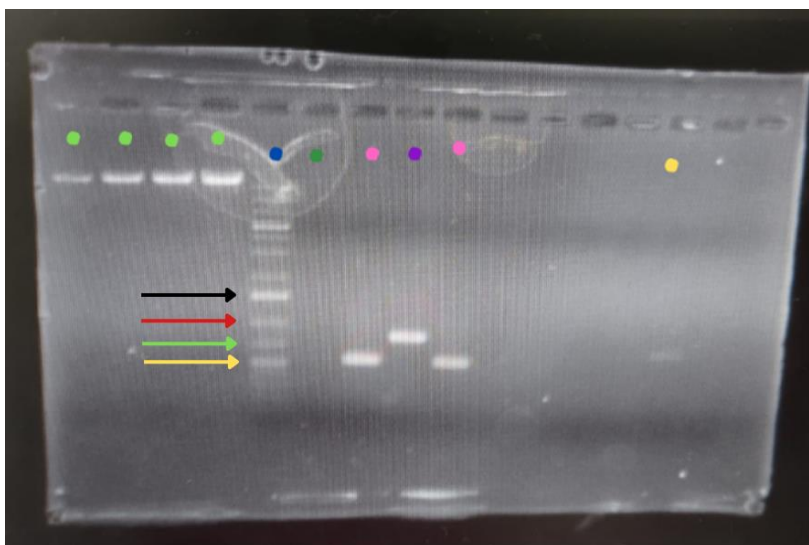
O método de extração de DNA descrito na sessão 3.2 foi bem-sucedido para isolar DNA a partir de esporos de F2024 cultivados em meio TSB e SDB, assim como para fragmentos do corpo de frutificação de FS e do micélio dos dois fungos isolados a partir do seu cultivo. Entretanto, o método não foi eficiente para separação de DNA direto dos corpos de frutificação de F2024, 2023 ou 2019, ou do micélio em meio MNMB de F2024; o material obtido nestes casos era escuro, sendo marrom para a amostra F2019 e vermelho para a amostra F2024.

Foram testados vários outros métodos para extração de DNA a partir da amostra de 2019. Foram feitas extrações com o mesmo protocolo utilizado para F2024, porém macerando o fungo em gelo seco e seguindo o protocolo para

leveduras do passo 6 em diante, assim como os métodos descritos por Kües e Dörnte (2013), Pilo P. *et al.* (2022) e Amer O. E. *et al.* (2011). Nenhuma extração ou amplificação por PCR foi bem-sucedida.

A reação de PCR descrita em 3.2 foi bem-sucedida para amplificação do fragmento ITS da amostra FS, gerando uma única banda de 650 pb, mas não dos outros DNAs obtidos.

Imagem 12: Gel de agarose (1%, 120 V, 45 min.) com resultados de reação de PCR. Pontos verde claro indicam controle de concentração (20, 40, 60 e 80 ng), ponto azul escuro indica padrão 1 Kb *plus Ladder*, ponto verde escuro indica controle negativo, pontos rosas indicam testes de concentração de primer (1 ou 2 µL) com DNA de *Cladosporium sp.*, ponto roxo indica controle com DNA de *Saccharomyces cerevisiae* e ponto amarelo indica fragmento amplificado de FS. Seta preta indica 1500 pb; seta vermelha indica 1000 bp; seta verde indica 700 bp e seta amarela indica 500 bp.



Fonte: autoria própria.

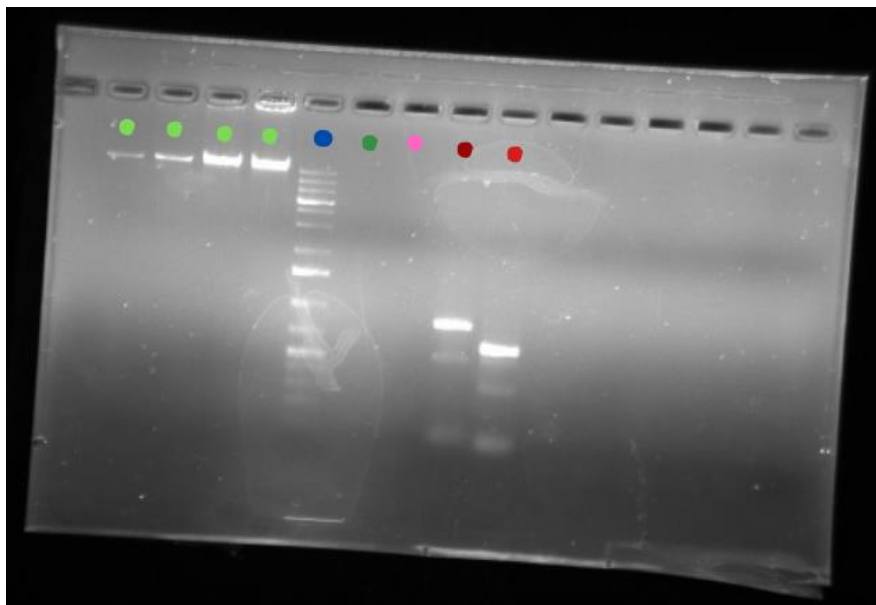
Sendo assim, foi feita uma segunda purificação do DNA extraído por meio de precipitação com acetato de sódio (3 mol/L), seguida de limpeza com isopropanol e álcool 70% (gelado), e ressuspensão com água destilada ultrapura. Esse procedimento visualmente melhorou a qualidade do DNA, dado que a amostra foi clareada, porém não resultou em amplificação. A diluição da amostra em água ultrapura (em 1:5 e 1:9) também não foi eficaz.

Foi feita então uma segunda extração de DNA, utilizando o mesmo método, originando um DNA mais límpido, mas que também não foi amplificado pela reação de PCR.

Foi utilizado então um segundo protocolo de PCR, com a enzima Phusion™ da empresa ThermoFischer®. A reação foi feita em volume de 20 µL (sendo 1 µL de DNA, 10 µL de buffer “high-fidelity” (HF) da enzima, 0,2 µL de enzima, 0,6 µL de DMSO, 1 µL de cada primer e 11,2 µL de água ultrapura estéril), e o ciclo usado foi de desnaturação inicial de 3 minutos a 98 °C, e então trinta ciclos de 98 °C por 10 segundos, 55 °C por 55 segundos e 72 °C por 45 segundos, e por fim uma extensão de 5 minutos a 72 °C e redução da temperatura a -4°C.

O protocolo com Phusion™ originou diversas bandas a partir do DNA extraído na segunda tentativa, que não foram eliminadas pelo aumento da temperatura de anelamento até 60 °C.

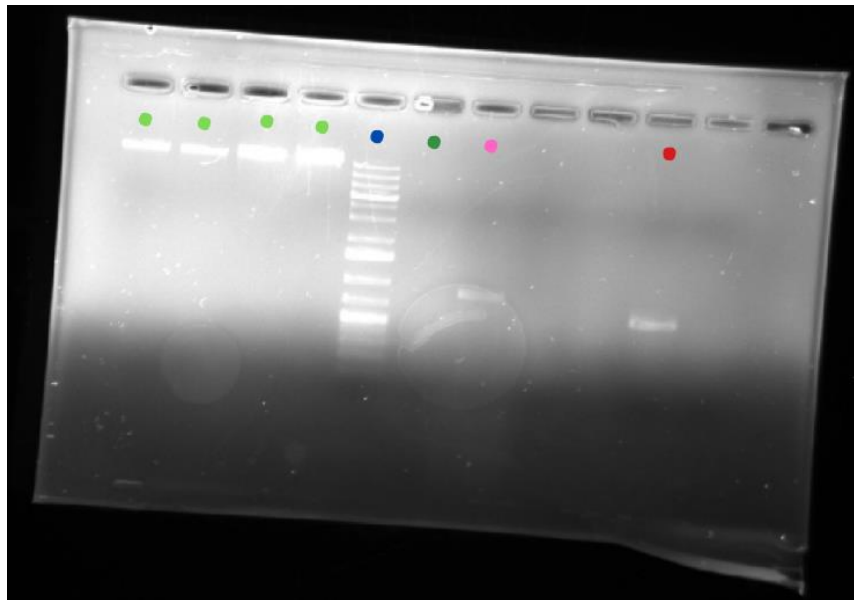
Imagem 13: Gel de agarose (1,3%, 120 V, 60 min) com resultados de reação de PCR. Pontos verde claros indicam controle de concentração (10, 20, 60 e 80 ng), ponto azul escuro indica padrão 1 Kb *plus Ladder*, ponto verde escuro indica controle negativo, ponto rosa indica controle positivo, ponto vermelho escuro indica resultado da amplificação do DNA obtido do cultivo em TSB, e ponto vermelho indica DNA obtido do cultivo em SDB.



Fonte: autoria própria

Entretanto, a re-amplificação do mix de PCR do DNA obtido do meio SDB possibilitou o isolamento de uma única banda de 650 pb – não presente para o meio TSB.

Imagem 14: Gel de agarose (1%, 120 V, 45 min) com resultados de reação de PCR. Pontos verde claros indicam controle de concentração (10, 20, 60 e 80 ug), ponto azul escuro indica padrão 1 Kb *plus Ladder*, ponto verde escuro indica controle negativo, ponto rosa indica controle positivo com DNA de FS, ponto vermelho indica resultado da amplificação da reação de PCR.



Fonte: autoria própria.

Foi feita a purificação do material tanto de bandas cortadas de gel (amostra F2024) quanto do mix de PCR (amostra FS), sendo o resultado avaliado em pureza por meio do gel de agarose e em quantidade por meio de espectrofotometria, utilizando NanoDrop (especificamente equipamento DeNovix Série DS-11), para envio para sequenciamento.

O material enviado teve qualidade suficiente para gerar resultados confiáveis para ambas as amostras, com bons níveis de similaridade entre fragmentos, uso de grande parte da sequência e baixa probabilidade de erro.

Para a amostra FS, 954 bases foram sequenciadas; destas, o número de bases úteis variou entre 390 e 586, retirando-se bases com alto ruído ou ambiguidade. Tanto a ferramenta BLAST quanto MycoID identificaram o fungo como do gênero *Scleroderma*, conforme análise morfológica realizada; a espécie em si varia pela ferramenta utilizada.

Para a ferramenta BLAST, o melhor resultado identifica a amostra como da espécie *Scleroderma capeverdeanum*, com 66% a 98% de “Query cover” (porcentagem utilizada do fragmento) e 97,21 a 97,42% de “Percent Identity”

(similaridade entre fragmentos), com “E value” (probabilidade do resultado obtido ser aleatório) de zero em ambos os casos. Como segunda espécie mais provável, indicou *Scleroderma dunensis*, com 64 a 96% de “Query cover”, E-value de 3 a $5e^{-113}$, e “Percent identity” de 85,93%.

Para a ferramenta MycoID, todos os resultados se referem a diferentes isolados de *Scleroderma Albidum Pat. & Trab.*, que não aparece dentre os resultados de BLAST. O erro foi de $4,83964e^{-174}$, “Overlap” de 99,23% (correspondente a “Query Cover”) e “Similarity” (igual a “Percent Identity”) de 99,48%. Todos os resultados obtidos vieram da base de dados UNITE.

A identificação a nível de espécie do gênero *Scleroderma* depende de análises microscópicas mais detalhadas, assim como observação de diferentes estágios de amadurecimento (Wu, Zhou, Qu e Ge, 2023).

Para a amostra F2024, de 580 bases, aproximadamente 450 foram úteis; entretanto, tanto a ferramenta BLAST quanto MycoID identificaram a amostra como do gênero *Trichoderma sp.*

Não é possível supor a espécie de *Trichoderma* nem pela ferramenta BLAST nem por MycoID, visto que todos os resultados obtidos possuíam alta qualidade - para BLAST, “Query Cover” de 91 a 99%, “Percent Identity” de 85,69 a 97,59% e erro de $6e^{-151}$ a 0.0; para MycoID, “Overlap” de 99,59% a 89,23%, “Similarity” de 97,95 a 99,59 e erro de 0.0.

Segundo a literatura, a região ITS não é suficiente variada para a identificação a nível de espécie desse fungo, sendo necessário utilizar outras regiões do DNA (Meyer, M; Mazaro, S. M.; Silva, J. C., 2019).

Trichoderma é gênero de ascomicetos saprófitas, sendo encontrados no solo e em matéria em decomposição, assim como parasíticos, sendo isolados de corpos de frutificação de várias espécies de basidiomicetos; possuem também a capacidade de formar micorrizas, que são associações mutualísticas entre fungos e raízes de árvores (Meyer, M; Mazaro, S. M.; Silva, J. C., 2019).

Este gênero de fungos não forma ascocarpo, apresenta crescimento extremamente rápido em meio de cultura – alcançando o final da placa entre 24 e 48h - (Meyer, M; Mazaro, S. M.; Silva, J. C., 2019) e possui morfologia completamente diferente da observada na amostra F2024.

Sendo assim, conclui-se que a amostra F2024 estava contaminada com este fungo, potencialmente sendo parasitada.

4.4 Resultados das extrações

Quadro 1: Nome e concentração das soluções usadas nos testes de atividade biológica

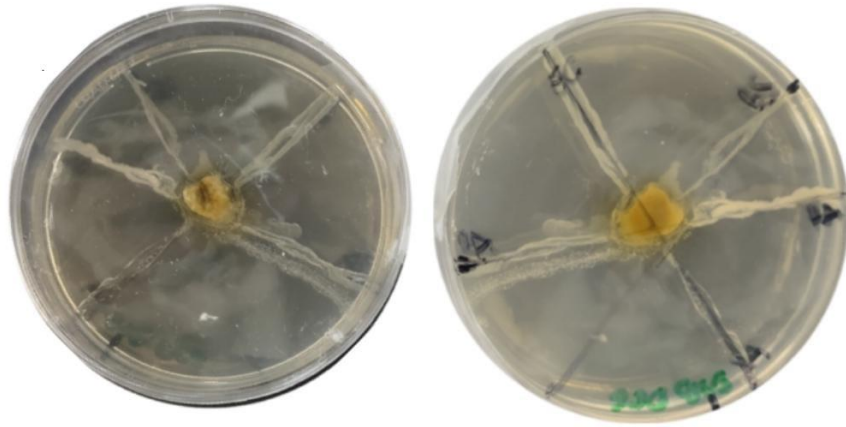
Nome da solução	Concentração utilizada	Fração utilizada	Meio de cultivo	Duração do cultivo
1a	Não concentrado	Sobrenadante	MNM	50 dias
1b		Fração aquosa		
1c		100 µg/mL		
2a	Não concentrado	Sobrenadante	Solo	50 dias
2b		Fração aquosa		
2c		100 µg/mL		
3a	Não concentrado	Sobrenadante	SDB	50 dias
3b		Fração aquosa		
3c		100 µg/mL		
4a	Não concentrado	Sobrenadante	MNM	27 dias
4b		Fração aquosa		
4c		100 µg/mL		
5a	Não concentrado	Sobrenadante	MNM	7 dias
5b		Fração aquosa		
5c		80 µg/mL		
6a	Não concentrado	Sobrenadante	MNM	15 dias
6b		Fração aquosa		
6c		90 µg/mL		
7a	Não concentrado	Sobrenadante	SBD	15 dias
7b		Fração aquosa		
7c		50 µg/mL		

4.5 Testes de atividade contra leveduras e bactérias

Nenhum dos testes de atividade contra leveduras ou bactérias foi bem-sucedido, incluindo também o teste de antagonismo contra bactérias.

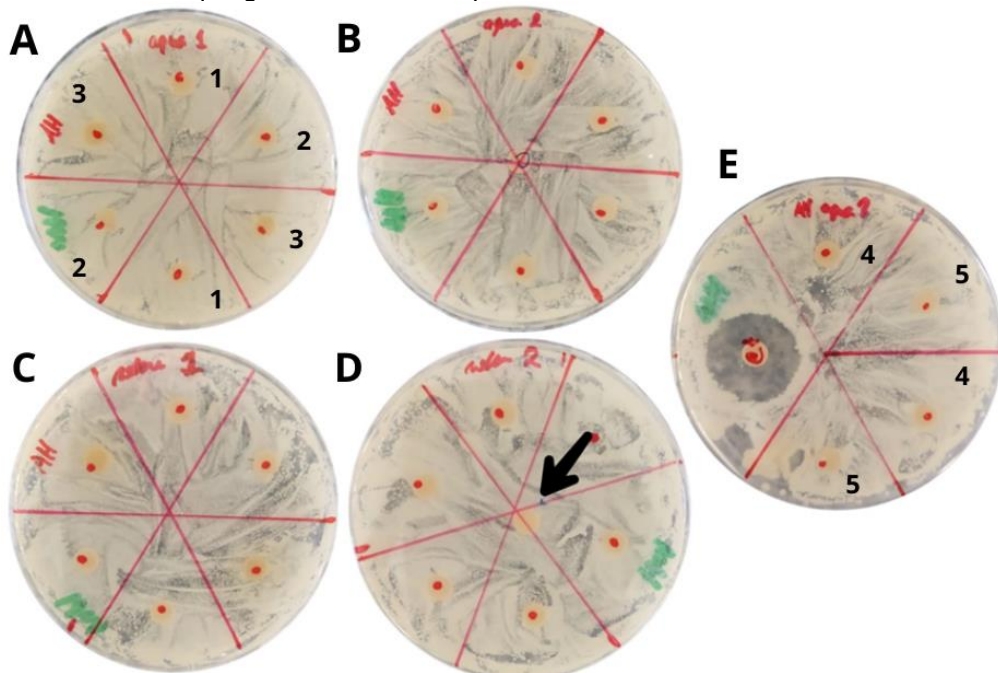
O controle positivo foi satisfatório para as bactérias testadas, gerando halos de 2,5 cm para *S. aureus*, 1 cm para *B. subtilis*, 1,5 cm para *E. coli* e 0,5 cm para *P. aeruginosa*, porém foi ineficaz para *C. auris*.

Imagem 15 – Fotos demonstram, respectivamente, frente e verso da placa sólida de MH inoculadas com colônia do fungo de F2024, assim como com 5 estrias referentes (em sentido horário, iniciando na esquerda) às bactérias *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. subtilis*, *A. hydrophila* e *S. aureus*, segundo metodologia da sessão 3.3.6. O fungo não reduziu o crescimento de nenhuma cepa.



Fonte: autoria própria.

Imagem 16 – Edição de fotos mostrando resultado dos testes de atividade de soluções do fungo de interesse contra *A. hydrophila*. Fotos demonstram verso das placas sólidas de MH inoculadas com o patógeno, assim como com discos de papel filtro, nos quais foram adicionados 5 μ L de soluções em duplicata, conforme orientação da placa A. A: Placa com soluções 1b, 2b e 3b. B: Placa com soluções 5b, 6b, 7b e controle negativo no centro. C: Placa com soluções 1a, 2a, 3a. D: Placa com soluções 5a, 6a e 7a; a duplicata de 7a está no centro, indicado por seta. E: Placa com soluções 4a (indicada pelo número 4) e 4b (indicada pelo número 5), assim como com o controle positivo de canamicina na esquerda, que gerou um halo de aproximadamente 2,5 cm.

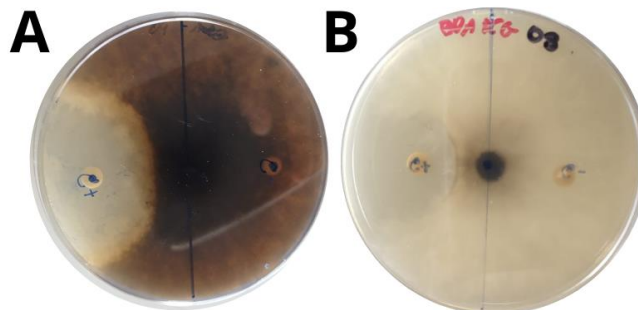


Fonte: autoria própria.

4.6 Testes de atividade contra fitopatógenos

O controle positivo utilizado foi satisfatório para *Lasiodiplodia theobromae* e *Neoscytalidium sp.*

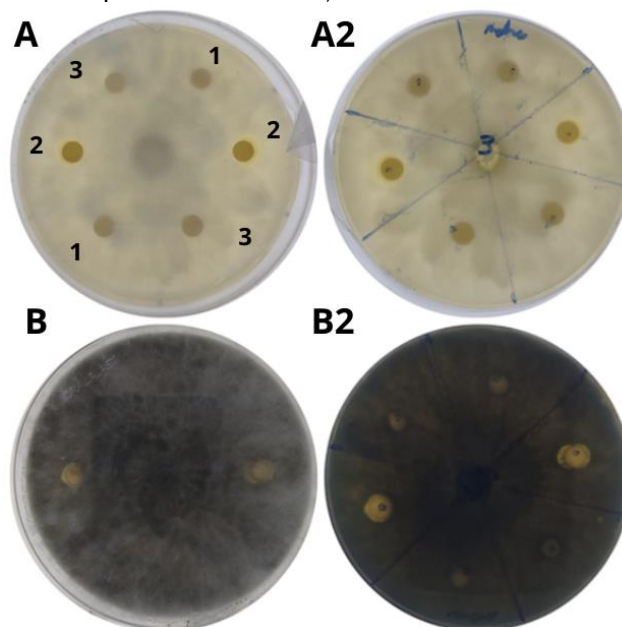
Foto: Controle positivo e negativo de *Neoscytalidium sp.* (A) e *Lasiodiplodia theobromae* (B).



Fonte: autoria própria.

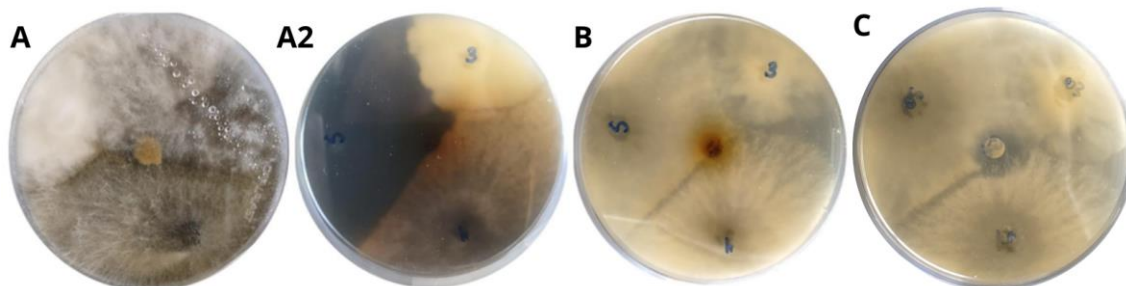
Uma das soluções testadas resultou na formação de um halo de inibição contra *Lasiodiplodia theobromae* e *Phytophthium sp.*, sendo esta 5 μ L do sobrenadante do cultivo de 15 dias em meio MNM (solução 6a). Essa atividade não pôde ser observada claramente no teste de antagonismo.

Figura 17 – Edição de fotos mostrando resultado de um dos testes de atividade de soluções de F2024 contra fitopatógenos; fotos demonstram, respectivamente, frente e verso das placas sólidas de BDA inoculadas no centro com fragmentos de *Lasiodiplodia theobromae* (A e A2) e *Phytophthium sp.* (B e B2), assim como com discos de papel filtro, nos quais foram adicionados em duplicata 5 μ L das soluções 5a, 6a e 7a (respectivamente indicadas pelos números 1, 2 e 3). Todas as placas estão na mesma orientação. Observa-se um halo de aproximadamente 0,5 cm nos discos das soluções 6a.



Fonte: autoria própria.

Imagem 18 – Edição de fotos mostrando resultado de teste de antagonismo entre o F2024 e fitopatógenos; fotos demonstram, respectivamente, frente (A) e verso (A2) das placas sólidas de BDA inoculadas no centro com fragmento de F2024, segundo metodologia na sessão 3.3.6, e ao redor fragmentos de *Lasiodiplodia theobromae* (identificada como nº 3), *Phytophthium sp.* (identificado como nº 5) e *Neoscytalidium sp.* (identificado como nº 4), após 72h em estufa a 25 °, assim como verso após 48h de incubação da mesma placa (B) e do controle positivo (C).



Fonte: autoria própria

5 DISCUSSÃO

A falta de atividade biológica do fungo contra bactérias foi inesperada; considerando que o fungo seja do gênero *Pisolithus*, além do conhecimento tradicional, a revisão bibliográfica de Oliveira *et al.* (2024) indicou que diferentes compostos extraídos de espécies desse gênero fúngico possuem atividade contra as bactérias testadas neste estudo, assim como algumas espécies de *Candida*, oomicetos e fungos fitopatogênicos.

Os trabalhos citados por Oliveira *et al.* (2024) diferem entre si nas metodologias, tanto pela parte do fungo utilizada para extração – basidioma, micélio ou esporos –, fração utilizada – filtrado puro, extrato metanólico, aquoso, alcoólico ou de acetato de etila –, tempo de cultivo, e principalmente, concentração utilizada.

É possível que o fungo estudado neste trabalho não tenha apresentado a atividade biológica esperada pela baixa concentração de extratos utilizada, assim como pelo método de extração em si; novos estudos são necessários para confirmar a ausência de atividade antibacteriana e contra leveduras.

Outra possível explicação para a atividade indicada pelo conhecimento tradicional seja que outras espécies, que fazem parte da microbiota dos corpos de frutificação, tenham atividade antimicrobiana. O estudo de Cullings *et al.* (2020) descreveu parte da microbiota encontrada em *Pisolithus arhizus*, identificando espécies de algas, proteobactérias e bactérias; o estudo ressaltou que ainda não se sabe se a interação ecológica entre esses microrganismos, mas é possível que seja mutualística.

O genoma das espécies presentes no corpo de frutificação da amostra F2024 não foi avaliado, porém observou-se crescimento de diferentes bactérias a partir de fragmentos do corpo de frutificação, assim como prováveis fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*; sabe-se que algumas espécies desses gêneros de fungos são produtores de moléculas com atividade antimicrobiana (Hyde *et al.*, 2019), e que bactérias em geral são fontes de compostos bioativos (Scheneider, Y. K., 2023).

Ademais, é possível que o fungo não tenha atividade antimicrobiana contra patógenos humanos, porém possua atividade anti-inflamatória ou imunomoduladora, que auxiliaria na cura das feridas infectadas. A revisão de Oliveira *et al.* (2024) incluiu vários trabalhos que demonstram que extratos produzidos com *Pisolithus*, assim como moléculas isoladas, possuem significativa atividade antioxidante. Já o trabalho de Kobori, Yoshida, Ohnishi-Kameyama e Shinmoto (2007) mostraram que a molécula ergosterol, isolado de vários basidiomicetos incluindo *Pisolithus*, demonstrou atividade anti-inflamatória pela regulação da resposta imune de macrófagos.

A atividade encontrada do fungo contra fitopatógenos pode expandir os resultados obtidos no trabalho de Ganeshkumar *et al.* (2021), que também identificou efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *Pisolithus* em meio MNMB sobre espécies de oomicetos e fungos.

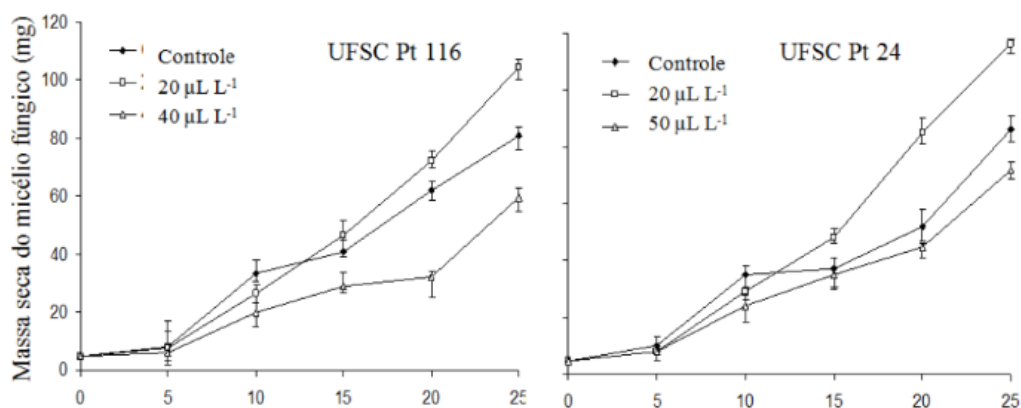
A ausência de atividade durante o teste de antagonismo direto contra fitopatógenos pode se dar por vários fatores. O primeiro deles é a metodologia; no trabalho de Oliveira e Foppa (2014), que avaliou a atividade de *Scleroderma* contra fitopatógenos, o meio utilizado para o teste foi Merlin-Norkans, o fungo foi inoculado no meio de cultura 8 dias antes dos fitopatógenos, e a inibição observada foi discreta, com um halo de 0,3 cm em comparação com o controle. A presença de três fitopatógenos em placa pode ter dificultado a observação da atividade biológica.

Ademais, é possível que as moléculas responsáveis pela atividade antibiótica tenham baixa capacidade de eluição no meio de cultura; sabe-se que o tamanho molecular elevado de produtos naturais modifica sua transferência em diferentes substâncias (Oliveira e Foppa, 2014).

Por fim, o trabalho de Steffen *et al.* de 2013 demonstrou que isolados de *Pisolithus* possuem mais de uma fase de crescimento exponencial e

estacionário. Aos 15 dias, o fungo estaria na transição entre a primeira fase estacionária e a segunda fase de crescimento exponencial, o que explicaria a atividade exclusiva do sobrenadante obtido em 15 dias de cultivo.

Imagem 19: “Curva de crescimento do micélio dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) e *Pisolithus sp.* (UFSC Pt 24) em meio líquido contendo diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto”. A curva controle foi feita pela adição do solvente utilizado no óleo essencial, e os autores afirmam que o controle não afetou o crescimento dos isolados.



Fonte: Editado de Steffen *et al.* (2013).

6 CONCLUSÃO(ÕES)

Foi possível realizar o isolamento de uma das amostras coletadas, assim como cultivos sucessivos para realização de testes de atividade biológica. O sobrenadante não concentrado, obtido no cultivo de 15 dias do fungo em meio Merlin-Norkans modificado, apresentou atividade contra *Lasiodiplodia theobromae* e *Phytophthium sp.* Não foi possível identificar geneticamente a espécie de macrofungo, porém características morfológicas sugerem se tratar de um fungo do gênero *Pisolithus*. Outra amostra coletada na propriedade foi identificada por morfologia e análise genética como sendo do gênero *Scleroderma*, utilizando as mesmas metodologias. Futuros estudos são necessários para confirmar o gênero e identificar a espécie do fungo, assim como para determinar as substâncias responsáveis pela atividade encontrada, e para investigar mais profundamente outras atividades biológicas que expliquem o conhecimento tradicional associado à espécie.

7 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 16, dez. 2006. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000500015>>. Acesso em: 23 fev. 2023.

AMER, O. *et al.* Non liquid nitrogen-based-method for isolation of DNA from filamentous fungi. **AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY**, vol. 10, n. 65, p. 14337-14341, 2011. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/259322591_Non_liquid_nitrogen-based-method_for_isolation_of_DNA_from_filamentous_fungi>. Acesso em: 20 dez. 2023.

ASSIS, N. M. Sistemática e Taxonomia de Fungos Gasteroides (Basidiomycota) na Amazônia Meridional, Brasil. Tese (Mestrado em Sistemática e Evolução) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 128 p., 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/28730/1/Sistematicataxonomiafungos_Assis_2019.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2024.

BALICK, M. J; COX, P. A. Plants, people, and culture: the science of ethnobotany. New York: Scientific American Library, 228 páginas, 1997. Disponível em: <https://archive.org/details/plantspeoplecult0000bali_f9g5/page/38/mode/2up>. Acesso em: 27 fev. 2023.

BRUCE, T. *et al.* Microbial Diversity of Brazilian Biomes. *In*: NELSON, K. E.; JONAS-NELSON, B. **Genomics Applications for the Developing World**, Nova Iorque, Springer New York, 2012, p. 217-247 Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-2182-5_13>. Acesso em: 23 fev. 2023.

CARVALHO, L. T. Caracterização do perfil de susceptibilidade de isolados clínicos de *Neoscytalidium dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* aos antifúngicos e a fotossensibilizadores. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 137 páginas, 2015. Disponível em: < <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17131/tde-20072016-083551/publico/LudmillaTonaniCarvalhoOrig.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2024.

CULLINGS, K. *et al.* Phylum-level diversity of the microbiome of the extremophilic basidiomycete fungus *Pisolithus arhizus* (Scop.) Rauschert: An island of biodiversity in a thermal soil desert. **MycrobiologyOpen**, vol. 9, n. 8, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mbo3.1062#>>. Acesso em: 30 abr. 2024.

DÖRNTE, B.; KÜES, U. Fast Microwave-based DNA Extraction from Vegetative Mycelium and Fruiting Body Tissues of Agaricomycetes for PCR Amplification.

Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, vol. 7, n. 4 p. 825-836, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/262180081_Fast_Microwave-based_DNA_Extraction_from_Vegetative_Mycelium_and_Fruiting_Body_Tissues_of_Agaricomycetes_for_PCR_Amplification>. Acesso em: 20 dez. 2023.

GANESHKUMAR, P. *et al.* Antimicrobial Metabolites from Ectomycorrhizal Fungus, *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker against Soil Borne Plant Pathogens. **Madras Agricultural Journal**, vol. 108, p. 1-5, 2021. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/353903711_Antimicrobial_Metabolites_from_Ectomycorrhizal_Fungus_Pisolithus_tinctorius_Pers_Coker_against_Soil_Borne_Plant_Pathogens>. Acesso em: 25 mar. 2024.

HYDE, K. D. *et al.* The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. **Fungal Diversity**, vol. 97, p. 1-136, 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13225-019-00430-9#Sec53>>. Acesso em: 23 fev. 2023.

JOSE, P. A.; JHA, B. New Dimensions of research on Actinomycetes: Quest for the Next Generation Antibiotics. **Frontiers of Microbiology**, vol. 7, ago. 2016. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01295/full>>. Acesso em: 28 fev. 2023.

KHAFAJI, I. K.; DEWEDAR, A. The efficiency of random versus ethno-directed research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 71, n. 3, p. 365-376, ago. 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874100001641?via%3Dihub>>. Acesso em: 28 fev. 2023.

KOBORI, M.; YOSHIDA, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M., SHINMOTO, H. Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. **Brazilian Journal of Pharmacology**, vol. 150, n. 2, p. 209-219, jan. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2042906/>>. Acesso em: 30 abr. 2024.

LEBEL, T.; PENNYCOOK, S.; BARRET, M. Two new species of *Pisolithus* (Sclerodermataceae) from Australasia, and an assessment of the confused nomenclature of *P. tinctorius*. **Phytotaxa**, vol. 348, n. 3, p. 163-186. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.348.3.1>>. Acesso em: 25 mar. 2024.

LIN, L.; CHANG, T.; TSAI, C.; HUANG, H. Characterization of *Pisolithus orientalis* from Taiwan and its Compatibility with *Cyclobalanopsis glauca*. **Research Journal of Microbiology**, vol. 11, p. 194-201. Disponível em: <<https://scialert.net/fulltext/?doi=jm.2016.194.201>>. Acesso em: 25 mar. 2024.

MADIGAN, M. *et al.* Microbiologia de Brock. Tradução: Alice Freitas Versiani. Porto Alegre: Artmed, 960 páginas, 2016.

MARTIN, F.; DÍEZ, J.; DELL, B.; DELARUELLE, C. Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *New Phytologist*, vol. 153, n. 2, p. 345-357, 2002. Disponível em: <<https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.0028-646X.2001.00313.x>>. Acesso em: 30 abr. 2024.

MARTINS, D. L. *et al.* Resistance of *Aeromonas hydrophila* isolates to antimicrobials and sanitizers. **Ciência Rural**, vol. 53, n. 12, abr. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20220256>>. Acesso em: 15 abr. 2024.

MCCARTHY, C. G. P; FITZPATRICK, D. A. Phylogenomic Reconstruction of the Oomycete Phylogeny Derived from 37 Genomes. **mSphere**, vol. 2, n. 2, 2017. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/msphere.00095-17>>. Acesso em: 15 abr. 2024.

MEYER, M. C. *et al.* *Trichoderma*: uso na agricultura. Brasília, DF: Embrapa, 538 páginas, 2019.

MILIKEN, W. TRADITIONAL MEDICINES AMONGST INDIGENOUS GROUPS IN RORAIMA, BRAZIL: A RETROSPECTIVE. **ETHNOSCIENTIA**, vol. 06, n. 03, p. 116-139, set. 2021. Disponível em: <<https://periodicos.ufpa.br/index.php/ethnoscientia/article/view/10503>>. Acesso em: 01 mar. 2024.

MISFUD, S.; MISFUD, D. Investigation on *Pisolithus* (Fungi, Sclerodermataceae) occurring in the Maltese Islads. **Borziana**, vol. 3, p. 33-44, 2022. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/362060903_Investigation_on_Pisolithus_Fungi_Sclerodermataceae_occurring_in_the_Maltese_Islands>. Acesso em: 25 mar. 2024.

MONEY, N. P. Chapter 1 - Fungal Diversity. *In*: WATKINSON, S. C.; BODDY, L.; MONEY, N. P. **The Fungi**, Academic Press, 3ª ed., p. 1-36, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123820341000013#s0180>>. Acesso em: 27 abr. 2023.

MITTERMEIER, R. A. *et al.* Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. **Conservation International**, 392 páginas, edição revisada, 2005.

MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, vol. 403, p. 853-858, 2000. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/35002501#Sec6>>. Acesso em: 20 fev. 2023.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, vol. 83, n. 3, p. 770-803, mar. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>>. *In*: SCHENEIDER, Y. K. Bacterial Natural Product Drug Discovery for New

Antibiotics: Strategies for Tackling the Problem of Antibiotic Resistance by Efficient Bioprospecting. **Antibiotics**, vol. 10, ed. 7, p. 842, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antibiotics10070842>>. Acesso em: 23 fev. 2023.

OLIVEIRA, L. P; FOPPA, T. Produção de extrato e avaliação antimicrobiana de scleroderma sp pelo método de difusão em ágar e confrontação direta. **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde**, vol. 3, n. 1, p. 49-56, 2014. Disponível em: <<https://periodicos.uniarp.edu.br/index.php/ries/article/view/247>>. Acesso em: 16 fev. 2024.

OLIVEIRA, M. Z. A. *et al.* Fungo Lasiodiplodia theobromae: um problema para agricultura baiana. **Bahia Agrícola**, vol. 9, n. 2, p. 24-29, mar. 2013. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/86075/1/Fungo-Lasiodiplodia-theobromae.pdf>> Acesso em: 20 mar. 2024.

OLIVEIRA, R. S. *et al.* Exploring the Bioactive Potential of *Pisolithus* (Basidiomycota): Comprehensive Insights into Antimicrobial, Anticancer, and Antioxidant Properties for Innovative Applications. **Microorganisms**, vol. 12, n. 3, p. 450, 2024. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/12/3/450>>. Acesso em: 30 abr. 2024.

PILO, P. *et al.* A rapid fungal DNA extraction method suitable for PCR screening fungal mutants, infected plant tissue and spore trap samples. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, vol. 17, jan. 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0885576521001594>>. Acesso em: 28 jul. 2023.

RAJA, H. A. *et al.* Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. **Journal of Natural Products**, vol. 80, n. 3, p. 756-770, fev. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5368684/>>. Acesso em: 28 jul. 2023.

RIFFIANI, R. *et al.* An optimized method for high-quality DNA extraction medicinal fungi *Mycoleptodonoides aitchisonii* for whole genome sequencing. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, vol. 948, Indonesia, ago. 2021. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/948/1/012032>>. Acesso em: 28 jul. 2023.

SANTOS, E. R. Conhecimento etnomicológico de comunidades rurais que habitam o entorno da rebio de pedra talhada, alagoas. Tese (Mestrado em Taxonomia e Ecologia dos Fungos) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Pernambuco. Recife, 91 páginas, 2020. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/40057/1/DISSERTA%c3%87%c3%83O%20Evelyn%20Rodrigues%20dos%20Santos.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2024.

SCHENEIDER, Y. K. Bacterial Natural Product Drug Discovery for New Antibiotics: Strategies for Tackling the Problem of Antibiotic Resistance by

Efficient Bioprospecting. **Antibiotics**, vol. 10, ed. 7, p. 842, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antibiotics10070842>>. Acesso em: 23 fev. 2023.

SCHOCH, C. 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**, vol. 130, n. 16, p. 6241-6246, fev. 2012. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1117018109>>. Acesso em: 27 jul. 2023.

SENANAYAKE, I. C. *et al.* Morphological approaches in studying fungi: collection, examination, isolation, sporulation and preservation. **Mycosphere**, vol. 11, n. 1, p. 2678-2754, dec. 2020. Disponível em: <https://www.mycosphere.org/pdf/MYCOSPHERE_11_1_20.pdf>. Acesso em: 28 abr. 2023.

STEFFEN, R. B. *et al.* Eucalyptus essential oil as Bio-Stimulator of the growth of in vitro ectomycorrhizal fungi. **Ciência Florestal**, vol. 23, n. 2, p. 405-416, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/288385674_Eucalyptus_essential_oil_as_Bio-Stimulator_of_the_growth_of_in_vitro_ectomycorrhizal_fungi>. Acesso em: 30 abr. 2024.

TKACZYK, M. Phytopythium: origin, differences and meaning in modern plant pathology. **Folia Forestalia Polonica**, vol. 62, p. 227-232, 2020. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/347126588_Phytopythium_origin_differences_and_meaning_in_modern_plant_pathology>. Acesso em: 20 mar. 2024.

VARGAS-ISLA, R.; CABRAL, T. S.; ISHIKARA, N. K. Instruções de coleta de macrofungos Agaricales e gasteroides. Primeira edição. Manaus: Editora INPA, 2014. Disponível em: <https://ppbio.inpa.gov.br/sites/default/files/livro_agaricales%20e%20gasteroides%20final%20%28corrigido%29_1.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2023.

VAN DER WESTHUIZEN, G. C. A; EICKER, A. The morphology and cultural characters of *Pisolithus tinctorius* (Gasteromycetes) in South Africa. **South African Journal of Botany**, vol. 55, n. 1, p. 17-21, 1989. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629916312285>>. Acesso em: 25 mar. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: World Health Organization; 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>>. Acesso em: 15 abr. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, fev. 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>. Acesso em: 15 abr. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis, abr. 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>>. Acesso em: 23 fev. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance, nov. 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 23 fev. 2023.

WU, R.; ZHOU, L.; QU, H.; GE, Z-W. Updates on Scleroderma: Four New Species of Section Scleroderma from Southwestern China. **Diversity**, vol. 15, n. 6, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/d15060775>>. Acesso em: 25 mar. 2024.

ANEXO 1 – COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
 Cadastro nº AC02F5D

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AC02F5D**
 Usuário: **Universidade de São Paulo**
 CPF/CNPJ: **63.025.530/0001-04**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Impossibilidade de identificação

Fonte do CTA

CTA de origem identificável diretamente com provedor

Provedor

Gerardo Francisco Gomes

Título da Atividade: **ISOLAMENTO DE MACROFUNGO ENCONTRADO NO VALE DO PARAÍBA**

Equipe

Gabriel Padilla **Universidade de São Paulo**
Dilênia Costa Gomes **Universidade de São Paulo**

Data do Cadastro: **04/04/2024 17:39:00**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **17:40** de **04/04/2024**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**