

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOSCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

**FUNGOS POROIDES (*GANODERMATACEAE*,
BASIDIOMYCOTA) EM ÁREA DE MATA-ATLÂNTICA E PAMPA:
CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DE SUA DIVERSIDADE E
POTENCIAL FARMACOLÓGICO**

TESE DE DOUTORADO

Viviane de Oliveira Garcia

**Porto Alegre, RS, Brasil
2020**

**FUNGOS POROIDES (*GANODERMATACEAE*,
BASIDIOMYCOTA) EM ÁREA DE MATA-ATLÂNTICA E PAMPA:
CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DE SUA DIVERSIDADE E
POTENCIAL FARMACOLÓGICO**

por

Viviane de Oliveira Garcia

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Botânica, da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, RS), como
requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Botânica

Orientadora: Prof^a Dr^a. Rosa Mara Borges da Silveira

**Porto Alegre, RS, Brasil
2020**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Botânica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**FUNGOS POROIDES (*GANODERMATACEAE*,
BASIDIOMYCOTA) EM ÁREA DE MATA-ATLÂNTICA E PAMPA:
CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DE SUA DIVERSIDADE E
POTENCIAL FARMACOLÓGICO**

elaborada por
Viviane de Oliveira Garcia

como requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Botânica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Rosa Mara Borges da Silveira, Dra. (UFRGS)
(Presidente/Orientador)

Tânia Mara Pizzolato, Dra. (UFRGS)

Diogo Henrique Costa Rezende, Dr. (UEFS)

Alexandre Macedo, Dr. (UFRGS)

Porto Alegre, 28 de agosto de 2020.

DEDICATÓRIA

*Ao homem mais leal e corajoso
que conheci, **Coraldino Alves
Garcia**, meu porto seguro, minha
fortaleza, meu oásis, meu
aconchego, meu pai.*

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho ocorreu, principalmente, pelo auxílio, compreensão e dedicação de várias pessoas. Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste estudo e, de uma maneira especial, agradeço:

- a professora Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, pela confiança em mim depositada, e pela pessoa humana, pela coerência, pela dedicação e principalmente, pela inspiração e exemplo de profissional, grata pela co-orientação;

- aos meus colegas do Lab 105, que se tornaram amigos inesquecíveis e nunca me deixaram desistir, Diego Deferrari, Rafael Von Borovski, Jéssica Gotardi, Cesar Hoffmann, Elenilson Figueiredo e Josi Santos, grata pela força diária que necessitei em alguns momentos desta caminhada;

- aos meus colegas do Micolab, pela parceria e companheirismo nas árduas saídas a campo, Altielys Casale Magnhago, Genivaldo Alves Silva, Shirley C. Feuerstein, Bárbara L. B. Schünemann, grata pelo aprendizado;

- aos meus amigos, Carlos Salvador-Montoya, Vinícius Bueno, Eudes M. S. Alves, Alexandre C. Martins, Mabel Rocio e Juliana Troleis; muito grata à vida por ter conhecido vocês, que sempre me deram incentivo;

- aos professores da Universidade Federal de Santa Maria, Dr. Rafael Lazzari, Dra. Lílíana Essi, Dr. Gilberto Coelho e Dra. Vanessa Fortes, sou imensamente grata por acreditarem em mim;

- à Secretária do Curso de Pós Graduação em Botânica, Milene Hemann Moreira, pela dedicação e competência;

- à Dra. Mayara Crespo pelo profissionalismo e amizade, nunca esquecerei;

- a minha orientadora, Dra. Rosa Mara B. da Silveira, grata pela oportunidade de realizar este sonho e fazer parte desta equipe;

- à Universidade pública, gratuita e de qualidade: sou grata a Universidade Federal de Santa Maria, por ter forjado a pessoa que me tornei e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela possibilidade de me desenvolver como estudiosa da Micologia.

Se esta tese está sendo lida, devo isso a todos que passaram pela minha vida nestes quatro anos, desde aquelas pessoas que me fizeram sofrer até aqueles que me fizeram levantar. Cada um tem uma importância diferente nesse processo de amadurecimento, sou grata a todos por me tornarem um ser humano melhor.

EPÍGRAFE

“...Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que eu era antes...”

Marthin Luther King

RESUMO

Tese de Doutorado
Curso de Pós-Graduação em Botânica

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
**FUNGOS POROIDES (*GANODERMATACEAE*,
BASIDIOMYCOTA) EM ÁREA DE MATA-ATLÂNTICA E PAMPA:
CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DE SUA DIVERSIDADE E
POTENCIAL FARMACOLÓGICO**

AUTORA: VIVIANE DE OLIVEIRA GARCIA
ORIENTADOR: ROSA MARA BORGES DA SILVEIRA
Data e local da defesa: Porto Alegre/RS, 2020

Resumo

Os fungos ocupam um lugar particular na história da humanidade. Menos estudados que as plantas, a funga brasileira segue quase desconhecida tanto em termos taxonômicos quanto em termos de potencial biotecnológico. No oriente a funga faz parte da Medicina Tradicional Chinesa e fornece insumos para a indústria de suplementos alimentares e cosméticos. Dentro desta ótica faz-se necessário o desenvolvimento de uma rede de conhecimentos sobre as espécies fúngicas brasileiras com potencial biotecnológico.

As regiões sudeste/sul da Mata Atlântica abrigam uma importante parcela da biodiversidade fúngica do Brasil e compreendem regiões que são *hotspots*, onde os estudos taxonômicos progridem.

Este estudo pretendeu gerar conhecimento sobre o potencial biotecnológico dos espécimes fúngicos da família *Ganodermataceae*, a mais estudada a nível mundial, nas regiões sudeste/sul da Mata Atlântica e do Pampa gaúcho. Aspectos taxonômicos, farmacológicos e químicos foram abordados. A região de coleta abrangeu os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo onde quatro gêneros foram encontrados: *Ganoderma*, *Amauroderma*, *Foraminispora* e *Cristataspora*.

Após identificação taxonômica e molecular foram produzidos extratos etanólicos os quais foram submetidos a testes biológicos *in vitro* e a análise de um dos extratos por espectrometria de massas. A análise química dos extratos de *Foraminispora rugosa*, apontou a presença de oxilipinas.

Foram determinadas as concentrações dos extratos que induzem à metade do efeito máximo (IC₅₀) nos ensaios que avaliaram a atividade citotóxica, ação tricomonocida e antibiofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*.

Pela primeira vez foi avaliada a ação biológica do macrofungo *Amauroderma schomburgkii* e *F. rugosa*, ambos, moderadamente tóxicos, mas o primeiro, apresentando potencial como agente antibiofilme estafilocócico.

A atividade tricomonocida foi proeminente em amostras pertencentes ao subgênero *Ganoderma*, entretanto, estas amostras permanecem não identificadas.

Os extratos quando testados como agentes citotóxicos não apresentaram um bom índice de seletividade quando comparados às células saudáveis.

Palavras-chave: Biodiversidade. Funga. Produtos Naturais. Bioprospecção.

ABSTRACT

Tese de Doutorado
Curso de Pós-Graduação em Botânica

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
**FUNGOS POROIDES (*GANODERMATACEAE*,
BASIDIOMYCOTA) EM ÁREA DE MATA-ATLÂNTICA E PAMPA:
CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DE SUA DIVERSIDADE E
POTENCIAL FARMACOLÓGICO**

**(POROID FUNGI (*GANODERMATACEAE*,
BASIDIOMYCOTA) IN ATLANTIC FOREST AND PAMPA:
CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF ITS DIVERSITY AND
PHARMACOLOGICAL POTENTIAL)**

AUTHOR: VIVIANE DE OLIVEIRA GARCIA
ADVISOR: ROSA MARA BORGES DA SILVEIRA
28/08/2020- UFRGS - Porto Alegre/RS

Fungi occupy a particular place in human history. Less studied than plants, the Brazilian fungus remains almost unknown both in taxonomic terms and in terms of biotechnological potential. In the East, the fungus is part of Traditional Chinese Medicine and provides raw material for the food supplement and cosmetics industry.

Within this perspective, it is necessary to develop a network of knowledge about Brazilian fungal species with biotechnological potential. The southeast / south regions of the Atlantic Forest are home to an important portion of Brazil's fungal biodiversity and comprise regions that are hotspots, where taxonomic studies progress.

This study aimed to generate knowledge about the biotechnological potential of fungal specimens of the *Ganodermataceae* family, the most studied worldwide, in the southeastern / southern regions of the Atlantic Forest and Pampa. Taxonomic, pharmacological and chemical aspects were addressed. The collection region covered the states of Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro and Espírito Santo where four genera were found: *Ganoderma*, *Amauroderma*, *Foraminispora* and *Cristataspora*.

After taxonomic and molecular identification, ethanolic extracts were produced which were subjected to biological tests in vitro and the analysis of one of the extracts by mass spectrometry. The chemical analysis of *Foraminispora rugosa* extracts showed the presence of oxilipins.

The concentrations of the extracts that induce half of the maximum effect (IC_{50}) in the tests that evaluated the cytotoxic activity, trichomonocidal action and antibiofilm of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* were determined. For the first time, the biological action of the macrofungus *Amauroderma schomburgkii* and *F. rugosa*, both moderately toxic, was evaluated, but the first, presenting potential as a staphylococcal antibiofilm agent. Trichomonocidal activity was prominent in samples belonging to the *Ganoderma* subgenus, however, these samples remain unidentified. The extracts when tested as cytotoxic agents did not show a good selectivity index when compared to healthy cells.

Keywords: Biodiversity, funga, natural products, bioprospection.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Rendimento dos extratos.....	49
Quadro 2: Amostras identificadas até gênero.....	144
Tabela 1: Efeitos citotóxicos de ácidos ganodéricos.....	36
Tabela2: Localidades de coleta.....	56
Tabela 3: Relações morfológicas entre <i>G. parvulum</i> e <i>G. martinicense</i>	59
Tabela 4: Extratos etanólicos sujeitos aos teste colorimétricos clássicos..	144

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

Figura 1: Diferença morfológica entre <i>G. lucidum</i> e <i>G. lingzhi</i>	21
Figura 2: Biossíntese de esteróis.....	24
Figura 3: Rota do Mevalonato.....	26
Figura 4: Estrutura de triterpenos lanostanos.....	28
Figura 5: Possível rota biossintética de ácidos ganodéricos em <i>G. lingzhi</i>	28
Figura 6: Estruturas de alguns ácidos ganodéricos.....	30
Figura 7: <i>G. lucidum</i> em diferentes fases de desenvolvimento.....	31
Figura 8: Etapa de oxidação do lanosterol.....	32
Figura 9: Fases do desenvolvimento de biofilmes.....	38
Figura 10: Trofozoíto de <i>T. vaginalis</i>	41
Fluxograma 1: Fluxograma mostrando a ordem dos experimentos.....	50
Figura 11: Separação de moléculas por ultrafiltração.....	53
Figura 12: Extratos sob efeito de testes colorimétricos clássicos.....	145
Figura 13: Padrão de fragmentação do ácido ganodérico A.....	146
Figura 14: Padrão geral de fragmentação de ácidos ganodéricos.....	146
Gráfico 1: Potencial trichomonocida dos extratos fúngicos.....	148
Gráfico 2: Potencial trichomonocida das subfrações	149
Gráfico 3: Curva dose-resposta da subfração de <i>Ganoderma</i> sp3.....	150
Gráfico 4: Citotoxicidade do subextrato ciclohexânico de <i>Ganoderma</i> sp3. em células Vero.....	150

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
INTRODUÇÃO.....	15
REVISÃO DA LITERATURA.....	16
GÊNEROS EM GANODERMATACEAE.....	18
BIOPROSPECÇÃO EM GANODERMATACEAE.....	20
COMPOSTOS TRIPERPENÓIDES DE ORIGEM NATURAL.....	22
BIOSSÍNTESE DE TRITERPENÓIDES.....	23
ROTAS BIOSINTÉTICAS.....	24
ROTA DO MEVALONATO.....	25
ÁCIDOS GANODÉRICOS.....	27
FUNGOS DA FAMÍLIA GANODERMATACEAE COMO AGENTES CITOTÓXICOS.....	33
FUNGOS DA FAMÍLIA GANODERMATACEAE COMO AGENTES ANTIBIOFILME.....	37
FUNGOS DA FAMÍLIA GANODERMATACEAE COMO AGENTES ANTIPARASITÁRIOS.....	39
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECÇÃO ESPECTROMÉTRICA.....	42
OBJETIVOS.....	44
HIPÓTESES.....	45
JUSTIFICATIVA.....	45
MATERIAL E MÉTODOS.....	46

ARTIGO 1.....	60
ARTIGO 2.....	92
RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL.....	143
CONSIDERAÇÕES FINAIS/TRABALHOS FUTUROS.....	151
CONCLUSÃO GERAL.....	153
REFERÊNCIAS.....	154

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18S	Gene que codifica a subunidade menor (SSU rRNA) RNA ribossomal.
28S	Gene que codifica a nuclear da subunidade grande (LSU rRNA) do RNA ribossomal.
4T1	Células de carcinoma mamário murinho
AACT	Acetil-CoA acetiltransferase
ATCC	American Type Culture Collection
BALB/c	Camundongo albino de laboratório.
Bcl1	Oncogene envolvido na Leucemia linfocítica crônica
BimL	Mediador da família BIM, que interage com Bcl-2 da morte celular, isoforma L, indutor de apoptose
BimS	Mediador da família BIM, que interage com Bcl-2 da morte celular, isoforma S, indutor de apoptose
C	Átomo de carbono
CID	Dissociação induzida por colisão
cMyc	Gene que codifica uma proteína que desempenha papel crucial na regulação do ciclo celular. Alterações no gene c-MYC estão relacionadas ao desenvolvimento e manutenção tumoral em vários tipos de câncer.
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol, marcador fluorescente que se liga a regiões de DNA ricas em adenina-timina.
DBE	Equivalente de ligação dupla (double bond equivalent)
DMAPP	Dimetil alila difosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eDNA	DNA extra celular
ESI	Ionização por electrospray
Fas	Proteína transmembranar que pertence à família dos fatores de necrose tumoral, a ligação com seu receptor induz apoptose.
FasL	Proteína transmembrana da família do fator de necrose tumoral.
Fox03	FOXO3 pertence à subclasse O da família forkhead (cabeça do garfo) de fatores de transcrição, a desregulação deste gen é associada à tumorigênese.
FoxN1	Proteína N1 da forkhead box, é um fator de transcrição
FPP	Farnesil dofosfato
FPPs	Farnesil difosfate sintetase
GA	Ácido ganodérico (ganoderic acid)
GGPP	Gerani-geranil difosfato
GGPPs	Geranil-geranil-difosfato sintetase
HMGR	3-hydroxi-3-metilglutaril-CoA reductase
HMGs	3-hydroxi-3-metilglutaril-CoA siintetase
IB	Inferência bayesiana
IDI	Isopentenila-difosfato isomerase
IPP	Isopentenila difosfato

ITS	Espaçador interno transcrito (Internal transcribed spacer)
LDH	Lactato desidrogenase
m/z	Razão massa/carga (mass-to-charge ratio)
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama em humanos
MDA-MB-231	Linhagem celular modelo para cancer invasivo de mama, isolado de M D Anderson
MICOLAB	Laboratório de Micologia- UFRGS
MK	Mevalonate quinase
MPK	Fosfomevalonato quinase
MS	Espectrometri de massas (mass spectrometry)
MS/MS	Espectrometria de massas hifenizada
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
MVD	Pirofosfomevalonato descarboxilase
MW	Peso molecular
nLSU	Gene que codifica a nuclear da subunidade maior (Nuclear large subunit ribosomal ribonucleic acid, LSU rRNA) RNA ribossomal.
NO	Óxido nítrico
OSC	2, 3-oxidosqualene-lanosterol cyclase
P53	Gene supressor tumoral, codifica uma proteína de reparo do DNA.
PCR	Reação em cadeia da polimerase
ppm	Partes por milhão
QTOF	Analisador de quadrupolo por tempo de vóto
RDB	Regra da ligação dupla (rule double bond)
rFIP-gat	Gene recombinante que codifica uma proteína imunomodulatória fúngica, no caso, do <i>Ganoderma atrum</i> .
RNA	Ácido ribonucleico
rpb2	Gene que codifica a segunda maior subunidade da RNA polymerase II.
S.L	<i>Sensu latu</i>
s.s	<i>Sensu strictu</i>
SE	Esqualeno monoxigenase
SQS	Esqualeno sintetase
SRB	Sulfrodamina B
tef 1 α	Gene que codifica o fator de alongação 1 α
TNF- α	Fator tumoral alfa, citocina capaz de provocar a morte de células tumorais.
TYM	Trypticase-yeast extract-maltose
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
VM	Máxima verossimilhança
β -tubulina	Gen que codifica a proteína β -tubulina, uma das proteínas do microtúbulo.

1 INTRODUÇÃO

Neste trabalho são apresentados os principais resultados da identificação e dos ensaios biológicos realizados com os espécimes de macrofungos da família *Ganodermataceae* coletados na região Sul e Sudeste da Mata Atlântica e na região do Pampa gaúcho. Ainda, serão apresentados os resultados dos ensaios biológicos e a avaliação química, realizada através de espectrometria de massas, de um espécime de *Foraminispora rugosa* (Berk.) Costa-Rezende, Drechsler-Santos & Robledo 2017. Os resultados expressam o perfil de *Ganodermataceae* nesta região dos Neotrópicos: estado do Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR), São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ) e Espírito Santo (ES).

Este trabalho está dividido em Introdução, Revisão bibliográfica (fundamentação teórica), Objetivos, Hipótese, Justificativa, Material e Métodos, Resultados: Artigo 1 e Artigo 2, Resultados e Discussão Geral e Considerações Finais/Recomendações para Trabalhos Futuros.

Nos artigos:

Artigo 1: São demonstrados os resultados da avaliação de citotoxicidade de *F. rugosa* pela primeira vez. O artigo publicado na revista *Botanical Studies*.

Artigo 2: São apresentados os resultados da identificação e da análise filogenética baseadas em análise de Máximo Verossimilhança e Análise Bayesiana das sequências concatenadas de ITS e 28S de todos espécimes coletados na região de estudo que sofrerão ensaio biológico. O artigo será submetido para a revista *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*.

Todas as referências bibliográficas citadas no referencial teórico, Material e Métodos e Discussão Geral são apresentadas após as Considerações Finais/Recomendações para Trabalhos Futuros.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nas últimas décadas taxa fúngicas sofreram e estão sofrendo redefinições. A definição de “fungos” enquanto Reino tem mudado constantemente conforme vão se conhecendo novos seres que apresentam “sinapomorfias fúngicas”, mas não são fungos, ou organismos proximalmente relacionados a fungos, mas que não se encaixam nas sinapomorfias clássicas. Desta forma, a presença de ergosterol e quitina na membrana celular e a osmotrofia não são mais consideradas como características definidoras do Reino Fungi (Torruella *et al.*, 2015, Richards and Wideman, 2017). Contudo, o sub-reino Dycaria é um grupo monofilético, onde estão agrupados os fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota, que são grupos altamente bem sucedidos, tanto em termos de diversidade evolutiva, como de biomassa ecológica (Richards e Wideman, 2017). Basidiomycota constitui o segundo filo em número de espécies. Neste taxa os organismos caracterizam-se pelos basídios como meiosporocistos durante o estágio de vida sexual. A cariogamia e a meiose ocorrem nos basídios, quando os basidiósporos são, então, formados (He *et al.*, 2019).

Na natureza, uma importante fração de carbono ambiental é fixada pelas plantas e acumulada como lignina. Este heteropolímero aromático e complexo é abundante nas plantas que produzem madeira, conferindo rigidez mecânica. Ao acumular-se no solo, forma parte importante da matéria orgânica (Martínez *et al.*, 2005, Thevenot *et al.*, 2010). Contudo, a habilidade para degradar lignina, surgiu uma única vez na biosfera, dentro de *Agaricomycetes*, nos fungos de podridão branca, pois removem a lignina escura da madeira (Naranjo-Ortiz e Gabaldón, 2019).

Fungos da ordem Polyporales Gäum. (1926) são definidos pela monofilia, bem suportada, e compreendem os fungos degradadores de madeira. Aqui, encontram-se os macrofungos de podridão branca e os de podridão parda, sendo que a ordem apresenta cerca de 1800 espécies descritas (Kirk, 2008). Quanto à morfologia do basidioma, porém, *Polyporales*, não tem uma sinapomorfia única devido a convergências evolutivas (Binder *et al.* 2005). Em *Polyporales*, está contida a família *Ganodermataceae*. Segundo

Donk (1948) a família define-se por apresentar características marcantes no basidioma, como, apresentar o himenóforo branco quando jovem, a presença de poros e tubos estratificados no contexto, o sistema hifal dimítico em alguns casos e trimitico em outros (com os três tipos de hifas: generativas, esqueletais e ligadoras), mas sempre com fíbulas nas hifas generativas. As hifas esqueletais estão presentes formando a estrutura rígida do basidioma. Quanto aos basidiósporos, mostram-se sempre com dupla camada, sendo a interna ornamentada e colorida, e a externa, fina e hialina. Os gêneros desta família podem ser separados por caracteres como a ornamentação dos esporos (Kirk, 2008) e as hifas presentes no contexto (Costa-Rezende *et al.*, 2017).

As espécies são cosmopolitas e crescem no solo (quando o fungo parasita raízes) ou cresce sobre madeira morta, ou ainda, expoliando árvores vivas. Existem cerca de 220 espécies descritas para *Ganodermataceae* e cinco gêneros amplamente aceitos (Moncalvo e Ryvarden, 1997, Ryvarden, 2004).

Contudo, Costa-Rezende *et al.*, 2016, 2017 e 2020 reagrupou as espécies conforme as análises morfológicas e taxonômicas, sugerindo novos gêneros, que serão considerados neste trabalho. Assim, *Ganodermataceae* contém os seguintes 11 gêneros: *Ganoderma*, *Amauroderma*, *Amaurodermellus*, *Furtadoa*, *Foraminispora*, *Cristataspora*, *Magoderna*, *Sanguinoderma*, *Haddowia*, *Trachyderma* e *Tomophagus*, (Furtado, 1981. Moncalvo *et al.* 1995, Moncalvo & Ryvarden 1997, Ryvarden 2004, Kirk *et al.* 2008, Costa-Rezende *et al.* 2017, 2020, Sun *et al.*, 2020).

A família *Ganodermataceae* pode ser reconhecida por apresentar macrofungos de basidioma perene ou anual (com contexto podendo conter várias camadas de tubos), estipitados ou sésseis, podendo apresentar o píleo lacado ou opaco. A superfície dos poros é branca quando jovem ou marrom quando madura. Contudo, a característica mais peculiar está nos basidiósporos, que apresentam dupla camada: uma interna ornamentada, engrossada e colorida e uma externa, mais fina e hialina (Donk, 1948).

5.1 Gêneros em *Ganodermataceae*

Ganoderma (P. Karst., 1881)

A espécie tipo é a mais estudada, principalmente por suas propriedades farmacológicas, *Ganoderma lucidum*.

Este gênero compreende espécies que são pileadas ou sésseis. São degradadores de madeira de podridão branca e algumas espécies são parasitas. Este gênero caracteriza-se por apresentar basidiospоро de parede dupla, truncado e elipsoide, cuja ornamentação é colunar. Neste gênero encontram-se os problemas taxonômicos mais relevantes e que ameaçam o uso destas espécies como ativo medicinal. Devido a ocorrência de muitas espécies crípticas difíceis de separar, afirmou Ryvardem (1991): “um caos taxonômico”. As espécies têm distribuição mundial tanto em climas tropicais, quanto em regiões temperadas e crescem como um parasita facultativo ou como sapróbios em tocos e raízes podres (Du et al., 2019).

Amauroderma (Murrill, 1905)

Cerca de 40 espécies são descritas atualmente para este gênero. A espécie tipo é *Amauroderma regulicolor* (Berk. ex Cooke) Murrill (sinonímia de *A. schomburgkii*). Os basidiomas são pileados, crescem no solo sobre tocos de madeira morta ou raízes de árvores vivas, são de distribuição pantropical e algumas apresentam registro de atividade farmacológica. O basidiósporo é caracterizado por seu formato globoso a subgloboso e sua ornamentação em pilares entre a camada interna e a externa.

Amaurodelmellus (Costa-Rezende, Drechsler-Santos & Góes-Neto 2020)

Semelhante ao *Amauroderma*, porém, apresenta basidiósporos ovoides e o contexto é branco.

Magoderma (Steyaert 1972)

Apresenta a superfície do píleo escura e lacada, contexto fibrótico, hifas da cobertura do píleo são anticlinais. Os basidiósporos são ovoides.

Trachyderma ((Imazeki) Imazeki 1952)

De basidiósporo truncado, tem como principal característica o contexto: suculento e carnososo quando maduro.

Sanguinoderma (Y.F. Sun, D.H. Costa & B.K. Cui 2020)

Este gênero contém espécies africanas, asiáticas e da Oceania, num total de cinco espécies até agora. Apresenta como característica a mudança de coloração da superfície dos poros, que adquire coloração vermelho sangue, quando manipulado.

Cristataspora (Robledo & Costa-Rezende 2020)

A este gênero pertencem espécies estipitadas, terrestres de podridão branca e distribuição pantropical. O basidiósporo caracteriza-se por serem truncados, como em *Ganoderma*, porém apresentam a ornamentação com cristas reticuladas verticais ou transversas, livres ou suavemente anastomosadas. São conhecidas duas espécies, *C. coffeata* e *C. flavipora*. A primeira refere-se ao sinônimo, ainda aceito, *Humphreya coffeata*.

Foraminispora (Robledo, Costa-Rezende & Drechsler- Santos 2017)

Gênero com uma espécie até 2017. Em 2020 (Costa-Rezende *et al.*, 2020) foram descobertas várias espécies asiáticas com os pilares (que unem o endósporo ao exósporo) ocas. *Apresenta esporos semelhantes a Amauroderma* sob microscopia óptica, mas em análise por ultramicroscopia, pode-se observar a característica dos pilares ocas (Costa-Rezende, 2017).

Furtadoa (Costa-Rezende, Robledo & Drechsler-Santos, 2017)

Apresenta 3 espécies até o momento, crescem no solo ou sobre madeira de angiospermas. Até agora, só há registros para a América do Sul. O basidiósporo não é o caracter diagnostico deste gênero, pois é semelhante a *Amauroderma*. *Furtadoa* caracteriza-se por apresentar sistema hifal

monomítico, no contexto, enquanto em *Amauroderma*, as hifas são dimíticas. O tipo é *Furtadoa biseptata* (Costa-Rezende, Drechsler-Santos & Reck, 2017).

Tomophagus (Murrill, 1905)

Tomophagus colossos (Fr.) Murrill, é a espécie tipo neste gênero, que conta, até agora com duas espécies descritas. *T. colossos* e *T. cattienensis*. Apresenta basidioporos helipsoides e truncados, mas se diferencia de *Ganoderma* por apresentar um contexto leve, esponjoso e espesso (enquanto *Ganoderma* tem contexto duro e rígido), onde são produzidos clamidósporos (esporos vegetativos).

5.2 Bioprospecção em *Ganodermataceae*

A espécie tipo de *Ganodermataceae*, *Ganoderma lucidum*, é caracterizada por seu píleo lacado e seu conteúdo de polissacarídeos e ácidos ganodéricos, sendo muito importante na cultura asiática e na Medicina Tradicional Chinesa (Hapuarachchi, 2017). Entretanto, *G. lucidum* foi descrito na Europa em 1844. Em 2012, Cao e colaboradores, comprovaram que o “*Ganoderma lucidum*” da China, conhecido como “Lingzhi” (Dai *et al.*, 2017), não é co-específico com o *G. lucidum* europeu ao avaliar, filogeneticamente, sequências de ITS e β -tubulina. (Cao *et al.*, 2012, Dai *et al.*, 2017). Os autores sugeriram o nome de *Ganoderma lingzhi*. Em 2016 outro grupo de pesquisa comprovou a composição química diferenciada entre as duas espécies e sugeriu caracteres morfológicos, não muito expressivos, para a diferenciação entre espécies. Os caracteres sugeridos foram a pequena diferença de altura do mixosporo, a cor da superfície dos poros e a sutil diferença entre o formato dos poros (Hennicke *et al.*, 2016). A fig. 1 apresenta os resultados morfológicos diferenciais entre *G. lingzhi* e *G. lucidum* de amostras comerciais (Hennicke *et al.* 2016).

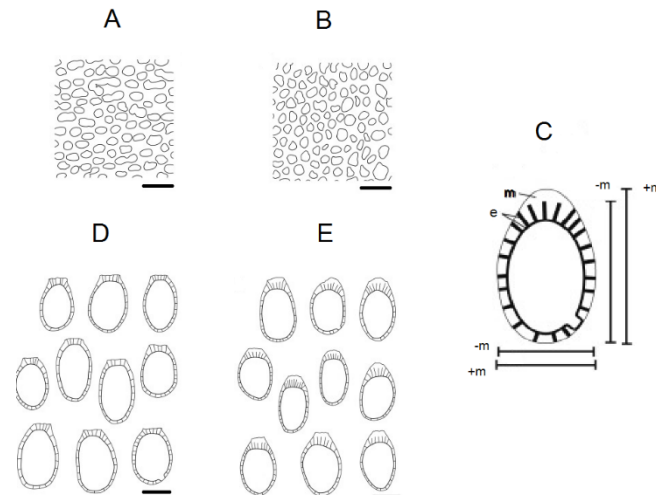


Fig.1: Diferenças morfológicas entre *Ganoderma lucidum* (à esquerda) e *Ganoderma lingzhi* (à direita) (A e B) A diferença na abertura dos poros. Escala: 0.5 mm. (C) Ilustração representativa de um basidiósporo demonstrando: o mixosporo hialino (m), o exosporo (e) e as ornamentações em forma de pilares, que vão do exósporo ao mixosporo exceto na parte superior do esporo. As barras mostram as medidas com mixosporo (+m) e sem mixosporo (-m). (D e E) Basidiosporos. Escala: 5 μ m. Adaptado de Hennicke *et al.* 2016.

De fato a caracterização morfológica clássica apresenta-se muito limitada no sentido de refletir a diversidade genética. Este fato ficou mais claro após o advento da análise filogética e foi reforçado após o advento da metagenômica. Como consequência, conhece-se muito pouco sobre o que de fato existe, mesmo que algumas espécies sejam muito abundantes na natureza.

“*Ganoderma lucidum*” é um complexo de espécies mal identificadas e vários estudos tentam nortear o verdadeiro nome dos insumos fúngicos que estão sendo consumidos, tanto na Ásia, como no resto do mundo. Os pesquisadores têm utilizado marcadores como as regiões do ITS, 18S, 28S, β -tubulina, rpb2, tef 1 α , entre outros (Smith e Sivasithamparam, 2000; Kwon *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2012; Hapuarachchi *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015; Hennicke *et al.* 2016, Dai *et al.*, 2017; Jargalmaa *et al.*, 2017).

Embora a genômica tenha revolucionado a taxonomia de fungos, existe uma necessidade crescente de mesclar esse tipo de abordagem com outras como a bioquímica, ecológica, morfológica e ontológica, a fim de fornecer

hipóteses testáveis sobre biologia fúngica (Naranjo-Ortiz MA and Gabaldón, 2019).

Atualmente, extratos de macrofungos são comercializados como complementos alimentares e produtos nutracêuticos (Giavasis, 2014, Bishop *et al.*, 2015), especialmente no Oriente. Além disto, a indústria oriental incorpora extratos fúngicos de *G. lucidum* também em cosméticos, com a função de rejuvenecedor, anti-oxidante, e em tratamentos para clareamento da pele (por inibição de tirosinase) (Chien *et al.*, 2008, Weng *et al.*, 2010, Taofiq *et al.*, 2016, 2017, Kim *et al.*, 2016, Li *et al.*, 2019).

Novos estudos também apontam a utilização de extratos ou compostos isolados de *G. lucidum* como neuroprotetor, hepatoprotetor, anti-inflamatório, regulador do metabolismo e no tratamento da obesidade (Chang *et al.*, 2015, Chen *et al.*, 2019, Wang *et al.*, 2019, Diling *et al.*, 2020).

Dentre os compostos isolados, os mais promissores são os ácidos ganodéricos. Estas moléculas pertencem à classe dos terpenoides (Bhat *et al.*, 2019). Entretanto, a literatura aponta mais de 400 (!) compostos isolados apenas do gênero *Ganoderma* (Baby *et al.* 2015).

5.3 Compostos triterpenoides de origem natural

Todos os organismos vivos produzem milhares de compostos orgânicos de baixo peso molecular. Muitos destes compostos, não apresentam função direta no crescimento e desenvolvimento destes seres vivos, por isto recebem o nome de metabólitos secundários. Entre os metabólitos secundários, os terpenos servem aos organismos como repelentes, toxinas ou atrativos para outros organismos e várias outras funções ecológicas, atuando em interações mutualísticas e antagonísticas entre todos os seres vivos (Gershenzon e Dudareva, 2007). São exemplo as piretrinas, que são um grupo de monoterpenos de esteris de ciclopropila. As piretrinas são compostos extraídos de flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e *Chrysanthemum coccineum*, da família *Asteraceae* que são utilizados comercialmente como inseticidas. (Soderlund, 1995). Estudos comprovaram a sua eficácia contra insetos das ordens *Coleoptera*, *Hemiptera* (*Homoptera* e *Heteroptera*), *Diptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Orthoptera* e *Thysanoptera* (Bhardwaj *et al.*, 2020).

Outro terpenoide de uso comercial e importante agente farmacológico é o paclitaxel, cuja fórmula molecular é $C_{47}H_{51}NO_{14}$. Este constituinte é um diterpeno nitrogenado e polioxigenado, sintetizado naturalmente nas folhas e na casca por plantas do gênero *Taxus*, quando em relação mutualística com um fungo endofítico. Paclitaxel foi isolado em 1971, nos EUA. Em 1993, o fungo endofítico, *Taxomyces andreanae*, foi descoberto nos tecidos de *Taxus brevifolia*. Estudos *in vitro* comprovaram que o fungo foi capaz de produzir paclitaxel e que pelo menos outros 18 gêneros de fungos são conhecidos hoje como produtores de paclitaxel. Este diterpeno foi desenvolvido para comercialização em larga escala pela companhia americana Bristol-Meyers Squibb com o nome de Taxol® sendo disponível como medicamento, hoje em dia, em mais de 60 países (Soliman *et al*, 2011). Atualmente é utilizado como agente antineoplásico no tratamento de câncer de pulmão, mama, próstata e ovário (Zhao *et al.*, 2012).

Na biossíntese de paclitaxel, o precursor do anel taxano é o geranylgeranyl-difosfato (GGPP), que é derivado do isopentenila-pirofosfato (IPP). Conforme Zhao, (2012) outros fungos endofíticos também possuem maquinaria metabólica para produção de triterpenoides com atividade antineoplásica, exemplos são a vimblastina (*Alternaria* sp.) e a vincristina (*Fusarium oxysporum*).

5.4 Biossíntese de Terpenoides

De maneira geral, terpenoides são produtos naturais amplamente distribuídos, que se constituem por unidades de isoprenos com 5C. Estas unidades formam cadeias de ramificações com características estruturais específicas (Schmidt-Dannert, 2014).

Entre os terpenoides produzidos nos três reinos eucarióticos, são formados diferentes tipos de esteróis: fitosteróis (sitosterol, estigmasterol, campesterol) em plantas, colesterol em animais e ergosterol em fungos. Todas estas estruturas derivam da ciclização de oxidoesqualeno em lanosterol (fungos e animais) e após múltiplos passos oxidativos geram os diferentes esteróis triterpenoides e ergosterol em fungos (Schmidt-Dannert, 2014). Fig.2.

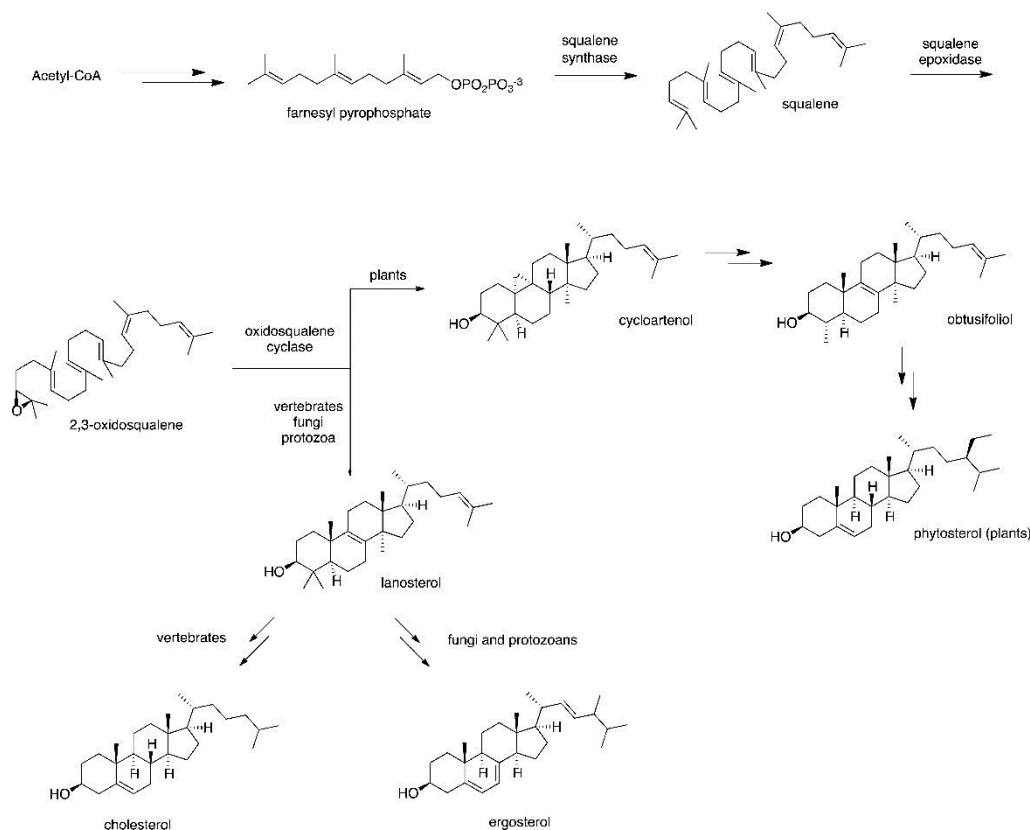


Fig. 2: Biossíntese de esteróis de acetil-CoA até colesterol (animais), ergosterol (fungos e protozoários) e fitosterol (plantas). Choi *et al.*, 2014

Na rota biossintética de terpenoides em fungos superiores Ascomycota e Basidiomycota apresentam portfolios diferentes de enzimas biossintéticas (Schmidt-Dannert, 2014).

Na família *Ganodermataceae* (Basidiomycota), inúmeras frações ricas em terpenoides têm sido descobertas. Dentre estes terpenoides, em *G. lucidum*, uma classe de triterpenos vem se destacando por suas atividades biológicas, os ácidos ganodéricos (Gajendiran e Abraham, 2018, Liang *et al.*, 2019).

5.4.1 Rotas Biossintéticas

O precursor isopentenila pirofosfato (ou isopentenila difosfato, IPP), com 5C, conjugado com o dimetilalila difosfato (DMAPP), também com 5C, são os precursores de todos os isoprenóides. Essas metades formam os

hemiterpenos, ou se polimerizam para formar incrementos de 5 carbonos, adicionando sucessivas unidades de IPP, formando diferentes comprimentos de cadeia de difosfato de prenilas. Estes difosfatos de prenila são precursores universais para todos os terpenoides (Jiang *et al.*, 2016).

De acordo com o número de carbonos, uma classificação de terpenoides é possível: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), carotenoides (C40) e poliprenois (>45 C) como mostra a Fig. 3) (Jiang *et al.*, 2016). Em *Ganodermataceae* os estudos provam que as moléculas que possuem atividade biológica, são os triterpenos e, mais especificamente, em *G. lucidum*, são os ácidos ganodéricos (Kohda *et al.*, 1985; Xia *et al.*, 2014).

Os triterpenos contem 30 ou 27 átomos de C, alguns poucos apresentam 24 átomos de C. Todos possuem o mesmo esqueleto, anéis de configuração trans A/B, B/C, C/D e substituintes 10 β , 13 β , 14 α e 17 β . Além destes substituintes, outros ocorrem nas posições C-3, 7, 11, 12, 15, 22, 23, 24 e no esqueleto lanostano (Xia *et al.*, 2014.)

5.4.2 A rota do Mevalonato

A biossíntese de ácidos ganodéricos (GA) está associada à rota do mevalonato (biossíntese de isoprenoides) (Shi *et al.*, 2010).Fig.3.

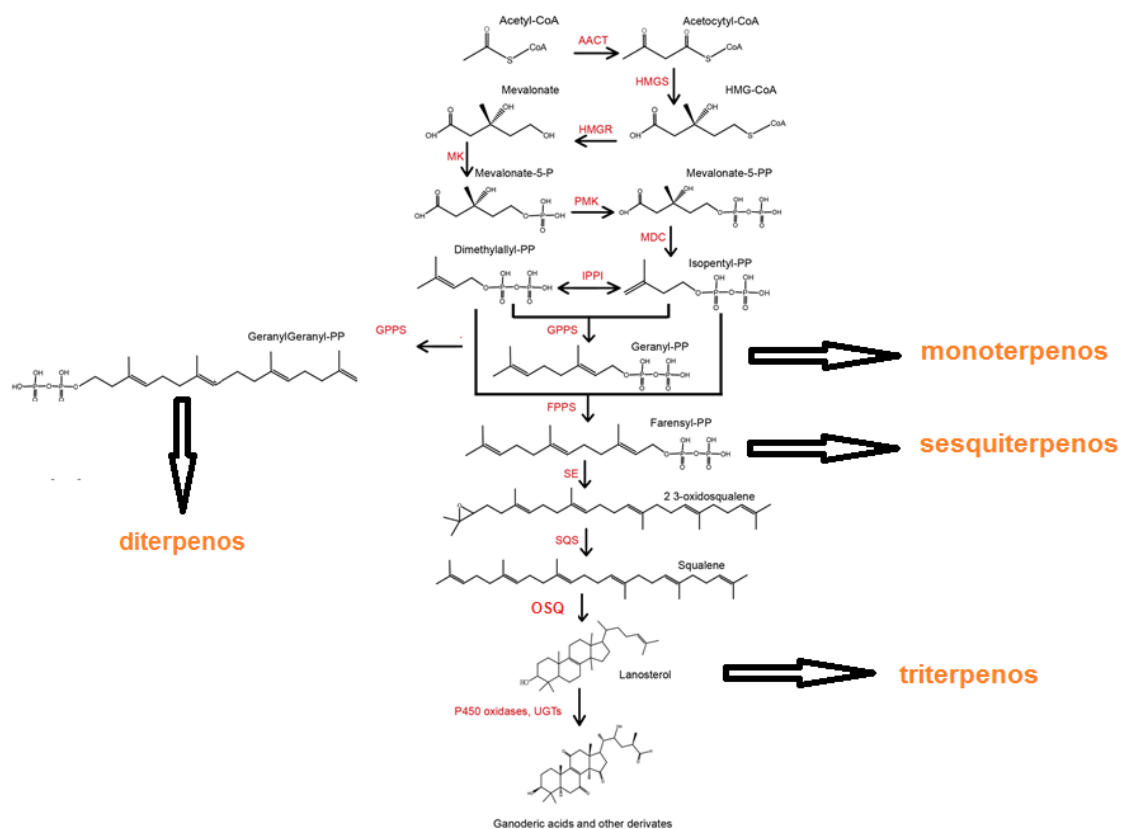


Fig. 3: Rota do mevalonato mostrando a formação de terpenoides em fungos. Adaptado de Hu *et al.*, 2017.

As enzimas conhecidas envolvidas na rota do mevalonato em fungos são (Croteau R., Purkett , 1989; Shi *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010):

- (1) acetil-CoA acetiltransferase (AACT): catalisa a reação de condensação de dois acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA.
- (2) 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintetase (HMGS): catalisa a reação de condensação do acetil-CoA com acetoacetil-CoA para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA.
- (3) 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGR): catalisa a formação do mevalonato;
- (4) mevalonate kinase (MK): Cataliza a fosforilação do mevalonato para formar mevalonato 5-fosfato;
- (5) fosfomevalonato quinase (MPK): enzima que converte o mevalonato 5-fosfato e ATP em mevalonate 5-difosfato e ADP.

- (6) pirofosfomevalonato descarboxilase (MVD): catalisa a reação química ATP e 5-difosfomevalonato em ADP e difosfato de isopentenil;
- (7) isopentenildifosfato isomerase (IDI): catalisa a conversão do isopentenil pirofosfato em dimetilalil pirofosfato.
- (8) farnesil difosfato sintetase (FPPs): catalisa a transformação de dimetilalil pirofosfato e isopentenil pirofosfato em farnesil pirofosfato, o precursor dos sesquiterpenos e triterpenos;
- (9) geranyl pirofosfato sintetase (GPPs): catalisa a condensação de isopentenildifosfato e Dimetilalil pirofosfato para gerar geranyl pirofosfato, precursor de monoterpenos.
- (10) esqualeno sintetase (SQS): catalisa a condensação de dois farnesil difosfato para formar o esqualeno;
- (11) esqualeno mono-oxigenase (SE): oxida o esqualeno em 2,3-oxidosqualeno, também chamada esqualeno epoxidase;
- (12) 2, 3-oxidosqualeno-lanosterol ciclase (OSC): enzimas envolvidas nas reações de ciclização do 2,3-oxidosqualeno para formar lanosterol.
- (13) geranylgeranyl-PP sintetase (GGPPs): Catalisa a trans-adição de três moléculas de isopentenilpirofosfato e dimetilalilpirofosfato para formar geranylgeranyl pirofosfato, o precursor de carotenoides e diterpenos.

5.5 Ácidos Ganódericos

Em *Ganodermataceae*, a rota biossintética dos triterpenoides está estabelecida na literatura até a formação do lanosterol (fig. 4). A enzima OSC catalisa a ciclização do 2, 3-oxidosqualeno na rota do mevalonato para formar o precursor dos triterpenos, o lanosterol (Hsu e Yen, 2014). Após, o lanosterol sofre várias modificações por diversas reações, como oxidação, redução e acilação até formar os vários GAs (Chen *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2010; (Hsu e Yen, 2014; Zang *et al.*, 2017). Os GA são triterpenoides tetracíclicos e apresentam o esqueleto estrutural do lanostano altamente oxidado (Xia *et al.*, 2014; Zang *et al.*; 2017; Liang *et al.*, 2019).

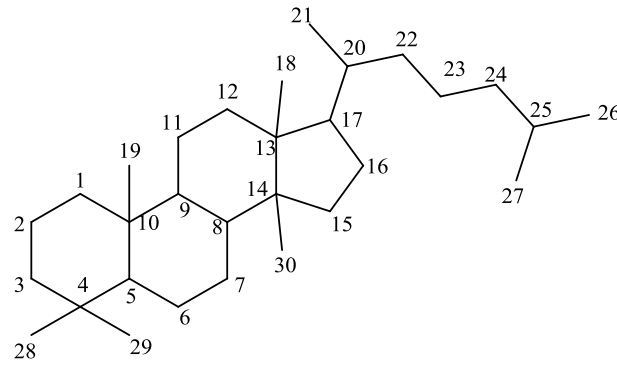


Fig.4: Os triterpenos de *Ganoderma* pertencem ao grupo de triterpenos derivados do lanostano (Xia *et al.*, 2014).

Após a síntese do lanosterol, o esqueleto carbocíclico também deve sofrer modificações complexas e pouco se sabe sobre as etapas específicas desse processo. Os resultados do sequenciamento do genoma de *G. lucidum* sugerem que o citocromo P450s (CYPs) estão envolvidos nesse processo, mas a rota específica ainda não é clara (Hui *et al.*, 2015). Após o sequenciamento do genoma de *G. lucidum*, foram demonstradas possíveis 16 CYPs envolvidos na síntese de terpenóides (Quin *et al.*, 2015) e uma possível rota foi proposta (fig. 5). Estes CYPs fazem oxidações seletivas, promovendo funcionalidade química para subsequente acetilações, esterificações, alquilações, etc... (Wang *et al.*, 2012), ou rendem diferentes produtos (Seki *et al.*, 2008).

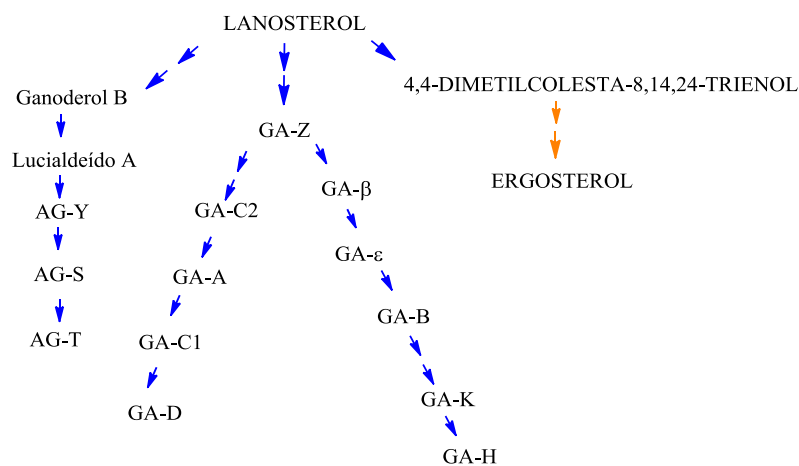
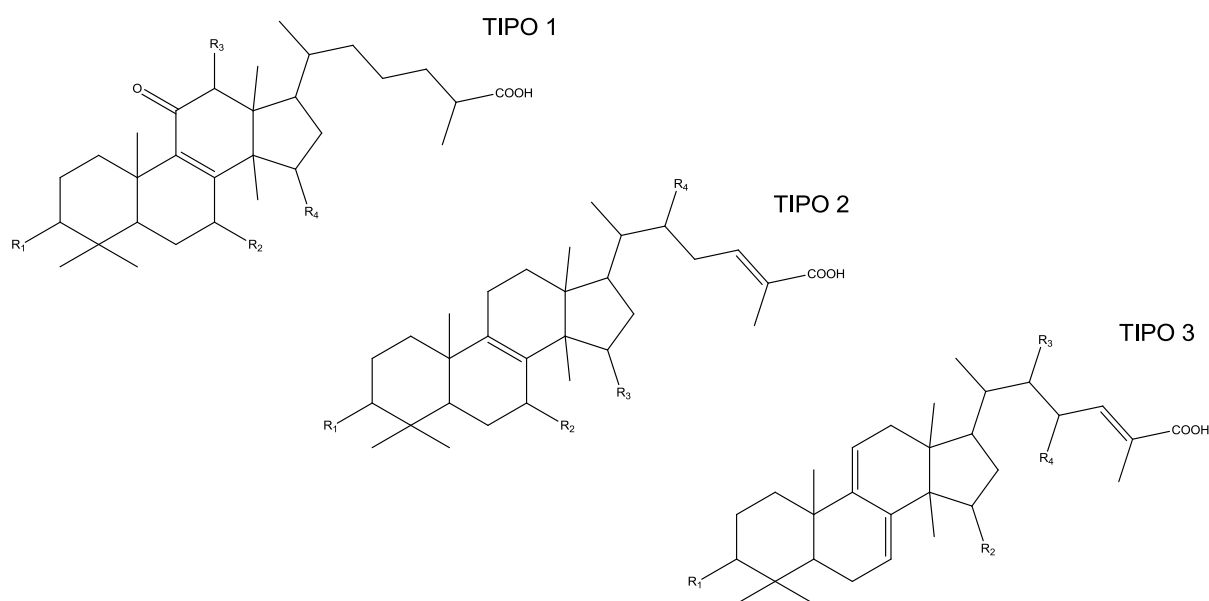


Fig.5: Possível rota biossintética de alguns ácidos ganodéricos em *G. lingzhi*, cada seta representa uma reação química, duas setas representam múltiplas reações. Setas azuis representam uma suposta rota, setas laranja mostram rotas bem definidas. Adaptado de Chen *et al.*, 2012 e Quin *et al.*, 2015.

Os primeiros ácidos ganodéricos isolados foram ácido ganodérico A e B, em 1982 por Kubota e colaboradores (Kubota *et al.*, 1982). Fig. 6. Estes terpenoides podem conter múltiplas estruturas ciclizadas e vários tipos de grupamentos, como. oxidrilas, açúcares, ácidos graxos, anéis benzenos, entre outros, que irão determinar a polaridade e a complexidade da molécula (Jiang *et al.*, 2016). Xu *et al.* (2010) separaram a estrutura molecular de ácidos ganodéricos em três subtipos:



GA	R1	R2	R3	R4	TIPO
A	O	OH	H	OH	1
B	β -OH	OH	H	O	1
H	β -OH	O	OAc	O	1
V	O	OH	OAc		2
Z	β -OH	H	H	H	2
U	α -OH	H	H	H	2
DM	O	O	H	H	2
Y	β -OH	H	H	H	3
X	β -OH	OAc	H	H	3

S	α -OH	H	OAc	H	3
T	α -OAc	OAc	OAc	H	3
Me	α -OAc	OAc	H	H	3
Mk	α -OAc	OH	OAc	H	3

Fig. 6 Estrutura de alguns ácidos ganodéricos. Xu *et al.* (2010)

Em se tratando de ontogenia, Liu *et al.* (2012) já haviam afirmado que as concentrações dos ácidos ganodéricos DM e TR em *G. lucidum* variam durante a formação do basidioma. Após, Nakagawa *et al.* (2018) relataram que o basidioma imaturo de *G. lingzhi*, cepa BMC9049, apresentou conteúdo total de polissacarídeos e triterpenóides mais alto e o conteúdo individual dos ácidos ganodéricos, como GA-A, GA-C2, GA-I, GA-K, GA-C e GA-D, foi alterado com o crescimento do basidioma. Ren *et al.*, 2020, avaliaram o conteúdo de ácidos ganodericos, por HPLC, em diferentes estágios, convencionando quatro fases no desenvolvimento de *G. lucidum* (fig.7):

- 1- Fase do alongamento dos primórdios
- 2- Fase de expansão do píleo
- 3- Fase de amadurecimento do basidioma
- 4- Fase de amadurecimento dos basidiósporos

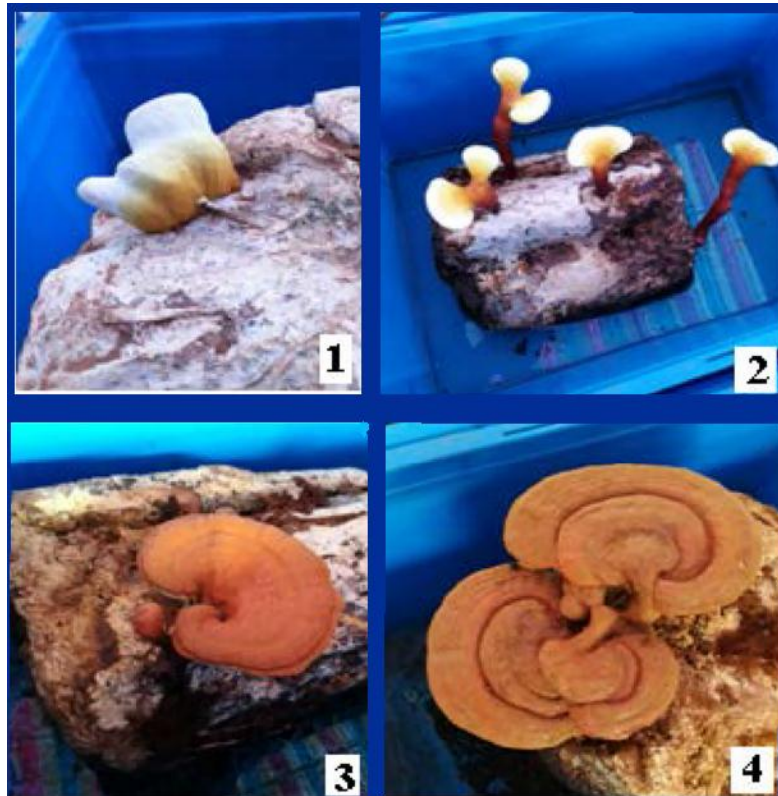


Fig 7: Apresentação das quatro fases do desenvolvimento de *G. lucidum*. Ren *et al.*, 2020.

Assim Ren, *et al.*, 2020, demonstraram que existe também uma diferente bioprodução de GA durante o desenvolvimento, além de diferença de conteúdo significativa entre o píleo e o estipe, sendo o píleo mais rico em GA e o estipe mais rico em compostos fenólicos e flavonoides. Os corpos de frutificação de *G. lucidum* podem ser colhidos na fase estágio 1 se o interesse for GA- B, GA-C2 e GA-G no píleo e se o interesse for por GA-A, a coleta deve ser na fase 3. A biossíntese de triterpenos em *G. lucidum* é afetada por condições ambientais, exceto durante o desenvolvimento do basidioma, quando a expressão do gene OSC é regulada por fatores bióticos e abióticos (Shang *et al.*, 2010). Por exemplo, Gao *et al* (2018) demonstraram que a adição de cobre ao meio de cultura, por mecanismos que envolvem a produção de espécies reativas de oxigênio, pode aumentar a concentração de GA. (Gao *et al.*, 2018).

Em 2018, Wang *et al.*, descobriram um gene da família P450 que sintetiza uma enzima que adiciona oxigênios ao lanosterol. O gene CYP5150L8 que sintetiza a enzima lanosterol oxidase (Wang *et al.*, 2018). CYP5150L8

cataliza três passos sucessivos na oxidação do lanosterol até o ácido 3-hidroxi-lanosta-8,24-dien-26-oico (Wang *et al.*,2018).Figura 8.

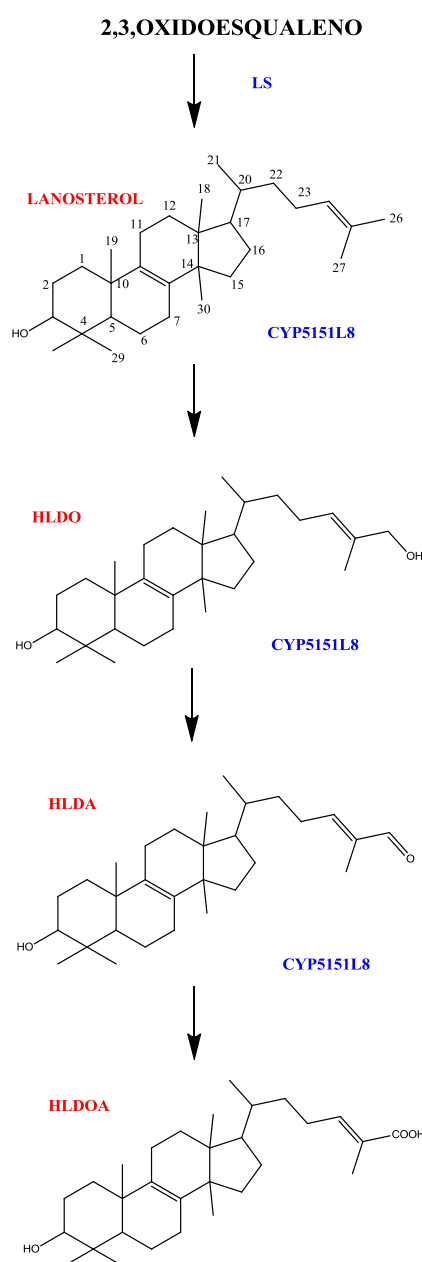


Fig. 8: Etapa de oxidação do lanosterol apresentando os passos oxidativos até o ácido 3-hidroxi-lanosta-8, 24-dien-26-oico (HLDOA). HLDO: 3-hidroxi-lanosta- 8,24-dien-26-ol; HLDA: 3-hidroxi-lanosta-8,24-dien-26-al; HLDOA: ácido 3-hidroxi-lanosta-8,24-dien-26-oico; LS: lanosterol sintetase. Adaptado de Wang *et al.*, 2018.

5.6 Fungos da Família *Ganodermataceae* como agentes citotóxicos

A carcinogênese é um processo complexo, de múltiplos estágios, que começa pela iniciação, promoção e progressão de um tumor e inclui uma acumulação contínua de eventos transformadores guiados por mutações genéticas e mudanças epigenéticas que afetam rotas importantes do desenvolvimento celular, como crescimento, sobrevivência, diferenciação, metástase, migração e invasão (Li *et al.*, 2020).

Processos inflamatórios são um dos mecanismos que levam ao surgimento de cânceres através de processos que envolvem genotoxicidade, reparos teciduais aberrantes, respostas proliferativas, invasão e metástase (Koo *et al.*, 2019).

Com relação aos terpenóides e seus efeitos em tumores e células cancerígenas, pode-se afirmar que apresentam papel na prevenção do câncer e na promoção da saúde (Li *et al.*, 2020). A literatura aponta que terpenóides também regulam a epigenética e a epigenômica na prevenção de cânceres (Li *et al.*, 2020). A atividade antitumoral dos macrofungos do gênero *Ganoderma*, foi uma das atividades revisadas por Dasgupta e Acharya (2019).

A citotoxicidade é definida como a toxicidade de determinada substância ou extrato bruto frente a diferentes células. A avaliação de compostos emprega modelos celulares para medir parâmetros relacionados com a proliferação celular, por exemplo, a capacidade de divisão, a atividade mitocondrial, as condições da membrana celular ou o conteúdo total de proteínas ou DNA. Vários ensaios, enzimáticos ou com o uso de corantes específicos são utilizados para marcar a atividade citotóxica entre eles, LDH (ensaio colorimétrico da enzima lactato desidrogenase, que avalia o dano na membrana plasmática, apoptose e necrose através de métodos fluorescentes), SRB (o corante liga-se a proteínas e mede-se o total de proteínas), MTT (avalia a atividade oxidativa da mitocôndria, mensurando a habilidade da célula viva em reduzir o corante), DAPI (mede a quantidade de DNA total, utilizando fluorocromos capazes de se ligarem estequiometricamente com DNA), iodeto de propídio, eritrosina B e azul de tripan (corante de células mortas). O uso de marcadores fluorescentes é útil quando se usa citometria de fluxo e a medida de intensidade da luz difusa sobre as células marcadas, podendo-se avaliar,

tanto a morte, quanto a apoptose e o número de células que permanecem vivas (Fricker e Buckley, 1996; Niu *et al*, 2001; Bopp *et al.*, 2008; Chudzik *et al.*, 2015).

Em recente revisão, feita por Wong *et al.*, 2020, onde foram reportadas atividades citotóxicas frente ao câncer de mama, foram mencionadas outras espécies do gênero *Ganoderma*, além de duas espécies do gênero *Amauroderma*, ambos são gêneros de *Ganodermataceae*.

Assim, resumidamente:

- *Amauroderma rude* apresentou maior atividade, *in vitro*, que o *G. lucidum* contra linhagens de células tumorais de câncer de mama e despertou processos apoptóticos.

Em experimentos *in vivo*, o crescimento de tumor de mama provocado por um xenoenxerto de células MDA-MB-231 em ratos imunodeprimidos (animal modelo com depleção do genes Foxn1, que causa deterioração do timo) foi reduzido após tratamento com ergosterol purificado de *A. rude* e a expressão do ongene c-Myc foi suprimida (Jiao *et al.* 2013). Além disto, *A. rude* exibiu quantidade considerável de ergosterol, molécula que aumenta a expressão do gene supressor tumoral Foxo3 e dos reguladores de apoptose como BimL, BimS, Fas, e FasL (Li *et al.* 2015).

- *Amauroderma rugosum* apresentou isolados químicos com atividade antioxidante, a formação do TNF- α e NO e a proliferação de linhagem de células MCF7 (Zhang *et al.*, 2017). Quanto a toxicidade, estudos demonstraram que um único tratamento com *A. rugosum* pulverizado (2000 mg/kg), por via oral, não prejudicou o crescimento, os parâmetros sanguíneos, as estruturas histológicas dos órgãos examinados ou a sobrevivência dos ratos em um período de 2 semanas (Fung *et al.* 2017).

- *Ganoderma atrum*: estudos provaram que rFIP-gat, a forma recombinante da proteína imunomoduladora fúngica FIP-gat de *G. atrum*, provocou aglutinação (IC₅₀ de 5 μ g/ml) e diminuição da viabilidade das células de câncer de mama MDA-MB-231 (9,96 μ g/ml). A 10 μ g/ml, o rFIP-gat interrompeu as células cancerígenas na fase G1/S do ciclo celular, inibiu a proliferação celular e provocou apoptose (Xu *et al.* 2016).

- *Ganoderma lipsiense*: o extrato fúngico administrado em camundongos BALB/c reduziu a densidade de microvasos e a contagem de células positivas para ciclina D1 (ou bcl1, é um regulador do ciclo celular, cuja super expressão está associada ao desenvolvimento e à progressão de câncer e são encontradas em 30% dos cânceres de mama), mas aumentou a contagem de células positivas para trombospondina 1 (proteína antiangiogênica) e, assim, inibiu o crescimento de MDA-MB-231-HM em camundongos (Qi *et al.* 2016).
- *Ganoderma tsugae* var. *jannieae*: o extrato acetato de etila micelial diminuiu em mais de 70% a atividade celular de células MCF7 e suprimiu a fosforilação de IκBα (Chan *et al.* 2015).
- *Ganoderma resinaceum*: O extrato micelial, contendo o fitosterol α-spinasterol, inibiu células MDA-MB-231 e MCF-7 de cancer de mama. O extrato desregulou as quinases dependentes de ciclina cdk4/6 e produziu interrupção do ciclo celular na fase G0 – G1. Por outro lado, aumentou a expressão do marcador apoptótico Bax e do supressor de tumor p53 (Sedky *et al.* 2018).
- *G. lucidum*: é um nutraceutico popular mundialmente e tem sido utilizado em ensaios clínicos em câncer de mama e em câncer de não-pequenas células de pulmão (Hsu and Cheng 2018). *G. lucidum* pode reduzir a prostração e melhorar a qualidade de vida em pacientes com câncer de mama que receberam terapia hormonal (Zhao *et al.*, 2012).

Em estudo utilizando o óleo contido nos esporos, foi observada a inibição da proliferação de células de câncer de mama *in vitro* e o crescimento de tumores *in vivo* (Jiao *et al.* 2020). De acordo com Su *et al.*, 2018, a administração de um extrato de esporos quebrados retardou o crescimento do xenoenxerto de câncer de mama 4T1 em camundongos. Além disto, a população de células T citotóxicas e a proporção de células T citotóxicas para células T auxiliares, no sangue periférico e baço, foram elevadas.

Suprasert *et al.*, 2015 relatam que sessenta pacientes, que falharam em duas ou mais seções de quimioterapia, durante o tratamento para o câncer ginecológico, foram divididos aleatoriamente em três grupos e submetidos a terapia complementar com *G. lucidum* durante 12 semanas. Vinte pacientes consumiram 6g/dia de extrato aquoso de *G. lucidum*; outros vinte pacientes consumiram 6g/dia de esporos e o restante tomou placebo. A doença estabilizou em 0%, 50% e 38,1%. A sobrevida em 1 ano foi de 44%, 60% e

63,6% nos grupos que receberam placebo, esporos de *G. lucidum* e extrato aquoso de *G. lucidum*, respectivamente (Suprasert *et al.* 2015).

Em revisão feita em 2014, por Hsu e Yen, foram relatados os ensaios de citotoxicidade, *in vitro*, utilizando os GA isolados até aquela data, como mostra a tabela 1.

Tabela 1: Efeitos citotóxicos dos GAs em linhagens celulares de câncer

GA	Incub. (h)	Cancer Cell Lines	IC ₅₀	GA	Incub. (h)	Cancer Cell Lines	IC ₅₀
GA-A	48	LLC	>20 µg/mL	GA-Mf	24	LO ₂	77.0 µM
GA-A	48	T-47D	>20 µg/mL	GA-Mf	24	HF	122.5 µM
GA-A	48	S-180	>20 µg/mL	GA-Mf	24	HO-8910PM	34.8 µM
GA-A	48	Meth-A	>20 µg/mL	GA-Mf	24	SW1990	47.1 µM
GA-AM1	48	HeLa	19.8 µM	GA-Mf	24	95-D	33.2 µM
GA-B	48	HeLa	20.3 µM	GA-Mf	24	HeLa	36.4 µM
GA-B8	48	LLC	>20 µg/mL	GA-Mf	–	HeLa	36.4 µM
GA-B8	48	T-47D	>20 µg/mL	GA-Mf	–	95-D	33.2 µM
GA-B8	48	S-180	>20 µg/mL	GA-Mk	–	HeLa	29.8 µM
GA-B8	48	Meth-A	>20 µg/mL	GA-Mk	–	95-D	30.8 µM
GA-C1	48	LLC	>20 µg/mL	GA-P	–	NCI-H187	26.0 µM
GA-C1	48	T-47D	>20 µg/mL	GA-P	–	MCF-7	58.0 µM
GA-C1	48	S-180	>20 µg/mL	GA-P	–	KB	40.0 µM
GA-C1	48	Meth-A	>20 µg/mL	GA-R	–	HeLa	21.4 µM
GA-D	48	HeLa	17.3 µM	GA-R	–	95-D	31.9 µM
GA-DM	72	PC-3	40.0 µM	GA-S	24	LO ₂	44.7 µM
GA-E	–	HepG2	0.144 nM	GA-S	24	HF	28.7 µM
GA-E	–	HepG2,2,15	0.105 nM	GA-S	24	HO-8910PM	25.2 µM
GA-E	–	CCM2	31.25 µM	GA-S	24	SW1990	41.4 µM
GA-E	–	P388	5.012 µM	GA-S	24	95-D	38.5 µM
GA-F	48	HeLa	19.5 µM	GA-S	24	HeLa	23.8 µM
GA-K	48	HeLa	15.1 µM	GA-S	–	NCI-H187	39.0 µM
GA-Mc	–	HeLa	35.4 µM	GA-S	–	MCF-7	>98 µM
GA-Mc	–	95-D	24.0 µM	GA-S	–	KB	53.0 µM
GA-S	–	HeLa	23.8 µM	GA-T	24	HepG2	13.1 µM
GA-S	–	95-D	38.5 µM	GA-T	24	95-D	14.5 µM
GA-T	–	NCI-H187	15.0 µM	GA-X	24	HuH-7	20.3 µg/mL
GA-T	–	MCF-7	78.0 µM	GA-X	24	HCT-116	38.3 µg/mL
GA-T	–	KB	18.0 µM	GA-X	24	Raji	39.2 µg/mL
GA-T	24	95-D	27.9 µg/mL	GA-X	24	HL-60	26.5 µg/mL
GA-T	24	HeLa	11.0 µM				

Nota: Incub. (h)= tempo de incubação da célula com o composto isolado em horas. Hsu e Yen. 2014.

5.7 Fungos da Família *Ganodermataceae* como agentes antibiofilme

Diferentemente das condições laboratoriais, onde bactérias crescem planctonicamente e em condições ricas de nutrientes, as bactérias ambientais ocupam um meio pobre em nutrientes, onde formam agregados multicelulares, imersos em uma matriz, chamados biofilmes (Costerton *et al.*, 1987).

Os biofilmes são formados por comunidades microbianas complexas que se estabelecem em uma grande variedade de superfícies e geralmente estão associadas a uma matriz extracelular composta por diferentes polímeros. Além disso, biofilmes fornecem proteção contra as defesas do hospedeiro e contra a ação de antibióticos, constituem-se em uma barreira para prevenir ou reduzir a penetração de agentes antimicrobianos. Dependendo da espécie bacteriana e das condições ambientais, a matriz deste biofilme apresentará exopolissacarídeos, proteínas, ácidos teitoicos e DNA (Flemming and Wingender, 2010).

Staphylococcus aureus pertence à família nosocomial oportunista denominada 'ESKAPE', sigla para *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp. (Rice, 2008).

S. aureus, tornou-se famoso por causar infecções crônicas em pacientes com em dispositivos médicos implantáveis como, válvulas cardíacas artificiais, cateteres e próteses articulares (Arciola *et al.*, 2012; McConoughey *et al.*, 2014). Estas infecções estão relacionadas ao biofilme de *S. aureus* e associadas ao aumento da morbimortalidade. Estas infecções nos dispositivos implantáveis frequentemente requerem remoção cirúrgica e aumento da duração no tempo de hospitalização, (Otto, 2008; Maneesha *et al.*, 2019).

Além disto, um número significativo de estudos relacionados ao biofilme bacteriano foi relatado devido a importância dos biofilmes como fonte de contaminação cruzada na indústria de alimentos. Como *S. aureus* é o maior componente do microbioma humano, com a manipulação, o grau de contaminação aumenta na superfície dos alimentos (Srey *et al.*, 2013). Uma vez ali, a formação de biofilme aumenta a resistência de *S. aureus* aos

estresses do processamento de alimentos: agentes antimicrobianos, temperaturas relativamente altas, altos teores de sal, entre outros (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2013). Conseqüentemente, aumentam as possibilidades de contaminação cruzada, o que pode comprometer a segurança dos produtos alimentícios.

S. aureus é capaz de formar biofilmes em diversas superfícies de trabalho amplamente utilizadas em instalações industriais, como poliestireno, polipropileno, aço inoxidável e vidro, e também em produtos alimentícios (Ciccio *et al.*, 2019).

A formação do biofilme ocorre em 5 etapas (Fig.9):

1. As células dos micro-organismos ligam-se a superfícies abióticas ou bióticas.
2. Após a ligação das células, o biofilme se desenvolve como um "tapete" conflúente de células envoltas em uma matriz secretada por estas células.
3. Ao atingir a confluência, ocorre um período de migração em massa de células e uma subpopulação é liberada do biofilme para permitir a formação de microcolônias tridimensionais.
4. As microcolônias formam-se a partir de diferentes focos de células que permaneceram ligadas durante o estágio 4. Esse estágio é caracterizado pela rápida divisão, formando agregações robustas compostas de proteínas e DNA extracelular.
5. Dispersão de células bacterianas.

Como a resistência aos antimicrobianos por bactérias nosocomiais é crescente, torna-se necessária a descoberta de novas moléculas capazes de inibir a formação de biofilme, seja inibindo o crescimento microbiano ou inibindo sua adesão a um substrato.



Fig.9 Estágios do desenvolvimento do biofilme. Adaptado de Moormeier e Bayles, 2017.

O desenvolvimento do biofilme de *S. aureus* é descrito em cinco estágios: (1) fixação, (2) multiplicação, (3) desprendimento, (4) maturação e (5) dispersão.

Métodos indiretos, *in vitro*, utilizando microplacas e corantes, como cristal violeta e safranina, têm sido amplamente usados devido à sua simplicidade e sensibilidade (Djordjevic *et al.*, 2002). No ensaio com o cristal violeta, o biofilme é corado com o cristal violeta e em seguida, o corante que não se ligou aos polissacarídeos é removido (Jackson *et al.*, 2002). A partir daí, os pocinhos corados sofrem leitura colorimétrica. O cristal violeta é um corante básico, que se liga em moléculas carregadas negativamente e nos polissacarídeos da matriz extracelular (Li *et al.*, 2003).

A literatura cita poucos registros sobre a atividade de extratos fúngicos como anti-biofilme. Entre eles estão os trabalhos de Bhardwaj *et al.*, 2017, demonstrando a ação anti-biofilme de extratos aquosos de *G. lucidum* contra *Candida albicans* e *C. glabrata* (Bhardwaj *et al.* 2017).

5.8 Fungos da Família *Ganodermataceae* como antiparasitários

O controle de parasitoses em humanos e animais depende largamente de drogas, das quais os parasitas em questão, não desenvolveram resistência. De fato, todos os parasitas, independentemente do filo ao qual pertençam, já desenvolveram ou são capazes de desenvolver resistência contra todos os compostos terapêuticos.

Basidiomicetos produzem uma grande diversidade de biocompostos, alguns deles são ativos no tratamento de doenças causadas por protozoários. Segundo Abugri *et al.*, 2019, a maioria dos extratos fúngicos e seus compostos isolados apresentam alguma concentração inibitória mínima (IC₅₀) para 50% dos parasitas variando entre 0.06 à 54µg/mL *in vitro*, além de baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo* (Abugri *et al.*, 2019, Oluba, 2019).

Os mecanismos de ação resultantes da interação dos bioprodutos de macrofungos *versus* parasitas envolvem lesão da membrana celular, que leva à lise celular, parada do ciclo celular, dano à função mitocondrial, dano no RNA e no DNA, bem como em fosfolipídios, reações de auto-oxidação, quelatão de metais e estresse oxidativo (Abugri *et al.*, 2019).

Registros encontrados na literatura sobre a ação antiparasitária de fungos da família *Ganodermataceae* demonstraram ação antiplasmodial *in vitro* e *in vivo* (Adams *et al.*, 2010; Oluba *et al.*, 2012; Oluba, 2014; Lakornwong *et al.*, 2014, Ma *et al.*, 2015; Lenzi *et al.*, 2018, Oluba, 2019), contra *Giardia duodenalis* (Costa *et al.*, 2019) e Duarte *et al.* 2010, demonstraram atividade tricomonocida de extratos aquosos de *Amaurodema camerarium*.

Ao avaliar extratos e constituintes químicos de *G. lucidum*, observou-se que triterpenos lanostanos, como *Ganodermalactona* F (C₃₀H₃₈O₅), esquisanlactona B (C₃₀H₄₀O₄) e colossolactona E (C₃₂H₄₂O₆) inibiram o crescimento de *P. falciparum* com IC₅₀ que variaram de 6.0–10 µM (Lakornwong *et al.*, 2014) e que o ácido ganodérico DM (C₃₀H₄₄O₄), ácido ganodérico TR1 (C₃₀H₄₄O₃), aldeído ganodérico TR (C₃₀H₄₄O₃), ácido ganodérico S (C₃₀H₄₄O₃), *Ganodermanondiol* (C₃₀H₄₈O₃) e ganofurano B (C₂₁H₂₆O₄) inibiram *P. falciparum* com IC₅₀ entre 6.0–20 µM (Adams *et al.* 2010). Em *G. boninense*, Ma *et al.*, 2014, demonstraram, que os terpenoides ganoboninketals A (C₃₂H₄₆O₇), B (C₃₀H₄₂O₆) e C (C₃₂H₄₆O₈) apresentaram, contra o mesmo parasita, uma IC₅₀ de 4.0, 7.9 e 1.7 µM, respectivamente.

Em um estudo recente, Oluba, 2019, demonstrou que o extrato rico em terpenoides de *G. lucidum* (coletado na Nigéria) reduziu a parasitemia *in vivo* aumentando a taxa de sobrevivência em ratos, quando parasitados por *Plasmodium berghei* , além de potencializar os efeitos da cloroquina, o medicamento de escolha para tratamento de malária (Oluba, 2019).

A coccidiose aviária é uma doença parasitária causada por protozoários apicomplexos do gênero *Eimeria*. Estes protozoários endoparasitas levam as aves de corte a uma enfermidade entérica importante, devido aos prejuízos econômicos por ela causados. Os parasitas atacam as células intestinais causando enterite e diarreia, conseqüentemente, uma diminuição na absorção intestinal de nutrientes, há ainda um efeito sinérgico da coccidiose com outras doenças, sendo mais severos do que quando ocorre sozinha (Allen e Fetterer, 2002). Com a utilização de extrato aquoso de *G. applanatum* foi possível controlar a infecção e apontar uma potencial alternativa na intervenção de eimeriose e na eliminação da infecção clínica em frangos (Ahad *et al.*, 2016).

O extrato aquoso de *Amauroderma camerarium*, obtido do cultivo micelial em condições estáticas (28 dias de cultivo suplementado com KNO₃),

apresentou atividade contra a cepa ATCC 30236 de *T. vaginalis*, diminuindo a viabilidade dos trofozoitos em 76% (Duarte, 2016). Neste estudo, uma proteína, identificada por espectrometria de massas, foi testada contra *T. vaginalis* ATCC 30236 e isolados clínicos. As concentrações inibitórias mínimas encontradas foram 2.6 μM contra as cepas ATCC e 5.2 μM contra os isolados clínicos.

T. vaginalis (fig.10) é o agente etiológico de tricomoníase, uma DST cosmopolita associada ao aumento da aquisição e transmissão do HIV, trabalho de parto prematuro, bebês com baixo peso ao nascer, infertilidade, doença inflamatória pélvica e câncer do colo do útero (Poole e McClelland 2013).

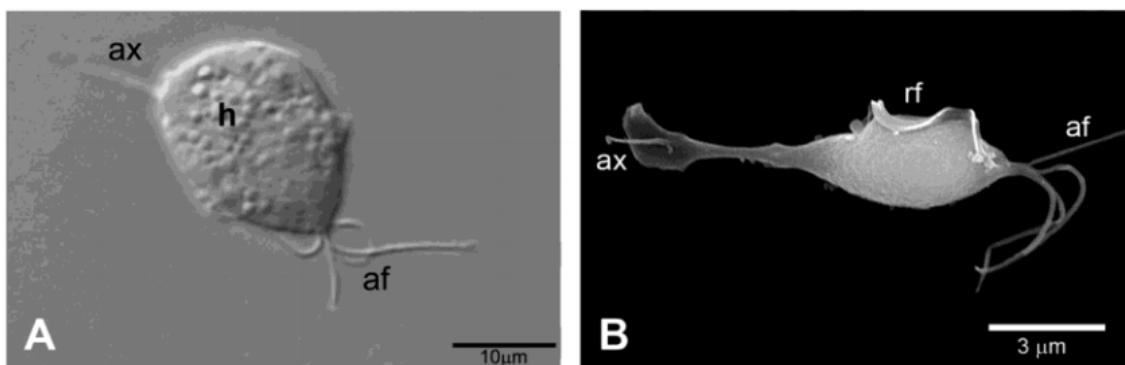


Fig 10: *T. vaginalis* cultivado no meio TYM por 48 h (A-B) mostrando um típico trofozoito em formato de 'pera'. As letras indicam: ax: axostyle; af: flagelo anterior; rf: flagelo recorrente, formando uma membrana ondulante. Modificado de Dias-Lopes, 2017.

As drogas utilizadas atualmente para tratamento de tricomoníase pertencem à classe dos nitroimidazóis: metronidazol ($\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$), tinidazol ($\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$) e benznidazol ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3$). Estes medicamentos tem sido prescritos a mais de quatro décadas (Durel *et al.*, 1960) para tratar infecções bacterianas ou parasitoses em humanos e animais o que levou ao desenvolvimento de mecanismos de resistência a estes fármacos (Koning, 2017; McDougald *et al.*, 2019).

Em 2012, a prevalência de resistência nos Estados Unidos ainda era baixa, mas Kirkcaldy *et al.* (2012) já alertavam para o perigo da dependência de uma única classe de medicamentos antimicrobianos utilizados no tratamento. Segundo Kirkcaldy *et al.*, as forças de mercado são insuficientes para estimular o desenvolvimento de novos medicamentos anti-tricomoniais e esforços para

promover e apoiar o desenvolvimento e a avaliação de novos medicamentos antimicrobianos se faz necessário (Kirkcaldy *et al.*, 2012). Na maioria dos países, os 5-nitroimidazóis metronidazol e tinidazol são as únicas opções de tratamento aprovadas para infecções por *T. vaginalis* e *E. histolytica* (Leitsch D., 2017).

A resistência aos medicamentos é o grande desafio ao tratamento da infecções parasitárias, principalmente pela escassez de novos medicamentos com atividade.

5.9 Cromatografia líquida com detecção espectrométrica

Foi utilizado neste estudo um sistema de analítico baseado em cromatografia líquida com detecção espectrométrica. Na literatura existe um vasto material sobre o assunto (Cabrera *et al.*, 2007, Chiaradia *et al.*, 2008, Vijlder *et al.*, 2018, Rathod *et al.*, 2019). Aqui será apresentado uma breve explicação voltada para a análise realizada neste trabalho.

De fato, sistemas operacionais são montados de várias formas, com ou sem cromatógrafos (injeção direta), com tipos de ionizadores diferentes e variados tipos de analisadores. O sistema aqui utilizado foi composto das seguintes partes:

- Cromatógrafo de ultra alta eficiência
- Ionizador por eletronebulização
- Analisador de quadrupolo
- Detector

Considerando que os terpenoides são um grande foco de pesquisas em fungos, esta tese irá concentrar esforços na identificação desta classe de compostos através UHPLC-QToF-MS (Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada a espectrômetro de massa com analisador de tempo de voo) buscando moléculas com C, H e O. A vantagem desta técnica é combinar a eficiência da separação cromatográfica com a obtenção de informações estruturais, como massa molar, grau de instauração e fórmula molecular obtidos do espectrometro de massas. (Chiaradia *et al.*, 2008).

O chamado cromatograma de massas que é assim denominado por se tratar de um cromatograma constituído de todos os íons produzidos pelo espectrômetro de massas ou apenas pelos íons de interesse produzidos por este. O primeiro passo é a escolha dos eluentes e da metodologia. Após, os extratos são infundidos na forma líquida no cromatógrafo e ao sair dele, passam por uma interface até atingir o espectrômetro. A espectrometria de massas tem como princípios fundamentais:

- a geração de íons de compostos orgânicos ou inorgânicos em fase gasosa
- a posterior separação destes íons de acordo com suas razões massa-carga (m/z)
- a detecção de tais íons, segundo suas respectivas m/z e abundância.

No espectrômetro, o volume de solvente é diminuído à pressão ambiente, sem elevar a temperatura e sob alta voltagem. No ionizador por nebulização (ESI ou electrospray ionization) podem ser escolhidos, ou o modo positivo, ou o negativo, dependendo do sinal da tensão aplicada. Explosões coulômbicas são geradas no solvente que carrega o analíto (formação do spray). Seguidas explosões coulômbicas irão reduzir as gotas até que sejam produzidos os íons. A análise de terpenoides é reportada na literatura nos modos de ionização positivos e negativos, mas no modo de ionização negativo há maior sensibilidade na detecção destes compostos.

Os íons formados por eletronebulização sofrem ionização suave, são formados íons pseudo-moleculares intactos, como $[M+H]^+$ no modo positivo, ou $[M-H]^-$ no modo negativo, porque a energia empregada nestas fontes de ionização não é suficiente para gerar uma fragmentação significativa das moléculas. Podem, também, formarem-se adutos, ou seja, a massa detectada pode ser um rearranjo entre os íons do analíto e íons do solvente. Adutos comuns são formados com Na^+ , K^+ , NH_4^+ (no modo positivo) e $HCOO^-$ e CH_3COO^- (no modo negativo) (Vijlder *et al.*, 2018).

Os íons, são, finalmente, transferidos para o analisador de quadrupolo por tempo de voo (QToF, do inglês, Quadrupole Time-of-Flight), para medir a razão massa/carga (m/z) dos íons numa exatidão de 0,0001 unidades de massa atômica (u.m.a.). Analisadores de tempo de voo ("Time-of-Flight Analyser") baseiam-se no princípio de que, como os íons são gerados na mesma fonte de ionização do espectrômetro de massas, eles possuem a

mesma energia cinética. Desta forma, a velocidade dos íons é apenas diferenciada por suas massas (pois a velocidade é inversamente proporcional à raiz quadrada da massa). Resumidamente, após a injeção do analito ocorre:

- 1.rápida separação cromatográfica
- 2.produção de íons em fase gasosa
- 3.aceleração dos íons a velocidades específicas em um campo elétrico
- 4.separação dos íons por um analisador de massas
- 5.deteção de cada íon em um m/z específico

1 OBJETIVOS

1.2 Objetivo geral

Ampliar o conhecimento sobre a diversidade e aplicabilidade de espécies de *Ganodermataceae* (Basidiomycota) coletadas em áreas de Mata Atlântica e Pampa, utilizando análises morfológicas e ensaios farmacológicos.

1.3 Objetivos específicos

- ✓ Conhecer as espécies da família *Ganodermataceae* presentes em áreas Sudeste/Sul do Brasil, compreendida nos biomas Mata Atlântica e Pampa;
- ✓ Utilizar caracteres morfológicos para a identificação das espécies encontradas na área de estudo;
- ✓ Avaliar qualitativamente e quantitativamente a atividade biológica de extratos etanólicos das amostras coletadas de *Ganodermataceae*.
- ✓ Empregar ensaios de citotoxicidade para identificar possíveis agentes citotóxicos e/ou demonstrar a segurança dos extratos etanólicos de origem fúngica.
- ✓ Verificar o potencial anti-trichomonas e anti-biofilme dos insumos produzidos.

- ✓ Confirmar a identificação taxonômica dos espécimes coletados através de análise molecular.
- ✓ Permitir a caracterização de alguns constituintes químicos responsáveis pela atividade farmacológica dos bioativos produzidos por *Foraminispora rugosa* através de análise por espectrometria de massas.

2 HIPÓTESES

- As espécies pertencentes à família *Ganodermataceae* do Sudeste/Sul do Brasil apresentam potencial farmacológico para serem utilizadas como antineoplásicas, anti-trichomonas e antibiofilme.
- As espécies produzem terpenoides entre os metabólitos secundários biossintetizados.

3 JUSTIFICATIVA

A importância dos produtos naturais para a sobrevivência dos fungos selvagens é uma evidência da miríade de metabólitos secundários biossintetizados que favorecem a ciclagem de matéria orgânica, a competitividade e muitas vezes, o parasitismo de plantas e animais (e outros fungos). Uma vantagem deste aspecto é que os constituintes químicos produzidos podem ser utilizados também para a descoberta de novos fármacos ou na semi-síntese de fármacos mais potentes. Considerando a necessidade da ampliação do conhecimento sobre a funga brasileira, especialmente para espécies de *Ganodermataceae*, a possibilidade de descobrimento de novos táxons com potencial para desenvolvimento de arsenal contra neoplasias e micróbios e motivado pelo (a):

- grande diversidade dos fungos poroides, em especial de *Ganodermataceae*, já evidenciada em levantamentos anteriores realizados na Região Sudeste/Sul do Brasil;
- escassez de estudos taxonômicos na área, sendo que, em sua maior parte, os que foram realizados tiveram enfoque apenas morfológico;

- a carência de informações sobre os metabólitos secundários produzidos por espécies que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais;

- poucos trabalhos sobre o potencial farmacológico e aplicabilidade das espécies ocorrentes na região.

Propomos o estudo das espécies da família *Ganodermataceae* encontradas em áreas de Mata Atlântica e Pampa, através de uma abordagem morfológica, molecular e farmacológica.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Coletas

Foram realizadas coletas, no período de 2016 a 2018 de espécimes cuja morfologia se assemelhasse com macrofungos da família *Ganodermataceae*, nos domínios da Mata Atlântica e Pampa. (Dados das coletas podem ser vistos na tabela 2 no Artigo 2).

A região de coletas compreendeu os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo, em reservas protegidas e zonas antropizadas. Os basidiomas foram examinados comparando-se a morfologia macro e microscópica com dados da literatura (Torres-Torres *et al.*, 2012, 2013 e 2015; Campos-Santana e Loguercio-Leite, 2013; Costa-Rezende, D. H, *et al.*, 2016 e 2017). A suposta identificação foi confirmada através de análise molecular.

6.2 Análises morfológicas

Os basidiomas foram fotografados, coletados e levados para o laboratório de Micologia/UFRGS e em seguida desidratados em estufa (35° a 40°C). Macroscopicamente foram caracterizados a partir de observações e medidas de caracteres importantes para este grupo de fungos, como píleo (dimensões, formato, superfície, cor, presença ou ausência de cutícula, margem e contexto), himenóforo (cor, número de poros por mm, tamanho dos poros, tamanho dos dissepimentos), estipe (dimensões, posição, formato, superfície, cor, presença ou ausência de cutícula, contexto). Para a análise microscópica, foram realizados cortes nos basidiomas (contexto e pileipelis) à mão livre, sob microscópio estereoscópico. Os cortes foram montados em lâminas e lamínulas seguindo Teixeira (1995). Foram utilizados KOH 2-3%

(hidratante e reagente para observação de reação xantocroica das hifas e basidiósporos), floxina 1% (corante para observar as características das hifas generativas, himênio e basidiósporos) e reagente de Melzer para observar a reação de dextrinoidia nas hifas e basidiósporos. A observação e mensuração (n=40) das estruturas foram realizadas em microscópio óptico com ocular micrométrica e os valores foram tabulados em planilha do Microsoft Excel para calcular média e desvio padrão na variação dos valores ($\Delta s = 5\%$), bem como a razão entre o comprimento e a largura dos basidiósporos (R). Os aspectos nomenclaturais, como sinonímias, autoria, datas e protólogos dos nomes relacionados com o complexo foram consultados nas bases de dados Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/>) e Mycobank (<http://www.mycobank.org/>).

Após a identificação, os materiais foram depositados no herbário do Instituto de Biociências (ICN/UFRGS).

6.3 Análise molecular filogenética

Para as análises moleculares, fragmentos dos basidiomas ainda frescos foram envoltos em papel manteiga e acondicionados em sacos hermeticamente fechados (tipo *ziplock*) com sílica-gel, a fim de preservar o DNA para estudos moleculares. Para a extração do DNA dos materiais, foi seguido o protocolo de Doyle; Doyle (1987) modificado por Góes Neto *et al.* (2005). Para amplificação das regiões nrLSU e nrITS foram utilizados os pares de *primers* LR0R-LR7 ou LR0R-LR5 (Vilgalys e Hester, 1990) e ITS8F-ITS6R (Dentinger *et al.*, 2010). Os produtos de extração foram amplificados por PCR a partir dos parâmetros especificados no Capítulo 2. A amplificação foi verificada para todos os produtos de PCR através da presença de bandas em gel de agarose 0,8% através da técnica de eletroforese, utilizando-se 2 μ L de tampão *Blue Juice*TM 10x, 1 μ L de SYBR green gel stain 500x e 2 μ L do produto de PCR. Em seguida, os produtos de PCR (ITS diluído 1/100 e 28S diluído 1/10) foram purificados com PEG (polietilenoglicol), para eliminação dos reagentes e de possíveis impurezas.

As sequências de DNA amplificadas e purificadas foram enviadas para reação de sequenciamento na Plataforma de Tecnologias (PDTIS) da Fiocruz de Belo Horizonte ou para a Macrogen Inc., em Seoul, Coreia do Sul.

Os cromatogramas gerados foram vistoriados e editados manualmente no software Geneious versão 9.0.5 (Kearse et al. 2012). A presença de ambiguidades indicando posições heterozigotas, foram anotadas de acordo com o código do International Union of Pure and Applied chemistry (IUPAC).

6.3.1 Alinhamento

As sequências geradas foram agrupadas de acordo com o marcador utilizado e alinhadas no MAFFT v.7 (Katoh *et al.* 2019, Kuraku et al., 2013), o alinhamento foi posteriormente editado manualmente através do software MEGA v.7 (Kumar et al. 2016).

O modelo de evolução molecular mais adequado aos dados foi obtido através do programa jModelTest2 v.2. 1.6 usando o AIC (Akaike Information Criterion) (Gascuel, Guindon, 2003; Darriba et al., 2012).

Para as análises filogenéticas foi montado uma matriz individual para cada marcador, com as sequências obtidas das amostras coletadas e aquelas disponibilizadas no banco de dados do GenBank (ncbi.nlm.nih.gov/genbank/, Benson et al., 2005). Para a construção e análise das árvores filogenéticas a partir das sequências alinhadas, foram utilizados os métodos de Máxima Verossimilhança (ML) com 1.000 pseudoreplicações (bootstrap), utilizando o programa RAxML versão 8.2.10 (Stamatakis 2014).

Para a análise de Inferência Bayesiana (IB) foi utilizado o programa Mr. Bayes v. 3.2.6 (Ronquist et al. 2012).

Os modelos evolutivos que mais se ajustaram aos dados de cada partição foram implementados como modelos específicos de partição dentro de análises de modelos mistos particionados, como pode ser visto no Artigo 1.

Os programas foram utilizados pela plataforma CIPRES (<https://www.phylo.org/> Miller et al. 2010). A análise de ML envolveu 100

buscas, cada uma a partir de uma árvore de parcimônia de adição passo a passo aleatória, sob o modelo GTRGAMMA e todos os outros parâmetros estimados pelo software.

Os valores dos suportes de bootstrap foram plotados na topologia com o melhor escore de verossimilhança. As análises bayesianas foram calculadas com 50.000.000 gerações, amostrando valores a cada 1000 gerações, em 4 cadeias e 2 corridas independentes.

A configuração gráfica da árvore, quanto a rotação e disposição dos táxons na topologia, foi primeiro realizada no programa FigTree® v1.4.0. As árvores posteriormente foram salvas em formato PDF, e editadas graficamente no CorelDraw®. Ao final do trabalho todas as sequências obtidas foram depositadas no banco de dados moleculares GenBank.

6.4 Preparação dos extratos

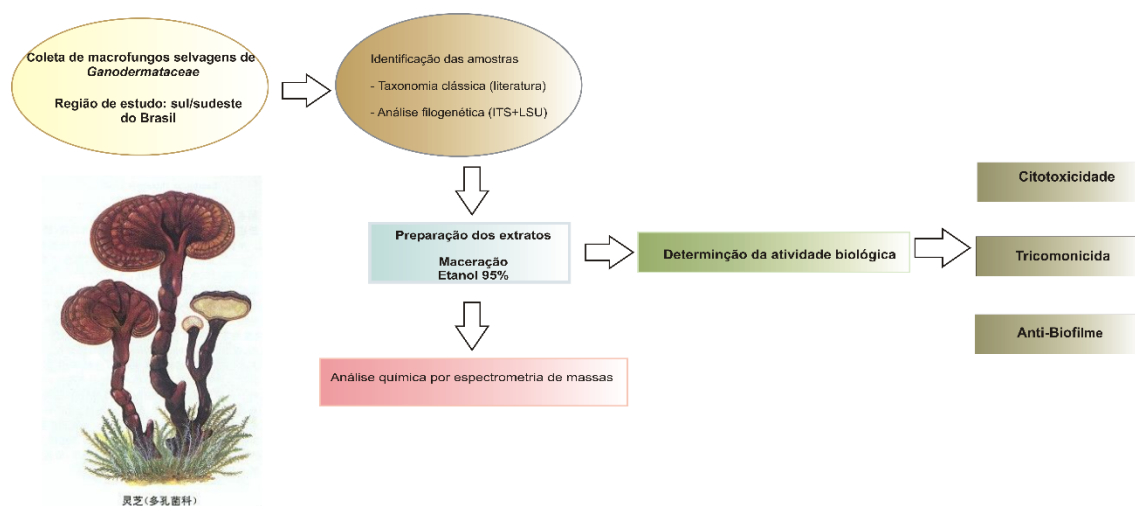
Dentre todas as espécies coletadas (Tabela 2), alguns dos basidiomas foram escolhidos para a preparação dos extratos etanólicos. Os critérios utilizados para a produção dos extratos foram, primeiramente, a quantidade em gramas dos basidiomas e em segundo lugar, os basidiomas deveriam apresentar-se maduros, inteiros e sem insetos ou outros parasitas.

Quadro 1: Rendimento dos extratos

Amostra	Matéria-prima (g)	Extrato seco (g)	Rendimento (%)
VOG04	429,8	18,16	4,2
VOG14	113,7	6,53	5,7
VOG15	117,5	7,27	6,2
VOG49	334	19,76	5,9
VOG68	58,49	0,77	1,32
VOG70	51,37	0,87	1,69
VOG71	14,67	0,20	1,36
ACM1370	38,06	2,43	6,38
ACM1374	364,34	16,55	4,54
VOG131	2,91	0,0343	2,35

VOG136	54,64	1,61	2,47
VOG148	32,50	0,89	2,74
VOG150	110,60	4,93	4,45
VOG127	57,62	1,74	3,01
VOG149	6,74	0,58	8,65
GAS1118	7,82	0,31	4,00
VOG137	2,52	0,04	1,58
VOG210	14,76	1,03	6,99
VOG212	414,10	-	-
SCF2962	44,61	1,72	3,85

Os basidiomas foram triturados em liquidificador e submetidos a extração com etanol 95% (1:10 proporção fungo:solvente) à temperatura ambiente, por 72 h com troca de solvente a cada 24h. Após a maceração, os extratos foram filtrados a vácuo e desalcoolizados à pressão reduzida em rotaevaporador. Os extratos secos foram quantificados e uma alíquota de cada amostra foi enviada para a avaliação dos efeitos biológicos frente à linhagens de células tumorais, bactérias e protozoários, como mostra o fluxograma 1.



Fluxograma 1: Apresenta a ordem dos experimentos

6.5 Ensaios biológicos

6.5.1 Ensaio de citotoxicidade com MTT

As linhagens celulares gliais C6, carcinoma de pâncreas (MIAPaCa-2), melanoma (MV-3), neuroblastoma SH-Sy5y e fibroblastos (L929) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Já as linhagens celulares Vero (renal sadia) e Hep-G2 (hepatocarcinoma) foram adquiridas do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem C6 cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low suplementada com 5% de soro fetal bovino (SFB). As linhagens Vero e Hep-G2 foram cultivadas com DMEM high e suplementadas com 10% de SFB. Todos os meios de cultivo foram suplementados com 0,1% de anfotericina B (250 µg/ml) e 1% de penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (10 mg/ml). As células foram mantidas em incubadora de CO₂ (Panasonic Healthcare Co., EUA) com umidade relativa de 95% e 5% de CO₂.

Células em crescimento exponencial foram retiradas das garrafas de cultura usando 0,05% de tripsina/ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) e semeadas em placas de cultura na densidade celular padronizada neste trabalho. Após 24h de incubação o meio foi retirado e as células foram submetidas às condições experimentais de tratamento.

6.5.1.2 Preparação dos extratos e determinação da viabilidade celular

Todos os extratos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e meio de cultura produzindo uma concentração final de DMSO de 0,5%. As células da (3×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Após esse período, as células foram submetidas ao contato com os extratos nas concentrações entre 50-500 µg/mL, por um período de 24 h. A viabilidade celular foi verificada pelo ensaio de brometo de metiltiazolildifeniltetrazólio (MTT). Foi utilizado o controle contendo apenas o meio de cultura e o controle do veículo (DMSO a 0,5% em meio de cultura). Para determinação da concentração citotóxica para 50 % das células (IC₅₀) de cada composto testado foi utilizada análise de regressão não linear com auxílio do software GraphPad Prism 7.0.

6.5.1.3 Ensaio de citotoxicidade com sais tetrazólio (MTT)

A viabilidade das células foi avaliada em placas de 96 poços, após um período de 24 h de incubação, sendo o meio de cultura retirado e, em seguida, adicionado 100 μ l de 0,5 mg/ml de MTT a cada poço. As placas foram incubadas por 1 h a 37°C, o MTT foi removido e o produto formado foi lido em 570 e 630 nm em espectrofotômetro de microplacas (Spectramax 190-Molecular Devices, com software ROMTRAmx M2e versão 2.1.35). Pelo menos três experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada ensaio (n = 3). Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em comparação com o controle do veículo (0,5% DMSO).

6.5.1.4 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), e a significância estatística foi determinada pela Análise de Variância (ANOVA, p <0,05), seguida do pós-teste de Dunnett para comparações múltiplas. O programa utilizado para essas análises foi o *GraphPad Prism 7.0*.

6.5.2 Ensaio de atividade antibiofilme

6.5.2.1 Separando pequenas moléculas de uma mistura complexa

Para realizar a separação de pequenas moléculas dos extratos brutos, 3 mL de extrato etanólico diluído em água miliq autoclavada foi filtrado, primeiramente em um ultrafiltro de centrífuga Ultracel 10 KDa Amicon (Merck Millipore, Tullagreen, Ireland) e centrifugado a 3500 RCF (força de rotação da centrífuga) e 4 °C durante 5 min. As moléculas que permaneceram retidas no filtro, chamadas aqui de R10, foram separadas. As moléculas menores, foram novamente filtradas, desta vez com um ultrafiltro de 3 KDa, aplicando 500 μ L a 14000 g. Assim, nesta filtração, as moléculas que ficaram retidas, foram chamadas R3 e as menores, as que saíram no filtrado, F3. Foram testadas como inibidores de biofilme as frações com moléculas de tamanho ≥ 10 KD (R10), as moléculas de tamanho $3 < x < 10$ KD (R3) e a subfração cujas

moléculas apresentaram tamanho inferior a 3KD (F3). Conforme mostra a Fig. 11.

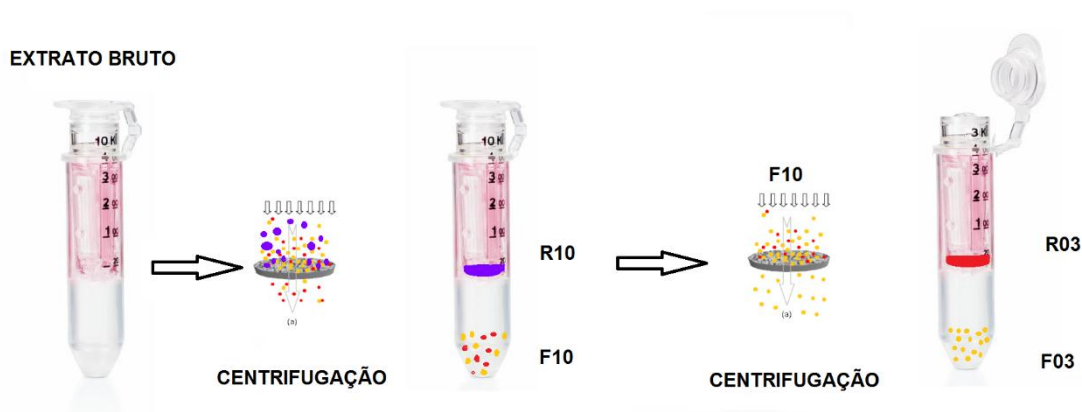


Fig.11: Processo de separação por tamanho de moléculas. R10:Retido em ultrafiltro de 10KDa, F10: filtrado em ultrafiltro de 10KDa; R03: Retido em ultrafiltro de 3KDa, F03: filtrado em ultrafiltro de 3KDa.

6.5.2.2 Ensaios de inibição de biofilme

A cepa-teste de *S. aureus* ATCC 6538 foi cultivada em meio TSB por 24h à 37°C. Após, um inóculo de *S. aureus* equivalente a 1×10^8 UFC (OD_{620} : 0,150) foi preparado em salina e 80µl foram adicionados em microplaca de poliestireno de 96 poços de fundo chato (Kasvi®). Oitenta microlitros das frações obtidas dissolvidas em água estéril foram adicionados na microplaca, assim como 40 µL de caldo triptona de soja (TSB) (Kasvi®). A microplaca foi incubada em estufa por 24 horas a 37°C. Para controle do crescimento bacteriano foi utilizado vancomicina (8 µg/mL) (Sigma-Aldrich®) e para controle de formação de biofilme apenas inóculo bacteriano sem adição do tratamento. O ensaio foi conduzido em duas replicatas independentes e os tratamentos foram testados em quadruplicata. O crescimento bacteriano foi mensurado através da diferença da leitura da densidade óptica a 620 nm nos tempos final (24 horas) e inicial (0). Para avaliação da formação de biofilme, foi utilizada a metodologia do cristal violeta. Após 24h de incubação, a suspensão foi descartada e a placa foi lavada com salina e fixada à 60°C durante 1h. Na sequência, foram adicionados 200 µL de cristal violeta 0,4%. Foi aguardado 15 min até a coloração das células nas paredes da placa. Após este período, a placa foi lavada com água destilada e foram adicionados 200 µL de etanol

absoluto (30 min) e, nova leitura, agora em 570 nm, foi realizada. Com a leitura dos dados foi verificado a porcentagem de biofilme inibido, sendo que inóculo sem adição do tratamento foi considerado como 100% de formação de biofilme. Foram considerados positivos para inibição de biofilme os compostos que apresentaram pouca ou nenhuma interferência no crescimento bacteriano, tendo sido capazes de reduzir a aderência e formação de biofilme.

6.5.3 Ensaio de atividade anti *Trichomonas*

O isolado de *T. vaginalis* (ATCC 30236) foi cultivado *in vitro* em meio TYM (Triptona – Extrato de Levedura – Maltose) em pH 6,0, suplementado com soro inativado pelo calor a 10% (v/v) e incubado à 37 °C (Diamond, 1957). Os organismos na fase de crescimento exponencial e exibindo mais do que 95 % de viabilidade (com morfologia normal) foram coletados, centrifugados e transferidos para um novo meio TYM para testar frente aos extratos fúngicos em microplaca de 96 poços.

Primeiramente os extratos fúngicos (e algumas subfrações) foram diluídos em dimetil sulfóxido (DMSO) a no máximo 2%. Foi realizado um screening de ação anti-trichomonas com a concentração final de cada poço calculada em 1.0 mg/mL (0.6% of DMSO na concentração final do poço). Na determinação da atividade, 100 µL da suspensão do parasita foi adicionado em cada poço, tendo ao final 2.0×10^5 trophozoítos/mL. Dois controles foram utilizados: somente com parasitas e o controle do veículo, com parasitas e DMSO a 0.6%. As microplacas foram incubadas por 24 h à 37 °C e 5.0% CO₂. O número de trofozoítos viáveis foi avaliado por contagem em hemocitômetro com o corante azul de tripan (0.2%). Os resultados foram expressos em número células vivas, comparando com poço não tratado e considerando a mobilidade e a morfologia normal dos trofozoítos.

6.6 Análise por Cromatografia Líquida acoplada a espectrômetro de massas hífenizadas

A análise parte das subfrações obtidas do extrato etanólico. As amostras foram injetadas no sistema UHPLC-QTOF-MS. O sistema consiste em uma coluna Shim-pack XR-ODS III (2.0 × 50 mm, 1.6 µm) da marca Shimadzu, termostaticada a 35 °C acoplada ao analisador de quadrupolo por tempo de

vão (Impact II, Bruker Daltonics). Além disto o sistema apresentou ionização por fonte eletrospray e foi operado no modo negativo. Foi adotado o modo de eluição em gradiente, sendo a fase móvel constituída por: eluente A: acetonitrila (a 0.1% de ácido fórmico) e B: fase aquosa (a 0.1% de ácido fórmico). O gradiente de eluição iniciou em 10% de A e foi mantido por 2 min, quando foi aumentado para 95% pelos próximos 10 min, e mantido por 3 min. Então, o solvente A a 95% foi diminuído a 10% em 2 min, quando foi mantido por 5 min. A vazão foi 0.35 mL min^{-1} e o volume injetado, $10 \mu\text{L}$. Os parâmetros de operação de ESI foram: voltagem do capilar 2500 V ; e na plate offset, 500 V ; pressão do nebulizador foi $3 \text{ bar (N}_2\text{)}$; gás de secagem $9 \text{ L min}^{-1} (\text{N}_2)$; a temperatura de secagem foi $190 \text{ }^\circ\text{C}$. O sistema UHPLC-QTOF-MS operou no modo de aquisição por dissociação induzida por colisão em banda larga (bbCID) e a recuperação do espectro foi acima de m/z 55–1000 com taxa de scan de 2 Hz . Este modo forneceu espectro de massas (MS) e espectro de massas hifenizado (MS/MS) ao mesmo tempo, trabalhando em duas diferentes energias de colisão: baixa energia de colisão para adquirir o MS e alta energia de colisão (20 eV). Nenhum isolamento de íons foi feito no quadrupolo. Íons de massa pré-selecionada foram fragmentados na célula de colisão. Foi realizada uma calibração externa no sistema UHPLC-QTOF-MS antes de cada injeção com solução de formiato de sódio. Os dados foram tratados no Software Data Analysis 4.2 (Bruker Daltonics). A acurácia da medida das massas teve como precisão erro $< 5 \text{ ppm}$.

Além disto, foi realizado um levantamento de dados envolvendo nomes de compostos, fórmula molecular, estrutura química e íons relacionados buscados na literatura, bem como, foram consultados bancos de dados online, a citar:

- PubChem Compound (<https://www.sciencedirect.com/>),
- RIKEN MSnspectral database for phytochemicals-ReSpect (<http://spectra.psc.riken.jp/>),
- Human Metabolome Database (www.hmdb.ca),
- Mass Bank of North America (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>).

Tabela 2: Pontos de coleta das amostras identificadas por análise molecular

Amostra	Data coleta	Localidade	UF	Coordenadas	Estação	Observação
VOG04	11/05/2016	Instituto de Pesquisas Hidráulicas (UFRGS), Porto Alegre	RS	30° 4' 35.048" S 51° 6' 53.173" W	I	<i>Ganoderma</i> lacado (subg. <i>Elfvigia</i>), em <i>Pinus</i> sp.
VOG14	17/09/2016	Distrito de Val Feltrina, Silveira Martins	RS	29° 37' 41.584" S 53° 36' 1.500" W	I	<i>Ganoderma</i> (subg. <i>Elfvigia</i>) complex#
VOG15	17/09/2016	Distrito de Val Feltrina, Silveira Martins	RS	29° 37' 50.94" S 53° 36' 30.11" W	I	<i>Ganoderma</i> (subg. <i>Elfvigia</i>)# complex#
VOG49	16/11/2016	Santa Tereza	RS	29° 9' 28" S 51° 41' 50" W	P	<i>Ganoderma</i> (subg. <i>Elfvigia</i>)# complex#
VOG59	14/12/2016	REBIO Augusto Ruschi, Santa Tereza	ES	19° 54' 49" S 40° 33' 9" W		<i>A. schombourgkii</i>
VOG61	14/12/2016	REBIO Augusto Ruschi, Santa Tereza	ES	19° 54' 49" S 40° 33' 9" W		<i>A. schombourgkii</i>
VOG68	14/12/2016	REBIO Augusto Ruschi, Santa Tereza	ES	19° 54' 49" S 40° 33' 9" W	P	<i>A. schombourgkii</i> #
VOG70	14/12/2016	REBIO Augusto Ruschi, Santa Tereza	ES	19° 53' 57" S 40° 32' 52" W	P	<i>A. schombourgkii</i> #
VOG71	14/12/2016	REBIO Augusto Ruschi, Santa Tereza	ES	19° 54' 49" S 40° 33' 9" W		<i>A. schombourgkii</i>
ACM1370	Jan2017	Parque Nacional de Foz do Iguaçu, Foz do Iguaçu	PR	25° 9' 26" S 53° 50' 13" W	V	<i>Amauroderma schomburgkii</i> #

ACM1374	Jan2017	Parque Nacional de Foz do Iguaçu, Foz do Iguaçu	PR	25° 9' 26" S 53° 50' 13" W	V	<i>Ganoderma</i> (subg. <i>Elfvigia</i>) complex#
VOG127	25/02/2017	Parque Estadual Lago Azul, Campo Mourão	PR	24° 06' 03" S 52° 19' 02" W	V	<i>Foraminispora rugosa</i> #
GAS1084	25/02/2017	Parque Estadual Lago Azul, Campo Mourão	PR	24° 06' 03" S 52° 19' 02" W	V	<i>Foraminispora rugosa</i> #
VOG129	25/02/2017	Trilha da Aventura, Parque Estadual Lago Azul, Campo Mourão	PR	24° 06' 03" S 52° 19' 02" W	V	<i>A. schombourgkii</i>
VOG131	25/02/2017	Parque Estadual Lago Azul, Campo Mourão	PR	24° 06' 03" S 52° 19' 02" W	V	<i>Ganoderma</i> lacado (subg. <i>Ganoderma</i>), não identificado #
VOG134	25/02/2017	Parque Estadual Lago Azul, Campo Mourão	P	24° 06' 03" S 52° 19' 02" W	V	<i>A. schombourgkii</i>
VOG135	25/02/2017	Parque Estadual Lago Azul, Campo Mourão	PR	24° 06' 03" S 52° 19' 02" W	V	<i>Ganoderma multiplicatum</i>
VOG140	27/02/2017	Parque Nacional de Foz do Iguaçu, Foz do Iguaçu	PR	25° 36' 41" S 54° 25' 56" W	V	<i>A. schombourgkii</i>
VOG141	27/02/2017	Parque Nacional de Foz do Iguaçu, Foz do Iguaçu	PR	25° 36' 41" S 54° 25' 56" W	V	<i>A. schombourgkii</i>
VOG148	25/02/2017	Parque Estadual Lago Azul, Campo Mourão	PR	24° 06' 03" S 52° 19' 02" W	V	<i>A. schombourgkii</i> #
VOG136	26/02/2017	Parque Nacional de Foz do Iguaçu, Céu Azul	PR	25° 9' 26" S 53° 50' 13" W	V	<i>Cristataspora coffeata</i> *#
VOG137	26/02/2017	Parque Nacional de Foz do Iguaçu, Céu Azul	PR	25° 9' 17" S 53° 50' 31" W	V	<i>Ganoderma</i> lacado (subg.

				W			<i>Ganoderma</i>) em árvore em pé. Não identificado.
VOG143	27/02/2017	Parque Nacional de Foz do Iguaçu, Foz do Iguaçu	PR	25° 36' 44" S 54° 25' 51" W	V		<i>A. schombourgkii</i>
VOG147	27/02/2017	Parque Nacional de Foz do Iguaçu, Foz do Iguaçu	PR	25° 38' 52" S 54° 27' 08" W	V		<i>A. pseudoboletum</i>
VOG149	março 2017	Fazenda Mariana Pimentel, Eldorado do Sul	RS	30° 12' 39.6" S 51° 35' 45.6" W	O		<i>Ganoderma</i> lacado (subg. <i>Ganoderma</i>). Não identificado.#
VOG170	30/07/2017	Parque Estadual do Espinilho, Barra de Quaraí	RS	30° 10' 26" S 57° 31' 11" W	I		Muito seco e quente, espécime velhos, <i>Ganoderma</i> cf <i>martinice</i> em <i>Acacia caven</i> .
GAS1118	21/04/2017	Parque Estadual Itapuã, Viamão	RS	-			<i>Ganoderma stipitatum</i> (?)#
VOG210	19/01/2018	Fazenda Mariana Pimentel, Eldorado do Sul	RS	30° 12' 39.6" S 51° 35' 45.6" W	V		<i>Ganoderma</i> lacado (subg. <i>Ganoderma</i>), não identificado.#
VOG212	03/02/2018	Parque Farroupilha Porto Alegre	RS	30° 02' 06,1" S 51° 13' 10,5" W	V		<i>Ganoderma</i> aff. <i>martinicense</i> #
SCF2962	03/02/2018	Parque Estadual Aparados da Serra, Cambará do Sul	RS	29° 10' 57,1" S 50° 05' 55.6" W	V		<i>A. schombourgkii</i> #
GAS1302	08/02/2018	Parque Estadual Turístico do Alto Ribeiro, Iporanga	SP	24° 33' 04.4" S 48° 40' 49.9" W	V		<i>A. schombourgkii</i>

Legenda: P: primavera, V: verão, O: outono, I: inverno, *Ganoderma* (subg. *Elfvigia*) complex: *Ganoderma* de píleo opaco em zona antropizada; #: sofreram ensaios biológicos.****Ganoderma coffeatum***: synon. *Cristataspora coffeata* (Berk.) Steyaert, Persoonia 7 (1): 102 (1972).

Tabela 3: Relações morfológicas entre *G. parvulum* e *G. martinicense* com VOG150, VOG170 e VOG212.

Caracteres	VOG150-VOG212	<i>G. parvulum</i> ²	<i>G. martinicense</i> ¹	VOG170
Fragilidade do píleo à pressão	<i>frágil</i>	<i>rígido</i>	<i>frágil</i>	<i>frágil</i>
Dimensões (píleo, cm)	12.0 x 23.0	1.7-5.5 x 2.2-4 x 0.7-13	5.0-20.0 x 6.0-30.0	7.0 x 9.5
Dimensões (estipe, cm)	3.5 x 5.0	<i>subestipitado à séssil</i>	3.0 x 12.0	<i>subestipitado</i>
Contexto	<i>marrom dourado, homogêneo, com bandas resinosas</i>	<i>pálido, homogêneo, com banda resinosa</i>	<i>marrom, com banda resinosa</i>	<i>marrom, homogêneo, sem bandas resinosas</i>
N° Poros/mm	5-7	5-6	5	4-6
Basidiósporo (µm)	7.0-10.0 x 4.4-6.9	8.0-9.0 x 6.0-6.8	9.5-12 x 5.0-7.0	8.92-11.38 x 5.37-8.10
Q	1.31-1.75	1.18-1.38	1.56-1.80	1.25-1.84
Pileipelis	<i>anamiloide</i>	<i>amiloide, crustohimenoderme</i>	<i>Anamiloide, himenoderme</i>	<i>anamilóide</i>

Legenda: 1- Welti & Courtecuisse, 2010; 2-Torres-Torres et al., 2012.

7. Artigo 1: Artigo publicado na revista *Botanical Studies* (B2), apresentando a identificação das amostras VOG127 e GAS 1084 e a análise química e de citotoxicidade de *F. rugosa*.

First Report of Chemical Composition and Cytotoxicity Evaluation of *Foraminispora rugosa* basidiomata from Brazil

Garcia V. O.^{1,*}, Orcid Number: 0000-0002-9892-0934

Fronza M.², Orcid Number: 0000-0002-7316-8598

Von Borowski R.³, Orcid Number: 0000-0003-1764-944X

Alves-Silva G.¹, Orcid Number: 0000-0002-8142-6665

Zimmer A. R.³, Orcid Number: 0000-0002-8309-7068

Ruaro T.³, Orcid Number: 0000-0001-9641-1258

Gnoatto S. C. B.³, Orcid Number: 0000-0002-8806-3182

Dallegrave A.⁴, Orcid Number: 0000-0003-4868-2250

Silveira R. M. B.¹, Orcid Number: 0000-0003-1578-5034

¹Federal University of Rio Grande do Sul, Institute of Biosciences, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre 91501-970, Rio Grande do Sul, Brazil.

²University of Vila Velha, Avenida Comissário José Dantas de Melo, 21 - Boa Vista II, 29102-920, Espírito Santo, Brazil.

³Federal University of Rio Grande do Sul, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre 90610-000, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁴Federal University of Rio Grande do Sul, Institute of Chemistry, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre 91501-970, Rio Grande do Sul, Brazil.

Key words: cytotoxicity, *Foraminispora rugosa*, *Ganodermataceae*, oxylipins, terpenoids, tandem mass spectra.

* Corresponding author. Viviane de Oliveira Garcia. Av. Roraima, 1000. Prédio 21, sala 5231. CEP: 97105-900. Tel.: +55 55 3220.8627. E-mail: voggarcia@yahoo.com.br

ABSTRACT:

Background: *Foraminispora rugosa* is a species reported from Brazil, Venezuela, French Guiana, Costa Rica and Cuba. It is a basidiomycete in the *Ganodermataceae* family. In this study, both chemical composition and cytotoxicity of the ethanolic extract of *F. rugosa* were investigated for the first time. **Results:** Phylogenetic analysis confirmed the identification of the specimens, and the results of cytotoxicity assays showed that at concentrations of 7.8 – 500.0 µg/mL the ethanolic extract displayed weak cytotoxicity against the tested cell lines. Five oxylipins were identified by Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled with Quadrupole Time-of-Flight and Mass Spectrometry (UHPLC-QTOF-MS). **Conclusions:** This study provides new insights into the current knowledge of bioactive compounds produced by macrofungi, and provides data for future biological assays with relative selectivity and safety.

Background:

Among medicinal fungi, those belonging to the *Ganodermataceae* family are the most widely studied in the world, principally the genera *Ganoderma* and *Amauroderma*. *Ganoderma lingzhi* (misidentified as '*G. lucidum*') (Ahmad et al. 2021) has been used in traditional Chinese Medicine for more than 2,000 years and it is an essential part of Chinese traditional culture, boosting scientific research in the area of health and well-being, and moving billions of dollars every year (Dai et al. 2017). In addition, the genus *Amauroderma* contains approximately 30 species, most of them widespread in tropical areas (Kirk 2008). Examples of bioactive compounds isolated from *Amauroderma* are: amaurocine, a protein with anti-*Trichomonas vaginalis* activity (Duarte et al. 2016); ergosterol or the pro-vitamin D₂ (Li et al. 2015); compounds with anti-acetylcholinesterase activity as amauroamoinin (Zhang et al. 2013); jacareubin, a

xanthone with cytotoxic activity against tumor cell lines of human epidermoid carcinoma and cervical carcinoma (Tang et al. 2015, Kaennakam et al. 2015).

Costa-Rezende et al. (2017) found that some neotropical *Amauroderma* species do not fit within the phylogenetic delimitation of *Amauroderma sensu stricto*. The specimens once called *Amauroderma sprucei* were relatively distant from the *Amauroderma s. str.* clade. Through ultramicroscopic studies, the researchers proved that these specimens form a new taxon, the genus *Foraminispora*. This genus was characterized by presenting differentiated ultramicroscopic structures, namely hollow pillars that join the endospore to the exospore. No reports are found in the literature for the chemical or biological evaluation of *Foraminispora rugosa* (Berk.) Costa-Rezende, Drechsler-Santos & Robledo, a Brazilian species. Therefore, due to the important role that fungi within *Ganodermataceae* play in the pharmacological field, and also due to the lack of chemical knowledge about Brazilian fungi (Kuhar et al. 2018), the ethanolic extracts of *F. rugosa* were evaluated for the first time, by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (UHPLC-QToF-MS) and biological assays.

Methods

Fungal sampling and morphological analysis

Two *F. rugosa* specimen samples, referred to as VOG127 (n° voucher: ICN 200398) and GAS1084 (n° voucher: ICN 200399) from here forward, were collected in February 2017 in Campo Mourão (Lago Azul State Park, 24° 6' 3" S 52° 19' 2" W), Paraná, Brazil. Both specimens were dried and deposited in the herbarium at the Institute of

Biosciences, at the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Morphological analysis was conducted according to Costa-Rezende et al. 2017.

DNA isolation and amplification

Genomic DNA was extracted from dried specimens according to Góes-Neto et al. 2005. The primer pairs ITS8-F/ITS6-R and LR0R/LR7 were used to amplify the nuclear ribosomal internal transcribed spacers (ITS; ITS1-5.8S-ITS2) and the nuclear ribosomal large subunit (LSU, 28S) regions according to Dentinger et al. 2010 and Vilgalys & Hester 1990, respectively. Polymerase chain reaction (PCR) was performed with a total volume of 25 μ L containing 1 unit Taq DNA polymerase, 0.25 μ L of 10 \times Taq polymerase reaction buffer (Applied Biological Material, Vancouver, Canada), 2.5 μ L of bovine serum albumin solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), 0.25 μ M of dNTP mix, 0.6 μ L of each of the two 10 μ M primers, and 1–2 μ L of total DNA. PCR amplification of ITS was performed with 5 cycles of initial denaturation (95 $^{\circ}$ C for 30 sec, 60 $^{\circ}$ C for 30 sec, 72 $^{\circ}$ C for 1min), followed by extension (30 s at 95 $^{\circ}$ C, followed by 30 s at 55 $^{\circ}$ C, 1 min at 72 $^{\circ}$ C) repeated for 25 cycles with a final extension of 10 min at 72 $^{\circ}$ C. PCR amplification of 28S followed methods by Vilgalys & Hester 1990. Purification and DNA sequencing were performed by Macrogen (Geumcheon-gu, Korea) and Fiocruz Belo Horizonte Plataforma PDTIS (Minas Gerais, Brazil). For ITS, the primers were the same as for amplification, and for 28S, we used LR0R and LR5.

Alignment and phylogenetic reconstructions

The sequences were blasted in GenBank with Blastn searches. Based on the blast analysis and related literature, additional related sequences were assembled. ITS and LSU sequence data sets were generated. Both data sets were separately aligned using

MAFFT v.7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software>) and manually adjusted using MEGA 7 to allow maximum alignment and maximum sequence similarity (Katoh & Standley, 2013; Kumar et al. 2016). The data sets were then combined, and in the subsequent analyses were subdivided into four data partitions: ITS1, 5.8S, ITS2 and 28S. Phylogenetic analyses were carried out with combined ITS+28S sequence data sets. In total, 54 specimens were observed (two outgroup species). The 28S matrix was built up to domain D3 (LR5 primer). *Perenniporia medulla-panis* was designated as an outgroup based on previous studies (Costa-Rezende et al. 2017). All materials and sequences used in this study are listed in Supplementary Material A.

All phylogenetic analyses were performed online using the CIPRES Science Gateway. We analyzed the data sets separately using maximum likelihood and Bayesian inference (BI). Maximum likelihood (ML) analysis was carried out in RAxML 8.2.9 (Stamatakis 2014). The partition file was provided to force RAxML software to search for a separate evolution model for each dataset. To assess the reliability of the nodes, rapid bootstrapping replicates were computed under the same model, allowing the program to halt bootstrapping automatically by extended majority rule (MRE)-based bootstrapping criterion (Pattengale et al. 2010). Bootstrap (BS) values above 80 were considered significant (high support), and above 70 were considered moderately supported. BI was performed in MrBayes 3.2.6 (Ronquist et al. 2012), and evolutionary models for BI were estimated using the Akaike information criterion (AIC) for each partition, as implemented in jModelTest2 (Darriba et al. 2012). The best-fit models for each partition were implemented as partition-specific models within partitioned mixed-model analyses (TIM1ef+G for ITS1, JC for 5.8S, TPM3+G for ITS2 and GTR+I+G for 28S). The Bayesian analyses were conducted with two independent runs, each with four simultaneous chains for 5×10^7 generations, sampling trees at every 100th generation.

The convergence diagnostic was calculated every 10^4 generation, and its critical value was set to stop the analysis automatically when the standard deviation of the split frequencies reached the value defined by the stopval command (stoprule = yes, stopval = 0.01). In all analyses, the first 25% of trees from each run were discarded as burn-in. Resulting trees from the two independent runs were then pooled to produce one, 50% majority-rule consensus tree, and Bayesian posterior probabilities (BPPs) were generated for the resulting tree. A BPP value above 0.99 was considered significant (high support), and above 0.95 was considered moderately supported.

Preparation of *F. rugosa* ethanolic extract and fractions

Only the VOG127 specimen was used to prepare the ethanolic extract. First, 57.62 g of the material was cut into small pieces and ground in a blender. The powder was macerated with ethanol (95%) for 3 days (ratio 1:10) with solvent exchange every 24 hours. After filtration by sintered funnel (G3), the solvent was removed in a vacuum with a rotavaporator (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland). The dried extracts were stored in flasks and quantified. The ethanolic extract from VOG127 was subjected to fractionation using column chromatography (Silica Gel 60), employing gradient elution (10% increments) with ciclohexane, ciclohexane/dichloromethane, dichloromethane, dichloromethane/methanol and finally, with methanol.

UHPLC–QTOF–MS analysis

The analysis of the five samples was carried out using a UHPLC-QTOF-MS system. The UHPLC (Shimadzu-Nexera x2) was equipped with a Shim-pack XR-ODS III column (2.0×50 mm, $1.6 \mu\text{m}$) from Shimadzu with the thermostat set at 35°C and coupled to the UHPLC-QTOF-MS mass analyzer (Impact II, Bruker Daltonics). The

UHPLC-QTOF-MS system was equipped with an electrospray ionization (ESI) source, operating in negative ionization mode. Within the adopted elution gradient mode, the mobile phase consisted of A: acetonitrile (0.1% formic acid) and B: aqueous phase (0.1% formic acid). The elution gradient started at 10% of A for 2 min, then was increased to 95% in the next 10 min, and kept for 3 min. Then 95% A linearly decreased to 10% in 2 min, and was kept for 5 min. The flow rate was 0.35 mL min^{-1} and the injection volume was $10 \text{ }\mu\text{L}$. The operation parameters of ESI were the following: capillary voltage 2500 V; end plate offset, 500 V; nebulizer pressure, 3 bar (N_2); drying gas, 9 L min^{-1} (N_2); and drying temperature, $190 \text{ }^\circ\text{C}$. The UHPLC-QTOF-MS system operated in broadband collision-induced dissociation (bbCID) acquisition mode and recorded spectra over the range m/z 55–1000 with a scan rate of 2 Hz. This mode provides MS and MS/MS spectra at the same time, working at two different collision energies; at low collision energy (10 eV), MS spectra were acquired. At high collision energy (20 eV), no isolation took place at the quadrupole, and the ions from the preselected mass range were fragmented at the collision cell. A UHPLC-QTOF-MS external calibration was performed before each injection with a sodium formate solution. Data treatment was processed with Data Analysis 4.2 Software (Bruker Daltonics). Besides, the accurate mass measurement (error < 5 ppm).

Before data processing, an in-house formula database was established including the compound name, molecular formula, chemical structure, accurate mass, and related product ions of the compounds in the VOG127 ethanolic extract by searching from databases such as PubChem Compound (<https://www.sciencedirect.com/>), RIKEN MSnspectral database for phytochemicals - ReSpect (<http://spectra.psc.riken.jp/>), Human Metabolome Database (www.hmdb.ca) and Mass Bank of North America (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>).

In vitro cytotoxicity

The MV-3 (human melanoma), MIAPaCa-2 (human pancreatic carcinoma), SH-Sy5y (human neuroblastoma), astroglial (C-6) cell, HEp-G2 (human hepatoblastoma), L929 (mammalian fibroblast) and Vero (African green monkey kidney epithelial cells) cell lines were used for cytotoxicity screening. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cell viability was determined by the tetrazolium salt method using MTT (Denizot and Lang, 1986). Briefly, cells were seeded in 96-well flat-bottom microplates at a density of approximately 12×10^3 cells/well in 150 µL of DMEM. After cell attachment, serial dilutions of extract (7.8 – 500.0 µg/mL) in culture medium were prepared and cells were incubated for 24h and 48h. Doxorubicin was used as the positive control. The control group cells were treated with higher concentrations of DMSO (0.5%). After incubation, 100 µl of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (1 mg/ml in PBS:Medium (1:1)) was added per well, and the plate was incubated for 2 h to allow the reaction of MTT by cellular mitochondrial dehydrogenases. Excess MTT was aspirated and the formazan crystals formed were

dissolved with 100 μ l of dimethyl sulfoxide (DMSO). Absorbance of purple formazan, proportional to the number of viable cells, was measured at 595 nm using a microplate reader (Molecular Devices, Spectra Max 190, USA). Experiments were carried out at least in triplicate.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad software (San Diego, CA, 176 USA). Data were expressed as the mean \pm standard deviation (SD). Statistical variations were determined using a one- or two-way analysis of variance (ANOVA) when appropriate. Values were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Morphological analysis

Foraminispora rugosa is found growing on the ground or on decayed angiosperm wood in South and Central America (Decock and Herrera-Figueroa 2006). This species is characterized by having a vivid orange hymenophore, with whitish context and the pileipellis as a short trichoderm. This basidiomycete belongs to *Ganodermatacae* for having double-walled basidiospores, with the inner layer ornamented (Fig.1). The dimensions of the basidiospores of studied specimens were compatible with the description in the literature. Both were confirmed micromorphologically as *F. rugosa*. The sample VOG127 has subglobose basidiospores [(8.5-)8.6-10(-10.3) X (7-)7.8-9(-9.7), n=40. Q = 1.22–1.06, Qm = 1.10, n=40] and (5-7(-5.60)) pores/mm.

Phylogenetic analyses

ITS BLAST queries of samples indicate the highest matches with species of *F. rugosa* with 99% similarity, and 28S BLAST showed 98% similarity. To confirm the results found in the BLAST, the sequences from the *Ganodermataceae* family available in Genbank were used. In this study, 28 species and 9 genera were used, namely: *Ganoderma*, *Foraminispora*, *Amauroderma*, *Trachyderma*, *Sanguinoderma*, *Haddowia*, *Magoderma*, *Furtadoa*, and *Tomophagus*. The new ITS and LSU sequences were generated in this study for VOG127 and GAS1084. Also, the concatenated analysis of the ITS+28S dataset was carried out and included 56 samples. The final aligned matrix of the ITS1-5.8S-ITS2 (ITS) region was 551 bp long and the 28S region, 784 bp long. The final aligned matrix of the combined dataset was 1335 bp long. The multiloci dataset recovered nine main clades. Specimens VOG127 and GAS1084 were placed as highly supported within the clade of *F. rugosa*. The new sequences have been deposited in GenBank (MN985326 and MN985327 for ITS; MN985507 and MN985508 for 28S). The *F. rugosa* clade was recovered in a single, well-supported lineage (100% BS, 1.0 BPP) (Fig. 1) with *Ganoderma* as its sister group (-, 0.95 BPP) together with *C. coffeata* (-, 0.99 BPP). *Amauroderma s.s.* (78% BS, 1.0 BPP), *Trachyderma* (100% BS, 1.0 BPP), *Sanguinoderma* (97% BS, 1.0 BPP), *Haddowia* (100% BS, 1.0 BPP), *Tomophagus* (100% BS, 1.0 BPP), *Magoderma* (100% BS, 1.0 BPP) and *Furtadoa* (no support value) were recovered at the genus level.

Figure 1: The sequences of ITS and 28S of the samples VOG127 and GAS1084

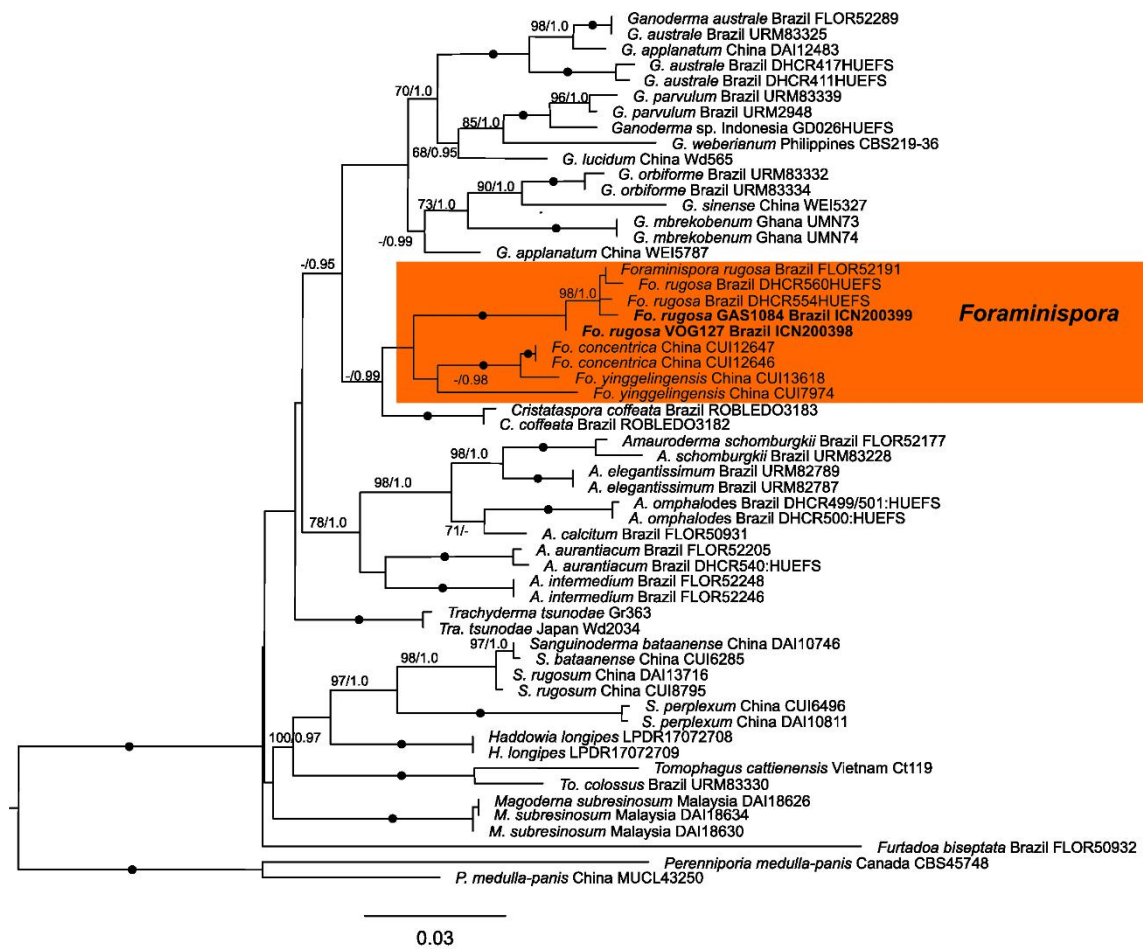


Fig 1 The figure above shows the ITS and 28S sequences of the samples VOG127 and GAS1084 (both in bold) among sequences of *F. rugosa* in the orange rectangle. The resulting topology is from maximum likelihood. The nodes with black dots indicate strong or full support (BS = 99 to 100 and PP = 0.99 to 1.0). Bottom left: the VOG127 specimen with its orange hymenophore. Scale bars: 2 cm. Bottom right: the general

view of subglobose and ornate basidiospores of *F. rugosa* (GAS1084) in optical microscopy (1000 x, Melzer reagent). Scale bars: 10 μm .

Chemical analysis

UPLC-QToF-MS analysis

The solvent-free sample was weighed and yielded 1.73 g (3.01%). Then, thirty two fractions were obtained to submit the ethanolic extract to a chromatography column using solvents of increasing polarity (cyclohexane:dichloromethane:methanol). The similar fractions were collected together (according to color, polarity and number of spots) and concentrated using reduced pressure. After, five subfractions were submitted to mass analysis in UHPLC-QTOF-MS. The analysis of subfractions showed peaks in negative ionization mode. The identification of compounds was achieved by matching pseudo-molecular ion mass, values and MS/MS fragmentation patterns with online or published data of isolated compounds from the *Ganodermatacae* fungi family. Five compounds were initially identified, but many others remain unknown. All identified compounds are listed in Table 1.

The most well known constituents of this family belong to the terpenoids class (Dasgupta & Acharya 2019). Thus, the starting point was to identify molecules with C15, C20 and C30. However, the fragments of the first fractions were very evident from molecules derived from fatty acids. Although these oxylipins are comprised of pairs of isomers, their structures were identified by elucidating the positions of the key hydroxyl and olefinic groups from MS/MS fragment analysis. The results demonstrate the presence of oxylipins with 18 carbon atoms (compounds **1**, **2**, **3**, **4** and **5**).

The compounds **4** and **5** are isomers with the elemental composition $C_{18}H_{34}O_5$. In the MS/MS spectra, the main fragment m/z 211.1338 $[M-H]^-$ indicates the presence of hydroxyl groups at positions 12 and 13 (**4**), and the fragment 171.1022 $[M-H]^-$ of compound **5** indicates the presence of hydroxyl groups at positions 9 and 10. The compounds **4** and **5** were identified to be 9,12,13-trihydroxy-10-octadecenoic acid (9,12,13-TODEA) and 9,10,13-trihydroxy-11-octadecenoic acid (9,10,13-TriHOME), respectively (Ludovici et al. 2014, Zhao et al. 2019).

Abundant ions at m/z 293.2124 $[M-H]^-$ was indicative of $C_{18}H_{29}O_3^-$; the peak at m/z 277.2167 indicated the loss of H_2O and the peak 195.1393 $[M-H]^-$ is a characteristic fragment from scission between C12 and C13, identical to 13-OH-9Z,11E,15Z-octadecatrienoic acid (13-HOtre, **2**) (Dufour & Loonis, 2005, Ludovici et al. 2014, Trapp et al. 2015). The metabolite **3** has a main ion fragment at m/z 293.2122 and the most dominant ion at m/z 185.1185 $[M-H]^-$, thus, **3** was identified as (10E,12Z)-9-oxooctadeca-10,12-dienoic acid (9-KODE) (Levinson et al. 2013, Ludovici et al. 2014, Zhao et al. 2019). The signals detected at m/z 295.2291 (**1**), 277.2168 $[M-H-H_2O]^-$ and 195.1386 were attributed to $C_{18}H_{31}O_3 [M-H]^-$; according to the literature the compounds can be coriolic acid (3-HODE) or vernolic acid (12(13)EpOME) (Ludovic et al. 2014 and Zhao et al. 2019).

Table 1: Characterization of compounds of ethanolic extract from *F. rugosa* by UPLC-QToF-MS^a

N°/Subfraction	Tentative identification	Molecular formula	m/z (measured experimental/theoretical)	Fragment ions (m/z)	err (ppm)	rdb	N°
8.2 (1-8)	(13-HODE) or 12(13)-EpOME	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	295.2281/295.2279	295.2281; 277.2168 ; 195.1386	0.8	3.5	1
8.3 (1-8)	13-HOtre	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	293.2124/293.222	293.2124 ; 277.2167; 195.1393	0.6	4.5	2
8.4 (1-8)	9-KODE	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	293.2122/293.2122	293.2122; 249.2216; 185.1185	0.0	4.5	3
5.6 (9-10)	(9, 12, 13-TODEA	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329.2333/329.2333	329.2333 ; 293.2131; 211.1338 ; 171.1018; 139.1131	0.2	2.5	4
5.7 (9-10)	9,10,13 TriHOME	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329.2325/329.2333	329.2325 ; 293.2108; 211.1337; 171.1022 ; 139.1125	2.7	2.5	5

^a compounds are listed by order of elution; err: deviation between measured mass and theoretical mass of the respective compound in [ppm]; rdb: number of rings and double bonds in the formula. In bold: peak at 100% intensity.

Cytotoxicity assay

In the cytotoxicity assay, higher IC₅₀ values correspond to lower cytotoxic activity. The VOG127 specimen had IC₅₀ values from 119.5 µg/ml (lower dose) to 216.7 µg/ml. The cytotoxicity of the ethanolic extracts of *F. rugosa* was investigated using an MTT assay on two non-transformed cell lines and four mammalian cancer cell lines. Table 2 indicates that the VOG127 ethanolic extract had a weak toxicity for all cell lines tested when compared to doxorubicin. The extract inhibited pancreatic cancer cells (MIAPaCa-2), melanoma cells (MV-3) and L929 (non-transformed fibroblasts cells) growth at very similar concentrations (154.9 µg/mL, 151.3 µg/mL and 153.6 µg/mL, respectively). In regards to neuroblastoma (SH-Sy5y) and astroglial (C-6) cells, the inhibition caused by the ethanolic extract of the VOG127 sample was poor, while for hepatoblastoma (HEp-G2) cells and Vero cells (renal epithelial cells), the extract from VOG127 showed the strongest inhibitive activity (138.5 µg/mL and 119.5 µg/mL respectively).

Table 2. Cytotoxicity of the ethanolic extract of the *F. rugosa* VOG 127 sample using the MTT method.

Cell lines	IC ₅₀ * (µg/mL) values	
	VOG 127	Doxorrubicin
MV3	151.3 ± 19.3	3.83 ± 1.5
MIAPaCa-2	154.9 ± 9.1	23.53 ± 2.3
SH-Sy5y	216.7(n=1)	5.00 ± 0.0 [#]
C6	213.6 ± 11.8	1.31 ± 0.4 ^{##}
HepG2	138.5±3.2	1.5 ± 0.6

L929	153.6 ± 7.6	7.83 ± 0.8
Vero	119.5±2.2	82.4 ± 8.7

*The activity was shown as the IC₅₀ value, which was the concentration of the tested ethanolic extract (µg/mL) that decreased the number of viable cells by 50%. Results are expressed as the mean and standard error values of triplicate data points. Cell lines: MV3: human melanoma; MIAPaCa-2: human pancreas carcinoma; SH-Sy5y: human neuroblastoma; C-6: astroglial C6 cells; HEp-G2: human hepatoblastoma; L929: non-transformed mammalian fibroblast; Vero: mammalian kidney epithelial. Literature data: #Namkaew, J. et al., 2018. ##Zhao, Y. et al., 2016.

Discussion

Here, we corroborate the results of taxonomic analysis found by Costa-Rezende et al. 2017. These authors observed that the columns of the endospore were hollow via Scanning Electron Microscopic analysis of the basidiospores of *F. rugosa*. Later, in 2020, other researchers found the same feature in other fungi in the Paleotropics (Sun et al. 2020). Since the VOG127 and GAS1084 samples were not evaluated through ultrastructural analysis, it was necessary to perform molecular analysis of the specimens in order to confirm their identity. Our specimen of *F. rugosa* grouped together with the specimens used by Costa-Rezende et al. 2017 & Sun et al. 2020. This categorically proved the identification of the specimens in this study by both Maximum likelihood and Bayesian data analysis.

It is known that over 90% of fungal diversity on Earth remains undiscovered (Tripp et al. 2017). Consequently, very little is known about fungal metabolites (Kuhar 2018). On the contrary, the genus *Ganoderma* alone has recorded more than 400 isolated metabolites (Baby 2015), unlike the other genera of *Ganodermataceae*.

In an attempt to identify the compounds of *F. rugosa*, an MS library of scientific literature through 2019 was used as a comparison for the detected fragment ions. No important ions were observed below m/z 180 or above m/z 600 on subfractions of *F. rugosa* under the analytical conditions used in this study.

Oxygenated derivatives of polyunsaturated fatty acids, the oxylipins, were found. Oxylipins are present in organisms from all kingdoms of nature and are a common means of communication among plants, animals, and fungi to control development and alter host-microbe interactions (Pohl et al. 2014).

Oxylipins can be produced by an enzymatic or non-enzymatic route. In fungi, the enzymatic route of oxylipins acts primarily on oleic, linoleic and alpha-linolenic acids (Beccaccioli et al. 2019). The 8-hydroxylinoleic acid (8-HODE) is known to stimulate the sexual cycle of *Aspergillus nidulans* (Gessler et al. 2017) and the (5S,8R)-dihydroxy-octadecadienoic acid (5,8-diHODE) acts in the differentiation process of *A. fumigatus* and *A. flavus*. This oxylipin causes lateral branching in *Aspergillus* hyphae and appressorium formation in *Magnaporthe grisea* (Niu et al. 2020). The (9S,10E,12Z)-9-hydroperoxy-10,12-octadecadienoic acid (9S-HPODE) stimulates the expression of mycotoxin genes in fungi, while the (9Z,11E,13S)-13-hydroperoxyoctadeca-9,11-dienoic acid (13S-HPODE) does the opposite (Gessler et al. 2017). The 9-hydroxy-10E,12Z-octadecadienoic acid (9-HODE) and the 9-hydroperoxy-10E,12E-octadecadienoic acid (9-HpODE) promote cAMP production via G-protein. This signaling pathway affects germination, sporulation and mycotoxin synthesis. In contrast, the Coriolic acid (13-HODE) and the (9Z,11E)-13-hydroperoxyoctadeca-9,11-dienoic acid (13-HpODE) suppress the production of mycotoxins in *Aspergillus* (Beccaccioli et al. 2019). The mushroom *Agaricus bisporum*

is capable of producing 8-HODE and (8R,11S)-dihydroxy-(9Z,12Z)-octadecadienoic acid (8.11-diHODE) from linoleic acid (Wadman et al. 2005).

The presence of oxylipins in the ethanolic extract of *F. rugosa* occurs for environmental reasons, since they are metabolites involved in the regulation of fungal development and communication between the fungus and the host to exploit plant resources and to meet biological needs of fungi (Tsitsigiannis & Keller 2017, Ludovici et al. 2014, Deboever et al. 2019). However, more studies are needed to find the exact role of oxylipins in the ecological relationships of *F. rugosa*.

As previously mentioned, the genus *Ganoderma* belongs to the sister clade of *F. rugosa*. In the studies by Gurovic et al. (2018), the presence of fatty acids in *G. lucidum* caused weak, indirect damaging effects on the prokaryotic cell, which was attributed to an indirect damage of the DNA. Thus, fatty acids should be considered as active components of *G. lucidum*. It is possible that oxylipins contribute to the cytotoxicity of *F. rugosa*. More studies are needed to test this hypothesis.

In this study, we evaluated *in vitro* cell culture models for toxicity screening. HepG-2 is a model for representing liver exposure (Sahu et al. 2014) and glial cell line C6 is a model for representing normal brain astrocytes (Ren et al. 2000). In addition, L929 and Vero have no tumor origin. All lineages have served to mimic healthy cells. The ethanolic extract used here showed weak cytotoxic activity. The standard recommended by the National Cancer Institute is an $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$ (Srisawat 2013). The strongest inhibition occurred in HepG-2 (IC_{50} 138.5) and Vero (IC_{50} 119.5) cells. Interestingly, the IC_{100} of the ethanolic extract from *G. lucidum* was $30 \mu\text{g/mL}$ (Mohan et al. 2016), or an IC_{50} of $31.2 \mu\text{g/mL}$, when tested in HepG2 cells. However, it was not cytotoxic to Vero cells (Fathima & Reena 2016). The weak cytotoxicity in *F. rugosa* may be explained by the difference in the extract constitution when compared to *G. lucidum*.

Preclinical and clinical studies have demonstrated that *G. lucidum* not only has anti-proliferative effects (Oppatova et al. 2019; Li et al. 2019), but also acts as an anti-influenza (Zhu et al. 2017), neuroprotective (Ren et al. 2019, Lai et al. 2019), anti-aging (Cuong et al. 2019), anti-obesity (Diling et al. 2020) and anti-inflammatory (Su et al. 2020) agent. Thus, we suggest the screening of other biological activities for *F. rugosa* as a future research direction, since we already have the guidelines on cytotoxicity and possible compounds.

Conclusion

Specimens of the *F. rugosa* mushroom are found in southern Brazil and the identification was confirmed through phylogenetic analysis of the ITS region and 28S gene sequences. The ethanolic extract of *F. rugosa* has weak cytotoxic activity. It may have some cytotoxic constituents. Oxylipins were detected in this extract via LC-MS.

Acknowledgments

We express our gratitude to the staff of the Lago Azul State Park. We thank Altielys Magnago, Carlos Montoya and Lisiane Garcia for the samples and field support. Special thanks to Idea Wild for the microscopy equipment.

Author's contributions

Garcia, V.O. worked on paper design, data interpretation, writing, and review. Alves-Silva, G. worked on the manuscript and methodology. Zimmer, A.R. and Ruaro, T.C. performed the biological assays. Dallegrave, A. performed most of the chemical analyses, Fronza M. worked on methodology and data interpretation. Gnoatto, S. C. B.

and Borovski, R. G. conceived the presented idea and contributed to sample preparation. Silveira, R. M. B. contributed to the critical review of the results and text and to the chemical analyses. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript and revisions.

Funding

This study was financed in part by the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)” - Finance Code 001.

Availability of data and material:

Accession numbers used in the molecular analysis:

GenBank ITS sequences in:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN985326>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN985327>

GenBank 28S sequences in:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN985507>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN985508>

The final data matrix has been deposited in TreeBASE:

<http://purl.org/phylo/treebase/phyloids/study/TB2:S29283?x-accesscode=335fda807b9242d99ae49933a9a35834&format=html>

List of abbreviations

13-HODE: Coriolic acid; 12(13)-EpOME: Vernolic acid; 13-Hotre: 13-OH-9Z,11E,15Z-Octadecatrienoic Acid; 9-KODE: (10E,12Z)-9-Oxo-octadeca-10,12-Dienoic Acid; 9, 12, 13-TODEA: 9,12,13-Trihydroxy-10-Octadecenoic Acid; 9,10,13

TriHOME: 9,10,13-Trihydroxy-11-Octadecenoic Acid; 8-HODE: 8-Hydroxylinoleic acid; 5.8-diHODE: (5S,8R)-dihydroxy-octadecadienoic acid; 9S-HPODE: (9S,10E,12Z)-9-Hydroperoxy-10,12-Octadecadienoic Acid; 13S-HPODE: (9Z,11E,13S)-13-Hydroperoxyoctadeca-9,11-Dienoic Acid; 9-HODE: 9-Hydroxy-10E,12Z-Octadecadienoic Acid; 9-HpODE: 9-Hydroperoxy-10E,12E-Octadecadienoic Acid; 13-HpODE: (9Z,11E)-13-Hydroperoxyoctadeca-9,11-Dienoic Acid; 8.11-diHODE: (8R,11S)-dihydroxy-(9Z,12Z)-octadecadienoic acids.

Declarations

Ethics approval and consent to participate: Not applicable.

Consent for publication: Not applicable.

Competing interests: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this paper.

References

Ahmad R, Riaz M, Khan A, Aljamea A, Aalgheryafi M, Sewaket D, Alqathama A (2021) *Ganoderma lucidum* (Reishi) an edible mushroom; a comprehensive and critical review of its nutritional, cosmeceutical, mycochemical, pharmacological, clinical, and toxicological properties. *Phytother Res* 35:6030-6062. doi:10.1002/ptr.7215

Baby S, Johnson AJ, Govindan B (2015) Secondary metabolites from *Ganoderma*. *Phytochemistry* 114: 66-101.

doi: 10.1016/j.phytochem.2015.03.010

Beccaccioli M, Reverberi M, Scala V (2019) Fungal lipids: biosynthesis and signaling during plant-pathogen interaction. *Front Biosci* 1,: 172-185. doi: 10.2741/4712.

Costa-Rezende DH, Robledo GL, Góes-Neto A, Reck MA, Crespo E, Drechsler-Santos ER (2017) Morphological reassessment and molecular phylogenetic analyses of *Amauroderma s. lat.* raised new perspectives in the generic classification of the *Ganodermataceae* family. *Persoonia* 39: 254–269. doi: 10.3767/persoonia.2017.39.10

Cuong TV, Chen W, Shi J (2019) The anti-oxidation and anti-aging effects of *Ganoderma lucidum* in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* 117: 99-105.

doi: 10.1016/j.exger.2018.11.016

Dai YC, Zhou LW, Hattori T, Cao Y, Stalpers JA, Ryvarden L, Buchanan P, Oberwinkler F, Hallenberg N, Liu PG, Wu SH (2017) *Ganoderma lingzhi* (Polyporales, Basidiomycota): the scientific binomial for the widely cultivated medicinal fungus Lingzhi. *Mycol Progress* 16: 1051-1055. doi:10.1007/s11557-017-1347-4

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9: 772. doi:10.1038/nmeth.2109

Dasgupta A, Acharya K (2019) Mushrooms: an emerging resource for therapeutic terpenoids. *3 Biotech* 9: 1-14. doi:10.1007/s13205-019-1906-2

Deboever E, Deleu M, Mongrand S, Fauconnier ML (2019) Plant-Pathogen Interactions: underestimated roles of phyto-oxylipins. *Trends Plant Sci* 25: 22-34. doi:10.1016/j.tplants.2019.09.009

Decock C, Herrera-Figueroa S (2006) Neotropical Ganodermataceae (Basidiomycota): *Amauroderma sprucei* and *A. dubiopansum*. *Criptogamie, Mycol* 27: 3–10. <https://sciencepress.mnhn.fr/en/periodiques/mycologie/27/1/neotropical-ganodermataceae-basidiomycota-amauroderma-sprucei-and-dubiopansum>. Accessed 15 Jun 2022.

Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89: 271-277. doi: 10.1016/0022-1759(86)90368-6

Dentinger BTM, Margaritescu S, Moncalvo JM (2010) Rapid and reliable high-throughput methods of DNA extraction for use in barcoding and molecular systematics of mushrooms. *Mol Ecol Resour*, 10: 628–633. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02825.x

Diling C, Yinrui G, Longkai Q, Xiaocui T, Yadi L, Jiabin F, Xiangxiang Z, Miao Z, Ou S, Dongdong W, Burton XY, Qingping YW (2020) Metabolic regulation of *Ganoderma lucidum* extracts in high sugar and fat diet-induced obese mice by regulating the gut-brain axis. *J Funct Foods* 65: 1-22. doi: 10.1016/j.jff.2019.103639

Duarte M, Seixas A, Carvalho MP, Tasca T, Macedo AJ (2016) Amaurocine: Anti-*Trichomonas vaginalis* protein produced by the basidiomycete *Amauroderma camerarium*. *Exp Parasitol* 161: 6-11. doi: 10.1016/j.exppara.2015.12.012

Dufour C, Loonis M (2005) Regio- and stereoselective oxidation of linoleic acid bound to serum albumin: identification by ESI-mass spectrometry and NMR of the oxidation products. *Chem Phys Lipids* 138: 60–68. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2005.08.003

Fathima AT, Reena M (2016) Anticancer and Antibacterial Activity of *Ganoderma lucidum*. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 5: 891-909. doi: 10.20546/IJCMAS.2016.510.097

Gessler NN, Filippovich SY, Bachurina GP, Kharchenko EA, Groza NV, Belozerskaya TA (2017) Oxylipins and oxylipin synthesis pathways in fungi. *Appl Biochem Microbiol*, 53: 628–639. doi: 10.1134/S0003683817060060

Góes-Neto A, Loguercio-Leite C, Guerrero RT (2005) DNA extraction from frozen field collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas* 18:19 - 32. doi: 10.5007/%25x

Gurovic MSV, Viceconte FR, Pereyra MT, Bidegain MA, Cubitto MA (2018) DNA damaging potential of *Ganoderma lucidum* extracts. *J Ethnopharmacol* 217: 83–88. doi: 10.1016/j.jep.2018.02.005

Kaennakam S, Siripong P, Tip-Pyang S (2015) Kaennacowanols A–C, three new xanthenes and their cytotoxicity from the roots of *Garcinia cowa* . *Fitoterapia* 102: 171–176. doi: 10.1016/j.fitote.2015.03.008

Katoh K, Standley DM (2013) Mafft multiple alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30: 772-780. doi: 10.1093/molbev/mst010

Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA (2008) *Ainsworth & Brisby's dictionary of the fungi*, 10th edn. CAB International, Wallingford.

Kuhar F, Pfister D, Furci G, Drechsler-Santos ER (2018) Delimitation of Funga as a valid term for the diversity of fungal communities: the Fauna, Flora & Funga proposal (FF&F). *IMA Fungus* 9: 71–74. doi: 10.1007/BF03449441

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33: 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054

Lai G, Guo Y, Chen D, Tang X, Shuai O, Yong T, Wang D, Xiao C, Zhou G, Xie Y, Yang Bb, Wu Q (2019) Alcohol extracts from *Ganoderma lucidum* delay the progress of Alzheimer's disease by regulating DNA methylation in rodents. *Front Pharmacol* 10: 1-17. doi: 10.3389/fphar.2019.00272

Levinson BS, Zhang R, Wanh Z, FU X, Didonato JA, Hazen LH (2013) Quantification of fatty acid oxidation products using on-line High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Free Radic Biol Medic* 59: 2-13. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.001

Li P, Liu L, Huang S, Zang Y, Xu J, Zhang Z (2019) Anti-cancer effects of a neutral triterpene fraction from *Ganoderma lucidum* and its active constituents on SW620 human colorectal cancer cells. *Anti-cancer Agents Med Chem*. doi: 10.2174/1871520619666191015102442.

Li X, WU Q, Xie Y, Ding Y, Du WW, Sdiri M, Yang BB (2015) Ergosterol purified from medicinal mushroom *Amauroderma rude* inhibits cancer growth in vitro and *in vivo* by up-regulating multiple tumor suppressors. *Oncotarget* 6: 17832-17836. doi: 10.18632/oncotarget.4026

Ludovici M, Ialongo C, Reverberi M, Beccaccioli M, Scarpari M, SCALA V (2014) Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive LC-MS/MS analysis of *Fusarium verticillioides* and maize kernels. *Food Addit Contam, Part A*, 31: 2026-2033. doi: 10.1080/19440049.2014.968810

Mohan K, Padmanaban M, Uthayakumar V, Chandrasekhar R, Muralisankar T (2016) Cytotoxic activities of *Ganoderma lucidum* ethanol extract against HepG2 cell line. *Bangladesh J Pharmacol* 11: 632-633. doi: 10.3329/bjp.v11i3.27906

Namkaew J, Jaroonwichawan T, Rujanapun N, Saelee J, Noisa P (2018) Combined effects of curcumin and doxorubicin on cell death and cell migration of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 54:629-639. doi.org/10.1007/s11626-018-0288-9

Niu M, Steffan BN, Fischer GJ, Venkatesh N, Raffa NL, Wettstein MA, Bok JW, Greco C, Zhao C, Berthier E, Oliw E, Beebe D, Bromley M, Keller NP (2020) Fungal oxylipins direct programmed developmental switches in filamentous fungi. *Nat Commun* 11:1-13. doi: 10.1038/s41467-020-18999-0

Opatova A, Horak J, Vodenkova S, Kostovcikova K, Cumova A, Macinga P, Galanova N, Rejhova A, Vodickova L, Kozics K, Turnovcova K, Hucl T, Sliva D, Vodicka P (2019) *Ganoderma lucidum* induces oxidative DNA damage and enhances the effect of 5-Fluorouracil in colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*. *Mutat Res-Genc Tox En* 845:1-10. doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.06.001

Pattengale ND, Alipour M, Bininda-Emonds ORP, Moret BME, Stamatakis A (2010) How many bootstrap replicates are necessary? *J Comput Biol* 17:337-354. doi: 10.1089/cmb.2009.0179

Pohl CH, Kock JLF (2014) Oxidized fatty acids as inter-kingdom signaling molecules. *Molecules* 19: 1273-1285. doi: 10.3390/molecules19011273

Ren Z, Wang C, Wang T, Ding H, Zhou M, Yang N, Lui Yy, Chan P (2019) *Ganoderma lucidum* extract ameliorates MPTP-induced parkinsonism and protects dopaminergic neurons from oxidative stress via regulating mitochondrial function, autophagy, and apoptosis. *Acta Pharmacol Sin* 40: 441–450. doi: 10.1038/s41401-018-0077-8

Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst Biol* 61: 539–542. doi: 10.1093/sysbio/sys029

Sahu SC, Zheng J, Graham L, Chen L, Ihrle J, Yourickjj, Sprando RL (2014) Comparative cytotoxicity of nanosilver in human liver HepG2 and colon Caco2 cells in culture. *J Appl Toxicol*, 34: 1155–1166. doi: 10.1002/jat.2994

Srisawat T, Chumkaew P, Heed-Chim W, Sukpondma Y, Kanokwiroon K (2013) Phytochemical Screening and Cytotoxicity of Crude Extracts of *Vatica diospyroides* Symington Type LS. *Trop J Pharm Res* 12 (1): 71-76. doi: 10.4314/tjpr.v12i1.12

Stamatakis, A (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312–1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033

Su HG, Peng XR, Shi QQ, Huang YJ, Ming LZ, Qiu MH (2020) Lanostane triterpenoids with anti-inflammatory activities from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* 173:1-7.

doi: 10.1016/j.phytochem.2019.112256

Sun Y-F, Costa-Rezende DH, Xing J-H, Zhou J-L, Zhang B, Gibertoni TB, Gates G, Glen M, Dai Y-C, Cui B-K (2020) Multi-gene phylogeny and taxonomy of *Amauroderma* s.lat. (*Ganodermataceae*). *Persoonia* 44: 206-239. doi: 10.3767/persoonia.2020.44.08

Tang ZY, Xia ZX, Qiao SP, Jiang C, Shen G, Cai MX, Tan XY (2015) Four new cytotoxic xanthenes from *Garcinia nujiangensis*. *Fitoterapia* 102: 109-114. doi: 10.1016/j.fitote.2015.02.011

Trapp AM, Kai M, Mithöfer A, Rodrigues-Filho E (2015) Antibiotic oxylipins from *Alternanthera brasiliana* and its endophytic bacteria. *Phytochemistry* 110: 72–82.

doi: 10.1016/j.phytochem.2014.11.005

Tripp EA, Zhang N, Schneider H, Huang Y, Mueller GM, Hu Z, Häggblom M, Bhattacharya D (2017) Reshaping Darwin's Tree: Impact of the Symbiome. *Trends Ecol Evol* 32:552-555.

doi: 10.1016/j.tree.2017.05.002

Tsitsigiannis DI, Keller NP (2007) Oxylipins as developmental and host–fungal communication signals. *Trends Microbiol* 15: 109-118. doi: 10.1016/j.tim.2007.01.005

Vilgalys R, Hester M (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J Bacteriol* 172: 4238–4246. doi: 10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990

Wadman MW, Van Zadelhoff G, Hamberg M, Visser T, Veldink GA, Vliegthart JFG (2005) Conversion of Linoleic Acid into Novel Oxylipins by the Mushroom *Agaricus bisporus*. *Lipids* 40: 1163-1170. doi:10.1007/s11745-005-1481-2

Zhang SS, Ma QY, Zou XS, Dai HF, Huang SZ, Luo Y, Yu Z F, Luo HR, Zhao YX (2013) Chemical constituents from the fungus *Amauroderma amoiensis* and their *in vitro* acetylcholinesterase inhibitory activities. *Planta Med* 79: 87-91.
doi: 10.1055/s-0032-1327951

Zhao T, Chen S, Li H, Xu Y (2019) Determination of Linoleic Acid Oxylipins in Chinese Baijiu Using Ultra-Performance Liquid Chromatography with Quadruple-Time-of-Flight Mass Spectrometry (UPLC-QTOF-MS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). *Anal Lett* 52: 2165-2179. doi: 10.1080/00032719.2019.1602137

Zhao Y, Ren W, Zhong T, Zhang S, Huang D, Guo Y, Yao X, Wang C, Zhang W-Q, Zhang X, Zhang Q (2016) Tumor-specific pH-responsive peptide-modified pH-sensitive liposomes containing doxorubicin for enhancing glioma targeting and anti-tumor activity. *J Control Release* 222:56–66. doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.006

Zhu Q, Amen YM, Ohnuki K, Shimizu K (2017) Anti-influenza effects of *Ganoderma lingzhi*: an animal study. J Funct Foods 34: 224–22. doi: 10.1016/j.jff.2017.04.040

Supplementary Material: A

Taxa, vouchers, origin and Genbank accession numbers used in the molecular analysis.

Taxa	Voucher	Origin	ITS	LSU
<i>A. aurantiacum</i>	FLOR52205	Brazil	KR816510	KU315205
<i>A. aurantiacum</i>	DHCR540HUEFS	Brazil	KR816511	MF409953
<i>A. austrosinense</i>	CUI13618	China	KR816512	KU219996
<i>A. calcitum</i>	FLOR50931	Brazil	KR816513	KU315207
<i>A. concentricum</i>	CUI12648	China	KR816514	KU219998
<i>A. concentricum</i>	CUI12644	China	KR816515	KU219997
<i>A. elegantissimum</i>	URM82789	Brazil	KR816516	KT006617
<i>A. elegantissimum</i>	URM82787	Brazil	KR816517	KT006616
<i>A. intermedium</i>	FLOR52248	Brazil	KR816518	KU315209
<i>A. intermedium</i>	FLOR52246	Brazil	KR816519	KU315208
<i>A. omphalodes</i>	DHCR499/501HUEFS	Brazil	KR816520	MF409951
<i>A. omphalodes</i>	DHCR500HUEFS	Brazil	KR816521	MF409952
<i>A. perplexum</i>	DAI10811	China	KR816522	KU220002
<i>A. perplexum</i>	CUI6496	China	KR816523	KU220001
<i>A. rugosum</i>	CUI8795	China	KR816524	KU220004
<i>A. rugosum</i>	DAI13716	China	KR816525	KU220007
<i>A. schomburgkii</i>	FLOR52177	Brazil	KR816526	KU315215
<i>A. schomburgkii</i>	URM83228	Brazil	KR816527	KT006621
<i>A. yunnanense</i>	CUI7974	China	KR816528	KU220013
<i>F. biseptata</i>	FLOR50932	Brazil	KR816529	KU315206

<i>F. rugosa</i>	FLOR52191	Brazil	KR816530	KU315216
<i>F. rugosa</i>	DHCR554HUEFS	Brazil	KR816531	MF409954
<i>F. rugosa</i>	DHCR560HUEFS	Brazil	KR816532	MF409955
<i>G. applanatum</i>	DAI12483	China	KR816533	KF495009
<i>G. applanatum</i>	WEI5787	China	KR816534	KF495011
<i>G. australe</i>	DHCR411HUEFS	Brazil	KR816535	MF436672
<i>G. australe</i>	DHCR417HUEFS	Brazil	KR816536	MF436673
<i>G. australe</i>	FLOR52289	Brazil	KR816537	KU315217
<i>G. australe</i>	URM83325	Brazil	KR816538	JX310802
<i>G. lucidum</i>	WD565	China	KR816539	AB368068
<i>G. mbrekobenum</i>	UMN7-3	Ghana	KR816540	KX000897
<i>G. mbrekobenum</i>	UMN7-4	Ghana	KR816541	KX000899
<i>G. orbiforme</i>	URM83334	Brazil	KR816542	JX310828
<i>G. orbiforme</i>	URM83332	Brazil	KR816543	JX310827
<i>G. parvulum</i>	URM2948	Brazil	KR816544	JX310835
<i>G. parvulum</i>	URM83339	Brazil	KR816545	JX310831
<i>G. sinense</i>	WEI5327	China	KR816546	KF495008
<i>G. sp</i>	GD026HUEFS	Indonesia	KR816547	MF436671
<i>G. tropicum</i>	KUMCC18-0046B	Thailand	KR816548	MH823540
<i>G. tropicum</i>	HE1232	Brazil	KR816549	KF495010
<i>G. tsugae</i>	AFTOLID771	China	KR816550	AY684163
<i>G. weberianum</i>	CBS219-36	Philippines	KR816552	MH867289
<i>Perenniporia medula-panis</i>	CBS457.48	Canada	MH856433	-
<i>Perenniporia medula-panis</i>	MUCL43250	China	KR816553	FJ393875
<i>T. colossus</i>	URM83330	Brazil	KR816554	JX310811
GAS1084	ICN200399	Brazil	MN985327	MN985508
VOG127	ICN200398	Brazil	MN985326	MN985507

* The accession numbers in bold-face indicate the newly generated sequences for this study.

8. Artigo 2: A ser submetido para a revista African Journal of Pharmacy and Pharmacology, Profile of *Ganodermataceae* in South/Southeast of Brazil: contributions to pharmaceutical and biodiversity knowledge.

Garcia VO^{a,*}, Fronza M^b, Von Borowski R^c, Alves-Silva G^a, Zimmer AR^c, Ruaro T^c,
Gnoatto SCB^c, Salvador M^d, Branco CS^d, Rossatto FCP^e, Zimmer KR^e, Silveira RMB^a

^aFederal University of Rio Grande do Sul, Institute of Biosciences, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre 91501-970, Rio Grande do Sul, Brazil.

^bUniversity of Vila Velha, Avenida Comissário José Dantas de Melo, 21 - Boa Vista II, 29102-920, Espírito Santo, Brazil.

^cFederal University of Rio Grande do Sul, Faculty of Pharmacy, Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre 90610-000, Rio Grande do Sul, Brazil.

^dUniversity of Caxias do Sul, Pharmacy Department, Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, Caxias do Sul 95070-560, Rio Grande do Sul – Brazil.

^eFederal University of Health Sciences of Porto Alegre, Microbiology Department, Rua Sarmiento Leite, 245 - Centro Histórico, Porto Alegre 90050-170, Rio Grande do Sul – Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3008 7556

E-mail address: voggarcia@yahoo.com.br (Garcia V. O.).

Abstract

Several fungi of *Ganodermataceae* are used in folk medicine worldwide, especially *Ganoderma* and *Amauroderma* genera. For the first time, the antibiofilm potential against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* of ethanolic extracts of *Ganodermataceae* species from South and Southeast of Brazil are assessed. Wild fungal specimens were collected and identified by classical taxonomic and molecular phylogenetic analysis. Extracts and fractions were investigated regarding the potential by MTT and Crystal violet assays. *Amauroderma schomburgkii*, *Ganoderma martinicense* and an unidentified *Ganoderma* species presented moderate cytotoxic potential. Fractions of *A. schomburgkii* extract (sample ICN200403) with molecules weighing between $3 \geq$ and <10 KDa reduced in 99.60% the *S. aureus* biofilm formation. Further studies are needed to find out which molecules are responsible for cytotoxic effects in *G. martinicense*, and which molecules of size 3-10KDa have antibiofilm activity in *A. schomburgkii*.

Key words: natural products, Basidiomycota, biofilm, MTT, fungal extract.

Introduction

In the world, mainly in the South America, the unrecognized Funga (Kuhar *et al.*, 2018) diversity seems to emerge, mainly, in geographic areas and ecological habitats that are largely understudied, as the hotspots of this Neotropical region (Hawksworth and Lücking, 2017). Brazil is the home of abundant biodiversity, and in the case of fungi, the country houses 2,741 species of Basidiomycota and 1,881 species of Ascomycota (Maia *et al.* 2015). According to Forzza (2012), there are at least 100

endemic species of fungi in the Atlantic Forest in Brazil; however, this is an underestimated assessment of fungal species' diversity.

Among medicinal fungi, those classified in *Ganodermataceae* are the most widely studied in the world, with highlights to *Ganoderma* and *Amauroderma* species. *Amauroderma schomburgkii* is the most common species of *Amauroderma* genus in the Neotropics, besides being the type species of this genus, and occurring since South Brazil to Central America (Furtado 1981, Ryvarden 2004, Campacci and Gugliotta 2009, Gomes-Silva et al., 2015); its identity is well defined.

Regarding phylogenetic and morphological studies with *Ganodermataceae* in Brazil, Costa-Resende *et al.* (2016, 2017, 2020) regrouped and described new species, which allowed advances in the biological and biotechnological studies of extracts produced by these fungi.

There are few papers about biotechnological potential of macrofungi from Neotropical region, such as Porras-Arboleda *et al.*, 2009, which worked with mycelial submerged culture from *Humphreya coffeata* (*Cristataspora coffeata*) from Colombia; Welti *et al.* 2010, with *Ganoderma* aff. *tuberculosis* from Martinique; and Duarte et al. 2016, with *Amauroderma camerarium* from Brazil and a constituent with trichomonicide effect.

Here we look for possible activities of extracts produced by basidiomata of *Ganodermataceae* species. For the first time, it has been evaluated antibiofilm and cytotoxic activity of *Foraminispora rugosa*, *Cristataspora coffeata*, *Amauroderma schombrugkii*, *Ganoderma stipitatum* and *G. martinicense* from the South and Southeast of Brazil, which are the focus of this contribution.

Materials and Methods:

Study areas

The regionalization of Neotropic zone is based on terrestrial taxa and areas defined by Morrone (2014), and allowed to distribute our samples in the Chacoan and Parana domains, in the Araucaria Forest, Atlantic, Pampean and Parana Forest Provinces (Material Supplementary B). The work encompassed the states of Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) and Paraná (PR), in the South extreme of Brazil, and the states of Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP) and Espírito Santo (ES), which belong to the southeastern region of the country. The searches were carried out during the years 2016 to 2018. The sampling was performed both in Conservation Units and anthropized zones.

Collections and morphological analysis

Some specimens were separated for molecular phylogenetic analysis. Of these, some basidiomata were separated for the extracts production, since the specimens should be mature, large and free of parasites. The remaining specimens are listed in Supplemental Material B. The basidiomata were dried and deposited at the herbarium of Institute of Biosciences, of Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. The morphological analysis followed specific literature, such as Costa-Rezende *et al.* (2016, 2017, 2020). Due to taxonomic problems related to identification or the low amount of raw material for the extracts production, only a few specimens of species complexes were used in this study.

2.2 DNA isolation and amplification

Dried basidiomata were used for DNA extraction with the CTAB method modified from Góes-Neto *et al.* (2005). The primer pairs ITS8F-ITS6R (Dentinger *et al.* 2010) and LR0RLR7 (Vilgalys and Hester 1990) were used to amplify the 5' end of the ITS (ITS1-5.8S-ITS2) and ncLSU (nc 28S rDNA), respectively. Sequencing was performed with a BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, California) using the PCR primers as forward and reverse sequencing primers. Purification and DNA sequencing were performed by Macrogen (Geumcheon-gu, Korea) and Fiocruz Belo Horizonte Plataforma PDTIS (Minas Gerais, Brazil). For the nc 28S rDNA region, LR5 or LR7 were used.

Alignment and phylogenetic reconstructions

It were generated ITS and LSU sequence data sets, and both were separately aligned using MAFFT v.7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software>) and manually adjusted using MEGA 7 (Kato and Standley, 2013; Kumar *et al.* 2016). The 28S matrix was built up to domain D3 (LR5 primer). Representative consensus sequences of the fungal taxa were deposited into the GenBank database (Supplementary Material A). The data sets were then combined, and in the subsequently analyses were subdivided into four data partitions: ITS1, 5.8S, ITS2 and 28S. Combined data set phylogenetic analyses with ITS+28S sequences were carried out. In total, 115 specimens were observed (two outgroup species). *Perenniporia medulla-panis* was designated as outgroup3 based on previous studies (Costa-Rezende *et al.*, 2017). All materials and sequences used in this study are listed in Supplementary Material A.

All phylogenetic sequences were analyzed using online CIPRES Science Gateway (Miller *et al.*, 2010). The data sets, on the other hand, were analyzed separately and combined with Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI). ML analysis was carried out in RAxML 8.2.9 (Stamatakis, 2014). The partition file was provided to force RAxML software to search for a separate evolution model for each data set. To assess the reliability of the nodes, it was computed the rapid bootstrapping replicates under the same model, allowing the program to halt bootstrapping automatically by extended majority rule (MRE)-based bootstopping criterion (Pattengale *et al.*, 2010). Bootstrap (BS) values above 80 were considered significant (high support), and above 70 were considered moderately supported. BI was performed in MrBayes 3.2.6 (Ronquist *et al.* 2012), and evolutionary models for BI were estimated using the Akaike Information Criterion (AIC) for each partition, as implemented in jModelTest2 (Darriba *et al.*, 2012). The best-fit models for each partition were implemented as partition-specific models within partitioned mixed-model analyses (TIM1ef+I+G for ITS1, JC for 5.8S, HKY+I+G for ITS2 and TrN+G for 28S). The set of Bayesian analyses was subjected to two independent runs, each with four simultaneous chains for 5×10^7 generations, sampling trees at every 100th generation. The convergence diagnostic was calculated every 10⁴th generation, and its critical value was set to stop the analysis automatically when the standard deviation of the split frequencies reached the value defined by the stopval command (stoprule = yes, stopval = 0.01). In all analyses, the first 25% of trees from each run were discarded as burn-in. Resulting trees from the two independent runs were then pooled to produce one 50% majority-rule consensus tree, and Bayesian Posterior Probabilities (BPPs) were generated for the resulting tree. A BPP value above 0.99 was considered significant (high support), and above 0.95 was considered moderately supported.

Preparation of the Fungi ethanolic extract

Basidiomata were used to preparation of ethanolic extract. The material was cut into small pieces and ground; the powder was submitted to maceration with ethanol (95%) for three days (ratio 1:10) with solvent exchange for 24 hours. After filtration by sintered funnel (G3), the solvent was removed in a vacuum with a rotary evaporator (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suíça). The dried extracts were stored in flasks under refrigeration.

Biological Assays

In sequence, the extracts suffered a previous screening of cytotoxicity by MTT assay and antibiofilm activity against bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*) biofilm.

The Cytotoxicity study

The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cell viability was determined by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay (Mossmann, 1983). Briefly, cells were seeded in 96-well flat-bottom microplates at a density of approximately 12×10^3 cells/well in 150 µL of DMEM. After cells attachment, serial dilutions of extract (7.8 – 500.0 µg/mL) in culture medium were prepared and cells were incubated for 24h and 48h. After incubation, 100 µl of MTT (1 mg/ml in PBS:Medium (1:1)) was added per well,

and the plate was incubated for 2 h to allow reaction of MTT by cellular mitochondrial dehydrogenases. The excess of MTT was aspirated and the formazan crystals formed were dissolved with 100 μ l of dimethyl sulfoxide (DMSO), and absorbance of purple formazan, proportional to the number of viable cells, was measured at 595 nm using a microplate reader (Molecular Devices, Spectra Max 190, USA). Experiments were carried out at least in triplicate. The cytotoxicity was expressed as IC_{50} (concentration that inhibits 50% of cell growth was extrapolated from concentration–response curves). Data were expressed as mean \pm standard error of mean (EPM), and statistical significance was determined by Analysis of Variance (ANOVA, $p < 0.05$), followed by Dunnett's post-test for multiple comparisons. The program used for these analyzes was GraphPad Prism 7.0.

The line cells used: human melanoma (MV-3), human pancreatic carcinoma (MIAPaCa-2), human neuroblastoma (SH-Sy5y), astroglial cell (C-6), human hepatoblastoma (HEp-G2), mammalian fibroblast (L929), human ovarian cancer cell line (Ovcar-3), human breast cancer cell line (MCF-7) with estrogen, progesterone and glucocorticoid receptors, human primary glioblastoma cell line (U-87) and mammalian kidney epithelial cell lines (Vero).

Microbial strains and growth conditions

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 were used as biofilm-forming bacteria. They were grown on Tryptone Soy Agar (TSA) (Oxoid Ltd., England) for 24 hours at 37°C. An inoculum equivalent to 1×10^8 CFU / mL (OD_{620} : 0.150) was prepared in saline solution (0.9% NaCl) and used in the assays.

Biofilm Inhibition

The quantification of biofilm was determined by crystal violet assay following Trentin et al. (2011). To determine the inhibition of biofilm formation, 80 μL of bacterial suspension, 40 μL of Tryptone Soy Broth (TSB) (Oxoid Ltd., England) and 80 μL of the treatment (final concentration at 5 mg/mL) were added to standard sterile 96-well polystyrene flat bottom microtiter plates (Kasvi, Brazil). The plates were incubated for 24 hours at 37°C. Following incubation time for the assay, the suspensions were discarded and each plate was washed 3 times with saline and heat-fixed at 60° C for 1h. After, 200 μL of 0.4% crystal violet were added to the wells for 15 minutes. After this period, each plate was washed with distilled water and 200 μL of absolute ethanol were added. After 30 minutes, the absorbance was measured at 570 nm using a microtiter plate reader (Spectramax M2e Multimode Microplate Reader, USA). The percentage of biofilm formation was verified, considering the control (inoculum without treatment) as 100% biofilm-forming. Vancomycin, gentamycin and rifampicin (Sigma, USA) (8 mg/mL) were included as growth inhibition controls. Experiments were carried out in triplicate and data are presented as percentage mean \pm standard deviation. Differences between groups were evaluated by Student's test (p value \leq 0.05).

Bacterial growth

Bacterial growth was assessed as the difference between optical density at 620 nm at the end (24 h) and at the beginning (0 h) of incubation time. The control (untreated) represented 100% of bacterial growth and it was prepared with Milli-Q

water replacing the treatments and the same concentration of DMSO. The positive controls (antibiotics) were also included as described in the biofilm assay.

Separating molecules by size

The most active extract in the biofilm assay (ICN200403 sample) was passed through ultrafiltration membranes with molecular weight cut-off of 10 and 3 kDa using an Amicon stirred ultrafiltration cell (Merck Millipore, Tullagreen, Ireland). The crude extract (12 mg) was resuspended in MiliQ water (3 mL) and filtered through a 0.22 μ m membrane. Ultrafiltration was performed sequentially: first through the 10 kDa and the filtered passed through 3 kDa. The filtrations yielded fractions with molecular weights ranging in size from >10 kDa (R10), 3-10 kDa (R3) and <3 kDa (F3). All the fractions were evaluated for its ability to inhibit bacterial growth and biofilm, as mentioned above.

Results and discussion

Molecular phylogenetic analyses

The newly generated sequences and additional sequences retrieved from Genbank included sequences from 115 fungal specimens and 1,293 characters, of which 877 were constant and 272 parsimony informative. The average standard deviation of split frequencies in the BI reached 0.009912. BI and ML analysis resulted in trees with a similar topology. The ML topology is presented in Supplementary Material B. The clades from *Amaurodemellus* (100 % ML, 1.00 BPP), *Tomophagus* (100 % ML, 1.00

BPP), *Sanguinoderma* (96 % ML, 1.00 BPP), *Magoderma* (100 % ML, 1.00 BPP), *Haddowia* (100 % ML, 1.00 BPP), *Furtadoa* (100 % ML, 1.00 BPP) and *Amauroderma s. str.* (98 % ML, 1.00 BPP), are nested *Cristataspora* (98 % ML, 1.00 BPP), and *Foraminispora* (100 % ML, 0.99 BPP) and *Ganoderma* (0 % ML, 0.00 BPP). Our results were similar to those of Costa-Resende *et al.*, 2020 and Sun *et al.*, 2020. Within *Ganoderma* group, a clade with species presenting dull pileus (here know as *Ganoderma* sp.) is the sister group of *G. tornatum*, and corresponds to a species complex. An unidentified laccate *Ganoderma* species group (white star) presented themselves as an isolated and highly supported clade, and so, they were called *Ganoderma* sp1. All other samples are placed with *Ganodermataceae* species, always with highly supported values.

Samples and Collection Area

Regarding the year season, a greater diversity of species was collected in the summer comparing to the winter. Additionally, the Cfb (Humid subtropical zone, with temperate summer) and AW (Tropical zone, with dry winter) climate have shown greater diversity comparing to the Cfa (Humid subtropical zone, with hot summer) (Alvares *et al.*, 2014); and in the conservation units (PARNA do Iguaçu, Lago Azul State Park and REBIO Augusto Ruschi, mainly) the species diversity was higher than in anthropized areas (Supplementary Material B).

Briefly, in this work were found one species of the genus *Foraminispora*, one of the genus *Cristataspora*, three of *Amauroderma* (*A. schomburgkii*, *A. calcitum* and *A. pseudoboletus*) and two of *Ganoderma* (*G. martinicense* and *G. stipitatum*); in addition, four specimens of laccate unidentified *Ganoderma* species, and several specimens of *Ganoderma applanatum-australe* complex were also found.

Fifteen extracts were tested, the yields ranged from 1.32 to 8.6%, according to Supplementary Material C.

As a justification for the use of extracts in this research is that *G. lucidum*, “the immortality fungus” (Wang *et al.*, 2012), has been used by the Chinese Traditional Medicine for millennia in the form of crude extract, acting as a panacea against aging diseases (Bishop *et al.*, 2015, Sharma *et al.*, 2019, Chaitanya *et al.*, 2019). In this way, the use of crude extracts can be considered as a “multi-target herb” (Li-Weber, 2009, Gill *et al.*, 2016, Zhou *et al.*, 2016, Chaitanya *et al.*, 2019). Therefore, this work evaluated the efficiency of crude extracts.

Here we present the collected species whose identification was the result of an integrative taxonomic work based on morphology and molecular phylogenetic analysis. On the map of the collection region, there is (Supplementary Material B) the distinct distribution of genera among the Pampean Province and the rest of the studied area, with the genus *Amauroderma* beginning to appear only in the highlands near the Atlantic Forest Province. Our hypothesis is that there is a relationship between the type of vegetation and the *Amauroderma* morphology, since that in the Pampean Province, grasslands predominate instead of forest formations.

Cytotoxic activity

All collected species were evaluated, *A. schomburgkii*, *C. coffeata*, *G. martinicense*, *G. stipitatum*, *F. rugosa*, one unidentified species of *Ganoderma* and *Ganoderma applanatum-australe* complex. *In vitro* cytotoxic activity of 15 basidiomata extracts was evaluated in nine cancer cell and two normal cell lines. The results are

showed in the table 1. The extracts exhibited different cytotoxicity against the tested cell lines. In particular, the extract of *G. martinicense* showed a promising cytotoxic activity against OVCAR-3 and MCF-7 cell lines, exhibiting IC_{50} values of 40.4 ± 2.3 and 32.4 ± 9 $\mu\text{g/mL}$, respectively. These effects were similar to the antitumoral agent available in market, doxorubicin (IC_{50} values of 32.7 ± 3.2 and 24.3 ± 2.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively). Doxorubicin is an antineoplastic routinely used in the treatment of several types of cancers due to its wide spectrum of action (Carvalho *et al.*, 2009).

Several studies report an *in vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of polysaccharides (Hanyu *et al.*, 2020) and triterpenes (Smina *et al.*, 2017) of *Ganoderma* spp. extracts (Hu *et al.*, 2002,) against MCF-7 breast cancer (Hu *et al.*, 2002, Smina *et al.*, 2017, Hanyu *et al.*, 2020),) and OVCAR-3 ovarian cancer cells (Hsieh and Wu, 2011). In addition, several studies with isolated compounds, for example ergosterol peroxide, also presented similar results (Dembitsky, 2008, Tan *et al.*, 2017).

Ganoderma lucidum is the most studied medicinal macrofungus. Ethanolic extracts may contain polysaccharides and some triterpenes, a combination that may has synergistic effects against cancer cells. The ethanol extract of *G. lucidum* reduced cell cycle progression by down-regulating the expression of cyclin D1 in OVCAR-3 and MCF-7 (Hu *et al.*, 2002, Hsieh and Wu, 2011). The researches founded an IC_{50} of 10 $\mu\text{g/mL}$ (Hsieh & Wu, 2011) against OVCAR-3. Smina *et al.* (2017) reported that triterpenic extract from *G. lucidum* has a 100% inhibitory effect with a 100 $\mu\text{g/mL}$ concentration, besides altering the levels of cyclin D1, Bcl-2, Bcl-xL, Bax and Caspase-9 in MCF-7 cells.

In addition, ergosterol interacts with cells that contain estrogen receptors. Ergosterol is a constituent of several macrofungi, including *Ganodermataceae*. At a concentration of 3 $\mu\text{g/mL}$, it completely prevented estradiol-17 β -induced growth of

MCF-7 cells in *in vitro* assays (Subbiah and Abplanalp, 2003). Besides, El-Sherif *et al.*, 2020, demonstrated that ergosterol peroxide is more active in inhibition of MCF-7 cell lines comparing to MDA-MB-231 cell lines (without estrogen receptors). According to the authors, there is evidence that ergosterol peroxide targets estrogen receptors. Tan *et al.*, 2017, demonstrated that ergosterol peroxide suppresses β -catenin-induced transcription of cyclin D1 and c-Myc in ovarian cancer cells. Ergosterol peroxide also regulates Src/SHP2-STAT3 pathway that modulates the angiogenesis. So, ergosterol peroxide has antitumoral effects by inhibiting the proliferation, migration and modulating angiogenesis in ovarian cancer cells.

Our hypothesis is that *G. martinicense* inhibited both cell lines (OVCAR-3 and MCF-7) because it contains compounds that interact with estrogen receptors. Further studies are needed to confirm the presence of ergosterol peroxide in ethanol extracts of this species.

Cytotoxicity was evaluated in face to L929, C6 glial cells, HepG2 and Vero cells. These cells mimic the metabolism of fibroblast, glial, hepatic and renal cells, respectively. As observed in Table 1, *Ganoderma* sp. did not present cytotoxic effects up to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration. This species complex did not vary in relation to the IC_{50} . Besides, *Amauroderma* has low cytotoxicity against C6 glial cells ($IC_{50} > 250 \mu\text{g}/\text{mL}$), HepG-2 ($IC_{50} > 250 \mu\text{g}/\text{mL}$), Vero cells ($IC_{50}: 167.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) and showed weak cytotoxicity against L929 ($IC_{50}: 47.9 \mu\text{g}/\text{mL}$). Thus, the extract of *A. schomburgkii* seems to be relatively safe when the cytotoxicity is assessed *in vitro*. *Ganoderma* sp.1, *C. coffeata* and *F. rugosa* were weakly cytotoxic (Table 1). Our results are also the first report of *A. schomburgkii* and *F. rugosa* in cytotoxic tests.

Inhibition, reversion, or retardation of cellular hyperproliferation may be effective for tumors regression (Gao and Zhou, 2004). Several studies demonstrate the

cytotoxic activity of *G. lucidum* crude extracts in a dose-dependent manner (Yue *et al.*, 2006, Cör *et al.*, 2014, Chen *et al.* 2016, Suárez-Arroyo *et al.*, 2017). *Ganoderma lucidum* is a useful source of food supplement and medicine to suppress the growth rate of tumors (Borches *et al.*, 2004, Suárez-Arroyo *et al.*, 2017). However, it does not act as a first line medicine (Unlu *et al.*, 2016).

Further studies are needed to verify whether *Ganodermataceae* from the South / Southeast region of Brazil can also act as adjuvant in the fight against cancer, and to determine which molecules are responsible for the cytotoxic activity of *G. martinicense*.

Table 1: Results of the cytotoxicity assay by the MTT method of samples

Samples	MV-3	MIAPaCa-2	L929	HepG2	Sh-sy5y	C6	OVCAR-3	MCF-7	U-87	Vero
Cytotoxic Activity ($IC_{50} \pm SD$, $\mu\text{g/mL}$) of <i>Ganodermataceae</i> species										
A. <i>schomburgkii</i> (ICN200403)	53.0 \pm 3.0	98.5 \pm 4.3	47.9 \pm 2.5	>500	333.5 (1n)	> 500	116.2 \pm 5.5	95.2 \pm 6.3		167.5 \pm 8.5
A. <i>schomburgkii</i> (ICN202136)	113.3 \pm 6.4	97.3 \pm 5.1	121.7 \pm 7.2							
A. <i>schomburgkii</i> (ICN200405)	66.0 \pm 10.2	105.9 \pm 2.1	59.1 \pm 5.3	> 250	> 250	> 250				
A. <i>schomburgkii</i> (ICN200400)									180.3 \pm 14.7	
G. <i>martnicense</i> (ICN202152)	47.2 \pm 5.8	105.1 \pm 6.4	53.1 \pm 4.1	140.8 \pm 23.2	161.4 (1n)	138.2 \pm 3,2	40.4 \pm 2.3	32.4 \pm 1.9		63.1 \pm 1.0
<i>Ganoderma</i> sp (ICN202130)	>500	>500	>500							
<i>Ganoderma</i> sp (ICN202131)	>500	>500	>500							
<i>Ganoderma</i> sp (ICN202132)	>500	>500	>500							433.6 \pm 6.6
<i>Ganoderma</i> sp (ICN202133)	>500	>500	>500							425.8 \pm 28.1
<i>Ganoderma</i> sp (ICN202138)	>500	>500	>500							

<i>G. stipitatum</i> (ICN202150)	51.4 ± 6.3	107.4 ± 1.6	71.2 ± 7.3							
<i>Ganoderma</i> sp.1 (ICN202148)	283.9 ± 21.7	280.5 ± 3.4	258.0 ± 2.8	> 250	> 250	> 250				
<i>Ganoderma</i> sp.1 (ICN202151)				296.2 ± 20.9	224.1 (1n)	141.2 ± 4.5				
<i>C. coffeata</i> (ICN200397)	253.6 ± 16.5	250.3 ± 0.4	239.6 ± 16.1	> 500	> 500	403.4 ± 6.9				>500
<i>F. rugosa</i> (ICN200398)	151.3 ± 19.3	153.6 ± 7.6	154.9 ± 9.1	>500	216.7 (1n)	213.6 ± 11.8				119.5 ± 2.2
Doxorubicin *	3.8 ± 1.5	23.5 ± 2.3	7.8 ± 0.8				32.7 ± 3.2	24.3 ± 2.5		
Samples	MV-3	MIAPaCa-2	L929	HepG2	Sh-sy5y	C6	OVCAR-3	MCF-7	U-87	Vero
Cytotoxic Activity ($IC_{50} \pm SD$, $\mu\text{g/mL}$) of <i>Ganodermataceae</i> species										
<i>A. schomburgkii</i> (ICN200403)	53.0 ± 3.0	98.5 ± 4.3	47.9 ± 2.5	>500	333.5 (1n)	> 500	116.2 ± 5.5	95.2 ± 6.3		167.5 ± 8.5
<i>A. schomburgkii</i> (ICN202136)	113.3 ± 6.4	97.3 ± 5.1	121.7 ± 7.2							
<i>A. schomburgkii</i> (ICN200405)	66.0 ± 10.2	105.9 ± 2.1	59.1 ± 5.3	> 250	> 250	> 250				
<i>A. schomburgkii</i> (ICN200400)									180.3 ± 14.7	
<i>G. martnicense</i> (ICN202152)	47.2 ± 5.8	105.1 ± 6.4	53.1 ± 4.1	140.8 ± 23.2	161.4 (1n)	138.2 ± 3.2	40.4 ± 2.3	32.4 ± 1.9		63.1 ± 1.0

<i>Ganoderma</i> (ICN202130)	sp	>500	>500	>500				
<i>Ganoderma</i> (ICN202131)	sp	>500	>500	>500				
<i>Ganoderma</i> (ICN202132)	sp	>500	>500	>500				433.6 ± 6.6
<i>Ganoderma</i> (ICN202133)	sp	>500	>500	>500				425.8 ± 28.1
<i>Ganoderma</i> (ICN202138)	sp	>500	>500	>500				
<i>G. stipitatum</i> (ICN202150)		51.4 ± 6.3	107.4 ± 1.6	71.2 ± 7.3				
<i>Ganoderma</i> (ICN202148)	sp.1	283.9 ± 21.7	280.5 ± 3.4	258.0 ± 2.8	> 250	> 250	> 250	
<i>Ganoderma</i> (ICN202151)	sp.1				296.2 ± 20.9	224.1 (1n)	141.2 ± 4.5	
<i>C. coffeata</i> (ICN200397)		253.6 ± 16.5	250.3 ± 0.4	239.6 ± 16.1	> 500	> 500	403.4 ± 6.9	>500
<i>F. rugosa</i> (ICN200398)		151.3 ± 19.3	153.6 ± 7.6	154.9 ± 9.1	>500	216.7 (1n)	213.6 ± 11.8	119.5 ± 2.2
Doxorubicin *		3.8 ± 1.5	23.5 ± 2.3	7.8 ± 0.8			32.7 ± 3.2	24.3 ± 2.5

Antibiofilm activity

The extracts of *C. coffeata*, *A. schomburgkii*, *G. stipitatum*, *Ganoderma applanatum-australe* complex and *Ganoderma* sp.1 (ICN202151) were evaluated for the antibiofilm and antimicrobial activity against *S. aureus* ATCC 6538 (Figure 1). As we did not have a sufficient amount of extract, *G. martinicense* and *F. rugosa* were not taken in the crystal violet test.

The best results were seen in the samples of *Ganoderma* sp., *Ganoderma* sp1 and *A. schomburgkii*. *Ganoderma* sp. was discarded for being a cryptic species of difficult identification. *Ganoderma* sp.1 inhibited bacterial growth in 70.93%, which can cause selective pressure on bacteria, so it was also discarded. *Amauroderma schomburgkii* inhibited the biofilm (99.60%) and showed less inhibition in the growth (24.34%) of *S. aureus* (Fig. 1).

This extract was tested also against *P. aeruginosa* ATCC27853, and showed no effectiveness (Supplementary Material D).

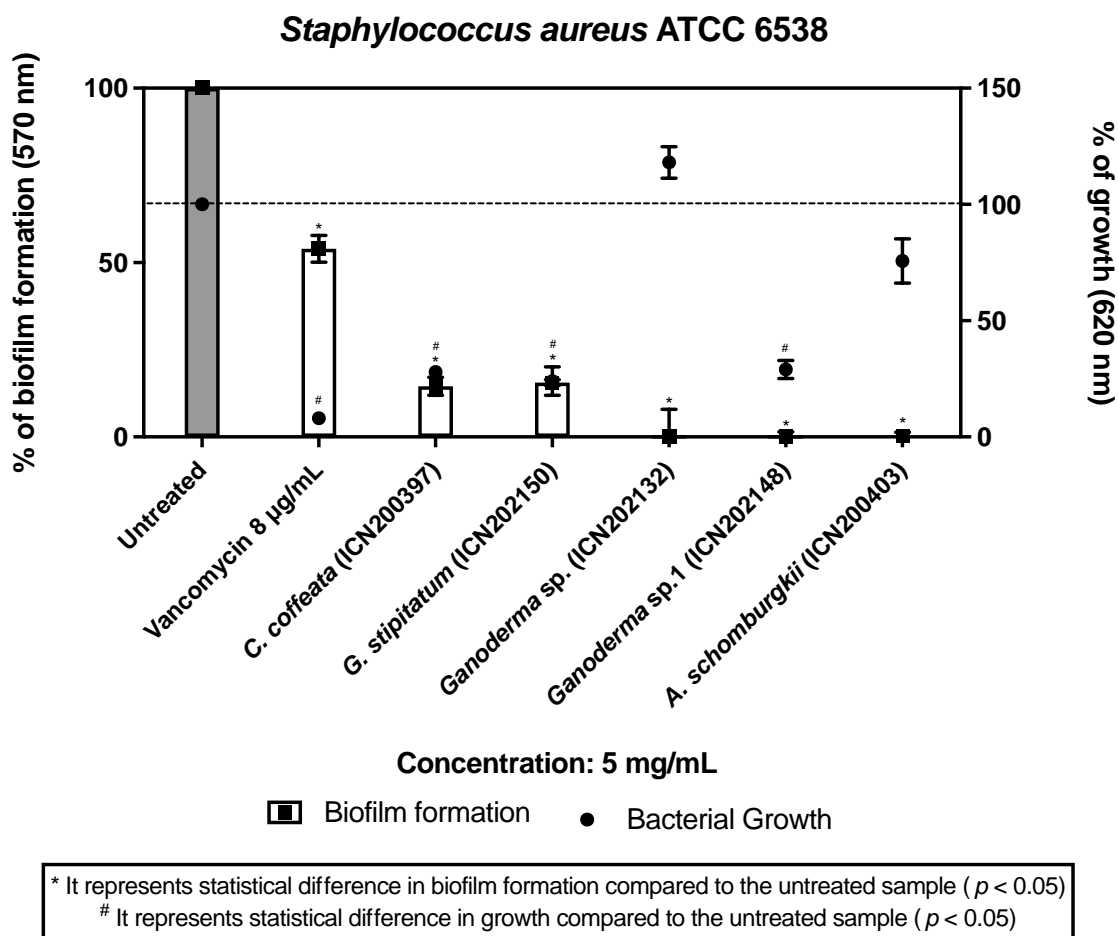


Figure 1: Screening antibiofilm activity from ethanolic extracts of *Ganodermataceae* of South and Southeast of Brazil. ICN200397: *C. coffeata*; ICN202150: *G. stipitatum*; ICN 202132: *Ganoderma* sp.; ICN202148: *Ganoderma* sp.1; (collected in Eldorado do Sul, RS); ICN200403: *A. schomburgkii*.

To have worse antimicrobial action and better activity as an antibiofilm are important characteristic in antibiofilm product, because the environmental stress produced by an antibiotic increases the rates of mutability and bacterial resistance (Poole, 2012, Ahmed *et al.*, 2018, Santos-Lopez *et al.*, 2019, Cepas *et al.*, 2019), and this is not desired. *Amauroderma schomburgkii* showed an inhibitory effect on biofilm formation greater than vancomycin at the tested concentration. (Fig. 2).

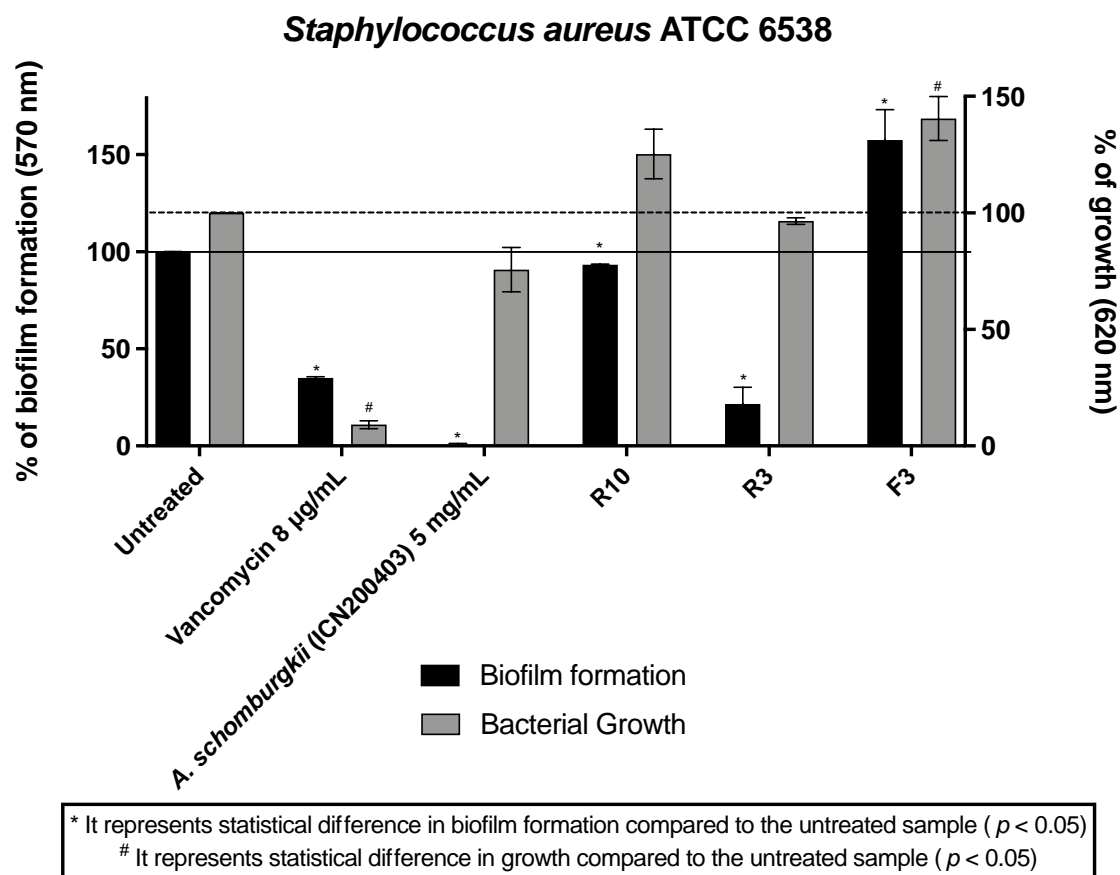


Figure 2. Comparison of the performance as an antibiofilm agent of *A. schomburgkii*, and the subfractions required by ultrafiltration. R10: subfraction containing molecules greater than 10 KDa, R3: subfraction containing molecules smaller than 10 KDa and larger than 3 KDa., F3: subfraction containing molecules smaller than 3 KDa.

These results show for the first time that the ethanolic extract of *A. schomburgkii* has better performance against biofilm formed by gram positive bacteria, especially *S. aureus*. Due to this, *A. schomburgkii* extracts (ICN200403) was chosen to undergo ultrafiltration purification.

Separating by molecule size

The ultrafiltration purification process of ethanolic extract of ICN200403 sample yielded three sub-fractions of different molecular weight, and each of them was subjected to the crystal violet assay, being observed significant differences among them when tested against *S. aureus*. The subfraction R10 (>10 kDa) showed activity similar to positive control group in antibiofilm action and bacterial growth (Fig 2). Meanwhile, the R3 subfraction (3-10 kDa) showed the best activity in crystal violet assay, reducing the biofilm formation in 78.34% when compared to non treated group. The bacterial growth showed similar values to control group. The R03 subfraction decreased the biofilm formation without affecting bacterial growth. Contrary to conventional antimicrobials, this extract acts as anti-virulence agent by inhibiting biofilms and, according to Francesko *et al.*, 2016, inflicting a low selection pressure for the development of antibiotic-resistant bacteria. Duarte *et al.* (2016) found a protein with 12 kDa and trichomonocidal action in *A. camerarium*. Besides, Arias-Londoño *et al.* (2019) found protein fractions in *G. lucidum* with antifungal activity against *Mycosphaerella fijiensis* (*Mycosphaerellaceae*) and Wang and TB (2006) isolated ganodermin, (15kDa) that acts against phytopathogens. The literature reports that *G. lucidum* extract is an antibiofilm agent against *Candida albicans* and *C. glabrata* (Bhardwaj *et al.*, 2017), besides inhibiting the *quorum sensing*-controlled behavior in *Chromobacterium violaceum* in a concentration-dependent manner (Zhu *et al.*, 2011).

In healthcare facilities, *S. aureus* can cause infections related to implantable medical devices, that may lead to serious consequences for the patient, including therapeutic failure due to its ability to form biofilms, an important virulence factor (Arciola *et al.*, 2012, Oliveira *et al.*, 2018). Furthermore, this pathogen can act as a reservoir of antibiotic resistance genes (Rossi *et al.* 2020).

As some medical implants are in direct contact with the patients' skin, cytotoxicity assessments in epidermal and dermal cells, as well as *in vivo* tests are essential to ensure the safety of the extract of *A. schomburgkii*. Certainly, more experiments are needed, but we already have a starting point.

Thus, this study provides a basis for the development of biotechnology to further studies that should explore which chemical compounds are responsible for *G. martinicense* as cytotoxic agent, and *A. schomburgkii* as a biofilm inhibitor, and for which mechanisms this occurs. Our results clearly demonstrate that the R3 subfraction is effective as *S. aureus* antibiofilm agent, because it contains high molecular weight molecules.

Conclusion

It is possible to conclude that: (1) The study area is abundant in the *Ganoderma* genus, especially the Pampean Province; (2) the ethanolic extract of *G. martinicense* is the most effective extract tested against OVCAR-3 and MCF-7; (3) the other specimens collected present moderate to weak cytotoxic action, being relatively safe; (4) the ethanolic extract of *A. schomburgkii* is a promising candidate for *S. aureus* biofilm inhibition; (5) the molecules responsible for the activity in *A. schomburgkii* have molecular weight between 3-10 kDa, corresponding to molecules of great molecular weight.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

We are very grateful to the staff of the “Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade” (ICMBio) for authorizing collections (Sisbio 54754). Gratitude to Altelys Magnago and Shirley C. Feuerstein for specimen collection. Special thanks to Idea Wild for the microscopy equipment and to PPGBOT-UFRGS for partially financing the research. This study was financed partially by the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)” - Finance Code 001.

REFERENCES

Ahmed MN, Porse A, Sommer MOA, Høiby N, Ciofu O, 2018. Evolution of antibiotic resistance in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa* populations exposed to subinhibitory levels of ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 62: e00320-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00320-18>.

Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G, 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift* 22: 711–728.

Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW, 2012. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* 33: 5967-5982. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.031

Arias-Londoño MA, Zapata-Ocampo PA, Mosquera-Arevalo AR, Sanchez-Torres JD, Atehortua-Garcés L, 2019. Antifungal protein determination for submerged cultures of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Ganodermataceae) with activity over the phytopathogen fungus *Mycosphaerella fijiensis* (Mycosphaerellaceae). *Actualidades Biológicas* 41: 53-64.

Bhardwaj A, Gupta P, Kumar N, Mishra J, Kumar A, Rakhee , Misra K, 2017. Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), Inhibits *Candida* Biofilms: A Metabolomic Approach. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 19: 685-696.

Bishop KS, Kao CHJ, Xu Y, Glucina M P, Paterson RRM, Ferguson LR, 2015. From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry* 114: 56–65. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.02.015

Borchers AT, Keen CL, Gershwin ME. Mushrooms, tumours and immunity: An update, 2004. *Experimental Biology Medicine* 229: 393-406.

Campacci TVS, Gugliotta AM, 2009. A review of *Amauroderma* in Brazil, with *A. oblongisporum* newly recorded from the neotropics. *Mycotaxon* 110: 423-436.

Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correio S, Oliveira PJ, Santos MS, Moreira PI, 2009. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Current Medicinal Chemistry* 16: 3267-3285.

Cepas V, López Y, Muñoz E, Rolo D, Ardanuy C, Martí S, Xercavins M, Horcajada JP, Bosch J, Soto SM, 2019. Relationship between biofilm formation and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Microbial drug resistance* 25: 72-82.

Chaitanya MVNL, Jose A, Ramalingam P, Mandal SC, Kumar PN, 2019. Multi-targeting cytotoxic drug leads from mushrooms. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 12: 531-536.

Chen C, Li P, Li Y, Yao G, Xu J-H, 2016. Antitumor effects and mechanisms of *Ganoderma* extracts and spore oil. *Oncology Letters* 12: 3571-3578.

Cör D, Botic T, Knez Z, Batista U, Gregori A, Pohleven F, Boncina T, 2014. Two-stage extraction of antitumor, antioxidant and antiacetylcholinesterase compounds from *Ganoderma lucidum* fruiting body. *The Journal of Supercritical Fluids* 91: 53-60.

Costa-Rezende DH, Gugliotta AM, Góes-Neto A, Reck MA, Robledo GL, Drechsler-Santos ER, 2016. *Amauroderma calcitum* sp. nov. and notes on taxonomy and distribution of *Amauroderma* species (Ganodermataceae). *Phytotaxa* 244: 101–124.

Costa-Rezende DH, Robledo GL, Góes-Neto A, Reck MA, Crespo E, Drechsler-Santos ER, 2017. Morphological reassessment and molecular phylogenetic analyses of *Amauroderma* s. lat. Raised new perspectives in the generic classification of the Ganodermataceae family. *Persoonia* 39: 254–269.

Costa-Rezende DH, Robledo GL, Drechsler-Santos ER, Glen M, Gates G, Bonzi BRM, Popoff OF, Crespo E, Góes-Neto A, 2020. Taxonomy and phylogeny of polypores with ganodermatoid basidiospores (Ganodermataceae). *Mycological Progress* 19: 725–741.

doi.org/10.1007/s11557-020-01589-1

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D, 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.

Dembitsky V, 2008. Bioactive peroxides as potential therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43: 223-251.

Dentinger BTM, Margaritescu S; Moncalvo JM, 2010. Rapid and reliable high-throughput methods of DNA extraction for use in barcoding and molecular systematics of mushrooms. *Molecular Ecology Resources* 10: 628–633.

Duarte M, Seixas A, Carvalho MP, Tasca T, Macedo AJ, 2016. Amaurocine: Anti-Trichomonas vaginalis protein produced by the basidiomycete Amauroderma camerarium. *Experimental Parasitology* 161: 6-11.

El-Sherif NF, Ahmed SA, Ibrahim AK, Habib ES, El-Fallal AA, El-Sayed AK, Wahba AE, 2020. Ergosterol peroxide from the Egyptian red Lingzhi or Reishi mushroom, *Ganoderma resinaceum* (Agaricomycetes), showed preferred inhibition of MCF-7 over MDA-MB-231 breast cancer cell lines. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 22: 389 – 396.

Forzza RC, Baumgratz JFA, Bicudo CEM, Canhos DAL, Carvalho Jr AA, Coelho MAN, Costa AF, Costa DP, Hopkins MG, Leitman PM, Lohmann LG, Lughadha EN, Maia LC, Martinelli G, Menezes M, Morim MP, Peixoto AL, PiraniJR, Prado J, Queiroz LP, Souza S, Souza VC, Stehmann JR, Sylvestre LS, Walter BMT, Zappi DC, 2012. New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges, *BioScience* 62: 39–45. doi.org/10.1525/bio.2012.62.1.8

Francesko A, Fernandes MM, Ivanova K, Amarin S, Reis RL, Pashkuleva I, Mendoza E, Pfeifer A, Heize T, Tzanov T, 2016. Bacteria-responsive multilayer coatings comprising polycationic. *Acta Biomaterialia* 33: 203–212

Furtado JS, 1981. Taxonomy of Amauroderma (Basidiomycetes, Polyporaceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 34: 1-109.

Gao Y, Zhou S, 2004. Chemopreventive and tumoricidal properties of Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetideae). Part II. Mechanism Considerations (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 6: 219-230.

Gill BS, Sharma P, Kumar R, Kumar S, 2016. Misconstrued versatility of *Ganoderma lucidum*: a key player in multi-targeted cellular signaling. *Tumour Biology* 37: 2789-2804. doi:10.1007/s13277-015-4709-z

Gomes-Silva AC, Lima-Júnior N, Malosso E, Ry arden L, Gibertoni T, 2015. Delimitation of taxa in Amauroderma (Ganodermataceae, Polyporales) based in

morphology and molecular phylogeny of Brazilian specimens. *Phytotaxa* 227: 201–228.
doi.org/10.11646/phytotaxa.227.3.1

Góes-Neto A, Loguercio-Leite C, Guerrero RT, 2005. DNA extraction from frozen fieldcollected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas* 18: 9 - 32.

Hanyu X, Lanyue L, Miao D, Wentao F, Cangran C, Hui S, 2020. Effect of *Ganoderma applanatum* polysaccharides on MAPK/ERK pathway affecting autophagy in breast cancer MCF-7 cells. *International Journal of Biological Macromolecules* 146: 353–362.

Hapuarachchi KK, Karunarathna SC, Phengsintham P, Yang HD, Kakumyan P, Hyde KD, Wen TC, 2019. Ganodermataceae (Polyporales): Diversity in Greater Mekong Subregion countries (China, Laos, Myanmar, Thailand and Vietnam). *Mycosphere* 10: 221–309.

Hawksworth DL, Lücking R, 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology Spectrum* 5: 1-17.

Hsieh TC, Wu JM, 2011. Suppression of proliferation and oxidative stress by extracts of *Ganoderma lucidum* in the ovarian cancer cell line OVCAR-3. *International Journal of Molecular Medicine* 28: 1065-1069.

Hu H, Ahn N-S, Yang X, Lee Y-S, Knag K-S, 2002. *Ganoderma lucidum* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. *International Journal of Cancer* 102: 250–253.

Jargalmaa S, Eimes JA, Park MS, Park YJ, Oh SY, Lim YW, 2017. Taxonomic evaluation of selected *Ganoderma* species and database sequence validation. *Peer J* 27: e3596. doi: 10.7717/peerj.3596. eCollection 2017.

Jiao C, Xie Y-Z, Yang X, Li H, Li X-M, Pan H-H, Cai M-H, Zhong H-M, Yang BB, 2013. Anticancer activity of *Amauroderma rude*. *Plos One* 8: e0066504. doi.org/10.1371/journal.pone.0066504

Katoh K, Standley DM, 2013. MAFFT multiple alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772-780.

Kuhar F, Pfister D, Furci G, Drechsler-Santos ER, 2018. Delimitation of Funga as a valid term for the diversity of fungal communities: the Fauna, Flora & Funga proposal (FF&F). *IMA Fungus* 9: 71–74.

Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874.

Le XT, Le QHN, Pham ND, Duong VH, Dentinger BTM, Moncalvo J-M, 2012. *Tomophagus cattienensis* sp. nov., a new Ganodermataceae species from Vietnam: Evidence from morphology and ITS DNA barcodes. *Mycological Progress* 11: 775–780

Li-Weber M, 2009. New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents wogonin, baicalein and baicalin. *Cancer Treatment Reviews* 35: 57–68.

Maia LC, Carvalho Júnior AA, Cavalcanti LH, Gugliotta AM, Drechsler-Santos ER, Santiago ALMA, Cáceres MES, Gibertoni TB, Aptroot A, Giachini AJ, Soares AMS, Silva ACG, Magnago AC, Goto BT, Lira CRS, Montoya CAS, Pires-Zottarelli CLA, Silva DKA, Soares DJ, Rezende DHC, Luz EDMN, Gumboski EL, Wartchow F, Karstedt F, Freire FM, Coutinho FP, Melo GSN, Sotão HMP, Baseia IG, Pereira J, Oliveira JJS, Souza JF, Bezerra JL, Araujo Neta LS, Pfenning LH, Gusmão LFP, Neves MA, Capelari M, Jaeger MSW, Pulgarín MP, Menolli Junior N, Medeiros PS, Friedrich RCS, Chikowski RS, Pires RM, Melo RF, Silveira RMB, Urrea-Valencia S, Cortez VG, Silva VF, 2015. Diversity of Brazilian Fungi. *Rodriguésia* 66: 1033-1045.

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T, 2010. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. In: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. New Orleans LA, USA.

Morrone JJ, 2014. Biogeographical regionalisation of the neotropical region. *Zootaxa* 3782: 1–110. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3782.1.1>

Mossmann T, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55–63.

Oliveira WF, Silva PMS, Silva RCS, Silva GMM, Machado G, Coelho LCBB, Correia MTS, 2018. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. *Journal of Hospital Infections* 98: 111-117. doi:10.1016/j.jhin.2017.11.008.

Pattengale ND, Alipour M, Bininda-Emonds ORP, Moret BME, Stamatakis A, 2010. How many bootstrap replicates are necessary? *Journal of Computational Biology* 17: 337-354.

Poole K, 2012. Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology* 20: 227-234.

Porras-Arboleda SM, Valdez-Cruz NA, Rojano B, Aguilar A, Rocha-Zavaleta L, Trujillo-Roldán MA, 2009. Mycelial submerged culture of new medicinal mushroom, *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey. (Aphyllphoromycetidae) for the production of valuable bioactive metabolites with cytotoxicity, genotoxicity, and antioxidant activity. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 11: 335–350.

Ronquist F, Teslenko M, Van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Suchard MA, Huelsenbeck JP, 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology* 61: 539–542.

Rossi CC, Pereira MF, Giambiagi-deMarva M, 2020. Underrated *Staphylococcus* species and their role in antimicrobial resistance spreading. *Genetics and Molecular Biology* 43 S2: 1-10.

Santos-Lopez A, Marshall CW, Scribner MR, Snyder DJ, Cooper VS, 2019. Evolutionary pathways to antibiotic resistance are dependent upon environmental structure and bacterial lifestyle. *eLife* 8: 1-23. doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.47612> p.1-23.

Smina TP, Nitha B, Devasagayam TPA, Janardhanan KK, 2017. *Ganoderma lucidum* total triterpenes induce apoptosis in MCF-7 cells and attenuate DMBA induced mammary and skin carcinomas in experimental animals. *Mutation Research* 813: 45–51.

Suárez-Arroyo IJ, Loperena-Alvarez Y, Rosario-Acevedo, Martínez-Montemayor MM, 2017. *Ganoderma* spp.: A promising adjuvant treatment for breast cancer. *Medicines* 4: 1-23.

Sharma C, Bhardwak N, Sharma A, Tuli HS, Batra P, Beniwal V, Gupta GK, Sharma AK, 2019. Bioactive metabolites of *Ganoderma lucidum*: Factors, mechanism and broad spectrum therapeutic potential. *Journal of Herbal Medicine* 17–18: 100268.

Stamatakis, A, 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312–1313. doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033.

Subbiah MRT, Abplanalp W, 2003. Ergosterol (major sterol of baker's and brewer's yeast extracts) inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and the potential role of its oxidation products. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 73: 19-23.

Sun Y-F, Costa-Rezende DH, Xing J-H, Zhou J-L, Zhang B, Gibertoni TB, Gates G, Glen M, Dai Y-C, Cui B-K, 2020. Multi-gene phylogeny and taxonomy of *Amauroderma* s.lat. (Ganodermataceae). *Persoonia* 44: 206-239.

Tan W, Pan M, Liu H, Tian H, Ye Q, Liu H, 2017. Ergosterol peroxide inhibits ovarian cancer cell growth through multiple pathways. *OncoTargets and Therapy* 10: 3467–3474.

Trentin DS, Giordani RB, Zimmer KR, Silva GA, Silva MV, Correa MTS, Baumvol IJR, Macedo AJ, 2011. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology* 137: 327-335.

Unlu A, Nayir E, Kirca O, Ozdogan M, 2016. *Ganoderma lucidum* (Reishi Mushroom) and cancer. *JBUON* 21: 792-798.

Vilgalys R, Hester M, 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238–4246.

Vu D, Groenewald M, Vries M, Gehrman T, Stielow B, Eberhardt U, Al-Hatmi A, Groenewald JZ, Cardinali G, Houbraken J, Boekhout T, Crous PW, Robert V, Verkley GJM, 2019. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology* 92: 135–154.

Wang H, Ng TB. Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*, 2006. *Peptides* 27: 27-30. doi: 10.1016/j.peptides.2005.06.009. Epub 2005 Jul 21. PMID: 16039755.

Wang XC, Xi RJ, Li Y, Wang DM, Yao YJ, 2012. The species identity of the widely cultivated *Ganoderma*, '*G. lucidum*' (Ling-zhi), in China. *PLoS One* 7: e40857. doi.org/10.1371/journal.pone.0040857

Welti S, Moreau P-A, Azaroual N, Lemoine A, Duhal N, Kouach M, Millet R, Courtecuisse R, 2010. Antiproliferative activities of methanolic extracts from a neotropical *Ganoderma* Species (Aphyllophoromycetidae): Identification and characterization of a novel ganoderic acid. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 12: 17-31. doi:10.1615/IntJMedMushr.v12.i1.20

Yue GG, Fung KP, Tse GM, Leung PC, Lau CB, 2006. Comparative studies of various *Ganoderma* species and their different parts with regard to their antitumor and immunomodulating activities in vitro. *Journal of alternative and complementary medicine* 12: 777-789.

Zhou L-W, Cao Y, Wu S-H, Vlasák J, Li D-W, Li M-J, Dai Y-C, 2015. Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (Ganodermataceae, Polyporales) inferred from morphology and multilocus phylogeny. *Phytochemistry* 114: 7–15.

Zhou X, Seto SW, Chang D, Kiat H, Razmovski-Naumovski V, Chan K, Bensoussan A 2016. Synergistic effects of Chinese herbal medicine: a comprehensive review of methodology and current research. *Frontiers of Pharmacology* 7: 1-16.

doi: 10.3389/fphar.2016.00201

Zhu H, Liu W, Tian B, Liu H, Ning S, 2011. Inhibition of quorum sensing in the opportunistic pathogenic bacterium *Chromobacterium violaceum* by an extract from fruiting bodies of Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) P. Karst. (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 13: 559-564.

Supplementary Material A: Species, vouchers, locality and accession numbers of the specimens used in phylogenetic analysis

Species	Vouchers	Locality	ITS	LSU	Reference
<i>Amauroderma aurantiacum</i>	FLOR52205	BRAZIL	KR816510	KU315205	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2016
<i>Amauroderma aurantiacum</i>	DHCR540 HUEFS	BRAZIL	MF409961	MF409953	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2016
<i>Amauroderma calcigenum</i>	FLOR52315	BRAZIL	KR816514	-	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2016
<i>Amauroderma calcitum</i>	FLOR50931/ DHCR538 (HUEFS)	BRAZIL	KR816528	KU315207	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2016
<i>Amauroderma calcitum</i>	FLOR52230	BRAZIL	KR816529	-	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2016
<i>Amauroderma elegantissimum</i>	URM82789	BRAZIL	JX310844	KT006617	Gomes-Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>Amauroderma elegantissimum</i>	URM82787	BRAZIL	JX310843	KT006616	Gomes-Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>Amauroderma exile</i>	URM82794	BRAZIL	JX310845	-	Gomes-Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>Amauroderma exile</i>	URM89226	BRAZIL	MK119796	MK119874	Sun <i>et al.</i> , 2020
<i>Amauroderma intermedium</i>	GAS910 (HUEFS)	BRAZIL	MF409959	-	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2017
<i>Amauroderma intermedium</i>	FLOR52248	BRAZIL	KR816527	KU315209	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2016
<i>Amauroderma omphalodes</i>	DHCR499/501(HUEFS)	BRAZIL	MF409956	MF409951	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2017
<i>Amauroderma omphalodes</i>	DHCR500(HUEFS)	BRAZIL	MF409957	MF409952	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2017
<i>Amauroderma partitum</i>	URM83039	BRAZIL	JX310853	-	Sun <i>et al.</i> , 2020
<i>Amauroderma partitum</i>	URM82882	BRAZIL	JX310852	-	Gomes-Silva <i>et al.</i> , 2015

<i>Amauroderma perplexum</i>	CUI6496	CHINA	KJ531650	KU220001	Genbank
<i>Amauroderma perplexum</i>	WEI5562	CHINA	KJ531652	-	Genbank
<i>Amauroderma praetervisum</i>	REC18707	BRAZIL	JX310855	-	Gomes-Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>Amauroderma praetervisum</i>	URM84230	BRAZIL	KC348461	-	Genbank
<i>Amauroderma praetervisum</i>	GOMES SILVA 909	BRAZIL	JX310856	-	Gomes-Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>Amauroderma pseudoboletus</i>	FLOR52318	BRAZIL	KR816516	-	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2016
<i>Sanguinoderma rude</i>	CANB643174	AUSTRALIA	KU315197	-	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2016
<i>Sanguinoderma rude</i>	CANB795782	AUSTRALIA	KU315198	-	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2016
<i>Sanguinoderma rude</i>	CANB359451	AUSTRALIA	KU315199	-	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2016
<i>Sanguinoderma rugosum</i>	Cui6285	CHINA	KJ531656	KU220012	Sun <i>et al.</i> , 2020
<i>Sanguinoderma rugosum</i>	Dai10746	CHINA	KU219981	KU220003	Sun <i>et al.</i> , 2020
<i>Amauroderma schomburgkii</i>	ICN200401	BRAZIL	MW541375	MW546310	This study
<i>Amauroderma schomburgkii</i>	ICN202153	BRAZIL	MW541365	MW546314	This study
<i>Amauroderma schomburgkii</i>	DHCR504 HUEFS	BRAZIL	MF409958	-	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2017
<i>Amauroderma schomburgkii</i>	FLOR52177	BRAZIL	KR816522	KU315215	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2016
<i>Amauroderma schomburgkii</i>	URM83228	BRAZIL	JX310848	KT006621	Gomes-Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>Amauroderma schomburgkii</i>	ICN200403	BRAZIL	MW541370	to be provided	This study
<i>Amauroderma schomburgkii</i>	ICN202140	BRAZIL	MW541378	MW546316	This study

<i>Amauroderma schomburgkii</i>	ICN202139	BRAZIL	MW541373	MW546318	This study
<i>Amauroderma schomburgkii</i>	ICN202141	BRAZIL	MW541374	MW546320	This study
<i>Amauroderma schomburgkii</i>	ICN202144	BRAZIL	MW541372	MW546324	This study
<i>Amauroderma schomburgkii</i>	ICN202145	BRAZIL	MW541376	MW546325	This study
<i>Amauroderma schomburgkii</i>	ICN202146	BRAZIL	MW541371	MW546326	This study
<i>Amauroderma schomburgkii</i>	ICN200405	BRAZIL	MW541377	MW546328	This study
<i>Amauroderma schomburgkii</i>	ICN202135	BRAZIL	MW541369	MW546311	This study
<i>Amauroderma schomburgkii</i>	ICN202134	BRAZIL	MW541368	MW546335	This study
<i>Amauroderma schomburgkii</i>	ICN202136	BRAZIL	MW541364	MW546337	This study
<i>Amauroderma schomburgkii</i>	ICN200400	BRAZIL	MW541366	MW546337	This study
<i>Amauroderma schomburgkii</i>	ICN202137	BRAZIL	MW541367	MW546339	This study
<i>Magoderma subresinosum</i>	WEI5569	CHINA	KJ531649	-	Genbank
<i>Magoderma subresinosum</i>	THP48	TAIWAN	FJ154784	-	Genbank
<i>Foraminispora yunnanense</i>	CUI7974	CHINA	KJ531653	KU220013	Genbank
<i>Foraminispora yunnanense</i>	YUAN2253	CHINA	KJ531655	-	Genbank
<i>Amaurodermellus ovisporum</i>	DHCR547	BRAZIL	MN077527	MN077553	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2020
<i>Amaurodermellus ovisporum</i>	DHCR546	BRAZIL	MN077528	-	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2020

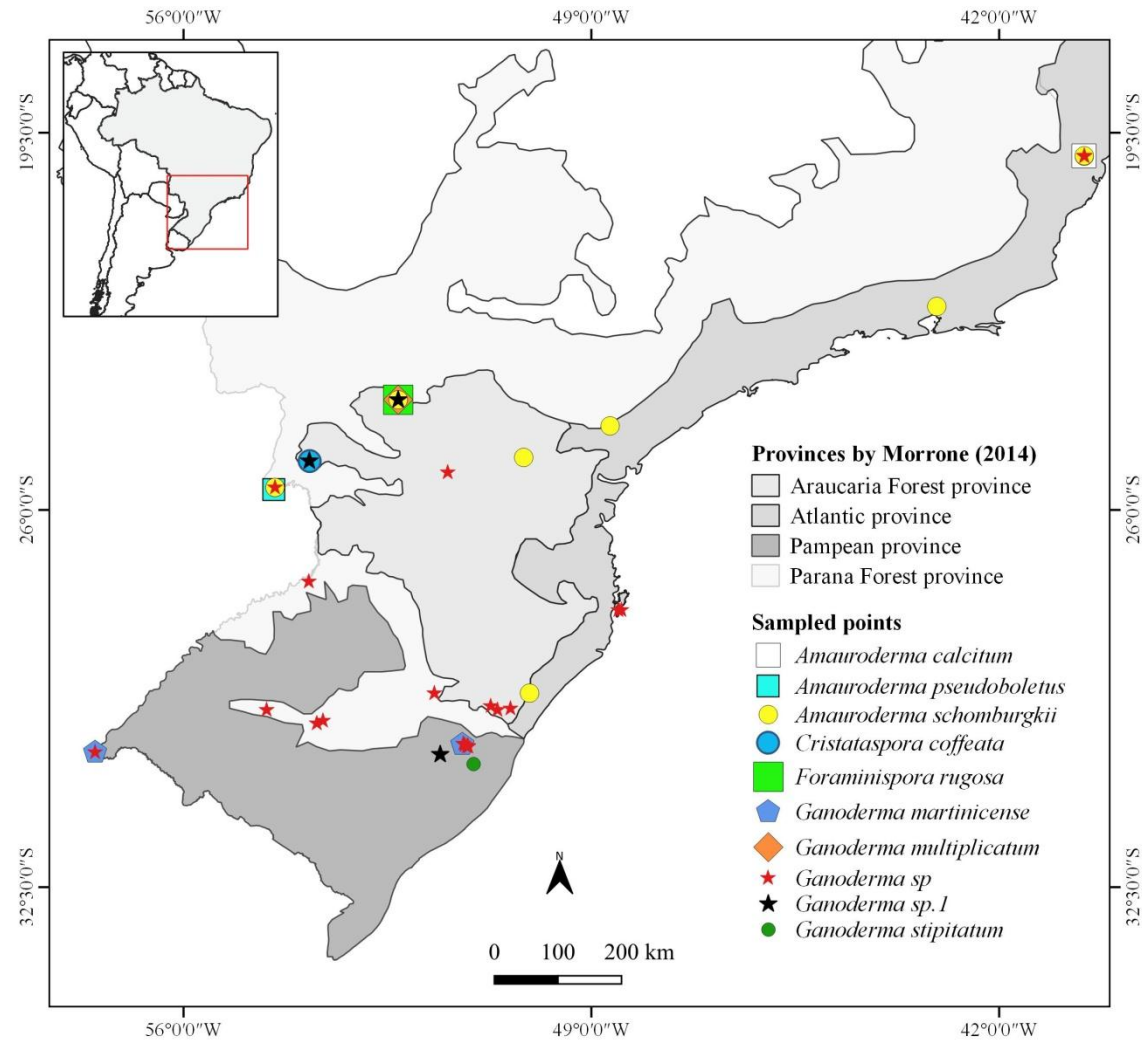
<i>Amauroderma</i> sp	INPA249751	BRAZIL	KR816525	-	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2016
<i>Cristataspora coffeata</i>	FLOR50933	BRAZIL	KU315204	-	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2016
<i>Cristataspora coffeata</i>	QCAM2955	ECUADOR	MH124633	-	Genbank
<i>Cristataspora coffeata</i>	ICN200397	BRAZIL	MW541383	MW546321	This study
<i>Foraminispora rugos</i>	ICN200399	BRAZIL	MW541384	MW546312	This study
<i>Foraminispora rugosa</i>	FLOR52191	BRAZIL	KU315200	KU315216	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2016
<i>Foraminispora rugosa</i>	DHCR512:HUEFS	BRAZIL	MF409960	-	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2017
<i>Foraminispora rugosa</i>	DHCR554:HUEFS	BRAZIL	MF409962	MF409954	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2017
<i>Foraminispora rugosa</i>	DHCR560:HUEFS	BRAZIL	MF409963	MF409955	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2017
<i>Foraminispora rugosa</i>	ICN200398	BRAZIL	MW541385	MW546317	This study
<i>Furtadoa biseptata</i>	FLOR50932	BRAZIL	KU315196	KU315206	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2016
<i>Furtadoa brasiliensis</i>	URM83578	BRAZIL	JX310841	-	Gomes-Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>Furtadoa brasiliensis</i>	TBG58	BRAZIL	JX982569	-	Gomes-Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>Ganoderma adpersum</i>	GAD3	POLAND	JN222418	-	Genbank
<i>Ganoderma applanatum</i>	KM120830	UK	AY884178	-	Genbank
<i>Ganoderma applanatum</i>	GA165	CHINA	DQ425009	-	Genbank
<i>Ganoderma applanatum</i>	GA117	CHINA	DQ424996	-	Genbank

<i>Ganoderma aridicola</i>	DAI 12588	South Africa	KU572491	-	Genbank
<i>Ganoderma australe</i>	DHCR411(HUEFS)	BRAZIL	MF436675	MF436672	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2017
<i>Ganoderma australe</i>	DHCR417 (HUEFS)	BRAZIL	MF436676	MF436673	Costa-Rezende <i>et al.</i> , 2017
<i>Ganoderma sp</i>	ICN202138	BRAZIL	MW541390	MW546311	This study
<i>Ganoderma sp</i>	ICN202131	BRAZIL	MW541388	MW546323	This study
<i>Ganoderma sp</i>	ICN202132	BRAZIL	MW541389	MW546330	This study
<i>Ganoderma sp</i>	ICN202130	BRAZIL	MW541387	MW546333	This study
<i>Ganoderma sp</i>	ICN202133	BRAZIL	MW541386	MW546334	This study
<i>Ganoderma austroafricanum</i>	CBS138724	SOUTH AFRICA	KM507324	MH877667	Vu <i>et al.</i> , 2019
<i>Ganoderma gibbosum</i>	SFC2013040421	KOREA	KY364259	-	Jargalmaa <i>et al.</i> , 2017
<i>Ganoderma gibbosum</i>	KUT0805	JAPAN	AB733121	AB733303	Genbank
<i>Ganoderma lingzhi</i>	DAI15798	CHINA	KU219990	KU220018	Genbank
<i>Ganoderma lingzhi</i>	DAI15799	CHINA	KU219991	KU220019	Genbank
<i>Ganoderma lucidum</i>	MUCL31549	FRANCE	MG706230	MG706176	Genbank
<i>Ganoderma lucidum</i>	K175217	UK	KJ143911	-	Zhou <i>et al.</i> , 2015
<i>Ganoderma lucidum</i>	CBS27081	FRANCE	MH861340	MH873099	Vu <i>et al.</i> , 2019
<i>Ganoderma martinicense</i>	LIPSWMart0844	MARTINIQUE FRANCE	KF963257	-	Genbank
<i>Ganoderma martinicense</i>	LIPSWMart0855	FRANCE	KF963256	-	Genbank

<i>Ganoderma martinicense</i>	GVL-35	MEXICO	MT232632	-	Genbank
<i>Ganoderma martinicense</i>	VO1795	MEXICO	MT939276	-	Genbank
<i>Ganoderma martinicense</i>	ICN202149	BRAZIL	MW541363	MW546338	This study
<i>Ganoderma martinicense</i>	ICN202152	BRAZIL	MW541361	-	This study
<i>Ganoderma multipileum</i>	DAI9447	CHINA	KF494997	-	Zhou <i>et al.</i> , 2015
<i>Ganoderma multipileum</i>	CWN04670	CHINA	KJ143913	-	Zhou <i>et al.</i> , 2015
<i>Ganoderma multiplicatum</i>	SPC9	BRAZIL	KU569553	KU570951	Genbank
<i>Ganoderma multiplicatum</i>	URM83346	BRAZIL	JX310823	JX310837	Genbank
<i>Ganoderma multiplicatum</i>	ICN200402	BRAZIL	MW541360	MW546321	This study
<i>Ganoderma orbiforme</i>	URM83334	BRAZIL	JX310814	JX310828	Genbank
<i>Ganoderma orbiforme</i>	URM83336	BRAZIL	JX310816	JX310830	Genbank
<i>Ganoderma resinaceum</i>	NY00985711	USA	KJ143918	-	Zhou <i>et al.</i> , 2015
<i>Ganoderma resinaceum</i>	CBS22036	USA	MH855781	MH867290	Vu <i>et al.</i> , 2019
<i>Ganoderma lingzhi</i>	SFC20150630-14	KOREA	KY364246	-	Jargalmaa <i>et al.</i> , 2017
<i>Ganoderma lingzhi</i>	SFC20150812-48	KOREA	KY364247	-	Jargalmaa <i>et al.</i> , 2017
<i>Ganoderma stipitatum</i>	THC16	COLOMBIA	KC884264	-	Genbank
<i>Ganoderma stipitatum</i>	ICN202150	BRAZIL	MW541382	MW546313	This study

<i>Ganoderma tornatum</i>	URM82776	BRAZIL	JQ514110	JX310800	Genbank
<i>Ganoderma tornatum</i>	TBG01AM2009	BRAZIL	JQ514108	JX310808	Genbank
<i>Haddowia longipes</i>	LPDR 17072708	LAOS	MK345423	MK346828	Hapuarachchi <i>et al.</i> , 2019
<i>Haddowia longipes</i>	LPDR17072709	LAOS	MK345424	MK346829	Hapuarachchi <i>et al.</i> , 2019
<i>Perenniporia medullapanis</i>	MUCL43250	NORWAY	FJ411087	-	Genbank
<i>Perenniporia medullapanis</i>	CBS45748	CANADA	MH856433	MH867979	Vu <i>et al.</i> , 2019
<i>Ganoderma</i> sp1	ICN202142	BRAZIL	MW541381	MW546319	This study
<i>Ganoderma</i> sp1	ICN202148	BRAZIL	MW541379	MW546329	This study
<i>Ganoderma</i> sp1	ICN202151	BRAZIL	MW541380	MW546332	This study
<i>Tomophagus cattienensis</i>	CT119	VIETNAM	JN184398	-	Le <i>et al.</i> , 2012
<i>Tomophagus cattienensis</i>	TRTC161191	VIETNAM	NR 154477	-	Le <i>et al.</i> , 2012
<i>Tomophagus colossus</i>	URM80450	BRAZIL	JX310825	JX310839	Genbank
<i>Tomophagus colossus</i>	URM83330	BRAZIL	JQ618247	JX310811	Genbank

Material Supplementary B: Study Region Map (figure A) and Tree Phylogenetic (figure B).



Supplementary Mareial C: Collection Data and yield of fungal extracts.

VOUCHER	Sample	Genus	State	Identification	Region	Month	Year	Substrate	Geographic coordinates	Climate (Alvares, 2013)	Province Morrone, 2014)	Yield of extract(%)
	VOG1	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	May	2016	standing dead tree	30°04'37.19"S 51°06'46.40" W	Cfa	Pampean	
	VOG2	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	May	2016	standing dead tree	30°04'37.19"S 51°06'46.40" W	Cfa	Pampean	
	VOG3	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	May	2016		30°04'37.19"S 51°06'46.40" W	Cfa	Pampean	
ICN202130	VOG4	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	May	2016	stump of <i>Pinus</i> sp	30° 4' 35.048" S 51° 6' 53.173" W	Cfa	Pampean	4.2
	VOG6	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	July	2016	standing dead tree	30°03'42"S 51°7'36" W	Cfa	Pampean	
	VOG8	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	July	2016	dead tree	30°03'42"S 51°7'36" W	Cfa	Pampean	
	VOG9	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	July	2016	dead tree	30°03'42"S 51°7'36" W	Cfa	Pampean	
	VOG11	<i>Ganoderma</i>	SC	<i>Ganoderma</i> sp	South	August	2016		27°46'24.92"S 48°29'12.26"W	Cfa	Atlantic	
	VOG12	<i>Ganoderma</i>	SC	<i>Ganoderma</i> sp	South	August	2016		27° 43' 30" S 48°32'18"W	Cfa	Atlantic	
	VOG13	<i>Ganoderma</i>	SC	<i>Ganoderma</i> sp	South	August	2016		27° 43' 30" S 48°32'18"W	Cfa	Atlantic	
ICN202131	VOG14	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	September	2016	fallen dead tree	29°37'50.94"S 53°36'30.11"W	Cfa	Pampean	5.7
ICN202132	VOG15	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	September	2016	fallen dead tree	29°37'50.94"S 53°36'30.11"W	Cfa	Pampean	6.2
	VOG16	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	September	2016	dead tree stump	29°26'38.067"S 54°34'33.212"W	Cfa	Pampean	
	VOG22	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	September	2016	dead tree	30°4'14.93"S	Cfa	Pampean	

								stump	51°8'18.312"W			
	VOG23	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	September	2016	dead tree stump	30°4'14.93"S 51°8'18.312"W	Cfa	Pampean	
	VOG24	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	September	2016	dead tree stump	30°4'14.93"S 51°8'18.312"W	Cfa	Pampean	
	VOG25	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	October	2016	dead tree stump	29°22'43"S 50°43'48"W	Cfa	Pampean	
	VOG26	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	October	2016	standing dead tree	29°22'44"S 50°43'49"W	Cfa	Pampean	
	VOG27	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	October	2016	standing dead tree	29°22'30"S 50°43'42"W	Cfa	Pampean	
ICN202133	VOG49	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	November	2016	standing dead tree	29°9'28"S 51°41'50"W	Cfa	Pampean	5.9
	VOG52	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	November	2016	standing dead tree	29°25'13"S 50°23'27"W	Cfa	Pampean	
	VOG56	<i>Amauroderma</i>	ES	<i>Amauroderma</i> sp.	Southeast	December	2016	root	19°54'49"S 40°33'9"W	Aw	Atlantic	
ICN202135	VOG59	<i>Amauroderma</i>	ES	<i>A. schomburgkii</i>	Southeast	December	2016	root		Aw	Atlantic	
	VOG60	<i>Amauroderma</i>	ES	<i>Amauroderma</i> sp.	Southeast	December	2016	root		Aw	Atlantic	
ICN202134	VOG61	<i>Amauroderma</i>	ES	<i>A. schomburgkii</i>	Southeast	December	2016	root		Aw	Atlantic	
	VOG67	<i>Amauroderma</i>	ES	<i>A. cf. calcitum</i>	Southeast	December	2016	root		Aw	Atlantic	
ICN202136	VOG68	<i>Amauroderma</i>	ES	<i>A. schomburgkii</i>	Southeast	December	2016	root		Aw	Atlantic	1.3
	VOG69	<i>Ganoderma</i>	ES	<i>Ganoderma</i> sp	Southeast	December	2016	fallen tree stump		Aw	Atlantic	
ICN200400	VOG70	<i>Amauroderma</i>	ES	<i>A. schomburgkii</i>	Southeast	December	2016	root	19°54'22"S 40°32'29W	Aw	Atlantic	1.7
ICN202137	VOG71	<i>Amauroderma</i>	ES	<i>A. schomburgkii</i>	Southeast	December	2016	root	19°54'22"S 40°32'29W	Aw	Atlantic	
	VOG72	<i>Ganoderma</i>	ES	<i>Ganoderma</i> sp	Southeast	December	2016		19°54'49"S 40°33'09W	Aw	Atlantic	

	VOG73	<i>Ganoderma</i>	ES	<i>Ganoderma</i> sp	Southeast	December	2016		19°53'57"S 40°32'52W	Cfa	Atlantic	
	VOG77	<i>Amauroderma</i>	ES	<i>A. calcitum</i>	Southeast	December	2016		19°54'49"S 40°33'09W	Cfa	Atlantic	
	VOG87	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	January	2017	fallen tree stump		Cfa	Pampean	
	VOG88	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	January	2017	fallen tree stump		Cfa	Pampean	
	VOG92	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	January	2017			Cfa	Pampean	
	VOG95	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	January	2017	standing dead tree	30°01'38.38"S 51°11'59.50W	Cfa	Pampean	
	VOG98	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	January	2017	standing dead tree	30°03'01.93S 51°10'34.67"W	Cfa	Pampean	
	VOG101	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	January	2017	standing dead tree	30°03'01.93S 51°10'34.67"W	Cfa	Pampean	
	VOG102	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	January	2017	standing dead tree	30°03'01.93S 51°10'34.67"W	Cfa	Pampean	
ICN200401	ACM1370	<i>Amauroderma</i>	PR	<i>A. schomburgkii</i>	South	January	2017	root		Cfb	Parana Forest	
ICN202138	ACM1374	<i>Ganoderma</i>	PR	<i>Ganoderma</i> sp	South	January	2017			Cfb	Parana Forest	
	VOG103	<i>Ganoderma</i>	PR	<i>Ganoderma</i> sp	South	February	2017		25°21'5"S 51°28'3"W	Cfa	Araucaria Forest	
	VOG104	<i>Ganoderma</i>	PR	<i>Ganoderma</i> sp	South	February	2017		25°21'05"S 51°28'04"W	Cfa	Araucaria Forest	
	VOG108	<i>Ganoderma</i>	PR	<i>Ganoderma</i> sp	South	February	2017		25°21'05"S 51°28'04"W	Cfa	Araucaria Forest	
	VOG109	<i>Ganoderma</i>	PR	<i>Ganoderma</i> sp	South	February	2017		25°21'05"S 51°28'04"W	Cfa	Araucaria Forest	
ICN202140	VOG118	<i>Amauroderma</i>	PR	<i>A. schomburgkii</i>	South	February	2017	root	24°6'9"S 52°10'15"W	Cfa	Araucaria Forest	
	VOG124	<i>Amauroderma</i>	PR	<i>Amauroderma</i> sp.	South	February	2017	root	24°6'2"S 52°19'05"W	Cfa	Araucaria Forest	
	VOG125	<i>Amauroderma</i>	PR	<i>A. schomburgkii</i>	South	February	2018	root	24°6'2"S 52°19'04"W	Cfa	Araucaria Forest	

ICN200398	VOG127	<i>Foraminispora</i>	PR	<i>Foraminispora rugosa</i>	South	February	2019	standing tree	24°6'3"S 52°19'2"W	Cfa	Araucaria Forest	3.0
ICN202139	VOG129	<i>Amauroderma</i>	PR	<i>A. schomburgkii</i>	South	February	2017	root	24°6'3"S 52°19'2"W	Cfa	Araucaria Forest	
	VOG130	<i>Amauroderma</i>	PR	<i>A. cf. praetervisum</i>	South	February	2017	root	24°6'3"S 52°19'2"W	Cfa	Araucaria Forest	
ICN202142	VOG131	<i>Ganoderma</i>	PR	<i>Ganoderma</i> sp1	South	February	2018	root	24°6'3"S 52°19'2"W	Cfa	Araucaria Forest	2.4
ICN202141	VOG134	<i>Amauroderma</i>	PR	<i>A. schomburgkii</i>	South	February	2017	root		Cfa	Araucaria Forest	
ICN200402	VOG135	<i>Ganoderma</i>	PR	<i>G. multiplicatum</i>	South	February	2017	root		Cfa	Araucaria Forest	
ICN200397	VOG136	<i>Cristataspora</i>	PR	<i>Cristataspora coffeata</i>	South	February	2017	live tree root	25°9'26"S 53°50'13"W	Cfa	Araucaria Forest	2.5
ICN202143	VOG137	<i>Ganoderma</i>	PR	<i>Ganoderma</i> sp1	South	February	2017	standing tree	25°9'17"S 53°50'31"W	Cfa	Araucaria Forest	
ICN202144	VOG 140	<i>Amauroderma</i>	PR	<i>A. schomburgkii</i>	South	February	2018	root	25°36'41"S 54°25'56"W	Cfa	Araucaria Forest	
ICN202145	VOG141	<i>Amauroderma</i>	PR	<i>A. schomburgkii</i>	South	February	2019	root	25°36'44"S 54°25'51"W	Cfa	Araucaria Forest	
ICN202146	VOG143	<i>Amauroderma</i>	PR	<i>A. schomburgkii</i>	South	February	2020	root	25°36'49"S 54°25'49"W	Cfa	Araucaria Forest	
ICN202147	VOG147	<i>Amauroderma</i>	PR	<i>A. pseudoboletus</i>	South	February	2017	root	25°38'53"S 54°27'9"W	Cfa	Araucaria Forest	
ICN200405	VOG148	<i>Amauroderma</i>	PR	<i>A. schomburgkii</i>	South	February	2017	root		Cfa	Araucaria Forest	
ICN202148	VOG149	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp1	South	March	2017	standing dead tree	30°12'39.6"S 51°35'45.6"W	Cfa	Pampean	8.7
	VOG150	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>G. martinicense</i>	South	May	2017	live tree	30°02'20.98"S 51°13'0.98"W	Cfa	Pampean	
	VOG153	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	May	2017	fallen log	27°13'57.61"S 53°51'04.82"W	Cfa	Pampean	
	VOG156	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	June	2017	fallen log	29°26'38"S	Cfa	Pampean	

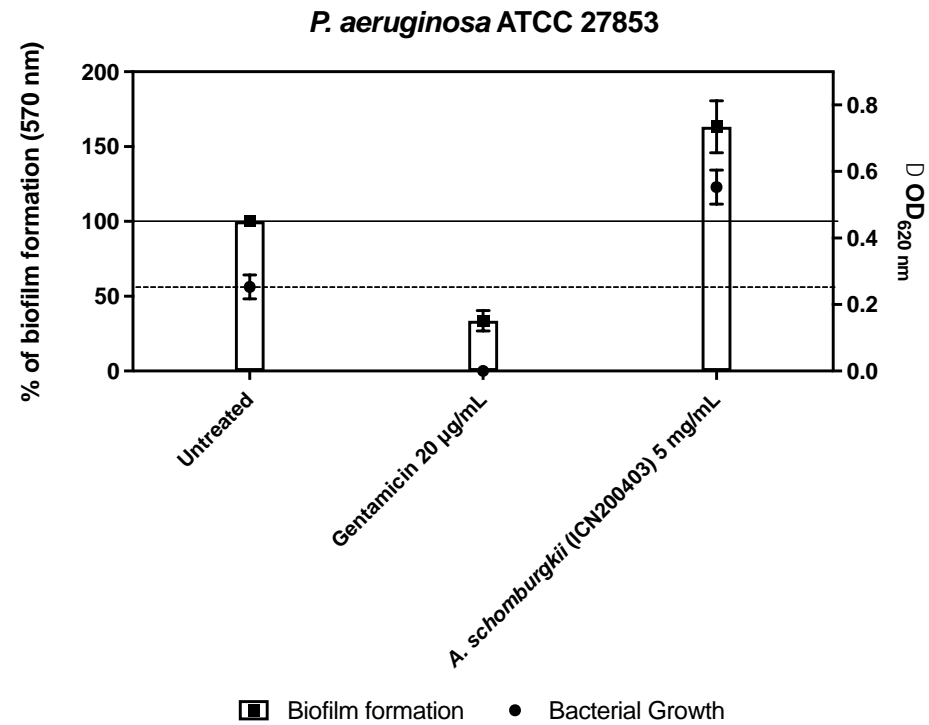
									50°36'50"W			
	VOG157	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	June	2017	fallen log	29°26'38"S 50°36'50"W	Cfa	Pampean	
	VOG160	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	June	2017	fallen log	29°26'38"S 50°36'50"W	Cfa	Pampean	
	VOG161	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	June	2017	fallen log	29°26'38"S 50°36'50"W	Cfa	Pampean	
	VOG169	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>G. martinicense</i>	South	June	2017	living Espinilhos	30°10'26"S 57°31'11"W	Cfa	Pampean	
ICN202149	VOG170	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>G. martinicense</i>	South	June	2017	living Espinilhos	30°10'26"S 57°31'11"W	Cfa	Pampean	
	VOG172	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>G. martinicense</i>	South	June	2017	living Espinilhos	30°10'26"S 57°31'11"W	Cfa	Pampean	
	VOG173	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	June	2017	tree stumps	30°10'26"S 57°31'11"W	Cfa	Pampean	
	VOG174	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp	South	August	2017	living tree	29°40'36"S 53°42'52"W	Cfa	Pampean	
ICN202151	VOG210	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>Ganoderma</i> sp1	South	January	2018	standing dead tree	30°12'39.6"S 51°35'45.6"W	Cfa	Pampean	7.0
	VOG211	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>G. martinicense</i>	South	January	2018	tree stumps		Cfa	Pampean	
ICN202152	VOG212	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>G. martinicense</i>	South	February	2018	tree stumps		Cfa	Pampean	
ICN202153	GAS1302	<i>Amauroderma</i>	SP	<i>A. schomburgkii</i>	Southeast	February	2018	root		Cfb	Atlantic	
ICN200403	SCF2962	<i>Amauroderma</i>	RS	<i>A. schomburgkii</i>	South	February	2018	root		Cfa	Pampean	
	VOG217	<i>Amauroderma</i>	ES	<i>A. schomburgkii</i>	Southeast	November	2018	root	19°53'46"S 40°32'32"W	Aw	Atlantic	
	VOG218	<i>Amauroderma</i>	ES	<i>A. schomburgkii</i>	Southeast	November	2018	root	19°53'46"S 40°32'32"W	Aw	Atlantic	
	VOG219	<i>Amauroderma</i>	ES	<i>A. schomburgkii</i>	Southeast	November	2018	root	19°53'46"S 40°32'32"W	Aw	Atlantic	

	VOG214	<i>Amauroderma</i>	ES	<i>A. schomburgkii</i>	Southeast	November	2018	root	19°53'46"S 40°32'32"W	Aw	Atlantic	
	VOG216	<i>Ganoderma</i>	ES	<i>Ganoderma</i> sp.	Southeast	November	2018	fallen tree stump	19°53'46"S 40°32'32"W	Aw	Atlantic	
	VOG220	<i>Amauroderma</i>	ES	<i>A. schomburgkii</i>	Southeast	November	2018	root		Aw	Atlantic	
	VOG221	<i>Amauroderma</i>	ES	<i>A. schomburgkii</i>	Southeast	November	2018	root		Aw	Atlantic	
	VOG222	<i>Amauroderma</i>	ES	<i>A. schomburgkii</i>	Southeast	November	2018	root		Aw	Atlantic	
	VOG223	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>G. martinicense</i>	South	November	2018	tree stumps		Cfa	Pampean	
	VOG224	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>G. martinicense</i>	South	December	2019	tree stumps		Cfa	Pampean	
	FTF262	<i>Amauroderma</i>	RJ	<i>Amauroderma</i> sp.	Southeast	May	2017	root	22°29'35"S 43°4'24"O	Cfb	Atlantic	
	FTF230	<i>Amauroderma</i>	RJ	<i>Amauroderma</i> sp.	Southeast	May	2017	root		Cfb	Atlantic	
ICN202150	Gas1118	<i>Ganoderma</i>	RS	<i>G. stipitatum</i>	South	May	2017	root	30°22'40"S 51°1'23"W	Cfa	Pampean	4.0
	MP249	<i>Amauroderma</i>	PR	<i>Amauroderma</i> sp.	South	June	2017	root		Cfb	Araucaria Forest	
ICN200399	GAS1084	<i>Foraminispora</i>	PR	<i>F. rugosa</i>	South	February	2017	Standing tree		Cfb	Araucaria forest	

NOTE: samples subject to phylogenetic molecular in this study are indicated in bold. Cfa: Humid subtropical zone, with hot summer; Cfb: Humid subtropical zone, with

temperate summer; Aw: Tropical zone, with dry winter.

Supplementary material D: Activity of biofilm inhibition and bacterial growth inhibition of *A. schomburgkii* ethanolic extract against *P. aeruginosa* (Gram-negative bacteria).



* It indicates statistical difference from untreated ($p < 0.01$)

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL

Muitas espécies de *Ganoderma* exibem alta plasticidade fenotípica. Desta forma, apenas a avaliação morfológica para definir uma espécie não fornece dados suficientes para a separação das espécies dentro deste gênero em especial. Fruto disto, existe uma imensa confusão taxonômica e muitas espécies crípticas permanecem classificadas dentro de complexos, sem uma identidade definida, principalmente nos Neotropicos (onde muitas vezes se utilizam nomes de espécies descritas em regiões temperadas do Hemisfério Norte (Cabarroi-Hernández et al., 2019)).

O objetivo deste trabalho não foi retificar o “caos” (Ryvarden, 1991) taxonômico do gênero *Ganoderma*. Infelizmente, ainda faltam ferramentas eficientes para definir inequivocamente as espécies. Contudo, o potencial farmacológico destes macrofungos vêm sendo descrito sem o devido rigor na identificação e muitas vezes sem o depósito do voucher.

Este trabalho pretende alertar para o risco de descrédito quanto ao potencial farmacológico destes fungos, pois a falta de repetibilidade nos resultados pode apenas ser fruto do uso de amostras com identificação equivocada. Isto tem acontecido com *G. lucidum*, à medida que os produtos vendidos sob essa identidade, correspondem, na verdade, a outras espécies (Lai et al., 2004, Osuji et al., 2016, Hennicke et al., 2016, Papp et al., 2017, Loyd et al., 2018) e que muitas vezes apresentam constituintes químicos diferentes entre si. Não bastasse isto, espécies identificadas como *G. applanatum* estão sendo reportadas em trabalhos sem avaliação molecular e sem voucher. Estes trabalhos avaliam atividade citotóxica, que muitas vezes não podem ser reproduzidas.

As amostras avaliadas aqui, quando a análise molecular não foi suficiente para a identificação, por uma questão de segurança, foram consideradas *Ganoderma* sp. conforme demonstrado no Quadro 2.

Quadro 2: Amostras de espécies crípticas que permaneceram identificadas até o nível de gênero.

Complexo “ <i>G. lucium</i> ”	Complexo “ <i>G. applanatum-australe</i> ”
GAS1118: <i>Ganoderma</i> sp.1	VOG4: <i>Ganoderma</i> sp.4
VOG149: <i>Ganoderma</i> sp.2	VOG14: <i>Ganoderma</i> sp.5
VOG210: <i>Ganoderma</i> sp.3	VOG15: <i>Ganoderma</i> sp.6
VOG131: <i>Ganoderma</i> sp.9	VOG49: <i>Ganoderma</i> sp.7
	ACM1374: <i>Ganoderma</i> sp.8

Graças aos recentes trabalhos taxonômicos envolvendo os gêneros *Foraminispora* (Costa-Rezende, 2017), *Amauroderma* (Costa-Rezende et al., 2016 e 2017) e da espécie *C. coffeata* (Costa-Rezende et al., 2020), as amostras contidas neste trabalho foram identificadas corretamente e avaliadas farmacologicamente.

Alguns dos basidiomas amostrais de *Ganodermataceae* foram processados a fim de se obter um isolado químico, porém, foi uma tentativa infrutífera. Talvez, a quantidade amostral não tenha sido suficiente (por exemplo, foram utilizados 3 g do pó do basidioma de *G. martinicense*). Trabalhos como os de Chen et al., 2017 (6 kg de basidioma de ‘*G. lucidum*’ de uma montanha na China), Su et al., 2020 (39 Kg de basidioma de ‘*G. lucidum*’ coletado na província de Yunnan, China), Huang et al., 2017 (2.5kg de basidioma de *G. calidofilum* coletados na província de Hainan, China), Chen et al., 2018 (48 kg de *G. resinaceum* coletados na província de Hainan, China), entre vários outros, foram realizados a partir de massa amostral centenas de vezes maior.

Ao realizar a análise fitoquímica preliminar nos extratos, o resultado demonstrou a presença de várias classes de compostos (tabela 4 e fig. 12):

Tabela 4: Extratos etanólicos sujeitos à reação de coloração com reveladores clássicos

Amostra	Espécie	Ácido fosfomolibdico-Corante de Shorr	Cloreto férrico 10%	Anisaldeído Sulfúrico	Ninidrina
		Compostos fenólicos, ceras de hidrocarbonetos, alcaloides e esteróis.	Compostos fenólicos e enolizáveis.	Fenóis, terpenos, açúcares e esteróis.	Aminas primárias
VOG149	<i>Ganoderma</i> sp.2	++	++	++	+
VOG150	<i>Ganoderma martinicense</i>	+++	+++	+++	+
VOG127	<i>F. rugosa</i>	+++	+++	+++	+

VOG136	<i>C. coffeata</i>	+++	++	+++	+
VOG70	<i>A. schomburgkii</i>	+++	+++	+++	+
VOG148	<i>A. schomburgkii</i>	+++	+++	+++	+

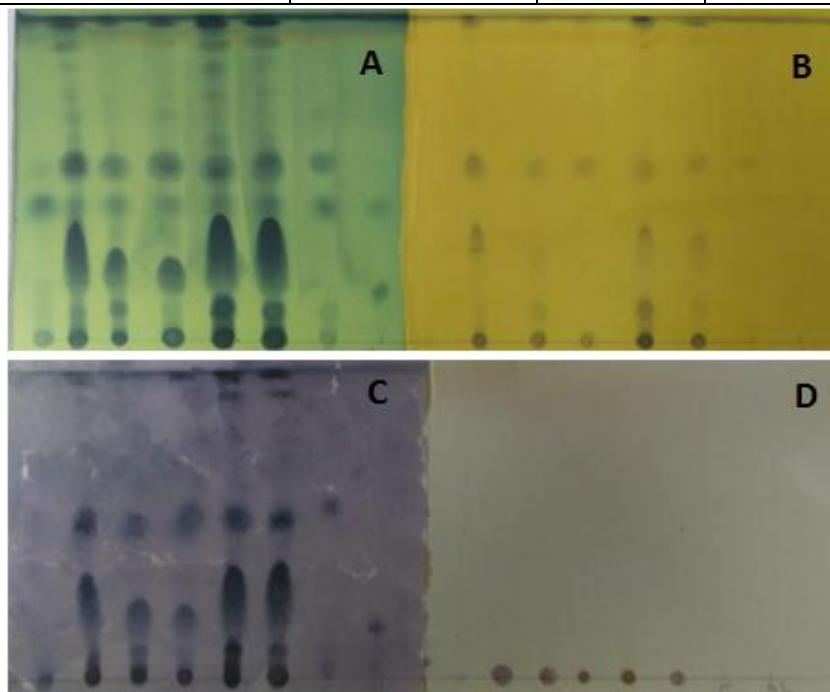


Fig. 12: Extratos etanólicos sujeitos aos testes colorimétricos clássicos, resultados. Da esquerda para a direita são apresentadas as amostras *Ganoderma* sp2, *Ganoderma martinicense*, *Foraminispora rugosa*, *Cristataspora coffeata*, *Amauroderma schomburgkii* (VOG 70 e VOG148), bem como os padrões de Ergosterol e Ácido Betulínico. Os reveladores são em A: ácido fosfomolibdico, B: cloreto férrico 10%, C: anisaldeído sulfúrico e D: ninidrina. Eluente: Diclorometano (2x).

Quanto à análise química dos extratos brutos, apenas o extrato de *F. rugosa* foi avaliado por Cromatografia Líquida de Ultra Performance associada à espectrômetro de massas (UHPLC-QTOF-MS). Esta técnica facilitou a identificação e caracterização de compostos conhecidos baseando-se na sua fórmula molecular, massa exata e fragmentação de massas, além de diferenciar compostos isobáricos. Porém, foi incapaz de identificar compostos inéditos.

Assim, a partir da análise fitoquímica preliminar, realizada em cromatografia por camada delgada (fig. 16) e nos inúmeros trabalhos reportados na literatura envolvendo separação e identificação por UHPLC-QTOF-MS, foi investigada a presença de terpenoides nos extratos (moléculas com C, H e O).

Os padrões de fragmentação dos anéis A, B, C e D, típicos de terpenóides, foram retirados de trabalhos como o de Yang et al., 2007. Nestes trabalhos foram apresentados padrões clássicos de fragmentação de ácidos ganodéricos em *G. lucidum*. Além disto, trabalhos de Zhang et al., 2018, que observaram a quebra dos anéis no ácido ganodérico A, como mostra a representação geral da fig. 13.

A quebra dos anéis depende da estrutura do ácido ganodérico e de seus substituintes. De modo genérico as quebras, após perda de H₂O e CO₂, ocorrem como apresentadas na fig. 14.

Os compostos químicos identificados em *F. Rugosa*, estão apresentados no Artigo 1.

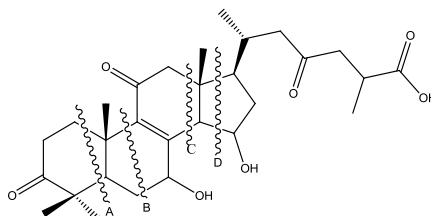


Fig.13: Fragmentação de ácido ganoderico A, segundo Zhang et al., 2018.

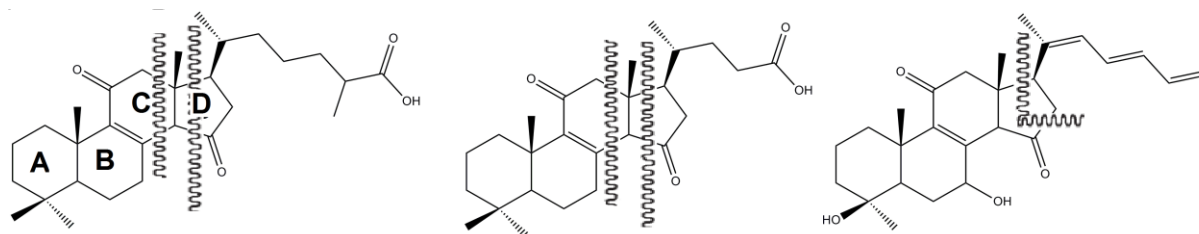


Fig.14: Padrão geral de fragmentação de ácidos ganodericos, segundo Whang et al., 2007

Foram identificadas 13 moléculas em *F. Rugosa*, dentre elas 5 oxilipinas com C18, importantes moléculas de comunicação entre Reinos (Fischer e Keller, 2016).

Ensaio biológicos

Foram realizados três ensaios biológicos a fim de clarear o perfil farmacológico das espécies em estudo.

Nos ensaios de citotoxicidade (tabelas 5 e 6), nenhuma das amostras apresentou potencial para ser utilizada como agente citotóxico. O ensaio foi realizado contra linhagens tumorais de MIAPaCa-2 (câncer de pâncreas humano), MEV-3 (melanoma), U-87 (glioblastoma), OVCAR-3(câncer de ovário), MF-7 (câncer de mama), SH-SY5Y (neuroblastoma humano) e contra linhagens não tumorais de C-6 (células gliais), L929 (fibroblastos), EpG-2 (hepatoma), Vero (células epiteliais renais) a fim de se verificar o índice de seletividade.

Neste trabalho foi levada em consideração a prerrogativa do Instituto Nacional do Câncer (NCI, USA), que determina um valor de IC₅₀ menor do que 20 µg/mL para extratos oriundos de produtos naturais em ensaios preliminares (Abdel-Hameed et al., 2012).

Os extratos etanólicos de *A. schomburgkii*, *F. rugosa*, *C. coffeata* e *Ganoderma* sp1 foram considerados moderadamente tóxicos, pois não são totalmente desprovidos de toxicidade. Somente o extrato de *G. martinicense*, espécime VOG212, apresentou toxicidade próxima à recomendada pelo NCI (32.4 µg/mL) quando avaliado frente às células de câncer de mama MF-7.

Os extratos também foram avaliados quanto ao potencial de inibição de biofilme de *S. aureus* ATCC6538. Destes, dois extratos de *A. Schomburgkii*, amostras ACM1370 e SCF2962, além de serem originados de amostras bem identificadas por taxonomia clássica e por análise molecular, apresentaram atividade de inibição de crescimento bacteriano moderada. O agente microbiano que não elimina as bactérias, evitando assim o estresse seletivo, que pode levar a processos de desenvolvimento de resistência, é um dos resultados esperados para um agente antibiofilme.

Aqui foi reportada pela primeira vez a atividade antibiofilme de *A. schomburgkii* (vide Artigo 2).

Na sequência da bioprospecção em *Ganodermataceae*, foi realizado o ensaio tricomonocida frente à *Trichomonas vaginalis*. Em um *screening* prévio, os critérios para selecionar os extratos foram:

- Boa solubilidade no meio TYM, o que acarretou o descarte de *G. martinicense* (VOG150 e VOG212).
- Menor IC₅₀ (menor concentração que elimina metade dos trofozoítos) no screening prévio com extratos na concentração de 1mg/ml (Gráfico 2).

No gráfico 1, pode-se observar a atividade do extrato de *G. Martinicense* (VOG212), com 100% de inibição dos trofozoítos, porém, devido aos problemas de solubilização, esta amostra foi descartada e a amostra de *Ganoderma* sp3 (VOG210) foi considerada como a que apresentou o melhor resultado (80.84% de inibição dos trofozoítos) a uma concentração de 1mg/ml.

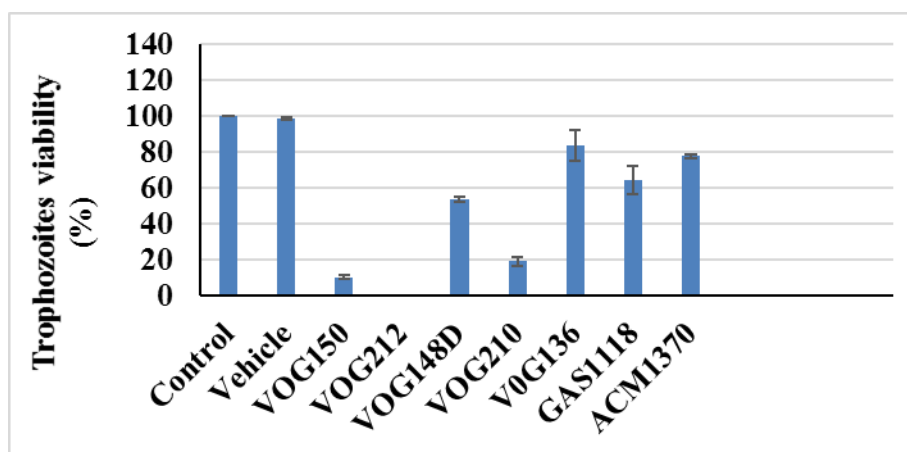


Gráfico 1: Screening do potencial tricomonocida das amostras de *Ganodermataceae* em estudo

Desta forma, o extrato de *Ganoderma* sp3 (VOG210) foi escolhido para sofrer separação por solvente.

O extrato bruto foi extraído com ciclo hexano (C₆H₁₂) e acetato de etila (C₄H₈O₂), gerando as subfrações VOG210CH e VOG201AC, respectivamente.

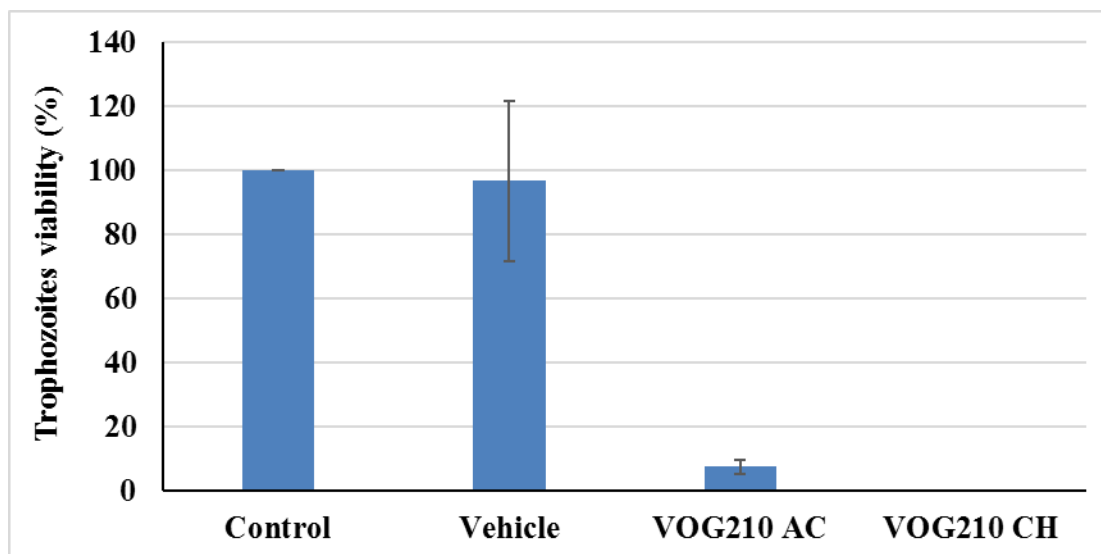


Gráfico 2: Potencial tricomonocida das subfrações acetato de etila (VOG210AC) e ciclohexânica (VOG210CH) de *Ganoderma* sp3.

As frações ciclohexânica (VOG210CH) e acetato de etila (VOG210AC) do extrato de *Ganoderma* sp3, em uma concentração de 1mg/mL, foram novamente testadas frente a *T. vaginalis* e foi demonstrado que a fração ciclohexânica foi mais potente, eliminando 100% dos trofozoítos. Pode-se concluir assim, que os constituintes mais apolares de *Ganoderma* sp3 são os compostos ativos (gráfico 2).

Também foi avaliada a curva dose-resposta para cálculo do IC₅₀ (concentração que elimina metade dos trofozoítos) e a curva dose-resposta de citotoxicidade frente às células Vero (gráfico 4). A IC₅₀ contra os trofozoítos foi determinada em 599,1µg/mL. No ensaio de citotoxicidade contra células Vero o extrato foi considerado citotóxico, com um índice de seletividade de 0.69. O índice de seletividade foi calculado pelo valor de IC₅₀ em células epiteliais renais (414,7µg/mL) dividido pelo valor de IC₅₀ em trofozoítos (599,1µg/mL).

Nota: O cálculo do índice de seletividade corresponde ao valor do IC₅₀ para a atividade do extrato em células Vero, dividido pelo valor do IC₅₀ nos trofozoítos. Utilizamos os limites determinados por Bélzivin et al, 2003 que considera um índice de seletividade promissor para valores superiores a três. No caso deste ensaio, o índice de seletividade foi 0.69, demonstrando a citotoxicidade do extrato bruto em células sadias de epitélio renal.

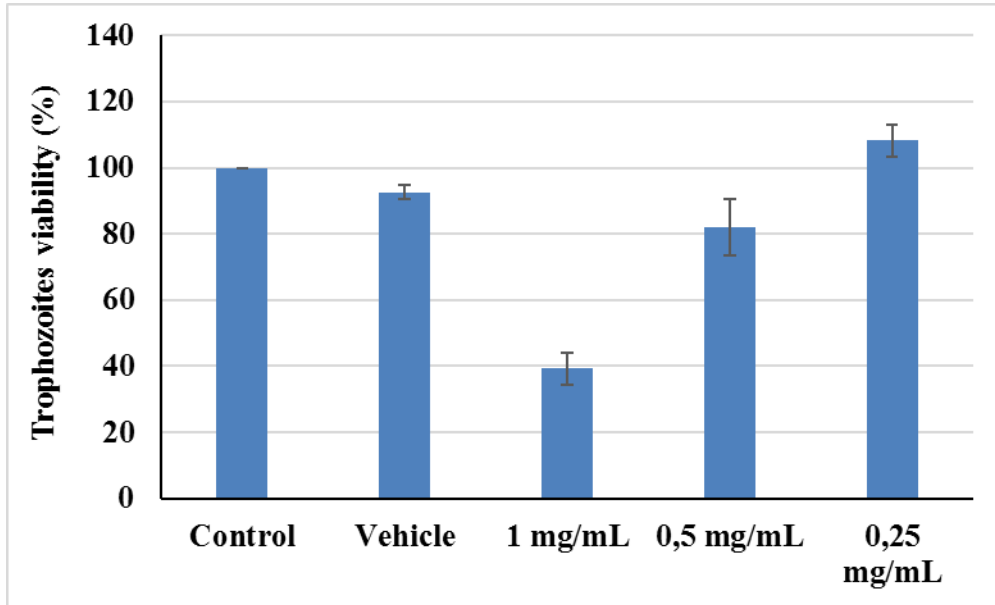


Gráfico 3: Curva dose-resposta do subextrato ciclohexânico de *Ganoderma sp3* (VOG210CH) no ensaio anti-Trichomonas

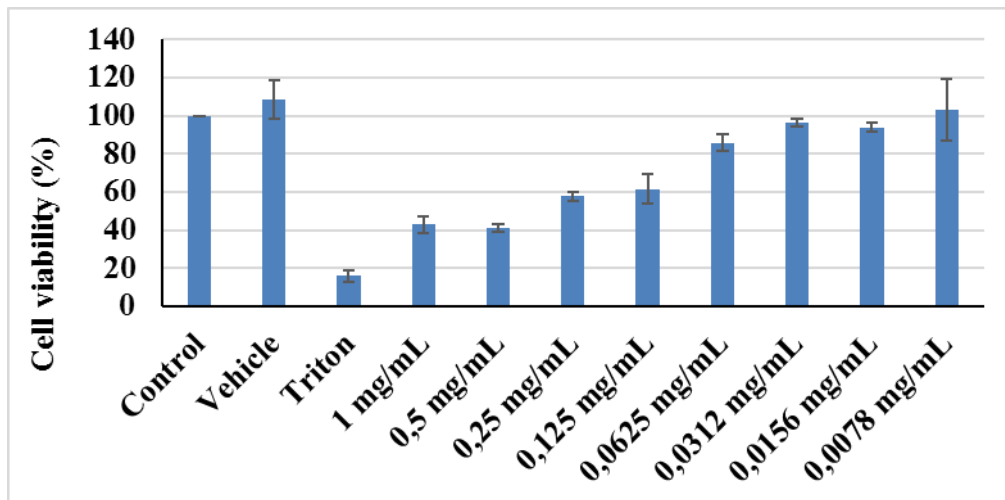


Gráfico 4: Citotoxicidade do subextrato ciclohexânico de *Ganoderma sp3* (VOG210CH) em células epiteliais renais (Vero cells).

Como pode ser observado no gráfico 3, a amostra *Ganoderma sp3*, subfração ciclohexânica (VOG210CH), foi mais potente que a amostra extraída com acetato de etila (VOG210Ac). Entretanto, o subextrato ciclo hexânico apresentou moderada citotoxicidade frente à células VERO. Mais estudos devem ser realizados a fim de esclarecer se as moléculas que são citotóxicas são as mesmas que agem contra o

parasita *T. vaginalis*, ou se são compostos distintos que podem ser separados e então, demonstrar alguma aplicabilidade com um mínimo de citotoxicidade.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS/TRABALHOS FUTUROS

Baseado em toda a revisão bibliográfica e nos resultados de bancada, serão apresentadas aqui as maiores limitações para a obtenção de resultados e sugestões para aprimorar o que foi realizado até agora.

- Uma das maiores dificuldades encontradas refere-se ao rendimento na produção dos extratos. Como visto no decorrer desta tese, o rendimento apresentado foi baixo. Duas sugestões ficam deste aprendizado. A primeira é escolher outra técnica para a produção dos extratos, como a extração por fluido supercrítico. Esta técnica extrativa tem a vantagem de ser mais rápida (pois pula a etapa de desalcoolização), mais eficiente (extrai compostos apolares com a mesma solubilidade do hexano) é ambientalmente amigável e barata (Sun *et al.* 2019).

A segunda, é a domesticação dos macrofungos com potencial farmacológico. O cultivo *in vitro* tem a vantagem de aumentar a quantidade de extrato bruto produzido sempre com a mesma cepa, controlando-se as variáveis ambientais. Vários trabalhos são encontrados na literatura relatando a importância de se conhecer as necessidades nutricionais e os gatilhos que levam, por exemplo, *Ganoderma lucidum* a bioproduzir terpenóides. Estudos demonstraram a necessidade de adição ao meio de cultivo de um agente oxidante (cobre, por exemplo) a fim de produzir estresse metabólico e assim, aumentar a quantidade de ácidos ganodéricos produzidos (Gao *et al.*, 2019), ou então variar a aeração, a quantidade de nitrogênio e de glicose no meio de cultura (Hu *et al.*, 2018). O cultivo artificial de *G. lucidum* foi desenvolvido com sucesso em substratos sólidos na China na década de 1970. Produzido, a mais de 40 anos, em ampla escala na China, Coréia e Japão, existe a dependência de cepas do tipo selvagem. Como a propagação vegetativa contínua para produção comercial leva à degeneração da qualidade das cepas no decorrer do tempo, o desenvolvimento sustentado da indústria de *G. lucidum* enfrenta o risco de escassez de “sementes”. Baseado neste exemplo,

ressalta-se aqui a importância da manutenção dos isolados miceliais das cepas coletadas nesta pesquisa, a fim de garantir matéria prima para futuros estudos. Além disto, para os espécimes selvagens aqui coletados, não há registros na literatura de protocolos para o cultivo *in vitro* para produção de grande quantidade de micélio e consequente, de metabólitos de interesse. Nem tão pouco, trabalhos focados na análise do solo, que se relacionem com estas espécies. Desta forma a domesticação deveria iniciar por estas reflexões.

No decorrer deste período de doutoramento foram feitas tentativas de cultivo com amostras isoladas de *Amaurodema schomburgkii*, porém, não foram frutíferas. O micélio desenvolveu-se em ágar extrato de malte, mas não produziu metabólitos no tempo de 21 dias de cultivo, à 28°C, em cultura estacionária. Fica a sugestão de manipular as variáveis ambientais e nutricionais a fim *startar* a síntese de compostos bioativos. Baseado nos resultado da atividade biológica frente a *S. aureus*, nossa hipótese é que esta espécie possui uma atividade promissora como inibidor de biofilme, fazendo-se necessário, então, o isolamento químico e determinação do mecanismo de ação das moléculas envolvidas. Além disto, no ensaio de citotoxicidade, *A. schomburgkii* apresentou atividade moderada, quando avaliado na forma de extrato etanólico bruto. Mais estudos são necessários para a verificação de quais os constituintes estão colaborando para a citotoxicidade do extrato.

- Foi feita a tentativa de isolamento químico de compostos majoritários. O extrato de *Ganoderma martinicense* foi processado em coluna cromatográfica em sílica gel 60, com eluição em gradiente (diclorometano: ciclohexano:metanol), partindo de uma massa de 3.0g. Somado aos problemas inerentes de isolamento de produtos naturais, como degradação e pouco rendimento, chegou-se a conclusão de que há necessidade de quantidade amostral muito maior para se obter um isolado.
- As amostras coletadas no Bioma Pampa, em sua grande maioria, de *Ganodermas* sem o píleo lacado. Poucas delas foram avaliadas biologicamente devido ao fato de haverem muitos problemas taxonômicos a serem resolvidos na identificação correta de *Ganoderma*.

- Na análise química por espectrometria de massas, a habilidade para caracterizar o terpenoma foi limitada pela falta de moléculas nos bancos de dados públicos com os respectivos fragmentos e os altos preços dos padrões. Poucos artigos científicos apresentam os dados de fragmentação. As moléculas são isoladas e apenas massa exata é apresentada, impossibilitando a identificação de compostos isobáricos. Considerando, que este trabalho avaliou espécies pouco estudadas, a nível de biomoléculas, faz-se urgente o isolamento do maior número de moléculas possível e a incorporação dos dados de fragmentação em bancos de dados de acesso aberto.

11 CONCLUSÃO GERAL

As áreas Sudeste/Sul da Mata Atlântica são mais ricas em biodiversidade fúngica quando comparadas ao bioma Pampa.

Os espécimes coletados que permanecem desconhecidos ou identificados a nível de gênero precisam ser identificados utilizando outros marcadores genéticos, ou outro tipo de tecnologia.

Este trabalho demonstrou o potencial dos espécimes coletados, principalmente de *Amauroderma schomburgkii* como agente anti-biofilme de *S. aureus* e de uma espécie não identificada (VOG210) como agente tricomonocida.

Quanto a atividade anti-tumoral, *G. martinicense* apresentou os melhores resultados e, apesar do IC₅₀ estar acima do preconizado, merece atenção e pode conter compostos químicos ativos contra linhagens tumorais de câncer de mama. Estudos mais refinados devem esclarecer quais os compostos atuam como citotóxicos e por quais mecanismos o fazem.

Através de espectrometria de massas, foi detectada a presença de oxilipinas C18 em *F. rugosa*.

12 REFERÊNCIAS

Abdel-Hameed ES, Salih A. Bazaid SA, Shohayeb MM, El-Sayed MM, El-Wakil EA. Phytochemical studies and evaluation of antioxidant, anticancer and antimicrobial properties of *Conocarpus erectus* L. growing in Taif, Saudi Arabia. *Eur J Med Plants*; v. 2, p. 93-112, 2012.

Abugri DA, Ayariga JA, Tiimob BJ, Yedjou CG, Mrema F, Witola WH. Medicinal Mushrooms as Novel Sources for New Antiparasitic Drug Development. Medicinal Mushrooms. In. *Medicinal Mushrooms: Recent Progress in Research and Development*. Publisher: Springer Singapore, p. 251–273, 2019. doi:10.1007/978-981-13-6382-5_9

Adams M, Christen M, Pnitzko I, Zimmermann S, Brun R, Kaiser M, Hamburger M. Antiplasmodial lanostanes from the *Ganoderma lucidum* mushroom. *J. Nat Prod*, v. 73, n. 5, p. 897– 900, 2010. <https://doi.org/10.1021/np100031c>
adaptations and evolutionary transitions. *Biological Reviews* (2019), v. 94, p. 1443-1476.

Ahad S, Tanveer S, Malik TA. Anticoccidial activity of aqueous extract of a wild mushroom (*Ganoderma applanatum*) during experimentally induced coccidial infection in broiler chicken. *Journal of Parasitic Disease*, v.40, n. 2, p. 408–414, 2016.

Allen F, Greiner R, Wishart D: Competitive fragmentation modeling of ESI-MS/MS spectra for putative metabolite identification. *Metabolomics*, v. 11, n. 1, p. 98–110, 2015.

Allen PC, Fetterer RH. Recent advances in biology of *Eimeria* species and diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clinical Microbiology Reviews*, v.; 15, n.1, p.: 58-65, 2002.

Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbot B. J., Mayo J. G., Shoemaker R. H.m Boyd M. R., 1998. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 48, 589-601.

Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections: A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* v. 33, n. 26, p. 5967-5982, 2012.

Astarita G, Kendall AC, Dennis EA, Nicolaou A. Targeted lipidomic strategies for oxygenated metabolites of polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, v.1851, n.4, p.456-468, 2015.

Beccaccioli, M., Reverberi M., Scala V. Fungal lipids: biosynthesis and signalling during plant-pathogen interactio. *Frontiers in Bioscience*, v. 1, n. 24, p. 172-185, 2019.

Bélzivin C, Tomasi S, Dévéhat LF, Boustie J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*, v. 10, n. 6-7, p. 499-503, 2003.

Bhardwaj A, Gupya P, Kumar N, Mishra J, Kumar A, Rakhee R, Misra K. Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), Inhibits *Candida* Biofilms: A Metabolomic Approach. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v.19, n.8, p. 685-696, 2017.

Bhardwaj K, Sharma R, Abraham J, Sharma P. Pyrethroids: A Natural Product for Crop Protection. In: Singh J., Yadav A. (eds) *Natural Bioactive Products in Sustainable Agriculture*. Springer, Singapore. 2020.

Bhat ZA, Wani AH, Bhat MYA, Malik AR. Major bioactive triterpenoids from *Ganoderma* species and their therapeutic activity: A review. Asian journal of pharmaceutical and clinical research, v. 12, n. 4, 2019 Online - 2455-3891 Print - 0974-2441

Binder M, Hibbett DS, Larsson K-H, Larsson E, Langer E. The phylogenetic distribution of resupinate forms in the homobasidiomycetes. Systematics and Biodiversity, v. 3, p. 113e157., 2005.

Bishop KS, Kao CHJ, Xu Y, Glucina MP, Paterson RRM, Ferguson LR. From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. Phytochemistry , v.114, n.1, p.56-65, 2015.

Bopp S.K., Lettieri T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. BMC Pharmacol., v.8, n.1, p. 8, 2008. doi: 10.1186/1471-2210-8-8.

Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D, Suchard MA, Rambaut A, Drummond AJ. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. PLoS Comput. Biol. 10:e1003537, 2014.

Cabarro-Hernández M, Villalobos-Arámbula AR, Torres-Torres MG, Decock C, Guzmán-Dávalos L. The *Ganoderma weberianum-resinaceum* lineage: multilocus phylogenetic analysis and morphology confirm *G. mexicanum* and *G. parvulum* in the Neotropics. MycoKeys, v. 59, p. 95–131, 2019. doi: 10.3897/mycokeys.59.3318

Cabrera GM, Vellasco AP, Levy LM, Eberli MN. Characterisation of Fungal Lanostane-type Triterpene Acids by Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. Phytochemical Analysis, v. 18: 489– 495, 2007.

Campos-Santana M, Loguercio-Leite C. Species of *Amauroderma* (Ganodermataceae) in Santa Catarina State, Southern Brazil. Biotemas, v. 26, n. 1, p. 1-5, 2013.

Cantrell CL, Case BP, Mena EE, Kniffin TM, Duke SO, Wedge DE. Isolation and identification of antifungal fatty acids from the Basidiomycete *Gomphus floccosus*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, n. 13 , p. 5062–5068, 2008.

Cao Y, Wu SH, Dai YC. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom “Lingzhi”. *Fungal Diversity*, v. 56, n.1, p. 49–62, 2012. DOI 10.1007/s13225-012-0178-5.

Chang CJ, Lin CS, Lu CC, Martel J, Ko YF, Ojcius DM, Tseng SF, Wu TR, Chen YY, Young JD, Lai HC. *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota. *Nature Communications*, v.6, p. 7489, 2015. doi: 10.1038/ncomms8489.

Chen S, Xu J, Liu C, Zhu Y, Nelson DR, Zhou S, Li C, Wang L, Guo X, Sun Y, Luo H, Li Y, Song J, Henrissat B, Levasseur A, Qian J, Li J, Luo X, Shi L, He L, Xiang L., Xu X., Niu Y, Li Q, Han M, Yan H, Zhang J, Chen H, Lv A, Wang Z, Liu M, Schwartz DC, Sun C. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Nat Commun* v.3, p. 913, 2012.

Chen, Xiao D, Liu W, Song Y, Zou B, Li L, Li P; Cai Y, Liu D, Liao Q.; Xie Z. Intake of *Ganoderma lucidum* polysaccharides reverses the disturbed gut microbiota and metabolism in type 2 diabetic rats. *Int. J. Biol. Macromol*, v. 15, n. 155, p. 890-902, 2019.

Chen S., Li X., Yong T., Wang Z., Su J., Jiao C., Xie Y., Yang B.B.. Cytotoxic lanostane-type triterpenoids from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* and their structure–activity relationships *Oncotarget*, v. 8, n.. 6), p: 10071-10084, 2017.

Chen XQ, Zhao J, Chen LX, Wang SF, Wang Y, Li SP. Lanostane triterpenes from the mushroom *Ganoderma resinaceum* and their inhibitory activities against α -glucosidase. *Phytochemistry*, v. 2018, n 149, p.103-115, 2018. doi:10.1016/j.phytochem.2018.01.007

Cheng CR, Yang M, Wu ZY, Wang Y, Zeng F, Wu WY, Guan SH, Guo DA. Fragmentation pathways of oxygenated tetracyclic triterpenoids and their application in the qualitative analysis of *Ganoderma lucidum* by multistage tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, v. 25, p.1323-1335, 2011.

Chiaradia MC, Collins CH, Jardim ICSF. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química. Nova*, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

Chien CC, Tsai ML, Chen CC, Chang SJ, Tseng CH. Effects on tyrosinase activity by the extracts of *Ganoderma lucidum* and related mushrooms. *Mycopathologia*, v.166, n. 2, p. 117-120, 2008. doi: 10.1007/s11046-008-9128-x. Epub 2008 May 6.

Choi JY, Podust LM, Roush WR. Drug Strategies Targeting CYP51 in Neglected Tropical Diseases. *Chemistry Review*, v.114, n. 22, p. 11242-11271, 2014. doi.org/10.1021/cr5003134

Chudzik M, Korzonek-Szlacheta I, Król W. Triterpenes as potentially cytotoxic compounds. *Molecules*, v. 20, n.1, p. 1610-1625; 2015. doi:10.3390/molecules20011610.

Ciccio P, Vergara AR, Festino AR, Paludi D, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food control*, v.50, p. 930-936, 2015

Cör D., Knez Z., Hrnčič M. K., 2018. Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase effect of *Ganoderma lucidum* terpenoids and polysaccharides: A Review. *Molecules* v. 23, n. 3, p.1-21, 2018. doi: 10.3390/molecules23030649.

Costa TM, Lenzi J, Paganelli CJ, Higino da Silva Filho H, Alberton MD, Tavares LBB, Oliveira D. Liposoluble compounds from *Ganoderma lipsiense* grown on solid red rice medium with antiparasitic and antibacterial properties. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 67, n.2, p. 180-185, 2019. <https://doi.org/10.1002/bab.1851>

Costa-Rezende DH, Gugliotta AM, Góes-Neto A, Reck MA, Robledo GL, Drechsler-Santos ER. *Amauroderma calcitum* sp. nov. and notes on taxonomy and distribution of *Amauroderma* species (*Ganodermataceae*). *Phytotaxa*, v. 244, n.2, 101–124, 2016.

Costa-Rezende DH, Robledo GL, Góes-Neto A, Reck MA, Crespo E, Drechsler-Santos ER. Morphological reassessment and molecular phylogenetic analyses of *Amauroderma* s. lat. Raised new perspectives in the generic classification of the *Ganodermataceae* family. *Persoonia*, v. 39, n.1, p. 254–269, 2017.

Costa-Rezende DH, Gugliotta AM, Góes-Neto A, Reck MA, Robledo GI, Drechsler-Santos E R. *Amauroderma calcitum* sp. nov. and notes on taxonomy and distribution of *Amauroderma* species (*Ganodermataceae*) *Phytotaxa*, v. 244, n. 2, p. 101–124, 2016.

Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. *Annual Review of Microbiology*, v. 41, p. 435-464, 1987. doi: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002251

Croteau R, Purkett PT. Geranyl pyrophosphate synthase: characterization of the enzyme and evidence that this chain-length specific prenyltransferase is associated with monoterpene biosynthesis in sage (*Salvia officinalis*) *Arch Biochem Biophys*, v. 271, n. 2, p. 524-35, 1989.

Cuong TV, Chen W, Shi J. The anti-oxidation and anti-aging effects of *Ganoderma lucidum* in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology*, v. 117, p. 99-105, 2019.

Dai YC, Zhou IW, Hattori T, Cao Y, Stalpers JA, Ryvarden L, Buchanan P, Oberwinkler F, Hallenberg N, Liu PG, Wu SH. *Ganoderma lingzhi* (Polyporales, Basidiomycota): the scientific binomial for the widely cultivated medicinal fungus Lingzhi. *Mycol Progress*, v. 16, p. 1051-1055, 2017.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*, v. 9, n.8, p.772, 2012. DOI:10.1038/nmeth.2109

Dasgupta A, Acharya K. Mushrooms: an emerging resource for therapeutic terpenoids. *3 Biotech*, v. 9, n. 10, p. 369, 2019. doi:10.1007/s13205-019-1906-2.

De Vijlder T, Valkenburg D, Lemièrre F, Romijn EP, Laukens K, Cuyckens F. A tutorial in small molecule identification via electrospray ionization-mass spectrometry: The practical art of structural elucidation. *Mass Spectrometry Reviews* , v. 37, n. 5, p. 607-629, 2018. DOI: 10.1002/mas.21551.

Deboever E, Deleu M, Mongrand S, Fauconnier ML. Plant-Pathogen Interactions: underestimated roles of phyto-oxylipins. *Trends in Plant Science*, v. 25, n. 1, p. 22-34, 2019.

Decock C, Herrera-Figueroa S. Neotropical *Ganodermataceae* (Basidiomycota): *Amauroderma sprucei* and *A. dubiopansum*. *Criptogamie, Mycol*, v. 27, n.1, p. 3–10, 2006.

Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, v. 89, 271-277, 1986.

Dentinger BTM, Margaritescu S, Moncalvo JM. Rapid and reliable high throughput methods of DNA extraction for use in barcoding and molecular systematics of mushrooms. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, n. XX, p. 628–633, 2010.

Diamond LS. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J Parasitol.*, v.43, n. 4, p. 488-490, 1957.

Dias-Lopes G, Saboia-Vahia L, Margotti ET, Fernandes NS, Castro CLF, Oliveira-Junior FO, Peixoto JF, Britto C, Silva-Filho FC, Cuervo P, Jesus JB. Morphologic study of the effect of iron on pseudocyst formation in *Trichomonas vaginalis* and its interaction with human epithelial cells. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 10, p. 664-673, 2017. doi: 10.1590/0074-02760170032.

Diling C, Yinrui G, Longkai Q, Xiaocui T, Yadi L, Jiabin F, Xiangxiang Z, Miao Z, Ou S, Dongdong W, Yizhen X, Yang BB, Qingping W, 2020. Metabolic regulation of *Ganoderma lucidum* extracts in high sugar and fat diet-induced obese mice by regulating the gut-brain axis *Journal of Functional Foods*, v. 65, p.1-22, 2020.

Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied Environmental Microbiology*, v. 68, p. 2950–2958, 2002. doi: 10.1002/cppb.20024.

Donk MA. Notes on Malesian fungi. I. *Bulletin du Jardin Botanique de Buitenzorg*. v.17, n. 3, p.473-482, 1948.

Doyle JJ, Doyle JL. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

Du Z, Dong CH, Wang K, Yao YJ. (2019) Classification, Biological Characteristics and Cultivations of *Ganoderma*. In: Lin Z., Yang B. (eds) *Ganoderma and Health*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1181. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9867-4_2

Duarte M, Seixas A, Carvalho MP, Tasca T, Macedo A J. Amaurocine: Anti-Trichomonas vaginalis protein produced by the basidiomycete *Amauroderma camerarium*. *Exp Parasitol* v. 161, p. 6-11, 2016.

Dufour C, Loonis M. Regio- and stereoselective oxidation of linoleic acid bound to serum albumin: identification by ESI–mass spectrometry and NMR of the oxidation products. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 138, n. 1-2 , p. 60–68, 2005.

Durel P, Couture J, Collart P, Girot C. Flagyl (metronidazole). *British Journal of Venereaç Disease*, v. 36, n. , p.154–162, 1960.

El-mekawy S, Meselhy MR, Nakamura N, Tezuka Y, Hattori M, Kakiuchi N, Shimotohno K, Kawahata T, Otake T. Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, v. 49, n. 6, p. 1651-1657, 1998.

El-Mekawy S, Meselhy MR, Nakamura N, Tezuka Y, Hattori M, Kakiuchi N, Shimotohno K, Kawahata T, Otake T. Anti-hiv-1 and anti-hiv-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, v. 49, n. 6, p. 1651-1657, 1998.

Fathima AT, Reena M. Anticancer and Antibacterial Activity of *Ganoderma lucidum*. *Microbiol App Sci*, v. 5, 891-909, 2016.

Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods* v. 131, n.2, 165-172, 1990.

Ferrari R, Lacaze I, Le Faouder P, Bertrand-Michel J, Oger C, Galano JM, Durand T, Moularat S, Tong LCH, Boucher C, Kilani J, Petit Y, Vanparis O, Trannoy C, Brun S, Lalucque H, Malagnac F, Silar P. Cyclooxygenases and lipoxygenases are used by the fungus *Podospira anserina* to repel nematodes. *Biochemistry et Biophysca Acta*, v. 1862, n.10, p. 2174-2182, 2018.

Fischer GJ, Keller NP. Production of cross-kingdom oxylipins by pathogenic fungi: An update on their role in development and pathogenicity. *J Microbiol.* v. 54, n. 3, p. 254-264, 2016. doi:10.1007/s12275-016-5620-z

Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Review Microbiology.* v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010. doi:10.1038/nrmicro2415

Fricker SP, Buckley RG. Comparison of two colorimetric assays as cytotoxicity endpoints for an in vitro screen for antitumour agents. *Anticancer Res.* v.16, n. 6B, p. 3755–3760, 1996.

Fung SY, Tan NH, Kong BH, Lee SS, Tan YS, Sabaratnam V. Acute toxicity study and the in vitro cytotoxicity of a black Lingzhi medicinal mushroom, *Amauroderma rugosum* (Agaricomycetes), from Malaysia. *Int J Med Mushrooms,* v. 19, n. 12, p. 1093–1099, 2017. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2017024550>.

Furtado JS., 1981. Taxonomy of *Amauroderma* (Basidiomycetes, Polyporaceae). *Mem N Y Bot Gard* 34: 1–109.

Gajendiran A, Abraham J. An overview of pyrethroid insecticides. *Frontiers of Biology,* v. 13, n. 2, p. 79–90, 2018.

Ganzera M, Sturm S Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis—An update covering 2011–2016. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* v. 147, p. 211–233, 2018.

Gao T, Shi L, Zhang T, Ren A, Jiang A, Yu H, Zhao MW. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species regulates hyphal branching and ganoderic acids biosynthesis in *Ganoderma lucidum* under copper stress. *Appl Environment Microbiology,* v. 84, n. 13, p. e00438-18, 2018. doi:10.1128/AEM.00438-18. Print 2018 Jul 1.

Gao T, Shi L, Zhang T, Ren A, Jiang A, Yu H, Zhao M. Cross talk between calcium and reactive oxygen species regulates hyphal branching and ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum* under copper stress. *J Agric Food Chem*, v 67, p. 2235-2244, 2019.

Garg S, Kaul SC, Wadhwa R. Cucurbitacin B and cancer intervention: chemistry, biology and mechanisms (Review). *International Journal of Oncology*, v. 52, n.1, p. 19-37, 2018.

Gargano ML, Van Griensven LJLD., Isikhuemhen OS, Lindequist U, Venturella G, Wasser SP, Zervakis GI. Medicinal mushrooms: valuable biological resources of high exploitation potential. *Plant Biosystems*, v. 151, 548-565, 2017.

Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure ceel activation. *J Immunol Methods* v. 94, 57-63, 1986.

Giavasis I. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 26, 162–173, 2014. doi:10.1016/j.copbio.2014.01.010.

Góes-Neto A, Loguercio-Leite C, Guerrero R. DNA extraction from frozen field-collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas*, v. 18, n. 2, p.19–32, 2005.

Gross J.H. *Mass spectrometry: a textbook*. 2nd Ed. Springer & Business Media, 2011. 753 p.

Gurovic MSV, Viceconte FR, Pereyra MT, Bidegain MA, Cubitto MA. DNA damaging potential of *Ganoderma lucidum* extracts. *J Ethnopharmacol*, v. 217, 83–88, 2018.

Hapuarachchi KK, Wen TC, Deng CY, Kang JC, Hyde KD. Mycosphere Essays 1: Taxonomic Confusion in the *Ganoderma*. *Mycosphere*, v. 6, n. 5, p. 542–559, 2015. Doi 10.5943/mycosphere/6/5/4

Hapuarachchi KK, Cheng CR, Wen TC¹, Jeewon R, Kakumyan P. Mycosphere Essays 20: Therapeutic potential of *Ganoderma* species: Insights into its use as traditional medicine. *Mycosphere*, v. 8, n. 1, p. 1653–1694, 2017.

Hawksworth DL, Lücking R. 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol Spectrum* 5, FUNK-0052-2016.

He MQ, Zhao RL, Hyde KD, Begerow D, Kemler M, Yurkov A, McKenzie EHC, Raspe O, Kakishima M, Sánchez-Ramírez S, Vellinga EC, Halling R, Papp V, Zmitrovich IV, Buyck B, Ertz D, Wijayawardene NN, Cui BK, Schoutteten N, Liu XZ, Li TH, Yao YJ, Zhu XY, Liu AQ, Li GJ, Zhang MZ, Ling ZL, Cao B, Antonín V, Boekhout T, Silva BDB, Crop ED, Decock C, Dima B, Dutta AK, Fell JW, Geml J, Ghobad-Nejhad M, Giachini AJ, Gibertoni TB, Gorjo SP, Haelewaters D, He SH, Hodkinson BP, Horak E, Hoshino T, Justo A, Lim YW, Menolli Jr N, Mesic A, Moncalvo JM, Mueller GM, Nagy LG, Nilsson RH, Noordeloos M, Nuytinck J, Orihara T, Ratchadawan C, Rajchenberg M, Silva-Filho AGS, Sulzbacher MA, Zdenko Tkalcic Z, Valenzuela R, Verbeken A, Vizzini A, Wartchow F, Wei TZ, Weis M, Zhao CL, Kirk PM. Notes, outline and divergence times of Basidiomycota. *Fungal Diversity*, v. 99, p. 105-367, 2019.

Hennicke F, Cheikh-Alic Z, Liebisch T, Maciá-Vicente JG, Bode HG, Piepenbring M. Distinguishing commercially grown *Ganoderma lucidum* from *Ganoderma lingzhi* from Europe and East Asia on the basis of morphology, molecular phylogeny, and triterpenic acid profiles. *Phytochemistry* v. 127, p. 29-37, 2016.

Huang SZ, Ma QY, Kong F, Guo ZK, Cai CH, Hu LL, Zhou L, Wang Q, Dai HF, Mei WL, Zhao XY. Lanostane-type triterpenoids from the fruiting body of *Ganoderma calidophilum* *Phytochemistry*, v. 143, p.104-110, 2017.

Hsu CL, Yen GC. Ganoderic acid and lucidenic acid (Triterpenoid). *The Enzymes*, v. 36, p. 33-56, 2014. doi 10.1016/b978-0-12-802215-3.00003-3.

Hsu KD, Cheng KC. From nutraceutical to clinical trial: frontiers in *Ganoderma* development. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 102, n. 21, p. 9037–9051, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9326-5>.

Hu G, Zhai M, Niu R, Xu X, Liu Q, Jia J. Optimization of Culture Condition for Ganoderic Acid Production in *Ganoderma lucidum* Liquid Static Culture and Design of a Suitable Bioreactor. *Molecules*, v. 23, p. 1-12, 2018. doi:10.3390/molecules23102563.

Hu Y, Ahmed S, Li J, Luo B, Gao Z, Zhang Q, Li X, Hu X. Improved ganoderic acids production in *Ganoderma lucidum* by wood decaying components. *Sci Rep*, v.7, 46623, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep46623>.

Hui C, Hai-Long Y, Gao-Qiang L. Biosynthesis and fermentation control of triterpenoids from *Ganoderma lingzhi*. *Mycosystema*, v. 34, n. 1, p. 1-9, 2015.

Imazeki R. A contribution to the fungus flora of Dutch New Guinea. *Bull Govt For Exp St Tokyo*, v. 57, p.87–128, 1952.

Islam S, Rahi S, Koli HK, Jerin I, Sajib SA, Hoque KF, Reza A. Evaluation of phytochemical, antioxidant, cytotoxicity and in vitro antibacterial activity of aqueous extract of *Ganoderma lucidum* cultivated in Bangladeshi habitat. *Malaya Journal of Bioscience*, v. 5, p. 01-13, 2018.

Jackson DW, Suzuki K, Oakford L, Simecka JW, Hart ME, Romeo T. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 184, p. 290–301, 2002.

Jargalmaa S, Eimes JA, Park MS, Park YJ, Oh SY, Lim YW. Taxonomic evaluation of selected *Ganoderma* species and database sequence validation. *Peer J*, v. 27, n.5, p. e3596, 2017. doi: 10.7717/peerj.3596. eCollection 2017.

Jiang Z, Kempinski C, Chappell J. Extraction and analysis of terpenes/terpenoids. *Current Protocol Plant Biology*, v. 1, p. 345-358, 2016.

Jiao C, Chen W, Tan X, Liang H, Li J, Yun H, He C, Chen J, Ma X, Xie Y, Yang BB. *Ganoderma lucidum* spore oil induces apoptosis of breast cancer cells in vitro and in vivo by activating caspase-3 and caspase-9. *J Ethnopharmacol*, v. 247, p. 112256, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112256>

Jiao C, Xie YZ, Yang X, Li H, Li XM, Pan HH, Cai MH, Zhong HM, Yang BB. *Plos One*, v.8, p. e66504, 2013.

Kaennakam S, Siripong P, Tip-Pyang S. Kaennacowanols A–C, three new xanthenes and their cytotoxicity from the roots of *Garcinia cowa* Sutin Kaennakama, Pongpun Siripongb, Santi Tip-pyang, *Fitoterapia*, v. 102, 171–176, 2015.

Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, v. 20, n. 4, p. 1160-1166, 2019.

Kim JW, Kim HI, Kim JH, Kwon OC, Son ES, Lee CS, Park YJ. Effects of *Ganodermanondiol*, a New Melanogenesis Inhibitor from the Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum*. *International journal of molecular sciences*, v.17, n. 11, p. 1798, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17111798>.

Kirkcaldy RD, Augostini P, Asbel LE, Bernstein KT, Kerani RP, Mettenbrink CJ, Pathela P, Schwebke JR, Secor WE, Workowski KA, Davis D, Braxton J, Weinstock HS. *Trichomonas vaginalis* Antimicrobial Drug Resistance in 6 US Cities, STD Surveillance Network, 2009–2010. *Emerging Infectious Diseases*, v.18, n. 6, p. 939–943, 2012.

Kohda H, Tokumoto W, Sakamoto K, Fujii M, Hirai Y, Yamasaki K. The biologically-active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr) Karst-histamine release-inhibitory triterpenes. *Chem Pharm Bull*, v. 33, p. 1367-1373, 1985.

Koning H.P. Drug resistance in protozoan parasites. *Emerg Top Life Sci*, v. 1, n. 6, p. 627–632, 2017.

Koo MH, Chae HJ, Lee JH, Suh SS, Youn JU. Antiinflammatory lanostane triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Natural product research*. p.1-8, 2019. doi.org/10.1080/14786419.2019.1705815.

Kubota T; Asaka Y, Miura I, Mori H. Structure of Ganoderic acid A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum* (FR.) Karst. *Helvetica Chimica. Acta* , v. 65, p. 611–619, 1982.

Kuhar F, Furci G, Drechsler-Santos ER, Pfister DH. Delimitation of Funga as a valid term for the diversity of fungal communities: the Fauna, Flora & Funga proposal (FF&F). *IMA Fungus*, v. 9, p. 71–74, 2018. <https://doi.org/10.1007/BF03449441>.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.*, v.33, n. 7, p1870-1874, 2016. doi:10.1093/molbev/msw054.

Küng E, Fürnkranz U, Walochnik J. Chemotherapeutic options for the treatment of human trichomoniasis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.16, n.2, p. 116-127, 2018. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.10.016.

Kuraku S, Zmasek CM, Nishimura O, Katoh K. aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic Acids Research*, v, 41, Web Server issue. W22-W28, 2013.

Kwon OC, Park YJ, Kim HI, Kong WS, Cho JH, Lee CS. Taxonomic Position and Species Identity of the Cultivated Yeongji '*Ganoderma lucidum*' in Korea. *Mycobiology*, v.44, n.1, p. 1-6, 2006. doi: 10.5941/MYCO.2016.44.1.1

Lai G, Guo Y, Chen D, Tang X, Shuai O, Yong T, Wang D, Xiao C, Zhou G, Xie Y, Yang BB, Wu Q. Alcohol extracts from *Ganoderma lucidum* delay the progress of Alzheimer's disease by regulating DNA methylation in rodents. *Frontiers of Pharmacology*, v. 10, p. 1-17, 2019.

Lakornwong W, Kanokmedhakul K, Kanokmedhakul S, Kongsaree P, Prabpai S, Sibounnvong P, Soyong K. Triterpene lactones from cultures of *Ganoderma* sp. KM01. *Journal of Natural Products*, v. 77, n. 7, p. 1545-1553, 2014. doi:10.1021/np400846k

Leitsch D. Drug susceptibility testing in microaerophilic parasites: Cysteine strongly affects the effectivities of metronidazole and auranofin, a novel and promising antimicrobial. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 7, n. 3, p. 321-327, 2017.

Lenzi J, Costa TM, Alberton MD, Goulart JAG, Tavares LBB. Medicinal fungi: a source of antiparasitic secondary metabolites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 102, p. 5791–5810, 2018.

Levinson BS, Zhang R, Wanh Z, Fu X, DiDonato JA, Hazen LH. Quantification of Fatty Acid Oxidation Products Using On-line High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 59, p. 2-13, 2013.

Li G, Lou HX. Strategies to diversify natural products for drug discovery. *Medicinal Research Reviews*, v. 38, n.4, p. 1255–1294, 2018.

Li J, Zhang J, Chen H, Chen XQ, Lan L, Liu C. Complete mitochondrial genome of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *PLoS One*, v. 8, n. 8. p. e72038, 2013.

Li L, Mao P, Shao, K, Mao PW, Shao KD, Bai XH, Zhou XW, 2019. *Ganoderma* proteins and their potential applications in cosmetics. *Applied Microbiology and*

Biotechnology, v. 103, p. 9239–9250, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10171-z>.

Li NJ, Liu WT, Li W, Li SQ, Chen XH, Bi KS, He P. Plasma metabolic profiling of Alzheimer's disease by liquid chromatography/ mass spectrometry. *Clin Biochem* v. 43, n. 12, p. 992–997, 2010.

Li P, Liu L, Huang S, Zang Y, Xu J, Zhang Z. Anti-cancer effects of a neutral triterpene fraction from *Ganoderma lucidum* and its active constituents on SW620 human colorectal cancer cells. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, v. 20, n. 2, p. 237-244, 2020.

Li S, Kuo HCD, Yin R, Wu R, Liu X, Wang L, Hudlikar R, Peter R.M, Kong AN. Epigenetics/epigenomics of triterpenoids in cancer prevention and in health. *Biochemical Pharmacology*, v. 175, p. 113890, , 2020.

Li X, Wu Q, Xie Y, Ding Y, Du WW, Sdiri M, Yang BB. Ergosterol purified from medicinal mushroom *Amauroderma rude* inhibits cancer growth in vitro and in vivo by up-regulating multiple tumor suppressors. *Oncotarget*, v. 6, n.19, p. 17832-17836, 2015.

Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*, v. 149, n. Pt2, p. 353-362, 2003.

Li YY, Mi ZY, Tang Y, Wang G, Li DS, Tang YJ. Lanostanoids Isolated from *Ganoderma lucidum* mycelium cultured by submerged fermentation. *Helvetica Chimica Acta*, v 92, n. 8, p. 1586-1593, 2009.

Liang C, Tian D, Liu Y, Li H, Zhu J, Li M, Xin M, Xia J. Review of the molecular mechanisms of *Ganoderma lucidum* triterpenoids: Ganoderic acids A, C2, D, F, DM, X and Y. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 174, p. 130-141, 2019. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.04.039.

Liu J, Kurashiki K, Fukuta A, Kaneko S, Suimi Y, Shimizu K, Kondo R. Quantitative determination of the representative triterpenoids in the extracts of *Ganoderma lucidum* with different growth stages using high-performance liquid

chromatography for evaluation of their 5 α -reductase inhibitory properties. *Food Chem.*, v. 133, n. 1, p. 1034–1038, 2012.

Liu W, Zhang J, Han W, Liu Y, Feng J, Tang C, Feng N, Tang Q. One single standard substance for the simultaneous determination of 17 triterpenes in *Ganoderma lingzhi* and its related species using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, v. 15, n. 1068-1069, p.49-55, 2017.

Lloyd A.L., Richter B.S., Jusino M.A., Truong C., Smith M.E., Blanchette R.A., Smith J.A. Identifying the “Mushroom of Immortality”: Assessing the *Ganoderma* Species Composition in Commercial Reishi Products. *Frontiers in Microbiology*, v.9, n. 1557, p. 1-14.

Ma K, Li L, Bao L, He L, Sun C, Zhou B, Si S, Liu H. Six new 3,4-seco-27-norlanostane triterpenes from the medicinal mushroom *Ganoderma boninense* and their antiplasmodial activity and agonistic activity to LXR β . *Tetrahedron*, v. 71, n. 12, p. 1808-1814, 2015.

Martin-Arjol I, Bassas-Galia M, Bermudo E, Garcia F, Manresa A. Identification of oxylipins with antifungal activity by LC–MS/MS from the supernatant of *Pseudomonas* 42A2. *Chem Phys Lipids*, v. 163, n. 4-5, p. 341–346, 2010.

McDougald LR, Cervantes HM, Jenkins MC, Hess M, Beckstead R. Protozoal Infections: diseases of poultry, p. 1192–1254, 2019. doi:10.1002/9781119371199.ch28

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. In: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. New Orleans LA, USA.

Mohan K, Padmanaban M, Uthayakumar V, Chandrasekhar R, Muralisankar T. Cytotoxic activities of *Ganoderma lucidum* ethanol extract against HepG2 cell line. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, v.11, n. 3, p. 632-633, 2016.

Moncalvo J, Ryvarden L. 1997. A nomenclatural study of the *Ganodermataceae* Donk. Synopsis Fungorum 11. Fungiflora, Oslo.

Moormeier DE, Bayles KW. Staphylococcus aureus biofilm: a complex developmental organism. Molecular Microbiology, v. 104, n.3, p. 365–376, 2017.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, v. 65, p. 55-63, 1983.

Nagasawa T, Nakamichi H, Hama Y, Higashiyama S, Igarashi Y, Mitsutake S. Phytosphingosine is a novel activator of GPR120. J Biochem, v. 164, n.1, p. 27–32, 2018.

Nakagawa T, Zhu Q, Tamrakar S, Amen Y, Mori Y, Suhara H, Kaneko S, Kawashima H, Okuzono K, Inoue Y, Ohnuki K, Shimizu K. Changes in content of triterpenoids and polysaccharides in *Ganoderma lingzhi* at different growth stages. J Nat Med., v.72, n. 3, p. 734–44, 2018.

Naranjo-Ortiz MA and Gabaldón T. Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions. Biological reviews, v. 94, p. 1443-1476, 2019.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. LACTARORUFIN B, CID=182703, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lactarorufin-B> (accessed on Feb. 10, 2020).

Niu Q, Zhao C, Jing Z. An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. J. Immunol. Methods, v. 251, n. 1-2, p. 11–19, 2001. doi: 10.1016/S0022-1759(01)00314-3.

Oluba OM, Adebisi KE, Eidangbe GO, Odotuga AA, Onyeneke EC. Modulatory effect of crude aqueous extract of Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes), on hematological and antioxidant indices in Plasmodium berghei–infected mice. International Journal of Medicinal Mushrooms, v.12, n.5, p. 499-506 , 2014.

Oluba OM, Olusola AO, Eidangbe GO, Babatola LJ, Onyeneke EC. Modulation of lipoprotein cholesterol levels in Plasmodium berghei Malarial infection by crude aqueous extract of *Ganoderma lucidum*. Cholesterol, v. 2012, p.1-6, ID 536396. doi:10.1155/2012/536396

Oluba OM *Ganoderma* terpenoid extract exhibited anti-plasmodial activity by a mechanism involving reduction in erythrocyte and hepatic lipids in Plasmodium berghei infected mice. Lipids Health Dis, v. 18, n. 12, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0951-x>.

Osuji C., Abubakar S., Mowobi G. A review of pharmacological significance and need for proper authentication of *Ganoderma lucidum*. J Sci Tech Adv., v. 1, n. 1, p. 1-7, 2016.

Oppatova A, Horak J, Vodenkova S, Kostovcikova K, Cumova A, Macinga P, Galanova N, Rejhova A, Vodickova L, Kozics K, Turnovcova K, Hucl T, Sliva D, Vodicka P. *Ganoderma lucidum* induces oxidative DNA damage and enhances the effect of 5-Fluorouracil in colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 845, p.1-10, 2019.

Otto M. Staphylococcal biofilms. Curr. Top. Microbiol. Immunol.,v. 322, p.207-228, 2008. doi 10.1007/978-3-540-75418-3_10.

Papp V, Dima B., Wasser S.P. What Is *Ganoderma lucidum* in the Molecular Era? International Journal of Medicinal Mushrooms, v. 19, n. 7, p. 575–593, 2017.

Park YJ, Kwon OC, Son ES, Yoon DE, Han W, Nam JY, Yoo YB, Lee SC. Genetic diversity analysis of *Ganoderma* species and development of a specific marker for identification of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *African Journal of Microbiology Research*, v. 6, n. 25, p. 5417-5425, 2012.

Pattengale ND, Alipour M, Bininda-Emonds ORP, Moret BME, Stamatakis A. How many bootstrap replicates are necessary? *Journal of Computational Biology*, v. 17, n. 3, 2010.

Peer M, Stegmann M, Mueller MJ, Waller F. *Pseudomonas syringae* infection triggers de novo synthesis of phytosphingosine from sphinganine in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, v.584, n. 18, p. 4053-4046, 2010.

Perfileva AI, Tsivileva OM, Koftin OV, Aniskov AA, Ibragimova DN.. Selenium-containing nanobiocomposites of fungal origin reduce the viability and biofilm formation of the bacterial phytopathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*. *Nanotechnologies in Russia*, v.13, p. 268-276, 2018.

Pohl CH, Kock JLF. Oxidized fatty acids as inter-kingdom signaling molecules. *Molecules*, v. 19, n.1, p. 1273-1285, 2014.

.

Poole DN, McClelland RS. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sexually Transmitted Infections*, v. 89 n.6, p. 418-422, 2013.

Pu CJ, Peng YL, Li ZH, He J, Huang R, Feng T, Liu JK. Two highly oxygenated ergosterols from cultures of the basidiomycete *Conocybe siliginea* *Natural Product Research*, v. 33, n. 21, p. 3037–3043, 2019.

Qi ZH., Meng J, Wang ZL, Sun HZ, Gong Y. Antitumor effect of *Ganoderma lipsiense* extract on triple-negative breast cancer model mice and mechanism study. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, v. 36, n. 3, p. 366–369, 2016.

Qin H., Xu JW., Xiao JH., Tang YJ., Xiao H., Zhong JJ. (2015) Cell Factories of Higher Fungi for Useful Metabolite Production. In: Ye Q., Bao J., Zhong

JJ. (eds) Bioreactor Engineering Research and Industrial Applications I. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol 155. Springer, Berlin, Heidelberg.

Ludovici M, Ialongo C, Reverberi M, Beccaccioli M, Scarpari M, Scala V. Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive LC-MS/MS analysis of *Fusarium verticillioides* and maize kernels. Food Additives and Contaminants, Part A, v.31, n. 12, p. 2026-2033, 2014.

Rathod RH, Chaudhari SR, Patil AS, Shirkhedkar AA, 2019. Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in practice: analysis of drugs and pharmaceutical formulations. Future Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 5, n.6, p. 1-26. <https://doi.org/10.1186/s43094-019-0007-8>.

Ren A, Li MJ, Shi L, Mu DS, Jiang AL, Han Q, Zhao MW, Yun SH. Profiling and Quantifying Differential Gene Transcription Provide Insights into Ganoderic Acid Biosynthesis in *Ganoderma lucidum* in Response to Methyl Jasmonate. PLoS One, v. 8, n. 6, p. e65027, 2013.

Ren X, Wang J, Huang L, Cheng K, Zhang M, Yang H. Comparative Studies on Bioactive Compounds, Ganoderic Acid Biosynthesis, and Antioxidant Activity of Pileus and Stipes of Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes) Fruiting Body at Different Growth Stages. International Journal of Medicinal Mushrooms, v. 22, n. 2, p. 133 – 144, 2020.

Ren Z, Wang C, Wang T, Ding H, Zhou M, Yang N, Liu YY, Chan P. *Ganoderma lucidum* extract ameliorates MPTP-induced parkinsonism and protects dopaminergic neurons from oxidative stress via regulating mitochondrial function, autophagy, and apoptosis. Acta Pharmacol Sin, v. 40, p. 441–450, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0077-8>

Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *Journal of Infectious Diseases*, v. 197, p. 1079–1081, 2008. doi:10.1086/533452

Richards TA, Leonard G, Wideman JG. 2017. What defines the “kingdom” fungi? *Microbiol Spectrum*, v. 5, n. 3, FUNK-0044-2017. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0044-2017.

Ronquist F, Teslenko M, Van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Suchard MA, Huelsenbeck JP. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst Biol*, v. 61, p. 539–542, 2012.

Ryvarden L. 1991. Genera of polypores, nomenclature and taxonomy. Oslo: Fungiflora.

Ryvarden L. Studies in neotropical polypores 2: A preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. *Mycologia*, v. 92, p. 180-191, 2000.

Ryvarden L., 2004. Neotropical polypores-Part 1. ed Fungiflora A/S, Oslo.

Saltarelli R, Palma F, Gioacchini AM, Calcabrini C, Mancini U, Bellis R, Stocchi V, Potenza L. Phytochemical composition, antioxidant and antiproliferative activities and effects on nuclear DNA of ethanolic extract from an Italian mycelial isolate of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 232, n. 1, p. 464-473, 2019.

Schmidt-Dannert C. Biosynthesis of terpenoid natural products in Fungi. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, v.148, p. 19-61, 2015. doi:10.1007/10_2014_283

Biotechnology of Isoprenoids. In: Schrader J., Bohlmann J. (eds) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol 148. Springer.

Scopel M., Santos O., Frasson A.P., Abraham W.R., Tasca T., Henriques A. T., Macedo A.J. Anti-Trichomonas vaginalis activity of marine-associated fungi from the SouthBrazilian Coast. *Experimental Parasitology*, v. 133, n.2, p. 211–216, 2013.

Sedky NK, El Gammal ZH, Wahba AE, Mosad E, Waly ZY, El-Fallal AA, Arafa RK, El-Badri N. The molecular basis of cytotoxicity of α -spinasterol from *Ganoderma resinaceum*: Induction of apoptosis and overexpression of p53 in breast and ovarian cancer cell lines. *J Cell Biochem*, v. 119, n. 5, p. 3892–3902, 2018. <https://doi.org/10.1002/jcb.26515>

Seki H, Ohyama K, Sawai S, Mizutani M, Ohnishi T, Sudo H, Akashi T, Aoki T, Saito K, Muranaka T. Licorice beta-amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. *Proceedings of the National Academy of Science of the U. S. A.*, v. 105, n. 37, p. 14204–14209, 2008.

Shang CH, Shi L, Ren A, Qin L, Zhao MW. Molecular Cloning, Characterization, and Differential Expression of a Lanosterol Synthase Gene from *Ganoderma lucidum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 74, n. 5, p. 974–978, 2010.

Shi L, Ren A, Mu D, Zhao M. Current progress in the study on biosynthesis and regulation of ganoderic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 88, p.1243–1251, 2010.

Shnyreva AV, Shnyreva AA, Espinoza C, Padrón JM, Trigos A. Antiproliferative activity and cytotoxicity of some medicinal wood-destroying mushrooms from Russia. *Int J Med Mushrooms*, v. 20, n.1, p. 1–11, 2017.

Silvestro D, Michalak I. RaxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organ Diver Evol*, v. 12, p. 335–337, 2012.

Smith BJ, Sivasithamparam K. Internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence of five species of *Ganoderma* from Australia. *Mycological Research*, v. 104, p. 943-951, 2000.

Soderlund DM, in *Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and uses* (eds Casida, J.E. & Quistad G.B.) 297-233 (Oxford University Press, New York, 1995).

Sohretoglu D, Huang S. *Ganoderma lucidum* polysaccharides as an anti-cancer agent. *Anti-Cancer Agents in Med Chem*, v. 18, p. 667-674, 2018.

Soliman SSM, Tsao R, Raizada MN. Chemical inhibitors suggest endophytic fungal Paclitaxel is derived from both mevalonate and non-mevalonate-like pathways. *Journal of Natural Products*, v.74, n. 12, p. 2497–2504, 2011.

Srey S, Jahid IK, Ha S. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control*, v. 31, p. 572–585, 2013.

Stamatakis A RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, v. 30, n. 9, p. 1312–1313, 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.

Su HG, Peng XR, Shi QQ, Huang YJ, Ming LZ, Qiu MH. Lanostane triterpenoids with anti-inflammatory activities from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, v. 173, p. 112256, 2020. Doi:10.1016/j.phytochem.2019.112256

Sudheer S, Taha Z, Manickam S, Ali A, Cheng PG. Development of antler-type fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* and determination of its biochemical properties. *Fungal Biol*, v. 122, n.5, p. 293-301, 2018.

Sun Y, Zhang M, Fang Z. Efficient physical extraction of active constituents from edible fungi and their potential bioactivities: A review. *Trends in food science and technology*, 2019. doi:10.1016/j.tifs.2019.02.026.

Suprasert P, Apichartpiyakul C, Sakonwasun C, Nitisuwanraksa P, Phuackchantuck R. Clinical characteristics of gynecologic cancer patients who respond to salvage treatment with Lingzhi. *Asian Pac J Cancer Prev*, v. 15, n. 10, p. 4193–4196, 2014.

Suresh MK, Biswas R, Biswas L. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 309, n.1, p. 1-12, 2019.

Swofford DL. 2002. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods), Version 4.0 Beta 10. Sinauer Associates, Sunderland.

Tang ZY, Xia ZX, Qiao SP, Jiang C, Shen G, Cai MX, Tan XY. Four new cytotoxic xanthenes from *Garcinia nuijiangensis*. *Fitoterapia*, v. 102, p. 109-114, 2015.

Taofiq O, Gonzalez-Paramas AM, Barreiro MF, Ferreira I. Mushrooms extracts and compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics—A review. *Industrial Crops and Products*, v. 90, p. 38-48, 2016. 10.1016/j.indcrop.2016.06.012.

Taofiq O, Heleno AS, Calhelha RC, Alves MJ, Barros L, Gonzalez-Paramas AM, Barreiro MF, Ferreira ICFR. The potential of *Ganoderma lucidum* extracts as bioactive ingredients in topical formulations, beyond its nutritional benefits. *Food and Chemical Toxicology*, v. 108, p.139-147, 2017.

Tham LX, Hung NLQ, Duong PN, Van Hop D, Detinger BT, Moncalvo JM. *Tomophagus cattienensis* sp. nov., a new *Ganodermataceae* species from Vietnam: Evidence from morphology and ITS DNA barcodes. *Mycological Progress*, v. 11, p. 775–780, 2012.

Torres-Torres MG, Guzmán-Dávalos L. The morphology of *Ganoderma* species with a laccate surface. *Mycotaxon*, v. 119, n.1, p. 201-216, 2012.

Torres-Torres MG, Guzmán-Dávalos L, Gugliotta AM. *Ganoderma* in Brazil: known species and new records. *Mycotaxon*, v. 121, p. 93–132, 2012.

Torres-Torres MG, Ryvarde L, Guzmán-Dávalos L. *Ganoderma* subgenus *Ganoderma* in Mexico. *Revista Mexicana de Micología*, v. 41, p. 27-45, 2015.

Torruella G, de Mendoza A, Grau-Bové X, Antó M, Chaplin MA, del Campo J, Eme L, Pérez-Cordón G, Whipps CM, Nichols KM, Paley R, Roger AJ, Sitjà-Bobadilla A, Donachie S, Ruiz-Trillo I. Phylogenomics Reveals Convergent Evolution of Lifestyles in Close Relatives of Animals and Fungi. *Current Biology*, v. 25, n. 18, p. 2404-2410, 2015. doi: 10.1016/j.cub.2015.07.053. Epub 2015 Sep 10.

Trapp AM, Kai M, Mithöfer A, Rodrigues-Filho E. Antibiotic oxylipins from *Alternanthera brasiliana* and its endophytic bacteria. *Phytochemistry*, v. 110, p. 72–82, 2015.

Tsitsigiannis DI, Keller NP. Oxylipins as developmental and host–fungal communication signals. *Trends in Microbiol*, v.15, p. 109-118, 2007.

Van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkuppele GJ, Broekhoven MG, Langenhuijsen MM. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods*, v. 14, p.311-320, 1994.

Vázquez-Sánchez D, Habimana O, Holck A. Impact of food-related environmental factors on the adherence and biofilm formation of natural *Staphylococcus aureus* isolates. *Current Microbiology*, v. 66, p. 110–121, 2013.

Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several species of *Cryptococcus*. *Journal of Bacteriology*, v. 172, n. 8, p. 4238–4246, 1990.

Wang C, Liu X, Lian C, Ke J, Lui J. Triterpenes and aromatic meroterpenoids with antioxidant activity and neuroprotective effects from *Ganoderma lucidum*. *Molecules*, v. 24, n. 23, p. 2-11, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24234353>

Wang Q, Hillwiog ML, Okada K, Yamazaki K, Wu K, Swaminathan S, Yamane H, Peters RJ. Characterization of CYP76M5-8 indicates metabolic plasticity within a plant biosynthetic gene cluster. *J. Biol. Chem*, v. 287, p. 6159–6168, 2012.

Wang Q, Wang YG, Ma QY, Huang SZ, Kong FD, Zhou LM, Dai HF, Zhao YX. Chemical constituents from the fruiting bodies of *Amauroderma subresinosum*. *J Asian Nat Prod Res*, v. 18, p. 1030-1035, 2016.

Wang WF, Xiao H, Zhong JJ. Biosynthesis of a ganoderic acid in *Saccharomyces cerevisiae* by expressing a cytochrome P450 gene from *Ganoderma lucidum*. *Biotechnology and Bioengineering*, v.115, n. 7, p. 1842–1854, 2018.

Wang X, Zang A, Yan G, Han Y, Sun H. UHPLC-MS for the analytical characterization of traditional Chinese medicines. *TrAc Trends in Analytical Chemistry*, v. 63, p. 180-187, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.05.013>.
Welti S, Courtecuisse R. The *Ganodermataceae* in the French West Indies (Guadeloupe and Martinique). *Fungal Diversity*, v. 43, n. 1, p.103–126, 2010.

Weng Y, Xiang L, Matsuura A, Zhang Y, Huang Q, Qi J. *Ganodermasides A and B*, two novel anti-aging ergosterols from spores of a medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* on yeast via UTH1 gen. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, n.3, p. 999-1002, 2010.

Wong JH, Ng TB, Chan HHL, Liu Q, Man GCW, Zhang CZ, Guan S, Ng CCW, Fang EF, Wang H, Liu F., Ye X, Rolka K, Naude R, Zhao S, Sha O, Li C, Xia L. Mushroom extracts and compounds with suppressive action on breast cancer: evidence from studies using cultured cancer cells, tumor-bearing animals, and

clinical trials. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, p. 4675-4703, 2020. doi <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10476-4>.

Xia Q, Zhang H, Sun X, Zhao H, Wu L, Zhu D, Yang G, Shao Y, Zhang X, Mao X, Zhang L, She G. A comprehensive review of the structure elucidation and biological activity of triterpenoids from *Ganoderma* spp. *Molecules*, v. 19, n. 11, p. 17478–17535, 2014. <https://doi.org/10.3390/molecules191117478>

Xu H, Kong YY, Chen X, Guo MY, Bai XH, Lu YJ, Li W, Zhou XW. Recombinant FIP-gat, a fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma atrum*, induces growth inhibition and cell death in breast cancer cells. *J Agric Food Chem*, v. 64, n. 13, p. 2690–2698, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00539>

Xu JW, Zhao W, Zhong JJ. Biotechnological production and application of ganoderic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 87, p.457–466, 2010.

Zhang L, Khoo CS, Koyyalamudi SR, Pedro N, Reddy N. Antioxidant, Anti-inflammatory and Anticancer Activities of Ethanol Soluble Organics from Water Extracts of Selected Medicinal Herbs and Their Relation with Flavonoid and Phenolic Contents. *Pharmacologia*, v. 8, n. 2, p. 59-72, 2017. DOI: 10.5567/pharmacologia.2017.59.72.

Zhang SS, Ma QY, Zou XS, Dai HF, Huang SZ, Luo Y, Yu ZF, Luo HR., Zhao Y X. Chemical constituents from the fungus *Amauroderma amoiensis* and their in vitro acetylcholinesterase inhibitory activities. *Planta Med*, v. 79, n. 1, 87–91, 2013.

Zhang H, Jiang H, Zhang X, Tong S, Yan J. Development of global chemical profiling for quality assessment of *Ganoderma* species by ChemPattern Software. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. v. 2018, p. 1-12, 2018.

Zhao H, Zhang Q, Zhao L, Huang X, Wang J, Kang X. Spore powder of *Ganoderma lucidum* improves cancer-related fatigue in breast cancer patients undergoing endocrine therapy: A pilot clinical trial. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2012, p. 1-8, 2012. doi:10.1155/2012/809614.

Zhao RL, Li GJ, Sanchez-Ramirez S, Stata M, Yang ZL, Wu, G, Dai YC, He SC, Cui BK, Zhou JL, Wu F, He MQ, Moncalvo JM, Hyde K. A six-gene phylogenetic overview of Basidiomycota and allied phyla with estimated divergence times of higher taxa and a phyloproteomics perspective. Fungal Diversity, v. 84, p. 43-74, 2017. doi 10.1007/s13225-017-0381-5.

Zhao T, Chen S, Li H, Xu Y. Determination of Linoleic Acid Oxylipins in Chinese Baijiu Using Ultra-Performance Liquid Chromatography with Quadruple-Time-of-Flight Mass Spectrometry (UPLC-QTOF-MS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Analytical Letters, v. 52, n.14, p. 2165-2179, 2019.

Zhao J, Zhou L, Wang J, Shan T, Zhong L, Liu X, Gao X. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. In Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology; Mendez-Vilas, A., Ed.; Formatex Research Center: Badajoz, Spain, 2012; Volume 1, pp. 567–576.

Zhou LW, Cao Y, Wu SH, Vlasák J, Li DW, Li M.J., Dai Y.C. Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (*Ganodermataceae*, Polyporales) inferred from morphology and multilocus phylogeny. Phytochemistry, v. 114, p. 7-15, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.09.023>.

Zhu Q, Amen YM, Ohnuki K, Shimizu K. Anti-influenza effects of *Ganoderma lingzhi*: an animal study. J Funct Foods, v. 34, p. 224–228, 2017.