

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia



Dissertação

**Atividade *in vitro* de extratos de macrofungos sobre o oomiceto patógeno
*Pythium insidiosum***

Luíze Garcia de Melo

Pelotas, agosto de 2022

Luíze Garcia de Melo

**Atividade *in vitro* de extratos de macrofungos sobre o oomiceto patógeno
*Pythium insidiosum***

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia e Parasitologia da
Universidade Federal de Pelotas.

Orientador: Prof. Dr^a Daniela Isabel Brayer Pereira

Coorientador(a): Prof. Dr^a Lisiane Volcão

Pelotas, 2022

Luíze Garcia de Melo

Atividade *in vitro* de extratos de macrofungos sobre o oomiceto patógeno *Pythium insidiosum*

Dissertação, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 20/06/2022

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Daniela Isabel Brayer Pereira (Orientador)
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr.^a Júlia de Souza Silveira
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof.^a Dr.^a Sônia de Ávila Botton
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Dr.^a Cristina Gomes Zambrano
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Eduardo Bernardi
Doutor em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, pela Universidade Federal de Pelotas.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer principalmente à universidade pública, a Ufpel, ao Ppgmpar e bolsa de fomento da Capes por ter permitido minha permanência na ciência. Também a todos professores e servidores, que mesmo em um momento de Pandemia contribuíram para que este trabalho tenha sido feito. Agradecimento à minha orientadora Daniela Pereira, que sempre esteve presente e contribuiu de várias formas no planejamento, execução e conclusão deste estudo, foi essencial para tudo acontecer, muito obrigada por tudo e todos os ensinamentos de microbiologia e micologia, que irei levar para sempre na vida acadêmica e profissional. Também agradeço à Lisiane Volcão que me coorientou e ao longo desses anos desde a graduação tem me acompanhado e me ensinado muitas coisas sobre o mundo dos fungos e extratos! Foi essencial também neste trabalho e por ter disponibilizado gentilmente extratos para eu testar! Assim como o Eduardo, que também me acompanha desde a graduação e foi essencial para contribuir no meu conhecimento sobre os cogumelos. Aos colegas de laboratório Caroline Braga (obrigada por todos os ensinamentos no lab e incentivo) Carolina Bermann, Augusto Brod, que estiveram presentes, contribuíram e foram essenciais para o desenvolvimento deste estudo. As professoras Dr^a Júlia de Souza Silveira, Dr^a Cristina Gomes Zambrano, Prof. Dr. Eduardo Bernardi e Prof.^a Dr.^aSônia de Ávila Botton, por aceitarem participar da minha Banca de defesa e dedicarem seu tempo para me ajudar nas considerações finais importantes na minha pesquisa.

À minha família que amo muito e foi essencial pra que este trabalho tenha sido feito, me dando várias caronas ao campo e também quando não tinha ônibus para ir ao laboratório, sempre me apoiou em todas as etapas e execução deste trabalho! À Diuli, minha companheira de vida e Bióloga que admiro e amo muito, que ao longo desses anos e também neste estudo sempre esteve me apoiando, obrigada por toda ajuda sempre! Por fim, e não menos importante, agradeço à todas amigas e presentes da biologia que ganhei para a vida mesmo distante (fisicamente). Enfim, agradeço a todos e também a quem me escapou de mencionar aqui!

Resumo

DE MELO, Luíze Garcia. **Atividade *in vitro* de extratos de macrofungos sobre o oomiceto patógeno *Pythium insidiosum***. 2022, 68f, Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Parasitologia) Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

P. insidiosum é um agente etiológico da pitiose, enfermidade que atinge principalmente o tecido subcutâneo de mamíferos que habitam regiões tropicais, subtropicais e temperadas. O desenvolvimento de *Pythium sp.* depende de fatores abióticos no ecossistema, como áreas alagadas e temperatura. Podem ser sapróbios ou parasitas de animais e plantas. No Brasil, país endêmico da doença, os equinos são os mais atingidos e os tratamentos para pitiose, mesmo com o avanço das pesquisas, ainda não estão totalmente estabelecidos. Esse estudo avaliou o potencial *in vitro* anti-*P. insidiosum* de extratos aquosos, hidro-alcoólicos e etanólicos de macrofungos silvestres do sul do Brasil. Extratos aquosos, etanólicos e hidro-alcoólicos foram preparados a partir das espécies *Auricularia auricula*, *Amanita gemmata*, *Amanita muscaria*, *Gymnopilus junonius*, *Lactarius deliciosus*, *Laccaria laccata*, *Psilocybe cubensis*, *Russula xerampelina*. Os testes de suscetibilidade *in vitro* foram realizados frente a 18 e 11 isolados de *P. insidiosum* empregando a técnica de microdiluição e seguindo o protocolo M38-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI). Os extratos de *R. xerampelina* hidro-alcoólico e etanólico 95% evidenciaram atividade anti-*P. insidiosum* nas concentrações inibitórias mínimas que variaram de 1,87- 7,50 mg/ml. E demais espécies de cogumelos testados não apresentaram efeitos inibitórios no crescimento *in vitro* de *P. insidiosum*. Este é o primeiro estudo a avaliar a atividade antimicrobiana de cogumelos sobre oomicetos, evidenciando o potencial antimicrobiano do macrofungo *R. xerampelina* sobre o patógeno *P. insidiosum*. Sugere-se que a busca por outras espécies de cogumelos com ação anti-*P. insidiosum* deve ser ampliada.

Palavras-chave: antimicrobiano, pitiose, basidiomicetos, anti-oomiceto, compostos bioativos.

Abstract

DE MELO, Luíze Garcia. ***In vitro* activity of macrofungal extracts on the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum***. 2022, 68f, Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Parasitologia) Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

P. insidiosum is an etiologic agent of pythiosis, a disease that mainly affects the subcutaneous tissue of mammals that inhabit tropical, subtropical and temperate regions. The development of *Pythium* sp. depends on abiotic factors in the ecosystem, such as wetlands and temperature. They can be saprobes or parasites of animals and plants. In Brazil, an endemic country for the disease, horses are the most affected and treatments for pythiosis, even with the advancement of research, are still not fully established. This study evaluated the *in vitro* anti-*P. insidiosum* from aqueous, hydroalcoholic and ethanolic extracts of wild macrofungi from southern Brazil. Aqueous, ethanolic and hydroalcoholic extracts were prepared from the species *Auricularia auricula*, *Amanita gemmata*, *Amanita muscaria*, *Gymnopilus junonius*, *Lactarius deliciosus*, *Laccaria laccata*, *Psilocybe cubensis*, *Russula xerampelina*. *In vitro* susceptibility tests were performed against 18 and 11 *P. insidiosum* isolates using the microdilution technique and following the M38-A2 protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI). The hydroalcoholic and ethanolic 95% extracts of *R. xerampelina* showed anti-*P. insidiosum* at minimum inhibitory concentrations that ranged from 1.87-7.50 mg/ml. And other mushroom species tested showed no inhibitory effects on the *in vitro* growth of *P. insidiosum*. This is the first study to evaluate the antimicrobial activity of mushrooms against oomycetes, showing the antimicrobial potential of the macrofungus *R. xerampelina* against the pathogen *P. insidiosum*. It is suggested that the search for other mushroom species with anti-*P. insidiosum* action should be expanded.

Palavras-chave: antimicrobial, pythiosis, basidiomycetes, anti-oomycete, bioactive compounds.

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo Biológico de <i>Pythium insidiosum</i> . 1- zoósporos (forma infectante) fixam-se em plantas aquáticas; 2- crescimento micelial na planta hospedeira; 3- reprodução assexuada na planta hospedeira; 4- formação de zoosporângios e liberação de zoósporos; 5- zoósporos livres no ambiente aquático; 6- Infecção por zoósporos de <i>P. insidiosum</i> , determinando a pitiose em mamíferos; 7- <i>kunkers</i> (massa necrótica contendo hifas de <i>P. insidiosum</i>) são desprendidos das lesões nos equinos; 8- <i>Kunkers</i> na água (refazem o ciclo no ambiente) (BRAGA et al., 2022).....	17
Figura 2. <i>Auricularia auricula</i> : Características macro morfológicas de <i>A. auricula</i> em diferentes fases de maturação: a. Basidiocarpos de coloração marrom-avermelhados e maturação jovem; b. Basidiocarpo de coloração marrom-amarelado, maturação mais avançada. Fonte: Arquivo pessoal.....	27
Figura 3. <i>Lactarius deliciosus</i> : Características macro morfológicas: coloração alaranjada, himênio laminar e lamelas adnatas anexadas ao estipe. Fonte: Arquivo pessoal.....	28
Figura 4. Características macro morfológicas de <i>Laccaria laccata</i> : Cogumelo marrom alaranjado, píleo convexo a aplanado e liso com depressão central, lamelas adnatas distantes entre si, apresentando altura de 10 cm e diâmetro de 4 cm, o estipe é cilíndrico, sem anel e levemente estriado. Fonte: Arquivo pessoal.....	29
Figura 5. Características macro morfológicas de <i>Gymnopilus junonius</i> em diferentes fases de maturação: a. Estipe cilíndrico e fibroso com estrias e anel parcialmente rompido, apresentando píleo de formato convexo; b. Píleo com véu/anel parcialmente rompido e himênio apresentando lamelas; c. Superfície do Píleo com fibras de cor ferrugem a amarelo - cogumelos crescendo em grupos na base de árvores de eucalipto e pinus; d. Cogumelo crescendo em tronco de eucalipto - himênio com lamelas adnatas e píleo aberto de formato aplanado. Fonte: arquivo pessoal.....	30
Figura 6. Características macro morfológicas de <i>Psilocybe cubensis</i> : a. Píleo convexo de cor amarelo claro e superfície lisa com véu praticamente rompido. b. Esporada de <i>P. cubensis</i> de cor castanho violáceo. Fonte: arquivo pessoal.....	32

- Figura 7. Características macro morfológicas de *Amanita muscaria*: basidiocarpo chamativo com a superfície do píleo vermelho brilhante com escamas brancas. Píleo convexo a plano e depresso no centro, himênio com lamelas adnatas e brancas, estipe branca com anel. Fonte: arquivo pessoal.....34
- Figura 8. Características macro morfológicas de *Amanita gemmata*: píleo aplanado de cor amarelo creme com escamas brancas, apresentando lamelas. Fonte: arquivo pessoal.....35
- Figura 9. Fotos da espécie *Russula xerampelina* no ambiente de coleta (vegetação de *Pinus* sp.). Fonte: arquivo pessoal.....36

Sumário

1 Introdução	11
2 Objetivos.....	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 Revisão de Literatura	15
3.1 Oomicetos.....	15
3.2 Ciclo biológico de <i>P. insidiosum</i> e nicho ambiental	16
3.3 Pitiose	18
3.3 Suscetibilidade <i>in vitro</i> de <i>P. insidiosum</i> frente a compostos antimicrobianos.....	20
3.3.1 Fármacos antifúngicos e antibacterianos	20
3.3.2. Óleos essenciais e extratos de plantas medicinais e outros compostos.....	21
3.3.3 Métodos terapêuticos aplicados à pitiose clínica.....	23
Aplicações biológicas e atividade antimicrobiana de Basidiomicetos	24
<i>Auricularia auricula</i> (L.) Underw (1902).....	25
<i>Lactarius deliciosus f. deliciosus</i> (L.) Gray (1821)	27
<i>Laccaria laccata</i> (Scop.) Cooke (1884)	28
<i>Gymnopilus junonius</i> (Fr.) P.D. Orton (1960)	30
<i>Psilocybe cubensis</i> (Earle) Singer, 1948.....	31
<i>Amanita muscaria</i> (L.) Lam. (1783) e <i>Amanita gemmata</i> (Fr.) Bertill (1866).....	33
<i>Russula xerampelina</i> (Schaeff.) Fr. (1838).....	36
4.Manuscrito	38
4.1 Resumo	39
Referências Bibliográficas.....	52

1 Introdução

Os cogumelos são fungos que desempenham importantes funções na natureza, como a decomposição e ciclagem de nutrientes (ANTUNES; KOYAMA, 2017). Durante séculos as civilizações utilizam macrofungos para fins medicinais devido às suas propriedades biológicas ativas (SCHULTES, 1998, RAHI & MALIK, 2016). De fato, muitos compostos provenientes de cogumelos já são conhecidos, como terpenóides, flavonóides, taninos, alcalóides e polissacarídeos, que podem ser importantes no desenvolvimento de novas categorias de substâncias bioativas (GEBREYOHANNES et al., 2019a; PETRE, 2015; VOLCÃO et al., 2021a, 2021b).

Por isso, a busca por compostos naturais que possuem funções farmacológicas se dá principalmente pela multirresistência de micro-organismos patógenos aos agentes antimicrobianos e ineficácia de medicamentos, que atualmente é um dos desafios mais preocupantes para os serviços de saúde, pois dificultam cada vez o combate às doenças de difícil tratamento (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Nesse sentido, o oomiceto *Pythium insidiosum* se manifesta como um preocupante patógeno de mamíferos ocasionando a pitiose, sendo caracterizado pela produção de zoósporos biflagelados na forma infectante (reprodução assexuada) (SANTURIO, 2004; GAASTRA et al., 2010). Este organismo pertence ao reino Straminipila, classe Oomycetes, Ordem Pythiales, família Pythiaceae e gênero *Pythium* (ALEXOPOULOS, 1996; GAASTRA et al., 2010).

Pythium sp. contém mais de 300 espécies com distribuição mundial, incluindo a América, Ásia, África e Austrália (BHALERAO et al., 2020). São micro-organismos sapróbios que se desenvolvem no solo, areia, fontes de água, locais alagados e na matéria orgânica em decomposição ou podem viver como parasitas de animais e plantas (BHALERAO et al., 2020).

A pitiose é uma enfermidade piogranulomatosa e as lesões clínicas manifestam-se predominantemente no tecido subcutâneo de mamíferos que habitam regiões tropicais, subtropicais e temperadas (LEAL et al., 2001; GROOTERS, 2003;

SANTURIO et al., 2006; GAASTRA et al., 2010). Esta enfermidade tem sido objeto de estudo em todos os mamíferos suscetíveis que possivelmente entram em contato com o agente em ambientes alagados (ZARO et al., 2018).

Já foram relatadas afecções em animais domésticos, como equinos (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012), caninos (FERNANDES et al., 2012; SILVA et al., 2020), felinos (DOWST et al., 2019), bovinos (GRECCO et al., 2009), caprinos (DO CARMO et al., 2015), animais silvestres (GROOTERS, 2003) e humanos (PERMPALUNG; WORASILCHAI; CHINDAMPORN, 2020). Os mamíferos afetados apresentam formas cutâneas e subcutâneas em equinos, caninos, felinos, bovinos, ovinos e caprinos, já na forma gastrointestinal em caninos e felinos (GAASTRA et al., 2010; DO CARMO et al., 2015), e ainda na forma ocular, subcutânea e sistêmica em humanos (PERMPALUNG, WORASILCHAI & CHINDAMPORN, 2019).

No entanto, os equinos são os mais atingidos pela doença, principalmente no Brasil (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; ROSSATO et al., 2018; ZARO et al., 2018). A pitiose equina tem potencial para circular em grandes áreas no bioma Pampa no Brasil (MACHADO; WEIBLEN; ESCOBAR, 2018), região leste do Uruguai (ROMERO et al., 2019), e também no pantanal e nordeste do Brasil (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; DOS SANTOS et al., 2014; SOUTO et al., 2021).

Os tratamentos disponíveis para a pitiose incluem a cirurgia, imunoterapia, agentes antimicrobianos, como antifúngicos, antibacterianos e terapias experimentais com óleos essenciais, nanopartículas de prata e ozonioterapia (KRAJAEJUN et al., 2006; FONSECA et al., 2015a; LORETO et al., 2018; VALENTE et al., 2019, ZAMBRANO et al., 2020; IANISKI et al., 2021) demonstrando respostas bastante variáveis, com relatos de sucessos e insucessos terapêuticos (GAASTRA et al., 2010). *P. insidiosum* não responde bem aos antifúngicos convencionais, assim como os azólicos e a anfortericina B (MENDOZA; NEWTON, 2005; MENDOZA; VILELA, 2013; ARAÚJO; BOSCO; SFORCIN, 2016; PERMPALUNG; WORASILCHAI; CHINDAMPORN, 2020). Esse fato está associado à falta de ergosterol na membrana citoplasmática, o que diferencia esse oomiceto de fungos verdadeiros (SANTURIO et al., 2006).

Assim, o interesse por substâncias com atividade biológica e potencial antagonico aos micro-organismos patogênicos são objetos de estudos que buscam descobrir novos compostos com alta eficácia e baixa toxicidade celular (FREIRE-MORAN et al., 2011; ARAÚJO; BOSCO; SFORCIN, 2016; GEBREYOHANNES et

al., 2019a; VOLCÃO et al., 2021a). É conhecido que a presença de compostos bioativos obtidos de cogumelos, como fenóis, incluindo os flavonoides e carotenoides estão relacionados à atividade antibacteriana (OEI, 2006; PEREIRA et al., 2007, 2006; VAMANU, 2018; CHOI et al., 2019; VOLCÃO et al., 2021a). Gebreyohannes et al. (2019a) evidenciaram que extratos de *Trametes* spp. e *Microporus* spp. apresentaram atividade frente a bactérias, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* Meticilina-Resistente (MRSA), *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Similarmente, VOLCÃO et al. (2021b) demonstraram que extratos de *Russula xerampelina*, principalmente extratos alcoólicos e hidro alcoólicos, foram capazes de inibir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*.

A busca por alternativas que contribuem no tratamento da pitiose é essencial, pois se observa que as combinações de compostos bioativos derivados de produtos naturais têm demonstrado resultados positivos (FONSECA et al., 2015a, 2015b; VALENTE et al., 2016a, 2016c; ZAMBRANO et al., 2019). Os macrofungos apresentam importantes propriedades medicinais, como antioxidantes, neuroproteção, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, antimicrobiana, antifúngicas, antiparasitárias e antivirais (MANZI et al. 1999; OZEN et al. 2011; PHAN et al. 2015; CHEUNG, 2008; WU, 2015; PETRE, 2015; KIM et al., 2017; OLIVEIRA, 2019; GEBREYOHANNES et al., 2019a; VAMANU, 2018), portanto, investiga-se que macrofungos podem apresentar propriedades com efeitos inibitórios sobre *P. insidiosum*.

O presente estudo investigou o potencial antimicrobiano de diferentes extratos das espécies de macrofungos *Auricularia auricula*, *Amanita gemmata*, *Amanita muscaria*, *Gymnopilus junonius*, *Lactarius deliciosus*, *Laccaria laccata*, *Psilocybe cubensis*, *Russula xerampelina*, sobre o oomiceto patogênico *P. insidiosum*.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade *in vitro* de extratos de macrofungos silvestres do sul do Brasil sobre isolados de *Pythium insidiosum*.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a coleta de *A. auricula* e *G.junonius*, *L. deliciosus*, *L. laccata* em três regiões localizadas no Rio Grande do Sul;
- Produzir extratos aquosos, etanólicos e hidro-alcoólicos a partir das espécies de basidiomicetos coletados.
- Analisar a suscetibilidade *in vitro* dos isolados de *P. insidiosum*, frente aos diferentes extratos de *Auricularia auricula*, *Amanita gemmata*, *Amanita muscaria*, *Gymnopilus junonius*, *Lactarius deliciosus*, *Laccaria laccata*, *Psilocybe cubensis*, *Russula xerampelina*;
- Comparar a atividade anti-*P.insidiosum* dos extratos aquosos, etanólicos e hidro-alcoólicos dos macrofungos silvestres *Auricularia auricula*, *Amanita gemmata*, *Amanita muscaria*, *Gymnopilus junonius*, *Lactarius deliciosus*, *Laccaria laccata*, *Psilocybe cubensis*, *Russula xerampelina*.

3 Revisão de Literatura

3.1 Oomicetos

Os oomicetos são micro-organismos sapróbios que se desenvolvem no solo, areia, fontes de água, locais alagados e na matéria orgânica em decomposição ou podem viver como parasitas de animais e plantas (VALENTE et al., 2019; BHALERAO et al., 2020; RAI; ABD-ELSALAM; INGLE, 2020).

Os integrantes da classe Oomycetes são distantes filogeneticamente do Reino Fungi e em sua classificação taxonômica, incluem os seguintes gêneros: *Pythium*, *Phytophthora*, *Hyaloperonospora*, *Albugo*, *Saprolegnia* e *Aphanomyces* (KWON-CHUNG, 1994). *Pythium* e *Phytophthora* podem causar infecções em plantas; *Lagenidium* e *Pythium* em insetos; *Achlya*, *Saprolegnia* e *Pythium* em peixes; *Lagenidium* e *Pythium* em mamíferos (MENDOZA; VILELA, 2013).

Os oomicetos se reproduzem de forma sexuada oogâmica; possui características como talo diploide e propriedades moleculares e bioquímicas diferentes como uma rota alternativa para a síntese do aminoácido lisina (ALEXOPOULOS, 1996; MOORE-LANDECKER, 1996). São também distintos de fungos verdadeiros devido à falta de ergosterol na membrana citoplasmática, assim como na constituição de sua parede celular que apresenta celulose, β -glucanas e hidroxiprolina e na reprodução, onde há formação de zoósporos móveis (SANTURIO et al., 2006).

O gênero *Pythium* contém mais de 300 espécies com distribuição mundial, incluindo América, Ásia, África e Austrália (RAI; ABD-ELSALAM; INGLE, 2020). Estes micro-organismos apresentam variabilidade genética em termos de virulência, hospedeiro e distribuição mundial (ADHIKARI et al., 2013; JIANG; TYLER, 2012). Dentre as espécies deste gênero patógenas para mamíferos, destaca-se *P. insidiosum* como o principal patógeno, acometendo animais domésticos (equinos, caninos, bovinos, felinos, caprinos e ovinos) (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012, SOUTO et al., 2021; FERNANDES et al., 2012; DOWST et al., 2019; GRECCO et al., 2009; DO CARMO et al., 2015), selvagens (aves e mamíferos) (GROOTERS,

2003; PESAVENTO et al., 2008; SOUTO et al., 2019; CAMUS, GROOTERS & AQUILAR, 2004; WELLEHAN et al., 2004; BUERGELT, POWE & WHITE, 2006) e humanos (PERMPALUNG; WORASILCHAI; CHINDAMPORN, 2020).

Por estudos filogenéticos sugere-se que *P. insidiosum* está agrupado de acordo com sua origem e distribuição geográfica, que agrupa os diferentes isolados em diferentes clados, clado I (isolados das Américas), clado II (isolados da Ásia e Austrália) e clado III (Tailândia e EUA) (SCHURKO et al., 2003). No entanto, recentemente, *P. insidiosum* foi monofilético com um clado maior e politômico de isolados americanos, enquanto *Pythium* spp. se apresentou parafilético com *Phytophythium* sp. e *Phytophthora* spp (WEIBLEN et al., 2020). Os peronosporalianos se subdividiram em quatro linhagens, demonstrando relação maior de *P. insidiosum*, *P. aphanidermatum* e *P. arrhenomanes* (WEIBLEN et al., 2020).

Na última década, *P. aphanidermatum*, uma importante espécie fitopatogênica, foi isolado de casos de infecções cutâneas e pitiose vascular em humanos (CALVANO et al., 2011). Recentemente, Zambrano et al (2022) comprovaram que esta espécie de oomiceto foi capaz de causar infecção experimental em coelhos, sugerindo que *P. aphanidermatum* está em processo de adaptação à hospedeiros vertebrados.

3.2 Ciclo biológico de *P. insidiosum* e nicho ambiental

O desenvolvimento de *P. insidiosum* depende de fatores abióticos no ecossistema ao qual faz parte (SANTURIO et al., 2006), como áreas alagadas e temperatura (ZAMBRANO et al., 2018; ZARO et al., 2018). A pitiose é descrita em regiões de clima quente, como tropicais, subtropicais e temperadas (GAASTRA et al., 2010; SANTURIO et al., 2006), sendo endêmica em diversos países (VALENTE, 2020). ZAMBRANO et al. (2018) evidenciaram *in vitro* que *P. insidiosum* tem viabilidade entre temperaturas de 5°C e 15°C, porém em temperaturas mais altas entre 20°C e 37°C o processo de zoosporogênese é induzido liberando os zoósporos.

O oomiceto aquático, *P. insidiosum*, completa seu ciclo de vida em ambientes pantanosos (FRANÇA et al., 2022). As águas rasas próximas às margens são habitats mais comuns de encontrar estes eucariotos (ALEXOPOULOS et al., 1996), assim colonizam plantas e desenvolvem um micélio que origina zoósporos

biflagelados. Ao serem liberados na água movimentam-se até encontrar outra planta, reiniciando o ciclo reprodutivo (FRANÇA et al., 2022). No entanto, quando há algum hospedeiro mamífero no local, os zoósporos liberados podem ser atraídos e penetrar na pele através de lesões pré-existent, ocasionando o processo de infecção que determina a pitiose (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996) (Figura 1). Por isso, o acesso dos hospedeiros suscetíveis a ambientes aquáticos é um fator determinante para a ocorrência da infecção, estando a ocorrência da enfermidade associada ao nicho ecológico de *P. insidiosum*, principalmente áreas alagadas, reservatórios de água, água de irrigação e solo, que são reservatórios naturais do oomiceto (SUPABANDHU et al., 2008; VANITTANAKOM et al., 2014). As manifestações clínicas nas espécies afetadas ocorrem normalmente em regiões do corpo que estão em maior contato com a água (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). Contudo, dependendo da espécie infectada, a pitiose pode manifestar-se nas formas cutânea, gastrointestinal, oftálmica ou sistêmica, sendo uma enfermidade de rápida evolução, difícil tratamento e prognóstico desfavorável (GAASTRA et al., 2010).

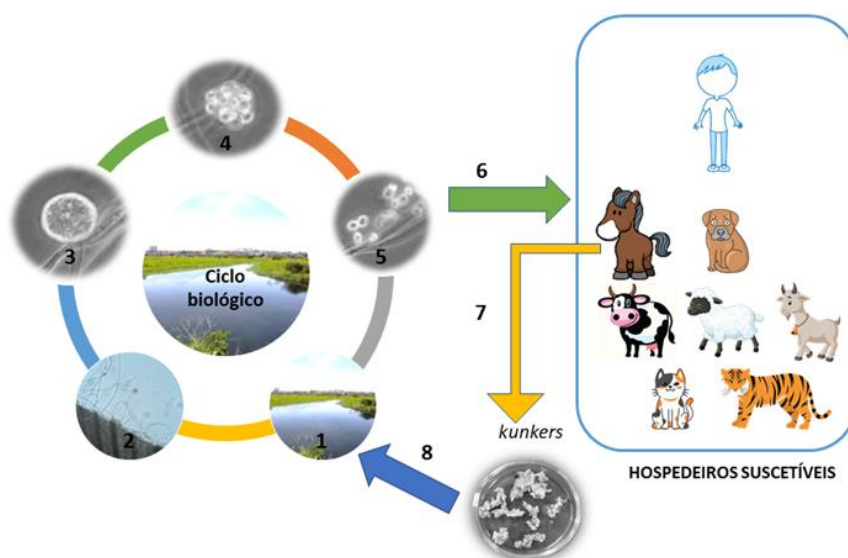


Figura 1. Ciclo Biológico de *Pythium insidiosum*. 1- zoósporos (forma infectante) fixam-se em plantas aquáticas; 2- crescimento micelial na planta hospedeira; 3- reprodução assexuada na planta hospedeira; 4- formação de zoosporângios e liberação de zoósporos; 5- zoósporos livres no ambiente aquático; 6- Infecção por zoósporos de *P. insidiosum*, determinando a pitiose em mamíferos; 7- *kunkers* (massa necrótica contendo hifas de *P. insidiosum*) são desprendidos das lesões nos equinos; 8- *Kunkers* na água (refazem o ciclo no ambiente) (BRAGA et al., 2022).

A pitiose equina tem potencial para circular em grandes áreas no bioma Pampa no Brasil (MACHADO; WEIBLEN; ESCOBAR, 2018), região leste do Uruguai

(ROMERO et al., 2019), e também no pantanal e nordeste do Brasil (DOS SANTOS et al., 2014; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; SOUTO et al., 2021). Já a ocorrência de pitiose humana vascular e ocular são comumente descritas na Tailândia e Índia (PERMPALUNG, WORASILCHAI & CHINDAMPORN, 2019).

Condições como estações chuvosas são determinantes para ocorrência de pitiose em algumas regiões (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012). Em áreas agrícolas endêmicas da Tailândia esses ambientes podem ser uma importante fonte de infecção por *P. insidiosum* para trabalhadores rurais (SUPABANDHU et al., 2008; VANITTANAKOM et al., 2014).

Existem evidências de que o nicho ambiental de *P. insidiosum* está em expansão, pois já foi relatado em clima árido ou semiárido, podendo estar relacionado com as alterações ambientais, como inundações de campos de arroz ou desenvolvimento irrigado da paisagem (GAASTRA et al., 2010). O desenvolvimento da agricultura com agroquímicos também pode gerar alterações ambientais, quando a adubação de plantas com excesso de nitrogênio ou aplicações de agroquímicos aumentam exsudatos no solo, que atuam de forma a estimular a germinação de micro-organismos patogênicos, incluindo *Pythium* sp. (TOKESHI, 2000). Já é conhecido que o uso excessivo de agrotóxicos e insumos químicos geram diversos impactos ecológicos e ambientais (CARNEIRO, 2015; SPADOTTO, 2006; TOKESHI, 2000).

3.3 Pitiose

A pitiose é uma enfermidade piogranulomatosa de importância médica e veterinária que atinge predominantemente o tecido subcutâneo de mamíferos e tem como agente causador o oomiceto *P. insidiosum* (GAASTRA et al., 2010; GROOTERS, 2003; LEAL et al., 2001; SANTURIO et al., 2006).

Dentre os hospedeiros suscetíveis já foram relatadas afecções em animais domésticos, como equinos (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012, SOUTO et al., 2021), caninos (FERNANDES et al., 2012), felinos (DOWST et al., 2019), bovinos (GRECCO et al., 2009), caprinos (DO CARMO et al., 2015); em animais silvestres (GROOTERS, 2003), como ave (PESAVENTO et al., 2008) e avestruz (*Struthio camelus*) (SOUTO et al., 2019), jaguar (*Panthera onca*) (CAMUS, GROOTERS & AQUILAR, 2004), camelo dromedário (*Camelus dromedarius*) (WELLEHAN et al.,

2004) e tigre de bengala (*Panthera tigris tigris*) (BUERGELT, POWE & WHITE, 2006); e humanos (PERMPALUNG; WORASILCHAI; CHINDAMPORN, 2020). A doença se apresenta de forma diferente dependendo do animal afetado, sendo elas cutâneas e subcutâneas em equinos (BECEGATTO et al., 2017), caninos (FERNANDES et al., 2012), felinos (DOWST et al., 2019), bovinos (GRECCO et al., 2009) e caprinos (DO CARMO et al., 2015), na forma gastrointestinal em caninos (DA SILVA et al., 2020) e felinos (RAKICH, GROOTERS & TANG, 2005), e ainda na forma ocular, subcutânea e sistêmica em humanos (GAASTRA et al., 2010).

Apesar da relevância para todos os mamíferos que entram em contato com o agente em locais alagados, os equinos são os mais atingidos pela pitiose, principalmente no Brasil em áreas alagadas no Rio Grande do Sul, Pantanal Mato-Grossense e Nordeste brasileiro (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; ROSSATO et al., 2018; ZARO et al., 2018, SANTOS et al., 2014; WEIBLEN et al., 2016, SOUTO et al., 2021).

O bioma pantanal é o que apresenta maior prevalência da pitiose equina no Brasil (0,9% - 66,7%), em segundo lugar o Cerrado (2,7% - 33,3%), além disso, a doença foi mais prevalente nas estações de janeiro a março, que são mais chuvosas (SANTOS et al., 2014). O Nordeste apresentou entre os anos de 1985 a 2020 uma taxa de 15,17% de amostras de equinos diagnosticados com pitiose, com maior incidência em estação chuvosa (70,29%).

Já no Rio Grande do Sul, a soroprevalência para *P. insidiosum* foi de 11,1%, apresentando um risco relativo de 11,17% de anticorpos anti-*P. insidiosum* nas regiões Sudeste, 4,62% em Porto Alegre, 11,17% em Sudoeste e 3,72% em Noroeste (WEIBLEN et al., 2016). A presença de açudes em propriedades com equinos também foi um fator com alta soropositividade (74,4%) e maior soroprevalência em fêmeas (69,1%) (WEIBLEN et al., 2016).

Nesta espécie de mamífero doméstico (equinos) a pitiose é caracterizada pelo desenvolvimento de massas teciduais de aparência tumoral, ulcerativas e granulomatosas que se desenvolvem rapidamente, localizadas principalmente nas extremidades do corpo (VALENTE, 2020). No seu interior, essas lesões apresentam tecido conjuntivo fibroso entrecortado por galerias preenchidas com massas branco-amareladas denominadas *kunkers*. Esses *kunkers* se desprendem dos tecido com facilidade (CHAFFIN; JAMES; MCMULLAN, 1995; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996), sendo fundamentais para o diagnóstico da pitiose em equinos, bem como

podem atuar na dispersão de *P. insidiosum* nos ambientes alagados, refazendo o ciclo biológico do oomiceto (FONSECA et al., 2014).

3.3 Suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* frente a compostos antimicrobianos

3.3.1 Fármacos antifúngicos e antibacterianos

Os estudos de suscetibilidade *in vitro* para *P. insidiosum* incluem compostos naturais e sintéticos, incluindo antimicrobianos como óleos essenciais, nanopartículas de prata, antifúngicos, antibacterianos e ozonioterapia (FONSECA et al., 2015a; IANISKI et al., 2021; VALENTE et al., 2019; ZAMBRANO et al., 2019).

Já foram feitos tratamentos e testes *in vitro* com o emprego de fármacos como antifúngicos, incluindo anfotericina B, azólicos (itraconazol, miconazol e voriconazol) compostos iodínicos, terbinafina, equinoandinas (caspofungina, micafungina), amorolfina (LORETO et al., 2014; IANISKI et al., 2021), antibacterianos como macrolídeos, tetraciclina, azitromicina, minociclina, aminoglicosídeos, doxiciclina, eritromicina, cloranfenicol, claritromicina, clindamicina, florfenicol, linezolida, ácido fusídico, mupirocin e roxitromicina (ARGENTA et al., 2012; DÓRIA et al., 2012; LORETO et al., 2011, 2012, 2014, 2018; MAHL et al., 2012; PEREIRA et al., 2007, 2013; PERMPALUNG; WORASILCHAI; CHINDAMPORN, 2020, ; ZANETTE et al., 2015).

P. insidiosum não responde bem aos antifúngicos convencionais (ARAÚJO; BOSCO; SFORCIN, 2016; MENDOZA; NEWTON, 2005; MENDOZA; VILELA, 2013; PERMPALUNG; WORASILCHAI; CHINDAMPORN, 2020), devido à ação de agentes antifúngicos atuarem na síntese de ergosterol, que é ausente em oomicetos (SUTHIWONG et al., 2014). Todavia, estudos já demonstraram que *P. insidiosum* apresenta suscetibilidade *in vitro* a diversos agentes antifúngicos como fluconazol, cetoconazol e miconazol (SHENEP et al., 1998), caspofungina (PEREIRA et al., 2007), voriconazol, itraconazol (ARGENTA et al., 2008) e terbinafina (ARGENTA et al., 2008; ITAQUI et al., 2016). E também em combinações farmacológicas de terbinafina e itraconazol, anfotericina B e iodeto de potássio (MENDOZA et al., 2004), terbinafina e antifúngicos azólicos e caspofungina (CAVALHEIRO et al., 2009a), anfotericina B e terbinafina (CAVALHEIRO et al., 2009b), terbinafina e

cetrimida (ITAQUI et al., 2016), e micociclina com anfotericina B, itraconazol e miconazol e de claritromicina com miconazol (JESUS et al., 2014).

A ação *in vitro* dos antibióticos azitromicina, claritromicina, minociclina e tigeciclina isolados e em combinação contra *P. insidiosum* correspondeu a interações sinérgicas em mais de 60% (JESUS et al., 2015a). Assim como Worasilchai et al. (2020) também obtiveram respostas de antibióticos doxiciclina, minociclina, tigeciclina, azitromicina e claritromicina na suscetibilidade *in vitro* contra isolados tailandeses de *P. insidiosum*.

No entanto, a disponibilidade de medicamentos ainda não foi totalmente elucidada (SUTHIWONG et al., 2014). Sendo uma enfermidade de rápida evolução, difícil tratamento, prognóstico desfavorável e letalidade nas espécies acometidas (GAASTRA et al., 2010).

3.3.2. Óleos essenciais e extratos de plantas medicinais e outros compostos

Devido ao difícil tratamento do oomiceto aos fármacos, estudos têm buscado terapias alternativas, como é o caso de Sriphana et al. (2013) que utilizou um composto alcalóide carbazol extraído de *Clausena harmandiana*, apresentando inibição do crescimento de micélios de *P. insidiosum* (SRIPHANA et al., 2013a). Já Suthiwong et al. (2014) obteve inibição do crescimento de micélios de *P. insidiosum* a partir de compostos extraídos e isolados dos frutos de *Micromelum falcatum*, enfatizando o grupo éster com um papel importante para a atividade de inibição de *P. insidiosum* (SUTHIWONG et al., 2014). A caracterização *in vitro* de combinações de carvacrol e timol com antifúngicos e antibióticos demonstraram efeitos sinérgicos relevantes na busca por tratamentos mais eficazes para pitiose cutânea (JESUS et al., 2015b).

O efeito fungicida do extrato bruto da casca de *Stryphnodendron adstringens* e do tanino em *P. insidiosum in vitro* e *in vivo* demonstrou que as substâncias utilizadas em diferentes concentrações evidenciaram efeito anti-*Pythium insidiosum* nos ensaios *in vitro* (TROLEZI et al., 2017). Já nos testes *in vivo* não tiveram efeito para ocorrer a remissão das lesões, sugerindo que a atividade terapêutica de *S. adstringens* e tanino possam ser testadas para cicatrização de feridas em pitiose (TROLEZI et al., 2017). Os compostos Calpulanone, Chalcone e isoflavonoides

mostraram atividade antifúngica com valores de MIC de 0,1 a 0,001 mg (POSRI et al., 2021).

Zambrano et al. (2019) verificaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo de girassol ozonizado (OGO) frente a *P. insidiosum* e a inibição do crescimento do oomiceto a partir de *kunkers* através do tratamento com OGO. Já nos ensaios de inibição de *kunkers* o OGO inibiu totalmente o crescimento de *P. insidiosum*. Concluindo que o OGO pode servir como aliado aos protocolos terapêuticos da pitiose (ZAMBRANO et al., 2019).

Os óleos essenciais e extratos de plantas se destacam em estudos como terapia antimicrobiana, pois apresentam compostos bioativos, assim como os cogumelos, apresentando propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anticarcinogênicas (BAKKALI et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2000). A atividade antimicrobiana de óleos essenciais está atribuída aos compostos aldeídos, fenóis e álcoois (BRUNI et al., 2004). O mecanismo de ação de óleos essenciais já é bem conhecido e ocorre devido à capacidade de penetração na parede celular fúngica, que altera o fluxo de elétrons e desintegra as membranas da célula fúngica (SWAMY; AKHTAR; SINNIHA, 2016).

Os estudos com óleos essenciais e *P. insidiosum* estão demonstrando que os compostos presentes em óleos inibem o crescimento do oomiceto (ARAÚJO; BOSCO; SFORCIN, 2016; FONSECA et al., 2015a, 2015b; JESUS et al., 2015; SRIPHANA et al., 2013a, 2013b; SUTHIWONG et al., 2014; TROLEZI et al., 2017; VALENTE et al., 2016a, 2016b, 2016c). Destacando-se estudos experimentais com os óleos de plantas da família Lamiaceae, incluindo *Melaleuca alternifolia*, *Origanum vulgare*, *Origanum majorana*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis*, que resultaram em atividade inibitória *in vitro* de todos os óleos testados contra *P. insidiosum* e maior atividade inibitória com a utilização de *O. vulgare* (FONSECA et al., 2015a, 2015b; VALENTE et al., 2016a, 2016b, 2016c; DE SOUZA SILVEIRA et al., 2022) e nanopartículas de prata biogênicas (VALENTE et al., 2019; VALENTE et al., 2020).

A atividade de própolis e geoprópolis também apresentaram atividade anti-*P. insidiosum* em fragmentos do micélio, porém o geoprópolis apresentou apenas ação fungistática, enquanto que o própolis inibiu o oomiceto (ARAÚJO; BOSCO; SFORCIN, 2016).

3.3.3 Métodos terapêuticos aplicados à pitiose clínica

As terapias para o tratamento da pitiose em animais e humanos incluem a cirurgia, imunoterapia e antimicrobianos (FONSECA et al., 2015a; KRAJAEJUN et al., 2006; LORETO et al., 2019), demonstrando respostas bastante variáveis, com relatos de sucessos e insucessos terapêuticos (GAASTRA et al., 2010).

Muitos animais precisam de cirurgia para o tratamento, no entanto, às vezes a lesão é muito extensa e grave, dificultando a abordagem (TROLEZI et al., 2017). Apesar da cirurgia poder levar à cura da pitiose, em alguns casos pode ocasionar deficiências, já em outros casos se a doença está muito avançada não é possível realizar o procedimento ou apresenta resultado desfavorável, como altas taxas recidivas (45%) (GAASTRA et al., 2010; YOLANDA; KRAJAEJUN, 2020).

A imunoterapia é utilizada por mais de duas décadas e apresenta cura de aproximadamente 60-70% em equinos e humanos, no entanto, diversos casos não demonstram sucessos e as respostas também variam conforme a espécie estudada, pois há muitos casos de equinos que não respondem, e também cães e gatos não há poucos estudos a respeito dos resultados (GAASTRA et al., 2010; MENDOZA; NEWTON, 2005).

Um relato de caso de pitiose em um cão da raça Beagle (30 meses de idade) mostrou redução completa da lesão após 45 dias de tratamento, que se baseou na associação de antifúngicos (terbinafina – 5mg/kg/dia/oral) e itraconazol (10mg/kg/dia/oral), associado a seis doses de imunoterápico Pitium VAC®, aplicado via subcutânea a cada 15 dias (PERSICI MARONEZE et al., 2012).

Nos humanos, o tratamento de pacientes com pitiose periorbital demonstrou eficácia para anfotericina B, mesmo sem resultados *in vitro* (TRISCOTT; WEEDON; CABANA, 1993). Em outro estudo foi observado o sinergismo *in vitro* de itraconazol e terbinafina, além de tratamento *in vivo* de uma infecção facial em criança (SHENEP et al., 1998). Assim como He et al. (2016) demonstrou eficácia no tratamento de criança com ceratite ocular através de fluconazol associado a anfotericina B, concluindo que alguns antifúngicos combinados podem apresentar implicações no tratamento da pitiose (HE et al., 2016).

Os antimicrobianos também apresentam efeitos para o tratamento da pitiose, na qual um caso de ceratite ocular obteve cura através de colírios com linezolid e azitromicina, associados com azitromicina oral (RAMAPPA et al., 2016). A pitiose

ocular de uma criança de sete anos foi curada empregando a terapia combinada de azitromicina e voriconazol tópicos juntamente com administração oral de azitromicina (CHATTERJEE; AGRAWAL, 2018). Além disso, uma resposta de um número de pacientes maior (18) foi vista no tratamento de pitiose ocular com os fármacos mencionados, demonstrando que podem exercer efeitos positivos no tratamento (BAGGA et al., 2018). A minociclina intraocular e oral também foi um tratamento de resolução de um caso de pitiose ocular (ROS CASTELLAR et al., 2017).

Os tratamentos bem sucedidos dependem do tamanho, tempo, localização da lesão, idade e estado nutricional de animais e humanos (MENDOZA, 2016). Na maioria dos casos o manejo da pitiose está aliado à combinação de diferentes formas de tratamentos, como associação entre antimicrobianos, cirurgia e imunoterapia (YOLANDA; KRAJAEJUN, 2020).

Aplicações biológicas e atividade antimicrobiana de Basidiomicetos

Os macrofungos pertencentes ao filo Basidiomycota são conhecidos por suas estruturas de reprodução que formam basidiomas (PUTZKE, 2014). Esses organismos participam de funções ecológicas e biológicas fundamentais nos ciclos biogeoquímicos e cadeias tróficas (ANTUNES; KOYAMA, 2017; INNOCENTI; SABATINI, 2018), além de também atuar no controle populacional de espécies do ambiente como antagonistas naturais e atrair ou repelir organismos do solo (DEGENKOLB; VILCINSKAS, 2016; INNOCENTI; SABATINI, 2018; NEGRETE GONZÁLEZ et al., 2018). Adicionalmente, diversas pesquisas, baseadas nas propriedades biológicas dos fungos, buscam encontrar alternativas terapêuticas para o controle de diversos organismos, que se tornam cada vez mais resistentes aos medicamentos e antibióticos atuais (BALDIN et al., 2011; DEGENKOLB; VILCINSKAS, 2016; MAFESSONI et al., 2019).

É conhecido que Basidiomicetos são fontes naturais de compostos, como terpenóides, flavonóides, taninos, alcalóides e polissacarídeos que podem ser importantes no desenvolvimento de novas categorias de compostos bioativos (GEBREYOHANNES et al., 2019a; PETRE, 2015; VAMANU, 2018; VOLCÃO et al., 2021a, 2021b). Tais propriedades conferem funções medicinais, como atividade antioxidante, propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitárias e antivirais

(KRUPODOROVA; SEVINDIK, 2020; MAFESSONI et al., 2019; PETRE, 2015; SHIAO et al., 1994; VAMANU, 2018) Comprovadamente, a presença de compostos bioativos como fenóis, flavonóides e carotenóides em cogumelos, está relacionada à atividade antibacteriana (CHOI et al., 2019; OEI, 2006; PEREIRA et al., 2007, 2006; VAMANU, 2018; VOLCÃO et al., 2021a), e são capazes de gerar respostas eficazes contra cepas microbianas patogênicas que desenvolveram um aumento da resistência através da utilização em excesso de medicação alopática (VAMANU, 2018)

A atividade antimicrobiana de extratos de macrofungos silvestres foi avaliada por Gebreyohannes et al. (2019). Estes autores demonstraram as propriedades antimicrobianas de extratos (clorofórmio, etanol 70% e solventes de água quente) de *Trametes* spp. e *Microporus* spp. frente a seis espécies de bactérias, incluindo *Staphylococcus aureus* metilina resistentes *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Em outro estudo, extratos aquosos de *A. auricula*, *L. deliciosus* e *L. laccata* também apresentaram propriedades antimicrobianas *in vitro* contra *Acinetobacter baumannii*, sem evidenciar citotoxicidade em linhagens de células animais (macrófagos e fibroblastos) (VOLCÃO et al., 2021a). Posteriormente, VOLCÃO et al. (2021b) demonstraram que os extratos alcoólicos de *Russula xerampelina* e *Suillus granulatus* apresentavam ação inibitória sobre *Pseudomonas aeruginosa*. Assim como, Barros et al. (2007) descreveram forte atividade inibitória do extrato de *Lactarius piperatus* contra *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, algumas espécies de macrofungos incluindo *Ganoderma* spp., *Cordyceps* spp., *Lentinus* spp., *Trichoderma* spp., *Pleurotus* spp., *Trametes* spp., *Antrodia* spp., *Agaricus* spp., *Terfezia* spp., *Astraeus* spp. e *Paecilomyces* spp evidenciaram efeitos antiparasitários *in vitro* e *in vivo* (ABUGRI et al., 2019).

***Auricularia auricula* (L.) Underw (1902)**

A espécie está classificada no filo Basidiomycota, classe Agaricomycetes, ordem Auriculariales, família Auriculariaceae e gênero *Auricularia*, (KIRK et al., 2008; ZHOU; DAI, 2013). Taxonomicamente o macrofungo de forma sésil possui basidiocarpos de consistência gelatinosa, resistente quando frescos e cores marrom-avermelhado a marrom-amarelado (Figura 2) (MUSNGI et al., 2005).

Auricularia spp. possui espécies sapróbias que se desenvolvem em habitats como galhos deteriorados de árvores vivas e mortas e sua distribuição compreende regiões tropicais à temperadas (MUSNGI et al., 2005; WU et al., 2015). É uma espécie habitualmente cultivada em países Asiáticos, sendo economicamente importante (CHEUNG, 2008; OEI, 2006; WU et al., 2015). É um macrofungo medicinal, com propriedades antioxidantes e utilizado no tratamento de bronquite crônica (CHOI et al., 2019; OEI, 2006). Extratos de *Auricularia* spp. revelam forte atividade antioxidante na concentração de 40-60 $\mu\text{g/mL}$ para eliminar e neutralizar 50% de radicais livres, além de demonstrar atividade antimicrobiana potente contra bactérias Gram-positivas em comparação à bactérias Gram-negativas e leveduras (GEBREYOHANNES et al., 2019b).

A atividade antibacteriana e antioxidante de extratos de *Auricularia auricula-judae* foi determinada com diferentes solventes (acetona, acetato de etila e etanol) por YU; OH (2016). Estes autores observaram propriedades antimicrobianas desses extratos sobre patógenos bacterianos gram-positivos e gram-negativos, incluindo *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae*.

OLI et al. (2020) ao avaliarem os constituintes em extratos proteicos (Tris buffer e aquoso quente) de *A. auricula-judae* observaram a presença de compostos como flavonóides (1,20 %; 0,80 %), alcalóides (0,60 %; 1,00 %), saponina (6,00 %; 2,40%), tanino (1,65%; 1,57%) e cianeto (0,24%; 0,40%)) Esses extratos demonstraram efeitos antimicrobianos contra patógenos bacterianos (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Bacillus subtilis*) fúngicos (*Candida albicans*, *Trichophyton schoenleinii*) (OLI et al., 2020).



Figura 2. *Auricularia auricula*: Características macro morfológicas em diferentes fases de maturação: a. Basidiocarpos de coloração marrom-avermelhados e maturação jovem; b. Basidiocarpo de coloração marrom-amarelado, maturação mais avançada. Fonte: Arquivo pessoal

***Lactarius deliciosus f. deliciosus* (L.) Gray (1821)**

É um macrofungo classificado no filo Basidiomycota, Subfilo Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, ordem Russulales, família Russulaceae, gênero *Lactarius* e espécie *Lactarius deliciosus* (KIRK et al., 2008; RAGONEZI et al., 2013). Sendo um fungo ectomicorrízico, é frequente em monoculturas de espécies arbóreas introduzidas no Brasil, como é o caso de pinus e eucaliptos, e ocorre na época de outono até início da primavera em diferentes áreas das regiões do sul (TRIERVEILER-PEREIRA; SULZBACHER; BALTAZAR, 2018). Espécies de *Lactarius* estabelecem uma relação íntima com as raízes de algumas plantas, na qual ambos são beneficiados (TRIERVEILER-PEREIRA; SULZBACHER; BALTAZAR, 2018).

As características morfológicas de *L. deliciosus* incluem basidiomas carnosos, de coloração verde-alaranjada; esporada de coloração laranja; himênio laminar e anexado ao estipe de formato adnato (Figura 3), possui exsudato de látex de cor laranja, ao reagir com o ar a coloração pode ficar verde; apresenta basídios possuindo quatro esterigmas relativamente longos, e esporos elipsoide, de ornamentação reticulada e amiloide (FREIRE; MARCHETTI; OLIVEIRA, 2013).

A composição nutricional da matéria fresca de *L. deliciosus* foi previamente descrita juntamente com a extração dos compostos antioxidantes, fenólicos totais e flavonóides, demonstrando na sua composição 85% de umidade, cinzas, lipídios, calorias, alto teor de proteína bruta e carboidratos (ROSA et al., 2020). Esse estudo

observou atividade antioxidante de compostos fenólicos e flavonóides e atividade antimicrobiana (ROSA et al., 2020).

Um importante estudo realizado por Alves et al. (2013) estabeleceu a atividade antimicrobiana de diferentes compostos fenólicos, que foram identificados e quantificados em espécies de cogumelos ao redor do mundo, mostrando que os compostos fenólicos presente em cogumelos, são capazes de inibir micro-organismos resistentes aos antibióticos comerciais e são promissores para futuras utilizações como agentes antimicrobianos. Dentre as espécies de cogumelos, *Lactarius* spp. foi avaliado no estudo, apresentando diferentes compostos fenólicos em sua composição, como ácido cinâmico e derivados, ácidos fenólicos e derivados do ácido benzoico (p-ácido hidroxibenzóico e ácido protocatecuico) (ALVES et al., 2013).



Figura 3. *Lactarius deliciosus*: Características macro morfológicas: coloração alaranjada, himênio laminar e lamelas adnatas anexadas ao estipe. Fonte: Arquivo pessoal.

***Laccaria laccata* (Scop.) Cooke (1884)**

Esta espécie de cogumelo está classificada no filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, subclasse Agaricomycetidae, ordem Agaricales, família Hydnangiaceae e gênero *Laccaria* (COOKE, 1884). *Laccaria* sp. é um gênero de fungos ectomicorrízicos, encontrados no solo de matas de *Eucalyptus* sp. e *Pinus* sp. em uma associação simbiótica com essas árvores. *L. laccata* é comumente encontrada em solos de matas de *Pinus* sp. (PUTZKE, 2014) com maior ocorrência do outono até a primavera na região sul do Brasil (TRIERVEILER-PEREIRA; SULZBACHER; BALTAZAR, 2018). *L. laccata* possui coloração marrom

alaranjado, píleo convexo a aplanado e liso, lamelas adnatas distantes entre si, apresentando altura de 10 cm e diâmetro de 4 cm, o estipe é cilíndrico, sem anel e levemente estriado (Figura 4), e a esporada é branca (PUTZKE, 2014; TIM, 2018).

A literatura evidencia que *L. laccata* tem potencial nutracêutico, sendo fonte de compostos fenólicos e atividade antioxidante, com teores de fenóis de 1.59 mg GAE/g e composição de tocoferóis de 8.04 ug (HELENO et al., 2010). Além disso, pesquisas revelaram que extratos de *L. laccata* possuem propriedades bactericidas (NOWACKA et al., 2014; VOLCÃO et al., 2021a).

L. laccata é fonte de polifenoloxidasas, enzimas capazes de produzir defesa contra insetos e patógenos e contribuem para biossíntese de alguns pigmentos e metabólitos secundários (KOLCUOĞLU; KUYUMCU; COLAK, 2018). A catecolase de *L. laccata* foi responsável pela oxidação de alguns compostos fenólicos (4-MC, DHPPA e L-DOPA) (KOLCUOĞLU; KUYUMCU; COLAK, 2018). Além disso, também é um cogumelo que apresenta em sua composição quitosana, um polissacarídeo produzido pela desacetilação da quitina (EGUSA et al., 2015; OBEREMKO et al., 2019). Este composto natural, biodegradável e biocompatível têm aplicações farmacêuticas, pois apresenta propriedades antimicrobianas (EGUSA et al., 2015; OBEREMKO et al., 2019). Este cogumelo tem atividade citotóxica em células tumorais (MH-22A) e células CHO normais *in vitro* (OBEREMKO et al., 2019), e atividade antineoplásica contra sarcoma em camundongos, com inibição tumoral de 75% (KIM et al., 1984), sendo um importante macrofungo para investigações de compostos naturais anticancerígenos (OBEREMKO et al., 2019).



Figura 4. Características macro morfológicas de *Laccaria laccata*: Cogumelo marrom alaranjado, píleo convexo a aplanado e liso com depressão central, lamelas adnatas distantes entre si, apresentando altura de 10 cm e diâmetro de 4 cm, o estipe é cilíndrico, sem anel e levemente estriado. Fonte: Arquivo pessoal

***Gymnopilus junonius* (Fr.) P.D. Orton (1960)**

O cogumelo está classificado taxonomicamente no filo Basidiomycota subfilo Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, subclasse Agaricomycetidae, ordem Agaricales, família Strophariaceae e gênero *Gymnopilus* (ORTON, 1960). *G. junonius* é um fungo decompositor saprófito, que pode crescer em madeiras, em geral restos de eucalipto e às vezes na base de árvores ainda vivas. São encontrados na época de outono até primavera (PUTZKE, 2014; TIM, 2018). Morfologicamente, o cogumelo possui píleo convexo a aplanado, superfície com fibras de cor ferrugem a amarelo, lamelas adnatas de cor ferrugem, assim como a esporada. Possui anel no estipe, que é cilíndrico e fibroso de cor amarelo escuro, apresentando estrias, podem crescer em grupos sobre troncos ou plantas vivas de eucaliptos (Figura 5) (PUTZKE, 2014; TIM, 2018). Podem ser ingeridos se tiver uma preparação adequada, pois possuem certa toxicidade e apresentam efeitos adversos (PUTZKE, 2014).



Figura 5. Características macro morfológicas de *Gymnopilus junonius* em diferentes fases de maturação: a. Estipe cilíndrico e fibroso com estrias e anel parcialmente rompido, apresentando píleo de formato convexo; b. Píleo com véu/anel parcialmente rompido e himênio apresentando lamelas; c. Superfície do Píleo com fibras de cor ferrugem a amarelo - cogumelos crescendo em grupos na base de árvores de eucalipto e pinus; d. Cogumelo crescendo em tronco de eucalipto - himênio com lamelas adnatas e píleo aberto de formato aplanado. Fonte: arquivo pessoal

KUMARESAN et al. (2018) realizaram um estudo sobre o extrato metanólico de *G. junonius* e analisaram a presença de seus compostos bioativos, atividade antioxidante e antibacteriana. A atividade antibacteriana desse extrato metanólico de *G. junonius* apresentou melhor ação antibacteriana contra *Enterococcus faecalis*, *Eggerthella lenta* e *Vibrio parahaemolyticus* (KUMARESAN et al., 2018). Em relação à composição química do cogumelo selvagem o estudo foi pioneiro, e avaliou o extrato metanólico, a qual identificou 33 compostos químicos (KUMARESAN et al.,

2018). Adicionalmente, *G. junonius* apresenta na sua composição proteínas, gordura, fibras, cinzas, monossacarídeos como xilose e glicose, aminoácidos, tocoferóis, compostos bioativos como fenóis, flavonóides, ácido ascórbico, antocianinas e β -carotenos, antioxidantes fenólicos, como bisnoryangonina e hispidina, e um alcalóide triptamínico (psilocibina) (HATFIELD; VALDES, 1978; LEE et al., 2008; SHARMA; GAUTAM, 2015). Este macrofungo também contém sesquiterpenos, que apresentam evidências experimentais citotóxicas em linhagens de células de câncer de pulmão e próstata humano, evidenciando potencial efeito anticancerígeno (LEE et al., 2020).

***Psilocybe cubensis* (Earle) Singer, 1948**

Classificado no filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, subclasse Agaricomycetidae, ordem Agaricales, família Strophariaceae e gênero *Psilocybe* (SINGER, 1948).

As características macro morfológicas de *P. cubensis* incluem tamanho aproximado de 8 cm de altura e 5 cm de diâmetro, píleo convexo de cor amarelo claro e superfície lisa, lamelas adnatas de cor acinzentado e estreitas entre si (Tim, 2018; STAMETS, 1996). O estipe é cilíndrico de cor esbranquiçado com tons amarelados e quando são quebrados mostram tons azulados, possui anel membranoso e esporada de cor castanho violáceo (Tim, 2018; STAMETS, 1996) (Figura 6).

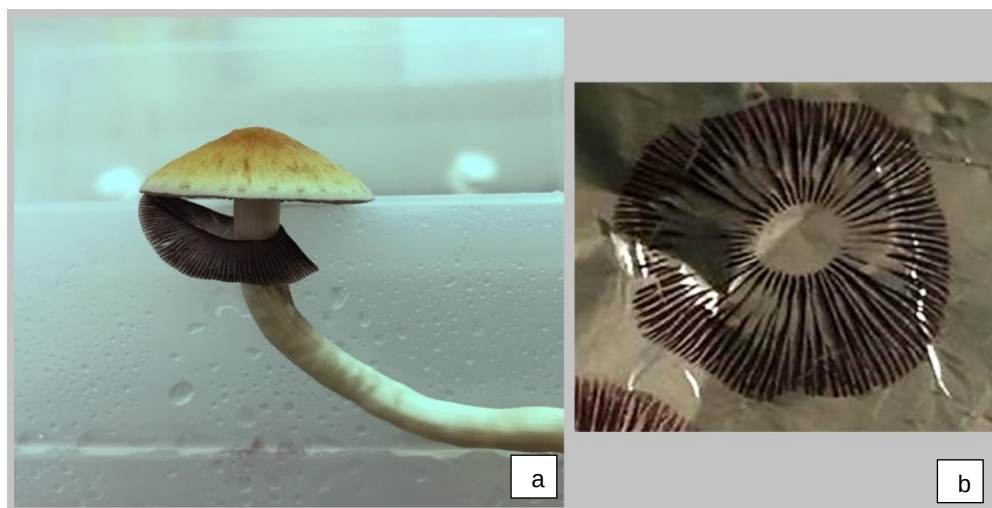


Figura 6. Características macro morfológicas de *Psilocybe cubensis*: a. Píleo convexo de cor amarelo claro e superfície lisa com véu praticamente rompido. b. Esporada de *P. cubensis* de cor castanho violáceo. Fonte: arquivo pessoal

Os macrofungos do gênero *Psilocybe* são saprotróficos, portanto absorvem matéria orgânica em decomposição, assim crescem em campos, esterco, madeira, musgo, solo e resíduos. As estações climáticas mais comuns de encontrar *P. cubensis* são nos meses de calor e chuva/umidade. São cogumelos facilmente cultiváveis *in vitro*, produzindo uma quantidade significativa de biomassa (STEBELSKA, 2013).

Os estudos com *P. cubensis* estão relacionados principalmente à atividade biológica da substância alcaloide psilocibina, presente nesse cogumelo (CARHART-HARRIS et al., 2018; LEWIS et al., 2017; NICHOLS, 2004; SIMÕES et al., 2007). A psilocibina é um metabólito secundário presente em alguns gêneros de macrofungos, incluindo *Gymnopilus* e *Psilocybe*. Esse metabólito tem se revelado como um potencial agonista de receptores do neurotransmissor serotonina, possuindo aplicações para o uso medicinal, como mudanças na conectividade neuronal e efeitos anti-inflamatórios, além de potencial antidepressivo do sistema nervoso central (CARHART-HARRIS et al., 2018; LEWIS et al., 2017; NICHOLS; JOHNSON; NICHOLS, 2017). Porém, a ingestão de *P. cubensis* pode ocasionar toxicidade aguda renal, evidenciando o seu potencial nefrotóxico. (AUSTIN et al., 2019). No entanto, a toxicidade e intensidade da intoxicação por psilocibina mostra ser dose-dependente (STEBELSKA, 2013).

O extrato aquoso de *P. cubensis* foi investigado em relação a quantidade de fenóis totais e atividade antioxidante, resultando em 312,7 ug de ácido gálico equivalente/ml de extrato de fenóis totais e atividade antioxidante de 2242,3 umol de trolox equivalente/ul de extrato, determinando uma porcentagem de atividade antioxidante de 70,5% (DE MELO, et al., 2018).

O perfil da atividade antibacteriana *in vitro* do extrato de micélio com acetato de etila de *P. cubensis* (DPT1) foi avaliado por DHANASEKARAN et al. (2020). Os autores encontraram efeitos antibacterianos contra patógenos, incluindo *Proteus vulgaris* (CIM: 1,25 mg/mL-1), *E. coli* (2,50 mg/mL-1), *P. aeruginosa* (2,50 mg/mL-1) e *S. aureus* (CIM: 10 mg/mL-1), o extrato desse macrofungo também apresentou eficácia larvicida em *Culex quinquefasciatus* mosquitos, revelando que os constituintes do extrato de *P. cubensis* tiveram influência direta nas propriedades biofarmacêuticas e larvicidas do mosquito, sendo dose-dependente entre a concentração de extrato de *P. cubensis* e a taxa de mortalidade (DHANASEKARAN et al., 2020).

***Amanita muscaria* (L.) Lam. (1783) e *Amanita gemmata* (Fr.) Bertill (1866)**

A. muscaria e *A. gemmata* são cogumelos classificados no filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, subclasse Agaricomycetidae ordem Agaricales, família Amanitaceae e gênero *Amanita* (LAMARCK; POIRET, 1783; BERTILL, 1866).

A. muscaria é amplamente conhecido mundialmente, devido ao seu basidiocarpo chamativo que possui a superfície do píleo vermelho brilhante, laranja ou mesmo amarelo com escamas brancas (PUTZKE, 2014). O píleo é convexo a plano e depresso no centro, a estipe é branca com anel e volva na base, sua esporada também tem cor branca (Figura 7) (PUTZKE, 2014). É um cogumelo que possui ectomicorrizas com as raízes de plantas de *Pinus* sp., ocorrendo em suas matas nas estações de frio (PUTZKE, 2014).



Figura 7. Características macro morfológicas de *Amanita muscaria*: basidiocarpo chamativo com a superfície do píleo vermelho brilhante com escamas brancas. Píleo convexo a plano e depresso no centro, himênio com lamelas adnatas e brancas, estipe branca com anel. Fonte: arquivo pessoal.

Algumas espécies de *Amanita* sp. podem provocar intoxicação ao ser consumido, devido ao seus componentes químicos como o ácido ibotênico e o muscimol, ocasionando disfunção no sistema nervoso central (MICHELOT; MELENDEZ-HOWELL, 2003). O muscimol e o ácido ibotênico são os princípios ativos de *A. muscaria*, no entanto pode conter outros componentes ativos ainda não descobertos (MICHELOT; MELENDEZ-HOWELL, 2003). O ácido ibotênico é um composto incolor e solúvel em água fria (MICHELOT; MELENDEZ-HOWELL, 2003).

Outra substância ativa como (x)-R-4-hydroxy-pyrrolidone-(2), estrutura relacionada ao ácido ibotênico e muscimol foi isolada de *A. muscaria*. Esta substância é comum em alguns micromicetos e normalmente possuem forte atividade biológica que inibem bactérias e fungos (MICHELOT; MELENDEZ-HOWELL, 2003). Em outro estudo também foi avaliada a atividade anti-inflamatória de compostos de fucomanogalactano e β -d-glucano isolados de basidiocarpos de *A. muscaria*, revelando potente ação para inibição da dor inflamatória (RUTHES et al., 2013).

Um componente isolado de *A. muscaria*, também presente em espécies de cogumelos *Hygrocybe* sp. é a muscaflavina, um pigmento amarelo e uma característica quimiotaxonômica, a qual já foi estudada em atividades farmacológicas, apresentando ação antimicrobiana (contra bactérias e fungos patogênicos de humanos e plantas), anti-inflamatória, antianalgésica e cicatrizante (CHITTARAGI, 2016; PATOČKA; KOCANDRLOVÁ, 2017).

A combinação de extrato de *A. muscaria* com nanopartículas de prata e óxido ferro foi investigada em relação às propriedades anticancerígenas (IVASHCHENKO

et al., 2018). O ácido hialurônico de *A. muscaria* serviu como agente formador de gel, enquanto o extrato como agente capeador da síntese de propriedades anticancerígenas das nanopartículas (NPs) de prata e óxido de ferro ultrapequeno (MAg) (IVASHCHENKO et al., 2018). As propriedades anticancerígenas foram significativamente impactadas pela formação superficial de NPs com glucanos e muscimol através dos compostos de *A. muscaria* (IVASHCHENKO et al., 2018).

Em outro estudo, o extrato éter de petróleo de *A. muscaria* apresentou atividade antimicrobiana moderada sobre *Shigella flexneri* e *Klebsiella oxytoca* (CIM = 1,56 mg/mL) (CHELELA; CHACHA; MATEMU, 2014). Por outro lado, foi observada fraca atividade inibitória do extrato clorofórmico, éter de petróleo e etanol sobre *Vibrio cholera* e *Streptococcus pyogens*. A atividade antifúngica foi variável, sendo que para *Candida albicans* o extrato etanólico de *A. muscaria* apresentou boa atividade inibitória (CIM = 0,78 mg/mL) e sobre *Cryptococcus neoformans* a inibição foi inferior (CIM = 12,5 mg/mL). Já o extrato clorofórmico apresentou fraca ação contra *C. albicans* e *C. neoformans* (CIM = 6,25 mg/mL) (CHELELA; CHACHA; MATEMU, 2014).

Assim como *A. muscaria*, *A. gemmata* é um cogumelo ectomicorrízico que possui associação com raízes de *Pinus* sp., ocorrendo nas matas nas estações de frio, como outono e inverno, principalmente.



Figura 8. Características macro morfológicas de *Amanita gemmata*: píleo aplanado de cor amarelo creme com escamas brancas, apresentando lamelas. Fonte: arquivo pessoal.

As espécies de *Amanita* sp. são comumente relatadas em casos de intoxicação (MICHELOT; MELENDEZ-HOWELL, 2003), devido à presença da

substância muscimol e ácido ibotênico em diversas espécies do gênero, no entanto, raros estudos investigaram a presença de compostos com funções antimicrobianas da espécie *A. gemmata* (MICHELOT; MELENDEZ-HOWELL, 2003). A presença de ácidos estizolóbico e estilozobínico em baixas quantidades foram detectados em *A. gemmata* também (MICHELOT; MELENDEZ-HOWELL, 2003).

A investigação de propriedades antibióticas de macrofungos foi feita para 36 fungos Agaricales, mostrando que aproximadamente 30 espécies de macrofungos, incluindo *A. gemmata* apresentaram atividade contra uma ou mais bactérias, incluindo *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *E. coli* (GARRIDO et al., 1982).

***Russula xerampelina* (Schaeff.) Fr. (1838)**

Pertencem ao filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, Classe Agaricomycetes, ordem Russulales, família Russulaceae e gênero *Russula*, espécie *Russula xerampelina* (FRIES, 1839).

Os cogumelos *Russula* sp. crescem sob matas de pinus e eucaliptos, apresentando comestibilidade a depender da espécie, *R. xerampelina* é um cogumelo vistoso de píleo convexo a aplanado, superfície lisa, película roxa e bordas brancas, as lamelas são próximas e adnatas de cor branca ou creme, a esporada é hialina, estipe branco, cilíndrico espesso e sem a presença de anel (TIM, 2018) (Figura 9).

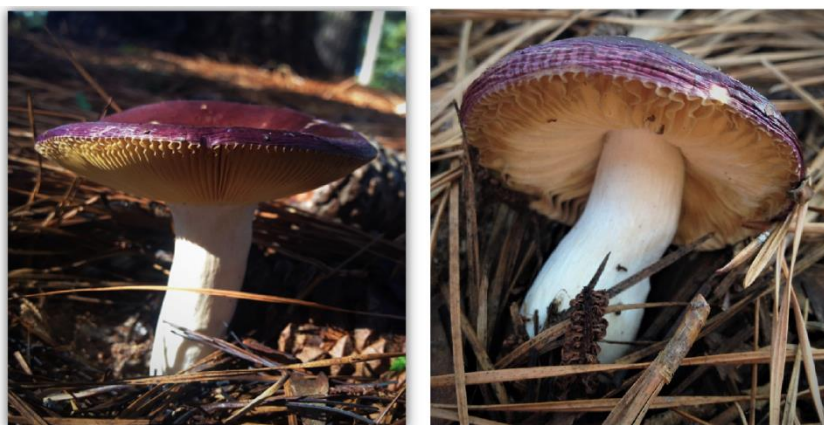


Figura 9. Fotos da espécie *Russula xerampelina* no ambiente de coleta (vegetação de *Pinus* sp.). Fonte: arquivo pessoal

R. xerampelina é um cogumelo com toxicidade leve ao ser consumido (ROBERTS; EVANS, 2014), além disso, é pouco estudado na literatura em relação a

outras espécies de cogumelos comestíveis, até mesmo do mesmo gênero ou família (VOLCÃO et al., 2021b).

A análise dos extratos etanólicos de *R. xerampelina* já constataram atividade antioxidante, presença de ácidos fenólicos e atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa* (VOLCÃO et al., 2021b). Singdevsachan et al. (2014) mostraram atividade antibacteriana do extrato etanólico, metanólico e aquoso da espécie *Russula vesca* e *Russula delicata* contra bactérias gram-negativas, *E. coli* e *Vibrio cholerae*. Outro estudo com extrato de água quente de *R. vesca* apresentou atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de *E. coli*, *S. typhi*, *P. mirabilis* e *C. albicans* (NWACHUKWU; O UZOETO, 2010). Também foi encontrado para o extrato etanólico de *R. delicata* atividade antimicrobiana contra bactérias de origem alimentar e deteriorantes, atividade antioxidante de 26%, a qual apresentou como principal componente no extrato etanólico a catequina, efeitos quelantes de íons ferrosos de 58% e teores de fenóis totais de 6,23 mg/g, ácido ascórbico de 2,93 mg/g, betacaroteno de 0,11 mg/g e licopeno de 0,03 mg/g (YALTIRAK et al., 2009).

4. Manuscrito

**Atividade *in vitro* de extratos de macrofungos sobre *Pythium insidiosum*
(Manuscrito em construção)**

Atividade *in vitro* de extratos de macrofungos sobre o oomiceto *Pythium insidiosum*

Luíze Garcia de Melo; Caroline Braga; Daniela Isabel Brayer Pereira; Lisiane Volcão; Eduardo Bernardi; Sônia de Ávila Botton; Carolina Bermann; Diuliani Fonseca

Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas.

4.1 Resumo

Pythium insidiosum é um importante oomiceto patógeno de mamíferos que causa a pitiose, uma doença endêmica em regiões de clima quente que destaca-se pelo prognóstico desfavorável, letalidade nas espécies acometidas e dificuldades de tratamento. Esse estudo avaliou o potencial *in vitro* anti-*P. insidiosum* de extratos aquosos, hidro-alcoólicos e etanólicos de cogumelos silvestres do sul do Brasil. Extratos aquosos, etanólicos e hidro-alcoólicos foram preparados a partir das espécies *Auricularia auricula*, *Amanita gemmata*, *Amanita muscaria*, *Gymnopilus junonius*, *Lactarius deliciosus*, *Laccaria laccata*, *Psilocybe cubensis*, *Russula xerampelina*. Os testes de suscetibilidade *in vitro* foram realizados frente a 18 e 11 isolados de *P. insidiosum* empregando a técnica de microdiluição e seguindo o protocolo M38-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI). Os extratos de *R. xerampelina* hidro-alcoólico e etanólico 95% evidenciaram atividade anti-*P. insidiosum* nas concentrações inibitórias mínimas que variaram de 1,87- 7,50 mg/ml. Os extratos das demais espécies de cogumelos testados não apresentaram efeitos inibitórios no crescimento *in vitro* de *P. insidiosum*. Este é o primeiro estudo a avaliar a atividade antimicrobiana de cogumelos sobre oomicetos, evidenciando o potencial antimicrobiano do macrofungo *R. xerampelina* sobre o patógeno *P. insidiosum*. Sugere-se que a busca por outras espécies de cogumelos com ação anti-*P. insidiosum* deve ser ampliada.

Palavras-Chave: antimicrobiano, pitiose, cogumelos, anti-*Pythium*, compostos bioativos, basidiomicetos

4.2 Introdução

Pythium. insidiosum é um oomiceto aquático causador da pitiose, uma relevante enfermidade emergente e de difícil tratamento, que acomete animais domésticos (equinos, caninos, bovinos, felinos, caprinos e ovinos), selvagens (aves e mamíferos) e humanos (GAASTRA et al. 2010), sendo relatada em diversos países de clima tropical, subtropical e temperado. No Brasil e na Tailândia, a pitiose é endêmica em equinos e humanos, respectivamente (KRAJAEJUN et al., 2006; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; SOUTO et al., 2021, LELIEVRE et al., 2015; PERMPALUNG et al., 2020).

As manifestações clínicas nos animais afetados caracterizam-se pelo desenvolvimento de lesões cutâneas e subcutâneas em equinos (BECEGATTO et al., 2017), caninos (FERNANDES et al., 2012), felinos (DOWST et al., 2019), bovinos (GRECCO et al., 2009) e caprinos (DO CARMO et al., 2015), e na forma gastrointestinal em caninos (DA SILVA et al., 2020) e felinos (RAKICH, GROOTERS & TANG, 2005). Em humanos, a doença ocorre na forma ocular, subcutânea e sistêmica (GAASTRA et al., 2010).

As terapias disponíveis para o tratamento da pitiose em animais e humanos incluem a cirurgia (KRAJAEJUN et al., 2006; PERMALUNG et al., 2015, BAGGA et al., 2018), imunoterapia (SANTURIO et al., 2003; PEREIRA et al., 2008; FONSECA et al., 2015b) e diferentes classes de fármacos antimicrobianos tais como: antifúngicos (LORETO et al., 2014; IANISKI et al., 2021), antibacterianos (ARGENTA et al., 2012; DÓRIA et al., 2012; LORETO et al., 2011, 2012, 2014, 2018; MAHL et al., 2012; PEREIRA et al., 2007, 2013; PERMPALUNG; WORASILCHAI; CHINDAMPORN, 2020, ; ZANETTE et al., 2015), óleos essenciais de plantas (FONSECA et al., 2015a, 2015b; DE SOUZA SILVEIRA et al., 2022), nanopartículas biogênicas de prata (VALENTE et al., 2019, 2020).

No entanto, o tratamento da pitiose é desafiador, pois os fármacos convencionais não costumam ser eficazes, particularmente os antifúngicos que agem no ergosterol da membrana citoplasmática de fungos, ausente nos oomicetos (SANTURIO et al., 2006). Dessa forma, as perspectivas do manejo de pitiose, na maioria dos casos, estão associadas à combinação de diferentes formas de tratamentos, como antimicrobianos, cirurgia e imunoterapia (YOLANDA;

KRAJAEJUN, 2020). Embora os índices de cura da pitiose em equinos com a imunoterapia sejam considerados satisfatórios, há muitos casos de equinos não responsivos a esse tratamento (MENDOZA; NEWTON, 2005). Por outro lado, a intervenção cirúrgica é uma das formas de tratamento que pode levar à cura da pitiose, no entanto, há recidivas e em alguns casos de doença avançada não é possível a realização do procedimento ou apresenta resultado desfavorável (YOLANDA; KRAJAEJUN, 2020).

Nesse sentido, buscar alternativas para contribuir no tratamento da pitiose é essencial, pois se observa que as combinações de compostos bioativos derivados de produtos naturais têm demonstrado resultados promissores (YOLANDA; KRAJAEJUN, 2020). Os macrofungos apresentam uma variedade de compostos medicinais, como terpenóides, flavonóides, taninos, alcalóides e polissacarídeos, que podem ser potenciais alvos para o desenvolvimento de novas categorias de medicamentos (OEI, 2006; PEREIRA et al., 2006, 2007; PETRE, 2015; VAMANU, 2018; VELÁZQUEZ-NARVÁEZ et al., 2018; CHOI et al., 2019; GEBREYOHANNES et al., 2019a; VOLCÃO et al., 2021a, 2021b). Tais compostos bioativos conferem funções medicinais, como atividade antioxidante e propriedades antimicrobianas incluindo atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, e antiviral (KRUPODOROVA; SEVINDIK, 2020; MAFESSONI et al., 2019; PETRE, 2015; SHIAO et al., 1994; VAMANU, 2018). Todavia, até o momento, nenhuma pesquisa avaliou a ação antimicrobiana de macrofungos sobre oomicetos, incluindo *P. insidiosum*.

É considerável que as propriedades bioativas dos basidiomicetos podem ser alternativas contra organismos patogênicos de importância médica e veterinária. Nesse sentido, o presente estudo investigou o potencial anti-*P. insidiosum* de diferentes extratos dos macrofungos *Auricularia auricula*, *Amanita gemmata*, *Amanita muscaria*, *Gymnopilus junonius*, *Lactarius deliciosus*, *Laccaria laccata*, *Psilocybe cubensis*, *Russula xerampelina*.

4.3. Materiais e métodos

Coleta dos macrofungos e obtenção dos extratos

Os macrofungos *A. auricula*, *G. junonius*, *L. deliciosus* e *L. laccata* foram coletados em três áreas vegetativas dos municípios de Capão do Leão e Pelotas,

duas áreas foram caracterizadas por bosque de coníferas e árvores de pequeno porte, com predominância de espécies de *Pinus* spp. Já no Horto Botânico Irmão Teodoro Luís a área foi descrita por tipos fisionômicos de vegetação de restinga, incluindo mata de restinga arenosa e mata de restinga turfosa (PRADO, 2018).

Após a coleta, as espécies de macrofungos foram identificadas de acordo com características macro e micromorfológicas, divididos igualmente (50 gramas) e embalados em envelopes de papel pardo e transferidos para estufa a 50°C, por um período de 96 horas, para desidratação dos basidiocarpos. Posteriormente, foram armazenados em recipientes hermeticamente fechados, protegidos da luz e umidade até a produção dos extratos (VOLCÃO et al., 2021a).

Os extratos aquosos, etanólicos e hidro-alcoólicos foram produzidos a partir dos macrofungos desidratados e triturados por maceração. Na produção dos extratos aquosos (EAQ), 25g de cada cogumelo triturado foi diluída em 100 ml de água destilada (AD). Na preparação dos extratos hidro-alcoólicos (EHA), os cogumelos triturados (25 g) foram adicionados a 100 ml de etanol 50%. Já para os extratos alcoólicos (EAL), os cogumelos triturados (25 g) foram adicionados a 100 mL de uma solução de etanol 95% (ROESLER et al., 2007). Em seguida as soluções foram incubadas em banho de ultrassom (SB-5200 DTDN Ultrasonic Cleaner) a uma temperatura de 40°C por 120 minutos para a extração dos compostos presentes nos macrofungos (ROESLER et al., 2007). As suspensões foram filtradas em papel filtro Whatman ® nº1, sendo posteriormente acondicionadas em tubos tipo Falcon e armazenadas em freezer a -20°C.

Os extratos aquosos, hidro alcoólicos e etanólicos 95% de *A. muscaria*, *A. gemmata*, *P. cubensis* e *R. xerampelina*, foram gentilmente cedidos pelo laboratório de Biologia, Ecologia e Aplicação de Fungos, da Universidade Federal de Pelotas.

Isolados de *P. insidiosum* e testes de suscetibilidade *in vitro*

Foram avaliados 10 isolados de *P. insidiosum*, oriundos de pitiose em equinos e caninos e 8 cepas padrão CBS1194.53, CBS119454, CBS1194.55, CBS575.85, CBS673.85, CBS702.83, CBS777.84, CBS101.555 pertencentes a pitoteca do laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas. Os isolados clínicos foram identificados por suas características macro e micromorfológicas e confirmadas molecularmente conforme descrito por Azevedo et al. (2012).

Nos testes de suscetibilidade *in vitro* 18 isolados de *P. insidiosum* foram utilizados para os extratos *A. auricula* EAQ, *A. auricula* EHA, *A. auricula* Et. 95%, *A. muscaria* EAQ, *A. gemmata* EAQ, *A. gemmata* Et 95%, *G. junonius* EAQ, *L. laccata* EHA, *L. laccata* EAQ, *L. laccata* Et 95%, *L. deliciosus* EAQ, *L. deliciosus* EHA, *L. deliciosus* Et 95%, *P. cubensis* EAQ, *R. xerampelina* EHAL, *R. xerampelina* EAQ. Já para o extrato de *R. xerampelina* Et. 95% utilizou-se 11 isolados de *P. insidiosum*.

O inóculo para os testes de suscetibilidade *in vitro* consistiu em zoósporos de *P. insidiosum* ($2 \text{ a } 3 \times 10^3$ zoósporos/mL) diluído 1:10 em caldo RPMI 1640, pH 7.0. Os zoósporos foram obtidos por zoosporogênese, seguindo a metodologia previamente descrita por Pereira et al (2007) e Janicki et al. (2021). Os isolados de *P. insidiosum* previamente cultivados em ágar extrato de levedura (AL) foram repicados para placas de Petri contendo ágar V8 juntamente com fragmentos de grama estéril (*Paspalum notatum*) e incubadas a 37° C por 3 dias. Posteriormente, os fragmentos de grama contendo micélio de *P. insidiosum* foram transferidos para placa de petri contendo 20 ml de meio de indução e incubados a 37° C por 12 a 24 horas. Após esse período as placas de Petri foram incubadas a 37° C, em rotação de 3000 rpm por cinco minutos. Os zoósporos livres no meio de indução foram contados em câmara de Neubauer sob microscopia óptica (100 e 400 ×).

Os testes de suscetibilidade foram realizados de acordo com o protocolo de microdiluição em caldo (M38-A2) do CLSI (2008) com adaptações para *P. insidiosum* (FONSECA et al., 2015a). Para a realização dos testes, os extratos foram diluídos em RPMI 1640 glicosado e tamponado a pH 7,0 com 0,165M MOPS na proporção de 1:1 para compor as soluções-estoque. As concentrações dos extratos nos poços variaram de 7,50 mg/mL a 0,01 mg/mL. Alíquotas de 100µL dessas diluições foram dispensadas sequencialmente nas microplacas, preenchendo os poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez. A estas colunas foi distribuído um volume de 100µL do inóculo. Para cada teste foram utilizadas colunas controle positivo (100 µL de RPMI e 100 µL de inóculo) e negativo (100 µL de RPMI e 100 µL do extrato). As placas foram incubadas sob agitação de 40 rpm a 37° C por 48 horas. Todos os testes foram realizados em quadruplicata. A leitura foi visual e levou em consideração o crescimento ou não de hifas. A menor concentração dos extratos capaz de inibir o crescimento de *P. insidiosum* foi identificada como concentração inibitória mínima (CIM). As concentrações capazes de inibir 50% e 90% dos isolados foram denominadas de CIM 50 e CIM 90, respectivamente. As concentrações acima

da CIM foram utilizadas para a determinação da concentração oomicida mínima (COM). Para isso 100 µL da diluição foram transferidos para tubos contendo 900 µL de caldo Sabouraud, e ficaram incubados a 37°C por 48 horas. A menor concentração do extrato que não evidenciou crescimento de hifas foi considerada a COM.

Análise de dados dos tratamentos com extratos alcoólicos e hidroalcoólicos de *R. xerampelina*

A análise dos dados foi feita a partir dos resultados dos testes de suscetibilidade *in vitro* do macrofungo *R. xerampelina* EHAL e Et. 95%, que apresentaram valores de CIM: A análise foi realizada no software estatístico IBM SPSS Statistics for Macintosh, Versão 20.0. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smimov e Shapiro-Wilk. Como a resposta variável não mostrou normalidade, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de U Mann-Whitney de duas variáveis independentes com nível de significância $p=0,05$.

4.4 Resultados

O presente trabalho é o primeiro estudo a avaliar a ação antimicrobiana de diferentes extratos de macrofungos sobre o oomiceto *P. insidiosum*. Este estudo incluiu cogumelos comestíveis (*A. auricula*, *L. laccata*, *L. deliciosus*), cogumelos que possuem toxicidade (*A. gemmata*, *A. muscaria*, *P. cubensis*) e cogumelos que possuem leve toxicidade quando consumidos (*R. xerampelina* e *G. junonius*).

Os resultados dos testes de suscetibilidade *in vitro* estão descritos na Tabela 1.

Dentre os diferentes extratos de cogumelos avaliados apenas os extratos EHAL e Et. 95% de *R. xerampelina* evidenciaram atividade anti-*P. insidiosum*, com CIM que variou de 1,87 a 7,50 mg/mL para ambos os extratos EHAL e Et. 95% (Tabela 1). Os demais extratos de macrofungos testados não apresentaram efeito inibitório sobre *P. insidiosum* nas concentrações avaliadas.

O extrato de *R. xerampelina* EHAL demonstrou concentração oomicida mínima (COM) contra 11 cepas de *P. insidiosum* nas concentrações 1,87 mg/ml, 3,75 mg/ml e 7,5 mg/ml. Já o extrato de *R. xerampelina* Et 95% demonstrou

concentração oomicida mínima (COM) contra cinco (5) das cepas avaliadas nas concentrações 1,87 mg/ml, 3,75 mg/ml e 7,5 mg/ml.

Ao comparar estatisticamente os extratos EHALL e Et. 95% de *R. xerampelina* que evidenciaram atividade contra *P. insidiosum*, foi constatada diferença significativa ($p = 0,012$) entre os valores de CIM destes tratamentos. O valor da mediana (3,75) no tratamento *R. xerampelina* EHALL foi significativamente menor do que a do Et. 95% de *R. xerampelina* (mediana = 7,50).

Tabela 1. Suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* frente aos extratos aquosos (EAQ), hidro alcoólicos (EHAL) e etanólicos 95% (Et 95%) de *Auricularia auricula*, *Amanita gemmata*, *Amanita muscaria*, *Gymnopilus junonius*, *Lactarius deliciosus*, *Laccaria laccata*, *Psilocybe cubensis*, *Russula xerampelina*.

Extratos	Nº de isolados de <i>P. insidiosum</i>	CIM (mg/ml) / número de isolados (%)			CIM [#] ₅₀	CIM [*] ₉₀	Faixa de variação
		7,50	3,75	1,87			
<i>R. x.</i> EHAL	18	7 (43,75%)	6 (37,50%)	3 (18,75%)	3,75 ^a	1,87	1,87 – 7,50
<i>R. x.</i> Et. 95%	11	7 (63,63%)	2 (18,18%)	2 (18,18%)	7,50 ^b	1,87	1,87 – 7,50
<i>L. l.</i> EAQ, EHAL, Et.95%	18	-	-	-	-	-	
<i>A. a.</i> EAQ, EHAL, Et.95%	18	-	-	-	-	-	
<i>L. d.</i> EAQ, EHAL, Et.95%	18	-	-	-	-	-	
<i>L. l.</i> EAQ, EHAL, Et.95%	18	-	-	-	-	-	
<i>G. j.</i> EAQ	18	-	-	-	-	-	
<i>A. m.</i> EAQ	18	-	-	-	-	-	
<i>A. g.</i> EAQ, Et.95%	18	-	-	-	-	-	
<i>P. c.</i> EAQ	18	-	-	-	-	-	

CIM concentração inibitória mínima; [#] Concentração mínima para inibir o crescimento de 50% dos isolados; ^{*} Concentração mínima para inibir o crescimento de 90% dos isolados; (-) ausência de atividade anti-*P. insidiosum*; Abreviações: *R. x.* = *R. xerampelina*, *L. l.* = *L. laccata*, *A. a.* = *A. auricula*, *L. d.* = *L.*

deliciosus, *G. j.* = *G. junonius*, *A. m.* = *A. muscaria*, *A.g.* = *A. gemmata*, *P. c.* = *P. cubensis*. Letras diferentes na mesma coluna diferiram significativamente ($p=0,012$) entre os tratamentos (extratos).

4.5 Discussão

Pythium insidiosum é um importante oomiceto patógeno de mamíferos. Causa a pitiose, uma doença emergente, de rápida evolução e prognóstico desfavorável (Gaastra et al. al., 2010). Os oomicetos pertencem ao reino Straminipila e abrangem micro-organismos eucarióticos que se assemelham morfológicamente aos fungos. No entanto, possuem algumas características particulares, como parede celular composta por celulose, ausência de ergosterol na membrana citoplasmática e produção de zoósporos assexuados nadadores que constituem os propágulos infecciosos (Weiblen et al., 2020).

A gravidade e letalidade da doença nas espécies acometidas, bem como as dificuldades encontradas para o tratamento da pitiose, impulsionam a realização de pesquisas que visam ampliar as alternativas terapêuticas e o arsenal de compostos antimicrobianos com atividade anti-*Pythium*. Neste sentido, as pesquisas avaliando a ação de fármacos antimicrobianos, incluindo compostos antifúngicos, antibacterianos, óleos essenciais de plantas e associações de diferentes classes farmacológicas, bem como novas estratégias como nanotecnologia, apresentaram um incremento considerável nos últimos anos (PEREIRA et al., 2007; ARGENTA et al., 2012; FONSECA et al., 2015 a,b; ZANETTE et al., 2015; ARAUJO; BOSCO; SFORCIN, 2016; JESUS et al., 2016; VALENTE et al., 2016 a,b; RAMAPPA et al. 2017; TROLEZI et al., 2017; BAGGA et al., 2018; LORETO et al., 2018; VALENTE et al., 2019; YOLANDA; KRAJAEJUN, 2020; IANISKI et al., 2021, SILVEIRA et al., 2022).

A ação antimicrobiana de extratos de macrofungos ainda não está totalmente elucidada, no entanto algumas espécies apresentam ampla atividade antimicrobiana contra diversos patógenos incluindo bactérias, fungos, parasitos e vírus (KRUPODOROVA; SEVINDIK, 2020; MAFESSONI et al., 2019; PETRE, 2015; SHIAO et al., 1994; VAMANU, 2018). Todavia, até o momento, nenhuma pesquisa avaliou a ação antimicrobiana de macrofungos sobre oomicetos, incluindo *P. insidiosum*.

Este é o primeiro estudo a avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de macrofungos silvestres frente ao oomiceto patógeno *P. insidiosum*. Dentre os macrofungos avaliados, apenas os extratos EHAL e Et. 95% de *R. xerampelina* evidenciaram atividade anti-*P. insidiosum*, sendo o extrato EHAL superior em sua

atividade inibitória. Por outro lado, os extratos EAQ, EHALL e Et. 95% das demais espécies de cogumelos testados (*A. auricula*, *A. muscaria*, *A. gemmata*, *G. junonius*, *L. laccata*, *L. deliciosus*, *P. cubensis*) não apresentaram efeitos inibitórios no crescimento *in vitro* de *P. insidiosum*. Previamente, Volcão et al. (2021b) avaliaram a atividade antioxidante do extrato de Et 95% de *R. xerampelina*, utilizado no presente estudo. Estes autores avaliaram o teor de flavonoides totais e o teor total de fenóis, sendo estes ácidos fenólicos 3,0 mg GAE/g (micrograma de ácido gálico equivalente por grama de extrato), enquanto que para flavonoides 1.098,33 mg CAE/g (microgramas de catequina equivalente por grama de extrato). Adicionalmente, evidenciaram que esse extrato apresentou efeitos antimicrobianos frente a bactéria *P. aeruginosa*, com CIM de 2,5 mg/mL, sem efeitos citotóxicos para células Vero. No presente estudo, ambos os extratos, Et. 95% e EHALL, de *R. xerampelina* demonstraram efeitos anti-*P. insidiosum* com CIMs variando de 1,87 a 7,5 mg/ml.

Considerando-se os diversos estudos que avaliaram a atividade antimicrobiana de gêneros e espécies de macrofungos (ALVES et al., 2013; CHELELA; CHACHA; MATEMU, 2014; DHANASEKARAN et al., 2020; EGUSA et al., 2015; GEBREYOHANNES et al., 2019b; KUMARESAN et al., 2018; NOWACKA et al., 2014; OBEREMKO et al., 2019; OLI et al., 2020; ROSA et al., 2020; SINGDEVSAACHAN et al., 2014; VOLCÃO et al., 2021a; YALTIRAK et al., 2009), nota-se que *R. xerampelina* é um cogumelo pouco estudado (VOLCÃO et al., 2021b). Contudo, os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram as potencialidades antagonistas deste macrofungo frente ao importante oomiceto patógeno *P. insidiosum*. É provável que a ação anti-*P. insidiosum* da espécie *R. xerampelina* deva-se a presença de compostos bioativos e/ou maiores concentrações de substâncias com atividades antimicrobianas em sua composição. Todavia, são necessárias pesquisas para determinar o teor desses compostos em *R. xerampelina*, bem como avaliar a atividade antimicrobiana de outras formulações de extratos deste macrofungo.

Segundo (BARROS; BAPTISTA; FERREIRA, 2007; (MATA et al., 2007 e VAMANU, 2018) a atividade antimicrobiana dos macrofungos está intimamente relacionada aos efeitos antioxidantes das substâncias bioativas, incluindo a composição de compostos fenólicos.

A composição química de extratos de macrofungos, bem como o conteúdo de substâncias bioativas podem ser influenciadas por diversos fatores, incluindo o tipo de solvente e temperatura utilizados para extração (MATA et al., 2007; ELBATRAWY et al., 2015, VOLCÃO et al., 2021b), quantidade e concentração do macrofungo, estruturas do basidiocarpo, como o píleo e estipe (CHEN et al., 2010), maturação do cogumelo (BARROS; BAPTISTA; FERREIRA, 2007) e localização geográfica do espécime de cogumelo coletado (BÁRBARA RIBEIRO et al., 2006).

Em nosso estudo se demonstrou que a espécie de cogumelo foi um fator importante que definiu a atividade inibitória contra *P. insidiosum*, mesmo testando diferentes solventes de extração, visto que apenas *R. xerampelina* apresentou ação anti-*P. insidiosum*. Sugere-se que o solvente aquoso para os macrofungos avaliados não foi um solvente satisfatório de extração para obter atividade anti-*P. insidiosum*, pois obteve-se resultados de inibição apenas com extratos etanólicos e hidro-alcoólicos de *R. xerampelina*.

Embora, as demais espécies de macrofungos avaliados neste estudo não tenham evidenciado atividade anti-*P. insidiosum* sugere-se que as pesquisas buscando basidiomicetos com atividade antimicrobiana frente a este oomiceto devem ser continuadas, uma vez que a maioria dos estudos prévios demonstraram atividade antimicrobiana a partir de diferentes espécies de macrofungos avaliados (ALVES et al., 2013; DHANASEKARAN et al., 2020; GEBREYOHANNES et al., 2019b; KUMARESAN et al., 2018; NWACHUKWU; O UZOETO, 2010; NOWACKA et al., 2014; OLI et al., 2020; ROSA et al., 2020; VOLCÃO et al., 2021a; YALTIRAK et al., 2009). No entanto, um estudo que avaliou uma quantidade significativa de macrofungos (35), resultou em apenas três gêneros com atividade antimicrobiana (Gebreyohannes et al., 2019a). Podemos considerar que o presente estudo avaliou poucos macrofungos, sendo necessário buscar mais espécies que possam ter atividade anti-*P. insidiosum*.

. 4.6 Conclusão

Este é o primeiro estudo a avaliar a atividade antimicrobiana de cogumelos sobre *P. insidiosum*. Os extratos dos cogumelos *L. deliciosus*, *L. laccata* *A. auricula*, *G. junonius*, *P. cubensis*, *A. gemmata* e *A. muscaria* não evidenciaram ação anti-*P. insidiosum* nas concentrações testadas. Todavia, demonstrou-se o potencial

antimicrobiano dos extratos etanólico e hidro-alcoólico da espécie de cogumelo *R. xerampelina*. Esta pesquisa mostra que os macrofungos tem potencial antimicrobiano sobre o oomiceto *P. insidiosum* e sugere que a busca por outras espécies de cogumelos com ação anti-*P.insidiosum* deve ser ampliada.

Referências Bibliográficas

- ABUGRI, D. A. et al. Medicinal Mushrooms as Novel Sources for New Antiparasitic Drug Development. Em: AGRAWAL, D. C.; DHANASEKARAN, M. (Eds.). . **Medicinal Mushrooms: Recent Progress in Research and Development**. Singapore: Springer, 2019. p. 251–273.
- ADHIKARI, B. N. et al. Comparative Genomics Reveals Insight into Virulence Strategies of Plant Pathogenic Oomycetes. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, p. e75072, 4 out. 2013.
- ALEXOPOULOS, C. J. **Introductory Mycology, 4th Edition | Wiley**. Disponível em: <<https://www.wiley.com/en-us/Introductory+Mycology%2C+4th+Edition-p-9780471522294>>. Acesso em: 10 mar. 2022.
- ALVES, M. J. et al. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 346–357, 2013.
- ANTUNES, P. M.; KOYAMA, A. Chapter 9 - Mycorrhizas as Nutrient and Energy Pumps of Soil Food Webs: Multitrophic Interactions and Feedbacks. Em: JOHNSON, N. C.; GEHRING, C.; JANSÁ, J. (Eds.). . **Mycorrhizal Mediation of Soil**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 149–173.
- ARAÚJO, M. J. A. M.; BOSCO, S. DE M. G.; SFORCIN, J. M. *Pythium insidiosum*: inhibitory effects of propolis and geopropolis on hyphal growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 863–869, dez. 2016.
- ARGENTA, J. S. et al. In vitro and in vivo susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 1–2, p. 137–142, maio 2012.
- AUSTIN, E. et al. Acute renal injury cause by confirmed *Psilocybe cubensis* mushroom ingestion. **Medical Mycology Case Reports**, v. 23, p. 55–57, mar. 2019.
- AZEVEDO, M. I. et al. Phylogenetic relationships of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene sequences. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 1–2, p. 141–148, set. 2012.
- BAGGA, B. et al. Leap forward in the treatment of *Pythium insidiosum* keratitis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 102, n. 12, p. 1629–1633, 1 dez. 2018.

- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 1 fev. 2008.
- BALDIN, E. et al. **Avanços em Fitossanidade**. [s.l: s.n.].
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, abr. 2016.
- BÁRBARA RIBEIRO, † et al. **Contents of Carboxylic Acids and Two Phenolics and Antioxidant Activity of Dried Portuguese Wild Edible Mushrooms**. research-article. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf061890q>>. Acesso em: 4 abr. 2022.
- BARNECHE, S. et al. Anti-MRSA Activity of Fruiting Body Extracts of Spectacular Rustgill Mushroom, *Gymnopilus junonius* (Agaricomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 19, n. 3, 2017.
- BARROS, L.; BAPTISTA, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1731–1737, 1 set. 2007.
- BERTILL, F. **Dictionnaire encyclopédique des sciences médicales: Amanita gemmata**. 3. ed. [s.l: s.n.]. v. 1
- BHALERAO, S. R. et al. Management of *Pythium* spp. by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Em: **Pythium**. [s.l.] CRC Press, 2020.
- BRUNI, R. et al. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 415–421, 1 maio 2004.
- BUERGELT, C.; POWE, J.; & WHITE, T. Abdominal pythiosis in a Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 37, n.2, p.186-189, 2006.
- CALVANOS, T.P; BLATZ, P.J.; VENTO, T.J. et al. *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. *J Clin Microbiol*. v. 49, n. 37, p.10–3, 2011.
- CARHART-HARRIS, R. L. et al. Psilocybin with psychological support for treatment-resistant depression: six-month follow-up. **Psychopharmacology**, v. 235, n. 2, p. 399–408, fev. 2018.
- CAMUS, A.C.; GROOTERS, A.M.; AQUILAR, R.F. Granulomatous Pneumonia Caused by *Pythium Insidiosum* in a Central American Jaguar, *Panthera Onca*.

- Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 16, n.6, p. 567-571, 2004.
doi:10.1177/104063870401600612
- CARNEIRO, F. F. **Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** [s.l.] EPSJV / Expressão Popular, 2015.
- CAVALHEIRO, A. S. et al. *In Vitro* Activity of Terbinafine Combined with Caspofungin and Azoles against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 2136-2138, 2009a.
- CAVALHEIRO, A. S. et al. *In vitro* activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 3-4, p. 408-411, 2009b
- CHAFFIN, M. K.; JAMES, S.; MCMULLAN, W. C. Cutaneous Pythiosis in the Horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Dermatology. v. 11, n. 1, p. 91–103, 1 abr. 1995.
- CHATTERJEE, S.; AGRAWAL, D. Azithromycin in the Management of *Pythium insidiosum* Keratitis. **Cornea**, v. 37, n. 2, p. e8, fev. 2018.
- CHELELA, B. L.; CHACHA, M.; MATEMU, A. O. Antibacterial and antifungal activities of selected wild mushrooms from Southern Highlands of Tanzania. 2014.
- CHEN, X.-H. et al. Chemical Composition and Antioxidant Activities of *Russula griseocarnosa* sp. nov. **ACS Publications**, v. 58, n. 11, p. 6966–6971, 29 abr. 2010.
- CHEUNG, P. C. **Mushrooms as Functional Foods.** [s.l.] John Wiley & Sons, 2008.
- CHITTARAGI, A. Antimicrobial and pharmacological properties of wild mushrooms of western ghats region of Karnataka. **University**, 2016.
- CHOI, Y.-J. et al. The medicinal mushroom *Auricularia auricula-judae* (Bull.) extract has antioxidant activity and promotes procollagen biosynthesis in HaCaT cells. **Natural Product Research**, v. 33, n. 22, p. 3283–3286, 17 nov. 2019.
- COOKE, M. C. **New British fungi.** 63. ed. [s.l.] Grevillea, 1884. v. 12
- DA SILVA, E. M. S.; MARTINS, K. P. F.; BOABAD, F. M.; & DE OLIVEIRA, L. G. S. Pitiose Gastrointestinal Canina: Revisão de Literatura. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 24, n. 5, p. 544-551, 2020.
- DE MELO, L. G. et al. **Atividade antioxidante e fenóis totais do cogumelo *Psilocybe cubensis*.** Anais MPU 2018. **Anais...** Em: 17^a MOSTRA DA PRODUÇÃO UNIVERSITÁRIA - CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. Rio Grande: FURG, 2018. Disponível em: <<https://mpu.furg.br/anais1?layout=edit&id=127>>. Acesso em: 23 mar. 2022

DE SOUZA SILVEIRA, J.; BRASIL, C. L.; BRAGA, C. Q.; DA SILVA MOREIRA, Â.; FRANZ, H. C.; ZAMBONI, R.; ... & PEREIRA, D. I. B. *Melaleuca alternifolia* formulations in the treatment of experimental pythiosis. *Brazilian Journal of Microbiology*, p. 1-7, 2022.

DEGENKOLB, T.; VILCINSKAS, A. Metabolites from nematophagous fungi and nematocidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 9, p. 3799–3812, 1 maio 2016.

DHANASEKARAN, D. et al. Taxonomic identification and bioactive compounds characterization of *Psilocybe cubensis* DPT1 to probe its antibacterial and mosquito larvicidal competency. **Microbial Pathogenesis**, v. 143, p. 104138, 1 jun. 2020.

DO CARMO, P. M. S. et al. Cutaneous Pythiosis in a Goat. **Journal of Comparative Pathology**, v. 152, n. 2, p. 103–105, 1 fev. 2015.

DÓRIA, R. G. S. et al. Treatment of Pythiosis in Equine Limbs Using Intravenous Regional Perfusion of Amphotericin B. **Veterinary Surgery**, v. 41, n. 6, p. 759–765, 2012.

DOS SANTOS, C. E. P. et al. Epidemiological Survey of Equine Pythiosis in the Brazilian Pantanal and Nearby Areas: Results of 76 Cases. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 2, p. 270–274, 1 fev. 2014.

DOWST, M. et al. An unusual case of cutaneous feline pythiosis. **Medical Mycology Case Reports**, v. 26, p. 57–60, 31 out. 2019.

EGUSA, M. et al. Characterization of Chitosan Nanofiber Sheets for Antifungal Application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 26202–26210, nov. 2015.

ELBATRAWY, E. N. et al. Medicinal Mushroom Extracts Possess Differential Antioxidant Activity and Cytotoxicity to Cancer Cells. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 17, n. 5, 2015.

FERNANDES, C. P. M. et al. Gastric pythiosis in a dog. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 29, n. 4, p. 235–237, 1 out. 2012.

FONSECA, A. O. S. et al. In vitro susceptibility of zoospores and hyphae of *Pythium insidiosum* to antifungals. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 69, n. 6, p. 1564–1567, 1 jun. 2014.

- FONSECA, A. O. S. et al. In vitro susceptibility of Brazilian *Pythium insidiosum* isolates to essential oils of some Lamiaceae family species. **Mycopathologia**, v. 179, n. 3–4, p. 253–258, 1 abr. 2015a.
- FONSECA, A. O. S. et al. Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. **Veterinary Microbiology**, v. 178, n. 3, p. 265–269, 5 ago. 2015b.
- FRANÇA, A. C. D. S. et al. **Conceitos e metodologias de integração em ciências biológicas e da saúde**. [s.l.] Atena Editora, 2022.
- FRANCK, J. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA. p. 81, 2019.
- FREIRE, C. G.; MARCHETTI, M. M.; OLIVEIRA, L. P. DE. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E NUTRICIONAL DO FUNGO ECTOMICORRÍZICO *LACTARIUS DELICIOSUS*. **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde**, p. 7–12, 17 set. 2013.
- FREIRE-MORAN, L. et al. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria-Time to react is now. **Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy**, v. 14, n. 2, p. 118–124, abr. 2011.
- FRIES, E. Epicrisis Systematis Mycologici seu Synopsis Hymenomycetum. **Annals and Magazine of Natural History**, Upsaliæ. v. 1, n. 21, p. 1836–1838, 1 set. 1839.
- GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: An overview. **Veterinary Microbiology**, v. 146, n. 1, p. 1–16, 20 nov. 2010.
- GARRIDO, N. et al. Antibiotic properties of ectomycorrhizae and saprophytic fungi growing on *Pinus radiata* D. Don l. **Mycopathologia**, v. 77, n. 2, p. 93–98, 1 jan. 1982.
- GEBREYOHANNES, G. et al. Determination of Antimicrobial Activity of Extracts of Indigenous Wild Mushrooms against Pathogenic Organisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, p. e6212673, 18 fev. 2019a.
- GEBREYOHANNES, G. et al. Investigation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Different Extracts of *Auricularia* and *Termitomyces* Species of Mushrooms. **The Scientific World Journal**, v. 2019, p. e7357048, 24 jul. 2019b.
- GRECCO, F. B. et al. Pitiose cutânea em bovinos na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 938–942, nov. 2009.

- GROOTERS, A. M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 33, n. 4, p. 695–720, v, jul. 2003.
- GROOTERS, A. M.; GEE, M. K. Development of a Nested Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection and Identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 2, p. 147–152, 2002.
- HATFIELD, G. M.; VALDES, L. J. The occurrence of psilocybin in *Gymnopilus* species. **Lloydia**, v. 41, n. 2, p. 140–144, 1 mar. 1978.
- HE, H. et al. Diagnosis and Treatment of *Pythium Insidiosum* Corneal Ulcer in a Chinese Child: A Case Report and Literature Review. **The American Journal of Case Reports**, v. 17, p. 982–988, 27 dez. 2016.
- HELENO, S. A. et al. Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1443–1450, abr. 2010.
- IANISKI, L. B. et al. In vitro anti-*Pythium insidiosum* activity of amorolfine hydrochloride and azithromycin, alone and in combination. **Medical Mycology**, v. 59, n. 1, p. 67–73, 4 jan. 2021.
- INNOCENTI, G.; SABATINI, M. A. Collembola and plant pathogenic, antagonistic and arbuscular mycorrhizal fungi: a review. **Bulletin of Insectology**, v. 71, n. 1, p. 71–76, 2018.
- ITAQUI, S. R. et al. In vitro synergism between azithromycin or terbinafine and topical antimicrobial agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, p. 5023–5025, 2016.
- IVASHCHENKO, O. et al. Gel with silver and ultrasmall iron oxide nanoparticles produced with *Amanita muscaria* extract: physicochemical characterization, microstructure analysis and anticancer properties. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 13260, 5 set. 2018.
- JESUS, F. P. et al. In vitro synergism observed with azithromycin, clarithromycin, minocycline, or tigecycline in association with antifungal agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n.v9, p. 5621-5625, 2014.
- JESUS, F. P. et al. In vitro and in vivo antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin or tigecycline against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, p. 87-91, 2015a.

- JESUS, F. P. K. et al. In vitro activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, n. 2, p. e89–e93, 1 jun. 2015b.
- JIANG, R. H. Y.; TYLER, B. M. Mechanisms and Evolution of Virulence in Oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, n. 1, p. 295–318, 2012.
- KAGEYAMA, K. Molecular taxonomy and its application to ecological studies of *Pythium* species. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, n. 4, p. 314–326, 1 jul. 2014.
- KIM, Y.-J. et al. Studies on Antitumor Components of Cultured Basidiomycetes - Purification and Chemical Analysis of Antineoplastic Constituents of Cultured Mycelia of *Laccaria laccata* -. **The Korean Journal of Mycology**, v. 12, n. 1, p. 35–43, 1984.
- KIRCHMAIR, M. et al. Amanita poisonings resulting in acute, reversible renal failure: new cases, new toxic Amanita mushrooms. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 4, p. 1380–1386, 1 abr. 2012.
- KIRK, P. et al. **Dictionary of the FungiCABI.org**, 2008. Disponível em: <<https://www.cabi.org/bookshop/book/9781845939335/>>. Acesso em: 10 mar. 2022
- KOLCUOĞLU, Y.; KUYUMCU, I.; COLAK, A. A catecholase from *Laccaria laccata* a wild edible mushroom and its catalytic efficiency in organic media. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. e12605, out. 2018.
- KRAJAEJUN, T. et al. Development and Evaluation of an In-House Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Early Diagnosis and Monitoring of Human Pythiosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 9, n. 2, p. 378–382, mar. 2002.
- KRAJAEJUN, T. et al. Ocular pythiosis: is it under-diagnosed? **American Journal of Ophthalmology**, v. 137, n. 2, p. 370–372, fev. 2004.
- KRAJAEJUN, T. et al. Clinical and Epidemiological Analyses of Human Pythiosis in Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 5, p. 569–576, 1 set. 2006.
- KRAJAEJUN, T. et al. Development of an Immunochromatographic Test for Rapid Serodiagnosis of Human Pythiosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 4, p. 506–509, abr. 2009.
- KRAJAEJUN, T. et al. Biochemical and genetic analyses of the oomycete *Pythium insidiosum* provide new insights into clinical identification and urease-based evolution of metabolism-related traits. **PeerJ**, v. 6, p. e4821, 5 jun. 2018.

- KRUPODOROVA, T.; SEVINDIK, M. Antioxidante potential an some mineral contentes of wild edible mushroom *Ramaria stricta*. **AgroLife Scientific Journal**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2020.
- KUMARESAN, S. et al. ANTIBACTERIAL ACTIVITY, IN VITRO ANTIOXIDANT POTENTIAL AND GC-MS CHARACTERIZATION OF METHANOLIC EXTRACT OF *GYMNOPIUS JUNONIUS*, A WILD MUSHROOM FROM SOUTHERN WESTERN GHATS, INDIA. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical sciences**, v. 5, p. 650–657, 1 mar. 2018.
- KWON-CHUNG, K. J. Phylogenetic Spectrum of Fungi That Are Pathogenic to Humans. **Clinical Infectious Diseases**, v. 19, n. Supplement_1, p. S1–S7, 1 ago. 1994.
- LAMARCK, J.-B.; POIRET, J.-L.-M. **Encyclopédie méthodique. Botanique**. Paris, Liège : Panckoucke; Plomteux, 1783. p. 1–801
- LAMOUR, K.; KAMOUN, S. **Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions and Research Tools**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2009.
- LEAL, A. T. et al. Pitiose. **Ciência Rural**, v. 31, p. 735–743, 2001.
- LEE, I.-K. et al. Chemical Constituents of *Gymnopilus spectabilis* and Their Antioxidant Activity. **Mycobiology**, v. 36, n. 1, p. 55–59, 1 mar. 2008.
- LEE, S. et al. Trichothecene and tremulane sesquiterpenes from a hallucinogenic mushroom *Gymnopilus junonius* and their cytotoxicity. **Archives of Pharmacal Research**, v. 43, n. 2, p. 214–223, 1 fev. 2020.
- LELIEVRE, L.; BORDERIE, V.; GARCIA-HERMOSO, D.; BRIGNIER, A.C.; STERKERS, M.; CHAUMEIL C.; et al. Imported *Pythium insidiosum* keratitis after a swim in Thailand by a contact lens-wearing traveler, **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 92, p. 270–273, 2015.
- LÉVESQUE, C. A.; COCK, A. W. A. M. D. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycological Research**, v. 108, n. 12, p. 1363–1383, dez. 2004.
- LEWIS, C. R. et al. Two dose investigation of the 5-HT-agonist psilocybin on relative and global cerebral blood flow. **NeuroImage**, v. 159, p. 70–78, 1 out. 2017.
- LORETO, É. S. et al. In Vitro Susceptibility of *Pythium insidiosum* to Macrolides and Tetracycline Antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3588–3590, jul. 2011.
- LORETO, E. S. et al. Diphenyl diselenide in vitro and in vivo activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, n. 1–2, p. 222–226, 2012.

- LORETO, É. S. et al. New Insights into the In Vitro Susceptibility of *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7534–7537, dez. 2014.
- LORETO, E. S. et al. Efficacy of Azithromycin and Miltefosine in Experimental Systemic Pythiosis in Immunosuppressed Mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. e01385-18, 21 dez. 2018.
- LORETO, E. S. et al. Screening of antibacterial drugs for antimicrobial activity against *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**, v. 57, n. 4, p. 523–525, 1 jun. 2019.
- MACHADO, G.; WEIBLEN, C.; ESCOBAR, L. E. Potential distribution of *Pythium insidiosum* in Rio Grande do Sul, Brazil, and projections to neighbour countries. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 6, p. 1671–1679, dez. 2018.
- MAFESSONI, A. et al. Fungos antagonistas e suas combinações contra *Meloidogyne* spp. em solo de cultivo de tomate sem a presença de hospedeiro Antagonist fungi and their combinations against *Meloidogyne* spp. on tomato cultivation soil without the presence of host. **Acta Biológica Catarinense**, v. 6, 25 set. 2019.
- MAHL, D. L. et al. In Vitro Susceptibility of *Pythium insidiosum* Isolates to Aminoglycoside Antibiotics and Tigecycline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 7, p. 4021–4023, jul. 2012.
- MANZI P., GAMBELLI L., MARCONI S., VIVANTI V., PIZZOFERRATO L. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. **Food Chem.** V. 65, n.4, p. 477–482, 1999. doi:10.1016/S0308-8146(98)00212-X.
- MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Epidemiologia da pitiose equina na Região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 865–868, set. 2012.
- MATA, A. T. et al. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 778–786, 1 jan. 2007.
- MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*. **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, 8 fev. 2016.
- MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M. R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 6, n. 4, p. 151–164, 1996.

- MENDOZA, L.; PRASLA, S. H.; AJELLO, L. Orbital pythiosis: a non-fungal diseasemimicking orbital mycotic infections, with a retrospective review of the literature. **Mycoses**, v. 47, n. 1-2, p. 14-23, 2004.
- MENDOZA, L.; NEWTON, J. C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**, v. 43, n. 6, p. 477–486, 1 set. 2005.
- MENDOZA, L.; VILELA, R. The Mammalian Pathogenic Oomycetes. **Current Fungal Infection Reports**, v. 7, n. 3, p. 198–208, 1 set. 2013.
- MICHELOT, D.; MELENDEZ-HOWELL, L. M. *Amanita muscaria*: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. **Mycological Research**, v. 107, n. 2, p. 131–146, 1 fev. 2003.
- MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996.
- MUSNGI, R. B. et al. Four species of wild *Auricularia* in Central Luzon, Philippines as sources of cell lines for researchers and mushroom growers. **Journal of Agricultural Technology**, v. 1, n. 2, p. 279–299, 2005.
- NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, out. 2000.
- NEGRETE GONZÁLEZ, D. et al. Suitability of *Cordyceps bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for biological control of *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae) in an organic Mexican banana plantation: laboratory and field trials. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 125, n. 1, p. 73–81, 1 fev. 2018.
- NICHOLS, D. E. Hallucinogens. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 101, n. 2, p. 131–181, fev. 2004.
- NICHOLS, D. E.; JOHNSON, M. W.; NICHOLS, C. D. Psychedelics as Medicines: An Emerging New Paradigm. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 101, n. 2, p. 209–219, fev. 2017.
- NOWACKA, N. et al. Analysis of phenolic constituents, antiradical and antimicrobial activity of edible mushrooms growing wild in Poland. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, Part 1, p. 689–694, 1 dez. 2014.
- NWACHUKWU, E.; O UZOETO, H. Antimicrobial activity of some local mushrooms on pathogenic isolates. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 23, p. 2460–2465, 4 dez. 2010.

- OBEREMKO, A. et al. Physicochemical and in vitro cytotoxic properties of chitosan from mushroom species (*Boletus bovinus* and *Laccaria laccata*). **Carbohydrate Polymers**, v. 221, p. 1–9, 1 out. 2019.
- OEI, P. O cultivo de cogumelos em pequena escala. p. 90, 2006.
- OLI, A. N. et al. Evaluation of the phytoconstituents of *Auricularia auricula-judae* mushroom and antimicrobial activity of its protein extract. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 38, p. 101176, 1 set. 2020.
- ORTON, P. D. New check list of British Agarics and Boleti, part III (keys to *Crepidotus*, *Deconica*, *Flocculant*, *Hygrophorus*, *Naucoria*, *Pluteus* and *Volvaria*). **Transactions of the British Mycological Society**, p. 159–439, 1960.
- OZEN, T.; DARCAN, C.; AKTOP, O.; TURKEKUL, L. Screening of antioxidant, antimicrobial activities and chemical contents of edible mushrooms wildy grown in the Black Sea region of Turkey. **Comb Chem High Throughput Screen**. v. 14, n. 2, p. 72–84, 2011.
- PANNANUSORN, S. et al. Random amplified polymorphic DNA typing and phylogeny of *Pythium insidiosum* clinical isolates in Thailand. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 38, p. 383–91, 1 abr. 2007.
- PATOČKA, J.; KOCANDRLOVÁ, B. PHARMACOLOGICALLY AND TOXICOLOGICALLY RELEVANT COMPONENTS OF *Amanita muscaria*. **Military Medical Science Letters**, 3. v. 86, p. 122–134, 2017.
- PESAVENTO, P.A.; BARR, B.; RIGGS, S.M.; et al. Cutaneous pythiosis in a nestling white-faced ibis. **Vet Pathol**. v. 45, p. 538–41, 2008.
- PEREIRA, A. P. et al. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. **Molecules**, v. 12, n. 5, p. 1153–1162, maio 2007.
- PEREIRA, D. I. B. et al. Zoosporogênese in vitro entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*. **Ciência Rural**, v. 38, p. 143–147, fev. 2008.
- PEREIRA, D. I. B. et al. Canine Gastrointestinal Pythiosis Treatment by Combined Antifungal and Immunotherapy and Review of Published Studies. **Mycopathologia**, v. 176, n. 3, p. 309–315, 1 out. 2013.
- PEREIRA, J. A. et al. Table Olives from Portugal: Phenolic Compounds, Antioxidant Potential, and Antimicrobial Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8425–8431, 1 nov. 2006.

- PERSICI MARONEZE, B., A BOTTON, S., AURÉLIO MOTA, M., RODRIGUES LOBO, R., P SOARES, M., SS VALENTE, J., & IB PEREIRA, D. Terapia combinada no tratamento de pitiose gastrointestinal em um canino. **Acta sci. vet.**(Online), 2012)
- PERMPALUNG, N.; WORASILCHAI, N.; CHINDAMPORN, A. Human Pythiosis: Emergence of Fungal-Like Organism. **Mycopathologia**, v. 185, n. 5, p. 801–812, 1 out. 2020.
- PETRE, M. **Mushroom Biotechnology: Developments and Applications**. [s.l.] Academic Press, 2015.
- PHAN, C.W.; DAVID, P.; NAIDU, M.; WONG, K. H.; SABARATNAM, V. Therapeutic potential of culinary-medicinal mushrooms for the management of neurodegenerative diseases: diversity, metabolite and mechanism. **Crit Rev Biotechnol**. V. 35, n.3; p. 355–368, 2015. doi:10.3109/07388551.2014.887649.
- POSRI, P. et al. Antifungal activity of compounds from the stems of *Dalbergia stipulacea* against *Pythium insidiosum*. **Natural Product Research**, v. 35, n. 17, p. 2823–2830, 2 set. 2021.
- PUTZKE, J. **Cogumelos no Sul do Brasil**. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/49058172-Cogumelos-no-sul-do-brasil-volume-1.html>>. Acesso em: 10 mar. 2022.
- RAKICH, P. M.; GROOTERS, A. M. & TANG, K. N. Gastrointestinal pythiosis in two cats. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 17, n. 3, p. 262-269, 2005.
- RAGONEZI, C. et al. Molecular approach to characterize ectomycorrhizae fungi from Mediterranean pine stands in Portugal. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 44, n. 2, p. 657–664, 2013.
- RAI, M.; ABD-ELSALAM, K. A.; INGLE, A. P. **Pythium: Diagnosis, Diseases and Management**. [s.l.] CRC Press, 2020.
- RAHI, D.K.; MALIK, D. Diversity of mushrooms and their metabolites of nutraceutical and therapeutic significance. **J Mycol**. p. 1–18, 2016. 7654123. doi:10.1155/2016/7654123.
- RAMAPPA, M. et al. Successful Medical Management of Presumptive *Pythium insidiosum* Keratitis. **Cornea**, v. 36, n. 4, p. 511–514, 20 dez. 2016.
- REIS, F. S. et al. Can *Suillus granulatus* (L.) Roussel be classified as a functional food? **Food & Function**, v. 5, n. 11, p. 2861–2869, 22 out. 2014.

- ROBERTS, P.; EVANS, S. **The Book of Fungi: A Life-Size Guide to Six Hundred Species from Around the World**. 1^a edição ed. [s.l.] Ivy Press, 2014.
- ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Food Science and Technology**, v. 27, p. 53–60, mar. 2007.
- ROMERO, A. et al. Equine pythiosis in the eastern wetlands of Uruguay. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, p. 469–475, 30 set. 2019.
- ROS CASTELLAR, F. et al. Intraocular minocycline for the treatment of ocular pythiosis. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 74, n. 11, p. 821–825, 1 jun. 2017.
- ROSA, G. B. et al. Investigation of Nutritional Composition, Antioxidant Compounds, and Antimicrobial Activity of Wild Culinary-Medicinal Mushrooms *Boletus edulis* and *Lactarius deliciosus* (Agaricomycetes) from Brazil. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 22, n. 10, p. 931–942, 2020.
- ROSSATO, C. K. et al. Pythiosis with atypical location in the soft palate in a horse in Southern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, p. 641–643, abr. 2018.
- RUTHES, A. C. et al. Fucomannogalactan and glucan from mushroom *Amanita muscaria*: Structure and inflammatory pain inhibition. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 761–769, 15 out. 2013.
- SANTOS, C.E.P. et al. Epidemiological survey of equine pythiosis in the Brazilian pantanal and nearby areas: results of 76 cases. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.34, p.270-274, 2014.
- SANTURIO, J. et al. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 1–14, 2006.
- SANTURIO, J. M. *Pythium insidiosum*: avaliação de imunoterápico para eqüinos, utilizando-se coelhos como modelo experimental. p. 71–71, 2004.
- SHARMA, S. K.; GAUTAM, N. Chemical, Bioactive, and Antioxidant Potential of Twenty Wild Culinary Mushroom Species. **BioMed Research International**, v. 2015, p. e346508, 25 jun. 2015.
- SHELDON, A. T. Antibiotic Resistance: Who Is Winning the War? Introductory Remarks. **International Journal of Toxicology**, v. 22, n. 2, p. 129–130, 1 mar. 2003.

- SHENEP, J. L. et al. Successful Medical Therapy for Deeply Invasive Facial Infection Due to *Pythium insidiosum* in a Child. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 1388–1393, 1 dez. 1998.
- SHIAO, M.-S. et al. Natural Products and Biological Activities of the Chinese Medicinal Fungus *Ganoderma lucidum*. Em: **Food Phytochemicals for Cancer Prevention II**. ACS Symposium Series. [s.l.] American Chemical Society, 1994. v. 547p. 342–354.
- SIERRALTA, A. et al. [Mushroom poisoning in the IX region. Role of *Amanita gemmata*]. **Revista medica de Chile**, v. 122, n. 7, p. 795–802, 1 jul. 1994.
- SILVA, E. M. S. DA et al. Pitiose Gastrointestinal Canina: Revisão de Literatura. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 24, n. 5- esp., p. 544–551, 2020.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia Da Planta Ao Medicamento**. 6. ed. [s.l.] UFSC e UFRGS, 2007.
- SINGDEVSACHAN, S. K. et al. Evaluation of nutritional and nutraceutical potentials of three wild edible mushrooms from Similipal Biosphere Reserve, Odisha, India. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 9, n. 2, p. 111–120, jun. 2014.
- SINGER, R. **Diagnoses fungorum novorum Agaricalium**. 2. ed. [s.l.] Sydowia, 1948.
- SOUTO, E. P. F. et al. Pythiosis in Equidae in Northeastern Brazil: 1985–2020. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 105, p. 103726, 1 out. 2021.
- SOUTO, E. P. F.; PESSOA, C. R. M.; PESSOA, A. F. A.; TROST, M. E.; KOMMERS, G. D.; CORREA, F. R.; & DANTAS, A. F. M. Esophageal pythiosis in an ostrich (*Struthio camelus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, p. 1081-1084, 2019.
- SPADOTTO, C. A. et al. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**, 2004.
- SPADOTTO, C. A. Avaliação de Riscos Ambientais de Agrotóxicos em Condições Brasileiras. p. 22, 2006.
- SRIPHANA, U. et al. Clauraila E from the roots of *Clausena harmandiana* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 9, p. 1078–1083, 1 set. 2013a.

- SRIPHANA, U. et al. New lignan esters from *Alyxia schlechteri* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. **Fitoterapia**, v. 91, p. 39–43, 1 dez. 2013b.
- STEBELSKA, K. Fungal Hallucinogens Psilocin, Ibotenic Acid, and Muscimol: Analytical Methods and Biologic Activities. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 35, n. 4, p. 420–442, ago. 2013.
- SUPABANDHU, J. et al. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. **Medical Mycology**, v. 46, n. 1, p. 41–52, 1 fev. 2008.
- SUTHIWONG, J. et al. Coumarinoids from the fruits of *Micromelum falcatum*. **Fitoterapia**, v. 94, p. 134–141, abr. 2014.
- Schurko, A. M., Mendoza, L., Lévesque, C. A., Désaulniers, N. L., De Cock, A. W., & Klassen, G. R. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. **Mycological research**, v. 107, n. 5, p. 537-544, 2003.
- SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIAH, U. R. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1–21, 2016.
- TIM, J. M. **Primavera fungi - Guia de Fungos do Sul do Brasil**. [s.l.] Via Sapiens, 2018. v. 1
- TOKESHI, H. Agricultural diseases and pests developed by chemical controls. **Fitopatologia brasileira**, v. 25, p. 264–270, 2000.
- TRIERVEILER-PEREIRA, L.; SULZBACHER, M.; BALTAZAR, J. **DIVERSIDADE DE FUNGOS BRASILEIROS E ALIMENTAÇÃO: O QUE PODEMOS CONSUMIR?** [s.l.: s.n.].
- TRISCOTT, J. A.; WEEDON, D.; CABANA, E. Human subcutaneous pythiosis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 20, n. 3, p. 267–271, 1993.
- TROLEZI, R. et al. *Stryphnodendron adstringens* and purified tannin on *Pythium insidiosum*: in vitro and in vivo studies. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 7, dez. 2017.
- VALENTE, J. et al. In Vitro Activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) in Its Free Oil and Nanoemulsion Formulations Against *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**, v. 181, n. 11/12, p. 865–869, dez. 2016a.

- VALENTE, J. D. S. et al. In Vitro Susceptibility of *Pythium insidiosum* to *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare* Essential Oils Combinations. **Mycopathologia**, v. 181, n. 7–8, p. 617–622, ago. 2016b.
- VALENTE, J. DE S. S. et al. In vitro anti-*Pythium insidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles. **Medical Mycology**, v. 57, n. 7, p. 858–863, 1 out. 2019.
- VALENTE, J. D. S. S., BRASIL, C. L., Braga, C. Q., ZAMBONI, R., Sallis, E. S. V., ALBANO, A. P. N., ... & PEREIRA, D. I. B. Biogenic silver nanoparticles in the treatment of experimental pythiosis Bio-AgNP in pythiosis therapy. **Medical Mycology**, v. 58, n.7, p. 913-918, 2020.
- VALENTE, J. S. et al. In vitro activity of antifungals in combination with essential oils against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 4, p. 998–1003, out. 2016c.
- VAMANU, E. Bioactive capacity of some Romanian wild edible mushrooms consumed mainly by local communities. **Natural Product Research**, v. 32, n. 4, p. 440–443, 16 fev. 2018.
- VANITTANAKOM, N. et al. Molecular detection of *Pythium insidiosum* from soil in Thai agricultural areas. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 3–4, p. 321–326, maio 2014.
- VELÁZQUEZ-NARVÁEZ, A. C. et al. *Agaricus subrufescens* en México: un recurso forestal no maderable, comestible, medicinal y potencialmente cultivable. **Madera y Bosques**, v. 24, n. 2, 27 ago. 2018.
- VOLCÃO, L. M. et al. Biological activity of aqueous extracts of Southern Brazilian mushrooms. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 31, n. 2, p. 148–159, 17 fev. 2021a.
- VOLCÃO, L. M. et al. Bioactive extracts of *Russula xerampelina* and *Suillus granulatus* in the in vitro control of *Pseudomonas aeruginosa* phytopathogenic. **South African Journal of Botany**, v. 140, p. 218–225, ago. 2021b.
- WEIBLEN, C. et al. Seroprevalence of *Pythium insidiosum* infection in equine in Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência Rural*, v.46, n.1, p.126-131, 2016.
- WEIBLEN, C.; ROBE, L. J.; DE AZEVEDO, M. I.; IANISKI, L. B.; STIBBLE, P. C.; RIIBEIRO, T. C.;... & BOTTON, S. D. A. New insights on evolutionary aspects of *Pythium insidiosum* and other peronosporaleans. *Mycoses*, v. 63,n.4, p. 395-406, 2020.

- WELLEHAN, J. F.; FARINA, L. L.; KEOUGHAN, C. G.; LAFORTUNE, M.; GROOTERS, A. M.; MENDOZA, L.; HEARD, D. J. Pythiosis in a dromedary camel (*Camelus dromedarius*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 35, n.4, p. 564-568, 2004.
- WORASILCHAI, N. et al. *In vitro* susceptibility of Thai *Pythium insidiosum* isolates to antibacterial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, e02099-19, 2020.
- WU, F. et al. Global diversity and taxonomy of the *Auricularia auricula-judae* complex (*Auriculariales*, *Basidiomycota*). **Mycological Progress**, v. 14, n. 10, p. 95, 24 set. 2015.
- YALTIRAK, T. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 47, n. 8, p. 2052–2056, ago. 2009.
- YOLANDA, H.; KRAJAEJUN, T. Review of methods and antimicrobial agents for susceptibility testing against *Pythium insidiosum*. **Heliyon**, v. 6, n. 4, p. e03737, 1 abr. 2020.
- YU, S. C.; OH, T. J. Antioxidant Activities and Antimicrobial Effects of Extracts from *Auricularia auricula-judae*. **Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition**, 2016.
- ZAMBRANO, C. G. et al. Influence of temperature on *in vitro* zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**, v. 56, n. 7, p. 877–883, 1 out. 2018.
- ZAMBRANO, C. G. et al. Óleo de girassol ozonizado: atividade anti-*Pythium insidiosum*. **R. bras. Med. equina**, p. 18–20, 2019.
- ZANETTE, R. A. et al. Micafungin alone and in combination therapy with deferasirox against *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, n. 1, p. 91–94, 2015.
- ZARO, D. et al. *Pythium insidiosum* em equino: Relato de caso. **PUBVET**, v. 12, n. 12, 2018.
- ZHOU, L.-W.; DAI, Y.-C. Phylogeny and taxonomy of poroid and lamellate genera in the *Auriculariales* (*Basidiomycota*). **Mycologia**, v. 105, n. 5, p. 1219–1230, 1 set. 2013.