



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Luiz Marcelo Ribeiro Tomé

Avaliação e padronização da técnica de espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF para identificação de Basidiomicetos (Hymenochaetaceae e Polyporaceae) e prospecção de peptídeos bioativos

BELO HORIZONTE

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Luiz Marcelo Ribeiro Tomé

Avaliação e padronização da técnica de espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF para identificação de Basidiomicetos (Hymenochaetaceae e Polyporaceae) e prospecção de peptídeos bioativos

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto (PPG Microbiologia - UFMG)

Co-orientadora: Profa. Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães (PPG Bioquímica e Imunologia UFMG)

BELO HORIZONTE

2019

Aos que sempre acreditaram em meu potencial.

“Educação não transforma o mundo.
Educação muda as pessoas.
Pessoas transformam o mundo”
Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido força e saúde.

Aos meus pais, pela luta para que eu sempre tivesse uma educação de qualidade, e por toda dedicação, amor e carinho durante a minha vida, seja ela pessoal, ou acadêmica.

A minha avó Maria de Lourdes (in memoriam), por sempre ter torcido pelo meu sucesso e por ter me ensinado durante os meus primeiros meses de pós-graduação e os últimos que tive o prazer de tê-la ao meu lado, qual o verdadeiro significado da vida.

A Tia Lúcia, Tio Ribeiro, Bruna e David (minha família mineira), por terem me recebido de braços abertos em Belo Horizonte. Serei eternamente grato a vocês, pois sem este apoio seria impossível concluir esta jornada.

Aos meus irmãos Murilo e Felipe, por todo o companheirismo, amor e torcida.

Aos meus companheiros de Laboratório e amigos, Paula Luize, Gabriel, Luz, Denner, Daniel, Aline e Mayara, por tornarem meu dia a dia mais leve, pelos conselhos e ajuda.

Aos meus amigos e irmãos, Ju, Rafa, Gabi e Gilberto por serem meu porto seguro aqui em BH, e por toda a paciência em meus momentos de angústia.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, em especial, Débora e Tiago, por todo o suporte durante a realização do meu mestrado.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, por todo o suporte e conhecimento compartilhado.

Ao Professor Dr. Henrique Figueiredo, por ter aberto as portas do AQUACEN para que eu pudesse realizar os meus experimentos do mestrado no MALDI Biotyper.

A Gabriella Borba do Laboratório AQUACEN por toda a ajuda com meus experimentos no MALDI Biotyper, e por toda a força e otimismo. Serei eternamente grato por todo o suporte.

Ao meu orientador Dr. Aristóteles Góes Neto, por todas as oportunidades a mim concedida, pela orientação, otimismo, confiança e profissionalismo. É um prazer estar ao seu lado nessa jornada acadêmica e científica.

A equipe do LBMCF por toda a parceria e união.

A Professora Dr. Mariana Quezado, pela ajuda, co-orientação, e por me permitir utilizar a estrutura do Laboratório Multiusuário de Proteômica para realizar meus experimentos.

A Adriana do Laboratório de Proteômica, por toda a ajuda durante meus experimentos com o HPLC e o MALDI-TOF.

A minha turma de mestrado, em especial Vivian, por todo o apoio e amizade durante a minha adaptação em BH, e na UFMG.

A minha família que está na Bahia por toda ajuda, carinho, amor e companheirismo, mesmo estando longe.

A Ramon, pela a ajuda na formatação da minha dissertação, pela paciência, e por ter se tornado esse amigo e companheiro no período de finalização do mestrado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa concedida durante todo o período de realização do mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE QUADROS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1 - REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	17
1.1 - Reino Fungi.....	17
1.2 - Filo Basidiomycota.....	20
1.3 - Família Hymenochaetaceae.....	22
1.4 - Família Polyporaceae.....	23
1.5 - Identificação de Fungos.....	24
1.6 - Identificação taxonômica através da Espectrometria de Massa.....	26
1.7 - Espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF.....	28
1.8 - Peptaibols (peptídeos bioativos).....	30
2 - JUSTIFICATIVA.....	32
3 - OBJETIVOS.....	33
3.1 - Objetivo geral.....	33
3.2 - Objetivos específicos.....	33
4 – FLUXOGRAMA.....	34
5 - METODOLOGIA.....	35
5.1 - Obtenção, reativação e preservação dos isolados.....	35
5.2 - Identificação morfológica.....	36
5.3 – Identificação molecular baseada no rDNA.....	36
5.4 - Análises filogenéticas.....	38
5.5 - Padronização da técnica de MALDI-TOF MS para a identificação de fungos.....	38
5.6 - Teste para otimização da técnica de IC/MS.....	41
5.7 - Análises estatísticas e dos espectros de massa.....	42

5.8 - Geração dos espectros de referência (MSP, main spectrum profile) e criação do banco de dados customizado (<i>in-house database</i>) para a identificação de basidiomicetos	42
5.9 - Análise de clusterização dos MSPs e componentes principais (PCA).....	43
5.10 - MALDI-TOF MS <i>real time identification</i>	43
5.11 - Influência do substrato e idade da cultura na identificação por MALDI-TOF MS	43
5.12 - Prospecção de peptídeos produzidos por fungos pertencentes ao filo Basidiomycota	44
5.12.1 - Preparação dos extratos de fungos	44
5.12.3 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	44
5.12.4 - Espectrometria de Massa por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz - Tempo de Voo (MALDI-TOF).....	45
6 - RESULTADOS.....	46
6.1 - Identificação morfológica e molecular baseada na região ITS do rDNA	46
6.2 - Análise Filogenética.....	48
6.3 - Padronização da técnica de MALDI-TOF MS para a identificação de Basidiomicetos	50
6.4 - Teste para otimização da técnica de IC/MS	53
6.5 - Criação e análise dos espectros de referência (MSP, <i>main spectrum profile</i>)	55
6.6 - Análise de clusterização (dendrograma)	58
6.7 - Análise de Componentes Principais (PCA)	59
6.8 - MALDI-TOF MS <i>Real Time Identification</i>	61
6.9 - Influência do substrato na identificação por MALDI-TOF MS.....	64
6.10 - Influência da idade da cultura na identificação por MALDI-TOF MS.....	68
6.11 - Prospecção de peptaibols produzidos por fungos pertencentes ao filo basidiomycota.....	70
7 – DISCUSSÃO	74
8 – CONCLUSÕES.....	81
9 – PERSPECTIVAS.....	82
10 – REFERÊNCIAS.....	83
11 – APÊNDICES	97
11.1 - Fotos da cultura dos isolados.....	97
11.2 - Espectros virtuais (MSPs) dos isolados estudados.....	101
11.3 - Programas e scripts utilizados para geração dos espectros virtuais	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Potencial de interação e utilização dos fungos.	18
Figura 2 - Árvore filogenética exibindo as relações entre os filos e classes do Reino Fungi.	19
Figura 3 - Basidiomas de (a) <i>Gonoderma parvulum</i> ; (b) <i>Pycnoporus sanguineus</i> ; (c) <i>Hymenochaete sp.</i> ; (d) <i>Hexagonia hydnoides</i>	21
Figura 4 - Desenho esquemático mostrando a região ITS entre os genes 18S, 5.8S e 28S em um trecho do rDNA.	26
Figura 5 - Representação esquemática da análise de MALDI, mostrando o processo de ionização.	29
Figura 6 - Componentes e funcionamento de um espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF. Em A são mostrados os componentes, dentre eles, o laser, o atenuador, o alvo, o eletrodo de aceleração, e o detector. Em B e C o funcionamento é ilustrado. Em B os íons alcançam o detector diretamente, e em C, após ter sido rejeitado por um refletor. O funcionamento do MALDI-TOF acontece a partir da emissão de pulsos de energia em direção ao alvo, o atenuador entre o laser e o alvo ajusta (afina) a energia do laser. Devido a excitação, as proteínas sofrem dessorção e ionização. Os íons formados são então acelerados em um campo elétrico e atravessam o tubo de voo até alcançarem o detector e serem registrados. Todo o sistema é operado sob condições de alto vácuo.	30
Figura 7 - Fluxograma mostrando as etapas para desenvolvimento do projeto de dissertação.	34
Figura 8 - Espectrômetro MALDI-TOF Biotyper Microflex (Bruker).	39
Figura 9 - Espectrômetro MALDI-TOF TOF Autoflex (Autoflex III smartbeam MALDI TOF/TOF MS).	45
Figura 10 - Árvore consenso de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (IB) baseada no conjunto de dados de sequências ITS (rDNA) dos isolados pertencentes ao filo Basidiomycota. Probabilidade Posterior (BPP) acima de 0,7 e valores de Bootstrap acima de 50% são mostrados.	49
Figura 11 - Gel virtual de proteínas comparando os espectros de massa gerados a partir dos protocolos 1 (561_AF_RX), 3 (561_TFA_RX) e 6 (561_MD_RX) em replicas técnicas (5).	51
Figura 12 - Comparação dos espectros de massa e gel de proteínas (parte superior) dos protocolos 1 e 3.	51
Figura 13 - Comparação dos espectros de massa e gel de proteínas (parte superior) dos protocolos 3 e 6.	52

Figura 14 - Comparação dos espectros de massa e gel de proteínas (parte superior) dos protocolos 1 e 6.....	52
Figura 15 - Taxa de sucesso na obtenção de espectros.	55
Figura 16 - MSP (espectro virtual) de <i>Ganoderma australe</i> (CCMB448), <i>Ganoderma sp.1</i> (DHCR379), <i>Ganoderma parvulum</i> (LMRT29) e <i>Ganoderma lucidum</i> (CCMB601). Picos com intensidade $\geq 20\%$ estão em vermelho e a relação m/z é mostrada. Setas em azul estão indicando os picos que são considerados biomarcadores para o gênero.	56
Figura 17 - MSP (espectro virtual) de <i>Fomitiporia neotropica</i> (CT203), <i>Fomitiporia impercepta</i> (GAS1037), <i>Fomitiporia neotropica</i> (GAS1183) e <i>Fomitiporia apiahyna</i> (GAS978). Picos com intensidade $\geq 20\%$ estão em vermelho e a relação m/z é mostrada. Setas em azul estão indicando os picos que são considerados biomarcadores para o gênero.....	57
Figura 18 - Dendrograma baseado nos MSPs gerado com o software MALDI Biotyper 3 mostrando a relação entre os 28 basidiomicetos estudados	59
Figura 19 - Diagrama de dispersão tridimensional (3D) da análise de componentes principais (PCA) para 4 espécies diferentes do gênero <i>Ganoderma</i>	60
Figura 20 - Diagrama de dispersão tridimensional (3D) da análise dos componentes principais (PCA) para 5 espécies diferentes do gênero <i>Fomitiporia</i>	60
Figura 21 - Comparação dos espectros de massa do fungo <i>Trametes villosa</i> (CCMB561) obtidos utilizando os meios de cultura MEA e PDA.	64
Figura 22 - Comparação dos espectros de massa do fungo <i>Ganoderma sp.1</i> (DHCR359) obtidos utilizando os meios de cultura MEA e PDA.....	65
Figura 23 - Comparação dos espectros de massa do fungo <i>Ganoderma lucidum</i> (CCMB601) obtidos utilizando os meios de cultura MEA e PDA.....	65
Figura 24 - Comparação dos espectros de massa do fungo <i>Fomitiporia neotropica</i> (CT203) obtidos utilizando os meios de cultura MEA e PDA.....	66
Figura 25 - Comparação dos espectros de massa do fungo <i>Lentinus crinitus</i> (GAS933) obtidos utilizando os meios de cultura MEA e PDA.....	66
Figura 26 - Comparação dos espectros de massa do fungo <i>Trametes villosa</i> (CCMB561) obtidos utilizando períodos diferentes de cultivo (10 dias e 6 meses)..	68
Figura 27 - Comparação dos espectros de massa do fungo <i>Ganoderma lucidum</i> (CCMB601) obtidos utilizando períodos diferentes de cultivo (10 dias e 6 meses)..	69

Figura 28 - Comparação dos espectros de massa do fungo <i>Lentinus crinitus</i> (GAS933) obtidos utilizando períodos diferentes de cultivo (10 dias e 6 meses).....	69
Figura 29 - Comparação dos espectros de massa do fungo <i>Fomitiporia neotropica</i> (CT203) obtidos utilizando períodos diferentes de cultivo (10 dias e 6 meses).....	70
Figura 30 - Cromatografia por CLAE do extrato de <i>Ganoderma sp.</i> DHCR379. O gradiente de acetonitrila + TFA 0,1% está representado em azul.....	71
Figura 31 - Espectro de massa por MALDI/TOF da fração F3 da amostra controle e F6 do extrato de <i>Ganoderma sp.</i> DHCR379.....	72
Figura 32 - Espectro de massa por MALDI/TOF da fração F2 da amostra controle e F5 do extrato de <i>Ganoderma sp.</i> DHCR379.....	72
Figura 33 - Espectro de massa por MALDI/TOF da fração F1 da amostra controle e F1 do extrato de <i>Ganoderma sp.</i> DHCR379.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Aplicações de enzimas lignolíticas em diferentes ramos da indústria.	22
Tabela 2 - Aplicações da Espectrometria de massa molecular.....	29
Tabela 3 - Isolados de fungos obtidos da CCMB-UEFS, UFRGS e LBMCF-UFMG.....	35
Tabela 4 - Protocolos utilizados para padronização na obtenção de espectros de massa.....	41
Tabela 5 - Identificação morfológica e molecular dos isolados.	46
Tabela 6 – Identificação final dos isolados a partir da abordagem integrativa das ferramentas de identificação clássica e molecular (baseada na região ITS), e número de acesso das sequências depositadas no GenBank.	47
Tabela 7 - Número de íons obtidos utilizando diferentes protocolos para obtenção de espectros de massa.....	51
Tabela 8 - Número de íons obtidos utilizando diferentes protocolos para obtenção de espectros.	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Identificação dos 28 isolados utilizando MALDI-TOF MS biotyper e a ferramenta de identificação em tempo real (Bruker Real Time Analysis).	61
Quadro 2 - Identificação dos cinco isolados cultivados em PDA utilizando o MALDI-TOF MS biotyper e a ferramenta de identificação em tempo real (Bruker Real Time Analysis).....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AF	Ácido Fórmico
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BS	<i>Bootstrap</i>
BSA	Albumina soro bovina
BPP	Probabilidade posterior
CCMB	Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Da	Dalton
dH_2O	Água destilada
ddH_2O	Água destilada e deionizada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EM	Espectrometria de Massa
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
Hz	Hertz
IC/IS	Célula Intacta/Esporo Intacto
IC/MS	Espectrometria de Massa de célula intacta
ITS	Espaçador Interno Transcrito
kDa	Kilodalton
kV	quilovolt
Log	Logaritmo (base 10)
M	Molar
MALDI	Ionização/dessorção a laser assistida por matriz
MEA	Extrato de Malte Ágar
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
Milli-Q	Água ultrapura
mL	mililitro

mm	milímetro
mM	milimolar
min	minutos
MSP	<i>Main Spectrum Profile</i>
<i>m/z</i>	Razão massa-carga
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PAHs	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PDA	Batata Dextrose Ágar
rDNA	DNA ribossomal
PCA	Análise de componentes principais
PEG	Polietilenoglicol
Taq	DNA polimerase termoestável
TFA	Ácido Trifluoroacético
TOF	Tempo de voo (do inglês, Time of Flight)
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

RESUMO

Os fungos formam um grupo de organismos que apresenta alta diversidade taxonômica e funcional e, portanto, são de grande interesse biotecnológico. Atuam na decomposição da madeira e de resíduos industriais, desempenhando papel fundamental na ciclagem de nutrientes. Além disto, produzem diversas biomoléculas oriundas do metabolismo primário e secundário, como polissacarídeos, peptídeos, enzimas, entre outras, que desempenham por exemplo, atividade antitumoral, anti-inflamatória, imunomoduladora e antimicrobiana. Estimativas sugerem que existam 5,1 milhões de espécies de fungos na natureza, das quais aproximadamente 10% foram descritas até o momento. Hymenochaetaceae e Polyporaceae são duas famílias que compõem os fungos do filo Basidiomycota, podem ser patógenos de plantas, produzem enzimas de interesse industrial e exercem papel importante na degradação da matéria orgânica. Apesar da grande diversidade e importância econômica dos fungos, este ainda é um grupo de micro-organismos que precisa ser mais estudado. Desta forma, estudos relacionados com a identificação taxonômica de espécies, bem como aqueles focados na prospecção e na identificação de moléculas bioativas produzidas por estes organismos são de grande interesse e importância, tanto do ponto de vista científico, como comercial. Atualmente, a identificação de fungos ao nível de espécie é baseada em caracteres morfológicos (macroscópicos e microscópicos) e na identificação molecular por DNA *barcode* (padrão ouro). O primeiro é dependente de profissionais especializados (micologistas) e o segundo é dispendioso, demorado e susceptível a contaminação ambiental. Nas últimas décadas, a espectrometria de massa surgiu como uma alternativa para a identificação de bactérias e fungos de interesse clínico, entretanto, poucos estudos têm utilizado esta técnica na identificação de fungos de interesse biotecnológico. Diante deste contexto, os objetivos do presente trabalho foram: (i) padronizar a identificação taxonômica de fungos das famílias Hymenochaetaceae e Polyporaceae utilizando a técnica de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) (ii) criar um banco de dados de espectros de referência para a identificação de espécies dessas duas famílias e (iii) prospectar e identificar peptídeos com potencial biotecnológico. Por meio da execução deste trabalho, demonstramos que o melhor protocolo para a obtenção do espectro de massa é aquele que elimina o passo de extração prévia de proteínas, e usa o micélio diretamente na placa alvo do MALDI-TOF MS (espectrometria de célula intacta). Um banco de dados customizado (*in-house database*) foi criado utilizando 28 isolados previamente identificados neste trabalho através de caracteres morfológicos (taxonomia clássica) e da região ITS do rDNA. Depois de construído, este foi testado usando a ferramenta de identificação em tempo real da Bruker, e todos os isolados testados apresentaram um *score* de identificação > 2.000, indicando uma identificação confiável ao nível de espécie. Desta forma, concluímos que esta técnica é altamente eficiente para a identificação das duas famílias testadas ao nível de espécie, e é suficientemente robusta para diferenciar táxons intimamente relacionados. Extratos contendo os metabólitos dos isolados *Trametes villosa* (CCMB561), *Ganoderma sp. 1* (DHCR379) e *Fulvifomes nilgheriensis* (GAS917) foram produzidos para a prospecção de peptaibols, contudo, nenhum dos três isolados demonstrou potencial para a produção desses peptídeos nas condições testadas.

Palavras-chave: Basidiomycota, identificação de fungos, espectrometria de célula intacta, MALDI-TOF MS, peptaibols.

ABSTRACT

Fungi comprise a group of organisms that have high taxonomic and functional diversity, and therefore, are of great biotechnological interest. They can act in wood decomposition and industrial waste, playing a fundamental role in the nutrients cycling. In addition, they produce various biomolecules derived from primary and secondary metabolism, such as polysaccharides, peptides, enzymes, among others, which perform, for example, antitumor, anti-inflammatory, immunomodulatory and antimicrobial activity. Estimates suggest that there are 5.1 million fungal species in the world, of which approximately 10% have been described so far. Hymenochaetaceae and Polyporaceae, which are part of the phylum Basidiomycota, can act as plant pathogens, produce enzymes of industrial interest, and play an important role in the degradation of organic matter. Despite the great diversity and economic importance of fungi, this is still a group of microorganisms that needs to be further studied. Thus, studies related to the taxonomic identification of species, as well as those focused on the prospection and identification of bioactive molecules produced by these organisms are of great interest and importance, both from a scientific and commercial point of view. Currently, the identification of fungi at the species level is based on morphological (macroscopic and microscopic) and molecular identification by DNA barcoding (gold standard). The first is dependent on specialized professionals (mycologists) and the second is expensive, time consuming and susceptible to environmental contamination. In the last decades, mass spectrometry has emerged as an alternative for the identification of bacteria and fungi of clinical interest, however, few studies have used this technique in the identification of fungi of biotechnological interest. In this context, the goals of this work were (i) to standardize the taxonomic identification of fungi of the families Hymenochaetaceae and Polyporaceae using the mass spectrometry tool (MALDI-TOF MS), (ii) to create a spectra reference database (protein fingerprints) for the identification of species of these two families, and (iii) to prospect and identify peptides with biotechnological potential. Herein, we demonstrate that the best protocol for obtaining the mass spectrum is one that eliminates the step of pre-extracting proteins and uses the mycelium directly on the MALDI target plate (intact cell mass spectrometry). An in-house database was created using 28 isolates previously identified in this work using morphological characters (classical taxonomy) and the ITS region of rDNA. After this database had built, it was tested using Bruker's real-time identification tool, and all the isolates tested had a score > 2.000 , indicating a reliable identification at the species level. We conclude that this technique is highly efficient for the identification of the two families tested at the species level and is sufficiently robust to differentiate closely related taxa. Extracts containing the metabolites of the isolates *Trametes villosa* (CCMB561), *Ganoderma sp. 1* (DHCR379) and *Fulvifomes nilgheriensis* (GAS917) were produced to prospect peptaibols, however, none of the three isolates demonstrated potential for the production of these peptides under the conditions tested.

Keywords: Basidiomycota, fungal identification, MALDI-TOF MS, intact cell mass spectrometry, peptaibols.

1 - REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

1.1 - Reino Fungi

Os fungos compreendem um dos maiores grupos de organismos eucarióticos na Terra, apresentam ampla diversidade taxonômica e funcional (Figuras 1 e 2), e alta plasticidade (BLACKWELL, 2011; RAJA *et al.*, 2017). Os membros do Reino Fungi são considerados ubíquos, possuindo a capacidade de crescer em quase todos os habitats do planeta, desta forma, ocupam uma ampla variedade de nichos naturais e artificiais, e exercem papéis primordiais na vida humana (RASPOR & ZUPAN, 2006; RAJA *et al.*, 2017). Estes, são heterotróficos, predominantemente aeróbios ou fermentadores facultativos, se reproduzem sexuadamente ou assexuadamente, obtêm nutrientes por absorção, são eficientes na degradação de um amplo espectro de substratos, possuem parede celular composta comumente por glicanas e quitina e podem apresentar-se sob a forma micelial (fungos filamentosos e multicelulares) ou leveduriforme (fungo unicelular) (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004; LOGUERCIO-LEITE & ESPOSITO, 2004; RAVEN; EVERT & EICHHORN, 2007; WEBSTER & WEBER, 2007).

O Reino Fungi compreende organismos que são ecologicamente importantes como decompositores da matéria orgânica, possuem importância médica como patógenos, e econômica, já que produzem uma extensa variedade de produtos naturais, metabólitos secundários com atividade biológica, e apresentam diversas aplicações na indústria farmacêutica, de biocombustíveis, alimentícia, têxtil e de cosméticos (MOORE & CHIU 2001; ESPOSITO & AZEVEDO, 2004; LOGUERCIO-LEITE & ESPOSITO, 2004; MENDONÇA; CASTRO & TELLES, 2010; RAJA *et al.*, 2017).

Os fungos estabelecem relações simbióticas importantes com outros organismos, as quais podem ser benéficas para ambos os componentes da associação (mutualismo), como no caso das micorrizas (relação entre fungos e raízes), presente em pelo menos 90% das plantas vasculares. Além disso, estes podem ser sapróbios, de vida livre ou endofíticos (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004; LOGUERCIO-LEITE & ESPOSITO, 2004; RAVEN; EVERT & EICHHORN, 2007; WEBSTER & WEBER, 2007; SMITH & READ, 2008).

Alguns autores estimam que existam em torno de 1,5 milhões de espécies no Reino Fungi, e que entre 80.000 e 120.000 tenham sido descritas (HAWKSWORTH, 2001; KIRK *et al.*, 2008; WEBSTER & WEBER, 2007). Contudo, estimativas atuais sugerem que existam

5,1 milhões de espécies, das quais apenas 5-10% foram descritas (BLACKWELL, 2011; HIBBETT *et al.*, 2011). Apesar dos esforços para estimar o número provável de fungos que existem na Terra, ainda há grandes divergências entre as estimativas que vem sendo propostas.

Os fungos são classificados comumente como pertencentes a oito filos: Ascomycota, Basidiomycota, Zoopagomycota, Mucoromycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Microsporidia e Cryptomycota (Figura 2) (SPATAFORA *et al.* 2017). Os filos Ascomycota e Basidiomycota fazem parte do sub-reino Dikarya por compartilharem hifas dicarióticas, sendo que neste clado estão a grande maioria das espécies de fungos já descritas (em torno de 98% do total) (JAMES *et al.*, 2006; CANNON & KIRK, 2007; HIBBETT *et al.*, 2007; HIBBETT, 2014; HAWKSWORTH & LÜCKING 2017).

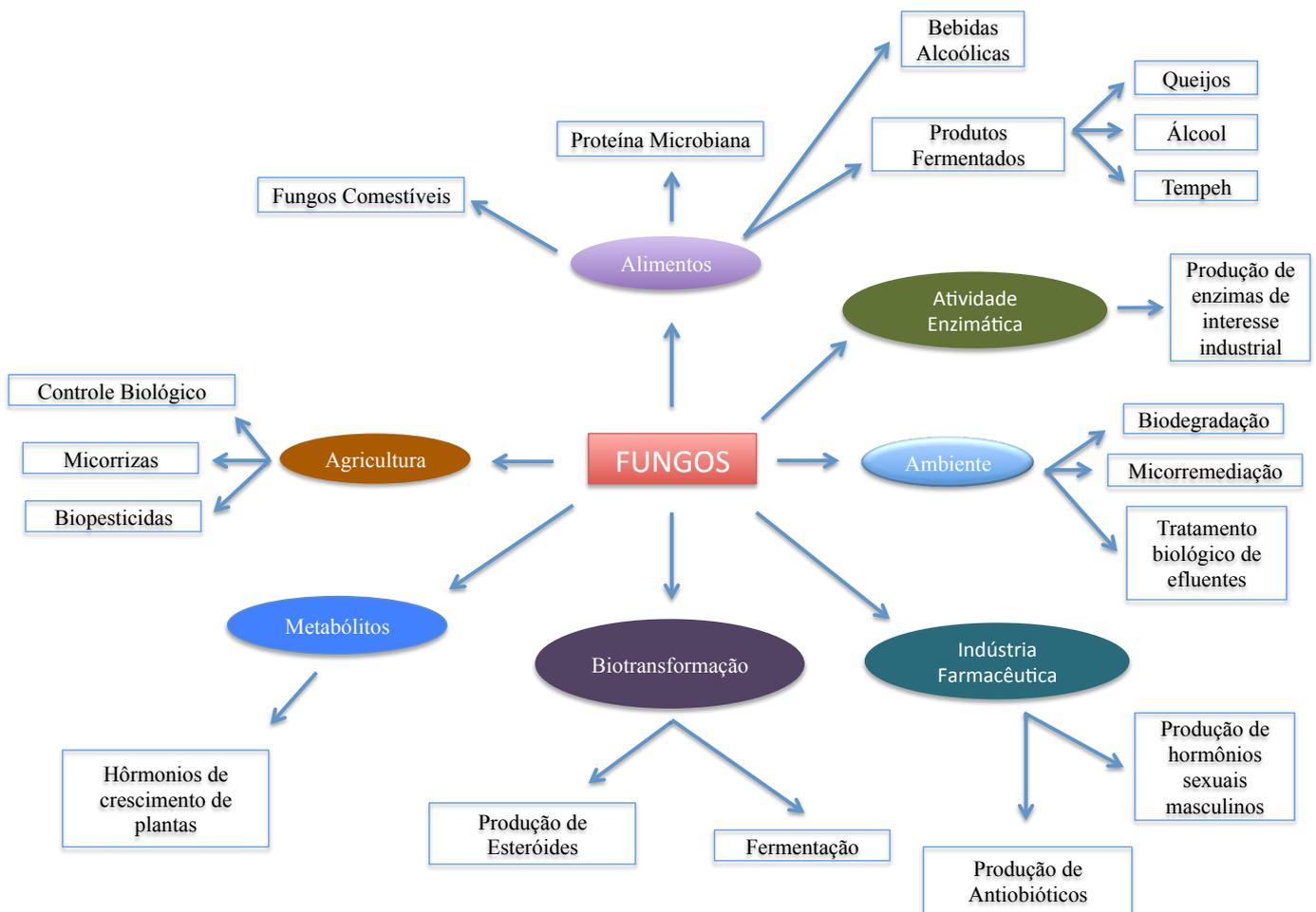


Figura 1 - Potencial de interação e utilização dos fungos. (Fonte: Adaptado de ESPOSITO & AZEVEDO, 2004)

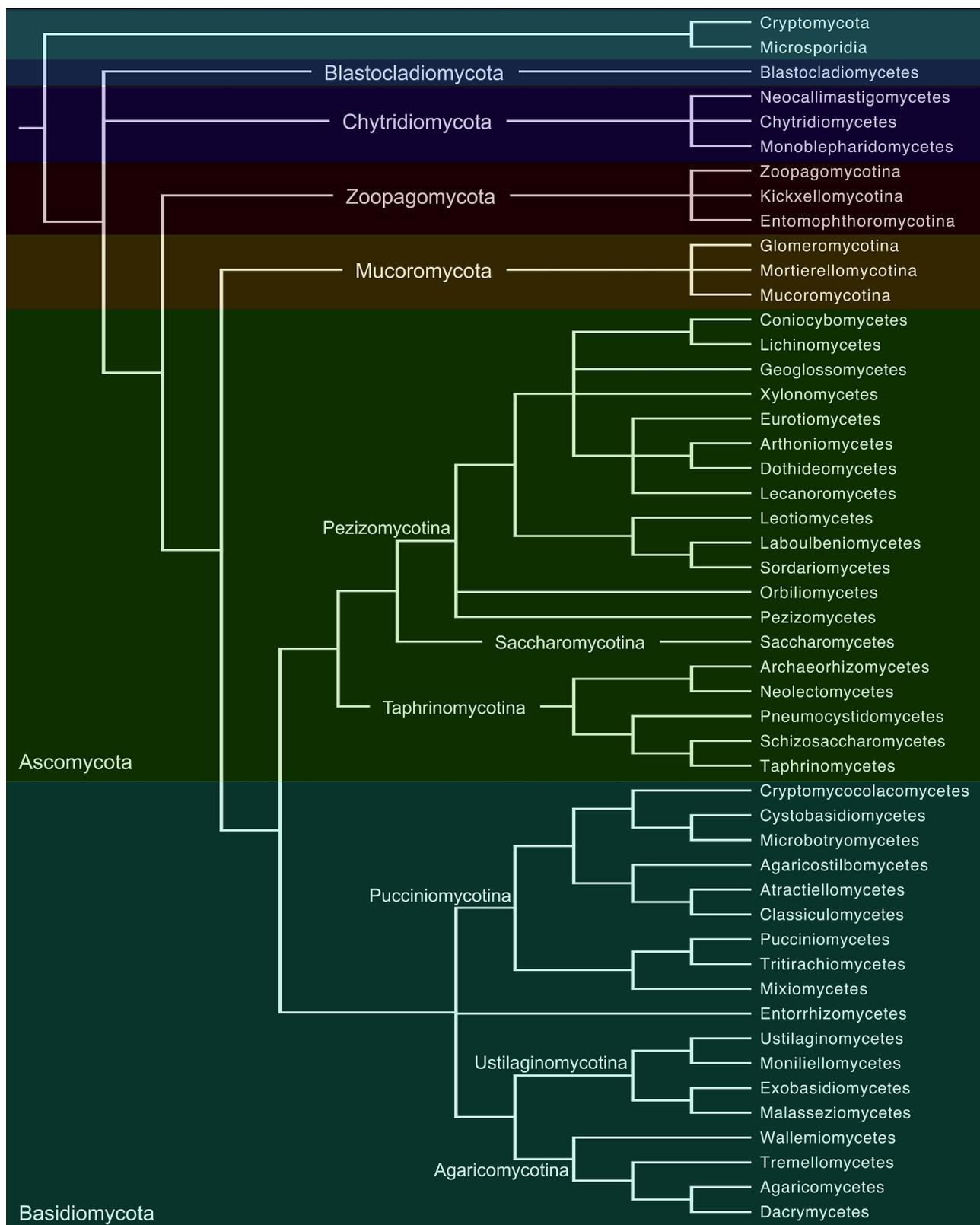


Figura 2 –Árvore filogenética exibindo as relações entre os filós e as classes do Reino Fungi gerada com base em filogenias publicadas utilizando múltiplos genes e genomas (Fonte: SPATAFORA *et al.* 2017).

1.2 - Filo Basidiomycota

O Filo Basidiomycota R.T. Moore (1980) engloba 16 classes, 52 ordens, 177 famílias, 1.589 gêneros e mais de 30 mil espécies identificadas, sendo um dos grupos mais diversos e estudados dentro do Reino Fungi - aproximadamente 32% dos táxons já descritos pertencem a este filo (WEBSTER & WEBER, 2007; KIRK *et al.*, 2008; DAI *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2017). Os basidiomicetos podem ser classificados de acordo com o hábito de vida em: sapróbios, simbióticos ou parasitas. Os primeiros atuam na decomposição da matéria orgânica, os simbióticos apresentam relações mutualísticas com outros organismos, como por exemplo, com plantas, enquanto que os patogênicos infectam plantas e animais (LOGUERCIO-LEITE, 2004; SCHMIDT-DANNERT, 2016). A maioria das espécies de basidiomicetos é terrestre, podendo também crescer em habitats de água continental hiposalina ou marinho (LOGUERCIO-LEITE, 2004; WEBSTER & WEBER, 2007).

Muitos basidiomicetos produzem basidiomas (Figura 3), estruturas macroscópicas que protegem os esporos (basidiósporos), que são produzidos e ancorados em estruturas denominadas basídios. Estes componentes estão presentes no ciclo de vida sexuado do fungo e são características diagnósticas, tradicionalmente utilizadas para a identificação dos microorganismos pertencentes a este filo (LOGUERCIO-LEITE, 2004; JAMES *et al.*, 2006; WEBSTER & WEBER, 2007; MOORE; ROBSON & TRINCI, 2011; SCHMIDT-DANNERT, 2016; ZHAO *et al.*, 2017).

Os fungos pertencentes a este grupo taxonômico são provavelmente os principais contribuidores para a decomposição da madeira, e o fazem por meio da produção de enzimas extracelulares de ação hidrolítica e oxidativa. Estas enzimas atuam na degradação dos principais componentes da matéria vegetal, apresentando desta maneira papel fundamental no ciclo do carbono, e grande importância nos ecossistemas florestais (FERRAZ, 2004; LOGUERCIO-LEITE, 2004; SINGH & SINGH, 2014; SCHMIDT-DANNERT, 2016; ZHAO *et al.*, 2017).

As pesquisas científicas vêm contribuindo com o conhecimento sobre os aspectos bioquímicos e moleculares da degradação da madeira por basidiomicetos, o que aumenta as possibilidades de emprego dos fungos ou de seus produtos metabólicos de forma otimizada e direcionada (SINGH & SINGH, 2014). Os basidiomicetos, especificamente aqueles relacionados à podridão branca (que possuem a capacidade de degradar todos os componentes da madeira), têm sido objeto de estudo de diversos grupos de pesquisa por produzirem enzimas oxidativas (Lignina Peroxidase, Manganês Peroxidase, Lacase). Estas enzimas atuam

de forma eficiente na degradação do material lignocelulósico formado majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina que, em conjunto, formam o complexo celular dos vegetais (DURÁN, 2004; FERRAZ, 2004).

Os basidiomicetos também são utilizados como alimento para o homem e animais, constituindo uma fonte de carboidratos e proteínas (comumente possui entre 20-30% de proteína bruta em relação a porcentagem de matéria seca), incluindo aminoácidos essenciais, possuem baixos níveis de gordura, e é livre de colesterol (MOORE & CHIU 2001). *Agaricus brunnescens*, *Volvariella volvacea*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* são exemplos de espécies comestíveis cultivadas com finalidade comercial. Outras aplicações e características dos fungos basidiomicetos incluem a produção de substâncias antibióticas (*Pycnoporus sanguineus*), utilização no clareamento de efluentes industriais (indústria têxtil e de celulose), biorremediação de solos, uso na medicina tradicional, produção de biocombustíveis e biocatálise (LOGUERCIO-LEITE, 2004; MENDONÇA; CASTRO & TELLES 2010; GADD, 2013; ZHAO *et al.*, 2017). Na tabela 1 são mostradas algumas enzimas produzidas por fungos deste grupo e as aplicações biotecnológicas associadas.



Figura 3 - Basidiomas de (a) *Gonoderma parvulum*; (b) *Pycnoporus sanguineus*; (c) *Hymenochaete* sp.; (d) *Hexagonia hydroides* (Fonte: Arquivo pessoal).

Tabela 1- Aplicações de enzimas ligninolíticas em diferentes ramos da indústria (Adaptada de MENDONÇA; CASTRO & TELLES 2010).

Indústria Alimentícia	Aplicações específicas das Enzimas
Lacase	Remoção de fenóis de alimentos e bebidas Determinação de ácido ascórbico
Lignina Peroxidase	Fonte de aromas naturais Produção de Vanilina
Manganês Peroxidase	Produção de sabores aromáticos naturais
Indústria de Papel e Celulose	
Lacase	Despolimerização da lignina Deslignificação de polpas de madeira Branqueamento de polpa de Kraft
Lignina Peroxidase	Descoloração de polpa de Kraft Efluentes de fábrica
Manganês Peroxidase	Branqueamento de polpa de Kraft
Indústria Têxtil	
Lacase	
Lignina Peroxidase	Degradação de tintas têxteis e branqueamento
Manganês Peroxidase	
Biorremediação	
Lacase	Biodegradação de xenobióticos Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs)
Lignina Peroxidase	Degradação de corantes azo, heterocíclicos, reativos e poliméricos Mineralização de contaminantes ambientais Degradação de xenobióticos e pesticidas
Manganês Peroxidase	Degradação de PAH's

1.3 - Família Hymenochaetaceae

Hymenochaetaceae Imazeki & Toki (1954) (Hymenochaetales, Basidiomycota) é uma importante família pertencente ao filo Basidiomycota, que apresenta grande relevância econômica e biotecnológica. Muitas espécies desta família são boas produtoras de enzimas de

interesse industrial, são fungos medicinais, patógenos de árvores exploradas pela indústria de celulose, e exercem papel fundamental na decomposição da madeira (CANNON & KIRK, 2007; DAI *et al.*, 2007; DAI *et al.*, 2009; DAI, 2010; HE & DAI, 2012; PIRES & GUGLIOTTA, 2016).

As principais características que definem este grupo são a presença de setas, septos nas hifas generativas, reação xantocróica¹ positiva permanente, ausência de grampos de conexão, basidioma amarelo a marrom (Figura 3C), e causam a podridão branca em árvores. A maioria das espécies possui distribuição tropical e são saprófitas ou parasitas (facultativas e/ou obrigatórias) em uma grande diversidade de árvores (angiospermas e gimnospermas) (RYVARDEN 1991; CANNON & KIRK, 2007; DAI, 2010; HE & DAI, 2012).

Espécies deste grupo, como por exemplo, o cogumelo *Phellinus baumi*, são usadas na medicina tradicional para combater doenças, como câncer e diabetes. SHON *et al.* (2003), estudaram a atividade de extratos de *Phellinus baumi*, e estes demonstraram alta atividade antioxidante, e atividade no sequestro de radicais livres. LIU *et al.* (2017), a partir de extratos do fungo *Fomitiporia punctata* (P. Karst.) Murrill obteve uma nova fração polissacarídica (G1) e demonstrou-se que esta possui efeitos antioxidantes significativos, é uma excelente sequestradora de radicais DPPH e pode ser considerada um antioxidante natural.

1.4 - Família Polyporaceae

Os fungos da família Polyporaceae Corda (1939) (Polyporales, Basidiomycota) são raramente corticioides², possuem sistema hifal, na maioria das vezes dimítico ou trimítico, possuem grampos de conexão, esporos com paredes finas a espessas, lisa ou ornamentada, e cistídio na maioria das vezes ausentes. Estas são algumas das características diagnósticas para a identificação deste grupo taxonômico (CANNON & KIRK, 2007; JUSTO *et al.*, 2017).

A família apresenta distribuição cosmopolita e as espécies pertencentes a este grupo podem ocorrer parasitando raízes e vivendo tanto no interior como sobre a madeira, causando a podridão branca (CANNON & KIRK, 2007; GLEN *et al.*, 2009; KINGE & MIH, 2011, JUSTO *et al.*, 2017).

As espécies da família Polyporaceae estão associadas a doenças em plantas, como por exemplo, a espécie *Ganoderma philipii*, que causa a podridão radicular de cacau e café (CANNON & KIRK, 2007). Contudo, espécies do gênero *Ganoderma* também estão associadas a efeitos benéficos em humanos, sendo utilizados principalmente na medicina

¹ Xantocróica: reação com KOH 3-5% (K+ negro).

² Corticioides: Basidiomas lisos e efusos.

tradicional oriental (especialmente na China), possuindo várias preparações (produtos) disponíveis no mercado (CANNON & KIRK, 2007).

Ganoderma lucidum é um exemplo de espécie desta família que tem sido objeto de interesse para diversos estudos farmacológicos, e já foi provado que, tanto seus extratos complexos quanto as substâncias purificadas podem: (i) inibir o crescimento/multiplicação de células cancerígenas, (ii) promover respostas imunológicas *in vivo* e *in vitro*, (iii) atuar na regulação do sistema nervoso e respiratório, (iv) aumentar a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, (v) dentre outras atividades biológicas (GAO *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2006; CHANG *et al.*, 2009; GONZÁLEZ MUÑOZ; BOTERO OROZCO & LÓPEZ GARTNER, 2014; DE MENEZES *et al.*, 2016). Todo o interesse para o estudo desse grupo se deve aos inúmeros compostos bioativos (polissacarídeos, ácidos ganodéricos, ergosteróis, proteínas, ácidos graxos insaturados, vitaminas e minerais) produzidos por estes fungos (ZHOU *et al.*, 2007).

Espécies de outros gêneros, como por exemplo, *Trametes villosa*, já foram reportadas na literatura como produtoras de enzimas ligninocelulolíticas, atuando eficientemente na decomposição da madeira (CARNEIRO *et al.*, 2017).

1.5 - Identificação de Fungos

A identificação de fungos ao nível de espécie é uma etapa essencial para o desenvolvimento de estudos básicos (ecologia, taxonomia, biogeografia), pesquisas aplicadas (genômica, bioprospecção e biotecnologia), bem como, para associar uma espécie as suas propriedades e características (RAJA *et al.*, 2017). Identificações errôneas podem ser responsáveis por significativas perdas econômicas em diversas áreas, como, na indústria, saúde, e agricultura, desde que, estas podem levar a utilização de tratamentos inadequados ou aplicações equivocadas do micro-organismo de interesse.

Atualmente, a identificação de fungos é realizada preliminarmente e primariamente por meio da análise de caracteres morfológicos (taxonomia clássica), tais como, aspectos da colônia/micélio (textura, cor), análise das estruturas reprodutivas e observação do crescimento em diferentes condições de cultivo. A observação e o registro destes caracteres são relativamente fáceis, e têm sido utilizados para identificar, classificar e inferir relações filogenéticas (TALBOT, 1971; CHALUPOVÁ *et al.*, 2014; JAYASIRI *et al.*, 2015). Contudo, a taxonomia clássica pode ser considerada uma ferramenta limitada, pois, muitas estruturas reprodutivas são produzidas temporariamente e com pouca frequência, alguns

táxons possuem complexos de espécies crípticas, e esta ainda pode se tornar difícil e altamente subjetiva entre os fungos assexuais ou os que não esporulam em condições de cultura, o que torna a identificação difícil até mesmo para especialistas (BICKFORD *et al.*, 2007; JAYASIRI *et al.*, 2015; PRISTAŠ *et al.*, 2017). Desta forma, a probabilidade de identificações errôneas ou não confiáveis ao nível de espécie, é eminente para determinados táxons, além do que, as características fenotípicas podem não refletir as relações filogenéticas, pois muitas delas estão sujeitas a plasticidade, paralelismo e reversão (SANTOS *et al.*, 2010; CHALUPOVÁ *et al.*, 2014; JAYASIRI *et al.*, 2015; BADOTTI *et al.*, 2017).

Como consequência, ferramentas baseadas na utilização de sequências de DNA (biomarcadores) emergiram como um método complementar a taxonomia clássica, de forma a alcançar identificações mais precisas ao nível de espécie, e também permitir reconstruções das relações evolutivas entre os organismos de forma mais acurada. Devido a sua especificidade e capacidade de permitir a determinação e diferenciação de táxons fortemente relacionados, esta ferramenta vem sendo amplamente utilizada e se tornou o padrão ouro para a identificação dos mais diversos organismos.

A região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) que pertence ao rDNA nuclear e abrange as regiões ITS1, 5.8S e ITS 2 (Figura 4), é considerada o código de barras primário de fungos e tem sido o marcador genético usualmente utilizado para a identificação, sistemática e filogenia deste grupo de organismos (SCHOCH *et al.*, 2012; BADOTTI *et al.*, 2017; BADOTTI *et al.*, 2018). Apesar da identificação molecular baseada no DNA ser um método preciso, e que algumas vezes dispensa o cultivo do micro-organismo, este ainda envolve um fluxo de trabalho muito longo (múltiplos procedimentos), fazendo com que todo o processo de identificação seja demorado, dispendioso e suscetível a contaminação ambiental, além do que, marcadores moleculares baseados em DNA nem sempre são adequados para a identificação de determinados táxons de fungos (CHALUPOVÁ *et al.*, 2014; NORMAND *et al.*, 2013; BECKER *et al.*, 2014; SUGAWARA *et al.*, 2016; BADOTTI *et al.*, 2017).

Desta forma, a busca por novas técnicas para a identificação rápida, simples, e confiável de fungos ainda é um desafio (ARAUJO, 2014). Nos últimos anos, a espectrometria de massa surgiu como aliada nesta tarefa por tratar-se de um método rápido, simples, e fácil, no qual os micro-organismos são identificados com base em um perfil de proteínas espécie-específico que varia de 2 a 20 kDa (FENSELAU & DEMIREV, 2001; SANTOS *et al.*, 2010; CROXATTO *et al.*, 2012).

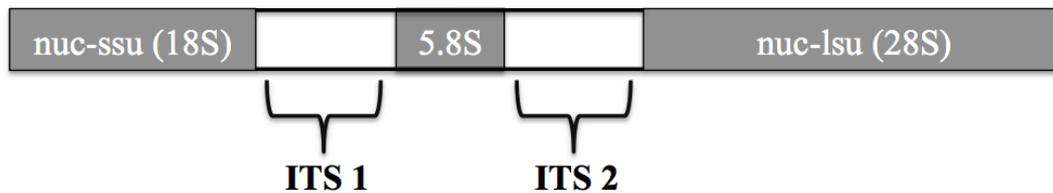


Figura 4 - Desenho esquemático mostrando a região ITS entre os genes 18S, 5.8S e 28S em um trecho do rDNA.

1.6 - Identificação taxonômica através da Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa tem sido utilizada nas últimas duas décadas como uma ferramenta alternativa e complementar para a identificação de micro-organismos, especificamente de bactérias e fungos. Este método apresenta boa resolução, é rápido, preciso, fácil de usar, e não laborioso, sendo utilizado até mesmo para a diferenciação de espécies crípticas e patótipos³. Esta ferramenta está se tornando cada vez mais reconhecida, por ser mais rápida e confiável que a taxonomia clássica, ou mesmo que a identificação por meio do DNA (VEEN, CLAAS & KUIJPER, 2010; PUTIGNANI *et al.*, 2011; ZAUTNER *et al.*, 2013; CHALUPOVÁ *et al.*, 2014; BEINHAUER *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2017). Esta técnica baseia-se na obtenção de espectros de massa de proteínas (*protein fingerprints*) de um isolado desconhecido, o qual é identificado pela comparação do seu espectro, com aqueles que estão depositados em banco de dados de referência (BADER *et al.*, 2011; NORMAND *et al.*, 2013; BECKER *et al.*, 2014). Em geral, detecta-se proteínas com massa molecular na faixa de 2 a 20 kDa, sendo estas utilizadas como marcadores específicos dos táxons (ERHARD *et al.*, 2008; REICH *et al.*, 2013). Os espectros de massa são espécie-específicos, e já foi comprovado que estes são apropriados para a identificação de micro-organismos aos níveis de espécie e subespécie (FENSELAU & DEMIREV, 2001; CROXATTO *et al.*, 2012; BEINHAUER *et al.*, 2016).

Para bactérias, o método de identificação por meio da espectrometria de massa encontra-se padronizado, sendo necessário apenas transferir uma única colônia para a placa alvo do MALDI-TOF, e recobri-la com a matriz orgânica (ASSIS *et al.*, 2017). Depois da obtenção dos espectros, este é comparado com a base de dados existente, e uma identificação é associada ao isolado em estudo.

³ Patótipos: Raças fisiológicas que diferem em sua virulência.

Para fungos a técnica é similar, contudo, há divergência em relação ao passo inicial, devido a célula fúngica possuir parede celular rígida, assim, em muitos artigos é reportada a necessidade de realizar a extração prévia de proteínas para a obtenção de espectros de massa de qualidade e reprodutíveis (VAN VEEN; CLAAS & KUIJPER, 2010; DEL CHIERICO *et al.*, 2012; NORMAND *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2017; PRISTAŠ *et al.*, 2017). Entretanto, também há a possibilidade da utilização de células intactas (espectrometria de massa de célula intacta/esporo intacto por MALDI-TOF) para a aquisição de espectros e posterior identificação (SCHMIDT & KALOW, 2005; BEINHAUER *et al.*, 2016; DA CUNHA *et al.*, 2018).

Após a obtenção dos espectros, o nível de similaridade entre a espécie a ser estudada (espécie desconhecida) e a espécie referência é indicado por meio de um algoritmo matemático que fornece um valor de *log* (calculado por meio da comparação dos picos do espectro do isolado desconhecido com o padrão espectral principal de referência (MSP) do banco de dados), o qual indica a confiabilidade da identificação ao nível de espécie e gênero. O valor de *log* varia entre 0.000 - 3.000, quando este é > 2.000 , há alta probabilidade de identificação ao nível de espécie, um score entre 1.700 e 1.990 indica identificação confiável ao nível de gênero, e um score < 1.700 indica uma identificação não-confiável (BECKER *et al.*, 2014).

O principal pré-requisito para o sucesso da identificação por meio da espectrometria de massa é a representatividade e qualidade dos bancos de dados. Estes precisam possuir espectros de referência de isolados taxonomicamente validados (ERHARD *et al.*, 2008). A maioria dos trabalhos publicados na área de identificação de micro-organismos por EM tem focado nos estudos em bactérias e fungos de interesse clínico, principalmente ascomycetos. Assim, há a necessidade de bibliotecas de espectros mais representativas, que consigam abranger a grande maioria dos fungos, tanto de interesse clínico como ambiental, pois assim, aumentaria a robustez e confiabilidade da identificação baseada na técnica de MALDI-TOF MS (BECKER *et al.*, 2014).

Notavelmente, ainda há poucos estudos voltados para a identificação/caracterização de fungos filamentosos, especificamente de basidiomicetos, utilizando o método de MALDI-TOF MS. SCHMIDT & KALOW (2005) usaram o método para diferenciar basidiomicetos degradadores da madeira, SUGAWARA *et al.*, 2016 utilizando cogumelos selvagens mostraram que a técnica de MALDI-TOF MS é eficiente para a identificação usando basidiomas, e PRISTAŠ *et al.* (2017) usaram a técnica para a discriminação entre espécies de

fungos degradadores de madeira dos gêneros *Fomitopsis*, *Rhodofomes*, *Fomes* e *Ganoderma* (Polyporaceae, Basidiomycota).

1.7 - Espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF

O MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*) ou ionização/dessorção a laser assistida por matriz, é uma técnica de espectrometria de massa molecular com aplicações em diferentes campos do conhecimento (Tabela 2). Esta técnica revolucionou os estudos de biopolímeros, permitindo a análise de proteínas e de outras biomoléculas com uma resolução/sensibilidade várias vezes aumentada (DASS, 2007; SKOOG *et al.*, 2015).

No espectrômetro de massa do tipo MALDI, a amostra (analito) é transferida para uma pequena placa metálica e misturada ou coberta com uma matriz orgânica, sendo que a mais utilizada é o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). Em seguida, o solvente é evaporado, e a placa é levada ao equipamento. No espectrômetro, os cristais de amostra-matriz são irradiados com um raio laser com alto poder de irradiação e pulsos de pequeno comprimento (poucos nanosegundos) para que simultaneamente ocorra a ionização e dessorção das moléculas da amostra e matriz, em fase gasosa (Figura 5). A matriz precisa ser capaz de absorver uma grande quantidade de energia no comprimento de onda da radiação a laser e transmiti-la de maneira controlada para as moléculas da amostra, para assim, permitir a dessorção das moléculas, até aquelas mais compactas, em íons em fase gasosa (SCHMIDT & KALLOW, 2005; DASS, 2007).

Como o raio laser irradiado é pulsado, o MALDI é combinado com um analisador de massa de tempo de voo (TOF). Assim, no MALDI TOF MS, ambos, matriz e analito, são ionizados e transferidos para a fase gasosa, por meio da aplicação do laser. Os íons formados são submetidos a um campo elétrico e acelerados, podendo assim ser determinado o tempo de voo destes por meio do detector. A partir da calibração do equipamento com moléculas de massa molecular conhecida, é possível converter o tempo de voo dos íons para razão m/z . Na Figura 6 são mostrados os componentes e o funcionamento de um MALDI-TOF MS (DASS, 2007; REICH *et al.*, 2013; SKOOG *et al.*, 2015).

Tabela 2 - Aplicações da Espectrometria de massa molecular (Adaptado de SKOOG *et al.*, 2015).

Aplicações da Espectrometria de Massas Moleculares

Elucidação da estrutura de moléculas orgânicas e biológicas

Determinação da massa molecular de peptídeos, proteínas e oligonucleotídeos

Identificação de componentes de cromatogramas em papel e de camada delgada fina

Determinação de sequências de aminoácidos em amostra de polipeptídeos e proteínas

Deteção e identificação de espécies separadas por cromatografia e eletroforese capilar

Identificação de drogas ilícitas e metabólitos de drogas ilícitas no sangue, urina e saliva

Monitoramento de gases do ar expelidos pela respiração de pacientes durante a cirurgia

Teste de *antidoping* em atletas olímpicos e animais de competição

Datação de espécies arqueológicas

Análise de partículas de aerossol

Determinação de resíduos de pesticidas nos alimentos

Monitoramento de espécies orgânicas voláteis nos abastecimentos de água

Identificação de micro-organismos

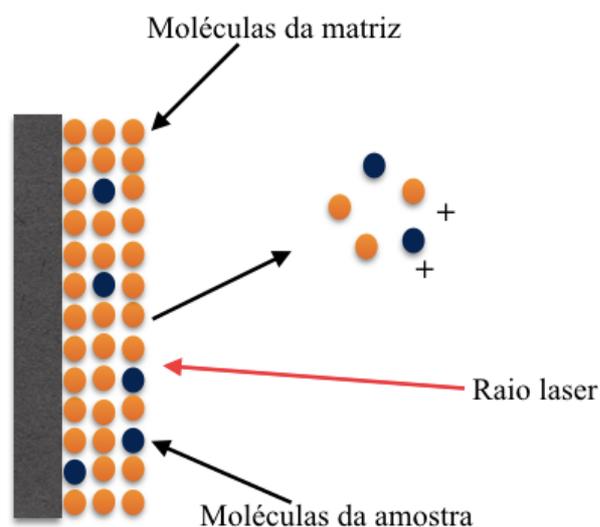


Figura 5 - Representação esquemática da análise de MALDI, mostrando o processo de ionização (Adaptado de DASS, 2007).

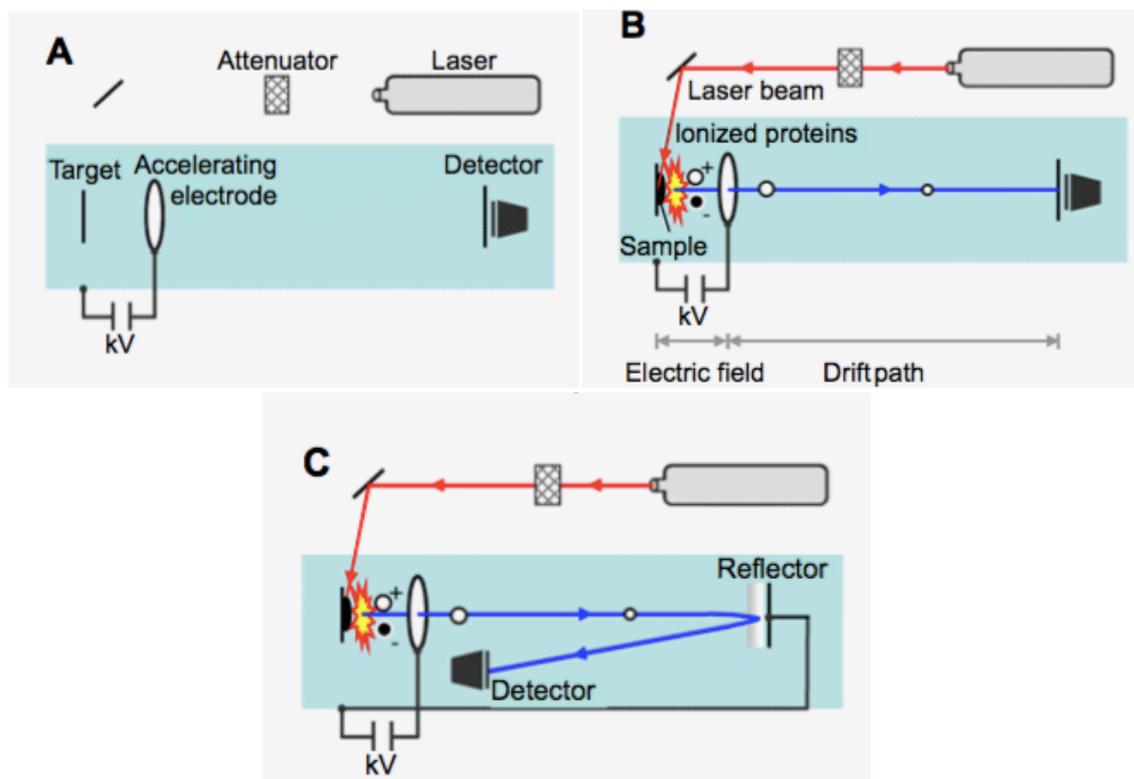


Figura 6 - Componentes e funcionamento de um espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF. Em A são mostrados os componentes, dentre eles, o laser, o atenuador, o alvo, o eletrodo de aceleração, e o detector. Em B e C o funcionamento é ilustrado. Em B os íons alcançam o detector diretamente, e em C, após ter sido rejeitado por um refletor. O funcionamento do MALDI-TOF acontece a partir da emissão de pulsos de energia em direção ao alvo, o atenuador entre o laser e o alvo ajusta (afina) a energia do laser. Devido a excitação, as proteínas sofrem dessorção e ionização. Os íons formados são então acelerados em um campo elétrico e atravessam o tubo de vôo até alcançarem o detector e serem registrados. Todo o sistema é operado sob condições de alto vácuo (Fonte: REICH *et al.*, 2013).

1.8 - Peptaibols (peptídeos bioativos)

Os *peptaibols* constituem uma família de peptídeos que pertence a classe dos peptaibióticos, sendo estes caracterizados por apresentarem atividade biológica, como por exemplo, atividade antibiótica. Estes têm entre 5 e 20 aminoácidos (massa molecular 500 a 2.200 Da), possuem alto conteúdo de ácido α -aminoisobutírico (Aib), um N-terminal acetilado, enquanto o C-terminal é reduzido a um aminoálcool. As estruturas, em sua maioria são lineares (alguns poucos apresentam estrutura cíclica), biossíntese não-ribossomal e presença de aminoácidos não-proteogênicos (DEGENKOLB *et al.*, 2003; STOPPACHER *et al.*, 2013; BRITO *et al.*, 2014).

Os metabólitos secundários produzidos por fungos são compostos frequentemente por moléculas que apresentam grande potencial para uso terapêutico (NAGARAJ *et al.*, 2001). Os *peptaibols* estão entres estas, e apresentam propriedades físico-químicas e biológicas interessantes, envolvidas por exemplo na formação de poros em membranas de bicamada lipídica, bem como atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiparasítica

(NAGARAJ *et al.*, 2001; SCHIELL *et al.*, 2001; DEGENKOLB *et al.*, 2003; LUO *et al.*, 2010; ALVES *et al.*, 2012). Estes são biossintetizados exclusivamente por fungos, normalmente aqueles que se associam a outros fungos, como parasitas (micoparasitismo), comensais, ou sapróbios, além daqueles que vivem no solo ou ainda patógenos de plantas (DEGENKOLB *et al.*, 2003).

Peptaibols produzidos por fungos pertencentes ao filo Basidiomycota têm sido pouco relatados na literatura. LEE *et al.* (1999a), isolaram e determinaram a sequência do peptídeo *Boletusin* derivado do extrato metanólico do basidioma de *Boletus spp.*, e LEE *et al.* (1999b) isolaram e determinaram a sequência de dois peptaibols (*Tylopeptins A e B*) de *Tylopilus neofelleus*. Apesar do grande número de trabalhos reportando as propriedades antibacterianas de extratos de Basidiomicetos, poucos tem sido os trabalhos focados na identificação dos compostos responsáveis por essas propriedades (ALVES *et al.*, 2012).

Devido a grande importância dos peptídeos com atividade biológica, prospectá-los, assim como elucidar suas estrutura e composições é fundamental para o conhecimento de suas propriedades e possíveis aplicações biotecnológicas.

2 - JUSTIFICATIVA

Atualmente, a identificação ao nível de espécie de fungos pertencentes ao filo Basidiomycota é realizada com base em caracteres morfológicos (taxonomia clássica) e/ou por meio da identificação molecular baseada no rDNA (padrão ouro). A primeira depende de profissionais especializados (micologistas), enquanto a caracterização molecular baseada no DNA possui fluxo de trabalho extenso, é um método dispendioso, e suscetível a contaminação ambiental. A espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF vem sendo empregada na identificação de micro-organismos, principalmente aqueles de interesse clínico. Esta técnica apresenta alta eficiência, confiabilidade (acurácia) e rapidez. O desafio para o emprego deste método na identificação de micro-organismos, especificamente de fungos do filo Basidiomycota, consiste na padronização do método (meio de cultura, tempo de incubação e protocolo para obtenção dos espectros de massa) e na representatividade e consistência dos bancos de dados. Neste trabalho pretende-se padronizar a identificação de fungos das famílias Polyporaceae e Hymenochaetaceae do filo Basidiomycota por meio da espectrometria de massa, estabelecendo esta nova abordagem na área da taxonomia de fungos de interesse biotecnológico, e criar um banco de dados customizado (*in-house*) para identificação dessas famílias. Além disso, este trabalho também visa prospectar peptídeos com atividade antimicrobiana (peptaibols) utilizando os isolados *Trametes villosa* (CCMB561), *Ganoderma sp. 1* (DHCR379) e *Fulvifomes nilgheriensis* (GAS917). Estes isolados pertencem ao filo Basidiomycota, que é um grupo pouco estudado quanto a prospecção de peptídeos com atividade biológica, e os isolados escolhidos pertencem a gêneros que já são reportados na literatura com seus extratos possuindo atividade antimicrobiana. Estes dados servirão de base para trabalhos futuros, permitindo uma rápida e confiável identificação de fungos ambientais de interesse econômico e biotecnológico, assim como, possibilitará a identificação de um novo peptídeo com atividade biológica oriundo de uma isolado pertencente ao filo Basidiomycota.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Avaliar e padronizar a técnica de espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF (MALDI Biotyper) para identificação de Basidiomicetos das famílias Hymenochaetaceae e Polyporaceae, assim como, prospectar possíveis peptídeos bioativos (peptaibols) de interesse biotecnológico de isolados pertencentes a essas duas famílias.

3.2 - Objetivos específicos

- i - Identificar todos os isolados obtidos nas coleções de cultura de micro-organismos através de caracteres morfológicos (taxonomia clássica), e por meio do sequenciamento da região ITS do rDNA;
- ii - Padronizar e otimizar a preparação de amostras (meio de cultura, tempo de crescimento e método de extração de proteínas totais) para a obtenção de espectros de massa de qualidade e reprodutíveis;
- iii - Criar um banco de dados customizado (*in-house database*) de espectros de massa para a identificação dos isolados em estudo;
- iv - Verificar a influência do meio de cultura e da idade do micélio na obtenção de espectros de massa de qualidade, no perfil de proteínas e identificação;
- v - Gerar análises filogenéticas de máxima verossimilhança (ML) e de Inferência Bayesiana (IB) com as sequências da região ITS obtidas neste trabalho e comparar com o dendrograma gerado a partir dos espectros de massa (MSPs);
- vi- Identificar e caracterizar possíveis peptídeos de interesse biotecnológico.

4 – FLUXOGRAMA

A realização desse trabalho começou com a obtenção dos isolados de fungos pertencentes ao filo Basidiomycota de diferentes coleções de micro-organismos do Brasil (Figura 7). Após a aquisição, estes foram utilizados para executar as duas etapas do projeto. A primeira, consistiu na padronização da técnica de MALDI-TOF MS para a identificação de Basidiomicetos, e a segunda, foi focada na prospecção e identificação de peptídeos com atividade biológica (*peptaibols*).

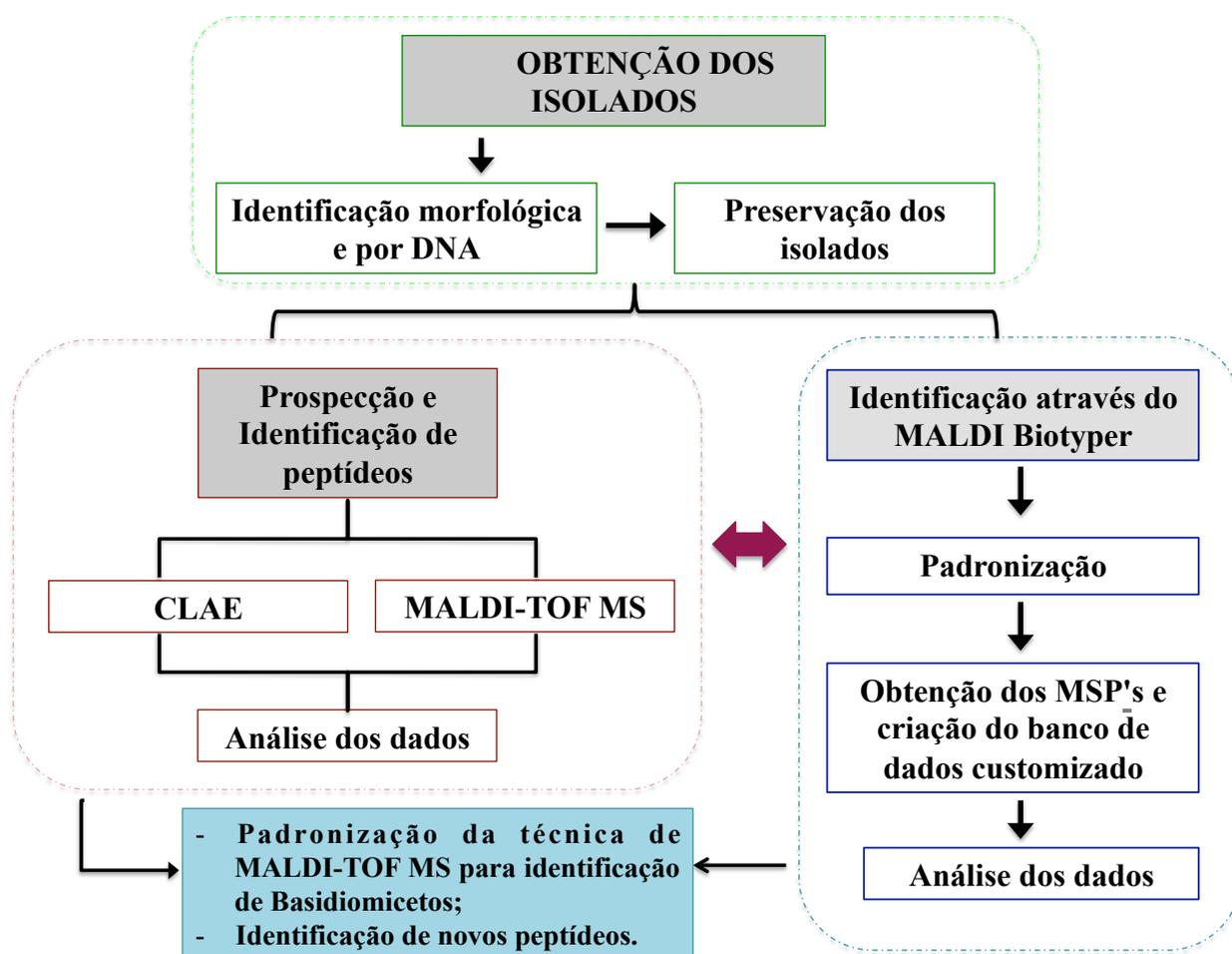


Figura 7 – Fluxograma mostrando as etapas para desenvolvimento do projeto de dissertação.

5 - METODOLOGIA

5.1 - Obtenção, reativação e preservação dos isolados

Vinte e oito isolados de fungos (Tabela 3) pertencentes ao filo Basidiomycota, e as famílias Hymenochaetaceae e Polyporaceae foram obtidos da Coleção de Culturas de Microorganismos da Universidade Estadual de Feira de Santana (CCMB-UEFS), do Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos (LBMCF-UFGM). Todos os isolados obtidos foram reativados em placas de petri 60 x 15 mm contendo meio de cultura MEA (2% de Extrato de Malte, 2% de dextrose e 2% de Ágar) e incubados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 5-10 dias. Após o crescimento, todos os fungos foram preservados de acordo com a metodologia descrita por CASTELLANI, 1967.

Tabela 3 - Isolados de fungos obtidos da CCMB-UEFS, UFRGS e LBMCF-UFGM

Número de Identificação	Família
GAS 1073	Hymenochaetaceae
GAS 1183	Hymenochaetaceae
CT 203	Hymenochaetaceae
GAS 978	Hymenochaetaceae
GAS 1037	Hymenochaetaceae
GAS 1139	Hymenochaetaceae
GAS 1189	Hymenochaetaceae
GAS 917	Hymenochaetaceae
GAS 1153	Hymenochaetaceae
GAS 1192	Hymenochaetaceae
MICOLAB01	Hymenochaetaceae
GAS 1176	Hymenochaetaceae
GAS 1142	Hymenochaetaceae
MB01	Hymenochaetaceae
MB03	Hymenochaetaceae
GAS 933	Polyporaceae
CCMB 456	Polyporaceae
CCMB 450	Polyporaceae

CCMB 452	Polyporaceae
CCMB 448	Polyporaceae
DHCR359	Polyporaceae
DHCR379	Polyporaceae
CCMB 601	Polyporaceae
LMRT 29	Polyporaceae
CCMB472	Polyporaceae
CCMB561	Polyporaceae
DHCR	Polyporaceae
CCMB451	Polyporaceae

5.2 - Identificação Morfológica

A identificação morfológica foi realizada por meio da análise dos caracteres macro e microscópicos do basidioma. Para a análise macroscópica foram analisadas características do basidioma, como dimensões, coloração da superfície do píleo, formato, forma da margem, coloração e presença de linhas no contexto, coloração do himenóforo e quantidade de poros por mm. Análises microscópicas foram realizadas utilizando o reagente de Melzer para estudo da forma e dimensão dos basidiósporos, bem como observação das reações amiloide e dextrinoide. Para o estudo do sistema hifal, secções dos basidiomas foram incubadas em solução aquecida (40°C) de NaOH 3%, depois dissecadas sob estereomicroscópio e finalmente examinadas em solução de NaOH 3% à temperatura ambiente (DECOCK *et al.* 2013).

5.3 – Identificação molecular baseada no rDNA

Para a identificação molecular todos os isolados foram reativados em meio de cultura MEA, e incubados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 5-10 dias, com o acompanhamento do crescimento diariamente. Após o crescimento, todos os isolados tiveram o DNA total extraído utilizando o *FastDNA Spin Kit* (Mp Biomedicals, Lote:103927) e purificado utilizando o *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche, Lote:21538900), seguindo as recomendações dos fabricantes. O DNA total de todas as amostras foi analisado qualitativamente e quantitativamente por eletroforese em gel e em espectrofotômetro Nanodrop 1000ND (Thermo Scientific, USA). Para todos os isolados foi feita a reação em cadeia da polimerase

(PCR) utilizando os primers ITS 6 (5'- TTCCCGCTTCACTCGCAGT - 3') e ITS 8 (5'- AGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTG-3') para a amplificação da região interna transcrita que abrangem as regiões ITS1-5.8S-ITS2 do código de barras primário de fungos (WHITE *et al.*, 1990). A reação de PCR foi realizada utilizando o *Kit KAPA Taq HotStart* em volume final de 50 µL, contendo 10 µL de tampão 5X KAPA, 3,0 µL de MgCl₂ (25mM), 1 µL de DNTP (10mM), 1 µL de primer ITS8 (10 pmol), 1 µL de primer ITS6 (10 pmol), 1 µL de DMSO (Absoluto), 1,5 µL de BSA (1µg/µL), 5 µL de Betaína (5M), 0,2 µL de Taq (5U/µL), 25,3 µL ddH₂O, e 1 µL de DNA. A reação de PCR foi realizada em termociclador Biocycler e Veriti 96 *Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), com a seguinte programação: Desnaturação Inicial: 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de Desnaturação: 94°C por 1 minuto, Anelamento: 58°C por 1 minuto, Extensão: 72°C por 1 minuto e Extensão Final: 72°C por 5 minutos. Para verificar se o fragmento de interesse foi amplificado, os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% utilizando o tampão TBE 0,5X (Tris-Borato EDTA 0,5 M pH 8,0) com adição de brometo de etídeo. Todas as amostras amplificadas foram purificadas utilizando EDTA 125 mM, etanol 70%, e etanol absoluto. Para o procedimento, 45 µL do produto de PCR amplificado foi misturado com 11,25 µL de EDTA e 135 µL de etanol absoluto, a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 13.000 rpm por 25 minutos a 4°C, em seguida, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente, 120 µL de etanol 70% foram adicionados aos tubos, estes foram homogeneizados por inversões sucessivas e centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o etanol residual foi evaporado durante 20 minutos a uma temperatura de 37°C. O DNA foi ressuspendido em 10 µL de água Milli-Q autoclavada e incubado a 37°C por 20 minutos. Após a purificação, 100 ng de DNA genômico de cada amostra foi enviado para sequenciamento por eletroforese capilar em sequenciador automático *DNA sequencer* ABI3730TM (Applied Biosystems) na empresa *Myleus Biotechnology*. Todas as sequências obtidas foram editadas e as sequências consenso geradas no software Geneious® 9.0.5. As sequências consenso foram submetidas ao *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para comparação e identificação por análise de similaridade com o banco de dados de sequência de nucleotídeos (nr) do NCBI (GenBank). Todas as sequências geradas para este trabalho foram depositadas no banco de dados GenBank (NCBI) (Tabela 6).

5.4 - Análises Filogenéticas

As sequências de DNA foram alinhadas usando o software MAFFT v.7 (KATO & STANDLEY, 2013) sob os critérios G-INS-i e inspecionadas manualmente usando o software Geneious® 9.0.5. O conjunto de dados foi subdividido em três partições (ITS1, 5.8S e ITS2). O melhor modelo de evolução de nucleotídeos para cada partição foi selecionado a partir do critério AIC (*Akaike Information Criterion*) usando jModel-Test2 v.1.6 (GUINDON & GASCUEL 2003, DARRIBA *et al.* 2012). Análises filogenéticas de Inferência Bayesiana (IB) e Máxima Verossimilhança (ML) foram aplicadas aos conjuntos de dados.

A IB foi realizada utilizando o programa MrBayes 3.1.2 (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003) com duas corridas independentes, cada uma iniciando a partir de árvores aleatórias com quatro cadeias independentes e simultâneas, realizando 1×10^7 replicações, amostrando uma árvore a cada 1×10^3 replicações. As primeiras $2,5 \times 10^6$ árvores amostradas foram descartadas como *burn-in*, enquanto as restantes foram usadas para reconstruir uma árvore consenso e calcular a probabilidade posterior (BPP) dos clados. A análise de Máxima Verossimilhança (MV) foi conduzida utilizando o software RAxML-HPC v. 8.2.3 (STAMATAKIS, 2014), disponível no portal científico da CIPRES (MILLER; PFEIFFER & SCHWARTZ, 2010; <http://www.phylo.org/>). A análise envolveu, inicialmente, 100 buscas pela árvore com maior verossimilhança, cada uma partindo de uma árvore de parcimônia pelo método *stepwise addition*, sob o modelo GTRGAMMA, com todos os outros parâmetros estimados pelo software. Apenas a árvore com melhor verossimilhança foi mantida para acessar a confiabilidade dos nós. Análises de *bootstrap* multiparamétrico sob o mesmo modelo foram realizadas, deixando o programa finalizar a análise a partir da opção autoMRE. Um arquivo adicional foi utilizado para forçar o software RAxML a considerar os parâmetros do modelo de evolução individualmente para cada partição utilizada.

5.5 - Padronização da técnica de MALDI-TOF MS para a identificação de fungos do filo Basidiomycota

Para padronizar a preparação de amostras para a obtenção de espectros de massa reprodutíveis e de qualidade foram testados seis protocolos (Tabela 4), sendo, cinco de extração de proteínas, e um utilizando o micélio diretamente na placa alvo do MALDI sem nenhuma preparação prévia. O isolado *Trametes villosa* (CCMB561) foi escolhido como organismo modelo para os testes iniciais, e este foi cultivado em meio de cultura MEA, e incubado a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 5-10 dias. O instrumento utilizado para a obtenção

dos espectros foi o espectrômetro Biotyper Microflex LT (Bruker Daltonics) (Figura 8) localizado no Laboratório AQUACEN da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Para a calibração e verificação do desempenho do equipamento foi utilizado o Padrão de teste bacteriano Bruker (BTS; Bruker). Os espectros foram obtidos no modo linear positivo utilizando o método MBT_AutoX (frequência do laser, 60 Hz, voltagem da fonte de íons 1, 20 kV, voltagem da fonte de íons 2, 18,25 kV, voltagem da lente, 6,0 kV, intervalo de massa, 2000-20000 Da). Para a captura dos espectros de massa foi utilizado o software flexControl 3.4 (Bruker Daltonics) e todos os testes foram feitos em réplicas. Abaixo a descrição detalhada dos protocolos que foram testados.



Figura 8 - Espectrômetro MALDI-TOF Biotyper Microflex (Bruker).

Protocolo 1: Extração Etanol - Ácido Fórmico

A extração utilizando o ácido fórmico foi realizada de acordo com o protocolo recomendado pela Bruker para a identificação de fungos filamentosos. Para execução deste teste, um volume de 300 μL de água destilada estéril foi adicionado a um tubo do tipo eppendorf de 1,5 mL, em seguida, o micélio do isolado testado (CCMB561) foi retirado da placa de petri com o auxílio de uma alça de repicagem descartável e transferido para o tubo. O micélio mais a água destilada foram agitados em vórtex, e posteriormente 900 μL de etanol absoluto foram adicionados. Em seguida, os tubos foram homogeneizados em vórtex e centrifugados a 13.000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e os tubos incubados a temperatura ambiente para a evaporação do álcool residual. Posteriormente, foram adicionados aos tubos 50 μL de ácido fórmico 70%, e estes foram homogeneizados em vórtex e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente.

Após a incubação, 50 µL de acetonitrila foram adicionados aos tubos, homogeneizados e centrifugados a 13.000 rpm por 2 minutos. Depois de centrifugados, 1 µL do sobrenadante de cada amostra foi transferido com o auxílio de uma pipeta automática para a placa alvo do MALDI, seco a temperatura ambiente e coberto com 1 µL de solução de matriz HCCA (ácido a-ciano-4- hidroxicinâmico) em 50% de Acetonitrila, 2.5% de Ácido Trifluoroacético e 47.5% de água (Fluka) (Bruker Daltonics GmbH).

Protocolo 2: Extração Etanol-Ácido Fórmico modificada

O segundo protocolo testado foi descrito por PRISTAŠ *et al.* (2017), no qual, na etapa inicial de extração, o micélio foi congelado em água destilada a – 20 °C e depois incubado a 95°C por 5 minutos. Após a incubação, foram seguidos os mesmos passos do protocolo 1, apenas alterando a quantidade de ácido fórmico e acetonitrila, aumentando ambos, de 50 µL para 100 µL.

Protocolo 3: Extração com Ácido Trifluoroacético

O terceiro protocolo utilizado foi o de extração com Ácido Trifluoroacético (TFA) descrito por FREIWALD & SAUER (2009). Para a execução deste protocolo foi utilizada uma alça de 10 µL para raspar a placa e recuperar o micélio. O micélio recuperado foi transferido para um tubo de 1,5 mL, 50 µl de TFA 80% foram adicionados, e a amostra homogeneizada em vórtex. Em seguida, 3 volumes de água destilada (150 µl) e 200 µl de acetonitrila foram adicionados e homogeneizados. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g em temperatura ambiente durante 2 minutos. Em seguida, 1 µL do sobrenadante (extrato de proteínas) foi retirado com o auxílio de uma pipeta automática e transferido para placa alvo do MALDI, seco a temperatura ambiente, e coberto com 1 µL de solução de matriz HCCA.

Protocolo 4: Extração Ácido Trifluoroacético + FastPrep

A extração foi feita seguindo os mesmos passos do Protocolo 3, com apenas uma modificação, no qual um passo de maceração inicial do micélio, utilizando beads de zircônio e o instrumento FastPrep (MP Biomedicals) foi realizado para que a parede celular do fungo fosse lisada e as proteínas fossem extraídas com mais facilidade (RAHI; PRAKASH & SHOUCHE, 2016).

Protocolo 5: Extração Ácido Fórmico + FastPrep

A extração foi feita seguindo os mesmos passos do Protocolo 1, com apenas uma modificação, no qual um passo de maceração inicial da suspensão hidro-alcoólica, utilizando beads de zircônio e o instrumento FastPrep (MP Biomedicals) foi adicionado (CASSAGNE *et al.*, 2011).

Protocolo 6 - Micélio diretamente + Matriz orgânica

Aproximadamente 50 µg de micélio foi raspado da placa de petri com o auxílio de um palito de madeira autoclavado e transferido diretamente para a placa alvo do MALDI, seco em temperatura ambiente, e coberto com 1 µL de HCCA (SCHMIDT & KALLOW, 2005).

Tabela 4 – Resumo dos diferentes protocolos avaliados para padronização na obtenção de espectros de massa.

Protocolos Testados	Número Protocolo	Referência
Extração Ácido Fórmico	1	BRUKER DALTONICS
Extração Ácido Fórmico protocolo modificado	2	PRISTAŠ <i>et al.</i> , 2017
Extração Ácido Trifluoroacético	3	FREIWALD & SAUER, 2009
Extração Ácido Trifluoroacético + FastPrep	4	RAHI <i>et al.</i> , 2016 modificado
Extração Ácido Fórmico + FastPrep	5	CASSAGNE <i>et al.</i> , 2011
Micélio diretamente + Matriz orgânica	6	SCHMIDT & KALLOW, 2005

5.6 - Teste para otimização da técnica de IC/MS

Na tentativa de otimizar o protocolo que utiliza o micélio diretamente na placa alvo sem nenhum tratamento prévio (Protocolo 6), este foi modificado com o objetivo de aprimorar a lise da parede celular. Para isto, 1 µL de ácido foi adicionado após a transferência do micélio para a placa alvo. Após a adição do ácido, a amostra foi seca a temperatura ambiente e coberta com 1 µL de HCCA. Os testes foram conduzidos utilizando o ácido fórmico 70% (Teste 1) (ASSIS *et al.*, 2017) e o ácido trifluoroacético 80% (Teste 2). Para testar se a adição do ácido teria impacto negativo ou positivo na obtenção dos espectros, o micélio também foi aplicado na placa sem a adição de nenhum ácido (Teste 3). Os isolados utilizados foram:

Trametes villosa (CCMB561), *Lentinus crinitus* (GAS933), *Fomitiporia neotropica* (CT203) e *Ganoderma sp.1* (DHCR359). Todo o experimento foi conduzido utilizando 3 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas.

5.7 - Análises estatísticas e dos espectros de massa

A comparação entre os espectros de massa e a contabilização do número de picos foram realizados utilizando o software online BIOSPEAN (RAUS & ŠEBELA, 2013) e o mMass (versão 5.5.0) (STROHALM *et al.*, 2010). Análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software PAST (versão 3.18) (HAMMER *et al.*, 2001).

5.8 - Geração dos espectros de referência (MSP, main spectrum profiles) e criação do banco de dados customizado (*in-house database*) para a identificação de basidiomicetos

Para a geração dos espectros de referência (MSPs), os isolados estudados foram repicados em meio de cultura MEA 2% e incubados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 5-10 dias, havendo variações no período de incubação dependendo do isolado. Todo o experimento foi conduzido utilizando 8 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas, gerando 24 espectros para cada isolado, que foram utilizados para criação do espectro consenso (MSP). Os espectros de referência (MSPs) foram gerados utilizando o espectrômetro Microflex LT (Bruker Daltonics) no modo linear positivo e o método MBT_AutoX (frequência do laser, 60 Hz, voltagem da fonte de íons 1, 20 kV, voltagem da fonte de íons 2, 18,25 kV, voltagem da lente, 6,0 kV, intervalo de massa, 2000-20000 Da). Para geração, edição e obtenção dos espectros consensos, foram utilizados os softwares fornecidos pelo fabricante, dentre eles, o Flex Control (Bruker Daltonics flexControl 3.4) para a leitura e captura dos espectros de massa, Flex Analysis II (Bruker Daltonics flexAnalysis software) para a geração dos espectros consenso, e o MALDI Biotyper 3 para a inserção dos espectros no banco de dados.

Além disso, espectros virtuais consistindo dos 70 picos principais foram gerados para todos os isolados usando o software R versão 3.4.2 GUI 1.70 (R Core Team, 2016), e os dados exportados do software FlexAnalysis (Bruker Daltonics). Os picos com intensidade $\geq 20\%$ foram marcados com a cor vermelha e a razão m/z mostrada.

5.9 - Análise de clusterização dos MSPs e componentes principais (PCA)

Com a finalidade de investigar as relações entre os organismos estudados e o nível de distância baseado no perfil de proteínas (espectro de massa), análises de clusterização foram

realizadas e um dendrograma foi gerado utilizando o software BioTyper 3.0 (Bruker Daltonics) e os MSPs obtidos neste trabalho. Os parâmetros empregados foram os seguintes: medida de distância = “correlação”, linkage = “média”, número máximo de nós de nível superior = “0”, dendrograma orientado a pontuação = “ativado”, valores de limiar de pontuação para um único organismo = “300” e valores de limiar de pontuação para um organismo relacionado = “0” (ASSIS *et al.*, 2017).

Análises de componentes principais (PCA) para os gêneros mais representativos dentro das famílias Hymenochaetaceae e Polyporaceae (*Fomitiporia* e *Ganoderma*) foram realizadas usando as ferramentas integradas do MALDI Biotyper e as configurações padrões.

5.10 - MALDI-TOF MS *real time identification*

O teste *de Real-Time Identification* foi realizado para identificar os 28 isolados de fungos por meio da comparação dos espectros de massa obtidos no software de identificação em tempo real com aqueles depositados no banco de dados. Para este teste, os fungos foram inoculados em placas de petri de 60 x 15 mm contendo meio de cultura MEA 2% e foram incubados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 5-10 dias. Para cada isolado aproximadamente 50 μg de micélio fresco foram transferidos para a placa alvo do MALDI com o auxílio de um palito, cobertos com 1 μL de matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico), e secos a temperatura ambiente. Os *scores* de identificação em tempo real (RT) adotados foram aqueles recomendados pelo fabricante (variando de 0 a 3): *score* ≥ 2.000 indica identificação ao nível de espécie, *score* ≥ 1.700 e < 2.000 indica identificação confiável ao nível de gênero, e um *score* < 1.700 indica identificação não-confiável.

5.11 - Influência do substrato e idade da cultura na identificação por MALDI-TOF MS

Para avaliar a influência do substrato na identificação de fungos por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS), os isolados *Trametes villosa* (CCMB561), *Lentinus crinitus* (GAS933), *Ganoderma sp.1* (DHCR359), *Ganoderma lucidum* (CCMB601) e *Fomitiporia neotropica* (CT203) foram inoculados em placas de petri de 60 x 15 mm contendo Batata Dextrose Agar (PDA) e incubados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 5-10 dias. Para avaliar a influência da idade do micélio, foram testadas as culturas dos fungos mencionados acima cultivados em MEA 2%, e que possuíam 5-10 dias, e culturas com seis meses de cultivo. Para ambos os testes foi utilizada a ferramenta de identificação em tempo real (Real-Time

Identification) do espectrômetro Microflex LT (Bruker Daltonics) para verificar se, com a alteração do substrato e idade do micélio, a identificação permaneceria confiável. Espectros dos isolados também foram gerados para a comparação dos perfis de proteínas.

5.12 - Prospecção de peptídeos produzidos por fungos pertencentes ao filo Basidiomycota

5.12.1 - Preparação dos extratos de fungos

Com o objetivo de prospectar peptídeos com atividade biológica (peptaibols) oriundos do metabolismo secundário de fungos pertencentes ao Filo Basidiomycota, os isolados *Trametes villosa* (CCMB561), *Fulvifomes nilgheriensis* (GAS917) e *Ganoderma sp.1* (DHCR379) foram utilizados nesta etapa do trabalho. Para a produção dos extratos, plugs de ± 5 mm de inóculo de cada isolado foram transferidos para 20 placas de petri (90 x 15 mm) contendo 20 mL de PDA (Batata Dextrose Agar) e incubadas a 28 ± 2 °C durante 21 dias (todo o experimento foi conduzido em triplicata). Após o período de incubação, o meio de cultura, contendo o micélio e os metabólitos secundários, foi cortado em cubos de 1 cm², submersos em 200 mL de Acetato de Etila (Absoluto) e incubados durante 72 horas à temperatura ambiente. Após o período de incubação, a fase orgânica foi filtrada e o solvente foi removido utilizando rotaevaporador a 40°C. Cinco placas de petri de PDA que não foram inoculadas com o fungo (estéril) foram submetidas ao mesmo procedimento descrito acima para servir como controle do meio de cultura (SILVA-HUGHES *et al.*, 2015).

5.12.3 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os extratos secos foram ressuspensos em uma proporção de 1:1 de acetonitrila (ACN) com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) e água Milli-Q com 0,1% de TFA. O material homogeneizado foi submetido a centrifugação a 12000 rpm por 3 minutos para a deposição de partículas que ficaram em suspensão, seco no concentrador *Eppendorf Vacufuge plus vacuum concentrator*, ressuspensado em água Milli-Q com 0,1% de TFA e então submetido à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando uma coluna analítica Vydac Protein & Peptide C18. Os eluentes foram água Milli-Q com 0,1% de TFA (A) e acetonitrila com 0,1% de TFA (B), e fluxo de 1 mL/min. A corrida no HPLC começou com um fluxo de 1 mL/min de água Milli-Q com 0,1% de TFA durante 10 minutos. Em seguida, inicializou-se o gradiente de concentração de B que variou de 0% (v/v) a 95% (v/v) em 40 minutos, sendo este estabilizado em 95% (v/v) por mais 5 minutos. A detecção foi realizada a 216 e 280 nm

(BRITO *et al.*, 2014). Os picos observados foram coletados utilizando tubos 1,5 mL do tipo eppendorf e posteriormente as frações recuperadas foram secas no concentrador *Eppendorf Vacufuge plus vacuum concentrator* e ressuspensas em 30 μ L de água Milli-Q com 0,1% de TFA (BRITO *et al.*, 2014).

5.12.4 - Espectrometria de Massa por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo (MALDI-TOF)

A análise das frações recuperadas por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada pela técnica de espectrometria de massa utilizando o equipamento MALDI-TOF-TOF (UltraFlex III, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) (Figura 9) e o software FlexControl 3.3 (Bruker Daltonics) do Laboratório Multiusuário de Proteômica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Todas as amostras foram aplicadas na placa do tipo MTP 384 polished steel S/N 20438 (Bruker Daltonics), cobertas com uma solução de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) em uma proporção de 1:1 e secas a temperatura ambiente. A aquisição dos espectros de massa foi realizada utilizando o programa RP_pepmix, em uma faixa de m/z de 500 a 4000 Da no modo refletido positivo. A calibração foi feita utilizando um padrão comercial da Bruker (Protein Calibration Standard, Bruker) (BRITO *et al.*, 2014).



Figura 9 - Espectrômetro MALDI-TOF TOF Autoflex (Autoflex III smartbeam MALDI TOF/TOF MS).

6 - RESULTADOS

6.1 - Identificação morfológica e molecular baseada na região ITS do rDNA

O uso combinado das ferramentas de identificação morfológica e molecular (baseada no sequenciamento da região ITS do rDNA) nos permitiu identificar vinte isolados ao nível de espécie, e oito ao nível de gênero (Tabelas 5 e 6). Estes foram classificados como pertencendo as famílias Hymenochaetaceae (15) e Polyporaceae (13). Os 15 isolados da família Hymenochaetaceae foram classificados em seis diferentes gêneros: *Arambarria*, *Fomitiporia*, *Fulvifomes*, *Neomensularia*, *Phellinotus* e *Phellinus*. Os 13 isolados da família Polyporaceae foram classificados como pertencendo a 4 diferentes gêneros: *Fomes*, *Ganoderma*, *Lentinus* e *Trametes*. Na família Hymenochaetaceae, 9 isolados foram identificados ao nível de espécie, e 6 ao nível de gênero. Na família Polyporaceae, 11 isolados foram identificados ao nível de espécie, e 2 ao nível de gênero (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 - Identificação morfológica e molecular dos isolados.

ID Isolado	Identificação Morfológica		Identificação Molecular (rDNA-ITS)			
	Família	Gênero/Espécies	Gênero/Espécies	Identidade (%)	Cobertura (%)	Número de acesso NCBI
GAS 1073	Hymenochaetaceae	<i>Fomitiporia sp.1</i>	<i>Fomitiporia sp.1</i>	96	99	JQ087893.1
GAS 1183	Hymenochaetaceae	<i>Fomitiporia sp.2</i>	<i>Fomitiporia neotropica</i>	99	100	KU663314.1
CT 203	Hymenochaetaceae	<i>Fomitiporia sp.2</i>	<i>Fomitiporia neotropica</i>	99	100	KU663313.1
GAS 978	Hymenochaetaceae	<i>Fomitiporia sp.3</i>	<i>Fomitiporia apiahyna</i>	100	100	KU663301.1
GAS 1037	Hymenochaetaceae	<i>Fomitiporia impercepta</i>	<i>Fomitiporia sp.4</i>	99	99	MF615298.1
GAS 1139	Hymenochaetaceae	<i>Fomitiporia sp.5</i>	<i>Fomitiporia sp.5</i>	98	99	JX093802.1
GAS 1189	Hymenochaetaceae	<i>Fulvifomes sp.1</i>	<i>Fulvifomes sp.1</i>	94	68	KP658662.1
GAS 917	Hymenochaetaceae	<i>Fulvifomes nilgheriensis</i>	<i>Fulvifomes nilgheriensis</i>	99	99	AY558633.1
GAS 1153	Hymenochaetaceae	<i>Neomensularia sp.1</i>	<i>Neomensularia sp.1</i>	96	99	KX078220.1
GAS 1192	Hymenochaetaceae	<i>Arambarria destruens</i>	<i>Arambarria destruens</i>	98	90	KY907681.1
MICOLAB01	Hymenochaetaceae	<i>Phellinotus piptadeniae</i>	<i>Phellinotus piptadeniae</i>	99	89	KM211289.1
GAS 1176	Hymenochaetaceae	<i>Phellinus sp.1</i>	<i>Phellinus sp.1</i>	91	100	JQ411392.1
GAS 1142	Hymenochaetaceae	<i>Phellinus sp.2</i>	<i>Phellinus sp.2</i>	81	91	KU954539.1
MB01	Hymenochaetaceae	<i>Phellinus rimosus</i>	<i>Phellinus sp.</i>	99	99	KP658634.1
MB03	Hymenochaetaceae	<i>Phellinus rimosus</i>	<i>Phellinus sp.</i>	99	99	KP658634.1

GAS 933	Polyporaceae	<i>Lentinus crinitus</i>	<i>Lentinus crinitus</i>	99	99	GU207295.1
CCMB 456	Polyporaceae	<i>Ganoderma australe</i>	<i>Ganoderma australe</i>	99	95	KU315203.1
CCMB 450	Polyporaceae	<i>Ganoderma australe</i>	<i>Ganoderma australe</i>	99	97	KU315203.1
CCMB 452	Polyporaceae	<i>Ganoderma australe</i>	<i>Ganoderma australe</i>	99	93	KU315203.1
CCMB 448	Polyporaceae	<i>Ganoderma australe</i>	<i>Ganoderma australe</i>	99	85	KU315203.1
DHCR359	Polyporaceae	<i>Ganoderma sp.1</i>	<i>Ganoderma sp.1</i>	95	100	JQ781878.1
DHCR379	Polyporaceae	<i>Ganoderma sp.1</i>	<i>Ganoderma sp.1</i>	95	100	JQ781878.1
CCMB 601	Polyporaceae	Not performed*	<i>Ganoderma lucidum</i>	99	100	AY636059.1
LMRT 29	Polyporaceae	<i>Ganoderma oerstedii</i>	<i>Ganoderma parvulum</i>	100	99	KU569523.1
CCMB472	Polyporaceae	<i>Fomes fasciatus</i>	<i>Fomes fasciatus</i>	97	94	AM269766.1
CCMB561	Polyporaceae	<i>Trametes villosa</i>	<i>Trametes villosa</i>	99	88	KF850163.1
DHCR	Polyporaceae	<i>Trametes sp.</i>	<i>Trametes villosa</i>	99	95	KF850163.1
CCMB451	Polyporaceae	<i>Trametes sp.</i>	<i>Trametes villosa</i>	99	90	FJ608587.1

* Identificação morfológica não realizada devido ao isolado ser de uso comercial e de propriedade industrial.

Tabela 6 – Identificação final dos isolados a partir da abordagem integrativa das ferramentas de identificação clássica e molecular (baseada na região ITS), e número de acesso das sequências depositadas no GenBank.

ID do Isolado	Gênero/Espécie	Número de acesso sequências depositadas no GenBank
GAS 1073	<i>Fomitiporia sp.1</i>	MH708498
GAS 1183	<i>Fomitiporia neotropica</i>	MH708503
CT 203	<i>Fomitiporia neotropica</i>	MH708502
GAS 978	<i>Fomitiporia apiahyna</i>	MH708499
GAS 1037	<i>Fomitiporia impercepta</i>	MH708501
GAS 1139	<i>Fomitiporia sp.5</i>	MH708500
GAS 1189	<i>Fulvifomes sp.1</i>	MH708504
GAS 917	<i>Fulvifomes nilgheriensis</i>	MH708505
GAS 1153	<i>Neomensularia sp.1</i>	MH714527
GAS 1192	<i>Arambarria destruens</i>	MH708497
MICOLAB01	<i>Phellinotus piptadeniae</i>	MH708514
GAS 1176	<i>Phellinus sp.1</i>	MH708516
GAS 1142	<i>Phellinus sp.2</i>	MH708515
MB01	<i>Phellinus rimosus</i>	MH708517
MB03	<i>Phellinus rimosus</i>	MH708518
GAS 933	<i>Lentinus crinitus</i>	MH708513
CCMB 456	<i>Ganoderma australe</i>	MH708509
CCMB 450	<i>Ganoderma australe</i>	MH708507
CCMB 452	<i>Ganoderma australe</i>	MH708508
CCMB 448	<i>Ganoderma australe</i>	MH708506
DHCR359	<i>Ganoderma sp. 1</i>	MH708510
DHCR379	<i>Ganoderma sp. 1</i>	MH708511
CCMB 601	<i>Ganoderma lucidum</i>	MH708512
LMRT 29	<i>Ganoderma parvulum</i>	MH714526
CCMB472	<i>Fomes fasciatus</i>	MH714525
CCMB561	<i>Trametes villosa</i>	MH708522
DHCR	<i>Trametes villosa</i>	MH708523
CCMB451	<i>Trametes villosa</i>	MH708521

6.2 - Análise Filogenética

Na análise filogenética o conjunto de dados final incluiu sequências da região ITS de 28 espécimes de fungos, com 762 caracteres, dos quais 312 foram constantes e 356 parcimoniosamente informativos. Os modelos evolutivos selecionados foram TPM1uf+G (ITS1), K80 (5.8S) e TPM3uf+G (ITS2). Os nós da árvore foram considerados com suporte alto quando estes exibiram um BPP $\geq 0,95$ e/ou BS $\geq 70\%$. Duas grandes linhagens foram recuperadas nas análises, correspondendo a Hymenochaetaceae (1,0 BPP, 100% BS) e Polyporaceae (1,0 BPP, 100% BS), cada uma composta pelos mesmos gêneros e espécies identificados por meio dos caracteres morfológicos e moleculares (Figura 10). Na família Hymenochaetaceae, todos os isolados pertencentes aos gêneros *Arambarria*, *Fulvifomes*, *Neomensularia*, *Phellinotus* e *Phellinus* se agruparam formando um clado com um valor de 0,97 de BPP e 76% de BS, e os isolados pertencentes ao gênero *Fomitiporia* formaram um clado com um valor de 1,0 de BPP e 99% de BS. Na família Polyporaceae, o clado composto por espécimes de *Ganoderma* (0,96 da BPP, 59% da BS) agrupou-se com uma linhagem irmã de *Lentinus crinitus* (55% BS), e o clado composto por isolados de *Trametes* (1,0 BPP, 100% BS) agrupou-se com o isolado CCMB472 *Fomes fasciatus* (0,95 BPP, 83% BS) (Figura 10).

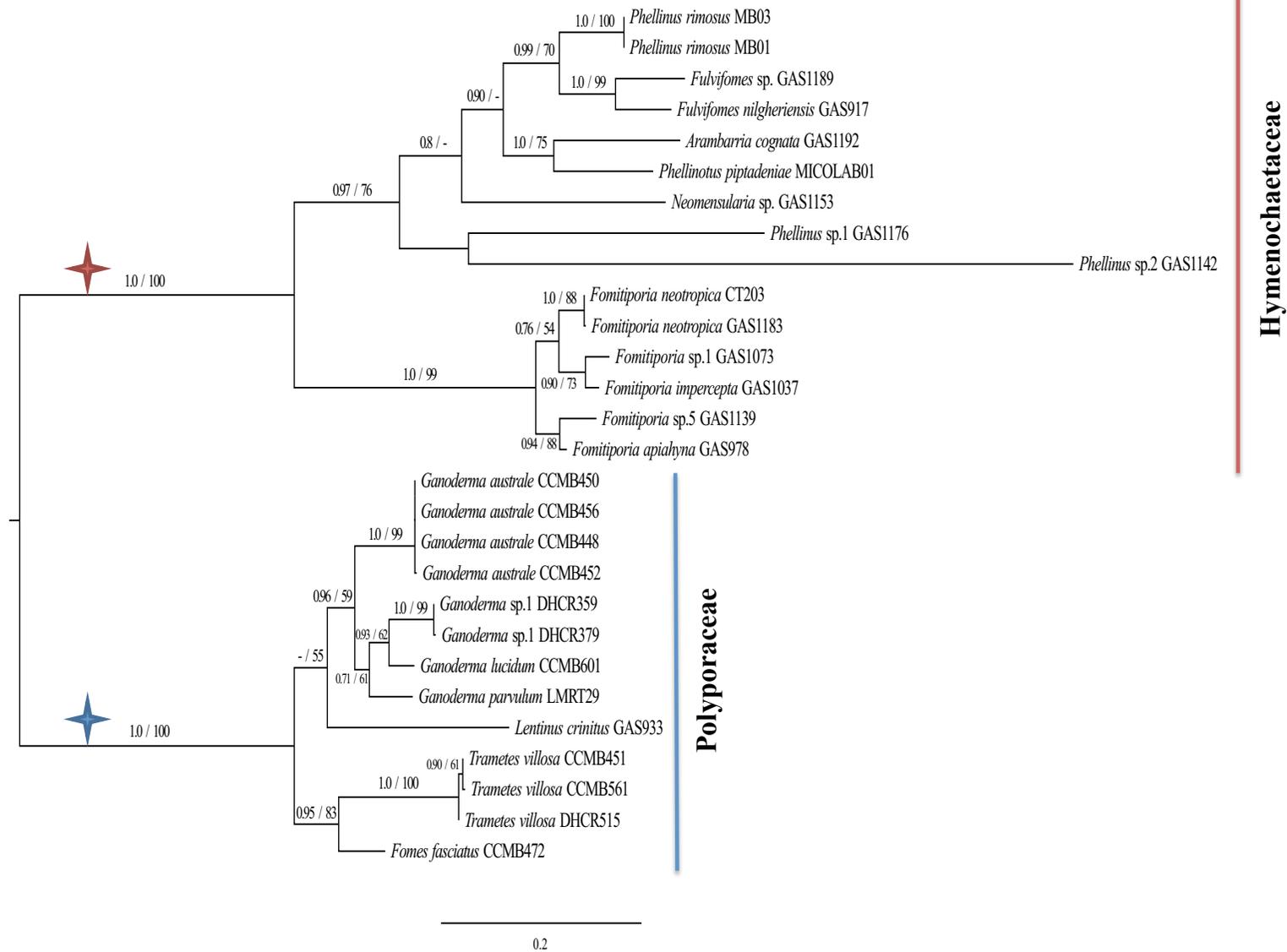


Figura 10 - Árvore consenso de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (IB) baseada no conjunto de dados de sequências ITS (rDNA) dos isolados pertencentes ao filo Basidiomycota. Probabilidade Posterior (BPP) acima de 0,7 e valores de Bootstrap acima de 50% são mostrados.

6.3 - Padronização da técnica de MALDI-TOF MS para a identificação de Basidiomicetos

Por meio da execução dos protocolos de extração de proteínas de PRISTAŠ *et al.* (2017) (Protocolo 2), RAHI *et al.* (2016) modificado (Protocolo 4) e o protocolo de CASSAGNE *et al.* (2011) (Protocolo 5) não foi possível obter espectros de massa do isolado testado (*Tramete villosa* CCMB561). Seguindo os protocolos de extração com Ácido Fórmico (BRUKER DALTONICS, Protocolo1), Ácido Trifluoroacético (FREIWALD & SAUER, 2009, Protocolo 3) e o protocolo de aplicação do micélio diretamente na placa alvo do MALDI (SCHMIDT & KALLOW, 2005, Protocolo 6) foi possível obter espectros de qualidade, contudo, seguindo os protocolos 1 e 3, nem sempre os espectros apresentavam reprodutibilidade, sendo necessário fazer diversas aplicações do analito, e repetidas tentativas de ionização para obtenção de espectros. Utilizando os espectros de massa obtidos através dos protocolos 1, 3 e 6 (com 5 réplicas técnicas), foi possível contabilizar o número de picos obtidos por réplica e método (Tabela 7), os quais foram utilizados para a aplicação de testes estatísticos e comparação dos métodos. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou que os dados (número de íons obtidos por meio de cada método e réplica) não apresentavam distribuição normal, assim, foram escolhidos os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para analisar os dados. O valor de p obtido por meio do teste de Kruskal-Wallis foi de 0,007 ($p < 0,05$), mostrando que há diferença significativa entre as medianas dos protocolos testados. O teste de Mann-Whitney, mostrou que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os protocolos 1 e 6 (valor de p : 0,01) e, 3 e 6 (valor de p : 0,01), e que não há diferença significativa entre os protocolos 1 e 3 (valor de p : 0,40). A partir da análise dos espectros (Figuras 11, 12, 13 e 14) foi possível observar que, com a alteração do método, o perfil de proteínas se altera, havendo uma maior alteração dos espectros entre os protocolos 1 e 6 (Figura 14), e, 3 e 6 (Figura 13), não havendo alteração muito significativa entre os protocolos 1 e 3 (Figura 12). A partir das análises foi possível observar que o protocolo 6 foi o que forneceu espectros com uma maior quantidade de picos (Tabela 7), e picos com maior intensidade (Figuras 13 e 14).

Tabela 7 - Número de íons obtidos utilizando diferentes protocolos para obtenção de espectros de massa.

Replicas	Número de picos obtidos		
	Protocolo 1	Protocolo 3	Protocolo 6
Réplica 1	463	459	1284
Réplica 2	547	530	1378
Réplica 3	609	561	1379
Réplica 4	634	601	1394
Réplica 5	637	620	1749

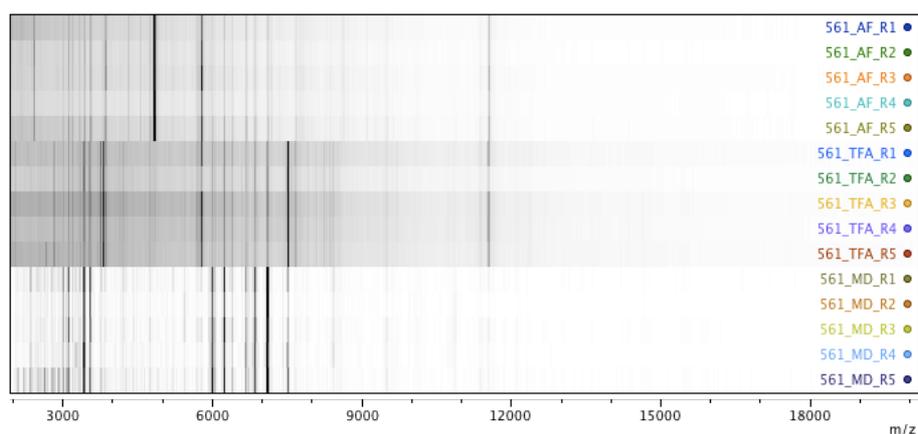


Figura 11 - Gel virtual de proteínas comparando os espectros de massa gerados a partir dos protocolos 1 (561_AF_RX), 3 (561_TFA_RX) e 6 (561_MD_RX) utilizando réplicas técnicas (5).

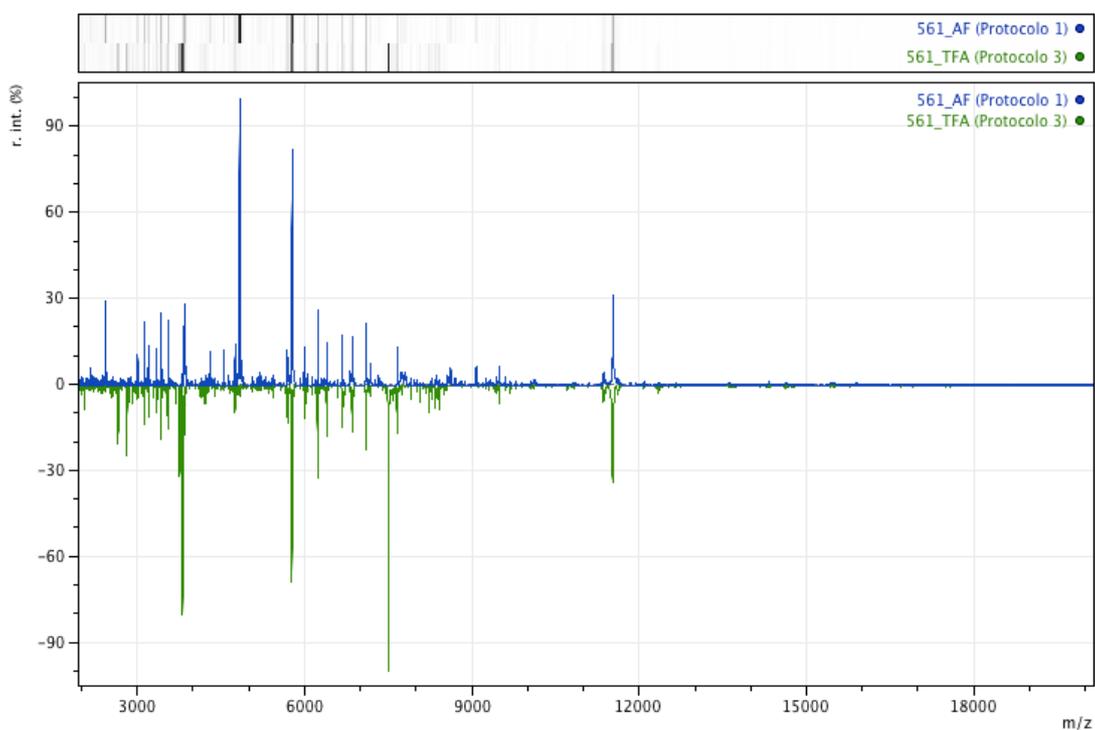


Figura 12 - Comparação dos espectros de massa e gel de proteínas (parte superior) dos protocolos 1 e 3.

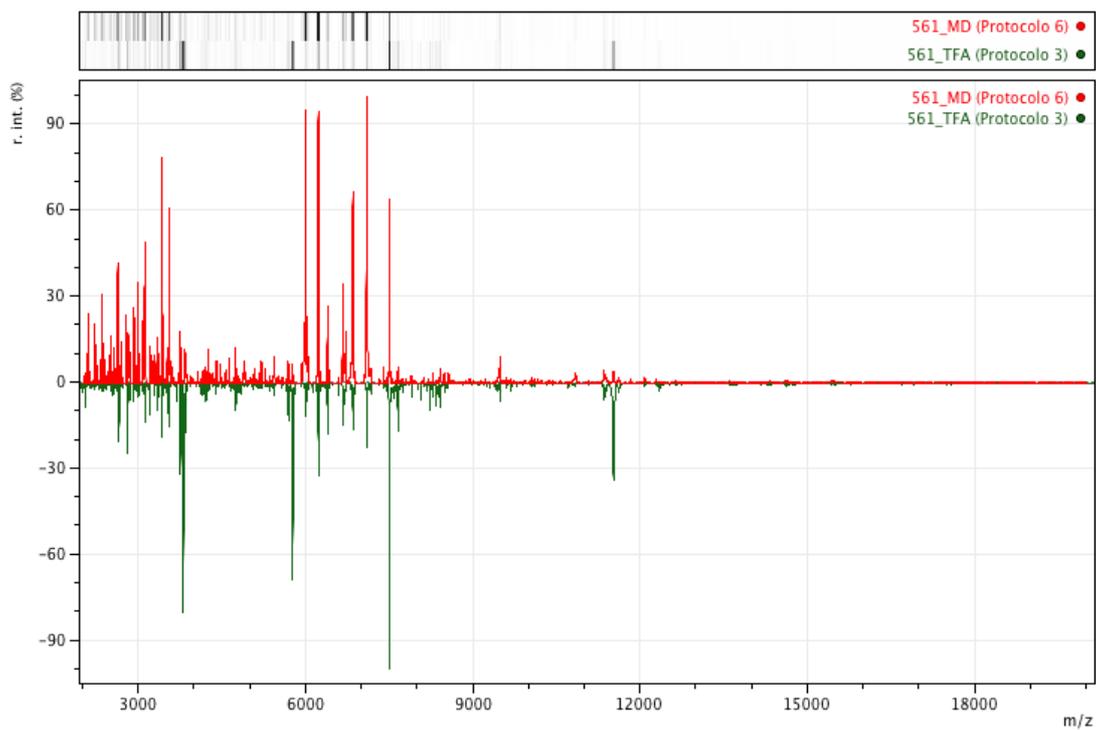


Figura 13 - Comparação dos espectros de massa e gel de proteínas (parte superior) dos protocolos 3 e 6.

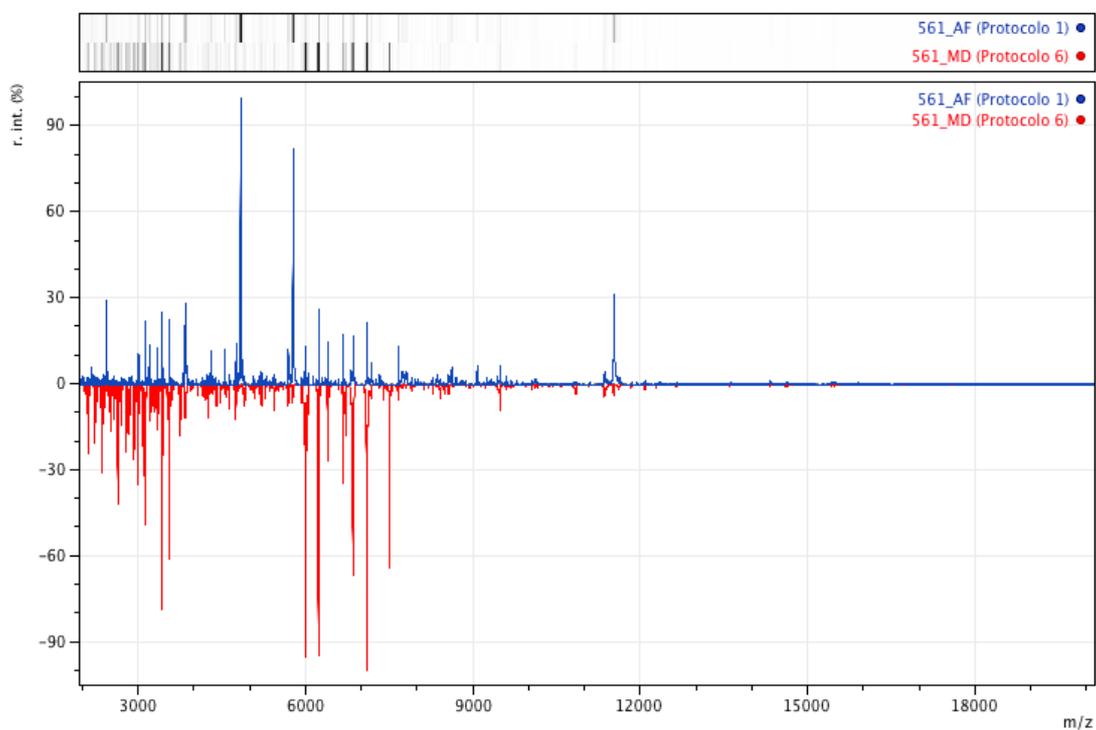


Figura 14 - Comparação dos espectros de massa e gel de proteínas (parte superior) dos protocolos 1 e 6.

6.4 - Teste para otimização da técnica de IC/MS

Utilizando o número de picos obtidos por espectro de massa aplicando diferentes testes (Teste 1, 2 e 3) e isolados (CCMB561, GAS933, CT203 e DHCR359) (Tabela 8) para verificação e otimização do protocolo 6 (aplicação direta do micélio na placa alvo do MALDI), foi possível realizar testes estatísticos (Shapiro-Wilk, One-Way ANOVA e Tukey's pairwise) e comparar as diferentes metodologias utilizadas. Por meio do teste de Shapiro-Wilk, foi possível observar que os dados (número de picos) possuem uma distribuição normal, com valor p de 0,47. O valor p do teste de One-way ANOVA foi de 0,01 ($p < 0,05$), mostrando que há diferença significativa no número de picos obtidos entre os testes (1, 2 e 3). O teste de Tukey's pairwise, mostrou que há diferença significativa entre os Testes 1 e 2 (valor de p : 0,00769) e, 2 e 3 (valor de p : 0,04058), e que não há diferença significativa entre os testes 1 e 3 (valor de p : 0,5282). Para cada isolado e teste foram feitas 9 tentativas de obtenção de espectros (1 Teste X 1 isolado X 3 réplicas biológicas X 3 réplicas técnicas), e a taxa de sucesso na obtenção destes foi contabilizada. Para os testes 1, 2 e 3 houve uma taxa de sucesso na obtenção dos espectros de respectivamente 67, 33 e 67% para o isolado CCMB561, 89, 22 e 100%, para o isolado CT203, 66, 0 e 100% para o isolado GAS933 e 100, 22 e 100% para o isolado DHCR359 (Figura 15). Com os dados da taxa de sucesso, foram realizados os mesmos testes estatísticos mencionadas anteriormente nessa sessão de resultados. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou que os dados possuem distribuição normal, com um valor de p de 0,1266. Por meio do teste de One-way ANOVA, o valor de p foi de 0,00282, mostrando que há diferença significativa ($p < 0,05$) na taxa de sucesso na obtenção de espectros entre os testes. O teste de Tukey's pairwise mostrou que há diferença significativa entre os testes 1 e 2 (valor de p : 0,00104), 2 e 3 (valor de p : 0,0003091) e não há diferença significativa entre os testes 1 e 3 (valor de p : 0,5991). A partir das análises, foi observado que quando adicionado o ácido trifluoroacético ao micélio, o número de íons (picos) obtidos e a taxa de sucesso na obtenção de espectros é inferior aos protocolos sem adição de ácido e com adição de ácido fórmico. Quando comparado os protocolos com adição de ácido fórmico e sem adição de nenhum ácido, estes não possuem diferença significativa quanto ao número de picos obtidos e a taxa de sucesso na obtenção de espectros. Assim, como o protocolo sem adição de nenhum ácido é o mais simples, mais rápido e ambientalmente mais correto, este foi o protocolo escolhido para ser utilizado nas etapas seguintes do trabalho.

Tabela 8 - Número de picos (íons) obtidos utilizando diferentes protocolos para obtenção de espectros.

Isolado	Número de íons obtidos		
	Micélio + AF + Matriz (Teste 1)	Micélio + TFA + Matriz (Teste 2)	Micélio + Matriz (Teste 3)
CCMB 561	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	779	0	579
	868	0	776
	895	0	827
	977	625	828
	979	857	916
	1134	891	1202
DHCR359	964	0	1080
	1058	0	1099
	1067	0	1105
	1189	0	1153
	1228	0	1157
	1327	0	1228
	1344	0	1281
	1359	722	1350
	1621	977	1635
CT 203	0	0	968
	903	0	1032
	906	0	1041
	1026	0	1076
	1080	0	1118
	1119	0	1228
	1254	0	1238
	1288	776	1240
	1317	892	1240
GAS933	0	0	718
	0	0	733
	0	0	744
	691	0	793
	860	0	879
	987	0	900
	1057	0	904
	1123	0	972
	1260	0	1100

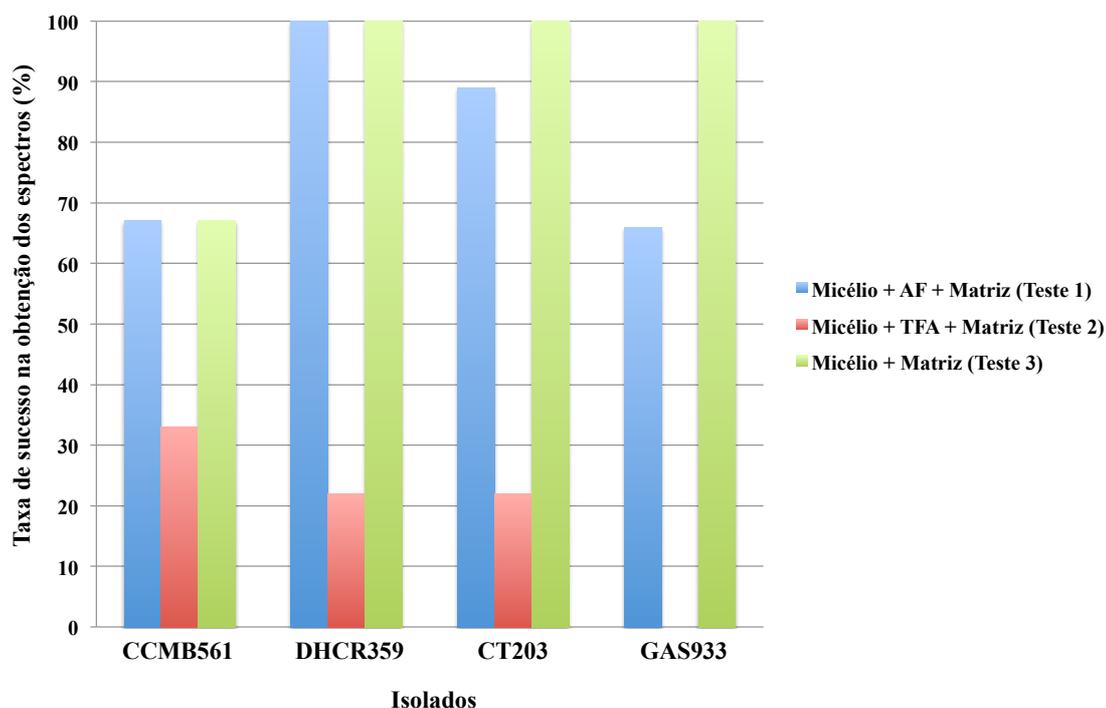


Figura 15 - Taxa de sucesso na obtenção de espectros.

6.5 - Criação e análise dos espectros de referência (MSP, *main spectrum profile*)

Como o uso do micélio diretamente (IC/MS) foi o protocolo mais eficiente quando comparado com aqueles que utilizam a extração prévia de proteínas, este foi o método escolhido para a obtenção dos espectros de todos os isolados e construção do banco de dados customizado (*in-house database*).

Para todos os isolados foram criados espectros virtuais (Figuras 16 e 17), utilizando o programa R. As análises visuais dos espectros de massa gerados, considerando picos que são maiores ou iguais a 20% de intensidade, revelaram que tanto a razão m/z quanto a intensidade do pico contribuem para a identificação dos isolados. Por exemplo, alguns picos (íons) podem ser considerados como biomarcadores para alguns grupos taxonômicos, como m/z : 5.984 ± 5 e 6.219 ± 5 para *Ganoderma* e m/z : 3.535 ± 5 e 6.050 ± 5 para *Fomitiporia* (Figuras 16 e 17).

Além disso, foi possível observar que a variação intraespecífica foi menor que a variação interespecífica para todos os isolados estudados. *Fomitiporia neotropica* (GAS1183) compartilha nove picos com o isolado *F. neotropica* (CT203) quando considerando apenas picos com intensidade maior ou igual a 20%, enquanto estes dois isolados de *F. neotropica* compartilharam apenas três picos com os isolados *Fomitiporia apiahyna* (GAS978) e *Fomitiporia impercepta* (GAS1037).

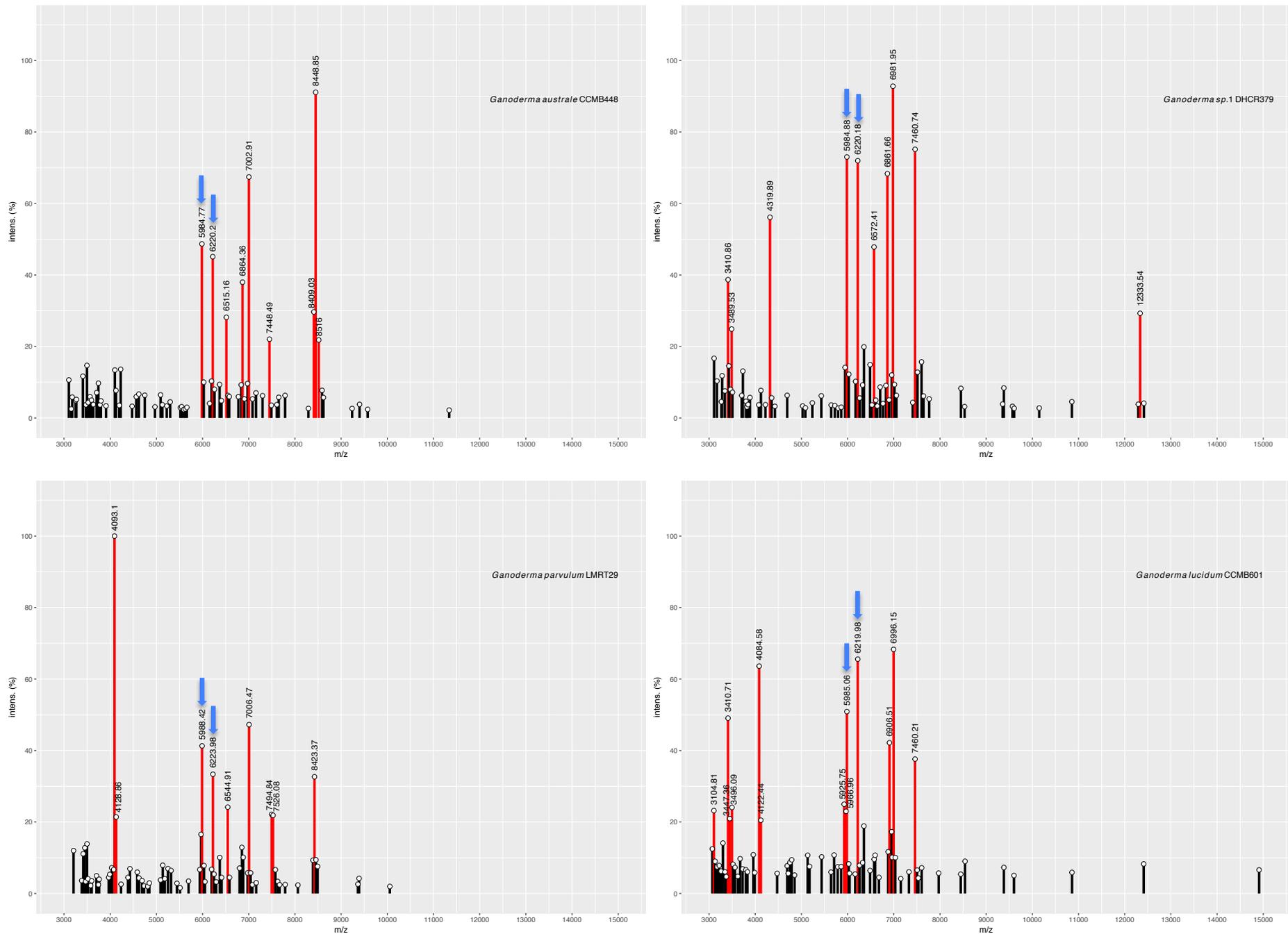


Figura 16 -MSP (espectro virtual) de *Ganoderma australe* (CCMB448), *Ganoderma sp.1* (DHCR379), *Ganoderma parvulum* (LMRT29) e *Ganoderma lucidum* (CCMB601). Picos com intensidade $\geq 20\%$ estão em vermelho e a relao m/z e mostrada. Setas em azul estão indicando os picos que são considerados biomarcadores para o genero.

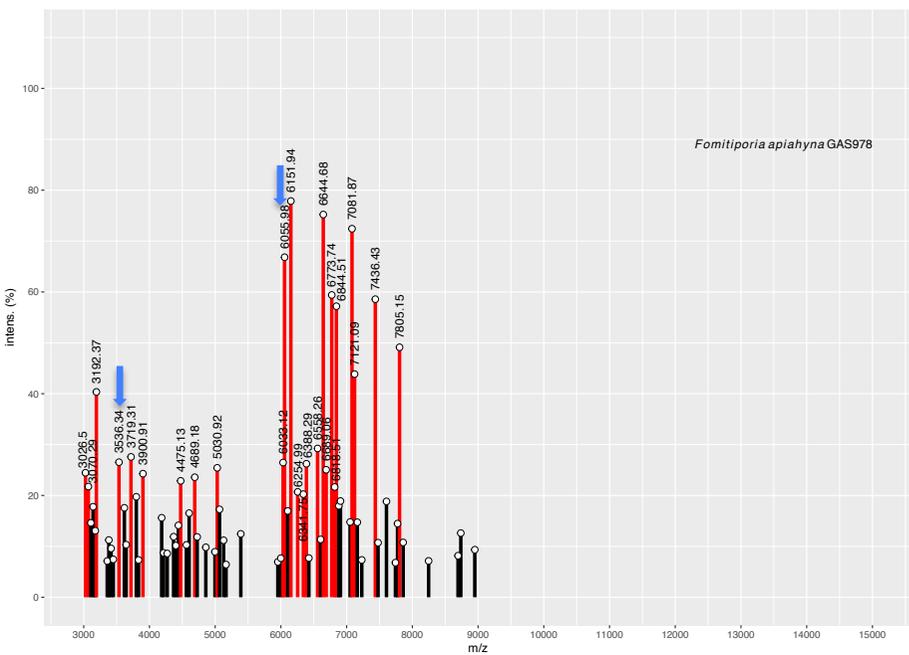
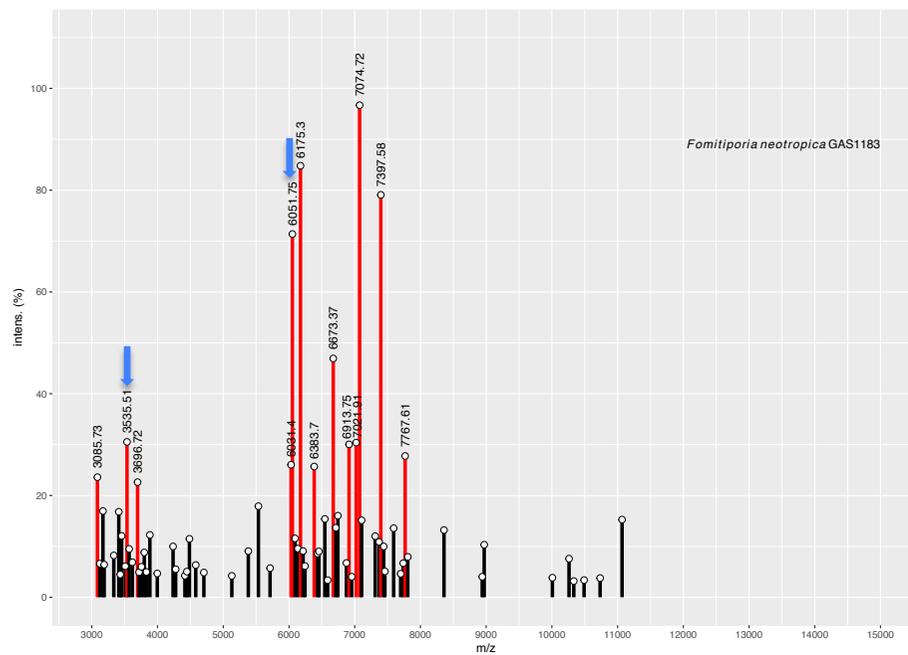
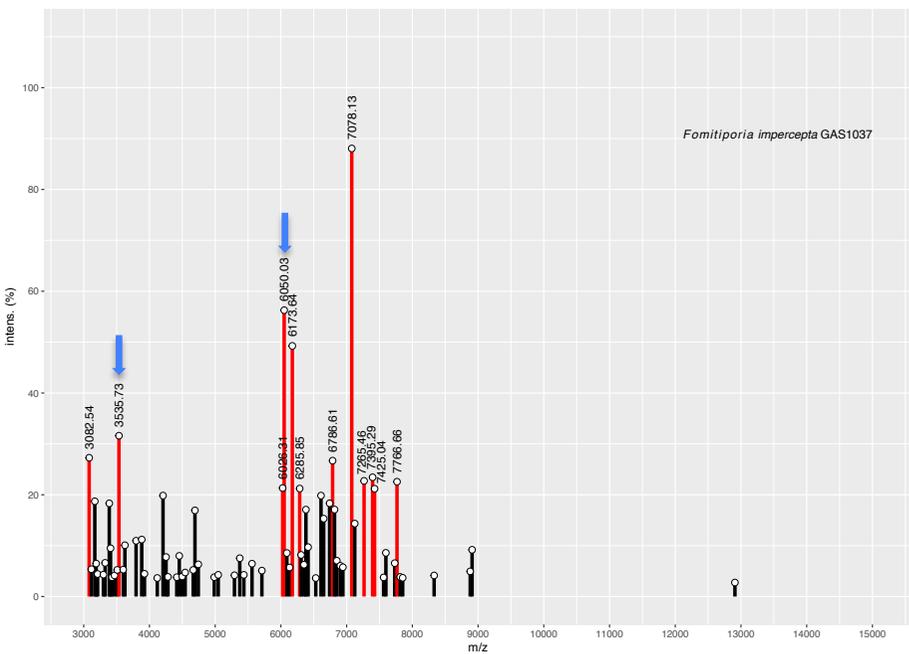
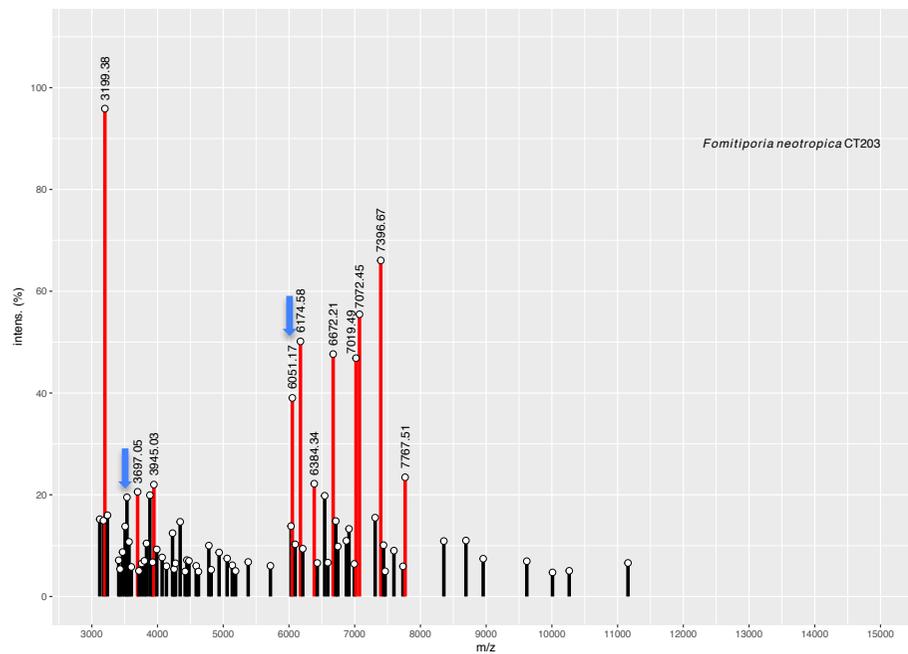


Figura 17 - MSP (espectro visual) de *Fomitiporia neotropica* (CT203), *Fomitiporia impercepta* (GAS1037), *Fomitiporia neotropica* (GAS1183) e *Fomitiporia apiahyna* (GAS978). Picos com intensidade $\geq 20\%$ estão em vermelho e a relação m/z é mostrada. Setas em azul estão indicando os picos que são considerados biomarcadores para o gênero.

6.6 - Análise de clusterização (dendrograma) baseada nos MSPs

A partir da análise do dendrograma (Figura 18), foi possível observar que os isolados estudados foram divididos em dois grandes clados, um agrupando os espécimes pertencentes a família Hymenochaetaceae e outro agrupando apenas os isolados da família Polyporaceae. Dentro do clado Hymenochaetaceae, os espécimes pertencentes ao gênero *Fomitiporia* formaram um clado com isolados pertencentes apenas a este gênero. Isolados pertencentes aos gêneros *Arambarria*, *Fulvifomes*, *Neomensularia*, *Phellinotus* e *Phellinus* se agruparam formando um grande clado. Na família Polyporaceae os isolados pertencentes aos gêneros *Ganoderma* e *Trametes* formaram subclados com espécimes pertencentes apenas a estes dois gêneros. Os isolados pertencentes aos gêneros *Fomes* e *Lentinus* formaram um subclado com um nível de distância entre as duas espécies compatível para isolados de gêneros diferentes ($dl > 400$).

No dendrograma as distâncias entre os isolados são apresentadas em unidades relativas denominadas nível de distância, em inglês, *Distance level* (dl). Para a família Polyporaceae, predominantemente, isolados da mesma espécie tiveram $dl < 100$, isolados do mesmo gênero e de espécies diferentes apresentaram $dl > 100$ e < 300 , e isolados de gêneros diferentes apresentaram $dl > 400$. Para a família Hymenochaetaceae, predominantemente, isolados que pertencem a mesma espécie apresentaram $dl < 100$, enquanto que isolados do mesmo gênero e de diferentes espécies, assim como isolados de diferentes gêneros, apresentaram $dl > 100$ (Figura 18). Logo, considerando as duas famílias estudadas, foi possível observar que, na medida que ocorre a mudança de nível taxonômico, partindo de espécie para família, o nível de distância vai aumentando gradualmente.

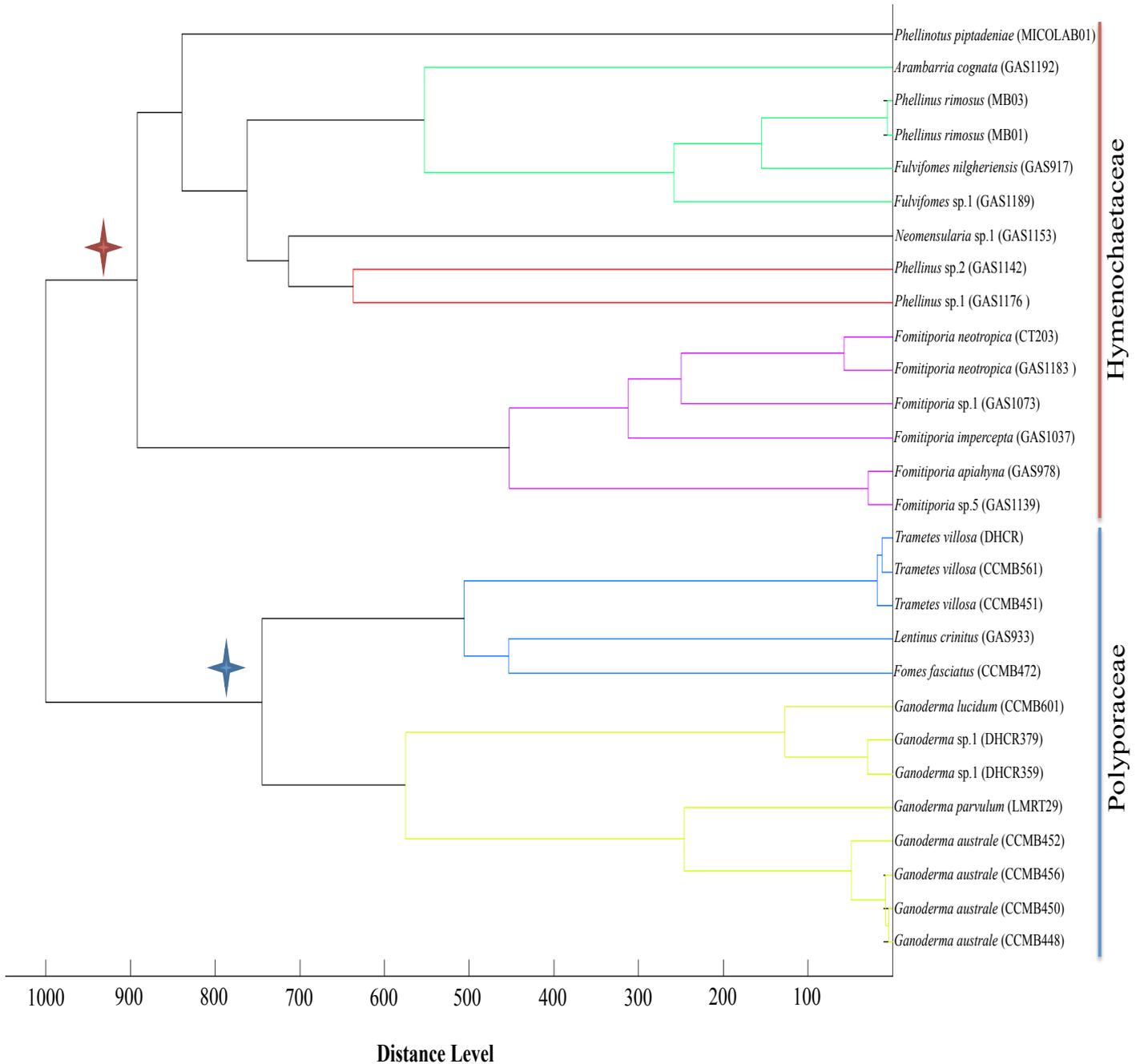


Figura 18 - Dendrograma baseado nos MSPs gerado com o software MALDI Biotyper 3 mostrando a relação entre os 28 basidiomicetos estudados.

6.7 – Análise de Componentes Principais (PCA)

A partir da análise de componentes principais (PCA), utilizando isolados dos gêneros *Fomitiporia* (Hymenochaetaceae) e *Ganoderma* (Polyporaceae), foi possível investigar a variação intraespecífica e interespecífica entre os isolados e os espectros de massa obtidos. Para o gênero *Ganoderma* (Polyporaceae) (Figura 19) foi possível observar que houve uma clara separação entre os isolados que pertencem a diferentes espécies, como por exemplo,

Ganoderma parvulum, *Ganoderma australe*, *Ganoderma* sp.1 e *Ganoderma lucidum* (variação interespecífica), e o método foi capaz de diferenciar até mesmo isolados da mesma espécie (variação intraespecífica), como por exemplo, os isolados DHCR379 e DHCR359 (Figura 19) que pertencem a espécie *Ganoderma* sp.1, e que foram nitidamente separados nesta análise, na qual os pontos referentes aos espectros (espectros provenientes de réplicas biológicas e técnicas) de cada isolado estão distantes entre eles.

Para o gênero *Fomitiporia* (Hymenochaetaceae) o resultado foi similar ao de *Ganoderma*, e o método se mostrou capaz de distinguir isolados da mesma, e de diferentes espécies (Figura 20), apresentando uma boa resolução intraespecífica e interespecífica.

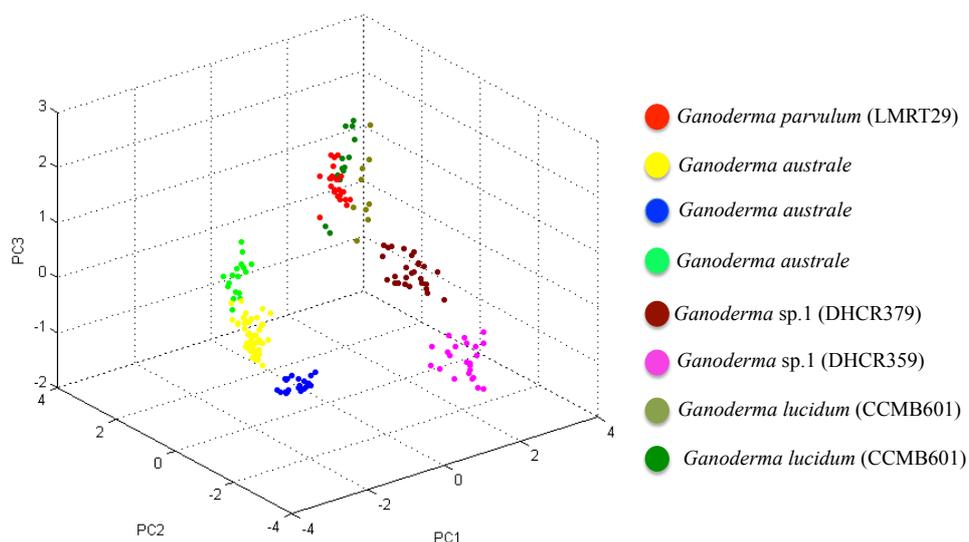


Figura 19 - Diagrama de dispersão tridimensional (3D) da análise de componentes principais (PCA) para 4 espécies diferentes do gênero *Ganoderma*.

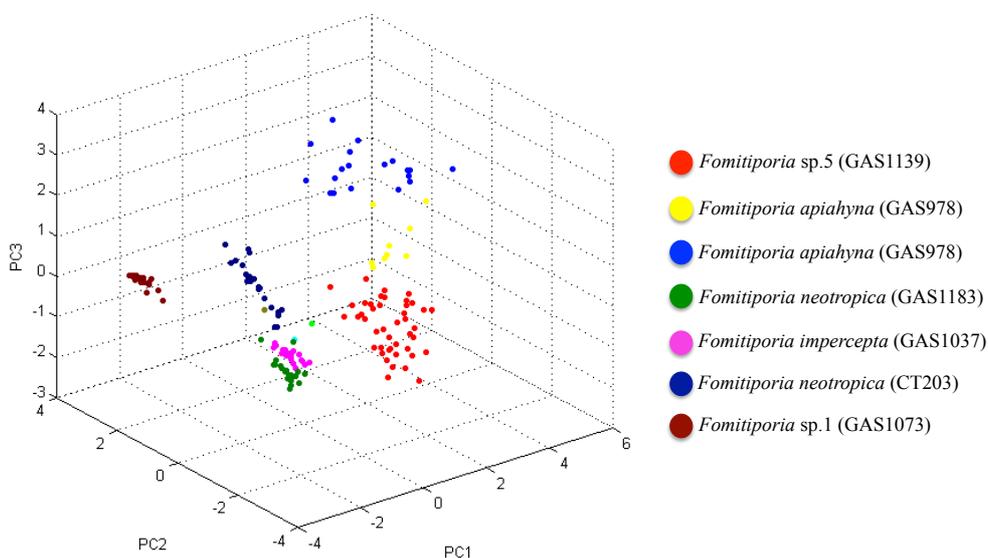


Figura 20 - Diagrama de dispersão tridimensional (3D) da análise dos componentes principais (PCA) para 5 espécies diferentes do gênero *Fomitiporia*.

6.8 - MALDI-TOF MS *Real Time Identification*

A robustez do método de identificação de Basidiomicetos por espectrometria de massa foi avaliada utilizando o banco de dados *in-house* criado neste trabalho e o *software* de identificação em tempo real fornecido pela Bruker. A taxa de identificação para todas as espécies foi de 100%, com *scores* superiores a 2.000 (Quadro 1). A maioria dos isolados, com exceção dos isolados *Ganoderma australe* CCMB456 e CCMB448, tiveram como primeiro *Match* (identificação) seu próprio espectro que já estava depositado no banco de dados, contudo, as espécies que tem mais de um MSP depositado, como por exemplo, as espécies: *Fomitiporia neotropica* CT203 (segundo *match*: *Fomitiporia neotropica* GAS1183, *score*: 2.311), *Phellinus rimosus* MB01 (segundo *match*: *Phellinus rimosus* MB03, *score*: 2.668), *Ganoderma australe* CCMB452 (segundo *match*: *Ganoderma australe* CCMB448, *score*: 2.017) e *Trametes villosa* CCMB561 (segundo *match*: *Trametes villosa* CCMB451, *score*: 2.248), tiveram como segundo *match* um MSP correspondente a mesma espécie, mas gerado a partir de outro isolado, mostrando assim, que os MSPs gerados são espécie-específicos, e que a técnica é apropriada para a identificação dos isolados estudados (membros das famílias Hymenochaetaceae e Polyporaceae).

Quadro 1 – Identificação dos 28 isolados utilizando MALDI-TOF MS biotyper e a ferramenta de identificação em tempo real (*Bruker Real Time Analysis*).

Família	Gênero	Espécie	Valor Score (ID Real Time)	Identificação Real Time (Best Match/Second Best Match)
	<i>Fomitiporia</i>	<i>Fomitiporia</i> sp.1 (GAS1073)	2.339	<i>Fomitiporia</i> sp.1 GAS1073
			1.354	<i>Fomitiporia apiahyna</i> GAS978
		<i>Fomitiporia neotropica</i> (CT203)	2.347	<i>Fomitiporia neotropica</i> CT203
			2.311	<i>Fomitiporia neotropica</i> GAS1183
		<i>Fomitiporia neotropica</i> (GAS1183)	2.684	<i>Fomitiporia neotropica</i> GAS1183
			2.109	<i>Fomitiporia neotropica</i> CT203
		<i>Fomitiporia</i>	2.557	<i>Fomitiporia apiahyna</i> GAS978

Hymenochaetaceae		<i>apiahyna</i> (GAS978)	2.038	<i>Fomitiporia</i> sp.2 GAS1139
		<i>Fomitiporia</i> <i>impercepta</i> (GAS1037)	2.508	<i>Fomitiporia</i> <i>impercepta</i> GAS1037
			1.634	<i>Fomitiporia</i> <i>neotropica</i> GAS1183
		<i>Fomitiporia</i> sp.5 (GAS1139)	2.273	<i>Fomitiporia</i> sp.5 GAS1139
			2.074	<i>Fomitiporia</i> <i>apiahyna</i> GAS978
	<i>Neomensularia</i>	<i>Neomensularia</i> sp.1 (GAS1153)	2.423	<i>Neomensularia</i> sp.1 GAS1153
			-	-
	<i>Fulvifomes</i>	<i>Fulvifomes</i> sp.1 (GAS1189)	2.654	<i>Fulvifomes</i> sp.1 GAS1189
			1.26	<i>Phellinus rimosus</i> MB03
		<i>Fulvifomes</i> <i>nilgheriensis</i> (GAS917)	2.393	<i>Fulvifomes</i> <i>nilgheriensis</i> GAS917
			-	-
	<i>Phellinus</i>	<i>Phellinus rimosus</i> (MB01)	2.668	<i>Phellinus rimosus</i> MB01
			2.668	<i>Phellinus rimosus</i> MB03
		<i>Phellinus rimosus</i> (MB03)	2.658	<i>Phellinus rimosus</i> MB01
			2.614	<i>Phellinus rimosus</i> MB03
		<i>Phellinus</i> sp.1 (GAS1176)	2.579	<i>Phellinus</i> sp.1 GAS1176
			1.257	<i>Trametes villosa</i> CCMB561
		<i>Phellinus</i> sp.2 (GAS1142)	2.433	<i>Phellinus</i> sp.2 GAS1142
			-	-
	<i>Phellinotus</i>	<i>Phellinotus</i> <i>piptadeniae</i> (MICOLAB01)	2.451	<i>Phellinotus</i> <i>piptadeniae</i> MICOLAB01
			-	-
	<i>Arambarria</i>	<i>Arambarria</i> <i>destruens</i> (GAS1192)	2.465	<i>Arambarria</i> <i>destruens</i> GAS1192
			-	-

Polyporaceae	<i>Lentinus</i>	<i>Lentinus crinitus</i> (GAS933)	2.238	<i>Lentinus crinitus</i> GAS933	
			-	-	
	<i>Ganoderma</i>	<i>Ganoderma australe</i> (CCMB456)	<i>Ganoderma australe</i> (CCMB456)	2.177	<i>Ganoderma australe</i> CCMB450
				2.084	<i>Ganoderma australe</i> CCMB456
		<i>Ganoderma australe</i> (CCMB450)	<i>Ganoderma australe</i> (CCMB450)	2.389	<i>Ganoderma australe</i> CCMB450
				2.256	<i>Ganoderma australe</i> CCMB456
		<i>Ganoderma australe</i> (CCMB448)	<i>Ganoderma australe</i> (CCMB448)	2.262	<i>Ganoderma australe</i> CCMB452
				2.062	<i>Ganoderma australe</i> CCMB448
		<i>Ganoderma australe</i> (CCMB452)	<i>Ganoderma australe</i> (CCMB452)	2.239	<i>Ganoderma australe</i> CCMB452
				2.017	<i>Ganoderma australe</i> CCMB448
		<i>Ganoderma</i> sp.1 (DHCR379)	<i>Ganoderma</i> sp.1 (DHCR379)	2.316	<i>Ganoderma</i> sp.1 DHCR379
				2.033	<i>Ganoderma</i> sp.1 DHCR359
		<i>Ganoderma</i> sp.1 (DHCR359)	<i>Ganoderma</i> sp.1 (DHCR359)	2.175	<i>Ganoderma</i> sp.1 DHCR359
				1.755	<i>Ganoderma</i> sp.1 DHCR379
		<i>Ganoderma lucidum</i> (CCMB601)	<i>Ganoderma lucidum</i> (CCMB601)	2.44	<i>Ganoderma lucidum</i> CCMB601
				1.579	<i>Ganoderma</i> sp.1 DHCR379
		<i>Ganoderma parvulum</i> (LMRT29)	<i>Ganoderma parvulum</i> (LMRT29)	2.496	<i>Ganoderma parvulum</i> LMRT29
				-	-
		<i>Fomes</i>	<i>Fomes fasciatus</i> (CCMB472)	2.121	<i>Fomes fasciatus</i> CCMB472
				-	-
	<i>Trametes</i>	<i>Trametes villosa</i> (CCMB561)	<i>Trametes villosa</i> (CCMB561)	2.309	<i>Trametes villosa</i> CCMB561
				2.248	<i>Trametes villosa</i> CCMB451
		<i>Trametes villosa</i> (DHCR)	<i>Trametes villosa</i> (DHCR)	2.17	<i>Trametes villosa</i> DHCR
				1.618	<i>Trametes villosa</i> CCMB451

		<i>Trametes villosa</i> (CCMB451)	2.061	<i>Trametes villosa</i> CCMB451
			1.99	<i>Trametes villosa</i> CCMB561

6.9 - Influência do substrato na identificação por MALDI-TOF MS

Os espectros de massa obtidos para os cinco isolados crescidos em PDA (Batata Dextrose Ágar) demonstraram que majoritariamente não há diferenças significativas nos perfis de proteínas quando comparados com aqueles obtidos a partir dos mesmos isolados cultivados em MEA (Figuras 21, 22, 23, 24 e 25). Estes resultados foram corroborados por meio da identificação em tempo real (*Real-Time identification*), que apresentou 100% de identificação correta de todos os isolados cultivados em PDA com *scores* superiores a 2.000 (Quadro 2) quando comparado com o banco de dados *in-house* criado para este trabalho utilizando o meio de cultura MEA.

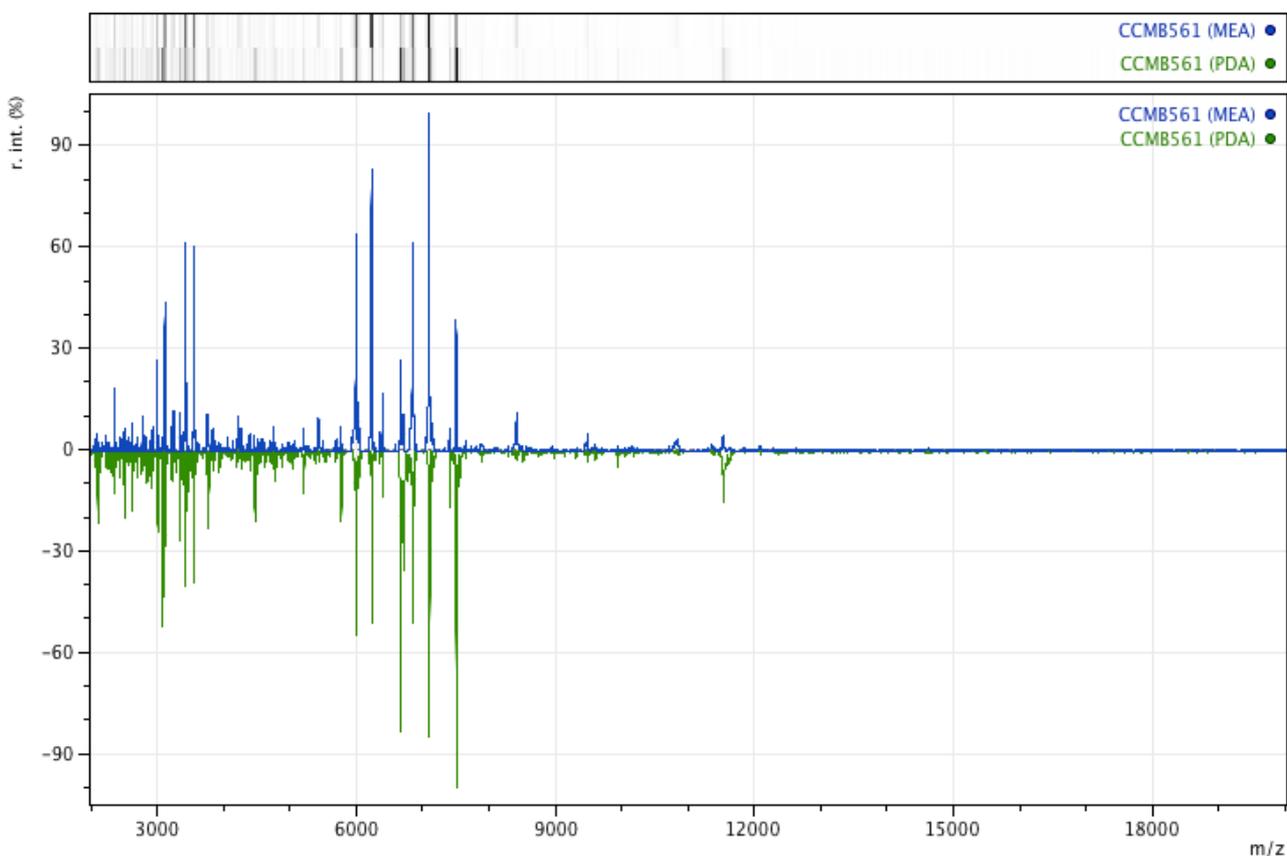


Figura 21 - Comparação dos espectros de massa do fungo *Trametes villosa* (CCMB561) obtidos utilizando os meios de cultura MEA e PDA.

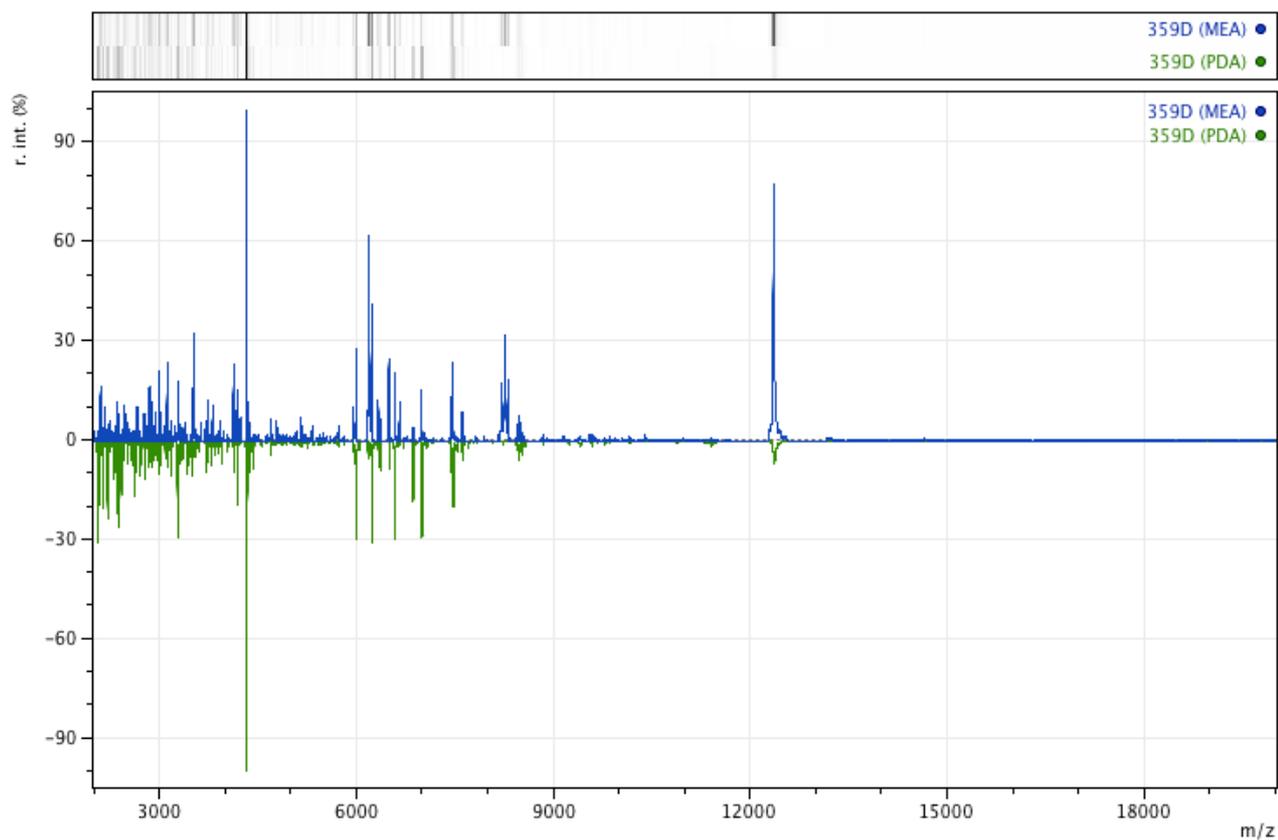


Figura 22 - Comparação dos espectros de massa do fungo *Ganoderma sp.1* (DHCR359) obtidos utilizando os meios de cultura MEA e PDA.

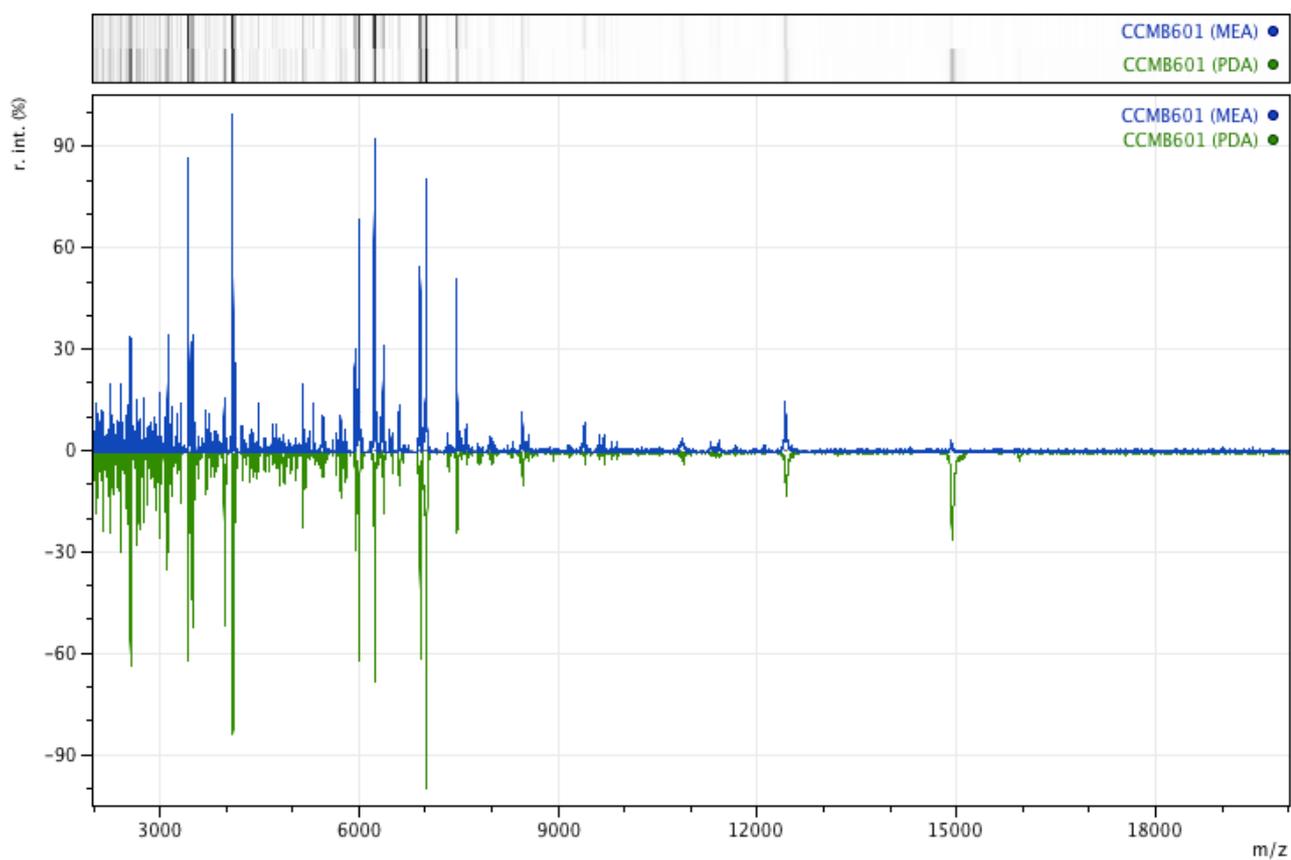


Figura 23 - Comparação dos espectros de massa do fungo *Ganoderma lucidum* (CCMB601) obtidos utilizando os meios de cultura MEA e PDA.

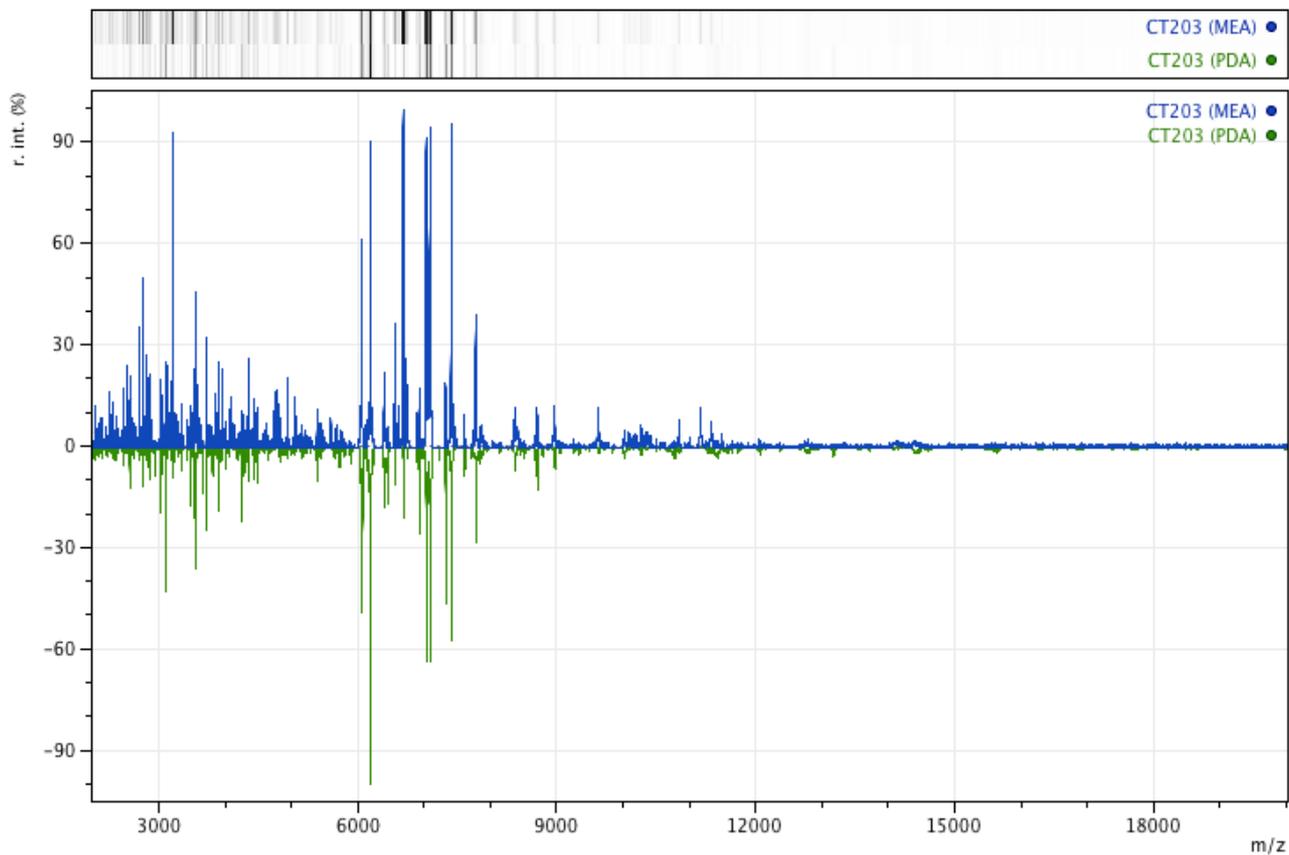


Figura 24 - Comparação dos espectros de massa do fungo *Fomitiporia neotropica* (CT203) obtidos utilizando os meios de cultura MEA e PDA.

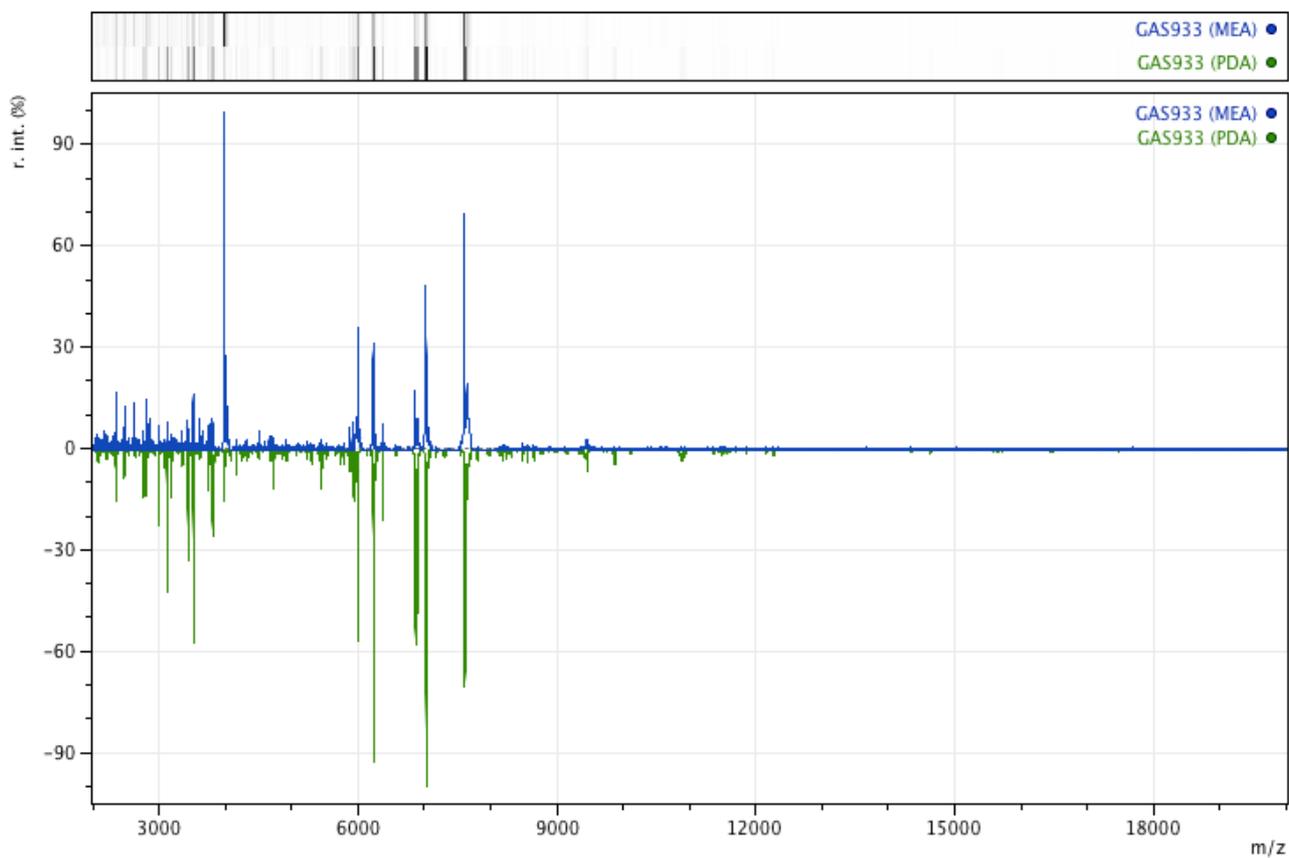


Figura 25 - Comparação dos espectros de massa do fungo *Lentinus crinitus* (GAS933) obtidos utilizando os meios de cultura MEA e PDA.

Quadro 2- Identificação dos cinco isolados cultivados em PDA utilizando o MALDI-TOF MS biotyper e a ferramenta de identificação em tempo real (*Bruker Real Time Analysis*).

Família	Gênero	Espécie	Réplica Biológica	Valor Score (ID Real Time)	Identificação Real Time (Best Match)
Hymenochaetaceae	<i>Fomitiporia</i>	<i>Fomitiporia neotropica</i> (CT203)	1	2.224	<i>Fomitiporia neotropica</i> (CT203)
		<i>Fomitiporia neotropica</i> (CT203)	2	2.418	<i>Fomitiporia neotropica</i> (CT203)
		<i>Fomitiporia neotropica</i> (CT203)	3	2.248	<i>Fomitiporia neotropica</i> (CT203)
Polyporaceae	<i>Ganoderma</i>	<i>Ganoderma lucidum</i> (CCMB601)	1	2.079	<i>Ganoderma lucidum</i> (CCMB601)
		<i>Ganoderma lucidum</i> (CCMB601)	2	2.204	<i>Ganoderma lucidum</i> (CCMB601)
		<i>Ganoderma lucidum</i> (CCMB601)	3	2.081	<i>Ganoderma lucidum</i> (CCMB601)
		<i>Ganoderma</i> sp.1 (DHCR379)	1	2.176	<i>Ganoderma</i> sp.1 (DHCR379)
		<i>Ganoderma</i> sp.1 (DHCR379)	2	2.217	<i>Ganoderma</i> sp.1 (DHCR379)
		<i>Ganoderma</i> sp.1 (DHCR379)	3	2.281	<i>Ganoderma</i> sp.1 (DHCR379)
	<i>Trametes</i>	<i>Trametes villosa</i> (CCMB561)	1	2.343	<i>Trametes villosa</i> (CCMB451)
		<i>Trametes villosa</i> (CCMB561)	2	2.408	<i>Trametes villosa</i> (CCMB451)
		<i>Trametes villosa</i> (CCMB561)	3	2.263	<i>Trametes villosa</i> (CCMB451)
	<i>Lentinus</i>	<i>Lentinus crinitus</i> (GAS933)	1	1.947	<i>Lentinus crinitus</i> (GAS933)
		<i>Lentinus crinitus</i> (GAS933)	2	2.129	<i>Lentinus crinitus</i> (GAS933)
		<i>Lentinus crinitus</i> (GAS933)	3	2.036	<i>Lentinus crinitus</i> (GAS933)

6.10 - Influência da idade da cultura na identificação por MALDI-TOF MS

Nossos resultados indicam que a idade do micélio (cultura) influencia no perfil de proteínas e na obtenção dos espectros de massa. Analisando os espectros, é possível observar que predominantemente, picos que aparecem na cultura com 10 dias de crescimento, desaparecem e/ou possuem intensidades diferentes nas culturas com 6 meses de cultivo (Figuras 26, 27 e 28 e 29). Para o isolado DHCR359 não foi possível gerar um espectro de massa, contudo, para os outros isolados foi possível obter espectros utilizando culturas com 6 meses de cultivo. A identificação foi obtida apenas para o isolado CT203, que foi identificado como *Fomitiporia* com *score* de 1.763 (identificação ao nível do gênero), enquanto que para os outros isolados (GAS933, CCMB601 e CCMB561) não foi obtida uma identificação confiável (*score* < 1.700).

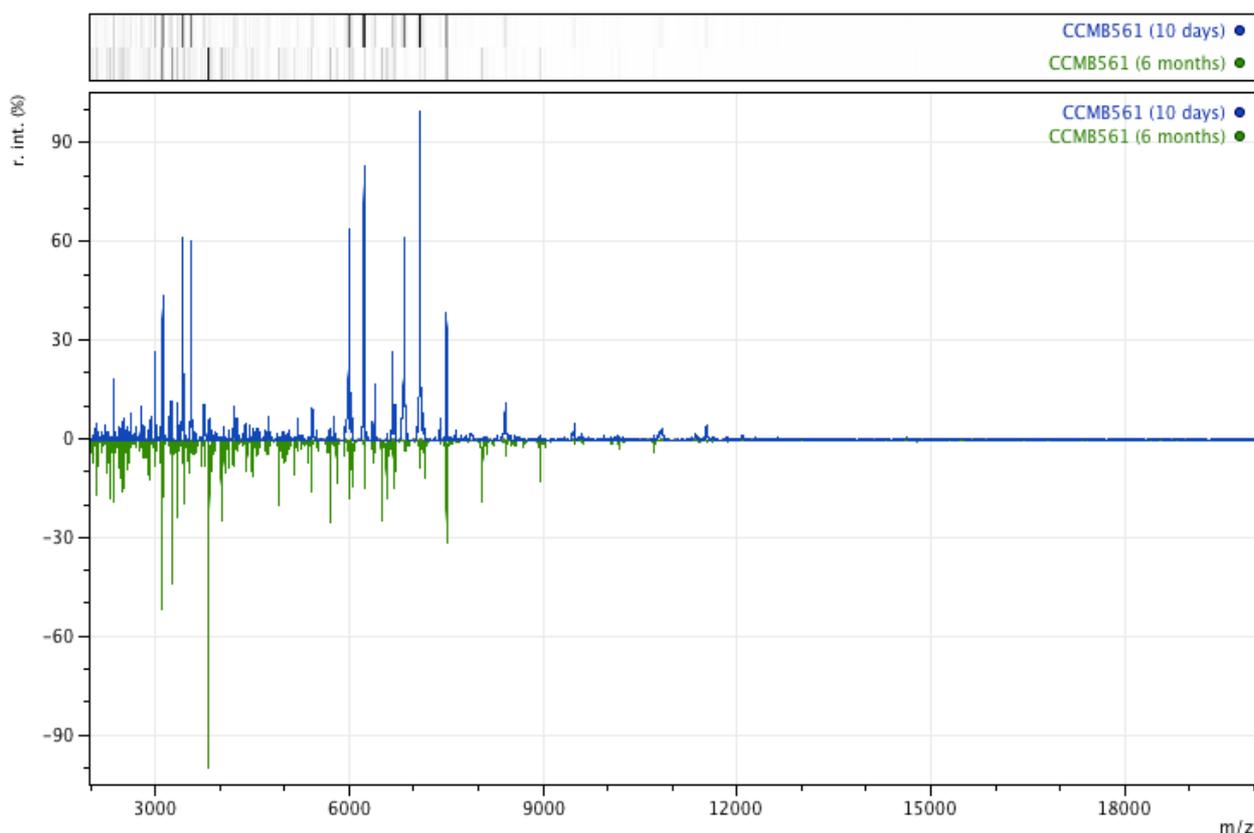


Figura 26 - Comparação dos espectros de massa do fungo *Trametes villosa* (CCMB561) obtidos utilizando períodos diferentes de cultivo (10 dias e 6 meses).

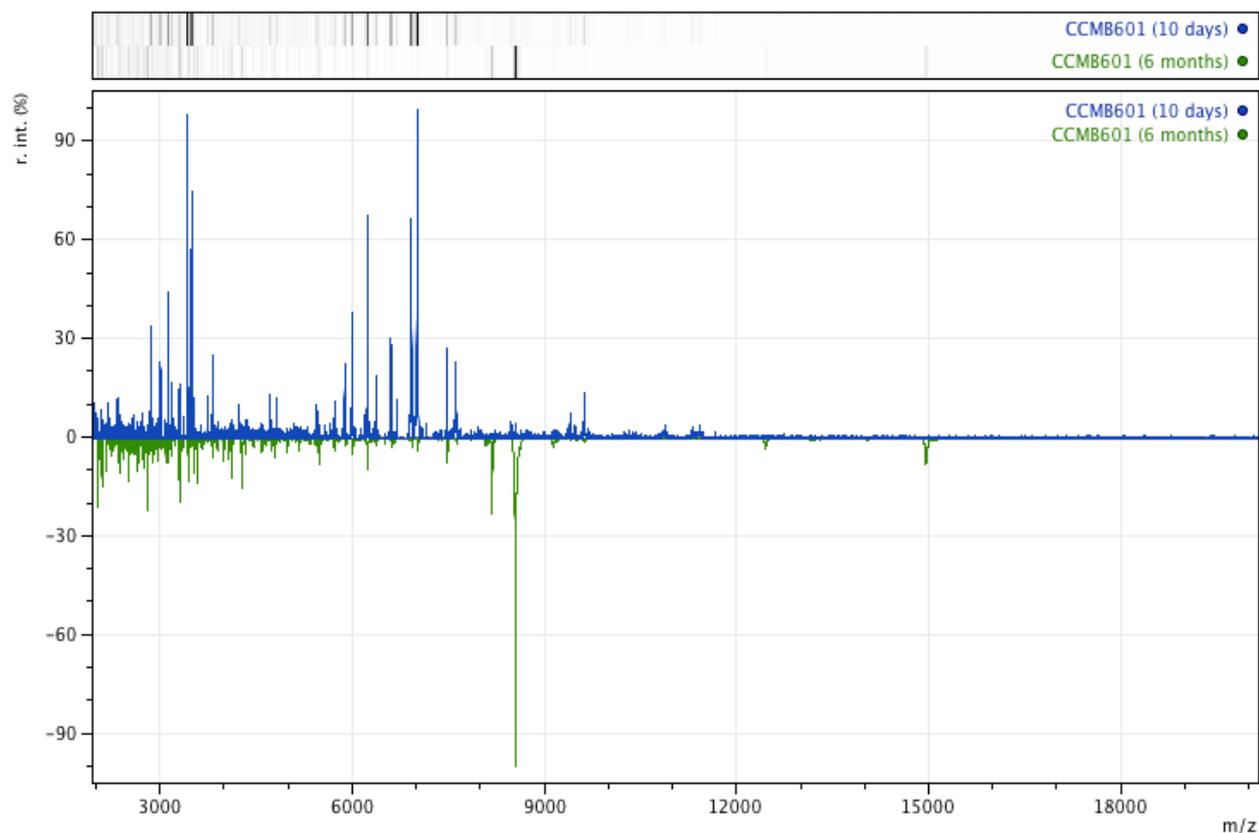


Figura 27 - Comparação dos espectros de massa do fungo *Ganoderma lucidum* (CCMB601) obtidos utilizando períodos diferentes de cultivo (10 dias e 6 meses).

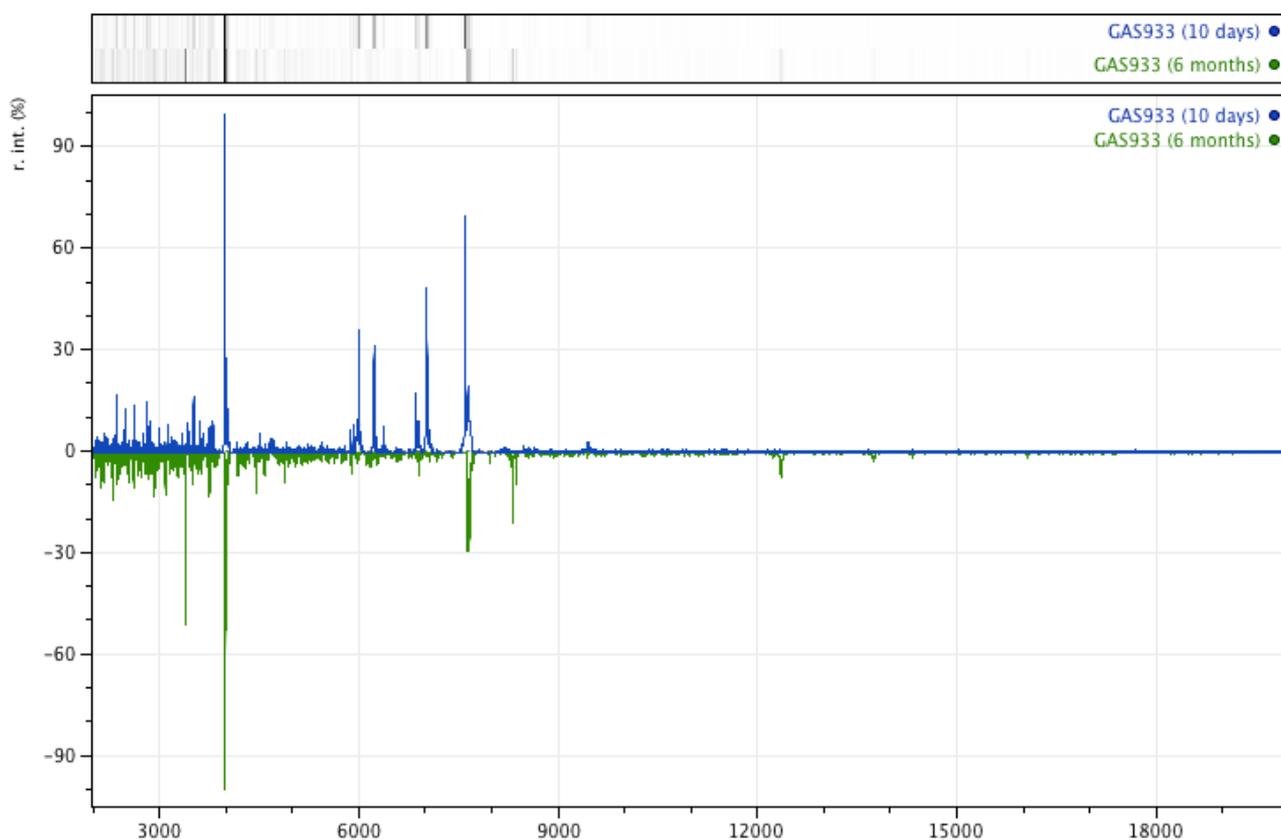


Figura 28 - Comparação dos espectros de massa do fungo *Lentinus crinitus* (GAS933) obtidos utilizando períodos diferentes de cultivo (10 dias e 6 meses).

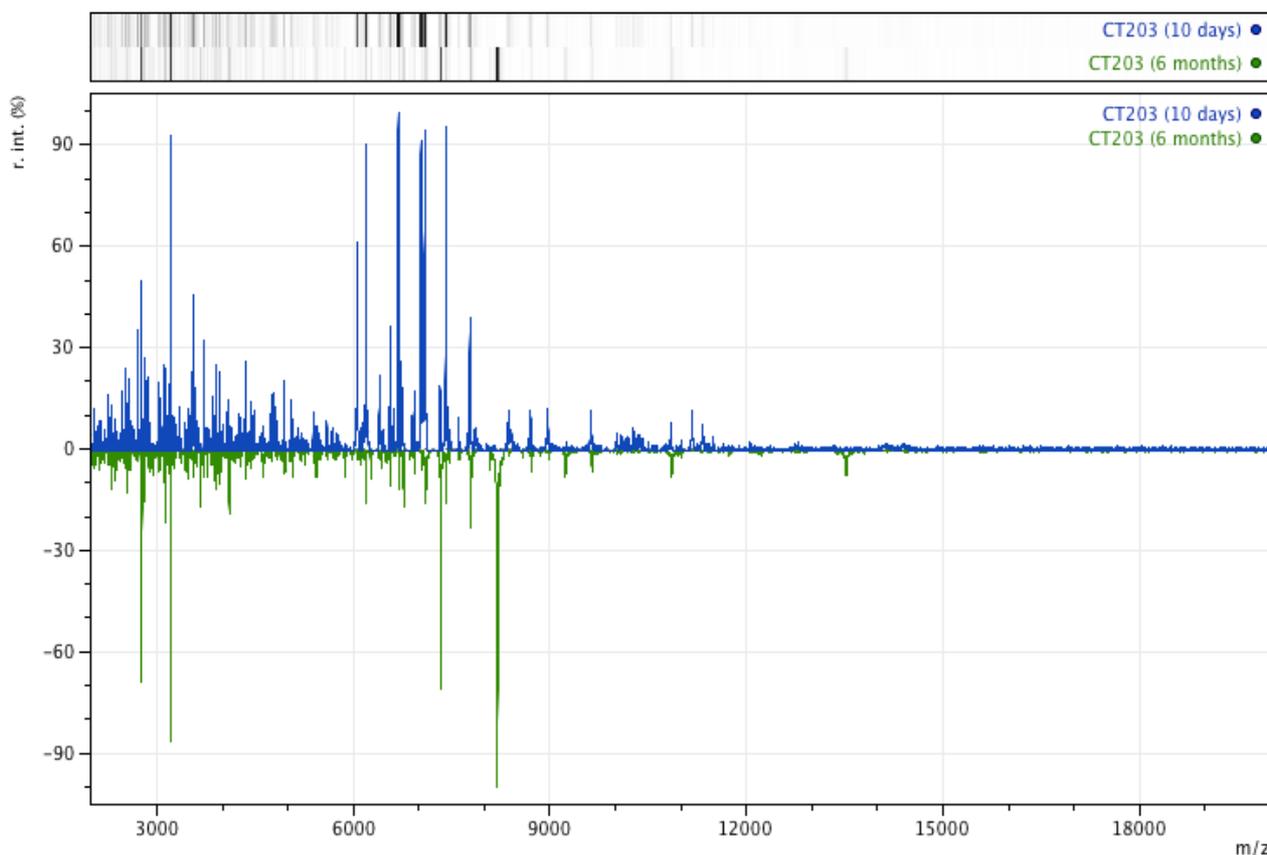


Figura 29 - Comparação dos espectros de massa do fungo *Fomitiporia neotropica* (CT203) obtidos utilizando períodos diferentes de cultivo (10 dias e 6 meses).

6.11 - Prospecção de peptaibols produzidos por fungos pertencentes ao filo basidiomycota

A partir da metodologia descrita por SILVA-HUGHES *et al.* (2015) e BRITO *et al.* (2014) não foi possível detectar/identificar peptídeos com atividade biológica (*peptaibols*) nos extratos dos fungos *Trametes villosa* CCMB561, *Fulvifomes nilgheriensis* GAS917 e *Ganoderma sp.* DHCR379. Com base na análise dos cromatogramas obtidos por meio da CLAE dos extratos de todos os isolados estudados, foi possível constatar que predominantemente as mesmas frações observadas na amostra controle, também estavam presentes nos extratos produzidos a partir dos isolados. Apesar disso, todas as frações foram recuperadas, secas no concentrador *Eppendorf Vacufuge plus vacuum concentrator* e ressuspendidas. Depois de ressuspendidas, estas foram analisadas no MALDI-TOF TOF Autoflex (*Autoflex III smartbeam MALDI TOF/TOF MS*). Os íons (picos) observados nos espectros de massa obtidos a partir dos extratos dos fungos também estavam presentes na amostra controle, ou seja, os peptídeos encontrados por meio das análises de CLAE e EM não eram produzidos pelos fungos, e sim um componente do meio de cultura (amostra controle).

Esses resultados foram observados para todos os isolados estudados, como por exemplo, para o isolado DHCR379, onde é possível constatar a partir do cromatograma obtido pela CLAE (Figura 30) que não houve uma diferença significativa entre o perfil da amostra controle e do extrato do isolado estudado, onde ambos apresentaram picos a partir de 3 ± 1 min (eluente A) e 19 ± 1 min (gradiente de concentração do eluente B). Quando comparamos os espectros de massa obtidos a partir das frações F3 do controle (detecção do pico em 21 minutos) e F6 da amostra DHCR379 (detecção do pico em 21 minutos) (Figura 31), estes apresentaram o mesmo perfil, com picos (íons) na mesma faixa de m/z (628 ± 1 , 650 ± 1 , 666 ± 1 , 681 ± 1 , 841 ± 1 , 855 ± 1 , 877 ± 1 , 893 ± 1 , 1066 ± 1 , 1082 ± 1). Quando comparamos os espectros de massa das frações F2 do controle (detecção do pico em 19 minutos) e F5 da amostra DHCR379 (detecção do pico em 19 minutos) (Figura 32), e as frações F1 do controle (detecção do pico em 3.7 minutos) e F1 da amostra DHCR379 (detecção do pico em 3.6 minutos) (Figura 33) os espectros de massa também apresentaram o mesmo perfil, corroborando que os peptídeos presentes no meio não eram produzidos pelo fungo e que os picos do cromatograma podem corresponder a outros compostos protéicos e/ou pigmentos.

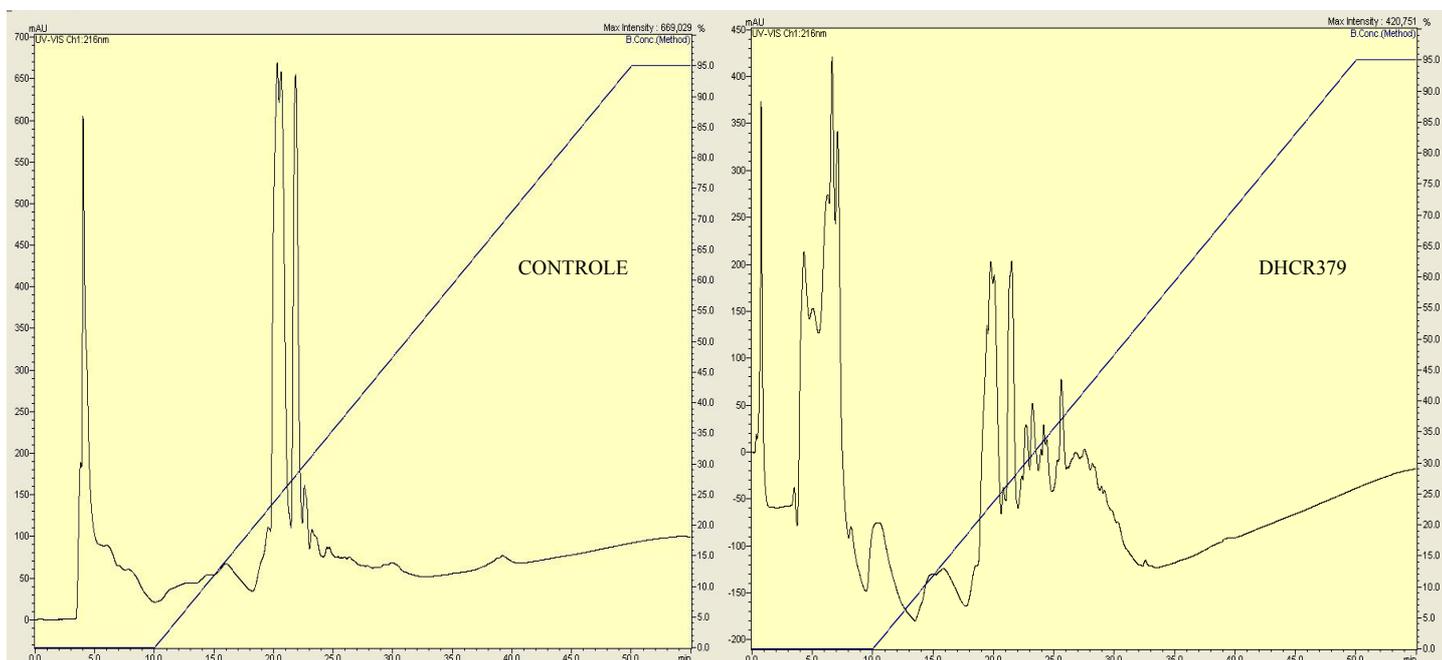


Figura 30 - Cromatografia por CLAE do extrato de *Ganoderma sp.1* DHCR379. O gradiente de acetonitrila + TFA 0,1% está representado em azul.

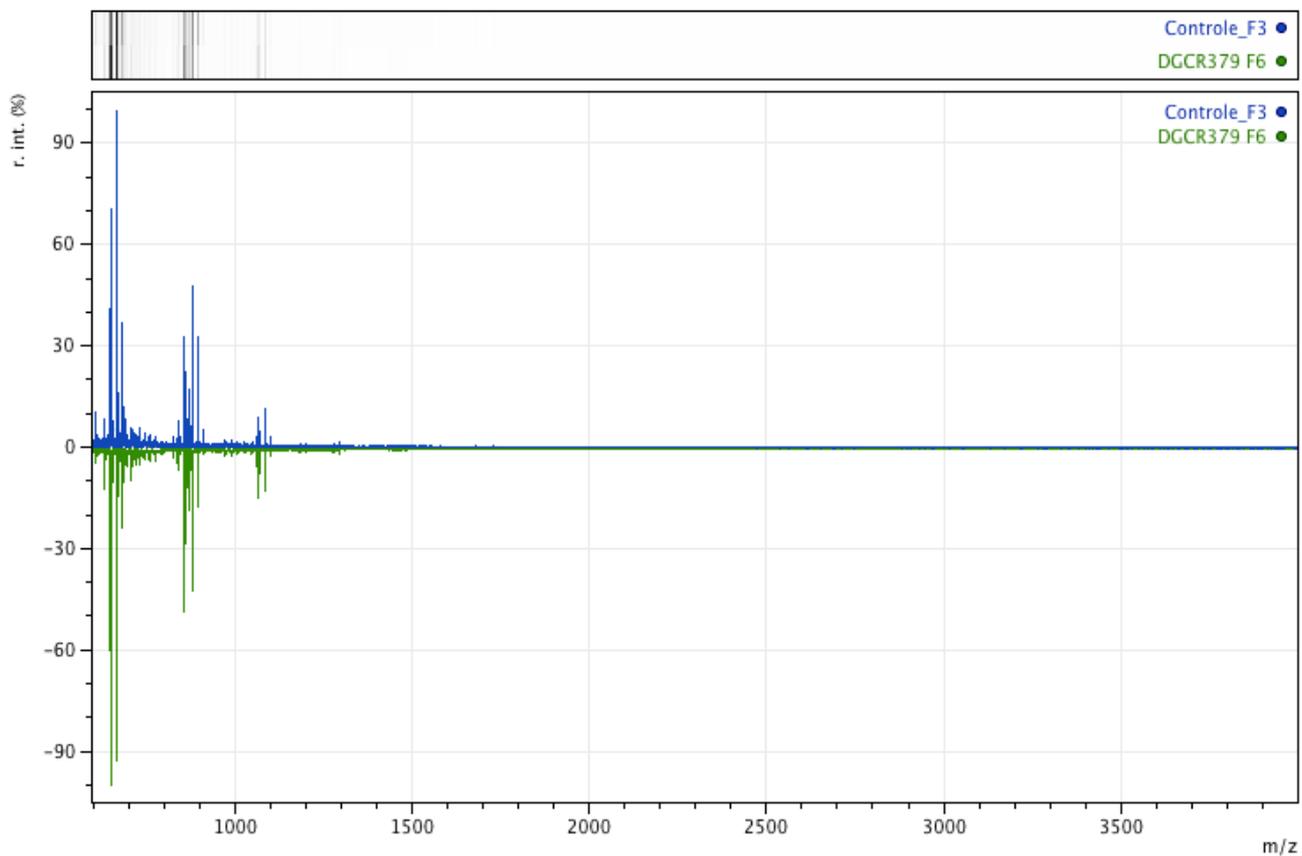


Figura 31 - Espectro de massa por MALDI/TOF da fração F3 da amostra controle e F6 do extrato de *Ganoderma sp.1* DHCR379.

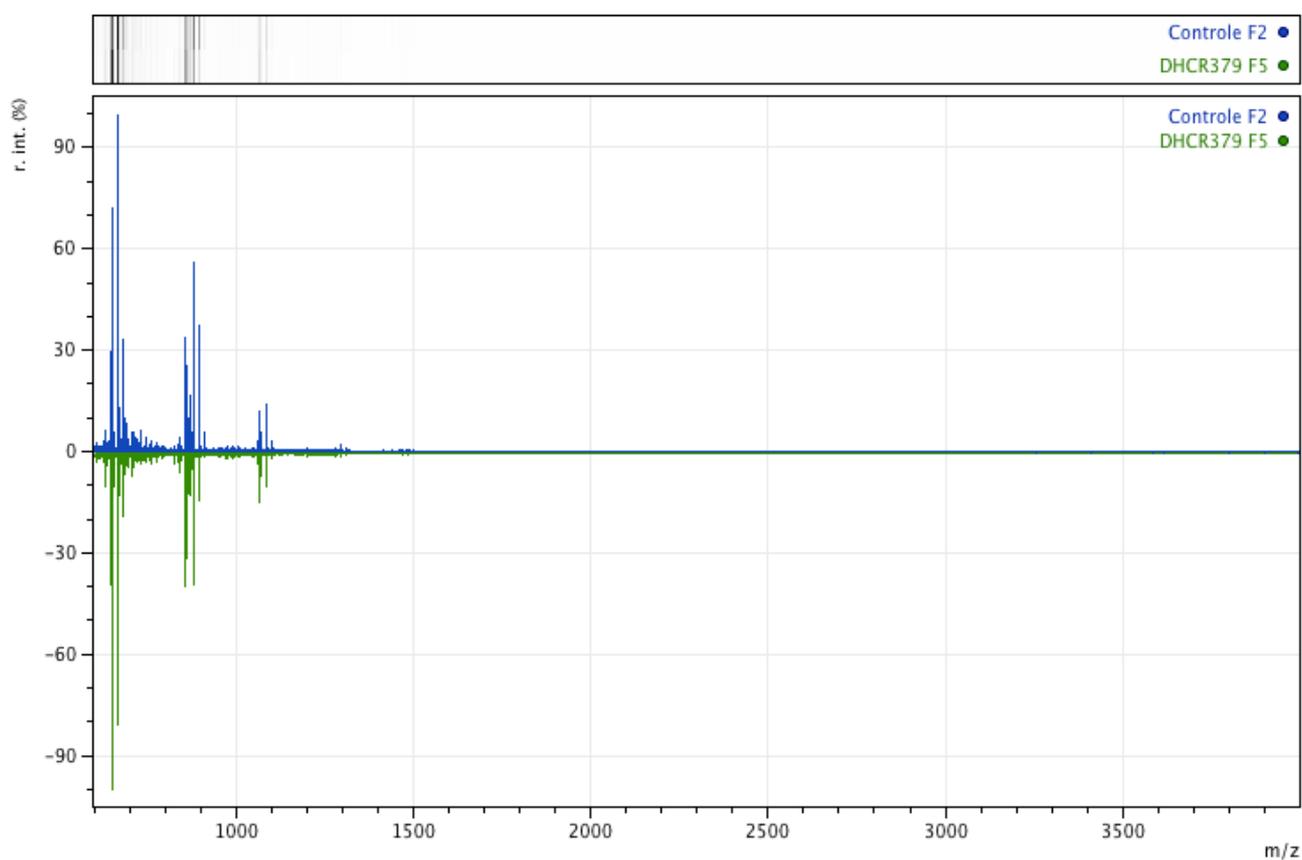


Figura 32 - Espectro de massa por MALDI/TOF da fração F2 da amostra controle e F5 do extrato de *Ganoderma sp.1* DHCR379.

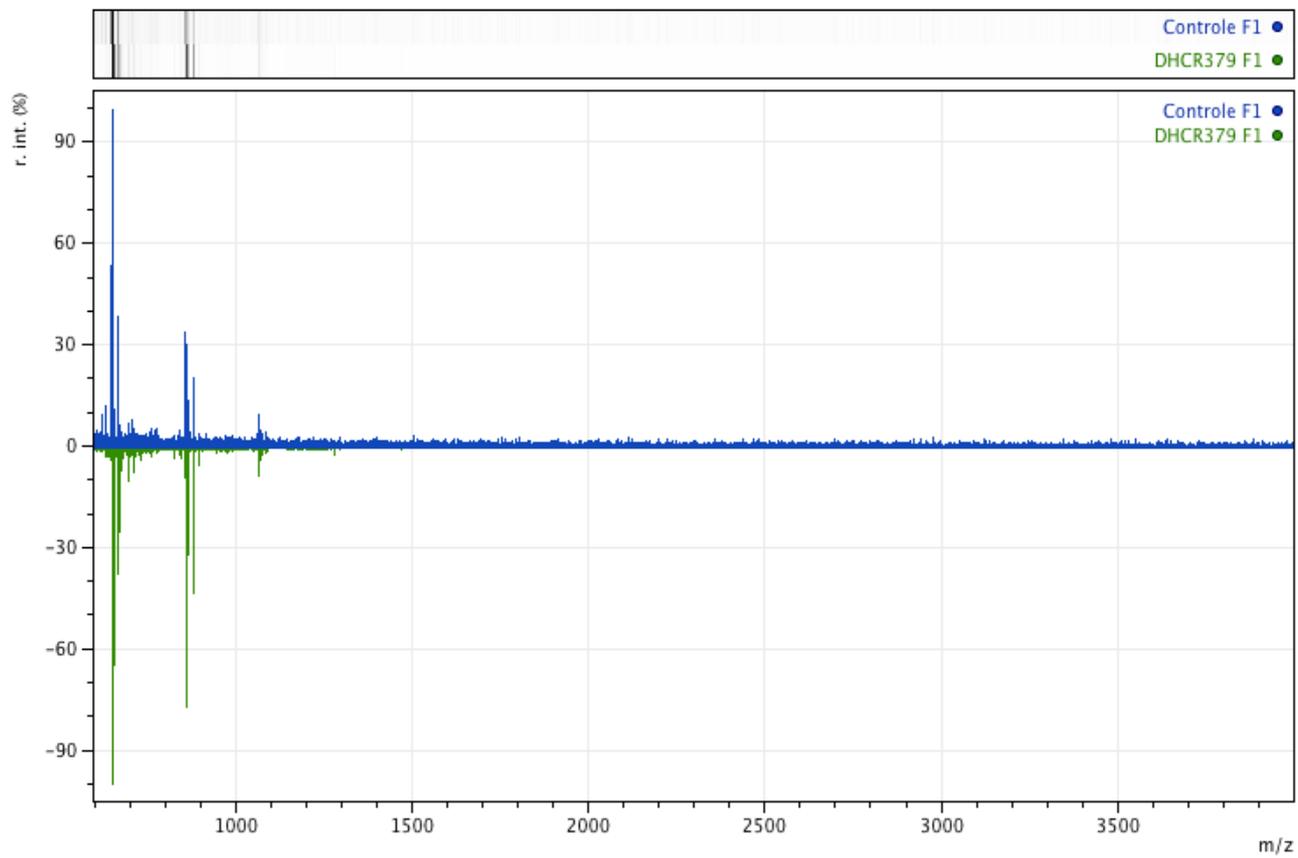


Figura 33 - Espectro de massa por MALDI/TOF da fração F1 da amostra controle e F1 do extrato de *Ganoderma sp.1* DHCR379.

7 – DISCUSSÃO

A identificação de fungos baseada na análise de caracteres morfológicos (taxonomia clássica) e/ou por meio da identificação molecular (sequenciamento do DNA) têm sido ferramentas amplamente empregadas nas últimas décadas na área da sistemática. Ambos os métodos são importantes ferramentas de identificação, possuem suas especificidades, e são utilizados pelos taxonomistas como estratégias complementares (BADOTTI *et al.*, 2017). A taxonomia clássica é uma técnica essencial na identificação de fungos, pois, por meio desta é possível investigar a evolução de caracteres morfológicos (RAJA *et al.*, 2017). Esta ferramenta apresenta boa resolução taxonômica em níveis hierárquicos mais altos, como por exemplo, classe, ordem, e família, contudo, para determinados táxons pode apresentar acurácia insatisfatória na identificação ao nível de gênero e espécie, principalmente entre espécies crípticas, que apresentam evolução convergente, e alta plasticidade fenotípica, tornando assim, o processo de identificação complexo até mesmo para profissionais altamente especializados (BICKFORD *et al.*, 2007; SEDLÁŘ *et al.*, 2009; SLEPECKY & STARMER, 2009; PRISTAŠ *et al.*, 2017). A identificação morfológica ainda pode se tornar restrita, pois, muitas estruturas macroscópicas são produzidas infreqüentemente, como no caso dos fungos pertencentes ao filo Basidiomycota, além disso, basidiomicetos comumente não esporulam em condições de cultura.

A identificação molecular através do sequenciamento do DNA se tornou uma ferramenta amplamente utilizada na identificação de fungos, sendo a região ITS a mais utilizada e considerada a região *barcode* para este grupo de organismos (SCHOCH *et al.*, 2012; BADOTTI *et al.*, 2017; BADOTTI *et al.*, 2018). Esta ferramenta impulsionou o campo da taxonomia, possibilitando a identificação de novos organismos e a delimitação destes dentro dos táxons (BLACKWELL, 2011). A escolha de um marcador taxonômico apropriado permite na maioria das vezes a identificação acurada ao nível de espécie, tornando esta técnica altamente específica. Contudo, a precisão desta depende da acurácia das sequências depositadas nos bancos de dados públicos, como por exemplo, o GenBank, e já foi reportado na literatura que muitas sequências depositadas não estão identificadas corretamente, e/ou são mal anotadas. Para alguns táxons, o uso de apenas um marcador taxonômico não é suficiente para a identificação ao nível de espécie, havendo a necessidade de sequenciar outras regiões do DNA para alcançar uma identificação precisa, e diferenciar táxons intimamente relacionados. Além disso, esta ferramenta possui um fluxo de trabalho muito extenso,

tornando o processo de identificação demorado e dispendioso (NILSSON *et al.*, 2006; BIDARTONDO, 2008; SCHOCH *et al.*, 2012; KÖLJALG *et al.*, 2013).

A busca por um método promissor para a identificação de fungos, um grupo de organismos heterogêneo e complexo, continua sendo um desafio no campo da taxonomia. Contudo, nas últimas duas décadas a Espectrometria de Massa por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz - tempo de voo (MALDI-TOF MS) surgiu como uma ferramenta promissora para a identificação de micro-organismos, sendo um método rápido, simples e fácil, quando comparado com a taxonomia clássica, e molecular baseada no sequenciamento do DNA (CHALUPOVÁ *et al.*, 2014). Esta ferramenta tem sido amplamente utilizada para a identificação de bactérias e fungos (ascomicetos) de interesse clínico, contudo, é pouco explorada para a identificação de fungos ambientais com interesse biotecnológico, principalmente de basidiomicetos (KALLOW *et al.*, 2010; ALANIO *et al.*, 2011; DEL CHIERICO *et al.*, 2012; RANQUE *et al.*, 2013; QUINTILLA *et al.*, 2018).

Neste estudo nós avaliamos o desempenho/eficiência do MALDI-TOF MS na identificação de 28 isolados pertencentes as famílias Hymenochaetaceae (15) e Polyporaceae (13) e ao filo Basidiomycota. Este último, é o segundo maior filo pertencente ao Reino Fungi e representa um importante e diverso grupo de organismos com diversas funções ecológicas e aplicações biotecnológicas.

Os isolados utilizados para a execução desta pesquisa foram obtidos de diferentes coleções de micro-organismos, e estes foram identificados com base em caracteres morfológicos e por meio da região ITS do rDNA. Dos 28 isolados, 20 foram identificados ao nível de espécie e 8 ao nível de gênero, sendo que estes últimos podem corresponder a espécies novas. Depois de identificados, os isolados foram utilizados para desenvolver toda a parte do trabalho de padronização da técnica de MALDI-TOF MS para a identificação de basidiomicetos pertencentes as famílias, gêneros e espécies estudadas, criação do banco de dados *in-house*, e testes complementares para a validação da técnica e análise de diferentes variáveis (meio de cultura e tempo de cultivo).

Até então, a maioria dos estudos publicados utilizando e avaliando a acurácia da EM por MALDI-TOF na identificação de fungos, tem realizado a extração prévia de proteínas do micélio (SUGAWARA *et al.*, 2016; PRISTAŠ *et al.*, 2017; DEL CHIERICO *et al.*, 2012) ou esporos (BEINHAUER *et al.*, 2016; CROSSAY *et al.*, 2017) para a obtenção do espectro de massa (*protein fingerprinting*) e posterior identificação do micro-organismo de interesse. A rigidez da parede celular dos fungos, que é constituída principalmente por glicanas e quitina,

conduziu para que está fosse a metodologia preconizada para a identificação deste grupo de organismos através da EM. Nesta pesquisa, nós avaliamos seis diferentes protocolos para a obtenção dos espectros de massa (perfis de proteínas), sendo cinco aplicando a extração prévia de proteínas, e um utilizando o micélio diretamente na placa alvo do MALDI-TOF. Inesperadamente, dentre todos os protocolos testados, aquele que apresentou melhor desempenho quanto a obtenção de espectros de massa de qualidade, com maior número de picos, e reprodutíveis, foi o que utiliza o micélio diretamente na placa alvo, apenas com a adição da matriz orgânica. Além de ser o protocolo mais simples e rápido, este oferece vantagens, tais como, independência da formação do basidioma e redução no uso de compostos orgânicos tóxicos. Assim como nosso trabalho, SCHMIDT & KALOW (2005) também aplicaram o micélio diretamente na placa alvo do MALDI e obtiveram sucesso na obtenção dos espectros.

Testes adicionais na fase pré-analítica foram realizados para verificar se só a adição do micélio mais a matriz orgânica na placa alvo do MALDI-TOF seria suficiente para obtenção de espectros de massa de qualidade. Como na literatura é reportada a necessidade de lisar a parede celular com um ácido orgânico forte (FENSELAU & DEMIREV, 2001), neste trabalho nós também testamos a adição de dois ácidos (TFA e AF) diretamente no micélio antes de cobri-lo com a matriz orgânica. A partir dos resultados, foi possível observar que diferentemente do que é descrito na literatura, a adição de ácidos não melhorou a performance da técnica, e quando adicionado o TFA, este teve um efeito negativo na obtenção e reprodutibilidade dos espectros.

A influência de diferentes substratos no perfil de proteínas foi avaliada utilizando dois meios de cultura distintos: Extrato de Malte Ágar (MEA) e Batata Dextrose Ágar (PDA). A comparação dos espectros obtidos usando MEA e PDA revelaram que não há diferenças significativas nos perfis de proteínas (espectros de massa) quando estes são comparados. Estudos demonstraram que a utilização de diferentes meios de cultura (substratos) não influencia significativamente nos perfis de proteínas de bactérias e fungos, conseqüentemente não interferindo na precisão da identificação. Este fenômeno pode ser explicado pelo fato de que os principais picos (íons) dos espectros de massa podem vir de proteínas que executam funções de manutenção da célula (*housekeeping proteins*), ou proteínas ribossomais (VALENTINE, 2005; CROSSAY *et al.*, 2017). Também tem sido relatado na literatura que variações sensíveis nas condições de crescimento, como pH e temperatura, impactam pouco

na identificação de micro-organismos através do MALDI-TOF MS, contribuindo desta forma para resultados mais reprodutíveis. (VALENTINE *et al.*, 2005).

Neste estudo também testamos a influência do tempo de cultivo no perfil de proteínas e na acurácia da identificação. Por meio da análise dos espectros de massa obtidos, foi possível observar perfis de proteínas discrepantes entre espectros gerados com culturas frescas e aquelas com seis meses de cultivo. Desta forma, nossos dados indicaram que culturas novas (5 a 10 dias de cultivo) são cruciais para obter espectros reprodutíveis e de qualidade. Até então nenhum estudo avaliou a influência do tempo de cultivo nos perfis de proteínas e na obtenção de espectros de massa a partir de isolados pertencentes ao filo Basidiomycota. Contudo, CROSSAY *et al.* (2017) utilizando esporos com 3 anos de diferença (2011 – 2014) pertencentes a isolados do filo Glomeromycota, não encontraram diferenças consideráveis nos espectros de massa ao longo do tempo. A estabilidade do perfil de proteínas relatada no referido estudo pode ter sido devido ao fato de que os autores utilizaram esporos, que são consideradas estruturas de resistência, enquanto no nosso trabalho, utilizamos micélio que é uma estrutura mais suscetível as alterações ambientais.

As análises dos espectros de referência (MSPs) gerados neste trabalho para todos os isolados demonstraram que a técnica de EM por MALDI-TOF é adequada para a identificação confiável ao nível de espécie e para a discriminação de táxons das famílias Hymenochaetaceae e Polyporaceae (Basidiomycota). Este resultado é altamente promissor para a sistemática dos gêneros estudados, como por exemplo, para o gênero *Ganoderma*, que é reconhecidamente muito problemática, tanto em relação a identificação baseada em caracteres morfológicos, como através da identificação molecular baseada no sequenciamento do DNA (MONCALVO & RYVARDEN, 1997; JARGALMAA *et al.* 2017, COSTA-REZENDE *et al.*, 2017). Além disso, vale a pena ressaltar que este gênero compreende espécies com grande potencial medicinal (BISHOP *et al.* 2015). Logo, ferramentas confiáveis para a identificação do grupo são de grande relevância científica.

A alta eficiência e aplicabilidade do MALDI-TOF MS na identificação de fungos foi mantida mesmo para aqueles fungos que são produtores de pigmentos, como os isolados da família Hymenochaetaceae. A interferência na ionização de biomoléculas tem sido frequentemente descrita devido a presença de pigmentos (DONG *et al.*, 2009; SULC *et al.*, 2009). Contudo, esse problema não foi observado em nosso estudo, indicando mais uma vantagem do protocolo selecionado e do método (MALDI-TOF MS).

Análises de componentes principais (PCA) foram realizadas utilizando as ferramentas integradas do MALDI Biotyper para investigar as variações intraespecíficas e interespecíficas entre os isolados e os espectros de massa obtidos. Utilizando isolados de *Fomitiporia* (Hymenochaetaceae) e *Ganoderma* (Polyporaceae) que são os gêneros mais representativos em número de isolados e espécies, nós observamos que o método é eficiente na diferenciação de isolados que pertencem a diferentes espécies (variação interespecífica), e este foi capaz até mesmo de diferenciar isolados da mesma espécie (variação intraespecífica) (Figuras 19 e 20). Resultados similares foram encontrados por CROSSAY *et al.* (2017) trabalhando com isolados pertencentes ao filo Glomeromycota, e as famílias: Gigasporaceae, Glomeraceae, Acaulosporaceae e Claroideoglomeraceae. Estes demonstraram que, para todas as famílias, as espécies foram claramente diferenciadas (variação interespecífica), e na maioria dos casos, isolados da mesma espécie foram discriminados (variação intraespecífica). BEINHAUER *et al.* (2016) também demonstrou que a técnica tem uma alta resolução, sendo capaz de distinguir isolados não apenas de espécies diferentes, mas também patótipos da mesma espécie, que diferem em sua virulência.

A relação entre os isolados foi avaliada por meio da análise do dendrograma gerado com base nos espectros de referência (MSPs), e das análises filogenéticas (ML e IB) geradas a partir das sequências da região ITS do rDNA. Os clados correspondentes às famílias estudadas (Hymenochaetaceae e Polyporaceae) foram recuperados em ambas as análises (Figuras 10 e 18) e a comparação das duas abordagens mostrou que a análise de agrupamento baseada nos perfis de proteínas (espectros de massa de referência) apresentou acurácia para a delimitação dos isolados ao nível de família, gênero e espécie, assim como aconteceu na análise filogenética baseada na região ITS, e as árvores (dendrograma baseado nos MSPs e árvore consenso de máxima verossimilhança e inferência bayesiana) apresentaram topologias similares. Em ambas análises, os isolados pertencentes aos gêneros *Arambarria*, *Fulvifomes*, *Neomensularia*, *Phellinotus* e *Phellinus* recuperaram topologias/agrupamentos conflitantes, e isto pode ser devido: (i) amostragem limitada dos gêneros estudados, (ii) artefatos produzidos pela análise de clusterização e/ou (iii) problemas de identificação e delimitação taxonômica dos gêneros. Nesse contexto, estudos adicionais relacionados a geração de perfis de proteínas (espectros de massa) e análises de clusterização (geração de dendrogramas e filogenia) são necessários para esclarecer se as limitações estão relacionadas a amostragem, ou, ao método.

Neste estudo, criamos um banco de dados de espectros de referência (MSPs) para as famílias Polyporaceae e Hymenochaetaceae (Basidiomycota). Com o objetivo de testar a

robustez do método, este foi posteriormente desafiado em um teste utilizando a ferramenta de identificação em tempo real da Bruker. Assim como CROSSAY *et al.* (2017), nós realizamos este teste utilizando os mesmos isolados que foram usados na criação do banco de dados. Os resultados para este experimento foram satisfatórios, e todos os isolados testados apresentaram *score* de identificação > 2.000, com uma taxa de 100% de identificação dos isolados ao nível de espécie. Como os Basidiomicetos compreendem um grupo de fungos pouco estudados quanto a identificação utilizando a EM por MALDI-TOF, o número de espectros disponíveis para este táxon é, até o momento, insignificante em comparação com os de bactérias e fungos (ascomicetos) de interesse clínico. Portanto, é importante destacar a necessidade de aumentar o número de espectros de referência desses micro-organismos no banco de dados, para obter identificações rápidas e confiáveis, sendo a representatividade do banco de dados um ponto crucial para o sucesso deste método e aumento da utilização da técnica na área da taxonomia (LOHMANN *et al.*, 2013; RAHI *et al.*, 2016; SUGAWARA *et al.*, 2016).

Outros estudos utilizando isolados de Basidiomicetos demonstraram assim como nós que a técnica de MALDI-TOF MS é viável para a identificação e discriminação deste grupo de organismos. SCHMIDT & KALOW (2005) utilizaram o MALDI-TOF MS para diferenciar basidiomicetos degradadores da madeira dos gêneros *Serpula*, *Coniophora* e *Antrodia*, e estes mostraram que está técnica é eficiente para a diferenciação dos táxons estudados. SUGAWARA *et al.* (2016) utilizando cogumelos selvagens mostraram que a técnica de MALDI-TOF MS é eficiente para a identificação rápida e precisa a partir de basidiomas, contudo, estes afirmam que é necessária uma atualização contínua do banco de dados para enriquecê-lo com espécies mais abundantes e alcançar identificações precisas. PRISTAŠ *et al.* (2017) utilizaram esta técnica para a discriminação entre espécies de fungos degradadores de madeira dos gêneros *Fomitopsis*, *Rhodofomes*, *Fomes* e *Ganoderma* (Polyporaceae, Basidiomycota), e demonstraram a aplicabilidade desse método na identificação de basidiomicetos filamentosos importantes como patógenos de plantas, e também evidenciaram que espectros espécie-específicos podem ser obtidos para todas as espécies testadas com níveis de distância relativamente altos, mesmo entre táxons próximos.

Neste trabalho também investigamos a produção de peptídios com atividade biológica (peptaibols) produzidos por fungos pertencentes ao filo Basidiomycota. Utilizando os isolados *Trametes villosa* (CCMB561), *Ganoderma sp. 1* (DHCR379) e *Fulvifomes nilgheriensis* (GAS917) produzimos extratos de acetato de etila, e investigamos a presença de

peptaibols por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e da espectrometria de massa, utilizando o equipamento MALDI-TOF TOF. Diferentemente de LEE *et al.* (1999) e LEE *et al.* (1999b), que isolaram e determinaram respectivamente a sequência dos peptaibols, *Boletusin*, a partir do basidioma do fungo *Boletus spp.*, e *Tylopeptins A* e *B* a partir do basidioma de *Tylopilus neofelleus*, nós não encontramos peptídeos nos extratos estudados. A ausência de peptaibols pode estar relacionada: (i) as condições de cultivo a que o fungo foi submetido, (ii) ao substrato (meio de cultura) utilizado para o crescimento do fungo, (iii) ao solvente orgânico (acetato de etila) utilizado para a extração dos metabólitos e/ou (iv) pelo fato de que utilizamos o fungo crescendo em um substrato, e não o basidioma.

8 – CONCLUSÕES

- ✓ O uso combinado das ferramentas de identificação morfológica e molecular (baseada no sequenciamento da região ITS do rDNA) nos permitiu identificar a maioria dos isolados ao nível de espécie (20 isolados);
- ✓ Os isolados que foram identificados apenas ao nível de gênero (8 isolados) e foram nomeados utilizando a abreviatura sp. podem corresponder a espécies novas;
- ✓ O protocolo mais eficiente para obtenção dos espectros de massa foi o que aplica o micélio diretamente na placa alvo do MALDI com a adição da matriz orgânica (HCCA), eliminando assim a necessidade do processo de extração prévia de proteínas ou adição de um ácido;
- ✓ Utilizando a ferramenta de identificação em tempo real da Bruker (*Real Time Identification*), foi possível obter uma taxa de 100% de identificação dos isolados ao nível de espécie, com scores > 2.000, indicando uma identificação confiável nesse nível taxonômico;
- ✓ A identificação taxonômica através da espectrometria de massa por MALDI-TOF se mostrou rápida, precisa e robusta para a identificação de isolados da família Hymenochaetaceae e Polyporaceae (Basidiomycota) ao nível de espécie, e até mesmo para discriminação de isolados da mesma espécie. Assim, esta técnica pode ser considerada promissora para a área da taxonomia de Basidiomicetos dos isolados e espécies estudadas;
- ✓ Foi observado que o meio de cultura (substrato) não influencia no perfil de proteínas, na obtenção dos espectros de massa, e conseqüentemente na identificação, mas que o tempo de cultivo, sim;
- ✓ As análises filogenéticas (IB e ML) e o dendrograma com base nos perfis de proteínas apresentaram topologias semelhantes, indicando que análises de clusterização baseadas nos espectros de massa são eficientes para estimar as relações filogenéticas entre os isolados das famílias estudadas;
- ✓ Nas condições testadas não foi possível prospectar e identificar peptídeos com atividade biológica (peptaibols) utilizando extratos de acetato de etila dos fungos *Trametes villosa* (CCMB561), *Ganoderma sp. 1* (DHCR379) e *Fulvifomes nilgheriensis* (GAS917).

9 – PERSPECTIVAS

Para confirmar que a técnica de MALDI-TOF MS é robusta e eficiente na identificação de espécies do filo Basidiomycota como um todo, iremos expandir nosso número de amostras incluindo isolados de todas as famílias desse grupo taxonômico, além disso, iremos também expandir o banco de dados de espectros de referência (MSPs) para este filo.

Para aumentar as chances de prospectar e identificar peptaibols dos fungos *Trametes villosa* (CCMB561), *Ganoderma sp. 1* (DHCR379) e *Fulvifomes nilgheriensis* (GAS917), experimentos adicionais serão realizados utilizando diferentes substratos, condições de cultivo e solventes orgânicos.

10 – REFERÊNCIAS

- ALANIO, A. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 5, p. 750-755, 2011.
- ALVES, M. *et al.* A Review on Antimicrobial Activity of Mushroom (Basidiomycetes) Extracts and Isolated Compounds. **Planta Medica**, v. 78, n. 16, p. 1707-1718, 2012.
- ARAÚJO, R. Towards the Genotyping of Fungi: Methods, Benefits and Challenges. **Current Fungal Infection Reports**, v. 8, n. 3, p. 203-210, 2014.
- ASSIS, G. *et al.* Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Fast Identification of Gram-Positive Fish Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- BADER, O. *et al.* Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 9, p. 1359-1365, 2011.
- BADOTTI, F. *et al.* Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, 2017.
- BADOTTI, F. *et al.* ITS and secondary biomarkers in fungi: review on the evolution of their use based on scientific publications. **Brazilian Journal of Botany**, v. 41, n. 2, p. 471-479, 2018.
- BECKER, P. *et al.* Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. **Medical Mycology**, v. 52, n. 8, p. 826-834, 2014.
- BEINHAUER, J. *et al.* Intact spore MALDI-TOF mass spectrometry and proteomic analysis of *Puccinia* pathogenic fungi. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 9, p. 1093-1103, 2016.

- BICKFORD, D. *et al.* Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 3, p. 148-155, 2007.
- BIDARTONDO, M. Preserving Accuracy in GenBank. **Science**, v. 319, n. 5870, p. 1616a-1616a, 2008.
- BISHOP, K. *et al.* From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. **Phytochemistry**, v. 114, p. 56-65, 2015.
- BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.
- BRITO, J. *et al.* Peptaibols from *Trichoderma asperellum* TR356 strain isolated from Brazilian soil. **Springer Plus**, v. 3, n. 1, p. 600, 2014.
- BRUKER DALTONICS GMBH, 2011 Instructions for Use MALDI Biotarget 48, https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/InstructionForUse/IFU_268711_267615_226413_MALDI_Biotarget_48_Rev1.pdf (accessed 04.07.2018).
- CANNON, P. & KIRK, P. Classification of the Fungi. In: Fungal families of the world. Wallingford [England]: **CABI**, 2007. 456 p.
- CANNON, P. & KIRK, P. Hymenochaetaceae. In: Fungal families of the world. Wallingford [England]: **CABI**, 2007. 456 p.
- CANNON, P. & KIRK, P. Polyporaceae. In: Fungal families of the world. Wallingford [England]: **CABI**, 2007. 456 p.
- CARNEIRO, R. *et al.* *Trametes villosa* Lignin Peroxidase (TvLiP): Genetic and Molecular Characterization. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 179-188, 2017.

CASSAGNE, C. *et al.* Mould Routine Identification in the Clinical Laboratory by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e28425, 2011.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 70, p. 181-184, 1967.

CHALUPOVÁ, J. *et al.* Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 1, p. 230-241, 2014.

CHANG, Y. *et al.* Ganoderma lucidum Extracts Inhibited Leukemia WEHI-3 Cells in BALB/c Mice and Promoted an Immune Response in Vivo. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 12, p. 2589-2594, 2009.

COSTA-REZENDE, D. *et al.* Morphological reassessment and molecular phylogenetic analyses of Amauroderma s.lat. raised new perspectives in the generic classification of the Ganodermataceae family. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 39, n. 1, p. 254-269, 2017.

CROSSAY, T. *et al.* New method for the identification of arbuscular mycorrhizal fungi by proteomic-based biotyping of spores using MALDI-TOF-MS. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012.

DA CUNHA, K. *et al.* Fast identification of dermatophytes by MALDI-TOF/MS using direct transfer of fungal cells on ground steel target plates. **Mycoses**, v. 61, n. 9, p. 691-697, 2018.

DAI, Y. *et al.* Dynamics of the worldwide number of fungi with emphasis on fungal diversity in China. **Mycological Progress**, v. 14, n. 8, 2015.

DAI, Y. *et al.* Pathogenic wood-decaying fungi in China. **Forest Pathology**, v. 37, n. 2, p. 105-120, 2007.

DAI, Y. *et al.* Species Diversity and Utilization of Medicinal Mushrooms and Fungi in China (Review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 11, n. 3, p. 287-302, 2009.

DAI, Y. Hymenochaetaceae (Basidiomycota) in China. **Fungal Diversity**, v. 45, n. 1, p. 131-343, 2010.

DARRIBA, D. *et al.* jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772-772, 2012.

DASS, C. Fundamentals of contemporary mass spectrometry. Tradução. Hoboken, **Wiley**, 2007.

DE MENEZES, T. *et al.* Production of Basidiomata and Ligninolytic Enzymes by the Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), in Licuri (*Syagrus coronata*) Wastes in Brazil. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 18, n. 12, p. 1141-1149, 2016.

DECOCK, C. *et al.* *Phylloporia nouraguensis*, an Undescribed Species on Myrtaceae from French Guiana. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 34, n. 1, p. 15-27, 2013.

DEGENKOLB, T. *et al.* The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. **Journal of Peptide Science**, v. 9, n. 11-12, p. 666-678, 2003.

DEL CHIERICO, F. *et al.* MALDI-TOF MS proteomic phenotyping of filamentous and other fungi from clinical origin. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 11, p. 3314-3330, 2012.

DONG, H. *et al.* Development of a MALDI two-layer volume sample preparation technique for analysis of colored conidia spores of *Fusarium* by MALDI linear TOF mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 5, p. 1373-1383, 2009.

DURÁN, N. Enzimas ligninolíticas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 1ª ed. Caxias do Sul: **EDUCS**, 2004. 510 p.

ERHARD, M. *et al.* Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 4, p. 356-361, 2008.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 1ª ed. Caxias do Sul: **EDUCS**, 2004. 510 p.

FENSELAU, C.; DEMIREV, P. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, n. 4, p. 157-171, 2001.

FERRAZ, A. F. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 1ª ed. Caxias do Sul: **EDUCS**, 2004. 510 p.

FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 4, n. 5, p. 732-742, 2009.

GADD, G. M. Fungi and their role in the biosphere. In: S. E. Jorgensen; F. Brian. Encyclopedia Of Ecology. Amsterdam, **Elsevier**, 2013. 1709 – 1717 p.

GAO, Y. *et al.* Antibacterial and Antiviral Value of the Genus *Ganoderma* P. Karst. Species (Aphyllorphoromycetidae): A Review. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 5, n. 3, p. 12, 2003.

GLEN, M. *et al.* Ganoderma and Amaurodermaspecies associated with root-rot disease of Acacia mangiumplantation trees in Indonesia and Malaysia. **Australasian Plant Pathology**, v. 38, n. 4, p. 345, 2009.

GONZÁLEZ MUÑOZ, A.; BOTERO OROZCO, K.; LÓPEZ GARTNER, G. Finding of a novel fungal immunomodulatory protein coding sequence in Ganoderma australe. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 16, n. 2, p. 90-95, 2014.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, n. 5, p. 696-704, 2003.

HAMMER, Ø *et al.* PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HAWKSWORTH, D. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1422-1432, 2001.

HAWKSWORTH, D. L., & LÜCKING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. **Microbiology Spectrum**. n. 5, p. 1-17, 2017.

HE, S.; DAI, Y. Taxonomy and phylogeny of Hymenochaete and allied genera of Hymenochaetaceae (Basidiomycota) in China. **Fungal Diversity**, v. 56, n. 1, p. 77-93, 2012.

HIBBETT, D. *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007.

HIBBETT, D. *et al.* Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. **Fungal Biology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 38-47, 2011.

HIBBETT, D. S. Major Events in the Evolution of Fungi. In: Losos, Jonathan B. The Princeton guide to evolution. **Princeton University Press**, 2014. 853 p.

JAMES, T. *et al.* Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 818-822, 2006.

JARGALMAA, S. *et al.* Taxonomic evaluation of selected Ganoderma species and database sequence validation. **PeerJ**, v. 5, p. e3596, 2017.

JAYASIRI, S. *et al.* The Faces of Fungi database: fungal names linked with morphology, phylogeny and human impacts. **Fungal Diversity**, v. 74, n. 1, p. 3-18, 2015.

JUSTO, A. *et al.* A revised family-level classification of the Polyporales (Basidiomycota). **Fungal Biology**, v. 121, n. 9, p. 798-824, 2017.

KALLOW, W. *et al.* MALDI-TOF MS and microbial identification: years of experimental development to an established protocol. In: H. N. Shah; S.E. Gharbia; V. Encheva. Mass spectrometry for microbial proteomics. Chichester, **Wiley**, 2010, p. 255–276.

KATOH, K.; STANDLEY, D. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KINGE, T.R. & MIH, A.M. Ganoderma ryvardense sp. nov. associated with basal stem rot (BSR) disease of oil palm in Cameroon. **Mycosphere**, n.2, p. 179–188, 2011.

KIRK, P. *et al.* Dictionary of the Fungi. Tradução . [s.l.] **CABI**, 2008.

KÖLJALG, U. *et al.* Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 21, p. 5271-5277, 2013.

LEE, S. *et al.* Isolation and sequence analysis of new peptaibol, boletusin, from Boletus spp. **Journal of Peptide Science**, v. 5, n. 8, p. 374-378, 1999.

LEE, S. *et al.* Tylopeptins A and B, New Antibiotic Peptides from *Tylopilus neofelleus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 52, n. 11, p. 998-1006, 1999b.

LIN, Y. *et al.* Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 2, p. 533-543, 2005.

LIN, K. *et al.* Reishi Polysaccharides Induce Immunoglobulin Production through the TLR4/TLR2-mediated Induction of Transcription Factor Blimp-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 34, p. 24111-24123, 2006.

LIU, F. *et al.* A novel polysaccharide with antioxidant, HIV protease inhibiting and HIV integrase inhibiting activities from *Fomitiporia punctata* (P. karst.) murrill (Basidiomycota, hymenochaetales). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 339-347, 2017.

LOGUERCIO-LEITE, C & ESPOSITO, E. Fungos: estrutura e ultra-estrutura. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 1ª ed. Caxias do Sul: **EDUCS**, 2004. 510 p.

LOGUERCIO-LEITE, C. Taxonomia dos fungos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 1ª ed. Caxias do Sul: **EDUCS**, 2004. 510 p.

LOHMANN, C. *et al.* Comparison between the Biflex III-Biotyper and the Axima-SARAMIS Systems for Yeast Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1231-1236, 2013.

LUO, Y. *et al.* Antimicrobial peptaibols induce defense responses and systemic resistance in tobacco against tobacco mosaic virus. **FEMS Microbiology Letters**, v. 313, n. 2, p. 120-126, 2010.

MENDONÇA MACIEL, M.; CASTRO E SILVA, A.; TELLES RIBEIRO, H. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 0-0, 2010.

MILLER, M.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, 2010.

MONCALVO, J.; RYVARDEN, L. A nomenclatural study of the Ganodermataceae. Donk. Oslo, **Fungiflora**, 1997

MOORE D, CHIU SW. Fungal products as food. In: POINTING SB, HYDE KD. Bio-exploitation of filamentous fungi. Hong Kong, **Fungal Diversity Press**, 2001. 223–251 p.

MOORE, D.; ROBSON, G.; TRINCI, A. 21st century guidebook to fungi. Cambridge, **Cambridge University Press**, p. 61-71, 2011.

NAGARAJ, G. *et al.* Antimalarial Activities of Peptide Antibiotics Isolated from Fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 145-149, 2001.

NILSSON, R. *et al.* Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. **PLoS ONE**, v. 1, n. 1, p. e59, 2006.

NORMAND, A. *et al.* Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 76, 2013.

NORMAND, A. *et al.* Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, 2017.

PARK, J. *et al.* Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of 345 clinical isolates of *Aspergillus* species from 11 Korean hospitals: comparison with molecular identification. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 1, p. 28-31, 2017.

PIRES, R.; GUGLIOTTA, A. Poroid Hymenochaetaceae (Basidiomycota) from Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Santa Virgínia, São Paulo, Brazil. **Rodriguésia**, v. 67, n. 3, p. 667-676, 2016.

PRISTAŠ, P. *et al.* Application of MALDI-TOF mass spectrometry for in vitro identification of wood decay polypores. **Forest Pathology**, v. 47, n. 5, p. e12352, 2017.

PUTIGNANI, L. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. **Mol. BioSyst.**, v. 7, n. 3, p. 620-629, 2011.

QUINTILLA, R. *et al.* MALDI-TOF MS as a tool to identify foodborne yeasts and yeast-like fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, p. 109-118, 2018.

RAJA, H. *et al.* Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 3, p. 756-770, 2017.

RAHI, P.; PRAKASH, O.; SHOUCHE, Y. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Microbial Identifications: Challenges and Scopes for Microbial Ecologists. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

RANQUE, S. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. **Mycoses**, v. 57, n. 3, p. 135-140, 2013.

RASPOR P., ZUPAN J. Yeasts in Extreme Environments. In: PÉTER G., ROSA C. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook, **Springer**. Berlin, Heidelberg, 2006.

RAUS, M.; ŠEBELA, M. BIOSPEAN: A Freeware Tool for Processing Spectra from MALDI Intact Cell/Spore Mass Spectrometry. **Journal of Proteomics & Bioinformatics**, v. 6, n. 12, p. 282-287, 2013.

RAVEN, P.; EVERT, R.; EICHHORN, S. *Biologia vegetal*. Tradução. Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, 2007.

REICH, M *et al.* Species Identification of Bacteria and Fungi from Solid and Liquid Culture Media by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 01, n. S5, 2013.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

RYVARDEN, L. Genera of polypores, nomenclature and taxonomy. **Synopsis Fungorum**, 1991.

SANTOS, C. *et al.* Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 375-385, 2010.

SCHIELL, M. *et al.* Cephaibols, New Peptaibol Antibiotics with Anthelmintic Properties from *Acremonium tubakii* DSM 12774. **The Journal of Antibiotics**, v. 54, n. 3, p. 220-233, 2001.

SCHMIDT-DANNERT, C. Biocatalytic portfolio of Basidiomycota. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 31, p. 40-49, 2016.

SCHMIDT, O.; KALLOW, W. Differentiation of indoor wood decay fungi with MALDI-TOF mass spectrometry. **Holzforschung**, v. 59, n. 3, 2005.

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

SEDLÁŘ, J.;SEDLÁŘOVÁ, M.; FLUSSER, J. Image processing methods for determination of downy mildews from light microscopy images In: K. KULPA; W. KASKA. **Signal Processing Symposium 2009 Proceedings**. Warsaw University of Technology, 2009.

SHON, M *et al.* Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts. **Food Chemistry**, v. 82, n. 4, p. 593-597, 2003.

SILVA-HUGHES, A. *et al.* Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (*Cactaceae*) from the United States. **Microbiological Research**, v. 175, p. 67-77, 2015.

SINGH, A.; SINGH, T. Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 62, p. 198-206, 2014.

SKOOG, D. *et al.* Fundamentos de química analítica. Tradução: Brasil, **Cengage Learning**, 2015.

SLEPECKY, R.; STARMER, W. Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. **Mycologia**, v. 101, n. 6, p. 823-832, 2009.

SMITH, S.E. & READ, D. The symbionts forming arbuscular mycorrhizas. In: Smith & Read. *Mycorrhizal Symbiosis*. Grã – Bretanha, **Academic Press**, 2008, p. 13-43.

SPATAFORA J. W. *et al.* The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. **Microbiol Spectr**, p. 3–34, 2017

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.

STOPPACHER, N. et al. The Comprehensive Peptaibiotics Database. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 5, p. 734-743, 2013.

STROHALM, M. *et al.* mMass3: A Cross-Platform Software Environment for Precise Analysis of Mass Spectrometric Data. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 11, p. 4648-4651, 2010.

SUGAWARA, R. *et al.* Rapid and reliable species identification of wild mushrooms by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Analytica Chimica Acta**, v. 934, p. 163-169, 2016.

SULC, M. *et al.* Biomarkers of *Aspergillus* spores: Strain typing and protein identification. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 280, n. 1-3, p. 162-168, 2009.

TALBOT P.H.B. Principles of fungal taxonomy. London, **Macmillan**, 1971, 274 p.

VALENTINE, N. *et al.* Effect of Culture Conditions on Microorganism Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 58-64, 2005.

VAN VEEN, S.; CLAAS, E.; KUIJPER, E. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 900-907, 2010.

WEBSTER, J. & WEBER, R. Introduction to fungi. Cambridge, **Cambridge University Press**, 2007. 841 p.

WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York, **Academic Press**, 1990, p. 315– 322

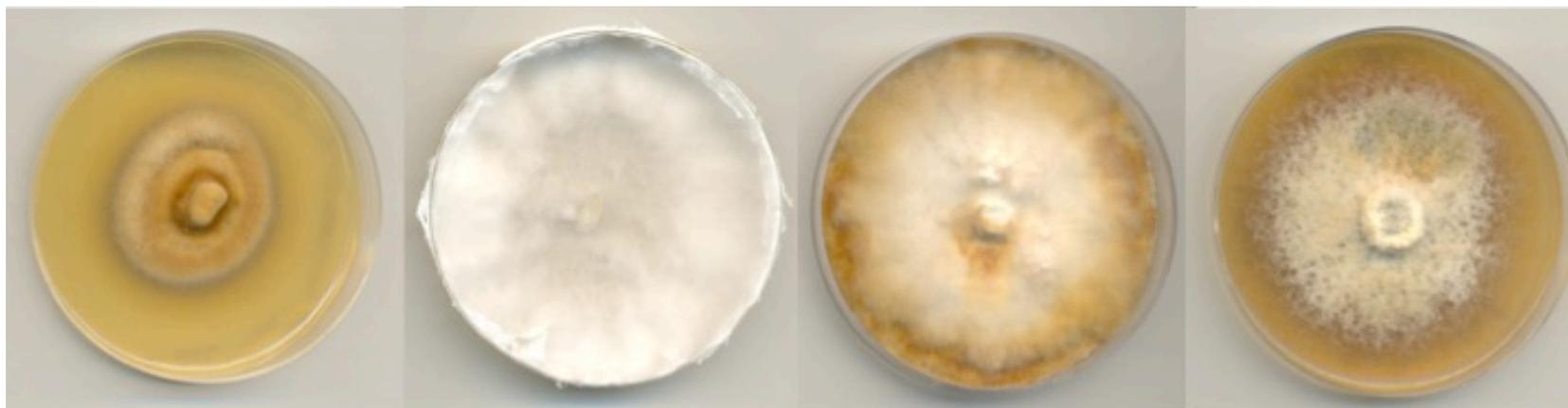
ZAUTNER, A. *et al.* Discrimination of multilocus sequence typing-based *Campylobacter jejuni* subgroups by MALDI-TOF mass spectrometry. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 247, 2013.

ZHAO, R. *et al.* A six-gene phylogenetic overview of Basidiomycota and allied phyla with estimated divergence times of higher taxa and a phyloproteomics perspective. **Fungal Diversity**, v. 84, n. 1, p. 43-74, 2017.

ZHOU, X. *et al.* Ganodermataceae: Natural Products and Their Related Pharmacological Functions. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 35, n. 04, p. 559-574, 2007.

11 - APÊNDICES

11.1 - Fotos da cultura dos isolados

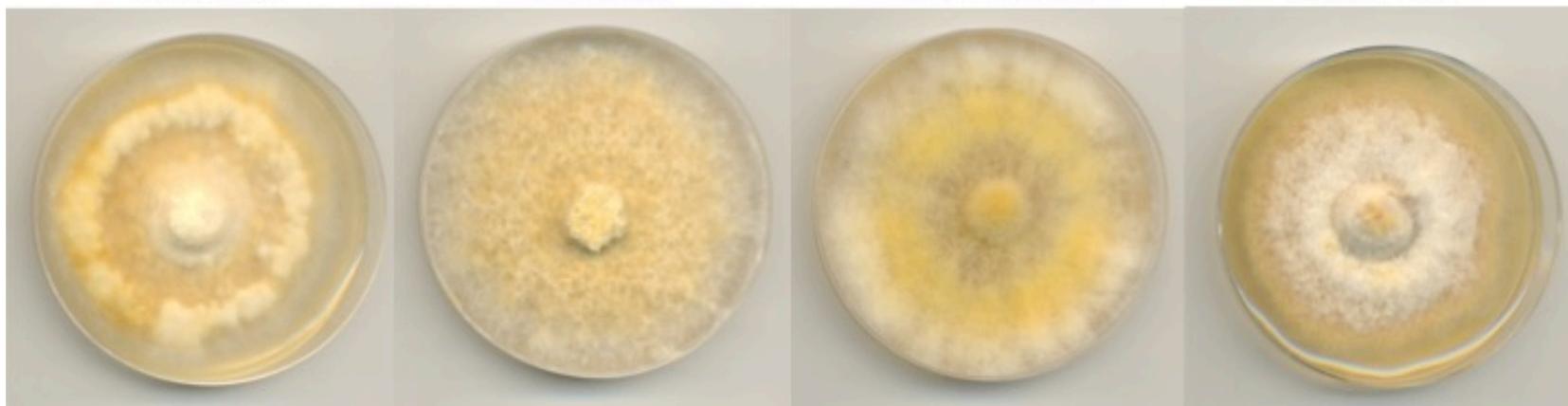


GAS1153

DHCR

CCMB472

GAS1192



MICOLAB01

GAS1176

MB03

GAS1073

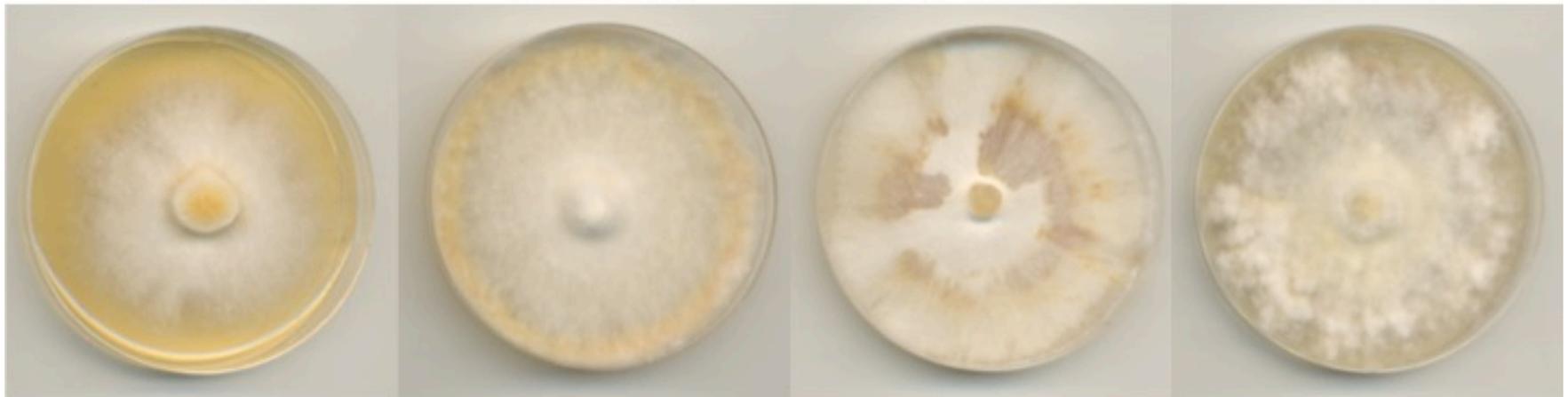


GAS917

CCMB456

MB01

GAS1139



GAS1037

GAS1183

CCMB448

CT203



CCMB450

CCMB1189

CCMB452

CCMB978



GAS1142

LMRT29

CCMB601

DHCR359



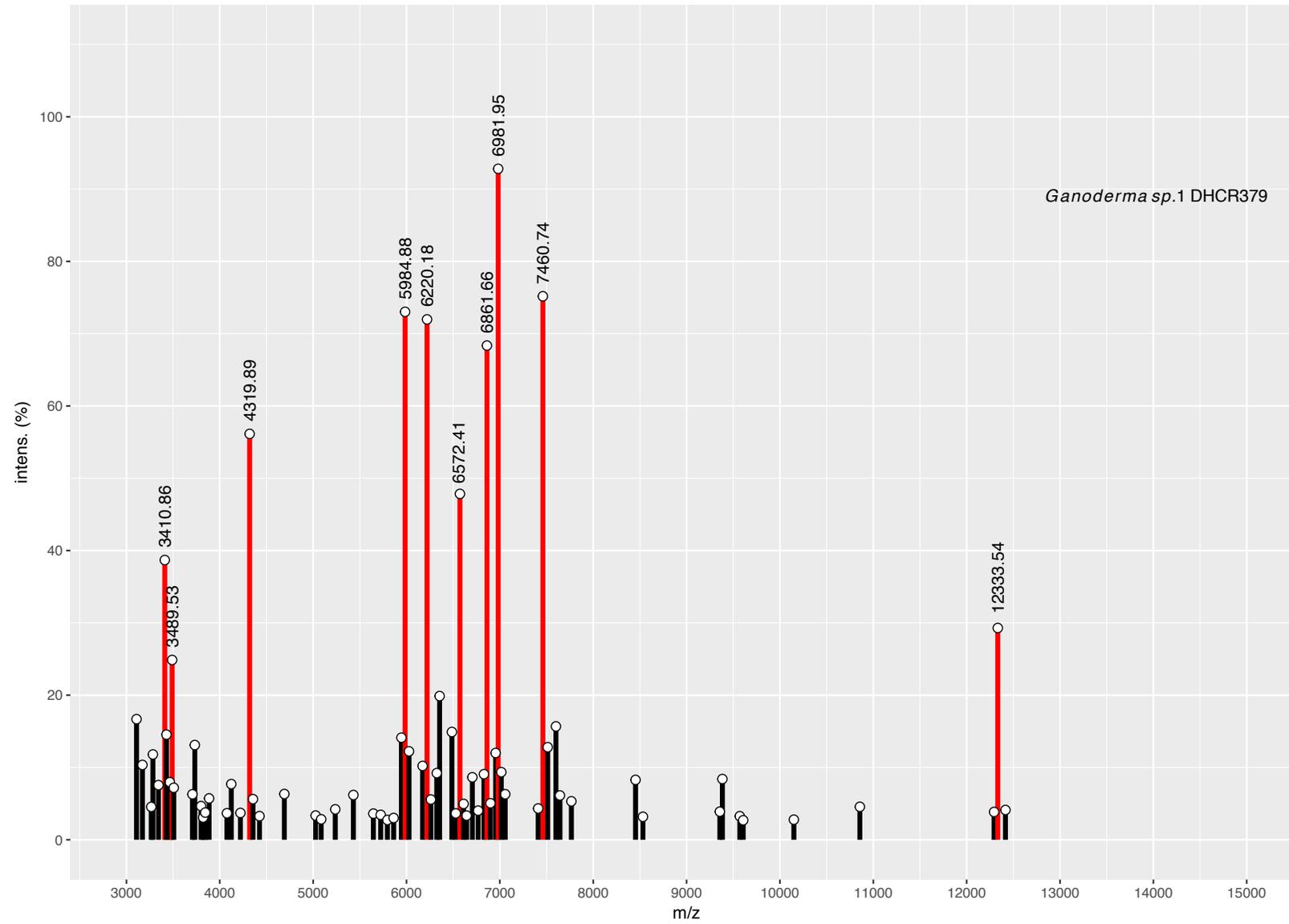
DHCR379

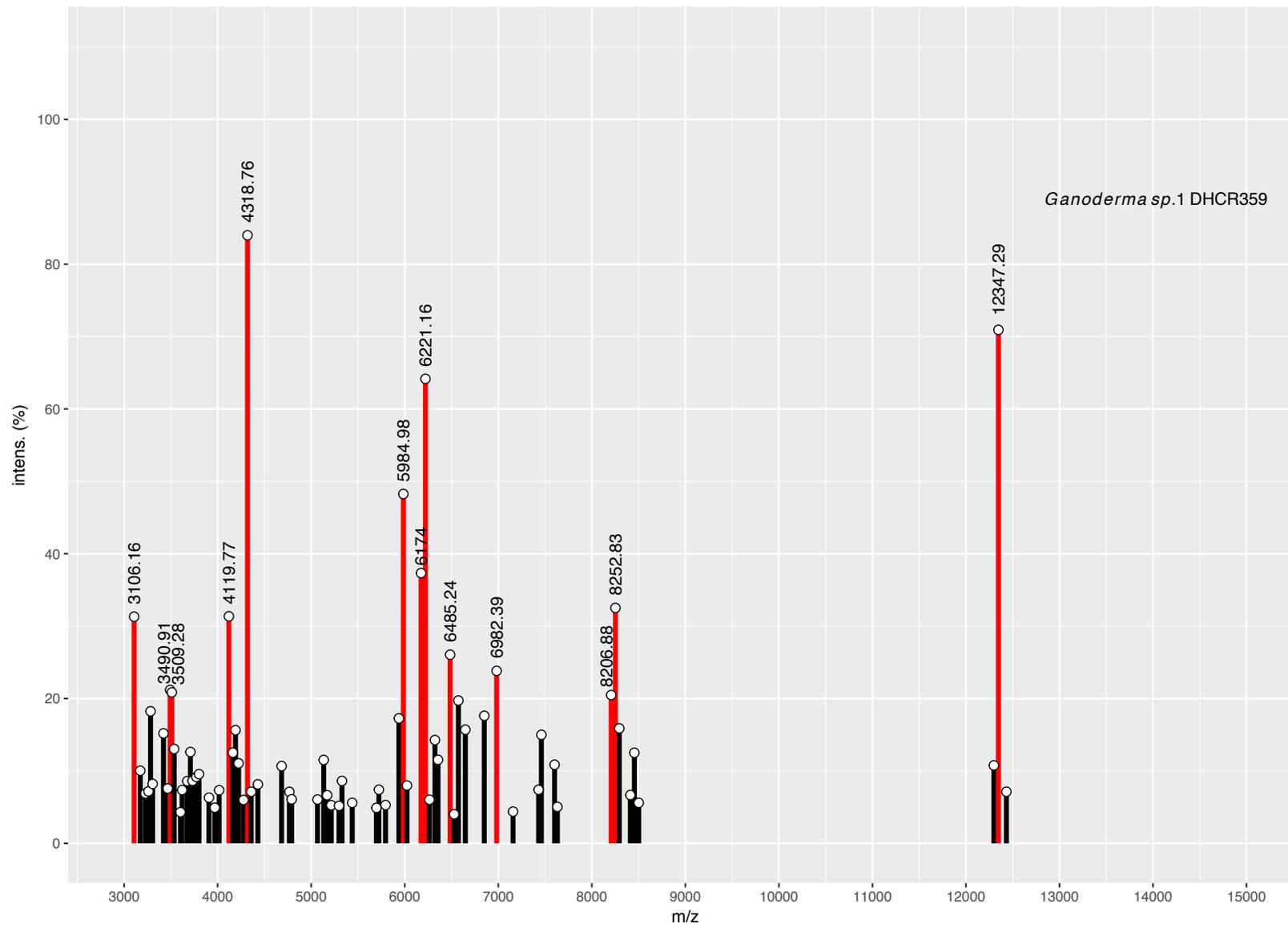
GAS933

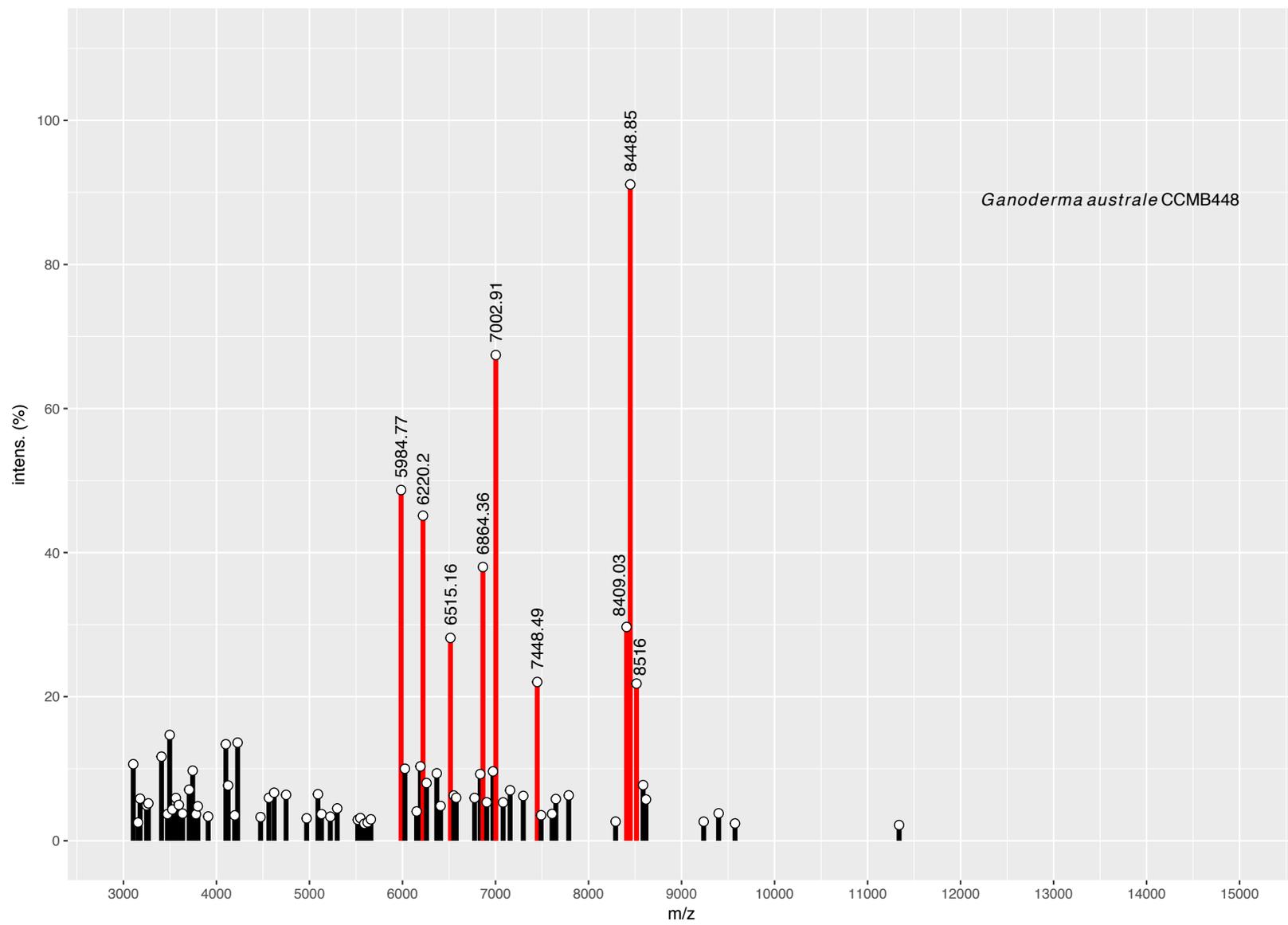
CCMB561

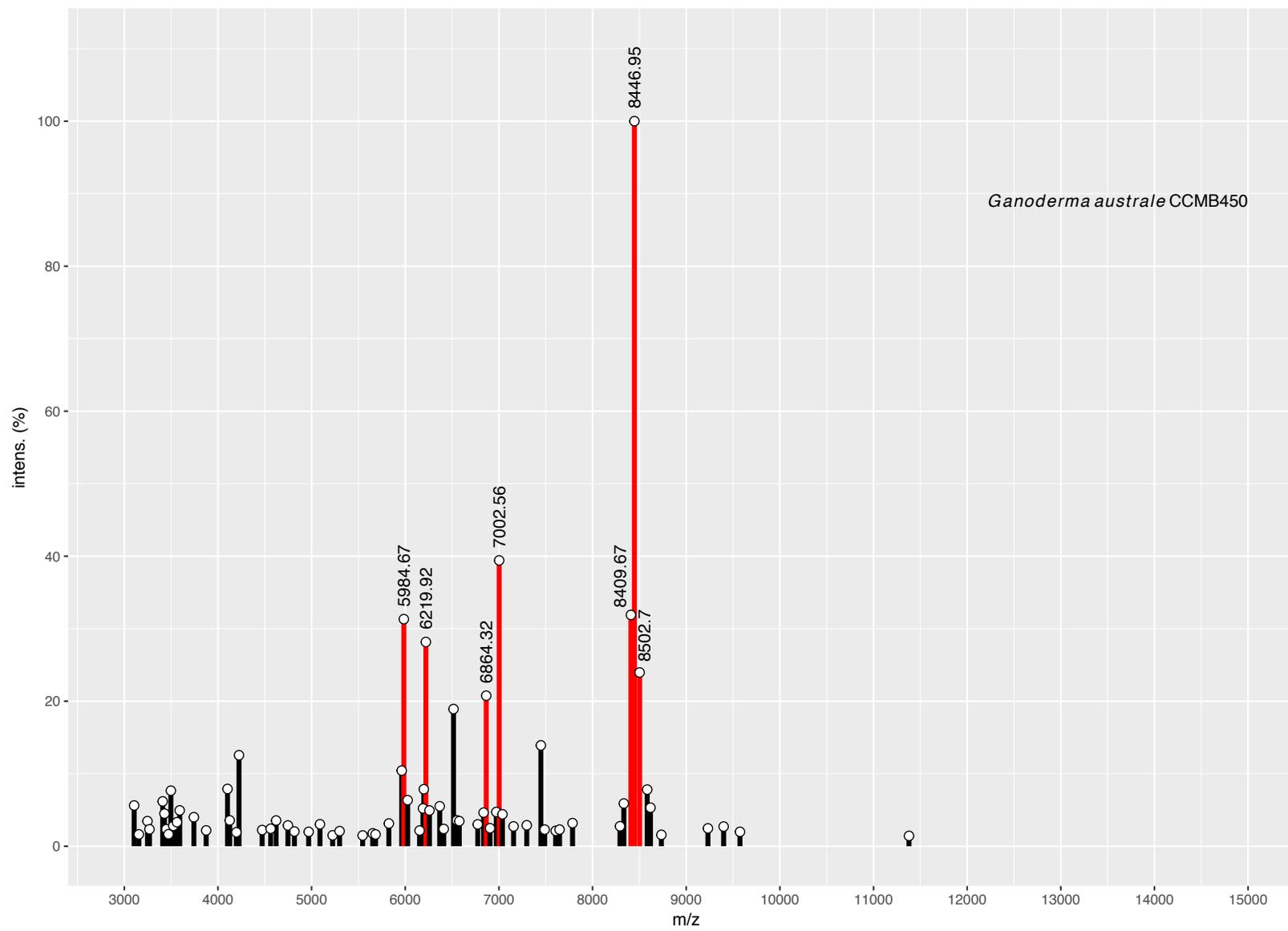
CCMB451

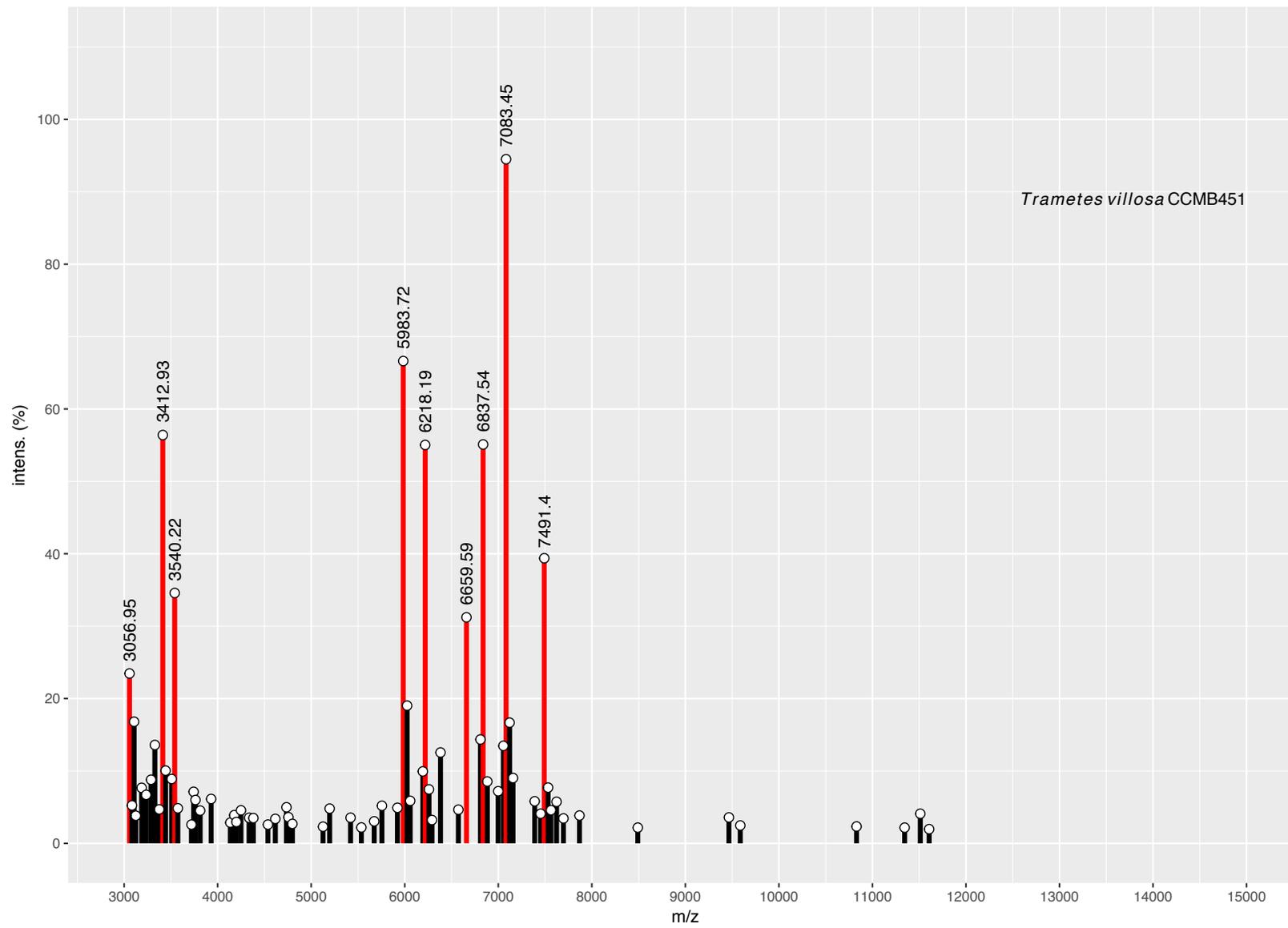
11.2 – Espectros virtuais (MSPs) dos isolados estudados

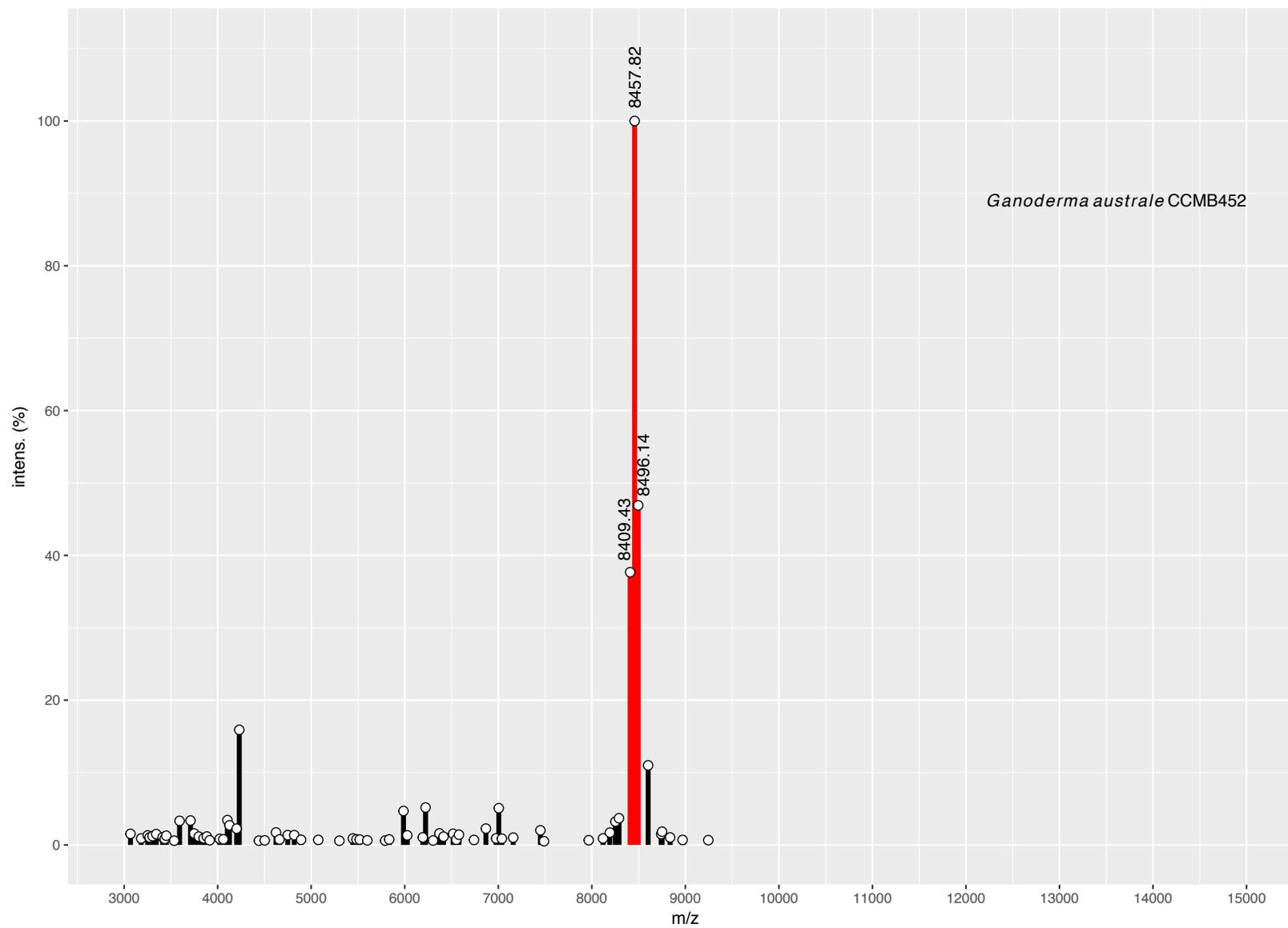


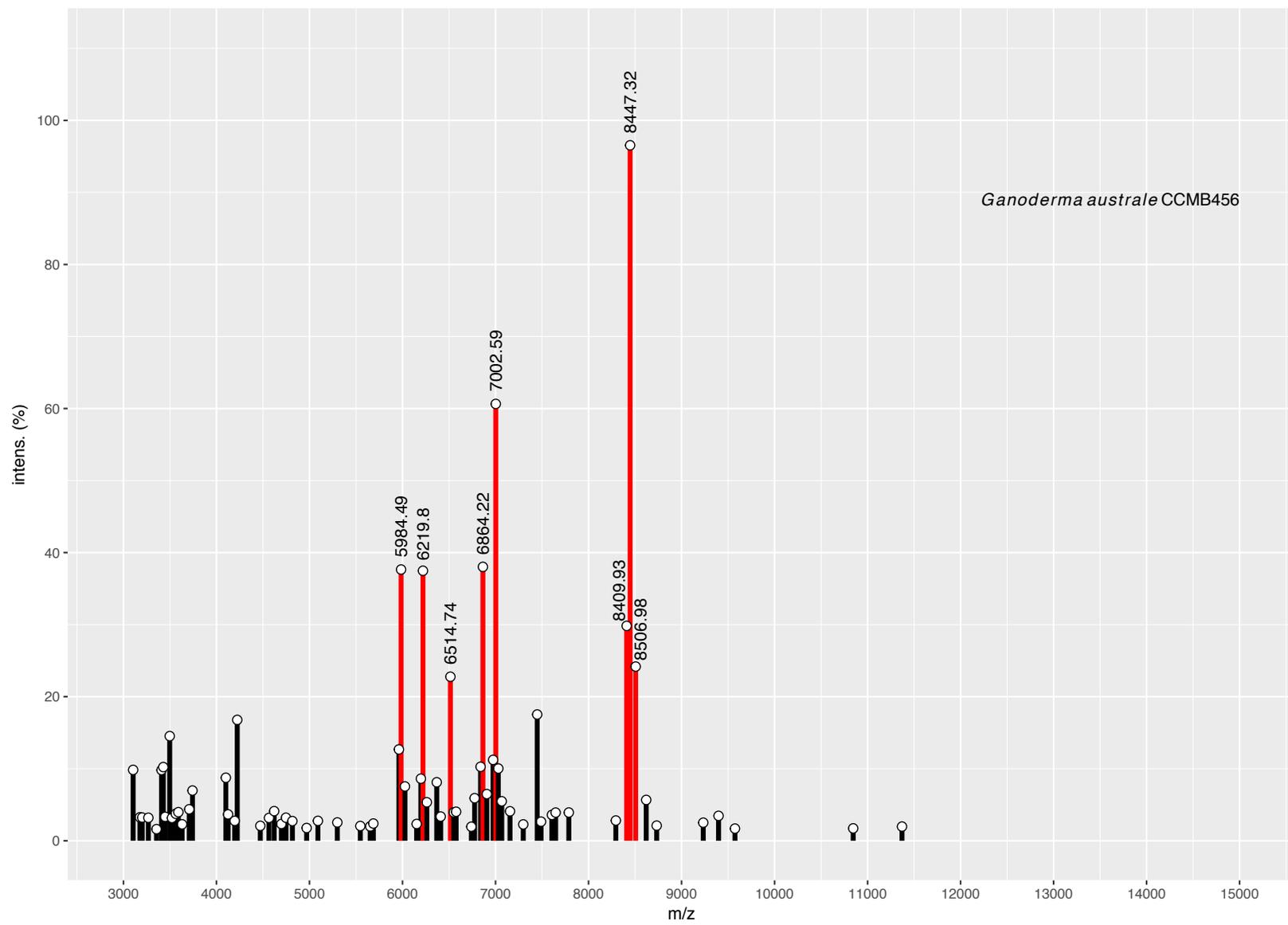


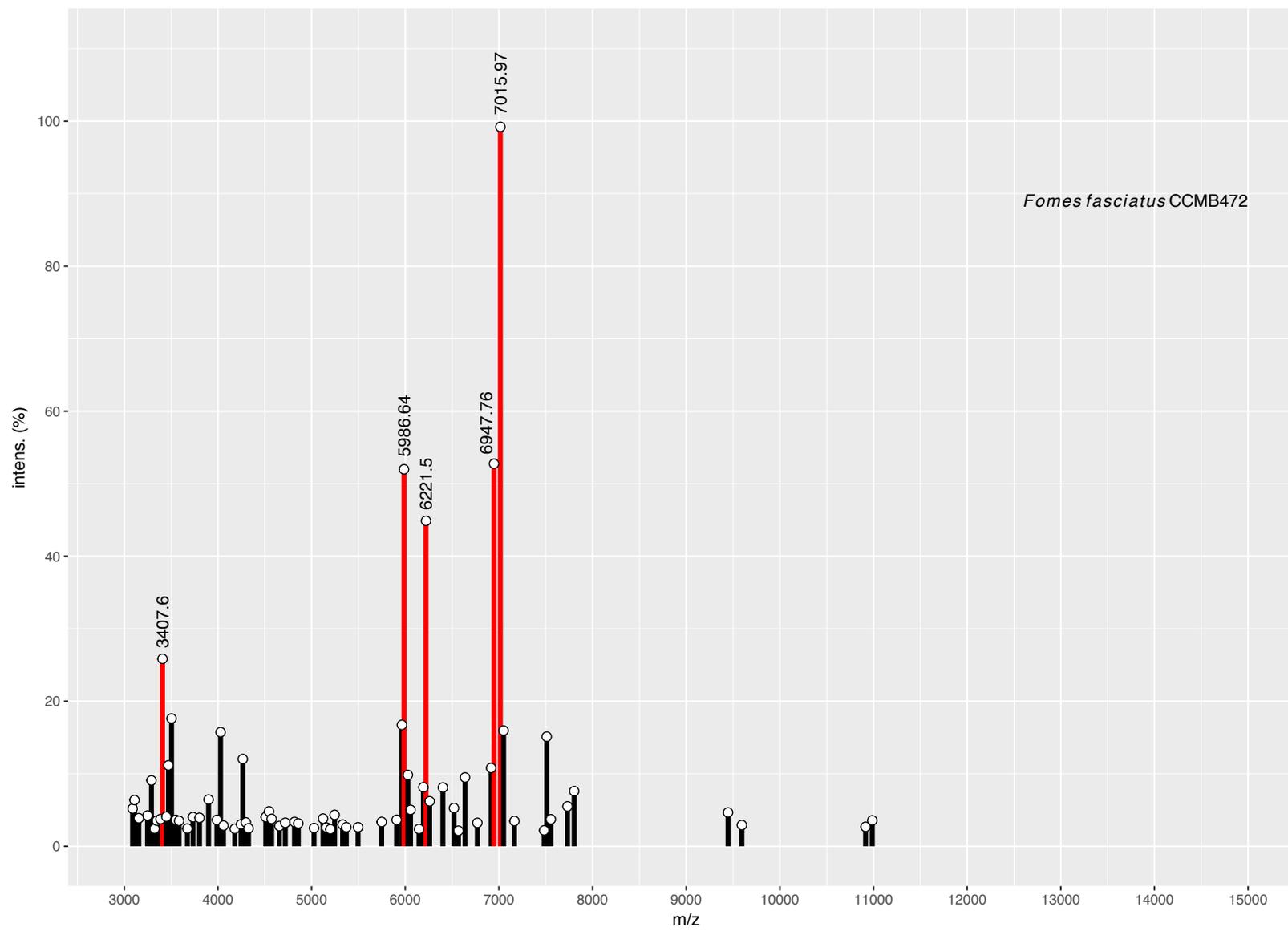


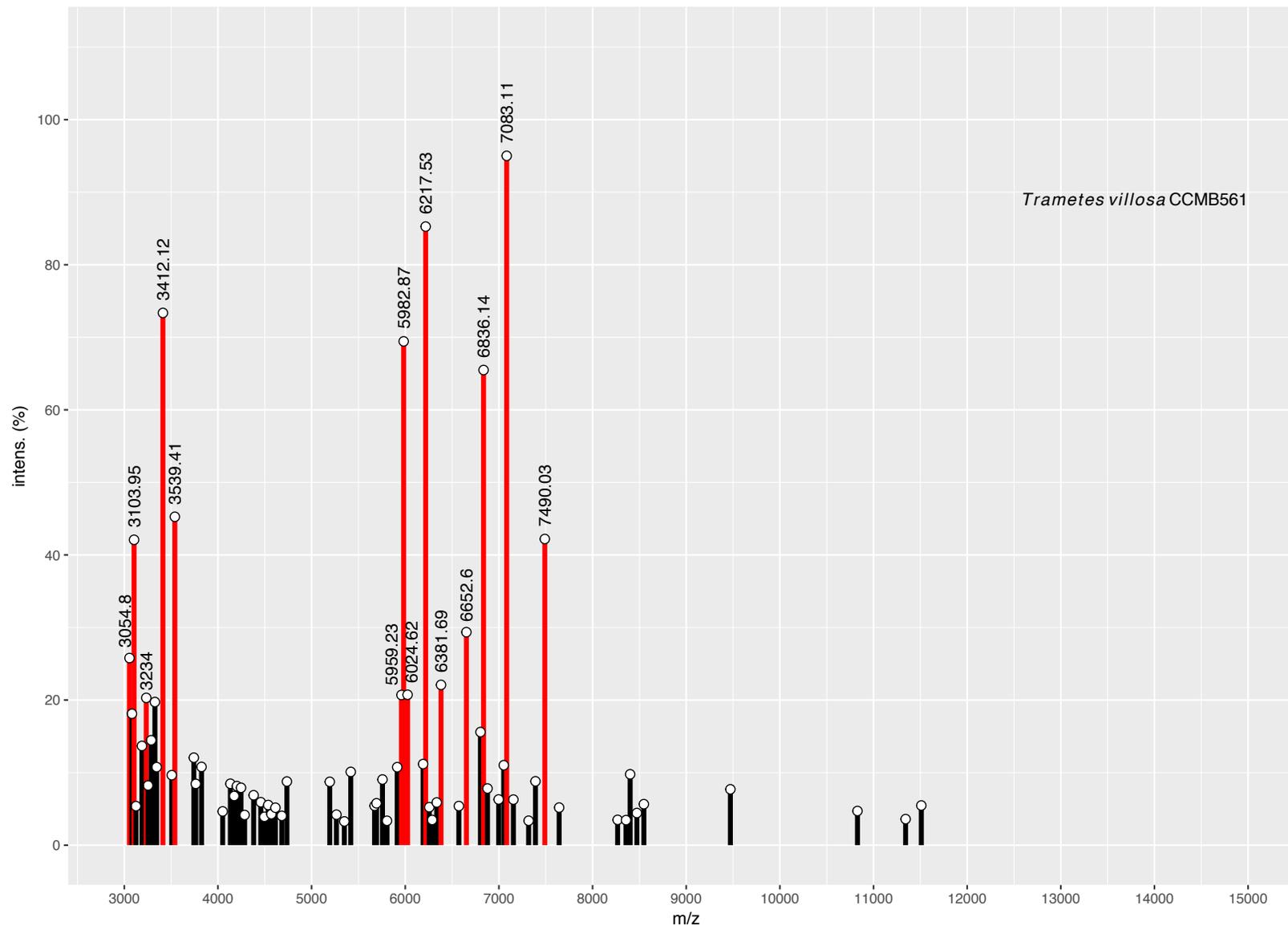


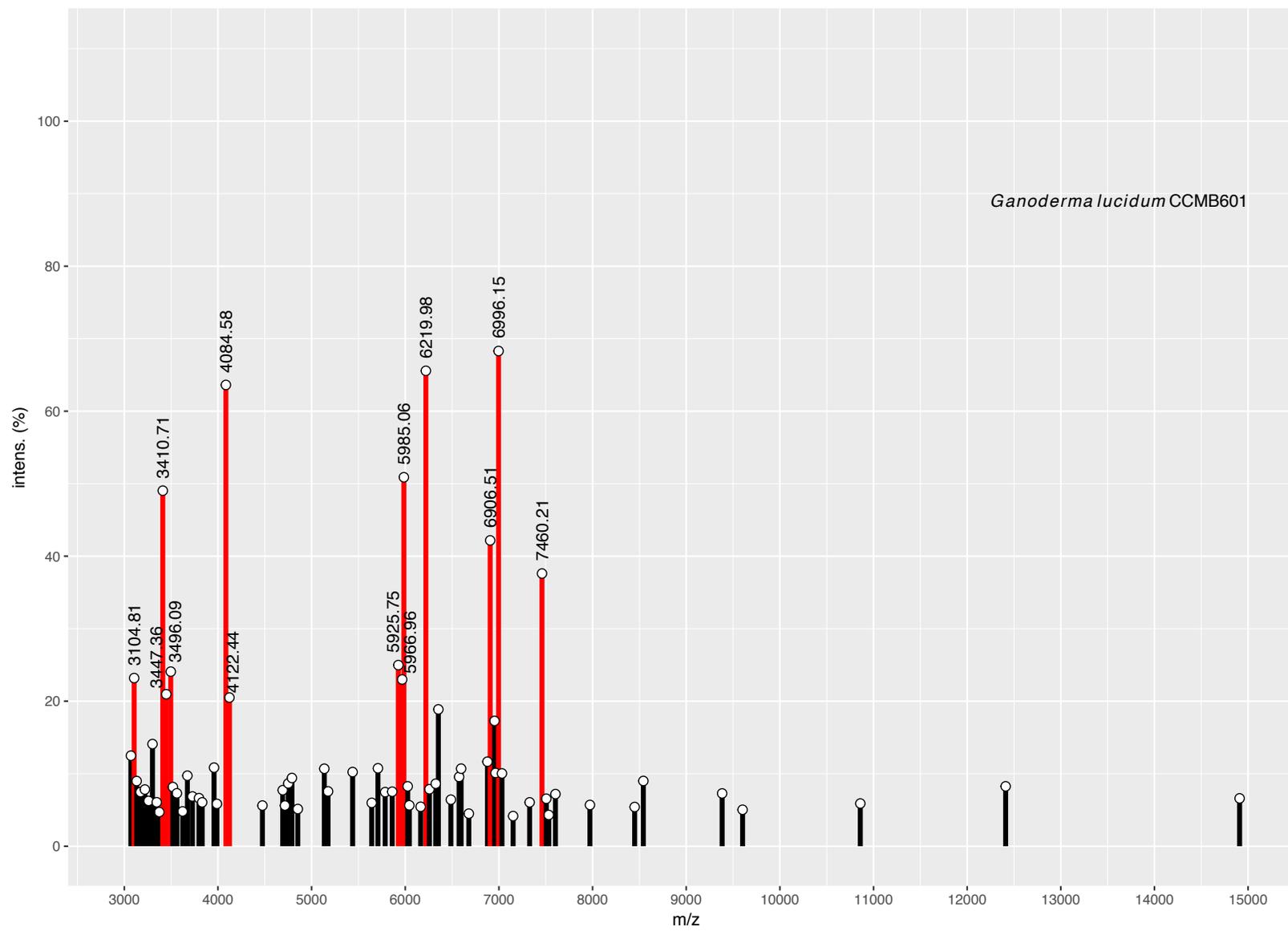


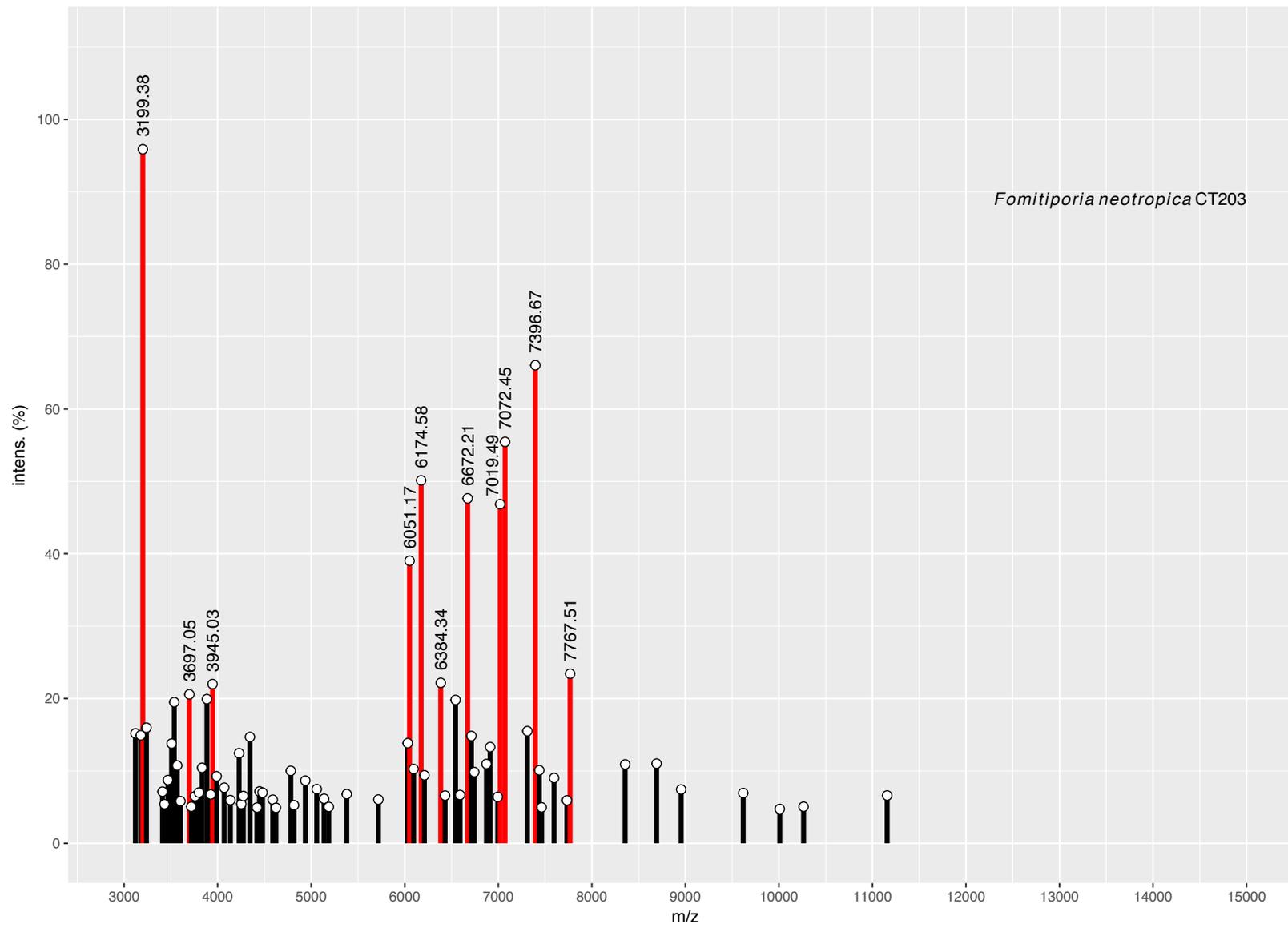


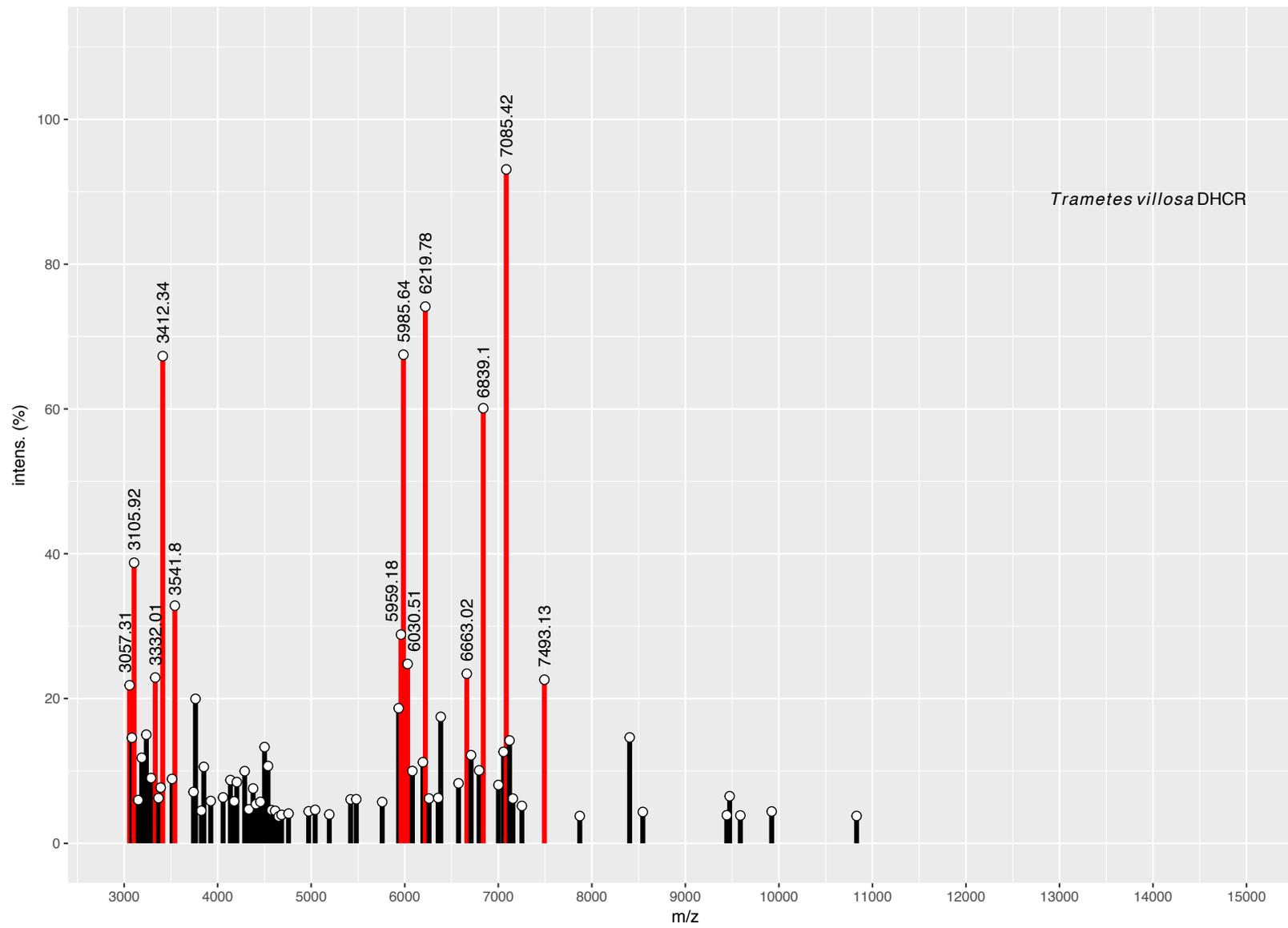


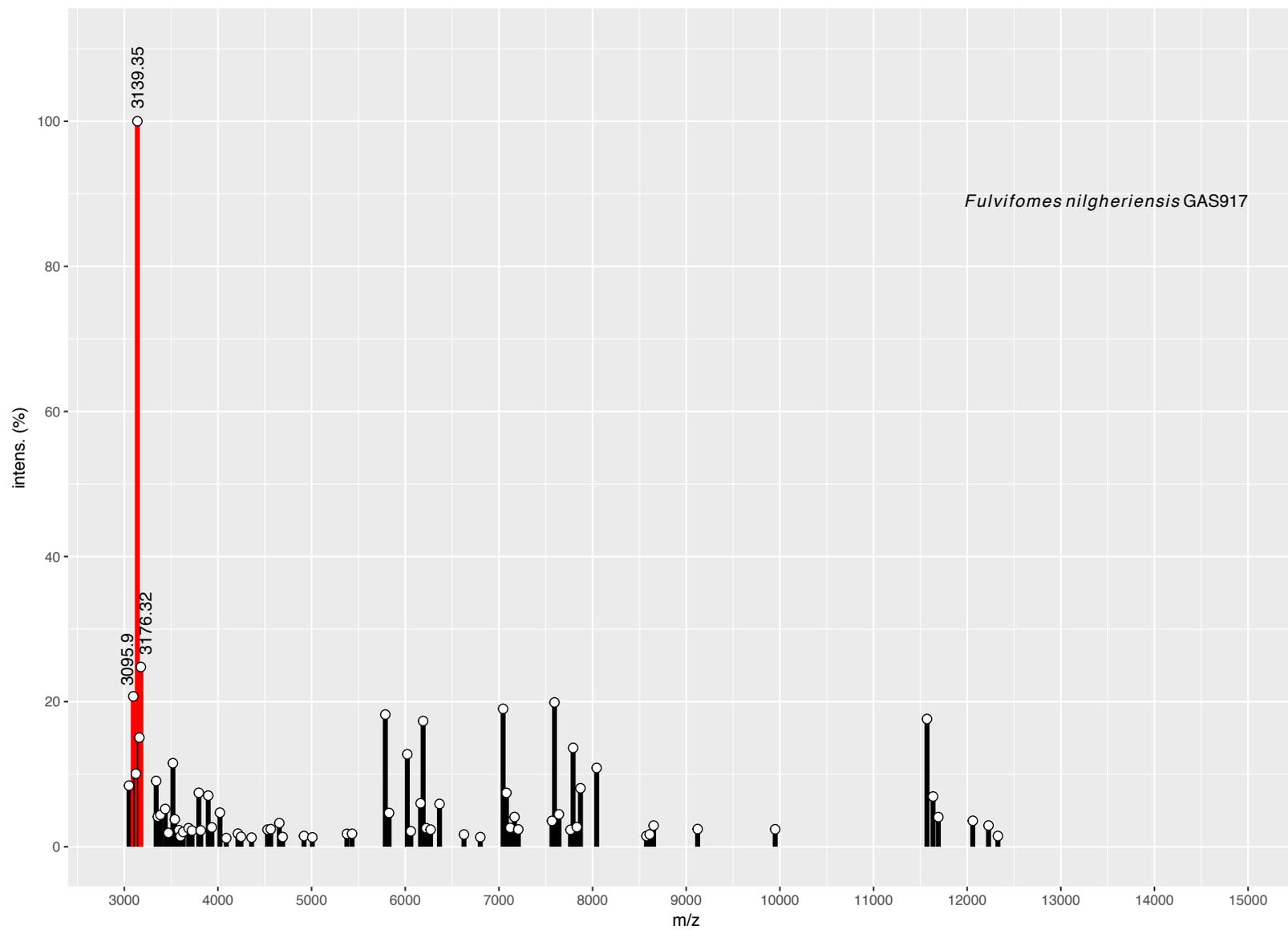


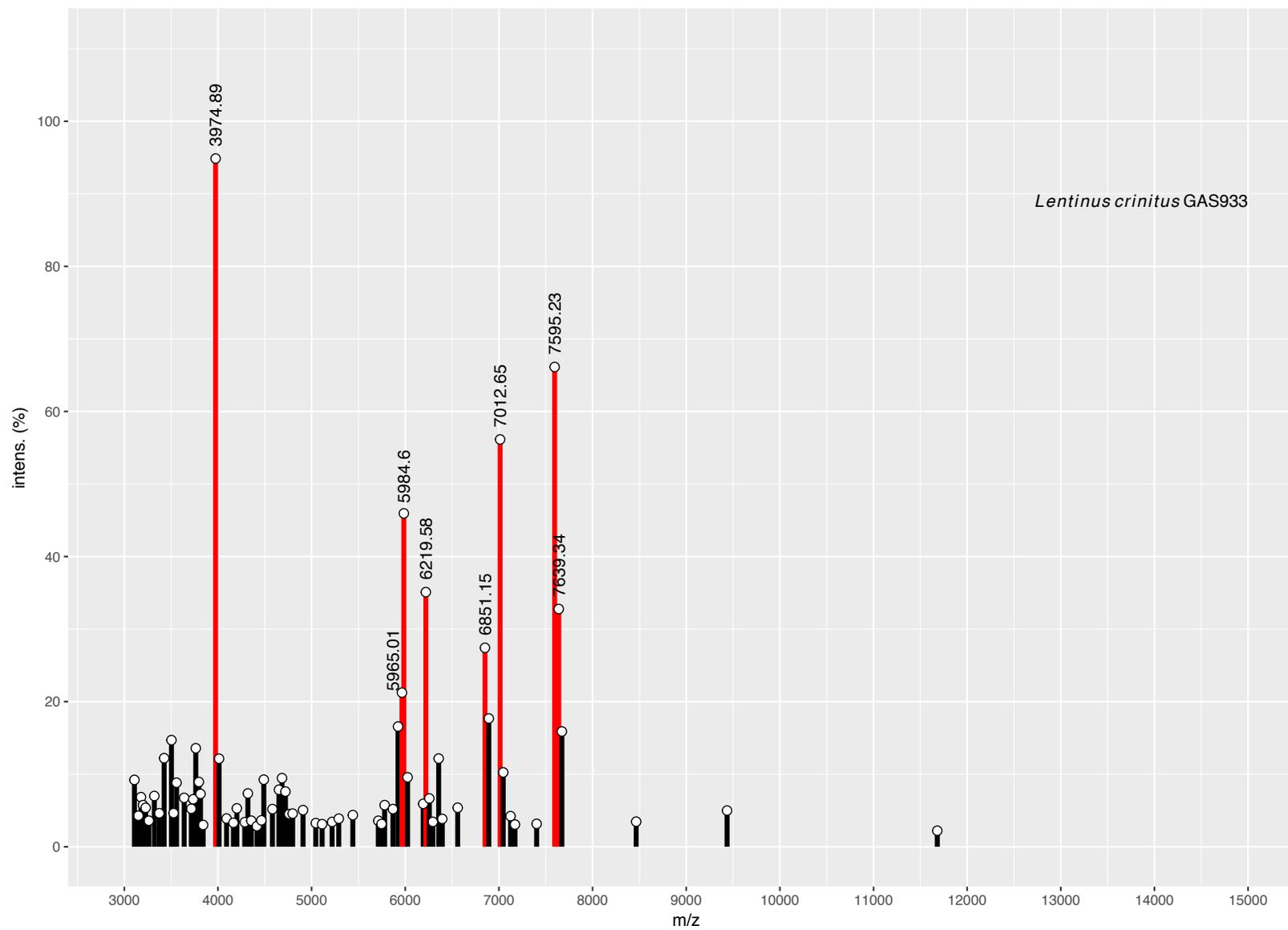


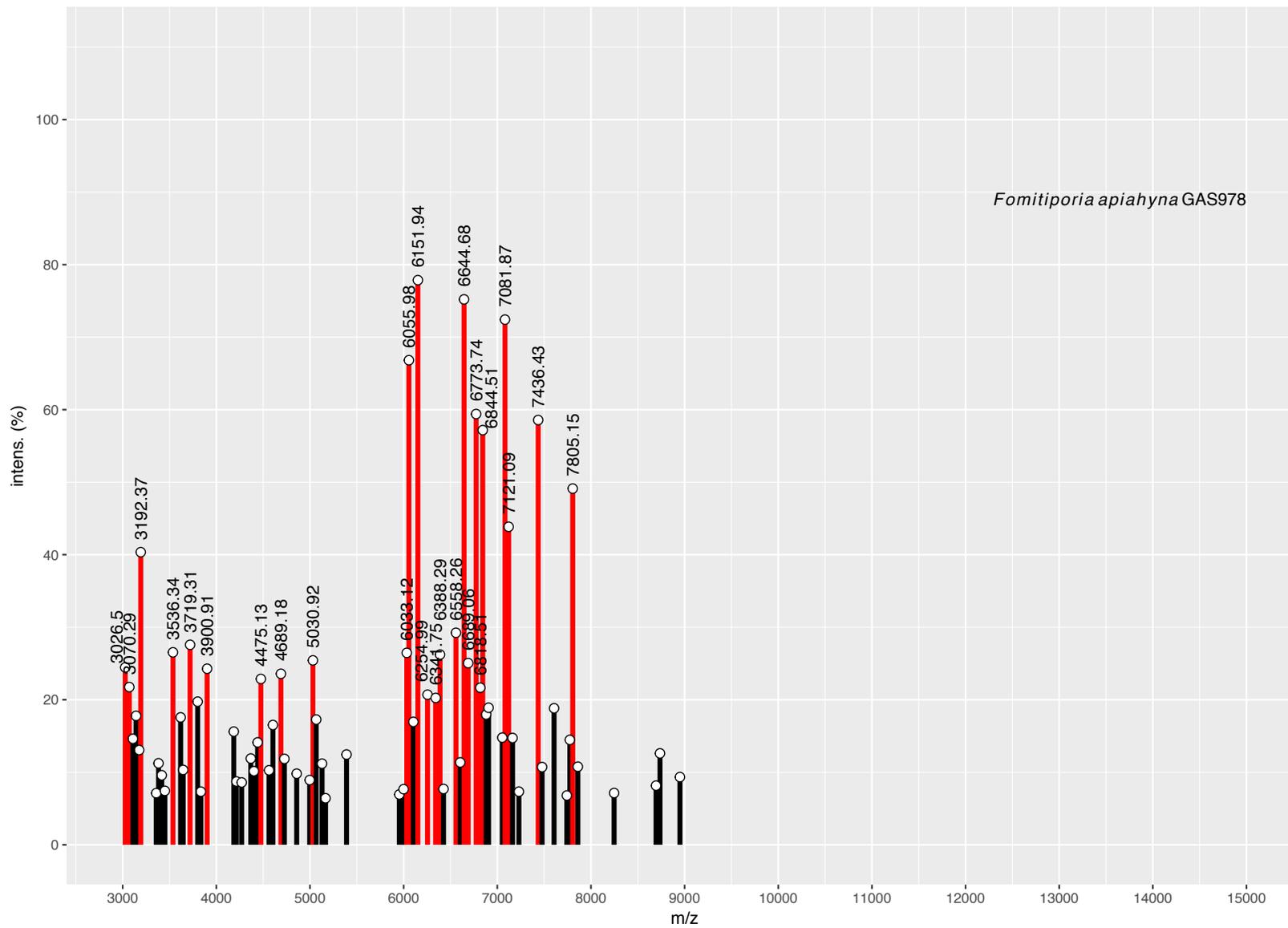


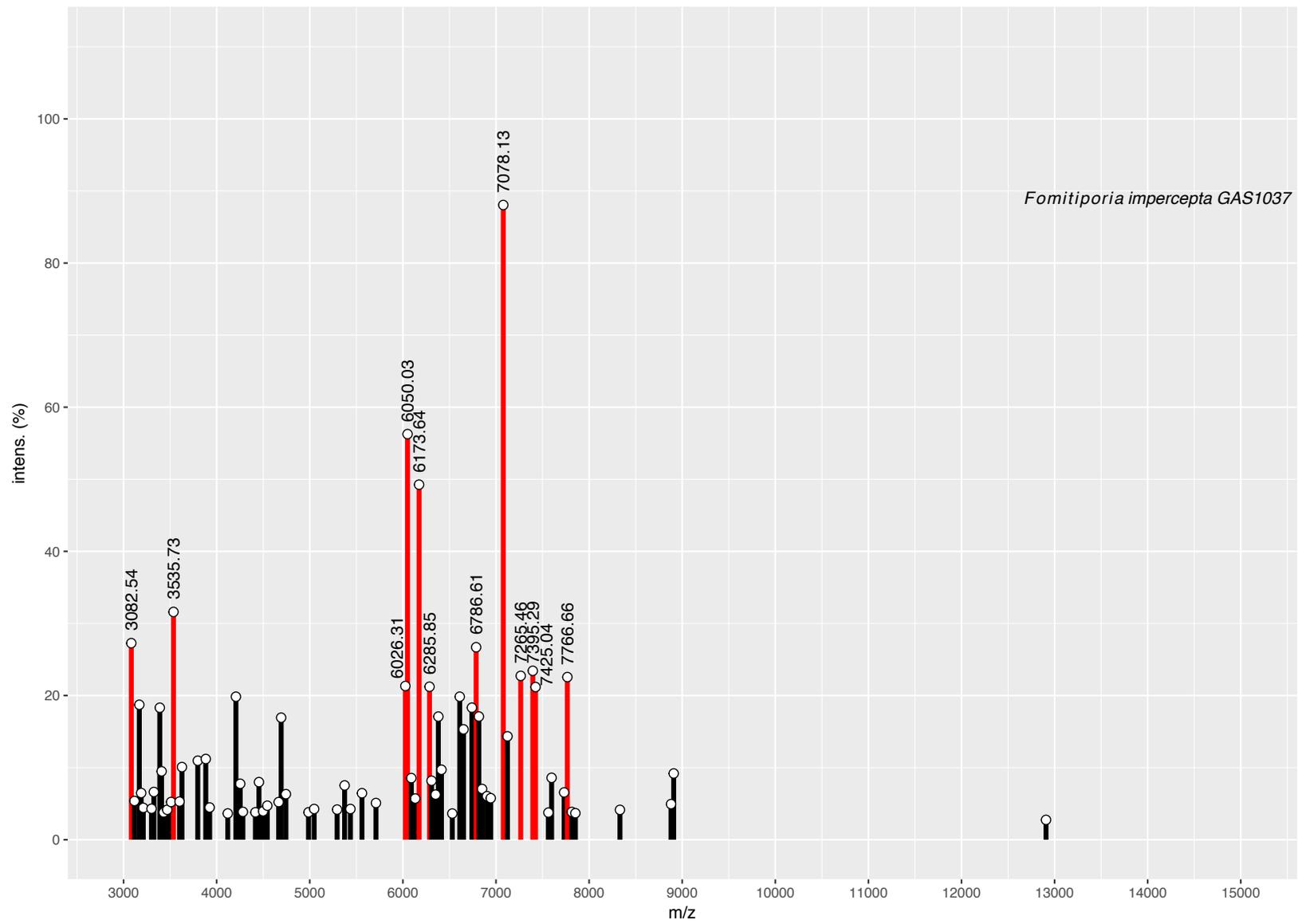


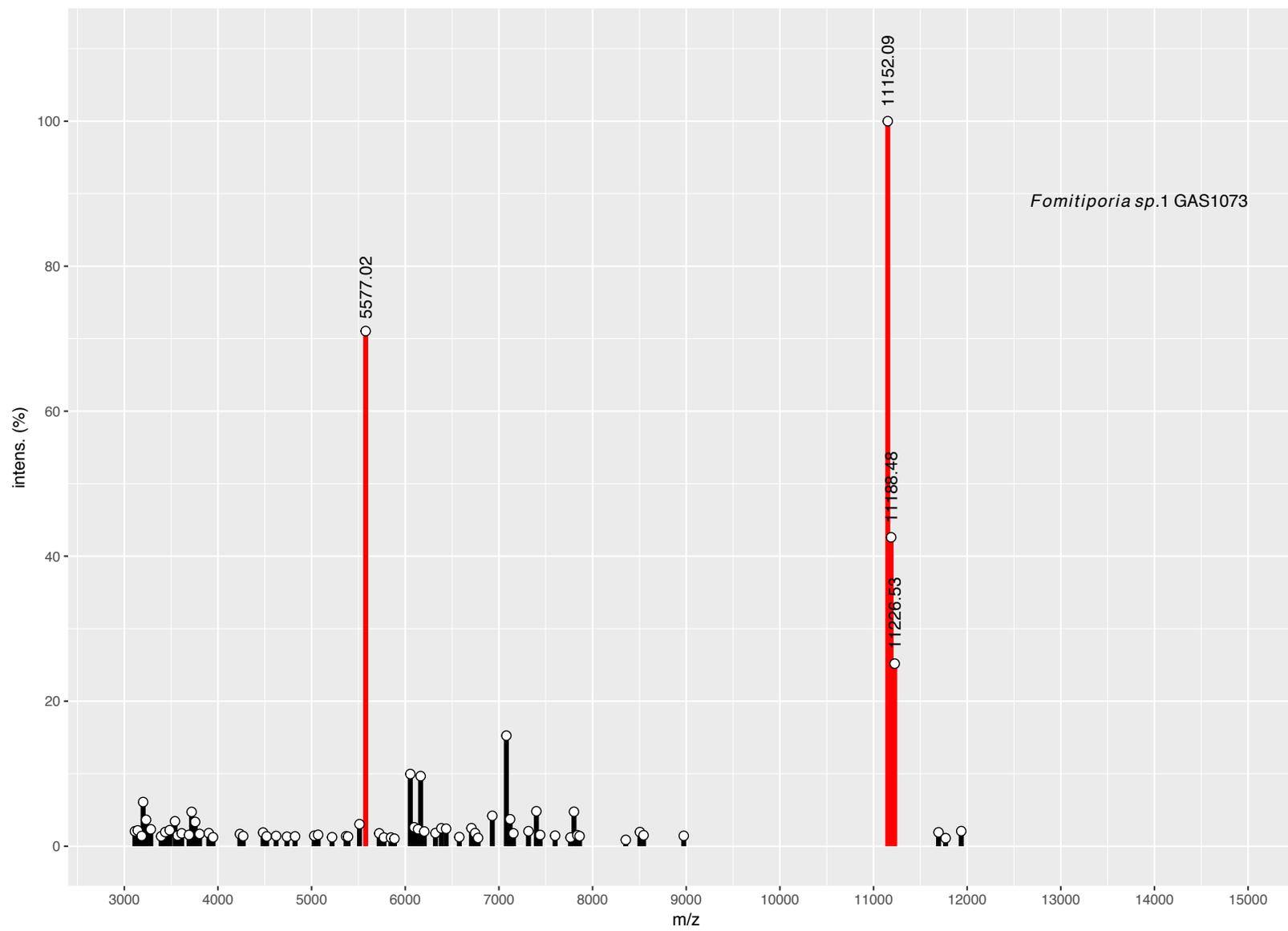


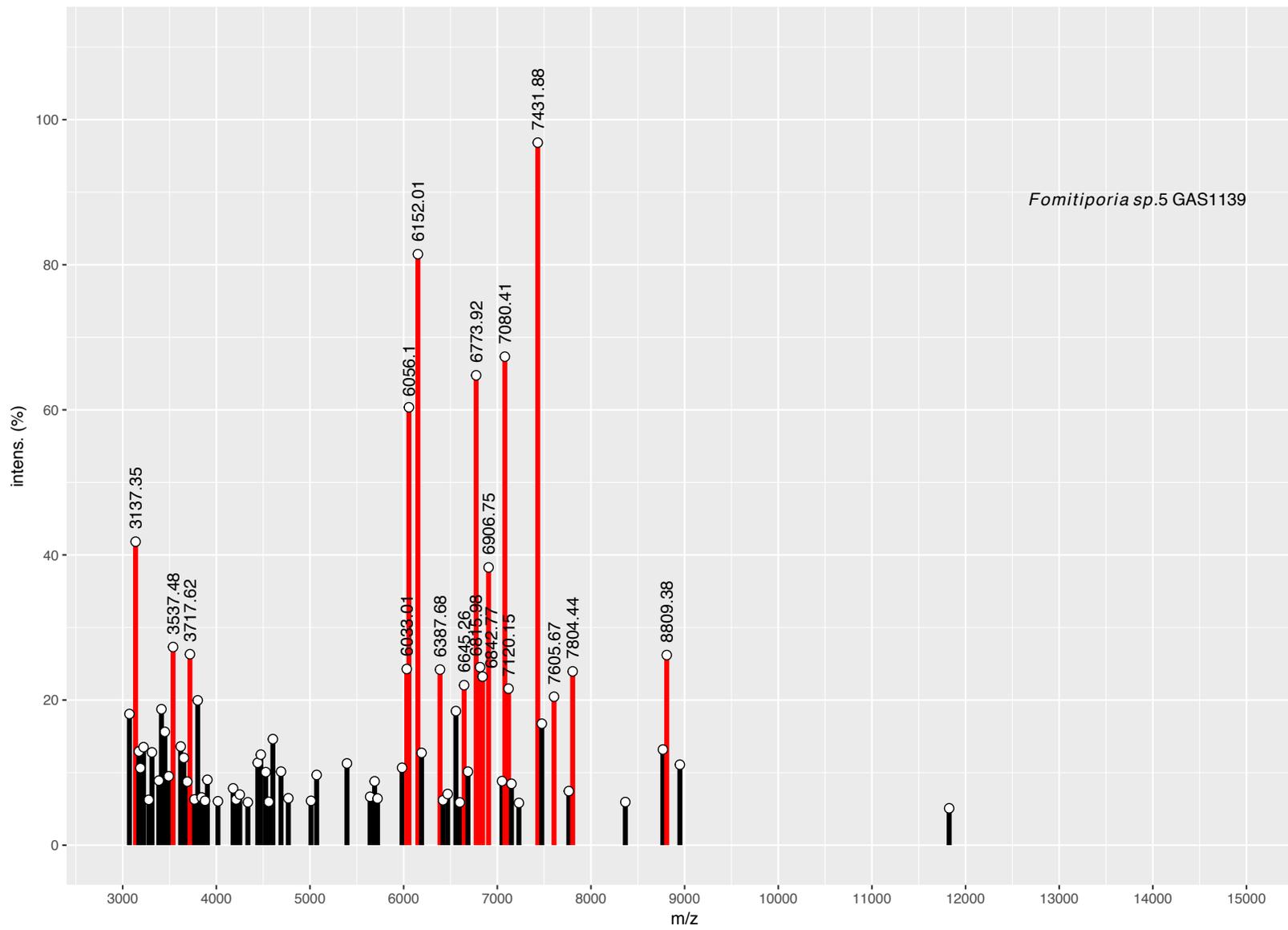


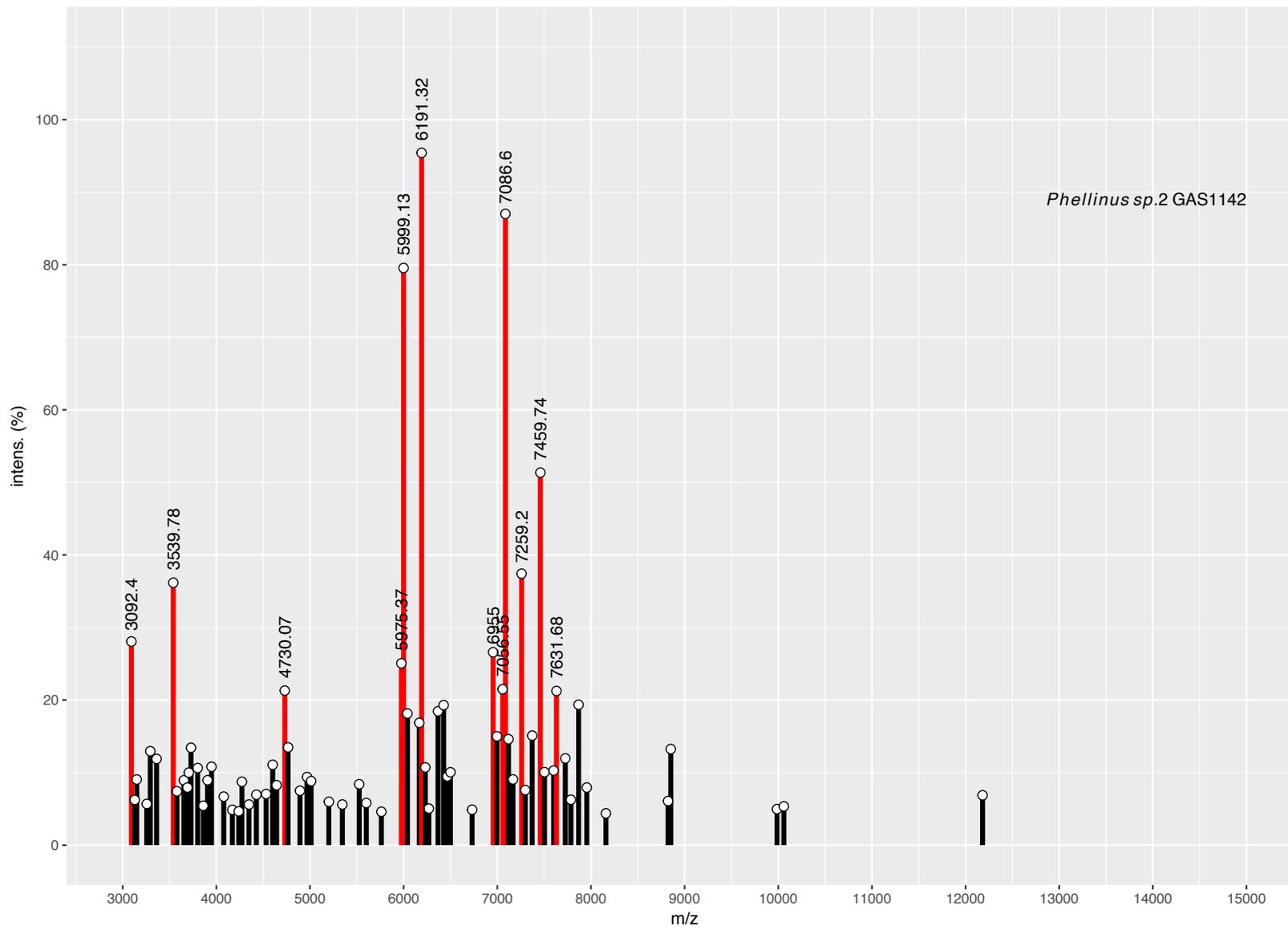


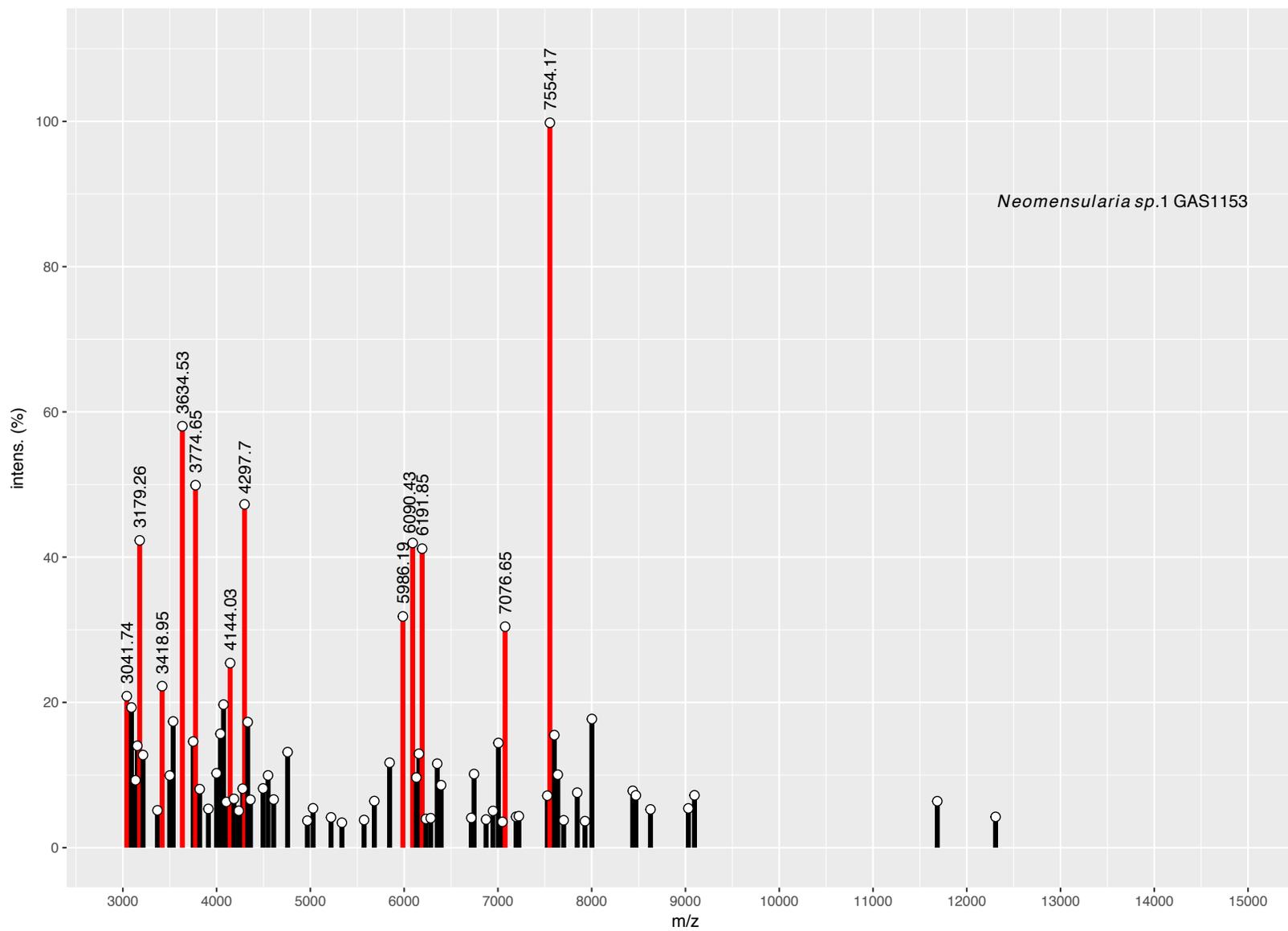


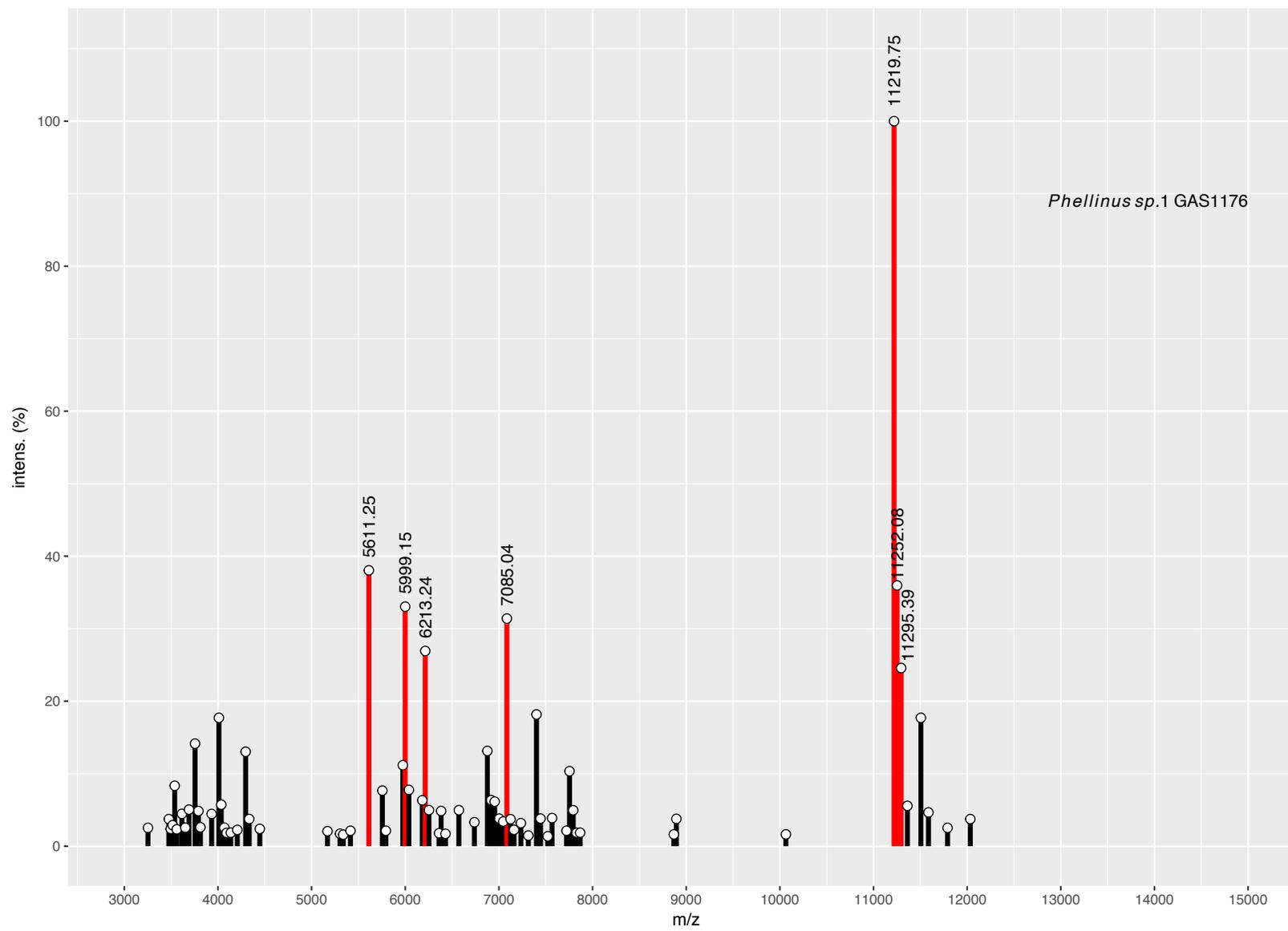


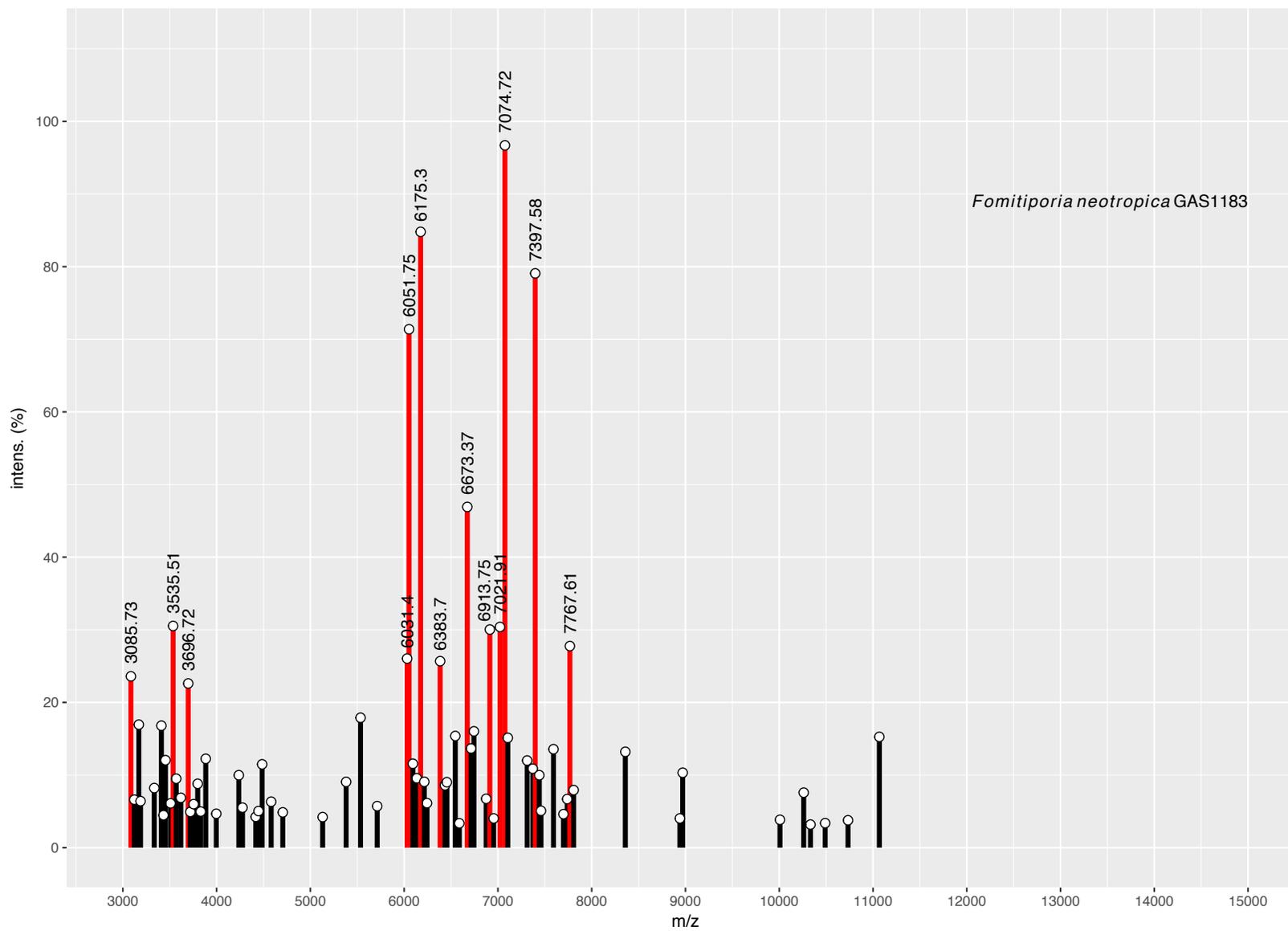


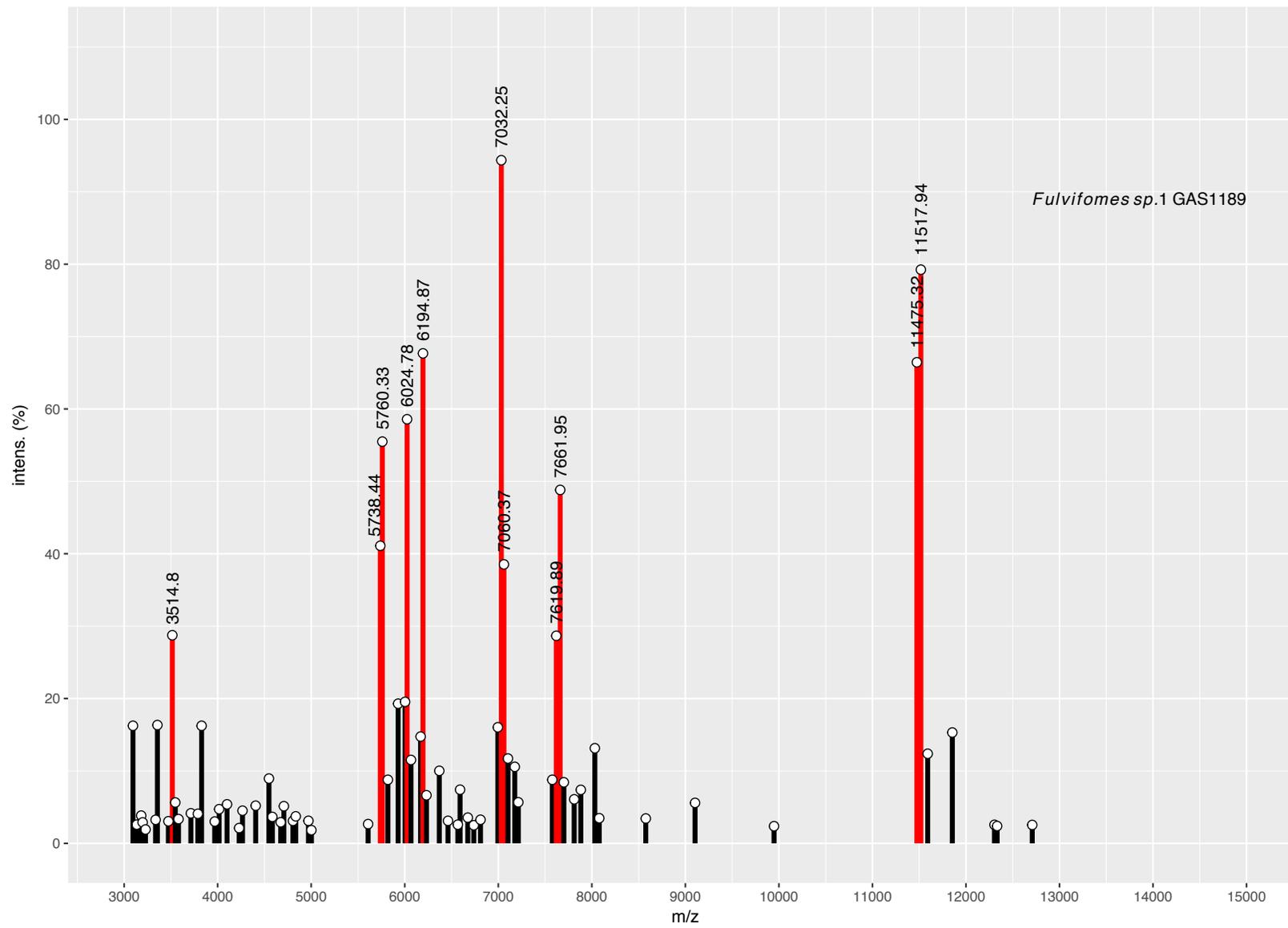


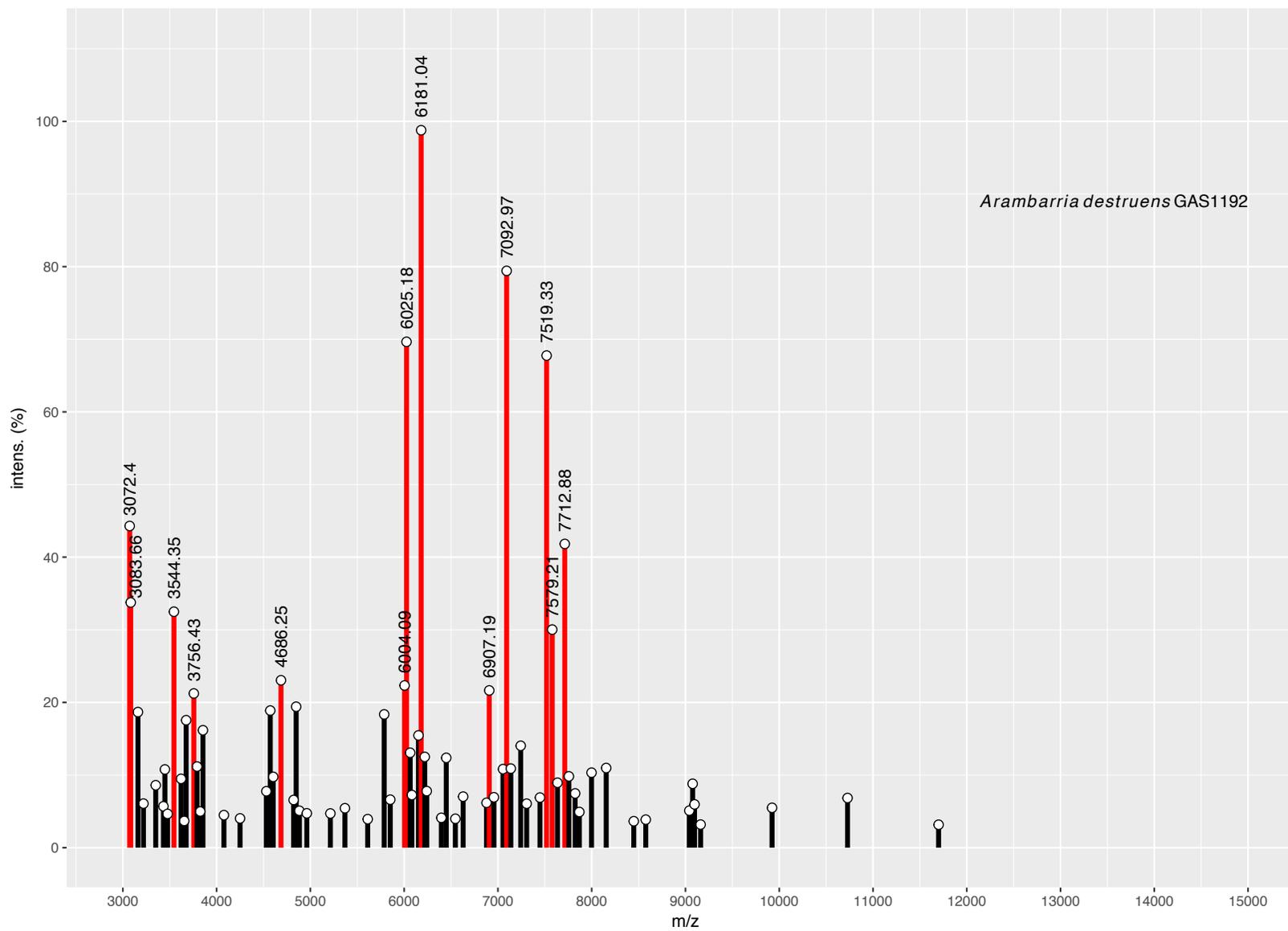


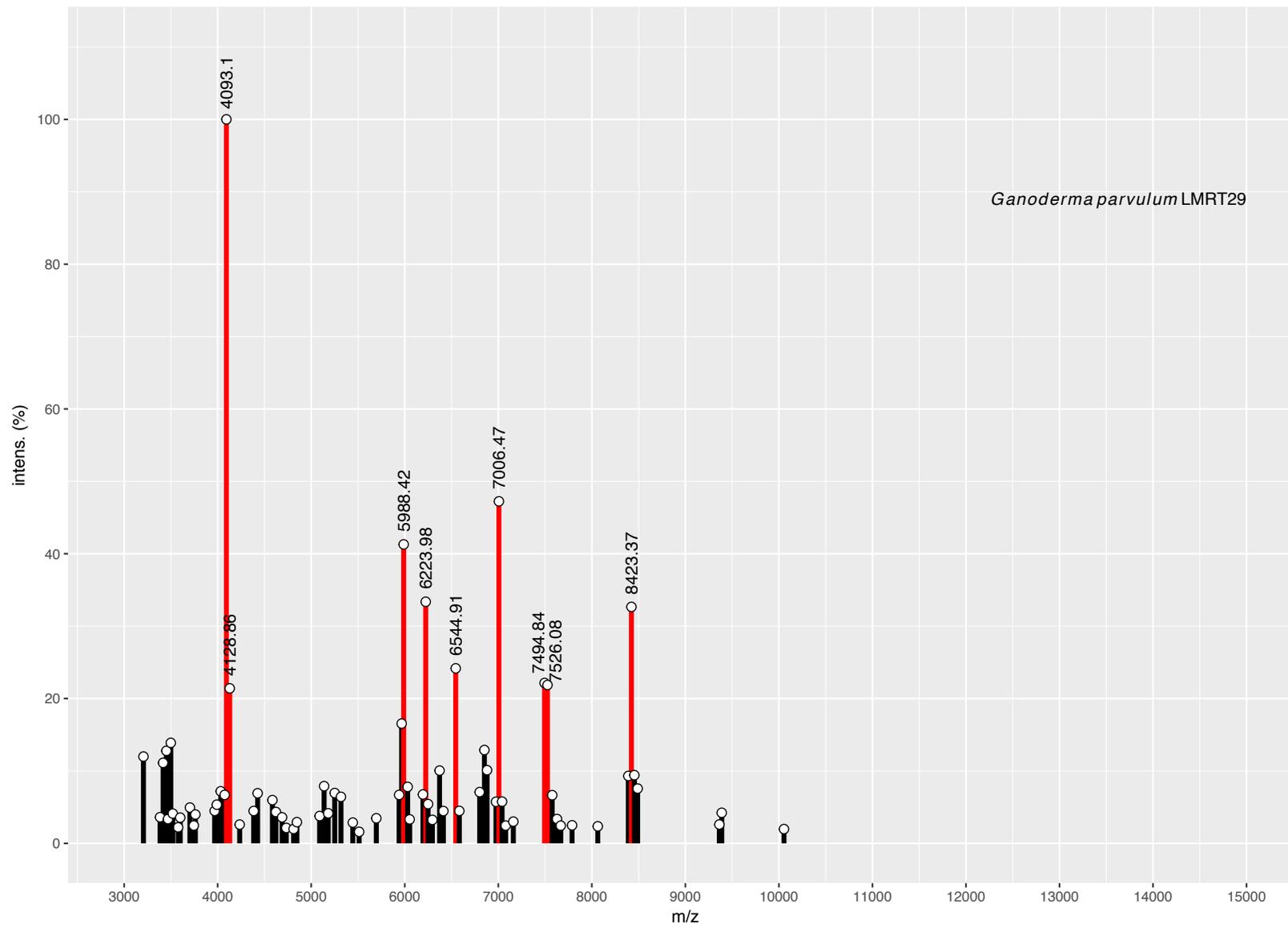


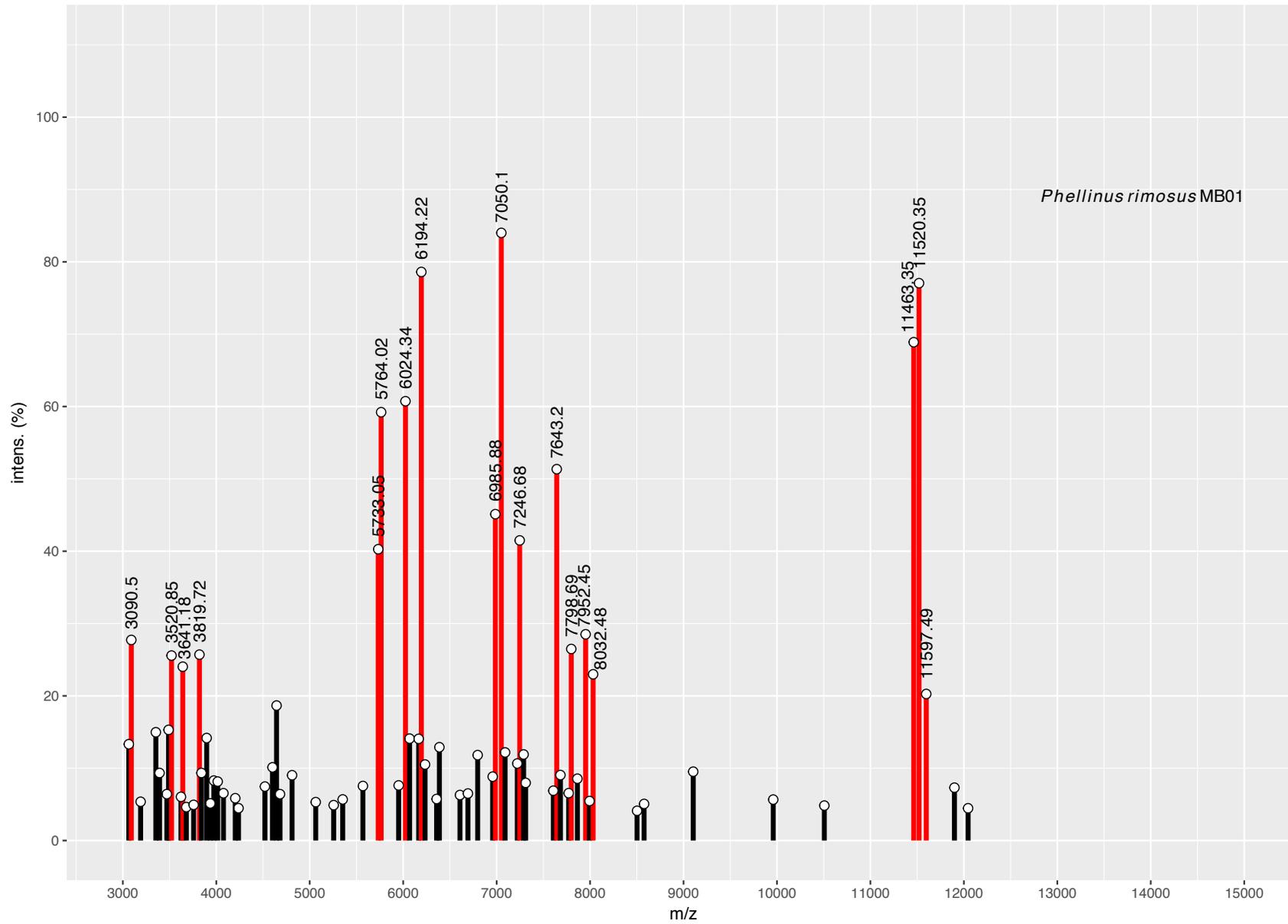


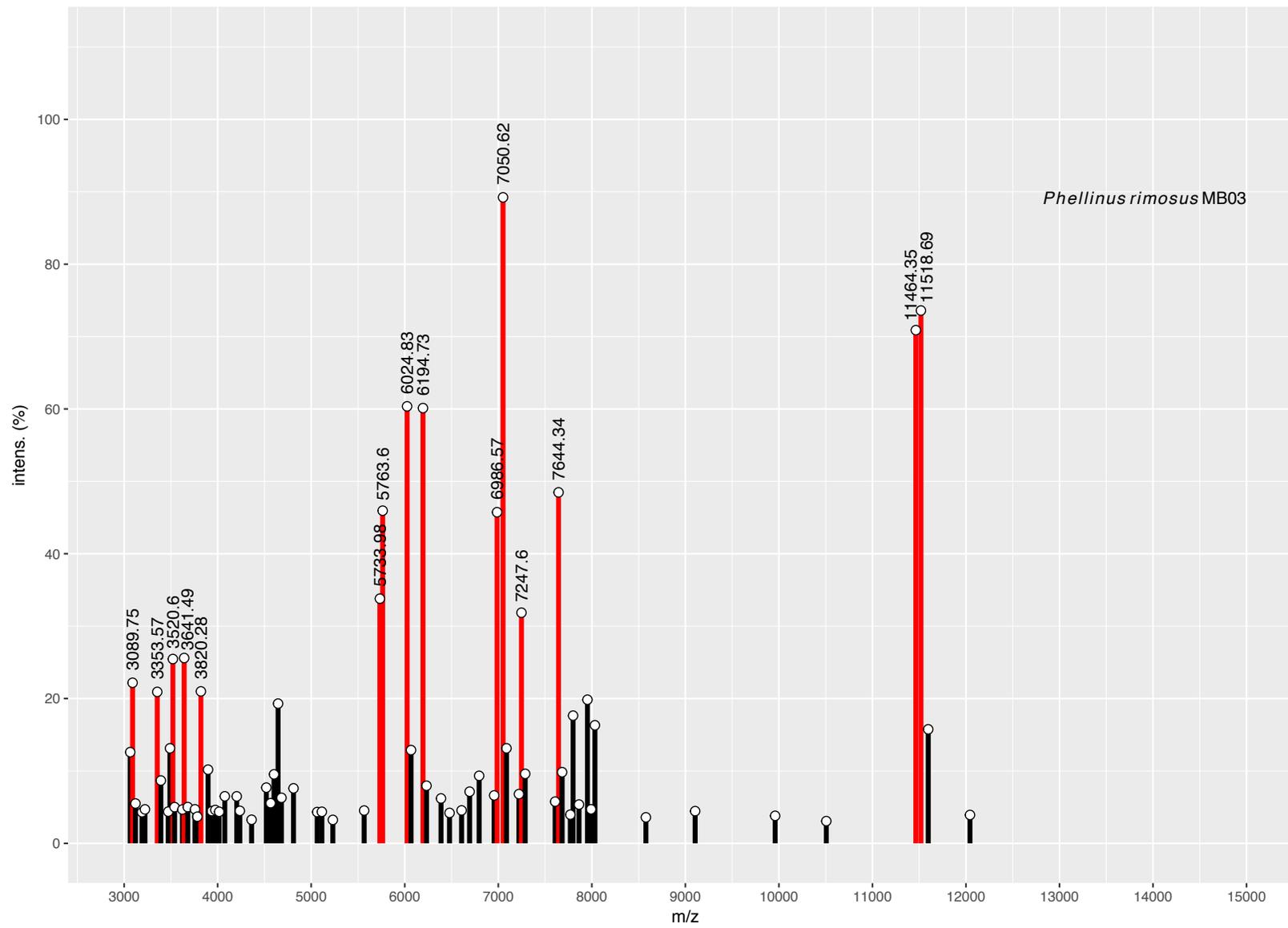


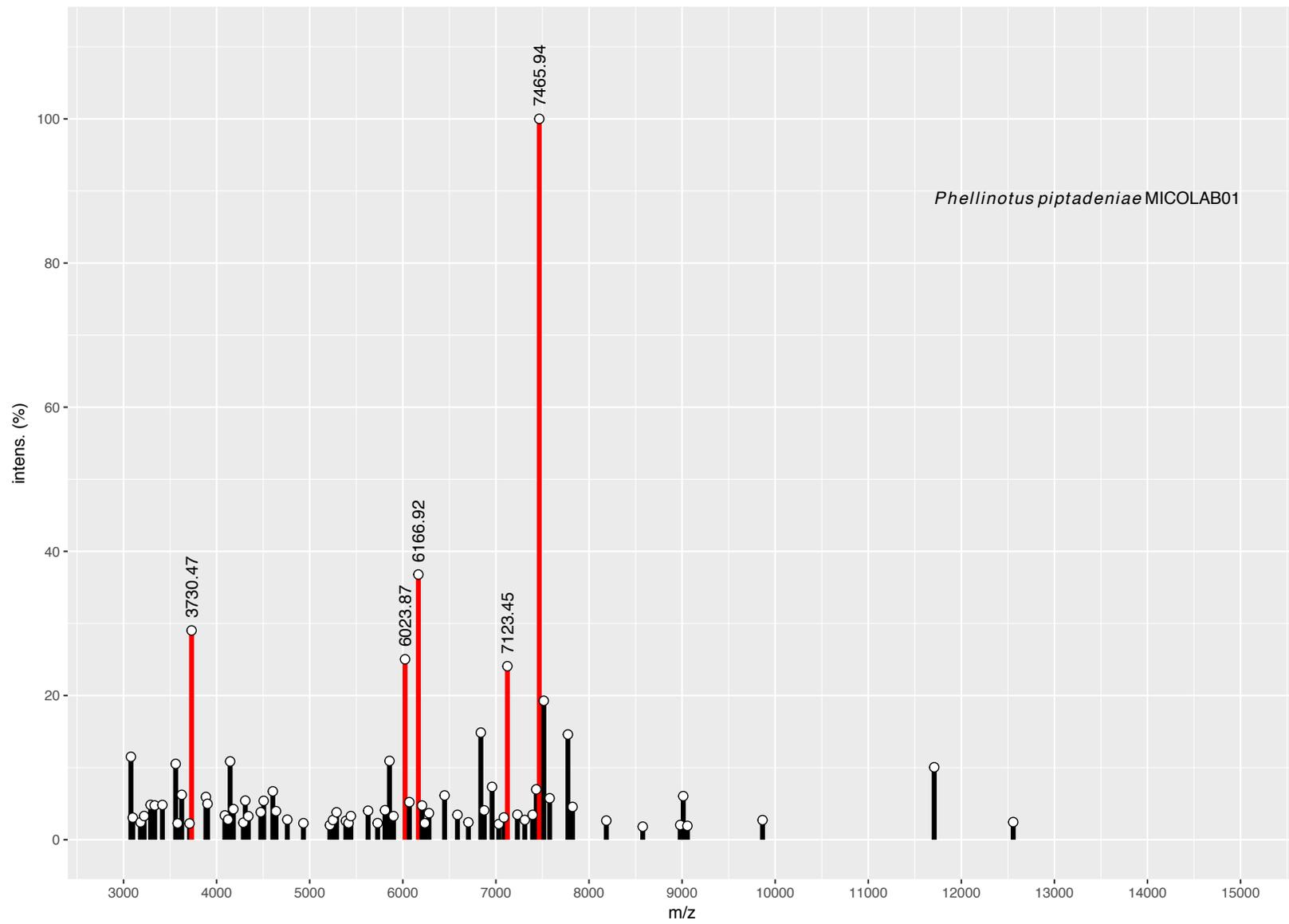












11.3 – Programas e scripts para geração dos espectros virtuais

Programa utilizado:

Software R (R 3.4.2 GUI 1.70)

Pacote R: ggplot

Passos do script:

- Acessar pasta com os arquivos na extensão .CSV

```
setwd("/Users/luizmarceloribeirrotome/Desktop/Resultados_Organizados/Espectros_Consensos/ESPECART")  
library(ggplot2)
```

- Abrir arquivo com os dados e plotar o gráfico

```
data = read.csv("379D.csv", sep = ";", dec = ".", head = FALSE)  
colnames(data) = c("mz", "int")  
data$color = "black"  
data$color[data$int > 20] = "red"  
sub = subset(data, int>20)
```

```
# imp = subset(data, int>2)
```

```
ggplot(data, aes(mz, y = int)) +  
  geom_segment(aes(xend=mz, yend=0), color= data$color, size=1.5) +  
  geom_point(shape = 21, colour = "black", size = 2.5, stroke = 0.5, fill = "white") +  
  labs(x = "m/z", y = "intens. (%)") +  
  scale_x_continuous(breaks = c(3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000,  
12000, 13000, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000, 19000, 20000), limits=c(3000, 15000)) +  
  geom_text(data=sub, aes(label = mz), hjust = -0.2, angle = 90) +  
  scale_y_continuous(breaks = c(0, 20, 40, 60, 80, 100), limits=c(0, 110)) +  
  annotate("text", x = 15000, y = 90, label = "italic(Ganoderma~sp.1)~379-D", vjust =  
"inward", hjust = "inward", parse = T) +  
  guides(fill=guide_legend(title="Presence"))
```