

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E  
PARASITOLOGIA**

Ana Carolina Peixoto Baidarian Mamede

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE  
FUNGOS DO FILO ASCOMYCOTA E BASIDIOMYCOTA  
SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E *ESCHERICHIA COLI***

Florianópolis

2012

Ana Carolina Peixoto Baidarian Mamede

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE  
FUNGOS DO FILO ASCOMYCOTA E BASIDIOMYCOTA  
SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E *ESCHERICHIA COLI***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à disciplina TCC II  
como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas pela  
Universidade Federal de Santa  
Catarina.

Orientador: Prof. Admir Giachini,  
PhD.

Florianópolis

2012

## COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Admir José Giachini, Ph.D. (UFSC)  
(Presidente)

---

Prof. Rafael Dutra de Armas, Dr. (UFSC)

---

Prof<sup>a</sup>. Elza de Fátima Albino Smânia, Dr. (UFSC)

*Dedico este trabalho aos meus pais, que nunca mediram esforços pela  
minha educação.*

*“A penicilina cura os homens, mas é o vinho que os deixa felizes.”*

*(Alexander Fleming)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade de alcançar essa meta.

À minha mãe Tereza, pelo apoio, pela paciência e por, mesmo com a distância e a saudade, nunca deixar de estar presente, torcer e cuidar de mim.

Ao meu pai Mamede, pelo incentivo, por toda a ajuda, pela torcida e por acreditar em mim.

À minha irmã Débora, por todos os momentos divididos desde sempre, pelas conversas, pelas risadas, pela amizade, independente da distância.

A toda a minha família, em especial à memória da minha avó, Ogaper, e da minha madrinha, Dirce, por tudo o que fizeram e fazem por mim.

Ao meu namorado Gustavo Nascimento, pelo carinho, amor, compreensão e apoio nesses cinco anos.

À família Nascimento, que se tornou a minha segunda família, em especial à D. Elisete e ao Sr. Rubens, por tudo o que fizeram por mim durante esses anos.

À Universidade Federal de Santa Catarina, por ser uma universidade pública, gratuita e de qualidade e por abrir suas portas para o enriquecimento da minha formação.

Ao meu orientador, Prof. Admir Giachini, por acreditar no meu potencial, pela atenção dedicada durante toda a pesquisa, pela disposição para ajudar, pela paciência, e pelo apoio, os quais foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Márcio Rossi e Cláudio Soares, por sempre estarem à disposição dos alunos e pelo exemplo de dedicação que nos dão.

À Prof.<sup>a</sup> Elza Smania e ao Prof. Artur Smania, por disponibilizarem as bactérias, assim como o Laboratório de Antibióticos para a realização de parte da pesquisa, e ao Fábio Smania, pela ajuda com os experimentos.

Aos membros da comissão examinadora, professores Admir, Elza, Rafael e Artur, por aceitarem colaborar com a elaboração deste trabalho.

Aos colegas do Grupo de Diversidade Microbiana, em especial ao mestrando Douglas Cardoso e à minha amiga Vanessa Braz, por toda a ajuda a mim prestada e por tornarem a convivência do dia-a-dia mais descontraída.

A todos aqueles que, embora não citados aqui, contribuíram de alguma forma para a minha formação e educação durante toda a minha vida, os meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

Os integrantes do Reino Fungi podem ser maléficos ou benéficos dependendo do tipo de associação que exercem com outros organismos. Compreende-se que os fungos são responsáveis por uma elevada razão de infecções em humanos, animais e plantas, com impactos consideráveis na economia. A alta taxa de metabólitos secundários produzidos pelos basidiomicetos destacou a atenção para novos estudos relacionados à produção de compostos antimicrobianos por esses fungos. Neste trabalho foram avaliados 31 isolados de fungos basidiomicetos e ascomicetos quanto a sua atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Porções dos fungos crescidos em cultura (MNM) foram extraídos na forma de discos micelianos ou via extração (difusão) com solução salina e testados quanto a sua atividade antibacteriana sobre *S. aureus* e *E. coli*. Somente dois isolados fúngicos (*Pycnoporus sanguineus* e *Pisolithus microcarpus*) apresentam atividade antibacteriana, e somente contra *S. aureus*. Os testes também demonstraram que somente o método de difusão a partir dos discos exerceu influência sobre o desenvolvimento bacteriano.

Palavras-chave: Basidiomicetos, Ascomicetos, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

## ABSTRACT

Members of the Kingdom Fungi can be harmful or beneficial depending on the type of association with other entities. It is understood that the fungi are responsible for a high rate of infections in humans, animals and plants, with considerable economical importance. Moreover, it is well known that fungi play an extremely important role in the environment and on the food web chain, since they are the causative agents of degradation of organic matter and, therefore, promote the recycling of vital elements. Currently, the high rates of secondary metabolites produced by basidiomycetes, popularly known as mushrooms, called the attention to new studies related to the production of antimicrobial compounds by these fungi. In this work, we tested 31 basidiomycetes and ascomycetes to determine their antimicrobial ability against two bacterial strains classified as *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Portions of fungi grown in culture (MNM) were extracted as discs or extraction mycelian (diffusion) with saline and tested for their antibacterial activity against *S. aureus* and *E. coli*. Only two fungal isolates (*Pycnoporus sanguineus* and *Pisolithus microcarpus*) have antibacterial activity, and only against *S. aureus*. The tests also demonstrated that only the method by diffusion from the disks have any influence on bacterial growth.

Keywords: Basidiomycetes, Ascomycetes, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Agaricus subrufescens</i> .....	21
Figura 2 – <i>Amanita muscaria</i> .....	22
Figura 3 – <i>Elaphomyces anthracinus</i> .....	23
Figura 4 – <i>Hebeloma crustuliniforme</i> .....	24
Figura 5 – <i>Hysterangium gardneri</i> .....	25
Figura 6 – <i>Laccaria</i> sp.....	26
Figura 7 – <i>Lactarius rufus</i> var. <i>rufus</i> .....	27
Figura 8 – <i>Lactarius rufus</i> var. <i>parvus</i> .....	28
Figura 9 – <i>Paxillus involutus</i> .....	29
Figura 10 – <i>Pisolithus</i> sp.....	30
Figura 11 – <i>Pisolithus microcarpus</i> .....	31
Figura 12 – <i>Pisolithus tinctorius</i> .....	32
Figura 13 – <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....	33
Figura 14– <i>Rhizopogon</i> sp.....	34
Figura 15 – <i>Rhizopogon fuscorubens</i> .....	35
Figura 16 – <i>Rhizopogon vulgaris</i> .....	36
Figura 17 – <i>Scleroderma</i> sp.....	37
Figura 18 – <i>Scleroderma areolatum</i> .....	38
Figura 19 – <i>Scleroderma bougheri</i> .....	39
Figura 20 – <i>Scleroderma bovista</i> .....	40

Figura 21 – <i>Scleroderma flavidum</i> .....	41
Figura 22 – <i>Scleroderma uruguayense</i> .....	42
Figura 23 – <i>Suillus</i> sp.....	43
Figura 24 – <i>Suillus cothurnatus</i> .....	44
Figura 25 – <i>Verticillium</i> sp.....	45
Figura 26 – Resultado da atividade antibacteriana de <i>Pisolithus</i> sp.....	48
Figura 27 – Resultado da atividade antibacteriana de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....	49
Figura 28 – Pigmentos liberados por <i>Rhizopogon</i> sp.....	50
Figura 29 – Pigmentos liberados por <i>Pisolithus microcarpus</i> .....	50

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Meios de cultura e solvente.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Seleção dos isolados fúngicos .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3 Seleção das bactérias-teste.....</b>	<b>46</b>
<b>3.4 Testes da atividade antibacteriana.....</b>	<b>46</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>

# 1. INTRODUÇÃO

O reino Fungi compreende um vasto grupo de organismos que, durante muito tempo, foram considerados vegetais e classificados no reino Plantae. Entretanto, um conjunto de características próprias permitiu a classificação dos fungos em um novo reino. Uma das características essenciais é a ausência de pigmentos fotossintetizantes, fator que caracteriza a nutrição dos fungos como heterotrófica, realizada por digestão e absorção (WEBSTER *et al*, 2007). Além da nutrição, os fungos apresentam características diferenciadas dos vegetais, como parede celular quitinosa (com exceção de fungos aquáticos) e armazenamento de glicogênio como substância de reserva (TRABULSI *et al*, 2008). Devido à morfologia altamente variada, os fungos podem se apresentar como filamentosos ou leveduriformes.

Atualmente, o reino Fungi abrange um total estimado de 1,5 a 5,1 milhões de espécies. Deste total, apenas cerca de 120 mil foram descritas (BLACKWELL, 2011), e a grande maioria ainda não foi pesquisada, justificando-se a necessidade de novos estudos utilizando esses organismos (HAWKSWORTH, 2001).

Os fungos estão divididos em sete filos principais: Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microsporidia e Neocallimastigomycota (HIBBETT *et al*, 2007). Entre eles, o filo Ascomycota possui o maior número de fungos descritos, enquanto o Basidiomycota compreende os cogumelos e fungos evolutivamente mais diferenciados (BARREIRO *et al*, 2012).

O filo Basidiomycota abrange aproximadamente 30 mil espécies, o que corresponde cerca de 20% do total de fungos descritos. Os basidiomicetos apresentam hifas septadas e são caracterizados pela produção de esporos sexuais externos conhecidos como basidiósporos, que variam de acordo com cada espécie (TRABULSI *et al*, 2008). Certas características deste filo como tamanho das frutificações, que varia de poucos milímetros até 50 centímetros, morfologia heterogênea e grande diversidade de cores são de grande valia no reconhecimento de espécies no campo (GUERRERO *et al*, 1983).

Organismos pertencentes ao filo Ascomycota, como os fungos leveduriformes, possuem um papel considerável na indústria alimentícia e biotecnológica, uma vez que atuam na fabricação de bebidas, queijos e pães, além da produção de substâncias antibióticas.

Na última década, notou-se um aumento da incidência de infecções importantes causadas por fungos, as quais ocorrem principalmente no ambiente hospitalar e em indivíduos com o sistema imune comprometido. Do mesmo modo, milhares de doenças causadas por fungos afetam plantas economicamente importantes, causando um prejuízo de um bilhão de dólares ao ano (TORTORA *et al*, 2012).

Outro papel extremamente importante desenvolvido pelos fungos no meio ambiente é a decomposição da matéria orgânica, uma vez que são organismos hábeis na degradação de compostos recalcitrantes como a lignina (BARREIRO *et al*, 2012).

Além disso, algumas espécies de fungos filamentosos participam de interações benéficas com outros seres vivos. Como exemplo dessas interações têm-se as micorrizas, associações de fungos com plantas, e os líquens, associações de fungos com algas. Essas interações estão intimamente relacionadas à produção de enzimas e metabólitos que, de acordo com Deacon (2005), podem ser classificados como primários e secundários.

Os metabólitos primários são produtos de vias comuns a todos os organismos, como os açúcares, aminoácidos e glicerol, ou seja, são elementos essenciais para o bom funcionamento do organismo. Normalmente são sintetizados durante a fase de crescimento do microrganismo. Já os metabólitos secundários são sintetizados na fase final de crescimento, próximo à fase estacionária e abrangem uma vasta diversidade de compostos, os quais são formados por vias específicas de organismos específicos. Estes não são essenciais para o crescimento, todavia conferem vantagens para os organismos que os produzem. Sua síntese é frequentemente reprimida e está intimamente relacionada às propriedades de cultivo, principalmente à composição do meio de cultura (MADIGAN *et al*, 2004).

De acordo com Bekai (2010), os metabólitos secundários são produzidos por plantas, fungos, bactérias, protozoários, insetos e animais, em resposta aos estímulos externos como alterações nutricionais, modificações das condições do ambiente - como pH e temperatura, infecções e competição. O termo “metabólito secundário” foi primeiramente utilizado por Bu'Lock, no início dos anos 1960, para caracterizar metabólitos microbianos não essenciais para o metabolismo basal da célula, produzidos a partir da diferenciação bioquímica de um organismo. Muitos desses metabólitos têm sido relacionados com a atividade biológica, representando importante fonte de novos

medicamentos. Aproximadamente um terço das drogas mais vendidas no mundo são produtos naturais ou derivados destes.

Desse modo, a alta exploração biotecnológica desses metabólitos pela indústria farmacêutica na forma de produção de antibióticos, e pela indústria alimentícia na produção de bebidas, posicionam os fungos como o segundo grupo de produtores de metabólitos secundários com aplicação industrial, atrás apenas de Actinobacteria. Como exemplos de metabólitos secundários, podem-se citar os alcalóides, flavonóides, taninos, pigmentos e ceras. Alguns exemplos de metabólitos secundários fúngicos com aplicação biotecnológica são a penicilina, alguns esteroides, hormônios para crescimento vegetal e a ciclosporina, administrada em pacientes recém-transplantados (SILVA e COELHO, 2006).

O emprego dos fungos como antimicrobianos vem desde a Antiguidade (3000 a.C.), quando os chineses faziam uso de sapatos mofados para curar feridas nos pés. Contudo, o primeiro antimicrobiano de eficácia comprovada foi a penicilina, substância isolada do fungo *Penicillium notatum* (atualmente denominado *Penicillium chrysogenum*), descoberta acidentalmente pelo cientista britânico Alexander Fleming, após ter sua cultura de *Staphylococcus aureus* contaminada com o bolor, no ano de 1928. Após vários anos de pesquisa e testes com alimentos mofados, finalmente conseguiram isolar a penicilina e, no ano de 1940, foi efetuado o primeiro teste clínico, que resultou na cura das feridas de centenas de enfermos oriundos da guerra. Graças aos esforços de Fleming e seus colaboradores, a penicilina foi empregada em larga escala e seu sucesso contribuiu para a diminuição de 39% das mortes de soldados na Primeira Guerra Mundial para 3,9% na Segunda Guerra (BALA *et al*, 2011).

Entre as décadas de 1940 e 1990, a descoberta de novos agentes antimicrobianos era a resposta mais bem sucedida para a problemática da resistência bacteriana. Atualmente, no entanto, essa estratégia tem falhado, uma vez que o aumento da resistência ocorre com mais rapidez e facilidade que a descoberta de novos antibióticos. Por conseguinte, a diminuição no número de antibióticos licenciados, essencialmente contra patógenos gram-negativos, devido à composição da membrana e da presença da camada lipopolissacarídica (LPS), além do aumento da resistência bacteriana aos antibióticos atualmente disponíveis no mercado, torna a descoberta de novas substâncias antimicrobianas de

suma importância para a indústria biotecnológica (LIVERMORE *et al*, 2011).

Compreende-se a resistência como uma forma de seleção natural que pode ser causada por fatores como: automedicação, uso equivocado e por período insuficiente de antibióticos, escolha de medicamentos mais caros e de amplo espectro como tratamento para infecções mais brandas e falta de assistência médica.

Ainda de acordo com Livermore e colaboradores (2011), na década de 1990 a indústria farmacêutica aprimorou os métodos de busca de novos agentes antimicrobianos, porém, mesmo com essas novas técnicas, os produtos mais eficazes eram ainda aqueles naturalmente provenientes de fungos e “estreptomicetos”, que haviam sido descobertos na Era de Ouro dos antibióticos, antes de 1970. Deste modo, as pesquisas realizadas geravam descobertas repetitivas, como aquelas pertencentes à classe das tetraciclinas, resultando em poucas novidades emergentes. Atualmente, estima-se que mais de 100.000 antibióticos diferentes são produzidos por espécies do gênero *Streptomyces*.

A pesquisa em busca de novos potenciais antimicrobianos é extremamente valiosa, uma vez que dos organismos que produzem substâncias com tais propriedades, poucos apresentam resultados positivos em testes com animais, dando origem a antibióticos de fato (MADIGAN *et al*, 2004).

Os antibióticos possuem toxicidade seletiva, ou seja, são tóxicos para as bactérias, mas não para a célula do hospedeiro. Entre os principais mecanismos de ação dos antibióticos estão: a inibição da duplicação do cromossomo bacteriano ou da transcrição, a inibição enzimática através da imitação de metabólitos bacterianos, a modificação da permeabilidade da membrana plasmática da bactéria e a inibição da síntese proteica bacteriana (CANTO, 2010).

O histórico da descoberta de substâncias antibacterianas isoladas de fungos os torna fontes promissoras neste campo de investigação (DYAKOV *et al*, 2011). Paralelamente, uma das vantagens de se utilizar esses microrganismos como fontes de antimicrobianos deve-se à possibilidade de utilizar fermentadores para seu cultivo em larga escala. Além da praticidade, esse tipo de produção não causa desequilíbrios ambientais, uma vez que a extração de largas porções dos microrganismos de seu ambiente natural não se faz necessária. (TAKAHASHI *et al*, 2008). Ainda, de acordo com Aqueveque e

colaboradores (2010), a constante busca por metabólitos secundários extraídos de fungos tem sido uma grande fonte de inovação química na busca de produtos naturais nos últimos vinte anos.

É conhecido o fato de que os metabólitos secundários extraídos de Basidiomycota são matéria-prima para uma ampla gama de produtos naturais, que abrangem desde componentes estruturais com ação antitumoral até agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirais, alucinógenos, citostáticos, enzimas reguladoras e aromas (BRIZUELA *et al*, 1998; SUAY *et al*, 2000).

Os primeiros estudos com basidiomicetos na área de atividade antimicrobiana foram desenvolvidos por Anchel, Hervey e Wilkins em 1941, quando foram examinados extratos de culturas de mais de duas mil espécies. Essas investigações resultaram no isolamento e na identificação da pleuromutilina e diterpeno, extraídos do fungo *Pleurotus mutillus*, utilizado no tratamento de infecções em animais, tornando-se o primeiro antibiótico originário de basidiomicetos (SANDVEN, 2000; ROSA *et al*, 2003).

Outro composto, a poliporina, foi isolado do fungo *Pycnoporus sanguineus* em 1946 e se mostrou sensível contra várias bactérias gram-positivas e gram-negativas. Estudos realizados por Smânia e colaboradores (1995 e 1997) demonstraram que o *P. sanguineus* produz cinabarina, pigmento alaranjado ativo principalmente contra bactérias gram-positivas, e com comprovada atividade contra bacilos gram-negativos (LIMA, 2009).

As propriedades medicinais de basidiomicetos foram frequentemente descritas em culturas antigas. Estudos asiáticos demonstraram que estes cogumelos possuem desenvolvida aplicação farmacológica. Na Ásia, além de servirem como alimento, os cogumelos são filtrados, e seus chás utilizados para tratamento de doenças que vão desde o resfriado comum até alguns tipos de cânceres (ROBLEZ-HERNÁNDEZ *et al*, 2008). A primeira aplicação de cogumelos anticâncer foi demonstrada por Lucas e colaboradores (1957), os quais induziram uma linhagem de Sarcoma 180 em camundongos e utilizaram extratos do corpo de frutificação do fungo *Boletus edulis* no tratamento dos oncogenes, o qual possibilitou a obtenção de uma resposta bastante satisfatória.

O Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta, abrangendo mais de 20% do total de espécies da Terra, segundo dados publicados pelo Ministério do Meio Ambiente (2013). Sandes e Di Blasi (2000)

afirmam que grande parte destes organismos é fonte de substâncias biologicamente ativas, que apresentam uma enorme diversidade em termos de estrutura e propriedades químicas e que podem ser utilizadas direta ou indiretamente no desenvolvimento de novos fármacos. Portanto, o Brasil, com toda sua diversidade, apresenta-se como uma importante fonte de recursos naturais para o desenvolvimento de novas substâncias de interesse biológico.

Apesar desta riqueza, poucos estudos objetivando a descoberta de novos compostos bioativos a partir de basidiomicetos foram realizados no Brasil. A maior parte das investigações foi direcionada para espécies comuns, como os cogumelos comestíveis, que são relativamente mais facilmente reconhecidos. Em adição, como previamente mencionado, a escassez de novas fontes de antimicrobianos, o aumento da resistência dos microrganismos e o tempo de pesquisa demasiadamente longo demandam novos trabalhos nessa área.

No presente estudo, foram realizados testes a partir de 31 exemplares de basidiomicetos e ascomicetos pertencentes à coleção do Laboratório de Diversidade Microbiana, a fim de verificar seu potencial biotecnológico sobre a produção de substâncias antibacterianas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a atividade antibacteriana de isolados fúngicos mantidos na coleção do Laboratório de Diversidade Microbiana da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Selecionar fungos com potencial antibacteriano;
- Avaliar a atividade antibacteriana de isolados fúngicos sobre cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*;
- Comparar a eficiência dos testes de difusão e extração;
- Verificar se o crescimento dos discos exerce influência considerável na biossíntese de substâncias com caráter antimicrobiano.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 MEIOS DE CULTURA E SOLVENTE**

#### **3.1.1 Meio de cultura para crescimento e manutenção das culturas fúngicas**

Para o crescimento e manutenção dos isolados selecionados foi utilizado o meio Melin-Norkrans Modificado (MNM) (Marx, 1969).

#### **3.1.2 Meio de cultura para os testes de atividade antibacteriana**

As culturas bacterianas foram mantidas em caldo de infusão de cérebro e coração (Brain heart infusion – BHI), sendo que o mesmo também serviu para o preparo do inóculo. Os testes de pureza bacteriana foram realizados com meio ágar sangue (ágar base adicionado a 5% de sangue de carneiro) (Himedia). O ágar Mueller-Hinton foi utilizado nos testes de atividade antimicrobiana.

### 3.1.3 Solvente utilizado na extração do micélio

Para os testes com extratos fúngicos, foi utilizada solução salina a 0,85% NaCl (20 ml por isolado) como solvente para a trituração do micélio.

## 3.2 SELEÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Os fungos selecionados para os ensaios de atividade antibacteriana foram obtidos da coleção de fungos do Laboratório de Diversidade Microbiana, da Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os espécimes testados são pertencentes aos filos Basidiomycota e Ascomycota e, a grande maioria, formadores de ectomicorrizas.

A seleção dos microrganismos foi realizada tendo em vista a escolha dos isolados de melhor crescimento em placa pela necessidade de um volume considerável de micélio para a realização dos testes.

Foram testados 31 fungos, os quais foram submetidos às seguintes metodologias ao longo do trabalho: Teste de difusão com discos, testes de extração e testes de crescimento dos discos. Os isolados empregados pertencem às espécies: *Agaricus subrufescens*, *Amanita muscaria* (2 isolados), *Elaphomyces anthracinus*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Hysterangium gardneri*, *Laccaria* sp., *Lactarius rufus* var. *rufus*, *Lactarius rufus* var. *parvus*, *Paxillus involutus*, *Pisolithus* sp. (2 isolados), *Pisolithus microcarpus* (4 isolados), *Pisolithus tinctorius*, *Pycnoporus sanguineus*, *Rhizopogon* sp. (2 isolados), *Rhizopogon fuscorubens*, *Rhizopogon vulgaris*, *Scleroderma* sp., *Scleroderma areolatum*, *Scleroderma bougheri*, *Scleroderma bovista*, *Scleroderma flavidum*, *Scleroderma uruguayense*, *Suillus* sp., *Suillus cothurnatus* e *Verticillium* sp.

As espécies utilizadas estão brevemente descritas a seguir.

## *Agaricus subrufescens* Peck

Pertencente à família *Agaricaceae*, o *A. subrufescens* é popularmente conhecido como “cogumelo-do-sol” ou “cogumelo amêndoa”. Este fungo comestível apresenta propriedades medicinais, sendo comercializado como suplemento auxiliar para o sistema imunológico, podendo ser útil no complemento do tratamento para doenças como o câncer, que debilitam a imunidade do indivíduo, assim como algumas infecções virais e bacterianas. Apresenta píleo cuja coloração varia desde o branco-cinza até o marrom-avermelhado e seu diâmetro oscila entre 5-18 cm (Figura 1A). É facilmente encontrado em regiões de clima tropical, entre galhos secos, sendo também cultivado no Brasil. Sua popularidade vem crescendo, principalmente entre brasileiros, japoneses e chineses, devido às suas propriedades terapêuticas e sabor exótico (GYÖRFI *et al*, 2010). Em cultura apresenta crescimento extremamente acelerado, com hifas brancas, cotonosas, que tomam todo o conteúdo da placa de crescimento (Figura 1B).

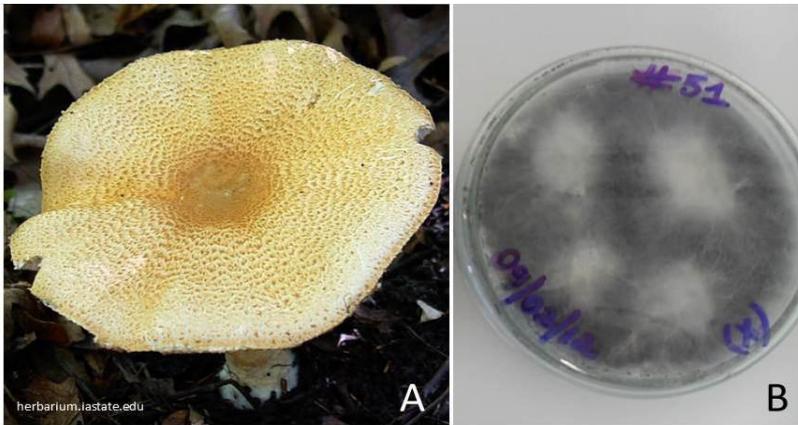


Figura 1 – *Agaricus subrufescens* Peck. A) Basidiocarpo de *A. subrufescens*; B) Cultivo *in vitro* de *A. subrufescens*.

*Amanita muscaria* (L.:Fr.) Hooker

Facilmente reconhecido por seu píleo avermelhado/alaranjado e salpicado de pontos brancos (Figura 2A), este basidiomiceto da família *Amanitaceae* é extremamente venenoso devido à presença de substâncias psicoativas e alucinógenas que, quando ingeridas, podem causar tonturas, confusão mental, boca seca, cansaço e hipersensibilidade (MICHELOT *et al*, 2003). É encontrado em regiões de clima temperado, e possui píleo com diâmetro em torno de 50 cm. Em cultura apresenta crescimento lento, com hifas esbranquiçadas imersas no meio de cultura (Figura 2B).



Figura 2 – *Amanita muscaria* (L.:Fr.) Hooker. A) Cogumelo *A. muscaria* no ambiente; B) Cultivo *in vitro* de *A. muscaria*.

*Elaphomyces anthracinus* Vittad.

*Elaphomyces anthracinus* não forma corpo de frutificação. Em cultura possui formato cilíndrico e hifas longas, negras e grossas que se irradiam em várias direções. Faz associação micorrízica com coníferas, tendo um aspecto de crescimento associativo bastante peculiar, com a emissão de hifas duras e grossas, normalmente em ângulo reto (

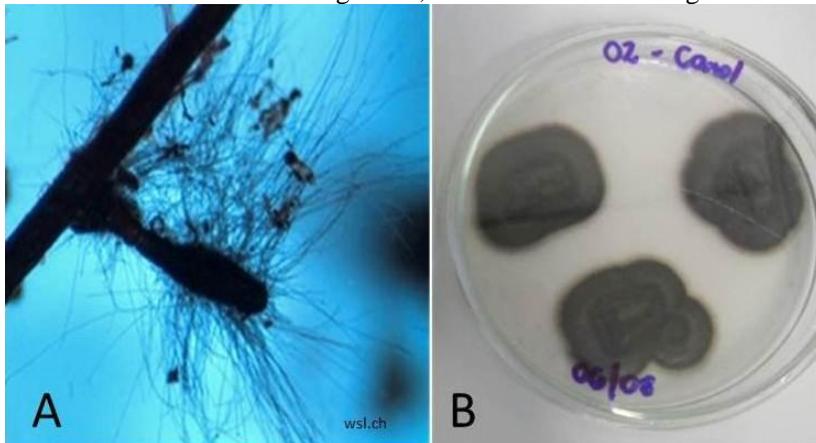


Figura 3A). É capaz de sobreviver a altas concentrações de pesticidas e fertilizantes, a alta retenção de água e a falta de oxigênio, fatores que, aliados à capacidade de formar micorrizas, tornam essa espécie promissora na produção de mudas florestais (IRAWAN, 2005). Em cultura, seu crescimento é lento e não apresenta grande volume de micélio (Figura 3B).

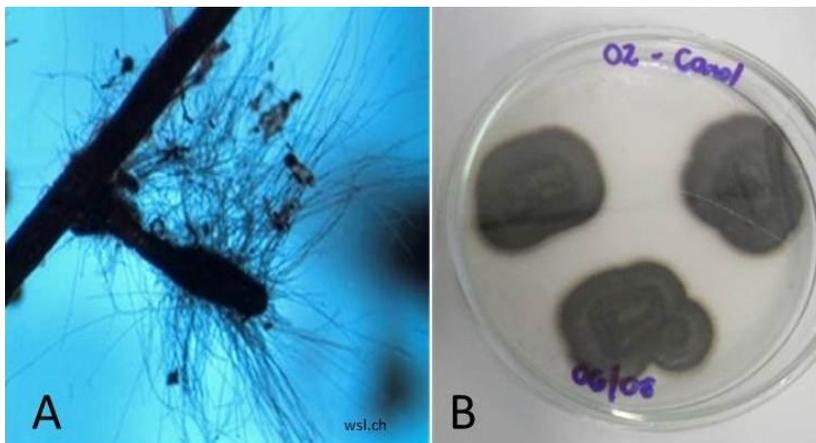


Figura 3 – *Elaphomyces anthracinus* Vittad. A) Forma teliomórfica do fungo *E. anthracinus*; B) Cultura *in vitro* de *E. anthracinus*.

*Hebeloma crustuliniforme* (Bull.) Quéf.

Possui píleo convexo cujo tamanho varia de 3-11 cm, superfície viscosa e lisa quando úmida e lamelas de cor marrom (Figura 4A). Amplamente distribuídos na sua área de abrangência e conhecidos pela formação de micorrizas, podem viver isolados ou em grupos, na base ou na borda de troncos, em gramados ou árvores perto de cemitérios. É venenoso, podendo causar graves distúrbios gastrointestinais. Pode ser encontrado na Europa, América do Norte e Austrália (ARORA, 1986). Em cultura, seu desenvolvimento é lento e apresenta micélio branco com aspecto de pelúcia (Figura 4B).

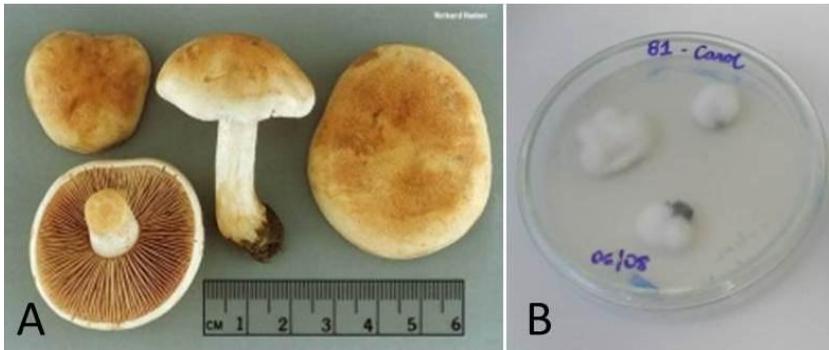


Figura 4 – *Hebeloma crustuliniforme* (Bull.) Quéf. A) *Hebeloma crustuliniforme* na forma de cogumelo; B) Cultura *in vitro* de *Hebeloma crustuliniforme*.

### *Hysterangium gardneri* Fischer

Possui basidiocarpo com coloração que varia do branco ao castanho rosado quando cortado, seco, esférico, com perídio fino (Figura 5A). Apresenta capacidade de formar micorrizas com espécies como *Eucalyptus* spp. A parte reprodutiva deste fungo tradicionalmente é encontrada abaixo da superfície do solo, sendo caracterizada como uma espécie hipógea. *Hysterangium* desenvolve-se de forma lenta *in vitro*, com poucas hifas aéreas e de amplitude reduzida (Figura 5B).

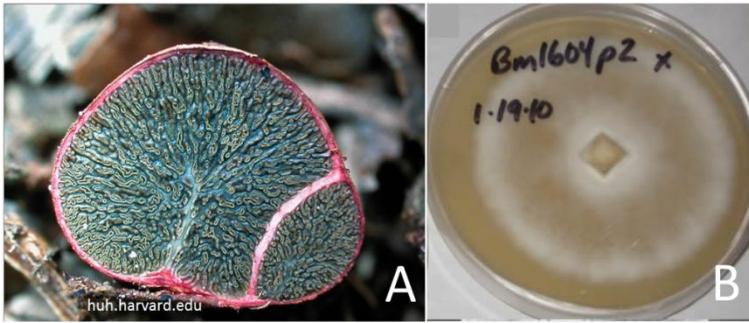


Figura 5 – *Hysterangium gardneri* Fischer. A) Corte demonstrando o interior do basidiocarpo de *H. gardneri*; B) Cultura *in vitro* de *H. gardneri*.

## *Laccaria* sp.

O gênero *Laccaria* apresenta basidioma de tamanho variável (0,5 cm a 20 cm) e coloração desde o branco até o laranja, marrom e lilás. Seu píleo robusto (para algumas espécies) pode ser convexo ou plano e a haste longa e fibrosa. Possui uma camada espessa de escamas enceradas que pode cobrir toda a sua superfície (Figura 6A). Seus esporos são espinhosos e de coloração que varia entre branco e lilás (FREIRE *et al.*, 2012). Esse fungo é extremamente difícil de isolamento. No entanto, uma vez *in vitro* desenvolve-se de maneira satisfatória, com necessidade de repiques mensais (Figura 6B).



Figura 6 – *Laccaria* sp. A) Cogumelo de *Laccaria* sp. no ambiente; B) Cultura *in vitro* de *Laccaria* sp.

*Lactarius rufus* (Fr.) Fr. var. *rufus* Hesler & A. H. Sm.

Encontrado normalmente no norte da Califórnia e nordeste do Pacífico, mais comum entre o final do verão e início do inverno, este fungo possui píleo não viscoso cuja extensão pode variar de 4-12 cm e o formato pode ser convexo-plano ou depressivo. Sua coloração se estende do vermelho tijolo ao marrom (Figura 7A), seu odor é brando, seu sabor é picante e seu aspecto bastante frágil. Apesar de não ser indicada a comestibilidade, *L. rufus* é comercializado enlatado na Escandinávia. Apresenta formação de micorrizas com coníferas, especialmente *Pinus* spp (ARORA, 1986). Em cultura, apresenta crescimento lento com micélio algodonoso e amarelado (Figura 7B).



Figura 7 – *Lactarius rufus* (Fr.) Fr. var. *rufus* Hesler & A. H. Sm. A) Cogumelos de *L. rufus* no ambiente; B) Cultura *in vitro* de *L. rufus*.

*Lactarius rufus* (Fr.) Fr. var. *parvus* Hesler & A. H. Sm.

Possui píleo medindo de 0,4 a 6,9 cm de diâmetro cuja coloração pode variar entre rosada e cor de pêssego. Quando jovem, observa-se que o píleo apresenta formato umbonado (protuberante), enquanto que quando maduro o mesmo se torna depressivo. As lamelas são espessas, o que dificulta sua separação do píleo, e possuem coloração variável entre bege e castanho, quando jovens, e rosada, quando maduros. Apresentam estipe central oco que pode medir entre 2,9 e 5,9 cm de comprimento e 0,3 e 1,5 cm de espessura (Figura 8A). Após aberto, seu interior apresenta coloração que varia do branco ao bege com aroma ligeiramente amargo. Seu desenvolvimento em placa de cultura costuma ser lento e com pouco volume de micélio (Figura 8B).



Figura 8 – *Lactarius rufus* (Fr.) Fr. var. *parvus* Hesler & A. H. Sm. A) Parte inferior do basidiocarpo de *L. rufus* var. *parvus*; B) Cultura *in vitro* de *L. rufus* var. *parvus*.

*Paxillus involutus* (Batsch) Fr.

Possui píleo de formato convexo com bordas enroladas medindo de 4-20 cm. Sua superfície é normalmente seca, mas viscosa quando molhada, podendo ser lisa ou apresentar pelos macios que se desgastam com o tempo. Sua coloração varia de amarelo-marrom, marrom-oliva ou marrom escuro (Figura 9A). Normalmente, são encontrados agregados em troncos no chão, em pântanos, árvores ou gramados. De sabor azedo, sua ingestão pode causar hemólise e falência renal, uma vez que o ser humano é muito sensível a este fungo (ARORA, 1986). Em placa de cultura, pode-se notar o crescimento aéreo de hifas de coloração marrom (Figura 9B).



Figura 9 – *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. A) Cogumelo do fungo *P. involutus*; B) Cultura *in vitro* de *P. involutus*.

*Pisolithus* sp.

É um fungo ectomicorrízico cosmopolita que vive em simbiose com espécies como *Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp. (SOUZA *et al*, 2001). Possui píleo com diâmetro entre 2,4 e 8 cm, globoso a piriforme. O pseudoestipe é extenso e robusto e pode atingir até 7,7 cm de comprimento e 3,1 cm de espessura (Figura 10A). Quando jovem, o perídio apresenta colorações variáveis desde palha até negro fosco, sendo que na maturidade se degrada podendo se tornar verde oliváceo, limão cremado, até negro (GIACHINI, 1995). Em cultura apresenta crescimento acelerado, micélio com aspecto felpudo e coloração marrom claro (Figura 10B).



Figura 10 – *Pisolithus* sp. A) *Pisolithus* sp. no ambiente; B) Cultura *in vitro* de *Pisolithus* sp.

*Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) G. Cunn.

Apresenta perídio liso de aproximadamente 8 cm, com coloração variável entre palha e cor de couro, base negra e rizomorfos castanho-amarelados (Figura 11A). Os peridíolos do centro da capa de esporos são maiores, enquanto os do topo (maduros) e os da base são menores e desintegrados. A base estéril também apresenta alguns peridíolos marrom escuros. Possui perídio central e sólido. O crescimento em meio de cultura é acelerado e com hifas cor de caramelo que formam um micélio felpudo (Figura 11B).



Figura 11 – *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) G. Cunn. A) *P. microcarpus* no ambiente; B) Cultivo *in vitro* de *P. microcarpus*.

*Pisolithus tinctorius* (Mont.) Fischer

Conhecido na Austrália como o fungo esterco de cavalo e na Europa como a trufa Bohemian, *Pisolithus tinctorius* é um “Earthball” (Figura 12A) amplamente distribuído que produz um gel negro utilizado como corante natural para roupas. Formador de micorrizas é extremamente importante na jardinagem, onde é utilizado como estimulador de crescimento de raízes (VOLK, 2003). Em placa de cultura, seu crescimento é acelerado, o micélio possui aspecto cotonoso e coloração variável desde amarelo escuro até marrom claro (Figura 12B).



Figura 12 – *Pisolithus tinctorius* (Mont.) Fischer. A) *P. tinctorius* no ambiente; B) Cultivo *in vitro* de *P. tinctorius*.

*Pycnoporus sanguineus* (L.) Murril

É um fungo de crescimento lento pertencente à família Polyporaceae que causa a podridão e, conseqüentemente, a queda de certos tipos de madeira em florestas de áreas tropicais e subtropicais dos hemisférios Norte e Sul. É um orelha-de-pau não comestível que apresenta coloração laranja brilhante (Figura 13A). Muito usado por tribos indígenas americanas e africanas para tratar diversas doenças. Seu uso foi relatado ainda por comunidades rurais de Santa Catarina no tratamento de lesões cutâneas. É conhecido por sintetizar a cinabarina, um composto com atividade contra várias espécies bacterianas. Em placa de cultura, apresenta micélio alaranjado e esbranquiçado que ocupa todo o entorno da placa (Figura 13B). Seu crescimento é extremamente rápido em meio de cultura.



Figura 13 – *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murril. A) Orelha-de-pau de *P. sanguineus* no ambiente; B) Cultivo *in vitro* de *P. sanguineus*.

*Rhizopogon* sp.

O gênero pertence à família Rhizopogonaceae e compreende fungos hipógeos que formam associações micorrízicas com membros naturais e exóticos da família Pinaceae. Essa classificação foi determinada de acordo com o tamanho e cor dos esporos e esporocarpo quando esmagados. O basidiocarpo de forma globosa se desenvolve na superfície do solo, apresentando coloração marrom e rizomorfias escuras que envolvem o corpo de frutificação e se estendem até o solo (Figura 14A). Internamente, apresenta gleba esponjosa, firme quando jovem e quebradiça quando maduro. Em cultura, apresenta crescimento rápido e micélio algodinoso na coloração amarelada (Figura 14B).



Figura 14 – *Rhizopogon* sp. A) *Rhizopogon* sp. no ambiente; B) Cultivo *in vitro* de *Rhizopogon* sp.

*Rhizopogon fuscorubens* A. H. Sm.

O basidiocarpo possui coloração amarronzada (Figura 15A) e seus exemplares são mais comumente encontrados em regiões do Pacífico Norte dos Estados Unidos (GRUBISHA *et al*, 2002). Em cultura, seu crescimento é ligeiramente rápido com hifas que apresentam coloração bege escuro (Figura 15B).

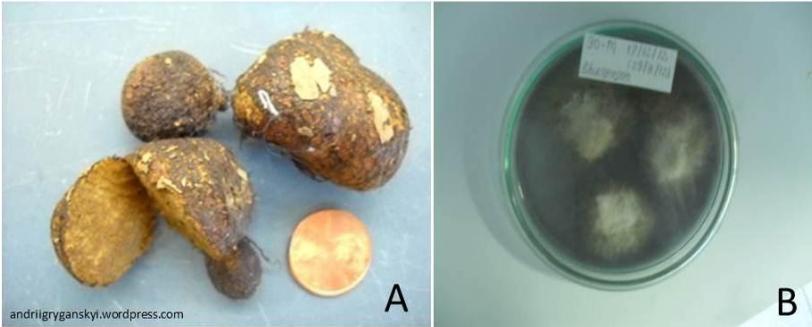


Figura 15 – *Rhizopogon fuscorubens* A. H. Sm. A) Basidiocarpo de *R. fuscorubens*; B) Cultivo *in vitro* de *R. fuscorubens*.

*Rhizopogon vulgaris* (Vittad.) M. Lange

Possui carpóforo com diâmetro variável entre 0,8-1,3 cm, de formato redondo a ovalado, com lóbulos pouco pronunciados, consistência macia e emborrachada. Como observado na Figura 16A, não apresentam estipe. Apresentam perídio marrom a fulvo, coberto por rizomorfias escuras firmemente aderidas à superfície. Quando seco, torna-se negro a violáceo-negro. Quando imaturos, apresentam gleba amarelada a creme que se torna palha com a maturação. A gleba possui câmaras que formam labirintos (GIACHINI, 1995). A Figura 16B demonstra o rápido crescimento alcançado por esse fungo ocupando a maior parte da placa de cultivo.

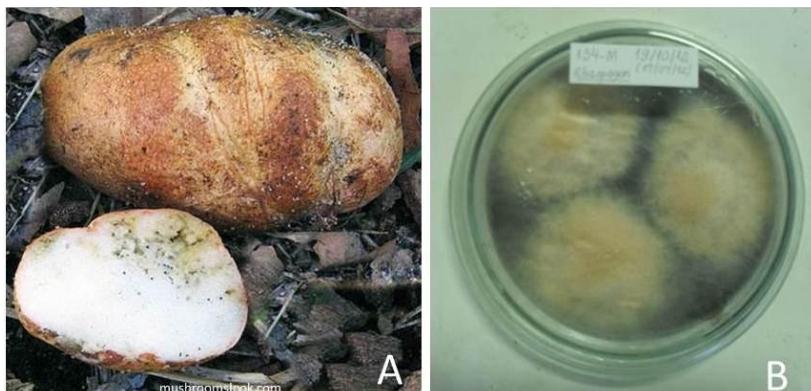


Figura 16 – *Rhizopogon vulgaris* (Vittad.) M. Lange. A) *R. vulgaris* no ambiente; B) Cultivo *in vitro* de *R. vulgaris*.

*Scleroderma* sp.

Os organismos do gênero são conhecidos como “Earthballs” ou bolas de terra e possuem perídio grosso semelhante ao couro. Vivem enterrados total ou parcialmente antes de atingirem a maturidade, o que os leva a serem confundidos com falsas trufas. São comuns, porém não notáveis, podendo viver livremente em locais diversos como troncos, embaixo de árvores e arbustos, na areia, no asfalto, em meio a estradas, trilhas e encostas ou formar micorrizas. Seu corpo de frutificação mede de 2-10 cm de extensão e possui superfície de coloração amarelada (Figura 17A). Venenoso, pode causar náuseas, vômito, diarreia e calafrios (ARORA, 1986). Seu crescimento em placa é ligeiramente acelerado, apresentando micélio esbranquiçado ou amarelado (Figura 17B).



Figura 17 – *Scleroderma* sp. A) *Scleroderma* sp. no ambiente; B) Cultivo *in vitro* de *Scleroderma* sp.

*Scleroderma areolatum* Ehrenb.

É uma espécie com frutificações pequenas que possui perídio fino de coloração amarelo-esbranquiçada, apresentando pequenas escamas marrons na base e escamas maiores no ápice (GIACHINI, 1995) (Figura 18A) Essas escamas normalmente se rompem com a idade, além de possuir esporos espinhosos. Possuem odor ferruginoso e podem ser encontrados embaixo de madeiras rígidas ou associados a coníferas. Em cultura, apresenta crescimento lento, com pouco volume de micélio, cujo aspecto é gelatinoso e a coloração é marrom escura (Figura 18B).

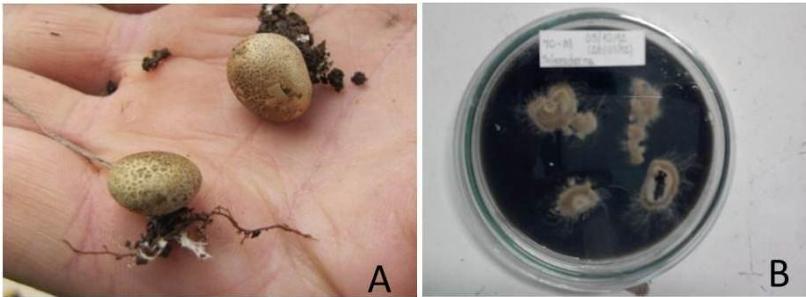


Figura 18 – *Scleroderma areolatum* Ehrenb. A) Cogumelos de *S. areolatum* no ambiente; B) Cultivo *in vitro* de *S. areolatum*.

*Scleroderma bougheri* Trappe, Castellano & Giachini

Apresenta carpóforo globoso a subgloboso de 0,7 a 2,2 cm de diâmetro. Não apresenta pseudoestipe, somente rizomorfias marrons que recobrem o carpóforo (Figura 19A). Devido às rizomorfias, o perídeo é algodonoso e de coloração amarelada. Quando jovem, apresenta odor ferruginoso. Em cultura, apresenta crescimento extremamente lento e micélio amarelado com aspecto de gelatina (Figura 19B).

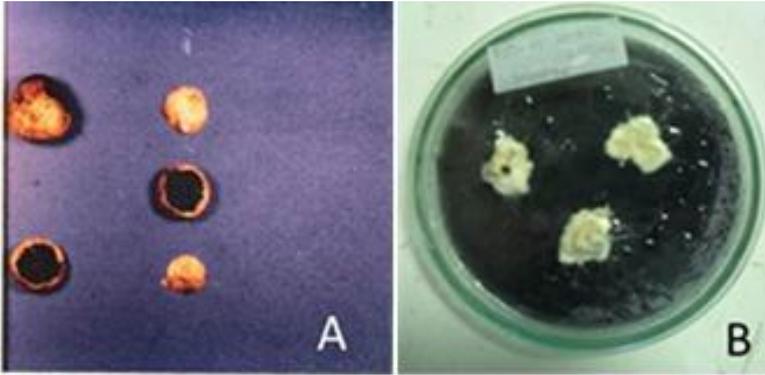


Figura 19 – *Scleroderma bougheri* Trappe, Castellano & Giachini. A) Carpóforos de *S. bougheri*; B) Cultivo *in vitro* de *S. bougheri*.

*Scleroderma bovista* Fr.

Quando jovens apresentam perídio macio com interior negro, enquanto espécimes com idade avançada possuem rachaduras no perídio (Figura 20A). Seu corpo de frutificação mede de 1,5-8 cm. Amplamente distribuídos, podem viver solitários em gramados ou agregados a coníferas. Quando maduros, apresentam manchas escuras no perídio. Em cultura, seu crescimento é lento, suas hifas são amarelo-escuro e aspecto é algodonoso (Figura 20B).



Figura 20 – *Scleroderma bovista* Fr. A) Corte demonstrando interior do perídio de *S. bovista*; B) Cultura *in vitro* de *S. bovista*.

*Scleroderma flavidum* Ellis & Everh.

Possui diversas características de *S. cepa*, como perídio liso, duro e resistente, sendo microscopicamente idêntico, contudo não apresenta manchas avermelhadas e curva-se para trás para se abrir e expor sua massa de esporos (Figura 21A). Em cultura, apresenta hifas esbranquiçadas de crescimento lento aspecto de algodão (Figura 21B).



Figura 21 – *Scleroderma flavidum* Ellis & Everh. A) Interior do perídio de *S. flavidum*; B) Cultivo *in vitro* de *S. flavidum*.

*Scleroderma uruguayense* (Guzmán) Guzmán

Carpóforo medindo de 2,5 a 3,4 cm de diâmetro, levemente achatado. Apresenta perídio esbranquiçado, com escamas irregulares, sendo menores na base e maiores no ápice do basidioma, de coloração marrom escuro (Figura 22A). O perídio possui duas camadas, sendo a externa palha e a interna esbranquiçada. Quando madura, a gleba apresenta-se violácea e pulverulenta. Em cultura, observa-se crescimento lento e micélio marrom claro de aspecto gelatinoso (Figura 22B).

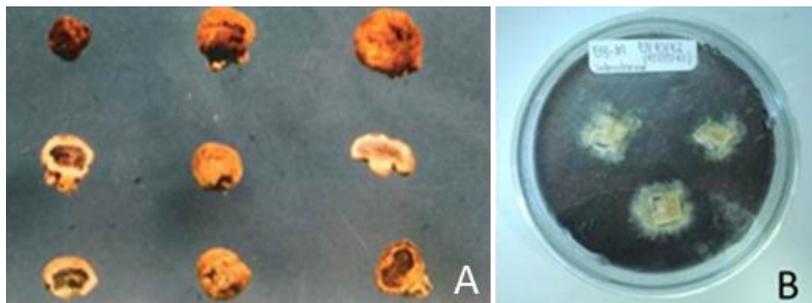


Figura 22 – *Scleroderma uruguayense* (Guzmán) Guzmán. A) Carpóforos de *S. uruguayense*; B) Cultivo em placa de *S. uruguayense*.

*Suillus* sp.

Os organismos deste gênero possuem uma haste cilíndrica, píleo com superfície viscosa e pegajosa, quando úmida, e com manchas escuras (Figura 23A). É conhecido pela formação de micorrizas, especialmente com espécies de *Pinus* sp. Em cultura, apresenta crescimento lento e micélio pouco volumoso de coloração amarelada (Figura 23B).



Figura 23 – *Suillus* sp. A) Cogumelos do gênero *Suillus* sp.; B) *Suillus* sp. cultivado em laboratório.

### *Suillus cothurnatus* Singer

Pode ser encontrado na Malásia, nos Estados Unidos, no México e no Brasil (introduzido). Apresenta píleo obtuso ou convexo medindo de 4-15 cm, de superfície macia e viscosa quando molhada, cuja coloração varia do amarelo-alaranjado ao marrom (Figura 24A). Possui aroma e sabor confusos, podendo ser comestível. Vivem espalhados ou agregados embaixo de coníferas, especialmente pinheiros. Em cultura, apresenta crescimento rápido, hifas esbranquiçadas e de aspecto de algodão (Figura 24B).



Figura 24 – *Suillus cothurnatus* Singer. A) *S. cothurnatus* no ambiente; B) Cultivo *in vitro* de *S. cothurnatus*.

### *Verticillium* sp.

Os organismos deste gênero são anamórficos (Figura 25) e caracterizam-se como parasitas e saprófitos de vegetais, insetos, nematódeos e outros organismos. O *Verticillium alboatrum*, em plantas como o morangueiro, causa a denominada “Murcha de *Verticillium*”, doença caracterizada por causar a murcha de folhas mais velhas e lesões escuras e profundas no pecíolo das folhas jovens, levando à morte do morangueiro (SIMON *et al*, 2005). Em cultura, esse fungo exala um odor característico de coco e o micélio apresenta coloração esverdeada (Figura 25B).

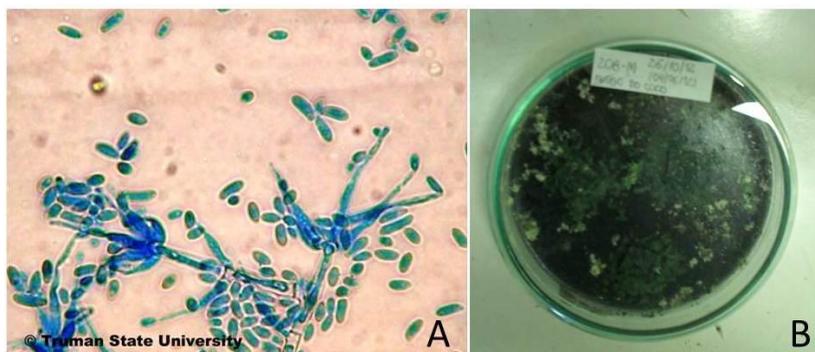


Figura 25 – *Verticillium* sp. A) Observação microscópica do fungo *Verticillium* sp.; B) *Verticillium* sp. cultivado em laboratório.

### **3.3 SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS-TESTE**

As cepas selecionadas para a realização dos testes, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Antibióticos (Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, MIP, UFSC). O critério de seleção foi o de se utilizar uma bactéria gram-positiva e outra gram-negativa nos testes para, dessa maneira, comparar os resultados entre uma estirpe e outra. Os espécimes foram mantidos em caldo BHI a -20 °C no Laboratório de Antibióticos.

### **3.4 TESTES DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

#### **3.4.1 Crescimento das culturas fúngicas**

Os fungos selecionados são originários de vários locais dentro e fora do país, e fazem parte da coleção do Laboratório de Diversidade Microbiana, MIP, UFSC. Os primeiros repiques foram realizados em agosto de 2011 e os fungos foram mantidos em BOD a 25 °C, onde tiveram seu crescimento monitorado durante um mês.

#### **3.4.2 Preparo dos inóculos bacterianos**

Foi feita a transferência de 300 µL de cada cultura-estoque para 3 ml de caldo BHI. Posteriormente, os inóculos foram incubados por 24 h a 36 °C. Após 8 h de incubação, foi verificada a pureza bacteriana através da semeadura em placas de ágar sangue. A concentração das suspensões foi ajustada com caldo de cultivo para a turvação correspondente a 10<sup>7</sup> UFC/ml (SOUZA *et al*, 2005).

#### **3.4.3 Testes de difusão**

Inicialmente, a detecção da atividade antibacteriana foi feita a partir do teste de difusão utilizando discos micelianos. Os inóculos bacterianos contendo 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foram semeados com *swabs* estéreis nas placas contendo meio de cultura ágar de Mueller-Hinton. Com o auxílio de um furador de aço estéril de 7 mm de diâmetro, foram recortados cinco discos

micelianos de cada placa, os quais foram transferidos para as placas inoculadas com os microrganismos. Ao final do processo de transferência, as placas foram incubadas por 24 h a 36°C, em estufa bacteriológica, sob condições aeróbias e, posteriormente, observadas quanto à inibição do crescimento bacteriano, através da formação de halos de inibição.

#### **3.4.4 Testes de extração**

A segunda metodologia utilizada para a detecção da atividade antibacteriana foi desenvolvida a partir da trituração do micélio. A utilização de solução salina como solvente visou à minimização do “stress” possivelmente causado aos organismos pela trituração. O procedimento consistiu em duas etapas. Primeiramente, com o auxílio de uma pequena colher estéril, foi feita a raspagem do micélio da placa e o conteúdo foi depositado em um béquer. Em seguida, adicionaram-se 20 mL de solução salina estéril a cada béquer contendo micélio, o qual foi triturado utilizando-se triturador mecânico (LAR-15 Metvisa). Os extratos obtidos foram aplicados em orifícios de 7 mm realizados com furador estéril nas placas semeadas com os microrganismos. As placas foram submetidas à incubação seguindo as mesmas condições dos testes de difusão com discos (adaptado de VALGAS *et al*, 2007).

#### **3.4.5 Testes de crescimento dos discos**

Cinco espécies de fungos foram selecionadas para a realização de novos repiques: *Elaphomyces anthracinus*, *Agaricus subrufescens*, *Suillus cothurnatus*, *Rhizopogon* sp. e *Pisolithus microcarpus*. O critério de seleção dos fungos foi o bom crescimento miceliano em placa. Os repiques foram feitos em quadruplicatas para cada espécie fúngica em meio de cultura Melin Norkrans Modificado (MNM), e as mesmas foram armazenadas em estufa BOD mantidas a 24 °C. O crescimento dos fungos foi monitorado durante 20, 25 e 30 dias.

Após o primeiro período de crescimento (20 dias), foi feito o recorte dos discos a partir do micélio, os quais foram transferidos para novas placas contendo meio MNM com carvão ativo. Para cada fungo, foram feitas duas placas, nas quais foram depositados quinze discos. As placas foram incubadas por oito dias, período melhor observado para o crescimento de micélio no entorno dos discos e os testes de difusão de

discos foram realizados, dessa vez somente retirando os discos das placas, sem corta-los. Mais uma vez, as placas foram incubadas sob as mesmas condições anteriormente descritas. O procedimento foi repetido por mais duas vezes, sendo a última sem o uso do carvão no meio de cultura, nos intervalos de crescimento de 25 e 30 dias. O intervalo teve o intuito de comparar a influência do tempo de incubação na produção de substâncias antimicrobianas.

### 3.4.6 Análise da atividade antibacteriana

Ao serem retiradas da estufa, as placas foram observadas quanto à formação de halos de inibição no entorno dos discos ou nos orifícios inoculados com extratos. Segundo Smânia e colaboradores (1995), para ser considerado um produtor de antimicrobianos, o fungo deve promover a formação de um halo de inibição de, no mínimo, 9 mm de diâmetro.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 31 isolados testados, dois demonstraram atividade antibacteriana: *Pycnoporus sanguineus* e *Pisolithus* sp. Estes promoveram a inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* e a formação de halos de inibição ocorreu durante a realização dos testes de difusão de discos. Abaixo, na Figura 26, pode ser feita a observação dos halos de inibição do fungo *Pisolithus* sp. contra a bactéria *S. aureus*.

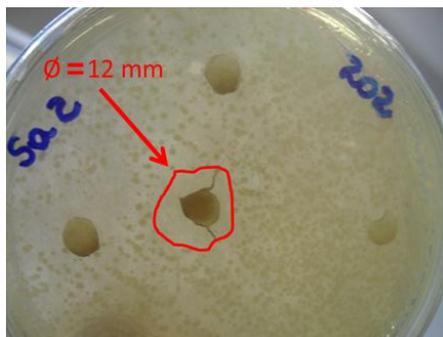


Figura 26 – Atividade antibacteriana de *Pisolithus* sp. contra *S. aureus*.

A Figura 27 confirma o resultado positivo para *P. sanguineus*, na foto indicado pelo número 3, o qual foi de acordo com os resultados obtidos através dos estudos de Smânia (1995; 1997) e Vanderlinde (2010).

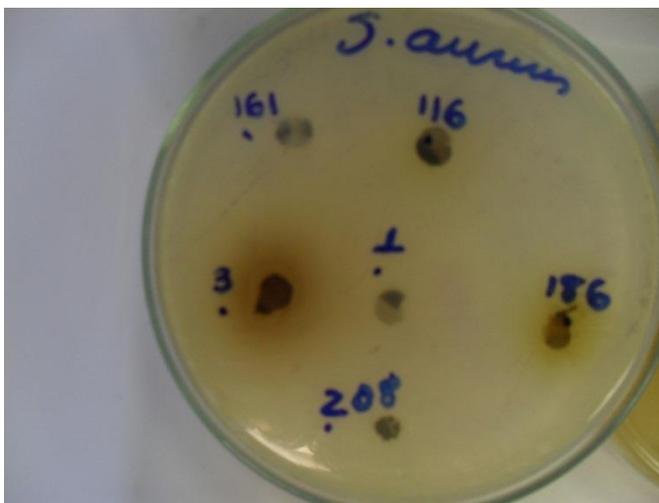


Figura 27 – Atividade antibacteriana de *P. sanguineus* contra *S. aureus*.

Entretanto, no trabalho publicado por Gameiro e colaboradores (2004), o mesmo fungo não foi capaz de promover a inibição do crescimento de *S. aureus*.

Para o gênero *Pisolithus*, Ameri e colaboradores (2011) demonstraram eficiência no uso de extratos de *P. albus* contra SARM (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina). Contudo, não foram encontrados relatos utilizando discos micelianos, como demonstrado no presente estudo.

Alguns organismos testados apresentaram uma alta liberação de metabólitos secundários, difundidos no ágar na forma de pigmentos, como *Rhizopogon* sp. e *P. microcarpus* (Figura 28 e Figura 29, respectivamente). Somente a liberação destes pigmentos não indica a produção de substâncias antimicrobianas e nem uma reação do fungo contra bactérias, entretanto, são necessários novos estudos a fim de verificar se esses pigmentos possuem alguma função significativa.



Figura 28 – Pigmentos liberados por *Rhizopogon* sp. contra *S. aureus*.

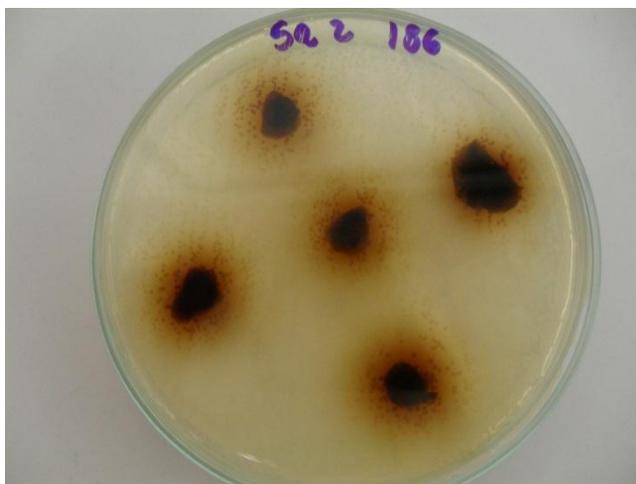


Figura 29 – Pigmentos liberados por *P. microcarpus* contra *S. aureus*.

Não foi possível demonstrar atividade antibacteriana de nenhum isolado através do teste de extração, possivelmente devido ao solvente utilizado. Portanto, são necessários novos estudos nas mesmas

circunstâncias para comprovar essa teoria, uma vez que os testes de difusão com discos apresentaram a liberação desses metabólitos.

*Pycnoporus sanguineus* e *Pisolithus* sp. não foram capazes de inibir o crescimento de *Escherichia coli*. Este resultado está em conformidade com aqueles obtidos nos estudos de Smânia e colaboradores (1995, 1997) e Ameri e colaboradores (2011), citados anteriormente. Devido ao fato de que as bactérias gram-negativas possuem uma estrutura diferenciada das gram-positivas no que diz respeito à parede celular, a qual é composta de peptidoglicano, lipoproteína, membrana externa e lipopolissacarídeo, as bactérias gram-negativas são mais resistentes à ação dos antibióticos, principalmente do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos.

O método de crescimento de discos em meio utilizando-se ou não carvão ativo, não foi relevante para a produção de substâncias antimicrobianas, uma vez que os organismos testados por este método não produziram os metabólitos almejados.

## 5. CONCLUSÃO

O presente estudo empregou diversas metodologias que visaram à detecção da produção de substâncias antibacterianas. Destas, o método de difusão de discos demonstrou que, dos 31 fungos testados, 2 (*P. sanguineus* e *Pisolithus* sp.) foram capazes de promover a formação de halos de inibição do crescimento de *S. aureus*, evidenciando atividade antibacteriana. Nenhum dos isolados apresentou atividade contra *E. coli*.

O método de extração não demonstrou eficácia no que se refere à inibição do crescimento bacteriano, uma vez que nenhum dos fungos testados apresentou atividade antibacteriana. A este fato, pode ser atribuído o uso da solução salina como solvente, o qual não proporcionou a separação dos metabólitos, diferentemente do procedimento discutido em literatura que tradicionalmente emprega acetato de etila ou metanol como solventes (Smânia *et al*, 1995).

A metodologia do crescimento de discos não exerceu influência considerável sobre a atividade antibacteriana, visto que não houve a formação de halos de inibição.

Alguns fungos liberaram pigmentos tanto durante o crescimento em placa quanto nos testes da atividade antibacteriana. Fungos como *Rhizopogon* sp. e *P. microcarpus* apresentaram forte pigmentação no

entorno dos discos. Este fato isolado não indica reação ou presença de metabólitos antibacterianos. Porém, estudos recentes demonstram que certos fungos liberam pigmentos com potencial biotecnológico. O fungo *Hydnellum peckii* é um exemplo deles, pois produz um pigmento avermelhado denominado atromentina, o qual possui propriedades anticoagulantes, similares às da heparina.

Fatores como idade do fungo, tempo de cultivo e composição do meio de cultura pode ter exercido influência sobre os resultados. Outrossim, alguns fungos possuem crescimento lento e outros não apresentam volume suficiente para a realização de testes que utilizam discos micelianos ou extratos.

Ainda, novos estudos se fazem necessários utilizando-se solventes diferenciados para extração, como acetato de etila e metanol, os quais apresentam eficiência comprovada na extração e separação dos metabólitos.

Com o intuito de verificar a influência do crescimento miceliano na produção de metabólitos de carácter antibacteriano, os testes de crescimento de discos também devem ser realizados utilizando os fungos que apresentaram atividade através do teste de difusão de discos.

## 6. REFERÊNCIAS

- AMERI A, GHADGE C, VAIDYA JG, DEOKULE SS. 2011. Anti-*Staphylococcus aureus* activity of *Pisolithus albus* from Pune, India. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5 (4): 527–532.
- AQUEVEQUE P, ANKE T, SAÉZ K, SILVA M, BECERRA J. 2010. Antimicrobial activities of submerged cultures of Chilean Basidiomycetes. *Planta Med*. 76: 1787–1791.
- ARORA D. 1986. Mushrooms demystified: A comprehensive guide to the fleshi fungi. 2 ed. Ten Speed Press, Berkeley. 959 p.
- BALA N, AITKEN EAB, FECHNER N, CUSACK A, STEADMAN1 KJ. 2011. Evaluation of antibacterial activity of Australian basidiomycetous macrofungi using a high-throughput 96-well plate assay. *Pharmaceutical Biology*, 49: 492–500.
- BARREIRO C, MARTÍN JF, GARCÍA-ESTRADA C. 2012. Proteomics shows new faces for the old penicillin producer *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*: 1–15.
- BEKAI LH. 2010. Atividade antibiótica do fungo *Antrodia albida* (Fr.) Donk. cultivado em laboratório (Dissertação). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- BLACKWELL M. 2011. The fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98 (3): 426–438.
- BRASIL. 2012. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Em <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>. Acessado em 17/12/2012.

- BRIZUELA MA, GARCÍA L, PÉREZ L, MANSUR M. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología*, 15: 69–74.
- CANTO EL. 2010. Como os antibióticos combatem bactérias? *Em dia com as Ciências Naturais*, 9. Edição para professores. Ed. Moderna.
- DEACON JW. 2005. *Fungal Biology*. 4 ed. Blackwell Publishing, 384 p.
- DYAKOV MY, KAMZOLKINA OV, SHTAER OV, BSKO NA, POEDINOK NL, MIKHAILOVA OB, TIKHONOVA OV, TOLSTIKHINATE, VASILEVA BF, EFREMENKOVA OV. 2011. Morphological characteristics of natural strains of certain species of basidiomycetes and biological analysis of antimicrobial activity under submerged cultural conditions. *Microbiology*, 80 (2): 274–285
- FREIRE CG, CAMPOS RFF, OLIVEIRA LP. 2012. Levantamento de fungos ectomicorrízicos em floresta de *Pinus taeda* em Caçador – SC. *Ignis*, 1: 71–92.
- GAMEIRO PH, NASCIMENTO JS, RIBEIRO GA. 2004. Avaliação presuntiva da atividade antimicrobiana de *Pycnoporus sanguineus*. (XIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas).
- GIACHINI AJ. 1995. Levantamento de fungos ectomicorrízicos em plantações de *Pinus* e *Eucalyptus* em Santa Catarina (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- GRUBISHA LC, TRAPPE JM, MOLINA R, SPATAFORA JW. 2002. Biology of the ectomycorrhizal genus *Rhizopogon*. VI. Re-examination of infrageneric relationships inferred from phylogenetic analyses of ITS sequences. *Mycologia*, 94 (4): 607–619.
- GUERRERO RT, HOMRICH MH. 1983. Fungos macroscópicos do Rio Grande do Sul: Guia para identificação. Porto Alegre, Ed. da UFRGS.
- GYÖRFI J, GEÖSEL A, VETTER J. 2010. Mineral composition of different strains of edible medicinal mushroom *Agaricus subrufescens* Peck. *Journal of Medicinal Food*, 13 (6): 1510–1514.
- HAWKSWORTH DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105: 1422–1432.
- HIBBETT DS, BINDER M, BISCHOFF JF, BLACKWELL M, CANNON PF, ERIKSSON OE, HUHNDORF S, JAMES T, KIRK PM, LÜCKING R, LUMBSCH HT, LUTZONI F, MATHENY PB, MCLAUGHLIN DJ, POWELL MJ, REDHEAD S, SCHOCH CL, SPATAFORA JW, STALPERS JA, VILGALYS R, AIME MC, APTROOT A, BAUER R, BEGEROW D, BENNY GL, CASTLEBURY LA, CROUS PW, DAI YC, GAMS W, GEISER DM, GRIFFITH GW, GUEIDAN C, HAWKSWORTH DL, HESTMARK G, HOSAKA K, HUMBER RA, HYDE KD, IRONSIDE JE, KÕLJALG U, KURTZMAN CP, LARSSON KH, LICHTWARDT R, LONGCORE J, MIADLIKOWSKA J, MILLER A, MONCALVO JM, MOZLEY-STANDRIDGE S, OBERWINKLER F, PARMASTO E, REEB V, ROGERS JD, ROUX C, RYVARDEN L, SAMPAIO JP, SCHÜBLER A, SUGIYAMA J, THORN RG, TIBELL L, UNTEREINER WA, WALKER C, WANG Z, WEIR A, WEISS M, WHITE MM, WINKA K, YAO YJ, ZHANG N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111: 509–547.

- IRAWAN US. 2005. Effect of mancozeb 80% concentrations on the growth of *Cenococcum geophilum* Fr. under in vitro condition. *Biotropia*, 25: 22–28.
- LIMA MA. 2009. Potencial biotecnológico de basidiomicetos isolados no estado do Paraná. (Dissertação). Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- LIVERMORE DM. 2011. Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66: 1941–1944.
- LUCAS EH. 1957. Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other Holobasidiomycetes. *Antibiotic Chemotherapy*, 7: 1–4.
- MADIGAN MT, MARTINKO JM, PARKER J. 2004. Microbiologia de Brock. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall. 608 p.
- MARX DH. 1969. The influence of ectotrophicmycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59: 153–163.
- MICHELOT D, MELENDEZ-HOWELL LM. 2003. *Amanita muscaria*: chemistry, biology, toxicology and ethnomycology. *Mycological Research*, 107 (2): 131–146.
- ROBLES-HERNÁNDEZ L, GONZÁLEZ-FRANCO AC, SOTO-PARRA JM, MONTES-DOMÍNGUEZ F. 2008. Review of agricultural and medicinal applications of basidiomycete mushrooms. *Tecnociencia Chihuahua*, 2: 95–108.

- ROSA LH, MACHADO KMG, JACOB CC, CAPELARI M, ROSA CA, ZANI CL. 2003. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7): 967–974.
- SANDES ARR, DI BLASI G. 2000. Biodiversidade e diversidade química e genética. *Biotecnologia*, 13: 28–32.
- SANDVEN P. 2000. Epidemiology of canidemia. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 17: 73–81.
- SILVA RR, COELHO GD. 2006. Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas. Instituto de Botânica – Ibt, Jardim Botânico de São Paulo.
- SIMON N, MENEGUZZO A, CALGARO A. 2005. Sistema de produção de morango para mesa na região da Serra Gaúcha e encosta superior do Nordeste. *Embrapa Uva e Vinho, Sistema de Produção 6*, ISSN 1678-8761 (versão eletrônica).
- SMÂNIA A, MONACHE FD, SMÂNIA EFA, GIL ML, BENCHETRIT LC, CRUZ FS. 1995. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Journal of Ethnopharmacology*, 45: 177–181.
- SMÂNIA EFA, SMÂNIA A, LOGUERCIO-LEITE C, GIL ML. 1997. Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 70: 57–59.
- SOUZA AM, CARVALHO D, ROSADO SCS, SALES NLP. 2001. Caracterização morfológica e isoenzimática de isolados de *Pisolithus spp.* *Cerne*, 7: 22–34.

- SOUZA SM, MONACHE FD, SMANIA JR A. 2005. Antibacterial activity of coumarins. *Zeitschrift für Naturforschung*, 60: 693–700.
- SUAY I, ARENAL F, ASENSIO FJ, BASILIO A, CABELLO MA, DIEZ MT, GARCIA JB, GONZALEZ DEL VAL A, GORROCHATEGUI J, HERNANDEZ, P, PELAEZ F, VICENTE MF. 2000. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 129–139.
- TAKAHASHI JA, LUCAS EMF. 2008. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. *Química Nova*, 31 (7): 1807–1813.
- TORTORA GJ, FUNKE BR, CASE CL. 2012. *Microbiologia*. 10 ed. Porto Alegre: Artmed. 934 p.
- TRABULSI LR, ALTERTHUM F. 2008. *Microbiologia*. 5 ed. São Paulo: Atheneu. 760 p.
- VANDERLINDE DG, ONOFRE SB. 2010. Atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* (Linnaeus: Fries) Murrill. *Revista Saúde e Pesquisa*, 3 (1): 11–16.
- VALGAS C, SOUZA SM, SMÂNIA EFA, SMÂNIA, A. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 370–380.
- VOLK TJ. Tom Volks's fungus of the month for June 2003. Em [http://botit.botany.wisc.edu/toms\\_fungi/jun2003.html](http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/jun2003.html). Acesso em 31 janeiro 2013.
- WEBSTER J, WEBBER R. 2007. *Introduction to Fungi*. 3 ed. Cambridge University Press. 841 p.