

Mariana Cristina Zucchi

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ISOLADOS
DO GÊNERO *PISOLITHUS MICROCARPUS***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Admir José
Giachini

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zucchi, Mariana Cristina
ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ISOLADOS DO
GÊNERO PISOLITHUS MICROCARPUS / Mariana Cristina Zucchi ;
orientador, Admir José Giachini - Florianópolis, SC, 2016.
61 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Pisolithus. 3. Temperatura.
4. Elementos-traço. 5. metabólitos secundários. I. Giachini,
Admir José . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Mariana Cristina Zucchi
**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ISOLADOS
DO GÊNERO *PISOLITHUS MICROCARPUS***

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado em sua forma final para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Florianópolis, 02 de fevereiro de 2016.

Prof.^a Maria Risoleta Freire, Dr.^a
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Admir José Giachini, PhD. (Orientador)
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Rafael Dutra de Armas - membro
Depto. MIP/CCB/UFSC

Dr. Cláudio Roberto F. S. Soares - membro
Depto. MIP/CCB/UFSC

M.^a Ana Carolina B Mamede- membro
Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC

A minha mãe e meu irmão. Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por todas as oportunidades.

A minha mãe, pelo amor incondicional, pela educação, pelo apoio, pelos bons exemplos e pelo incentivo diário.

À meu irmão pela fiel amizade.

Ao meu orientador, prof. Admir, por toda a ajuda, confiança, amizade e aprendizado.

Aos colegas do Laboratório Microrganismos e Processos Biotecnológicos.

A minha grande amiga Carol, por toda a ajuda, pelos momentos de descontração.

Ao Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFSC.

Aos membros da Comissão Examinadora, pelas contribuições nesse trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela qualidade e pelas oportunidades e aos professores do Curso de Ciências Biológicas, pelo aprendizado que me foi proporcionado.

“Os sonhos precisam de persistência e coragem para serem realizados. Nós os regamos com nossos erros, fragilidades e dificuldades. Quando lutamos por eles, nem sempre as pessoas que nos rodeiam nos apoiam e nos compreendem. Às vezes somos obrigados a tomar atitudes solitárias, tendo como companheiros nossos próprios sonhos. Mas os sonhos, por serem verdadeiros projetos de vida, resgatam nosso prazer pela vida que representa a felicidade essencial que todos procuramos.” (Augusto Cury, 2004).

RESUMO

Fungos produzem uma ampla diversidade de metabólitos secundários que possuem significativo impacto na sociedade. Dentre os fungos, os basidiomicetos vêm sendo relatados como fontes promissoras de compostos bioativos e antimicrobianos. No presente trabalho, dois isolados fúngicos do gênero *Pisolithus microcarpus* coletados em duas áreas distintas (degradada pela exploração de carvão, região carbonífera de SC e não degradada em uma cidade do estado de MG) cultivados *in vitro* foram submetidos à estresse térmico e alteração na composição do meio de cultura contendo o elemento-traço Zn (zinco) e avaliados quanto à produção de compostos bioativos capazes de inibir o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas. Inicialmente os fungos foram cultivados em meio Merlin Norkrans Modificado (MNM) por 30 dias à 25 °C. Após o crescimento três discos com micélio jovem foram retirados das bordas das colônias e transferidos para placas de Petri que continham 25 mL de meio de cultura MNM. As placas foram novamente incubadas por 25 dias em três temperaturas: 25 °C, 30 °C e 37 °C para a verificação da influência da temperatura no crescimento em meio de cultura sólido. Para o cultivo em meio de cultura líquido cinco discos de micélio foram transferidos para frascos tipo Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL e cultivados nas três temperaturas. Em paralelo os isolados fúngicos foram cultivados em MNM líquido, acrescido de três concentrações de Zn (0,25; 0,50; 1,00 mmol L⁻¹) na forma de ZnSO₄·7H₂O. Após vinte e cinco dias de incubação dos isolados, para os que apresentaram crescimento, foram feitas as extrações metanólicas do micélio. O solvente foi evaporado utilizando evaporador rotatório e o extrato bruto resultante foi acondicionado em frascos de vidro. Nenhum dos isolados fúngicos apresentou crescimento nos cultivos com meio cultura MNM líquido, acrescido do Zn nas três concentrações testadas. Os ensaios de difusão em disco foram feitos utilizando os extratos metanólicos solubilizados com reagente dimetilsulfóxido (DMSO) em volume proporcional ao peso do extrato. A concentração testada para cada extrato utilizado foi de 0,1 mg/μL. Testes foram executados frente as duas estirpes bacterianas: *S. Aureus* (ATCC 6538P) e *E. Coli* (ATCC 8739). As placas foram incubadas à 37 °C por 24 h e a atividade antibacteriana foi observada pela formação de halos de inibição no entorno dos discos. Somente o isolado fúngico coletado na região carbonífera de Santa Catarina demonstrou atividade antibacteriana frente à *S. Aureus*, com formação de halos de 18 mm. Para o extrato do isolado UFSC- Pt 222 que apresentou atividade antibacteriana foram feitos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) determinada pelo método de microdiluição. Como resultados obtidos a partir do extrato bruto temos: (CIM) entre 33,3 mg/mL à 16,6 mg/mL para *S. Aureus* (ATCC 6538P) e 33,3 mg/mL para *E. Coli* (ATCC 8739). Esses resultados indicam que novos estudos devem ser realizados a fim de identificar e testar esses compostos visando potenciais aplicações biotecnológicas.

Palavras chave: *Pisolithus*, temperatura, elementos-traço, metabólitos secundários.

ABSTRACT

Fungi produce a wide variety of secondary metabolites that have significant impact on society. Basidiomycetes among fungi have been reported as promising sources of bioactive compounds and antibiotics. In the present work, two fungal isolates belonging to *Pisolithus microcarpus* were collected in two distinct areas (degraded by coal mining, in SC and no degraded) cultured in vitro, and subjected to thermal stress and changes in the composition of the culture medium containing the trace-element Zn (zinc). The isolates were assessed for the production of bioactive compounds capable of inhibiting growth of potentially pathogenic bacteria. Initially fungi were cultured in Merlin Norkrans Modified (MNM) medium for 30 days at 25 °C. Upon growth three discs were removed from young mycelium edges of colonies and transferred to Petri dishes containing 25 mL of MNM culture medium. Plates were incubated for 25 days at three different temperature: 25 °C, 30 °C and 37 °C to determine the influence of temperature on the growth of the fungi. For the cultivation in liquid media, five mycelial discs were transferred to 125 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of medium and cultured the temperatures cited above. In parallel fungal isolates were grown in liquid MNM plus three Zn concentrations (0,25, 0,50, 1,00 mmol L⁻¹) in the form of ZnSO₄.7H₂O. After twenty-five days of incubation grown isolates were subjected to made the methanolic extraction of the mycelium. The solvent evaporated using rotary evaporator and the resulting crude extract was packed in glass bottles. None of the fungal isolates grew in liquid medium added of Zn. The disk diffusion assays were done using the methanolic extracts solubilized with dimethyl sulfoxide (DMSO) in volume proportional weight of the extract. Concentration used for each extract was 0.1 mg/uL. Assays were performed against two bacterial strains: *S. Aureus* (ATCC 6538P) and *E. Coli* (ATCC 8739). Plates were incubated at 37 °C for 24 h and the antibacterial activity observed by the formation of inhibition zones around the disks. Only the isolates collected in the coal region of Santa Catarina shown antibacterial activity against *S. Aureus*, showing halos of 18 mm. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) test were performed for the extract that showed antibacterial activity, by the microdilutions method. The results obtained from the crude extract showed MIC between 33,3 mg/ml and 16,6 mg/ml: *S. Aureus* (ATCC 6538P) for *E. Coli* (ATCC 8739) 33,3 mg/ml. These results indicate that further studies should be conducted to identify and test these compounds targeting at potential biotechnological applications.

Keywords: *Pisolithus*, temperature, trace elements, secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto geral do crescimento do isolado de <i>P. Microcarpus</i> cultivado em meio de cultura MNM, mantidos à temperatura de 25 °C com 30 dias de cultivo.	32
Figura 2. Crescimento dos isolados de <i>P. Microcarpus</i> em meio de cultura MNM nas três temperaturas distintas.....	41
Figura 3. Ensaio de difusão em disco utilizando o extrato metanólico do isolado fúngico UFSC-Pt 222 <i>P. Microcarpus</i> com inibição do crescimento de <i>S. Aureus</i>	43
Figura 4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	46
Figura 5. Ensaio com técnica de diluição em microplacas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	47

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Critérios para a aceitação da atividade antimicrobiana de extratos brutos e plantas.....	45
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C. - Antes de Cristo

ATCC - American Type Culture Collection

BHI - Brain Heart Infusion

CIM - Concentração Inibitória Mínima

DMSO - Dimetilsulfóxido

EB - Extrato bruto

ESC - Extração supercrítica

µg - Microgramas

µL - Microlitros

mL - Mililitros

mm - Milímetros

MNM - Merlin-Norkrans Modificado

MH - Mueller-Hinton

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards

pH - Potencial hidrogeniônico

p.p.m - Partes por milhão

SARM - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

UFC - Unidades formadoras de colônia

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

Zn - Zinco

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	25
1.1	Interação dos fungos com elementos-traço	29
1.2	O gênero <i>Pisolithus</i>	30
2.	OBJETIVOS.....	33
2.1	Objetivo Geral.....	33
2.2	Objetivos Específicos	33
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1	Coleta e isolamento dos fungos.....	35
3.2	Cultivo dos isolados em meio sólido.....	35
3.3	Cultivo dos isolados em meio líquido	36
3.4	Cultivo dos isolados em meio líquido acrescido de Zn	36
3.5	TESTES DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	36
3.5.1	Preparo do inocúlo bacteriano	36
3.5.2	Preparação dos extratos	37
3.5.3	Testes de disco-difusão em ágar.....	37
3.5.4	Testes a partir da extração do caldo de cultivo.....	38
3.5.5	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	39
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Efeito da temperatura no cultivo dos isolados.....	41
4.2	Influência de zinco no crescimento de isolados de <i>Pisolithus</i>	42
4.3	Ensaio com extratos metanólicos.....	43
4.4	Influência da temperatura na atividade antibacteriana	44
4.5	Ensaio para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	45
5.	CONCLUSÕES.....	49
6.	REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos eucarióticos e heterotróficos que constituem um grupo com enorme diversidade. Se destacam pelo modo de nutrição absorvativa e com base em certas características que incluem aspectos morfológicos e fisiológicos, se tornam um grupo microbiano muito bem delimitado (BEKAI, 2010; LOGUERCIO-LEITE, 2006). São encontrados nos mais variados habitats como: solo, plantas, animais vivos e mortos, explorando inúmeros nichos ecológicos por todo o globo terrestre (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004; GALVAGNO & FORCHIASSIN, 2004).

A nutrição dos fungos demanda basicamente de nitrogênio, carbono e exoenzimas que são liberadas sobre o substrato onde se encontram. Porém, fósforo, cálcio, potássio, magnésio e elementos-traço que são elementos essenciais também são utilizados como fonte nutritiva por esses microrganismos (KIRK *et al.*, 2001). São aeróbios em sua maioria, apesar de alguns estarem envolvidos em processos fermentativos, sendo em alguns casos capazes de sobreviver em condições de anaerobiose (ALEXOPOULOS, 1996).

No Reino Fungi são reconhecidos três grupos distintos: fungos filamentosos, leveduras e cogumelos (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004; ARCHER *et al.*, 2008).

Segundo Taylor *et al.*, (2014) estima-se que os fungos possuem aproximadamente 10 milhões de espécies, das quais aproximadamente apenas 120 mil são conhecidas (BLACKWELL, 2011).

Estudos filogenéticos classificam os fungos em 7 filos e 10 subfilos. Os filos são: Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia, Ascomycota e Basidiomycota. O filo Ascomycota possui o maior número de fungos descritos, enquanto o filo Basidiomycota compreende os fungos evolutivamente mais diferenciados e a grande maioria dos cogumelos (BARREIRO *et al.*, 2012).

O filo Basidiomycota integra um número próximo de 30 mil espécies. Isso corresponde a praticamente 37% dos fungos ditos verdadeiros (KIRK *et al.*, 2001). Os basidiomicetos são fungos que apresentam corpos de frutificação, sendo conhecidos popularmente como cogumelos (TORTORA, *et al.*, 2009) A singularidade do filo consiste na presença de estruturas especializadas: o basidioma que dá forma característica aos organismos. O basidioma é o conjunto de hifas septadas entrelaçadas que caracteriza a formação dos micélios e da estrutura de reprodução sexuada, esta responsável pela produção dos esporos sexuais externos e os basidiósporos, que apresentam uma ampla diversidade e variam conforme a espécie. (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

De modo geral os fungos possuem um vasto número de contribuições tecnológicas. Em particular, os basidiomicetos, são conhecidos ao longo da história, seja por sua toxicidade, ou ainda por apresentarem grande importância econômica e social, como na indústria alimentícia e principalmente na indústria farmacêutica, entre outros usos. Constituem um grupo de fungos bem familiar que engloba desde espécies venenosas, fitopatogênicas, até comestíveis (RAVEN *et al.*, 2001).

Algumas espécies são responsáveis por efeitos desagradáveis que acarretam enormes prejuízos à agricultura, doenças em animais e no homem (AGRIOS, 2005).

Ecologicamente estes organismos desempenham papel de suma importância. Possuem hábitos sapróbios em sua grande maioria, obtendo energia necessária para viver a partir da decomposição de matéria orgânica (LOPES, 2011). São responsáveis pela decomposição em ecossistemas florestais (ALEXOPOULOS, 1996). Participando diretamente no processo de degradação de celulose e lignina (GOÉSNETO, 1994).

Os fungos podem ainda estabelecer relações simbióticas com outros organismos. Por exemplo, os líquens, associações simbióticas mutualísticas entre fungos (principalmente ascomicetos e basidiomicetos) e algas verdes ou cianobactérias, e as micorrizas, importante associação simbiótica entre fungos e raízes de plantas. Como resposta a essas associações simbióticas, metabólitos primários e secundários são produzidos pelos microrganismos (SCHARDL *et al.*, 2004).

Diversos são os compostos naturais que apresentam atividades biológicas oriundas do metabolismo fúngico. Os metabólitos primários são pequenas moléculas tais como: aminoácidos, açúcares, álcoois, ácidos orgânicos e vitaminas, estes geralmente sintetizados durante a fase de crescimento vegetativo. Eles desempenham função estrutural, plástica, disponibilizando assim energia juntamente com os precursores químicos indispensáveis, viabilizando então o crescimento e reprodução (LOPES, 2011). Ao contrário dos metabólitos primários, metabólitos secundários não estão envolvidos no crescimento celular e desenvolvimento do organismo. A sua síntese ocorre na fase final do crescimento, bem próximo à fase estacionária (LOPES, 2011). Os fungos possuem ainda como característica marcante a diversidade nas suas rotas metabólicas, o que torna estes microrganismos uma valiosa fonte de compostos biativos (EL, ENSHASYA, 2007).

No ano de 1891 botânicos e fisiologistas vegetais usaram pela primeira vez o termo “metabólitos secundários” na tentativa de classificar compostos (corantes, fragrâncias), que pareciam não ter função nenhuma para as plantas (BU’LOCK, 1961). Ainda, segundo Bu’lock, no início dos

anos 60, microbiologistas adotaram o termo para caracterizar metabólitos microbianos oriundos da diferenciação bioquímica de um organismo e não essenciais para o metabolismo basal da célula. Metabólitos secundários são sintetizados quando o crescimento microbiano está na fase estacionária, e são frequentemente bioativos.

Portanto, uma fonte promissora para novos medicamentos devido às atividades antibióticas e com grande importância farmacêutica, sendo que poucos metabólitos secundários de sucesso não apresentam atividade antibiótica. Aproximadamente um terço das drogas mais vendidas no mundo são produtos naturais ou derivados destes (DEMAIN, 1999; SHWAB & KELLER, 2008).

Usualmente, os metabólitos secundários se encontram separados em cinco grupos: peptídeos não ribossomais, policetídeos, derivados de aminoácidos, derivados de ácidos graxos e híbridos de policetídeos-peptídeos (KEMPKEN & ROHLFS, 2010; ROZE *et al.*, 2011).

Plantas, fungos, bactérias, protozoários, insetos e animais produzem metabólitos secundários em resposta aos estímulos externos. Estes variam desde alterações nutricionais, até mudanças nas condições do ambiente como luminosidade, temperatura, pH, infecções e também competição (BEKAI, 2010). Como o metabolismo secundário demanda uma grande quantidade de energia, é provável que os fungos sejam capazes de ativar a produção de alguns metabólitos de interesse, apenas quando isso se torna uma vantagem. Dessa forma, a produção dos metabólitos secundários é coordenada, em geral, pelo desenvolvimento do fungo em certas condições ambientais, ou seja, é vantajoso para o fungo produzir certos metabólitos secundários apenas em estágios apropriados do seu desenvolvimento (LIMA, 2009; SHWAB & KELLER, 2008; 2006; YU & KELLER, 2005).

Especificamente, esses compostos em condições ambientais apresentam diversidade na estrutura química, variação de forma, transformação e concentração, atribuindo assim vantagens seletivas aos microrganismos produtores (CARVALHO, 2007). Entretanto, muitos desses metabólitos apresentam efeitos tóxicos ou inibitórios em outros organismos (KHALDI *et al.*, 2010).

Os primeiros relatos do uso de fungos como antimicrobianos são de 3.000 a.C, quando chineses usavam sapatos mofados para a cura de ferimentos infeccionados em seus pés. O primeiro metabólito fúngico com eficácia comprovada foi a penicilina, substância isolada de *Penicillium notatum* (atualmente denominado *Penicillium chrysogenum*) descoberta acidentalmente pelo cientista britânico, Alexander Fleming em 1928, após ter sua cultura de *Staphylococcus aureus* contaminada com o bolor, o qual

apresentou capacidade de inibição do crescimento bacteriano (TAKAHASHI & LUCAS, 2008).

Porém, somente na década de 1940, graças ao trabalho dos pesquisadores ingleses Florey e Chain, a apreciação científica da importância do uso dos metabólitos fúngicos apresentou notória expansão, devido ao massivo impacto que a penicilina causou à saúde humana, quando o índice de mortalidade dos soldados foi de 39% durante a Primeira Guerra Mundial e sofreu redução para apenas 3,9%, na Segunda Guerra (LOPES, 2011, TAKAHASHI & LUCAS, 2008).

Anchel, Hervey e Wilkins, em 1941, investigaram pela primeira vez o potencial antimicrobiano dos basidiomicetos examinando os extratos obtidos do corpo de frutificação e do micélio de mais de duas mil espécies (SANDVEN, 2000). Como resultado obtiveram o isolamento e procederam à identificação da pleuromutilina, composto extraído do fungo *Pleorotus mutilis*, um diterpeno usado no tratamento de infecções causadas por micoplasmas em animais (BRIZUELA *et al.*, 1998); Este foi, portanto, o primeiro antibiótico comercializado obtido a partir de basidiomicetos (WILKINS, 1946; KAVANAGH, HERVEY & ROBBINS, 1952; BENEDICT & BRADY, 1972; KUPKA, ANKE & OBERWINKLER, 1979; IINUMA *et al.*, 1983; SMÂNIA *et al.*, 1995; SANDVEN, 2000; ROSA *et al.*, 2003).

Ainda em 1946, novos estudos levaram ao isolamento e identificação de mais um composto bioativo, a poliporina originária do fungo *Pycnoporus sanguineus*. Esse composto mostrou-se eficaz contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. Estudos posteriores realizados por (SMÂNIA *et al.*, 1995, 1997) utilizando o fungo *Pycnoporus sanguineus*, comprovaram que a cinabarina, outro composto bioativo isolado daquele fungo e com pigmentação alaranjada, é ativo contra diversos microrganismos sendo mais efetivo contra bactérias Gram-positivas.

Em estudos realizados por Rosa *et al.*, (2003) cento e três basidiomicetos originários do estado de Minas Gerais foram isolados e tiveram a sua atividade antimicrobiana testada. Foram testados os extratos orgânicos obtidos do corpo de frutificação e do caldo de cultivo, extraídos com etanol e acetato de etila, respectivamente. A atividade antimicrobiana foi detectada em 14% dos extratos testados, sendo que esses extratos apresentaram atividade antimicrobiana considerável contra um ou mais microrganismos, formando halos de inibição maiores que 12 mm de diâmetro. Porém, apenas dois destes extratos apresentaram um amplo espectro de ação, sendo efetivos contra fungos e bactérias.

A parede celular fúngica é alvo de diversos estudos e as propriedades imunomodulatórias das glucanas constituintes da parede

celular são bem conhecidas. Entretanto, ainda são poucos os pesquisadores de que muitos dos metabólitos secundários, secretados extracelularmente pelo micélio, podem combater bactérias (STAMETS, 2002; KUPRA *et al.*, 1979; BENEDICT & BRADY, 1972) e vírus (BRANDT & PIRAINO, 2000; SUZUKI *et al.*, 1990). Além disso, esses metabólitos extracelulares já se mostraram ativos contra protozoários, como o agente causador da malária *Plasmodium falciparum* (ISAKA *et al.*, 2001; KITTAKOOP *et al.*, 1999; LOVY *et al.*, 1999), dentre outros microrganismos (ORDÓNEZ *et al.*, 2006; WANG e NG, 2006; ZIEGENBEIN *et al.*, 2006; ROSA *et al.*, 2003).

Além dos metabólitos excretados extracelularmente, outras moléculas produzidas por basidiomicetos, como os polissacarídeos constituintes da parede celular, apresentam atividade antimicrobiana, aumentando a eficiência dos cogumelos para os propósitos medicinais (WASSER & WEIS, 1999). Alguns cogumelos e seus metabólitos podem apresentar propriedades antibióticas altamente específicas, enquanto outros têm efeitos mais amplos. Com o aumento do número de bactérias desenvolvendo resistência aos antibióticos comerciais, como as MRSA (*Staphylococcus aureus metilina-resistentes*) e *Pseudomonas*, extratos e derivados de cogumelos representam uma grande promessa para elaboração de novos medicamentos (STAMETS, 2002).

O fato de que os basidiomicetos têm sido insuficientemente estudados, juntamente com a vasta gama de tipos estruturais de antibióticos obtidos a partir deles, sugerem que os basidiomicetos podem ser uma fonte de novos compostos bioativos com diferentes espectros antimicrobianos (GETHA *et al.*, 2009; ANKE, 1989). Portanto, a descoberta de novos compostos bioativos microbianos é um desafio que pode trazer benefícios substanciais e os tornar uma fonte promissora neste campo de investigação (DYAKOV *et al.*, 2011). De acordo com Gloer, (2007) a literatura apresenta evidências diretas e indiretas sobre diversos grupos taxonômicos e ecológicos de fungos com potencial nessa área, que ainda não foram explorados de maneira sistemática para a busca desses metabólitos secundários.

1.1 Interação dos fungos com elementos-traço

No ambiente, os elementos-traço ocorrem de forma natural no solo, rochas, plantas e se apresentam nas mais diversas formas, como vapores, íons dissolvidos em água, como sais ou minerais no solo e na areia (DEMIRBAS, 2001).

Elementos-traço têm importância fundamental ao metabolismo microbiano e humano, apesar de muitos não apresentarem nenhuma função metabólica conhecida. Porém todos os elementos-traço, mesmo em concentrações mínimas, podem ser tóxicos, ainda que os efeitos dessa toxicidade sejam totalmente dependentes da especificidade de cada microrganismo (MELO; AZEVEDO, 2008).

Impactos antropogênicos ocorridos desde a época da Revolução Industrial, são responsáveis pela liberação de elementos-traço no ambiente, e a liberação se deve principalmente, pela disposição de resíduos industriais, urbanos, atividades mineradoras, beneficiamento de metais, aplicação de fertilizantes e defensivos agrícolas, águas residuais, efluentes de esgotos industriais e/ou urbanos (PARAMESWARI *et al.*, 2010; DIAS, 2013).

Os fungos que formam ectomicorrizas, em prevalência são os basidiomicetos, em solos com excesso de elementos-traço e em simbiose com as raízes das plantas, aumentam consideravelmente a absorção dos nutrientes, podendo então imobilizá-los, reduzindo a translocação destes para a parte aérea da planta, atribuindo assim à planta tolerância aos elementos-traço. De acordo com Voleski e Holan, (1995) cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu) e zinco (Zn) são uns dos principais elementos-traço e muito tóxicos em baixas concentrações, sendo que, sua liberação e acumulação no solo aumenta continuamente.

Segundo Grazioti *et al.*, (2001) fungos ectomicorrízicos podem apresentar variações intra e interespecíficas e ecodaptação a inúmeros fatores abióticos como por exemplo, excesso de elementos-traço. Uma vez em contato com elementos-traço os fungos estão expostos a uma situação de estresse, podendo desencadear a produção de substâncias bioativas para auxiliar na sobrevivência em meio à hostilidade do ambiente.

1.2 O gênero *Pisolithus*

Integrantes do gênero *Pisolithus* são encontrados na forma gasteróide. São cosmopolitas, podendo ser encontrados nos mais diversos habitats, desde regiões temperadas até regiões tropicais (MARX *et al.*, 1977). O gênero pertence ao filo Basidiomycota, classe Basidiomycetes, ordem Boletales, família Pisolithaceae (CATOLOGUE OF LIFE, 2007). As espécies do gênero *Pisolithus* Alb. & Schwein são reconhecidas como ectomicorrízicas, comumente em simbiose com representantes de Gimnospermas e Angiospermas, podendo também formar associações com outras espécies de plantas (SINGLA *et al.*, 2004).

Esta simbiose consiste na troca de energia obtida através do processo de fotossíntese, no qual o fungo transfere para a planta nutrientes

absorvidos do solo e a planta por sua vez, fornece ao fungo compostos fotossintetizados (MAMEDE, 2015).

Das características morfológicas do fungo *Pisolithus* cabe destacar: o píleo, varia de globoso a piriforme com diâmetro entre 2,4 e 8 cm. Possui pseudoestipe extenso e robusto podendo atingir até 7,7 cm de comprimento e 3,1 cm de espessura. Quando jovem, o perídio apresenta colorações variáveis desde palha até negro fosco, todavia na maturidade se degrada e a coloração varia desde verde oliváceo, limão cremado, até negro (GIACHINI, 1995). No cultivo *in vitro*, apresenta crescimento lento, micélio com coloração que varia de amarelo escuro à marrom claro e com aspecto cottonoso (Figura 1).

Alguns estudos têm relatado que os metabólitos secundários produzidos por fungos desse gênero possuem propriedades antibacterianas e antifúngicas, sendo responsáveis pela proteção da raiz e do fungo contra patógenos. Os metabólitos secundários são produzidos como resposta à estímulos externos que vão desde alterações na temperatura, pH até efeitos tóxicos de elementos-traço e outros contaminantes do solo (CAMPOS *et al.*, 2008).

Embora os estudos da atividade antimicrobiana deste fungo sejam escassos, Ameri e colaboradores (2011), relataram a atividade antimicrobiana de isolados do gênero *Pisolithus* contra algumas bactérias Gram positivas e Gram negativas, usando o método de difusão de extratos. E Mamede (2012) em estudo utilizando extratos de espécies do mesmo gênero, porém coletadas em regiões de extração de carvão no estado de Santa Catarina, verificou o efeito atenuador do fungo frente à *Staphylococcus aureus*.

Outros fatores como, altitude, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, poluição atmosférica e ataque de patógenos exercem influência direta sobre a produção de metabólitos secundários, uma vez que protegem os organismos produtores desses metabólitos contra a hostilidade do ambiente (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Portanto, habitar ambientes extremos pode condicionar certas espécies de organismos vivos a produzir componentes tipicamente sintetizados durante o metabolismo secundário, estes que servirão como protetores contra as adversidades sofridas por esses organismos.



Figura 1- Aspecto geral do crescimento de um isolado de *P. Microcarpus* cultivado em meio de cultura MNM, mantidos à temperatura de 25 ° C com 30 dias de cultivo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antibacteriano de isolados do gênero *Pisolithus microcarpus* cultivados *in vitro*, submetido à estresse térmico e a distintas concentrações de Zinco (Zn).

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento do fungo em três temperaturas distintas;
- Determinar se o potencial antibacteriano tem relação com as temperaturas de crescimento;
- Avaliar o crescimento do fungo exposto à diferentes concentrações do elemento traço Zn;
- Testar a atividade antibacteriana dos extratos fúngicos frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos que apresentarem atividade antimicrobiana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Diversidade Microbiana, situado no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.1 Coleta e isolamento dos fungos

Neste trabalho foram utilizados dois isolados do gênero *Pisolithus microcarpus*, pertencentes à coleção de fungos do Laboratório de Diversidade Microbiana, da Universidade Federal de Santa Catarina. Os exemplares dos fungos, denominados UFSC-Pt 222 e UFSC-Pt D17 foram coletados em duas regiões distintas: Boca do Dragão, localizada no município de Lauro Müller, Sul de Santa Catarina (28° 23' 43.40'' S; 49° 27' 57.01'' W), conhecida pelo fato de ser uma área impactada pela mineração de carvão e no município de Diamantina, Minas Gerais (17° 59' 23.40'' S; 43° 25' 34.10''), área isenta de impacto sofrido por qualquer atividade de mineração, respectivamente.

Para o isolamento foi seguida a metodologia descrita por (Marx, 1977).

3.2 Cultivo dos isolados em meio sólido

Os isolados foram cultivados em meio de cultura Merlin Norkrans Modificado (MNM), com a seguinte composição: C6H12O6 (10 g/L), extrato de malte (3 g/L), (NH₄)₂HPO₄ (0,25 g/L), KH₂PO₄ (0,5 g/L), CaCl₂.2H₂O (0,05 g/L), NaCl (0,025 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,15 g/L), FeCl₃ (1%) (1,2 mL/L), Tiamina – HCl (100 µg/L), agar-agar (15 g/L), água destilada (para 1000 mL), com pH ajustado para 5.8±0.1 (Marx, 1969) e mantidos a temperatura de 25 °C durante 30 dias, previamente ao uso.

Após o crescimento, os isolados foram repicados e três discos com micélio jovem foram retirados das bordas das colônias e transferidos para placas de Petri com meio MNM. As placas foram novamente incubadas por mais 25 dias em três temperaturas distintas: 25 °C, 30 °C e 37 °C com três repetições para cada temperatura.

3.3 Cultivo dos isolados em meio líquido

Os isolados foram cultivados em meio de cultura Melin-Norkrans Modificado- MNM líquido (Marx, 1969) e mantidos à temperatura de 25 °C durante 30 dias. Após o crescimento os isolados foram repicados. Cinco discos de micélio de aproximadamente 7mm de diâmetro transferidos para frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio MNM líquido. Os frascos foram incubados por mais 25 dias em três temperaturas diferentes: 25 °C, 30 °C e 37 °C, todos executados em triplicata.

3.4 Cultivo dos isolados em meio líquido acrescido de Zn

Para o preparo desse ensaio utilizou-se meio de cultura Melin-Norkrans Modificado- MNM líquido (Marx, 1969), acrescido de três concentrações de Zn (zinco) 0,25; 0,50; 1,00 mmol L⁻¹ em forma de ZnSO₄·7H₂O. O composto fosfato de amônio dibásico (NH₄)₂HPO₄ foi retirado do meio para evitar a precipitação do Zn no meio de cultura líquido, uma adaptação proposta por Graziotti *et al* (2001). A concentração de KH₂PO₄ (fosfato de potássio monobásico) foi ajustada para 750 mg L⁻¹ e o pH para 4,7. Dos isolados de *Pisolithus microcarpus* mantidos à temperatura de 25 °C durante 25 dias, cinco discos com aproximadamente 7 mm de diâmetro foram retirados do micélio jovem e tranferidos para frascos tipo Erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL do meio de cultura contendo Zn. Os frascos foram incubados por mais 25 dias e mantidos a temperatura de 25°C. Os ensaios foram feitos em duplicata.

3.5 TESTES DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

3.5.1 Preparo do inocúlo bacteriano

Os testes para a avaliação da atividade antimicrobiana foram feitos utilizando cepas das bactérias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) uma bactéria Gram-positiva e *Escherichia coli* (ATCC 8739) uma bactéria Gram-negativa. Os microrganismos foram cedidos pelo Laboratório de Antibióticos, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

As culturas bacterianas foram mantidas em meio de cultura ágar nutriente a 4 °C. Após o crescimento, foi utilizado caldo de infusão de cérebro e coração BHI (*Brain heart infusion*) para o preparo do inóculo. De cada cultura-estoque foram retirados 300 µL e transferidos para 3 mL de caldo BHI. Logo após os inóculos foram incubados por 24 h a 37 °C.

Transcorridas 8 h de incubação, foi verificada a pureza das culturas bacterianas, procedendo a semeadura de sub amostras de bactérias em placas de ágar sangue.

Uma vez confirmada a pureza das culturas, inóculos bacterianos foram preparados a partir de uma cultura crescida por 24 h à 37 °C em placa de Petri com ágar Mueller-Hinton. Colônias foram selecionadas e transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução salina estéril 0,85%. Com auxílio de alça de platina, as suspensões foram agitadas até atingir a uniformidade e ajustadas, com turbidez padronizada ao tubo 0,5 da Escala de McFarland, concentração correspondente a 10⁸ UFC/mL (JOHANN, 2003; SOUZA *et al.*, 2005).

3.5.2 Preparação dos extratos

Após o crescimento dos fungos como descrito nos itens 3.2 e 3.3, foram realizadas as extrações. O conteúdo dos frascos de cultivo foi filtrado e o conteúdo das placas (meio de cultura e micélio) transferidos individualmente para frascos de vidro tipo conserva com tampa e previamente esterelizados (capacidade 500 mL). Após a adição de metanol (aproximadamente 150 mL), os frascos permaneceram em repouso por três dias à temperatura ambiente. Posteriormente, o conteúdo de cada frasco foi transferido para balão volumétrico e evaporado em evaporador rotatório, modelo Rotavapor® R-100 (BUCHI).

O procedimento consiste na evaporação total do solvente restando apenas o material aderido ao fundo do balão. O material foi raspado com espátula, armazenado em frascos de vidro e, pesado em balança de precisão.

3.5.3 Testes de disco-difusão em ágar

Com a finalidade de determinar a atividade antibacteriana dos isolados fúngicos, foram realizados testes de difusão em ágar utilizando discos.

No método por difusão a amostra é depositada em contato com o meio sólido inoculado com o microrganismo-teste, e a verificação da atividade antimicrobiana é feita pela medição do halo de inibição, quando este estiver presente (ARESI, 2011).

O método de difusão é considerado um ensaio qualitativo, uma vez que permite detectar a presença ou ausência de compostos com atividade antimicrobiana (ARESI, 2011; OSTROSKY *et al.*, 2008; VALGAS *et al.*, 2007).

Para tal, as bactérias-teste (Gram positivas e Gram negativas) foram cultivadas *overnight* e, posteriormente, diluídas para uma concentração próxima de 10^8 UFC/mL. Após a homogeneização do inóculo, uma alíquota da suspensão bacteriana diluída foi espalhada na superfície do meio de cultura MH (Mueller-Hinton) com o auxílio de hastes de (*swabs*) esterilizados (SMÂNIA *et al.*, 1997). As placas foram então incubadas por 24h à 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), em condições aeróbias. A confirmação da atividade antibacteriana se dá pela mensuração do halo de inibição na placa, quando houver, o qual deve conter, no mínimo, 9 mm de diâmetro (SMÂNIA *et al.*, 1997).

3.5.4 Testes a partir da extração do caldo de cultivo

Para os testes de extração a partir do caldo de cultivo, cinco discos de micélio fúngico foram inoculados em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio MNM (Melin-Norkrans Modificado- líquido) e cultivados em três temperaturas (25°C , 30°C e 37°C) por cerca de três semanas. Para cada isolado, foram realizados cultivos em triplicata.

O micélio produzido foi coletado e separado do meio líquido via peneiramento pelo do uso de papel filtro. O extrato utilizado foi preparado conforme descrito no item 3.5.2.

O método de Kirby-Bauer, conhecido como método de difusão em disco (NCCLS, 2003) foi usado para determinar a produção de substâncias antibacterianas (BAUER *et al.*, 1966). Para a solubilização dos extratos foi utilizado o reagente dimetilsulfóxido (DMSO) em volume proporcional ao peso do extrato, sendo que para cada 10 mg de extrato foram utilizados 100 μL de DMSO. Dessa maneira a concentração para cada extrato utilizado foi de 0,1 mg/ μL . Após homogeneização, 20 μL do volume total foram aplicados sobre os discos de papel com 7 mm de diâmetro previamente esterilizados.

Para avaliar a sensibilidade das cepas bacterianas foram utilizados discos de antibiótico de referência para as duas bactérias (Estreptomicina), como controle positivo. Os cultivos bacterianos para os ensaios, foram executados nas mesmas condições descritas anteriormente. As bactérias teste foram diluídas em solução fisiológica a 0,85% até que atingissem uma concentração próxima a 10^8 UFC/mL. Nas Placas de Petri, contendo meio de cultura MH (Mueller-Hinton), foi depositado o inóculo bacteriano com o auxílio de um *Swab* conforme descrito no item 3.5.1. Um disco estéril do antibiótico foi depositado no centro da placa e os discos impregnados com os extratos a serem testados foram distribuídos em pontos equidistantes sobre o ágar; Com o auxílio de uma pinça estéril, todos os discos foram pressionados

suavemente para o contato total com a superfície do ágar. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas (BARATTO *et al.*, 2008; ARESI, 2011). Os testes foram executados em duplicata.

A confirmação da atividade antibacteriana foi determinada 18 horas após a incubação, pela observação das placas e medição dos halos de inibição produzidos. O tamanho dos halos foi comparado com os da tabela aprovada internacionalmente pela NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003).

3.5.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Inicialmente, para a solubilização dos extratos foi utilizado o reagente dimetilsulfóxido (DMSO) em volume proporcional ao peso do extrato, sendo que para cada 10 mg de extrato foram utilizados 100 µL de DMSO. Desse modo, a concentração de cada extrato utilizado foi de 0,1 mg/µL. A seguir na microplaca de 96 poços foram distribuídos caldo de cultivo MH (Mueller-Hinton). Na linha A da placa foram adicionados 200 µL do caldo mais 100 µL do extrato a ser analisado. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas e de maneira decrescente, transferindo-se 100 µL da linha A para a linha B, e assim sucessivamente até alcançar a linha E, totalizando cinco concentrações analisadas. O planejamento partiu de 33,3 mg/mL, 16,6 mg/mL, 8,3 mg/mL, 4,1 mg/mL, e 2,0 mg/mL de extrato. A linha F da placa foi utilizada como controle positivo (meio de cultura), sendo as colunas de 1-4 destinadas ao controle positivo, referente a bactéria Gram positiva *S. Aureus* (ATCC 6538P) e as colunas 5-8 à bactéria Gram negativa *E. Coli* (ATCC 8739). A linha G foi utilizada como controle negativo recebendo apenas o reagente dimetilsulfóxido (DMSO). O inóculo bacteriano foi preparado de acordo com o item 3.5.1. Nos poços 3 e 4, de A até G, foram adicionados 10 µL do inóculo e ainda nos poços 7 e 8, de A até G, também foram adicionados 10 µL do inóculo, exceto nos controles. O teste para determinação da CIM foi realizado em duplicata e a placa incubada por 24 h a 37 °C.

A leitura do experimento foi realizada através de densidade óptica (DO), com o uso de leitora de microplacas. A CIM foi considerada a menor concentração de extrato que inibiu o crescimento bacteriano, resultados estes expressos em mg/mL.

Para confirmação da viabilidade do teste frente as bactérias, dos poços que continham os inóculos, alíquotas de 10 µL foram plaqueadas com auxílio de alça de Drigalski em meio de cultura Mueller-Hinton e incubadas por 24 h à 37 °C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito da temperatura no cultivo dos isolados

Na figura 2 pode-se observar que os dois isolados fúngicos seguiram um padrão de crescimento, porém apresentando diferenças no desenvolvimento, forma e coloração do micélio. Na temperatura de 30 °C para o exemplar UFSC-Pt 222 foi possível observar um pequeno aumento no crescimento miceliano, e discreta mudança na coloração, o crescimento se manteve à 37 °C, porém nota-se que a coloração sofreu alteração. No exemplar UFSC- Pt D17 o crescimento foi maior em 25 °C, preenchendo por completo a placa. A 30 °C o crescimento apresentou pequena diminuição. A 37 °C apresentou diminuição no crescimento do micélio e a coloração foi ficando mais escura com o aumento das temperaturas.



Figura 2- Crescimento dos dois isolados de *Pisolithus microcarpus* em meio de cultura MNM nas três temperaturas distintas. Imagem representada em (a) refere-se ao isolado UFSC- Pt 222 cultivado nas três temperaturas 25 °C, 30 °C e 37v°C. Imagem representada em (b) refere-se ao isolado UFSC Pt- D17 também cultivado nas três temperaturas, respectivamente.

O efeito inibidor da temperatura sobre o crescimento de fungos é bastante variável e tem um melhor desenvolvimento entre 20 °C e 25 °C. Porém, somente algumas espécies são capazes de se desenvolver em temperaturas mais elevadas (BENATO *et al.*, 2001).

De acordo com Lee *et al.*, (2004) a temperatura é um dos principais fatores que pode influenciar na produção de compostos bioativos, sendo que

as temperaturas ótimas para a produção de metabólitos têm sido mais baixas do que aquelas para crescimento miceliano.

4.2 Influência de zinco no crescimento de isolados de *Pisolithus*.

Não houve diferença no crescimento dos isolados fúngicos testados, cultivados em meio MNM líquido em frascos tipo Erlenmeyer incubados por 25 dias à temperatura de 25 °C, com a adição de Zn (0,25; 0,50; 1,00 mmol L⁻¹).

De acordo com Levinskaite, (2001) o Zn é conhecido por favorecer o crescimento e desenvolvimento de fungos.

Em estudo desenvolvido por Dias (2013) foram observados efeitos positivos, a presença de contaminantes no substrato de cultivo de *Pleurotus* contendo inclusive, Zn. Esse elemento-traço também é um micronutriente que é absorvido e exigido pelo fungo em baixas concentrações, além de ser utilizado no metabolismo do fungo.

Fungos apresentam limites de tolerância distintos no que diz respeito a presença de elementos-traço. A tolerância depende da espécie do fungo, sua capacidade de adaptação, tipo e concentração do elemento-traço (HAMAD *et al.*, 2005).

Os fungos micorrízicos têm capacidade de reduzir a biodisponibilidade de elementos-traço, devido a mecanismos de complexação, compartimentalização, quelação e volatilização (KHAN *et al.*, 2000; CUNNING *et al.*, 2001; FOMINNA *et al.*, 2006; BELLION *et al.*, 2006). Os elementos-traço, uma vez retidos no micélio fúngico, ficam imobilizados e não são translocados para a parte aérea da planta (AGGANGAN *et al.*, 1998; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; STEFFEN *et al.*, 2011).

Algumas pesquisas têm evidenciado que a contaminação por elementos-traço pode limitar o desenvolvimento e até mesmo inibir o crescimento de isolados fúngicos (GRAZIOTTI *et al.*, 2001; GRAZIOTTI *et al.*, 2003). Os mesmos autores em estudo sobre os efeitos dos elementos-traço em isolados de *Pisolithus tinctorius*, relatam que concentrações de 2,71 mmol L⁻¹ de Zn inibiram o crescimento fúngico em até 50%.

Também observaram que a tolerância à elementos-traço não depende exclusivamente do tipo do elemento-traço utilizado, mas também do isolado fúngico.

Segundo Marcante *et al.*, (2014) o cultivo em meio líquido contendo Zn induz à uma considerável inibição do crescimento e relata que para *Agaricus subrufescens* ocorreu inibição aparente de crescimento com a adição de apenas 2,5 mg/mL⁻¹ de Zn, reduzindo a produção de biomassa em

76,8%. Em concentrações acima de $7,5 \text{ mg/mL}^{-1}$ de Zn o crescimento miceliano foi totalmente inibido.

A divergência de resultados encontrados na literatura a respeito das concentrações de elementos-traço responsáveis pela limitação e até total inibição do crescimento dos fungos, sejam eles em meios de cultura ou até mesmo no solo são questionáveis. Para especificar concentrações de elementos-traço que causariam toxidez aos fungos, muitos estudos são necessários, sendo que a realização de calibrações para cada espécie ou isolado fúngico é necessária.

4.3 Ensaios com extratos metanólicos

Os extratos metanólicos dos isolados UFSC-Pt 222 e UFSC-Pt D17, foram utilizados nos ensaios de disco difusão em ágar para verificação da atividade antibacteriana frente às cepas bacterianas selecionadas. O isolado UFSC-Pt 222 promoveu a inibição do crescimento da bactéria *S. Aureus* apresentando halos de inibição com 17 mm de diâmetro. O isolado denominado UFSC-Pt D17 não apresentou atividade antimicrobiana durante a realização dos testes de disco difusão em ágar.

Na figura 4 podem ser observados os halos de inibição do crescimento de *S. Aureus* usando extrato metanólico do isolado fúngico UFSC-Pt 222.



Figura 3- Ensaio de difusão em disco utilizando o extrato metanólico do isolado fúngico UFSC-Pt 222 *P. Microcarpus* com inibição do crescimento de *S. Aureus* halo 4. O halo central refere-se ao controle positivo. Os demais discos referem-se aos extratos que não apresentaram atividade, onde: (8 – D17, 12 – UFSC-Pt 222 (extrato do micélio), 27 – UFSC-Pt 222 (extrato do meio de cultura), 17 – D5 e Balão – D5 extrato do micélio).

Estudos realizados por Mamede (2015), indicaram que a espécie *P. Microcarpus* apresentou atividade antimicrobiana com formação de halos de inibição de aproximadamente 18 mm de diâmetro frente a *S. Aureus* e 17 mm de diâmetro frente a *P. Aeruginosa*.

Então, a presença dos halos de inibição nos testes indica que o isolado produziu compostos que agiram de maneira positiva no controle do crescimento das cepas bacterianas. Resultado este, pode ser justificado pelo fato de o isolado UFSC- Pt 222 ter sido coletado em um solo com a presença de diferentes tipos de elementos-traço com concentrações variadas, como é o caso da região carbonífera de Santa Catarina. Outra explicação inclui o fato do organismo estar sujeito a condições ambientais distintas que incitem a produção dos compostos antibacterianos, como temperaturas médias anuais menores, maior exposição solar, seca etc. (STOCKER & WORGOTTER, 2001). Porém, é importante ressaltar que o tamanho dos halos não depende somente da concentração e intensidade de ação dos extratos contra as bactérias patogênicas, mas também seu peso molecular e outras características, responsáveis pela dispersão na placa de Petri. Por conta disso, estudos complementares são necessários (OLIVEIRA, 2014).

4.4 Influência da temperatura na atividade antibacteriana

Os extratos obtidos do caldo de cultivo em três temperaturas distintas não apresentaram atividade antibacteriana em experimentos sucessivos com difusão em disco.

Porém, durante o desenvolvimento do estudo os extratos testados apresentaram uma liberação considerável de metabólitos secundários, difundidos no ágar na forma de pigmentos. Essa evidência pode de certa maneira indicar uma reação do fungo na presença do microrganismo.

Entretanto, somente a liberação destes pigmentos durante a realização dos testes de difusão em disco não confirma a produção de substâncias antimicrobianas.

Smânia *et al.*, (1997) relatam que extratos de *P. Sanguíneos* cultivados em temperatura de 25 °C, acompanhados da presença de luz, incitaram a produção de cibarina no cultivo *in vitro*.

Ameri e colaboradores (2011), durante trabalho realizado com extratos de *P. Albus* relatam a eficiência dos extratos em testes de difusão em disco frente a *S. Aureus* resistente à meticilina (SARM). Esse resultado corrobora o com estudo de Mamede, (2012) que relatou halos de inibição frente ao crescimento de *S. Aureus* usando o teste de difusão em disco.

4.5 Ensaios para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo, usando microplacas (96 orifícios) (Figura 5). Seguindo metodologia descrita por (DUARTE *et al.*, 2005).

O Quadro 1 mostra as concentrações que podem ser consideradas expressas em mg/mL, referentes a atividade antimicrobiana de extratos brutos e plantas

Os resultados a partir do extrato bruto que inibiram consideravelmente o crescimento microbiano de *S. Aureus* (ATCC 6538P) estão nas concentrações entre 33,3 mg/mL à 16,6 mg/mL e *E. Coli* (ATCC 8739) 33,3 mg/mL, respectivamente.

QUADRO 1- Critérios para a aceitação da atividade antimicrobiana de extratos brutos e plantas.

CIM DO EXTRATO	AÇÃO
Abaixo de 100 mg/mL	Boa atividade antimicrobiana
Entre 101 e 250 mg/mL	Moderada atividade antimicrobiana
Entre 251 e 500 mg/mL	Fraca atividade antimicrobiana

Fonte: ARAUJO, (2010).

A metodologia da CIM se mostrou mais eficiente em relação aos ensaios de difusão em disco com extratos obtidos do caldo de cultivo nas três temperaturas distintas. Tal resultado talvez possa ser explicado pela dificuldade da difusão do extrato no meio de cultura.

De acordo com ALVES *et al.*, (2008) a dificuldade da difusão de extratos brutos em ágar pode estar diretamente relacionada à massa molecular e a hidrossolubilidade dos produtos naturais.

Quanto aos microrganismos, *S. Aureus* (Gram-positivo) foi o que apresentou maior sensibilidade aos extratos através da CIM se confirmando através do plaqueamento. Já *E. Coli* (Gram negativa) se mostrou menos sensível ao extrato (Figura 5).

A menor inibição frente a bactéria Gram negativa pode ter relação com diferenças estruturais, tais como a presença de uma membrana externa sobre uma camada delgada de peptidoglicano (KONEMAN *et al.*, 1999).

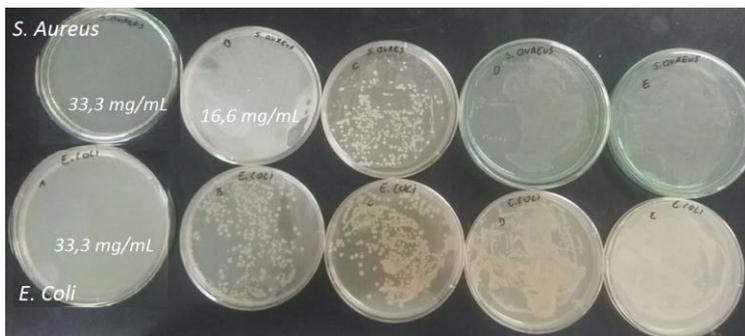


Figura 4- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Os resultados apresentados pela CIM no presente estudo, demonstram que o extrato metanólico do isolado fúngico UFSC-Pt 222, possui considerável atividade antimicrobiana.

Outro resultado que corrobora com o presente estudo, é o de Öztürk *et al* (2011) no qual foi avaliada a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de três espécies de *Agaricus*. Esses autores verificaram que as bactérias Gram positivas foram mais sensíveis ao extrato do cogumelo que as bactérias Gram negativas.

Kitzberger *et al.*, (2007) em estudo para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de *L. Edodes* obtidos por solventes orgânicos via extração supercrítica constataram que os extratos obtidos com a adição de cossolventes e também com o processo de ESC (extração supercrítica) com CO₂ puro, se apresentaram mais efetivos contra *M. Luteus* e *B. Cereus* duas bactérias Gram positivas. Já os extratos obtidos por baixa pressão não apresentaram nenhuma atividade antimicrobiana.

A CIM é uma medida *in vitro* que mostra a atividade do extrato, medicamento e susceptibilidade bacteriana, não sendo considerada uma medida de eficácia. Quanto mais baixos forem os valores de CIM, mais susceptível é o microrganismo (PAPICH; 2013).

Não foi possível comparar os resultados obtidos pela técnica da microdiluição em caldo, já que ainda não foram encontrados na literatura trabalhos demonstrando as CIM's de isolados de *Pisolithus*.

Portanto, o isolado UFSC-Pt 222, proveniente da região de Lauro Müller- SC, teve sua ação antibacteriana comprovada frente a bactéria Gram positiva *S. Aureus*.

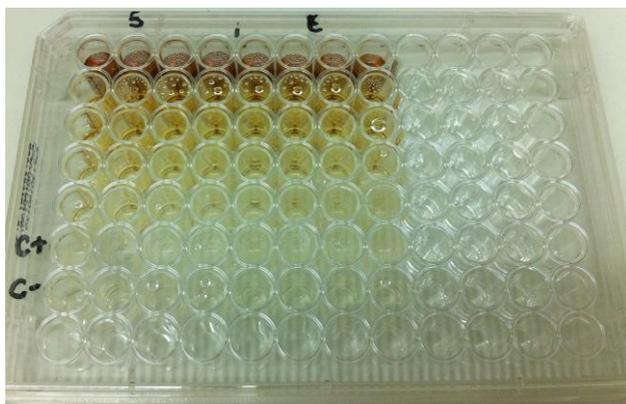


Figura 4- Ensaio com técnica de diluição em microplacas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

As facilidades de se utilizar isolados desse fungo como produtor de compostos antimicrobianos de interesse se devem ao fato que os mesmos apresentam bom crescimento quando cultivados em biorreator (ROSSI, 2002). Evitando assim, a necessidade de extrair a espécie do ambiente, desfazendo as associações micorrízicas e causando potenciais desequilíbrios no ecossistema.

Os resultados do presente trabalho, podem ser considerados para caracterizar o fungo como um potencial modelo biotecnológico.

Ainda que tenham sido verificadas diferenças significativas nas metodologias testadas, a realização de estudos complementares é de suma importância. Diferentes condições de cultivo e novos métodos de extração de compostos devem ser testados.

5. CONCLUSÕES

- O fungo UFSC-Pt 222, isolado de área impactada, apresentou atividade antibacteriana frente às cepas de *S. Aureus*, nos ensaios com difusão em disco, enquanto o isolado UFSC-Pt D17 proveniente de área não impactada, não apresentou atividade em nenhum dos ensaios realizados.
- O cultivo em três temperaturas distintas mostrou diferenças em relação ao crescimento dos isolados fúngicos testados.
- A condição de cultivo em que os isolados fúngicos foram submetidos com adição do elemento-traço Zn levou a completa inibição do crescimento fúngico.
- O extrato metanólico do isolado fúngico UFSC-Pt 222 apresentou Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 33,3 mg/mL até 16,6 mg/mL frente a bactéria *S. Aureus* e 33,3 mg/mL frente a bactéria *E.Coli*
- Os resultados obtidos neste trabalho devem ser complementados em trabalhos futuros, no sentido de detectar e purificar esses metabólitos que apresentaram atividade antibacteriana, pois a metodologia adotada neste trabalho foi utilizando extratos brutos.

6. REFERÊNCIAS

- AGGANGAN, N. S.; DELL, B.; MALAJCZUC, N. Effects of chromium and nickel on growth of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* and formation of ectomycorrhizas of *Eucalyptus urophylla* S.T Blake. **Geoderma**, Tucson, v. 84, n. 1-3, p. 15-27, June 1998.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. San Diego. Academic Press. 5 ed, p. 922. 2005.
- AHMAD, I.; ZAFAR, S.; AHAMAD, F. Heavy metal biosorption potencial of *Aspergillus* and *Rizopus sp.* Isolated from wastewater treated soil. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**. v. 9, n. 1, p. 123-126, 2005.
- ALVES, E. G. A.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo Comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**. v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4ª ed. John Wiley e Sons, 880 p, 1996.
- AMERI, A.; GHADGE, C.; VAIDYA, J.G.; DEOKULE, S.S. Anti *Staphylococcus aureus* activity of *Pisolithus albus* from Pune, India. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 5, n. 4, p. 527–532, 2011.
- ANKE, T. Basidiomycetes: a source for new bioactive secondary metabolites. **Progress in Industrial Microbiology**. v. 27, p. 51-66, 1989.
- ARAÚJO, R. R. N. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microrganismos relacionados à lesão de mucosite oral** (Dissertação). Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.
- ARCHER, D.B.; CONNERTON, I.F.; MACKENZIE, D.A. Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**. v. 111 p. 99-147, 2008.
- ARESI, C. **Avaliação da potencial atividade antimicrobiana de produtos de origem natural: Estudo bioguiado de *Dalbergia ecastaphyllum* L.**

Taub. (Dissertação). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

BARATTO, L.; LANG, K.L.; VANZ, D.C.; REGINATTO, F.H. Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 4, p. 577–582, 2008.

BARREIRO, C.; MARTÍN, J.F.; GARCÍA-ESTRADA, C. Proteomics shows new faces for the old penicillin producer *Penicillium chrysogenum*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. p. 1–15, 2012.

BARRY, A.L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows, A.; Hauser, W.J.; Hermann, K.L.; Isenberg, H.D.; Shamody, H.J. **Manual of clinical microbiology**. 5 ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1117– 1125, 1991.

BAUER, A.W; KIRBY, W.M.M; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 45, p. 493–496, 1966.

BEKAI, L. H. **Atividade antibiótica do fungo *Antrodia albida* (Fr.) Donk. cultivado em laboratório** (Dissertação). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

BELLION, M; COURBOT, M.; JACOB, C.; BLAUDEZ, D.; CHALOT, M. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v.254, p.173-181, 2006.

BENATO, E. A.; SOUZA, N.L. Manejo de doenças de frutos pós colheita. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo. v. 9, p. 403-440, 2001.

BENEDICT, R.G.; BRADY, L.R. Antimicrobial activity of mushroom metabolites. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 61, n. 11, p. 1820–1821, 1972.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? **American Journal of Botany**. v. 98, n. 3, p. 426–438, 2011.

BRANDT CR, PIRAINO F. Mushroom antivirals. **Rec. Res Dev. Antimic. Ag. Chem**, v. 4, p. 11-26, 2000.

BRIZUELA, M.A.; GARCÍA, L.; PÉREZ, L.; MANSUR, M.
Basidiomicetos: nueva fuente de metabólitos secundários. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 15, p. 69–74, 1998.

BU'LOCK, J. D. Essays in biosynthesis and microbial development. **New York: WileyLiss**, p.71, 1967.

CAMPOS, A. N. R.; TÓTOLA, M. R.; COSTA, M. D.; BORGES, A. C.
Total lipid and fatty acid accumulation during basidiospore formation in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* sp. **Revista Brasileira de Ciência do solo**. v. 32, p. 1531- 1540, 2008.

CARVALHO, M. P. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Basidiomicetos *Lentinula edodes*, *Lentinus crinitus*, *Amauroderma* sp. e *Pycnoporus sanguineus*** (Dissertação) Mestrado em Microbiologia Agrícola e Ambiente) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

CUMMING, J. R.; SWIGER, T. D.; KURNIK, B. S.; PANACCIONE, D. G.
Organic acids exudation by *Laccaria bicolor* and *Pisolithus tinctorius* exposed to aluminum *in vitro*. **Canadian Journal of Florestes Research**, Otavva. v. 31, n.4, p. 703-710. Apr, 2001.

DEMAIN, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms, **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 52, p. 455-63, 1999.

DEMIRBAS, A. Heavy metal bioaccumulation by mushrooms from artificially fortified soils. **Food Chemistry**, London. v. 74, n. 3, p. 293-301, Aug. 2001.

DIAS, P. L. **Bioacumulação de elementos-traço em *Agaricus bisporus* e *Pleurotus* sp.** (Dissertação) Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2013.

DYAKOV, M.Y.; KAMZOLKINA, O.V.; SHTAER, O.V; BSKO, N.A.; POEDINOK, N.L.; MIKHAILOVA, O.B.; TIKHONOVA, O.V.; TOLSTIKHINA, T.E.; VASILEVA, B.F.; EFREMENKOVA, O.V.

Morphological characteristics of natural strains of certain species of basidiomycetes and biological analysis of antimicrobial activity under submerged cultural conditions. **Microbiology**. v. 80, n. 2, p. 274–285, 2011.

EL-ENSHASYA, H.A.; Filamentous Fungal Cultures—Process Characteristics, Products, and Applications. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources, **New Technologies and Applications**. v. 9, p. 225-261, 2007

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004

FOMINNA, M.; HILLIER, S.; CHARNOCK, J. M.; MELVILLE, K.; ALEXANDER, I.J.; GADD, G. M. Role of oxalic acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*, **Applied and Environmental Microbiology**. Jena. v.71, n.1, p. 371-381, Jan. 2005.

GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. **Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo**, p. 125-172 In: Esposito, E & Azevedo, J.L. **Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**. 510p. Educs, Caxias do Sul, 2004.

GIACHINI, A. J. **Levantamento de fungos ectomicorrízicos em plantações de *Pinus* e *Eucalyptus* em Santa Catarina** (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 1995.

GLOER, G. B. Applications of Fungal Ecology in the Search for New Bioactive Natural Products, *In*: Kubicek, C.P.; Druzhinina, I.S. **Environmental and Microbial Relationship**, Springer- Verlag Beling Heidelberg, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GÓES-NETO, A. **Diagnóstico da Biodiversidade de Macromicetos do Estado da Bahia: Evolução histórica e situação atual**. (Monografia) Universidade Federal da Bahia. Salvador, 1994.

GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M.; CARVALHO, D. Tolerância de fungos ectomicorrízicos a metais pesados em meio de

cultura adicionado de solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa. v. 25, n. 4, p. 839-848, 2001.

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

HUANG, W-Y.; CAI, Y-Z.; HYDE, K.D.; CORKE, H.; SUN, M. Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. **World Journal Microbiology Biotechnology**. v. 23, p. 1253–1263, 2007.

IINUMA, H.; NAKANURA, H.; NAGANAWA, H.; MASUDA, T.; TAKANO, S.; TAKEUCHI, T.; UMEZAWA, H.; IITAKA, Y.; OBAYASHI, A. Basidalin, a new antibiotic from basidiomycetes. **The Journal of Antibiotics**, v. 36, n. 4, p. 448–450, 1983.

ISAKA M, TANTICHAREON M, KONGSAEREE P, HEBTARANONTH Y. Structures of Cordypyridones A-D, anti-malarial N-hydroxy- and N-methoxy-2- pyridones from the insect pathogenic fungus *Cordyceps nipponica*. **Journal of Organic Chemistry**. v. 66(14), p. 4803-4808, 2001.

JANG, H. D.; LIN, Y. Y.; YANG, S. S. Polyunsaturated fatty acids production with *Mortierella alpine* by solid substrate fermentation. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**. v. 41, p. 41-48, 2000.

JOHANN, S. **Atividade antimicrobiana de flavonóides polimetoxilados isolados de frutos cítricos** (Dissertação). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

KHAN, A. G. Mycorrhizoremediation: an enhanced form of phytoremediation. **Journal of Zhejiang University Science**, Zhejiang. v.7, p.503-514, July. 2006.

KAVANAGH, F.; HERVEY, A.; ROBBINS, W.J. Antibiotic substances from Basidiomycetes IX. *Drosophila subatrata* (Batsch ex Fr.) Quel. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 38, n. 7, p. 555–560, 1952.

KHALDI, N.; SEIFUDDIN, F.T.; TURNER, G.; HAFT, D.; NIERMAN, W.C.; WOLFE, K.H.; FEDOROVA, N.D. SMURF: Genomic mapping of

- fungal secondary metabolite clusters. **Fungal Genetics and Biology**. v. 47, p. 736–741, 2010.
- KEMPKEN, F.; ROHLFS, M. Fungal secondary metabolite biosynthesis – a chemical defense strategy against antagonistic animals? **Fungal Ecology**. v. 3, p. 107-114, 2010.
- KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. A. Ainsworth & Bisby's. **Dictionary of the Fungi**. 9 Ed., Wallingford, CAB International, UK, p. 655, 2001.
- KITTAKOOP, P. *et al.* Bioactive naphthoquinones from *Cordyceps unilateralis*. **Phytochemistry**. v. 52, p. 453-457, 1999.
- KITZBERGER, C. S. G. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake *Lentinula edodes* extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**. v. 80, n. 2, p. 631638, 2007.
- KONEMAM, E. W. *et al.* Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas Color 5 ed. Buenos Ayres: **Panamericana**, 1999.
- KUPKA, J.; ANKE, T.; OBERWINKLER, F. Antibiotics from Basidiomycetes. VII Crinipellin, a new antibiotic from the Basidiomycetous fungus *Crinipellis stipitaria* (Fr.) Pat. **The Journal of Antibiotics**. v. 32, n. 2, p. 130–135, 1979.
- LEE, B. C.; BAE, J. T.; PYO, H. B.; CHOE, T. B.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; YUN, J.W.; Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial Technology**. Atlanta, v. 35, p. 369-376, 2004.
- LEVINSKAITE, M. P. The mechanism of action off copper-chrome-arsenate preservatives against wood destroying fungi: record 1969. London: **British Wood Preserving Association**. p. 113, 2001.
- LIMA, M.A. **Potencial biotecnológico de basidiomicetos isolados no estado do Paraná** (Dissertação). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

LOGUERCIO-LEITE, C.; GROPOSO, C.; DRESCHLER-SANTOS, E.R.; Figueiredo, N. F.; Godinho, P.S.; Abrão, R.L. A particularidade de ser um fungo –I. Constituintes celulares. **Biotemas**. v. 19, n. 2, p. 17-27, 2006.

LOPES, F.C. **Produção e análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos**. (Dissertação). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

LOVY A, KNOWLES B, LABBE R, NOLAN L. Activity of edible mushrooms against the growth of human T4 leukemia cancer cells, and Plasmodium falciparum. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**. v. 6(4), p. 49-57, 1999.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, p. 608, 2004.

MAMEDE, A. C. P. B. **Avaliação da atividade antibacteriana de fungos do filo Ascomycota e Basidiomycota sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*** (Trabalho de conclusão de curso). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MAMEDE, A. C. P. B. **Atividade antibacteriana do fungo *Pisolithus microcarpus***. (Dissertação). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

MANCILHA, E. S. I. **Seleção de Basidiomycetes coletados e isolados em área de Mata Atlântica- PE com atividade fenoloxidase e sua aplicação na descoloração de corantes sintéticos** (Tese). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

MARCANTE, R. C.; MENIQUETTI, A.; PASCOTTO, C. R.; GAZIN, Z. C.; MAGALHÃES, H. M.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Bioacumulação de zinco em micélio de *Agaricus subrufescens*. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 17, n. 4, p. 249-252, out/dez. 2014.

MARX, D.H. Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Canadian Journal of Botany**, v. 23, p. 217–223, 1977.

MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of

mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria.

Phytopathologist. v.59, p.153-163, 1969.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; **Microbiologia Ambiental**. 2 ed. rev. ampl. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.

OLIVEIRA, K. K. C. **Atividade antimicrobiana de basidiomicetos ocorrentes na Amazônia**. (Dissertação), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

ORDÓÑEZ, R.M. *et al.* Antimicrobial activity of glycosidase inhibitory protein isolated from *Cyphomandra betacea* Sendt. fruit. **Peptides**. v. 27, p. 1187-1191, 2006.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.18, n.2, p.301-307, 2008.

ÖZTÜRK, M. *et al.* *In vitro* antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1353-1360, 2011.

PAPICH, Mark G. Antimicrobials, Susceptibility Testing, and Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) in Veterinary Infection Treatment. **Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**. ed 5, v. 43, p. 1079-1089, set. 2013.

PARAMESWARI, E.; LAKSHMANAN, A.; THILAGAVATHI, T.; Biosorption and metal tolerance potential of filamentous fungi isolated from metal polluted ecosystem. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, Vigo, v. 9, n. 4, p. 664-671, 2010.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Rio Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 906., 2001.

ROSA, L.H.; MACHADO, K.M.G.; JACOB, C.C.; CAPELARI, M.; ROSA, C.A.; ZANI, C.L. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 98, n. 7, p. 967-974, 2003.

ROSSI, M.J.; SOUZA, J.A.R.; OLIVEIRA, V.L. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 59, p. 175– 181, 2002.

ROZE, L.V.; CHANDA, A.; LINZ, J.E. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: A new understanding of established cellular processes, Fungal **Genetics and Biology**. v. 48, p. 35–48, 2011.

SBAC- **Sociedade Brasileira de Análises Clínicas** – Como avaliar e monitorar os resultados de Resistência Bacteriana, 2010. Disponível em: <http://www.sbac.org.br/pt/conteudos/qualinews/cursos_e_eventos/sbac_rj/jornada_rio_2010/jornada_rio_2010_04.pdf> Acesso em: jan 2016.

SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M. J. Symbiosys of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p. 315-340, 2004.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A.M.F.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; GIANINNI, M.J.S.M. The use of Standard methodology for determination of antifungal activity of Natural Products against medical yeasts *Candida* sp. and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 391-397, 2007.

SHWAB, E.K.; KELLER, N.P. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes, **Mycological research**. v. 112: p. 225-230, 2008.

SINGLA, S.; REDDY, M. S.; MARMEISSE; GAY.G. Genetic variability and taxonomic position of ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* from India. **Microbiology Research**. v. 159, p. 203-210, 2004.

SMÂNIA, E. F. A. *et al.* 9Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. *Journal Chem. Tech.* **Biotechnol.** v. 70, p. 57-59, 1997.

SMÂNIA, A.; MONACHE, F.D.; SMÂNIA, E.F.A., GIL, M.L.; BENCHETRIT, L.C.; CRUZ, F.S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 45, p. 177–181, 1995.

SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA, A.; LOGUERCIO-LEITE, C.; GIL, M.L.
Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*.
Journal of chemical technology and biotechnology. v. 70, p. 57–59, 1997.

SANDVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Revista Iberoamericana de Micologia**. v. 17, p. 73–81, 2000.

SOUZA, S.M.; MONACHE, F.D.; SMANIA JR.A. Antibacterial activity of coumarins. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 60, p. 693–700, 2005.

STAMETS, P. Novel antimicrobials from mushrooms. **Journal Am. Bot. Council**, v. 54, p. 28-33, 2002.

STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I.; STEFFEN, G. P. K.; JACQUES, R. J. S.; SILVA, R. F. S. Ação do óleo essencial de eucalipto na micorrização e no estabelecimento de mudas de *Eucalyptus grandis* em solo contaminado por cobre. **Pesquisa Florestal Brasileira**. v.31, p.245-255, 2011.

STEFFEN, R. B; ANTONIOLLI, Z. I.; STEFFEN, G. P. K.; JACQUES, R. J. S.; ECHKARDT, D. P.; SANTOS, M. L. dos; SANTANA, N. A. Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus grandis* no crescimento de isolados de fungos ectomicorrízicos em diferentes concentrações de cobre, zinco e níquel. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, PR, v. 31, n. 67, p. 227-234, jul./set. 2011.

SUN, R.; GAO, Y.X.; SHEN, K.Z.; XU, Y.B.; WANG, C.R.; LIU, H.Y.; DONG, J.Y. Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*, **Phytochemistry Letters**, doi: 10.1016/j.phytol.2010.12.001, 2010.

TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**. v. 31, n. 7, p. 1807–1813, 2008.

TAYLOR, D. L. A First comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. **Ecological Society of America**. v. 81, n. 1, p. 3-20, fev. 2014.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 934, 2012.

VALGAS, C.; SOUZA, S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JR, A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 369-380, 2008.

VOLESKY, B.; HOLAN, Z. Biosorption of heavy metals. **Biotechnology Progress**, New York. v.11, n.3, p. 235-250, May/June 1995.

WANG, H.; NG, T. B. Ganoderming, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Peptides**. v. 27, p. 27-30, 2006.

WASSER, S.P.; WEIS, A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical Reviews in Immunology**. v. 19, p. 65-96, 1999.

YU, J.H.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**. v. 43, p. 437-58, 2005.