

Ana Carolina Peixoto Baidarian Mamede

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DO FUNGO *PISOLITHUS*
*MICROCARPUS***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Admir José Giachini.

Florianópolis
2015

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

Mamede, Ana Carolina Peixoto Baidarian
Atividade biológica do fungo *Pisolithus microcarpus* /
Ana Carolina Peixoto Baidarian Mamede ; orientador, Admir
José Giachini - Florianópolis, SC, 2015.
80 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Fungos . 3.
atividade antibacteriana. 4. metabólitos secundários. I.
Giachini, Admir José . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências. III. Título.

Ana Carolina Peixoto Baidarian Mamede

ATIVIDADE BIOLÓGICA DO FUNGO *Pisolithus microcarpus*

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e Biociências, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 15 de setembro de 2015.

Prof. Dr. Oscar Bruna Romero
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

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

Prof^a. Dr^a. Roberta Paulert
Universidade Federal do Paraná (Videoconferência)

Prof. Dr. Artur Smânia Jr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Inês Maria Costa Brighente
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus pais e à minha irmã.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pela educação, pelo apoio, pelos bons exemplos e pelo incentivo diário.

À minha irmã, pela amizade e pelas conversas intermináveis.

Ao meu orientador, prof. Admir, por toda a ajuda, confiança e pelo aprendizado que me proporcionou durante todos esses anos.

Aos professores Rafael, Cláudio e Márcio, e aos colegas do grupo Microrganismos e Processos Biotecnológicos pelo apoio.

Aos meus queridos amigos: Anabel, Thays, Igor e Renato, pelas viagens, reuniões gastronômicas e pela parceria diária; Mariana, Vanessa e Stéphanie, pelo apoio e amizade; Douglas, Emanuela e David pelos momentos de descontração.

Ao pessoal do Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFSC, em especial à prof^a Inês, à Handriela e ao Tiago pela paciência e pela grande ajuda nas análises químicas.

Ao Laboratório de Farmacognosia da UFSC, especialmente ao Prof. Flávio, à Tatiana e à Luiza, pelo auxílio na extração.

Aos membros da Comissão Examinadora, pelas contribuições nesse trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela qualidade e pelas oportunidades a mim oferecidas.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biotecnologias, pelo aprendizado que me foi proporcionado.

À CAPES, pelo auxílio financeiro que tornou possível a realização do Mestrado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos.

*"A educação é a arma mais poderosa que temos para
mudar o mundo."*

Nelson Mandela

RESUMO

A grande diversidade de metabólitos secundários produzidos por basidiomicetos, especialmente aqueles cultivados *in vitro*, tem ampliado o campo da biotecnologia visando à produção de compostos antimicrobianos. O objetivo desse estudo foi analisar os extratos de isolados do fungo *Pisolithus microcarpus* (Cooke e Massee) G. Cunn. coletados em duas áreas distintas (degradada pela exploração de carvão e não degradada) quanto a sua capacidade de inibir o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas. Inicialmente os fungos foram cultivados em meio Merlin Norkrans Modificado (MNM) durante o período de 30 dias. Após verificado crescimento, foi feita a extração metanólica do micélio e do meio de cultura. O solvente foi evaporado utilizando evaporador rotatório e o extrato resultante foi particionado com acetato de etila e butanol. Os ensaios de difusão em disco foram feitos utilizando os extratos metanólicos e as frações frente a seis estirpes bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 e ATCC 6538P), *Escherichia coli* (ATCC 25922 e ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e a atividade antibacteriana determinada pela formação de halos de inibição no entorno dos discos. Um dos isolados coletado na região carbonífera de Santa Catarina demonstrou atividade antibacteriana frente à *S. aureus*, pela formação de halos de 18 mm de diâmetro e frente à *P. aeruginosa*, com halos de 17 mm de diâmetro. Para a separação dos compostos presentes nas frações ativas foi realizada cromatografia em camada delgada, utilizando diversos sistemas de solventes. A análise qualitativa de alcaloides, flavonoides e esteroides indicaram a presença de flavonoides nos extratos, enquanto a análise quantitativa de fenólicos, flavonoides, DPPH e potencial redutor demonstrou a baixa capacidade antioxidante do fungo. Os espectros de ressonância magnética nuclear e de infravermelho demonstraram que a fração acetato de etila contém hidrocarbonetos aromáticos, aldeídos e hidrogênios ligados a carbonos e oxigênios, características indicadoras de triterpenos. Os resultados indicam que novos estudos devem ser realizados a fim de identificar esses compostos visando potenciais aplicações biotecnológicas.

Palavras chave: Fungos, atividade antibacteriana, metabólitos secundários, triterpenos.

ABSTRACT

The great diversity of secondary metabolites produced by basidiomycetes, especially those cultivated *in vitro*, has opened a broad biotechnological field aiming at the production of antimicrobial compounds. The aim of this study was to analyze the extracts from isolates of the fungus *Pisolithus microcarpus* (Cooke e Masee) G. Cunn. collected from two distinct areas (coal-mined degraded and non-degraded), for their ability to reduce the growth of potentially pathogenic bacteria. The fungi were initially grown in modified Merlin Norkrans Medium (MNM) during 30 days. After significant growth, a methanolic extraction of the mycelium was performed. The solvent was evaporated using a rotatory evaporator and the resulting extract partitioned using ethyl-acetate and butanol. A disk diffusion assay was performed against six bacterial isolates using the methanolic extracts and fractions: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 and ATCC 6538P), *Escherichia coli* (ATCC 25922 and ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Assay plates were incubated at 37 °C during 24 h. The antibacterial activity was determined through the formation of inhibition zones around the discs. One isolate collected from the coalfields of Santa Catarina showed antibacterial activity by forming inhibition zones (18 mm) for *S. aureus*, and (17 mm) for *P. aeruginosa*. Thin-layer chromatography was performed with different solvents in order to separate compounds present in the active fractions. Qualitative analysis of alkaloids, flavonoids and steroids indicated the presence of flavonoids in the extracts. Qualitative analyses of phenolics, flavonoids, DPPH and reducing potential showed a low antioxidant activity for the fungus. Nuclear magnetic resonance spectra and infrared spectroscopy showed that the ethyl acetate fraction contains aromatic hydrocarbons, aldehydes and hydrogens attached to carbons and oxygens, an indicator feature of triterpenes. The results indicate that further studies should be conducted to identify these compounds, targeting at future biotechnological applications.

Keywords: Fungi, antibacterial activity, secondary metabolites, triterpenes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aspecto geral de basidiomas de *Pisolithus microcarpus*.....31
- Figura 2.** Aspecto geral do crescimento de um isolado de *Pisolithus microcarpus* em meio de cultura MNM.....31
- Figura 3.** Reação de Liebermann-Burchard para detecção de esteroides e/ou triterpenos.41
- Figura 4.** Pastilha de brometo de potássio (KBr) preparada a partir da fração butanólica para análise em espectroscopia de infravermelho.....44
- Figura 5.** Ensaio de difusão em disco utilizando extratos metanólicos de isolados de *Pisolithus microcarpus*, contra *S. aureus*.....46
- Figura 6.** Inibição do crescimento de *P. aeruginosa* pelo isolado UFSC-Pt 222.47
- Figura 7.** Análise qualitativa de alcaloides presentes na fração butanólica.....51
- Figura 8.** Reação de Shinoda para análise qualitativa de flavonoides na fração butanólica.....51
- Figura 9.** Reação de Lieberman-Burchard para análise qualitativa de esteroides.52
- Figura 10.** Reação entre um flavonoide e o radical livre DPPH55
- Figura 11.** A) Placa cromatográfica em contato com o sistema de solventes composto por CHCl₃:EtOH 10:90 (v/v). B) Cromatografia em camada delgada utilizando extrato bruto (Eb) e fração butanólica (Fb) revelada com reagente anisaldeído. ...58
- Figura 12.** Cromatograma do extrato bruto, fração butanólica e fração acetato de etila.59
- Figura 13.** Cromatografia em camada delgada.....59
- Figura 14.** Espectro de RMN ¹H da fração acetato de etila do isolado UFSC-Pt 222 solubilizada em metanol deuterado.60
- Figura 15.** Espectro de RMN ¹H da fração acetato de etila do isolado UFSC-Pt 222 solubilizada em acetona deuterada.61
- Figura 16.** Espectro de Infravermelho referente à fração butanólica do fungo UFSC-Pt 222.63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diâmetro dos halos de inibição obtidos no ensaio de difusão em ágar	47
Tabela 2. Análise qualitativa de alcaloides, flavonoides e esteroides presentes no extrato bruto e frações do fungo UFSC-Pt 222.	52
Tabela 3. Determinação da atividade antioxidante, porcentagem de DPPH, análise de fenólicos, flavonoides totais e potencial redutor de frações obtidas do isolado fúngico UFSC-Pt 222 e da planta <i>Bunchosia armeniaca</i> (ciruela).	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS – Ácido Acetil Salicílico
abs – Absorbância
a.C. – Antes de Cristo
Ác. – Ácido
AcOEt – Acetato de etila
ATCC – American Type Culture Collection
BHI – Brain Heart Infusion
CCD – Cromatografia em Camada Delgada
DMSO – Dimetilsulfóxido
DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EB – Extrato bruto
EtOH – Etanol
FAe – Fração acetato de etila
FB – Fração butanólica
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
KBr – Brometo de potássio
µg – Microgramas
µL – Microlitros
mm – Milímetros
MNM – Merlin-Norkrans Modificado
NaCl – Cloreto de sódio
nm – Nanômetros
pH – Potencial hidrogeniônico
p.p.m. – Partes por milhão
UFC – Unidades formadoras de colônia
UV-VIS – Ultravioleta visível
v/v – Volume/volume

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	23
2.	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	Fungos.....	25
2.2	Fungos com potencial antimicrobiano	27
2.3	O gênero <i>Pisolithus</i>	29
2.4	Produtos naturais como fonte de compostos de interesse biotecnológico.....	32
3.	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral.....	35
3.2	Objetivos Específicos	35
4.	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Isolamento, cultivo e identificação de <i>Pisolithus</i>	37
4.2	Meios de cultura e soluções	38
4.3	Atividade antibacteriana	38
4.3.1	Preparo dos extratos.....	38
4.3.2	Bactérias-teste	39
4.3.3	Ensaio de disco difusão em ágar	39
4.4	Caracterização química dos extratos e frações	40
4.4.1	Análise qualitativa de flavonoides, alcaloides, esteroides e triterpenos.....	40
4.4.1.1	Pesquisa de flavonoides (Reação de Shinoda).....	40
4.4.1.2	Pesquisa de alcaloides.....	41
4.4.1.3	Pesquisa de esteroides e triterpenos.....	41
4.4.2	Determinação do conteúdo de fenólicos	42
4.4.3	Determinação do conteúdo de flavonoides	42
4.4.4	Avaliação da atividade antioxidante utilizando DPPH	42
4.4.5	Potencial redutor	43
4.4.6	Cromatografia em Camada Delgada.....	43
4.4.7	Ressonância magnética nuclear de ¹ H	44
4.4.8	Espectroscopia de Infravermelho.....	44
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Identificação dos fungos	45
5.2	Ensaio de disco difusão em ágar	45
5.3	Análises qualitativas de metabólitos secundários	49
5.4	Avaliação da atividade antioxidante	53
5.4.1	Teor de fenólicos (Método de Folin-Ciocalteu)	53
5.4.2	Teor de flavonoides	53
5.4.3	Determinação do potencial redutor	54
5.4.4	Determinação da ação sequestrante do radical livre DPPH	54

5.5	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	57
5.5	Ressonância Magnética Nuclear de ^1H	60
5.6	Análises por espectroscopia de Infravermelho (IV)	61
6.	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS.....	67

1. INTRODUÇÃO

Pisolithus é um gênero de basidiomicetos conhecido principalmente pela capacidade de se associar com espécies de Angiospermas e Gimnospermas pelo elucidado processo de micorrização. Essa simbiose baseia-se na troca de energia obtida pelo processo de fotossíntese, onde a planta fornece ao fungo fotossintetizados e este, por sua vez, transfere para a planta nutrientes absorvidos do solo.

Entretanto, estudos recentes têm indicado que os metabólitos secundários produzidos por fungos desse gênero possuem propriedades antibacterianas e antifúngicas, que podem estar associados à proteção da raiz e do fungo contra patógenos externos. Esses metabólitos são produzidos por diversos organismos, em resposta a diversos estímulos externos como alterações de pH e temperatura, e podem estar relacionados à diferentes atividades biológicas, além da já citada antimicrobiana.

Historicamente, os maiores produtores de substâncias antimicrobianas têm sido as bactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Contudo, a partir da descoberta da penicilina (1928) e da estreptomomicina (1940), ocorreram os primeiros relatos cientificamente comprovados de antimicrobianos produzidos por fungos. Ainda na década de 1940 foi descoberta a poliporina, a primeira substância antimicrobiana isolada a partir de um basidiomiceto (*Pycnoporus sanguineus*).

O uso de basidiomicetos como alvos terapêuticos é relatado desde a antiguidade. Atualmente, as pesquisas com esses organismos englobam suas propriedades nutricionais e farmacológicas, evidenciando efeitos na atividade antimicrobiana, controle da homeostase, prevenção de tumores, diminuição do colesterol, e tratamentos de derrame cerebral, doenças do coração, entre outros.

O estudo da atividade antimicrobiana de organismos é de extrema importância, uma vez que o mercado atual sofre com a falta de agentes antimicrobianos. Além disso, o uso indiscriminado de certos antimicrobianos, notadamente os antibióticos, seleciona bactérias resistentes aos medicamentos disponíveis, o que torna a problemática da resistência bacteriana crescente a cada ano.

Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo explorar a natureza das substâncias sintetizadas pelo fungo *Pisolithus microcarpus* e o efeito que as mesmas exercem sobre bactérias patogênicas, agregando

conhecimento na pesquisa de novos metabólitos antimicrobianos sintetizados por essa espécie.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fungos

Historicamente, o reino Fungi compreende um vasto grupo de organismos que, devido à presença de diversas características que os assemelham às plantas, como parede celular e reprodução esporófitica, foram considerados vegetais e classificados no reino Plantae por muitos anos. Entretanto, um conjunto de características próprias permitiu a inserção dos fungos em um novo reino. Uma dessas características é a ausência de pigmentos fotossintetizantes, fator que caracteriza a nutrição dos fungos como heterotrófica, realizada por digestão e absorção, uma vez que eles não realizam fixação do carbono e os nutrientes entram no organismo através da parede celular e da membrana plasmática (WEBSTER *et al.*, 2007; ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). 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 (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Devido à morfologia altamente variada, os fungos podem se apresentar como filamentosos ou leveduriformes.

Atualmente, estima-se que existam entre 1,5 a 5,1 milhões de espécies de fungos, dos quais apenas cerca de 120 mil foram oficialmente descritas (BLACKWELL, 2011), e grande maioria ainda não foi estudada, justificando-se a necessidade de novas pesquisas utilizando esses organismos (HAWKSWORTH, 2001).

A classificação atual divide os fungos em sete filos principais, sendo eles 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).

Organismos pertencentes ao filo Ascomycota possuem um papel considerável na indústria alimentícia e biotecnológica, uma vez que são utilizados para a fabricação de bebidas, queijos e pães, além da produção de substâncias antimicrobianas.

O filo Basidiomycota abrange aproximadamente 30 mil espécies descritas, o que corresponde a cerca de 20% do total de fungos oficialmente descritos. Os basidiomicetos apresentam hifas septadas e são caracterizados pela produção de esporos sexuais externos conhecidos como basidiósporos, os quais variam de acordo com a

espécie. Certas características deste filo, como tamanho das frutificações, que varia de poucos milímetros até 50 centímetros, morfologia heterogênea e grande diversidade de cores, são ferramentas de grande valia no reconhecimento de espécies no campo (GUERRERO e HOMRICH, 1983). Os basidiomicetos são organismos cosmopolitas que podem ser encontrados principalmente no meio terrestre, atuando na decomposição da matéria orgânica, como parasitas de animais e vegetais, ou em associações mutualísticas, se associando a plantas, processo denominado de micorrização.

Espécies formadoras de micorrizas são de grande importância para a agricultura, o setor florestal e o de recuperação ambiental, pois aumentam a capacidade de absorção de água pelas plantas e favorecem sua adaptação a novos ambientes ou ambientes degradados (MIRANDA, 1993).

Outro papel extremamente importante desenvolvido pelos fungos no meio ambiente é a ciclagem biogeoquímica dos elementos, uma vez que possuem habilidade na degradação tanto de compostos residuais simples até 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 os líquens, que são 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 elementos essenciais para o bom funcionamento do organismo, além de serem produtos de vias comuns a todos os organismos, como açúcares, aminoácidos e glicerol. Normalmente são sintetizados durante a fase exponencial 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 e a reprodução, 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).

Metabólitos secundários são produzidos por organismos diversos como plantas, fungos, bactérias, esponjas, protozoários, insetos e animais, em resposta aos estímulos externos como alterações nutricionais, modificações das condições do ambiente - como pH e temperatura, infecções e eventos de competição (STROHL, 2000). 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 (BEKAI, 2010). Muitos desses metabólitos têm sido relacionados à atividade biológica, representando importante fonte de novos medicamentos. Aproximadamente um terço dos fármacos mais vendidos no mundo são produtos naturais ou derivados destes.

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

2.2 Fungos com potencial antimicrobiano

O emprego dos fungos como agentes antimicrobianos ocorre desde a antiguidade (3000 a.C.), quando os chineses faziam uso de sapatos mofados para curar feridas nos pés. Contudo, a primeira substância antimicrobiana produzida por fungos com eficácia comprovada foi a penicilina, isolada de *Penicillium notatum* (atualmente denominado *Penicillium chrysogenum*), descoberta acidentalmente pelo cientista britânico Alexander Fleming no ano de 1928, após verificar que uma cultura de *Staphylococcus aureus* teve seu crescimento inibido pelo bolor (TAKAHASHI e LUCAS, 2008).

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 do que a descoberta de novos antibióticos (GUIMARÃES *et al.*, 2010). O termo “antibiótico” foi cunhado pela primeira vez em 1940 por Selman Walksman após a descoberta da estreptomicina, e é definido como uma substância produzida por microrganismos (bactérias, fungos, etc.), antagonista ao desenvolvimento ou à vida de outros seres (MARINELLI e GENILLOUD, 2014).

Durante a década de 1990 a indústria farmacêutica aprimorou os métodos de busca de novos agentes antimicrobianos. Porém, os produtos mais eficazes eram ainda aqueles naturalmente provenientes de fungos, principalmente de “estreptomicetos” (atualmente Actinobacteria), que haviam sido descobertos na Era de Ouro dos antibióticos, antes de 1970. Desse modo, as pesquisas realizadas geravam descobertas repetitivas, como aquelas pertencentes à classe das tetraciclina, resultando em poucas novidades emergentes. Atualmente, estima-se que mais de 100.000 antibióticos distintos sejam produzidos apenas por espécies do gênero *Streptomyces* (LIVERMORE, 2011).

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 se utilizar fermentadores para cultivo do organismo produtor 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 e LUCAS, 2008). De acordo com Aqueveque e colaboradores (2010), nos últimos vinte anos, a constante busca por metabólitos secundários extraídos de fungos tem sido uma grande fonte de inovação química na descoberta de produtos naturais.

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; CAMELINI *et al.*, 2012). Os primeiros estudos com basidiomicetos na área de atividade antimicrobiana foram desenvolvidos em 1941, quando foram examinados extratos de culturas de mais de duas mil espécies desses fungos. Essas investigações resultaram no isolamento e na identificação da pleuromutilina, um diterpeno extraído do fungo *Pleurotus mutilus*, amplamente utilizada no tratamento de infecções em animais, tornando-se assim o primeiro antibiótico originário de basidiomicetos (WILKINS, 1946; KAVANAGH, HERVEY e ROBBINS, 1952; BENEDICT e BRADY, 1972; KUPKA, ANKE e OBERWINKLER, 1979; IINUMA *et al.*, 1983; SMÂNIA *et al.*, 1995; SANDVEN, 2000; ROSA *et al.*, 2003).

Em 1946, estudos utilizando o fungo *Pycnoporus sanguineus* permitiram o isolamento da poliporina a partir do fungo *Pycnoporus sanguineus*, a primeira espécie de basidiomiceto a ser coletada no Brasil

(FIDALGO, 1970). Esse composto se mostrou sensível contra uma ampla diversidade de bactérias. O uso desse cogumelo por indígenas americanos, africanos, mexicanos, além de povos da Amazônia se deve às suas propriedades terapêuticas, como atividade anti-inflamatória, problemas no útero, verrugas e feridas, além de servir como alimento. Além disso, esses povos acreditavam que o uso do cogumelo curava pesadelos (SMÂNIA *et al.*, 1995; PACHECO *et al.*, 2013). Estudos realizados por Smânia e colaboradores (1995 e 1997) demonstraram que *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 fungos possuem uma ampla aplicação farmacológica (YANG e JONG, 1989; MIZUNO, 1993; WASSER e WEIS, 1999). 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 (ROBLES-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 basidioma, ou seja, do corpo de frutificação do fungo *Boletus edulis* no tratamento de oncogenes, cuja aplicação possibilitou a obtenção de uma resposta bastante satisfatória.

Pesquisas na área dos antimicrobianos se tornam cada vez mais necessárias, devido à dificuldade de se encontrar novas moléculas com espectro de ação eficiente contra bactérias patogênicas. Um candidato a fármaco passa por um processo de alto investimento que, incluindo a descoberta de alvos terapêuticos, desenho, seleção e aprimoramento da molécula candidata até os ensaios clínicos, pode levar mais de dez anos para ser concluído e para que o antimicrobiano seja comercializado (CALIXTO e JR., 2008).

2.3 O gênero *Pisolithus*

Espécies pertencentes ao gênero *Pisolithus* Alb. & Schwein. são comprovadamente ectomicorrízicas, cosmopolitas, que podem ser encontrados tanto em regiões temperadas quanto tropicais (MARX, 1977). Suas espécies normalmente são encontradas em simbiose com representantes de Angiospermas e Gimnospermas, estimulando seu crescimento (SOUZA, SILVA e OLIVEIRA, 2004). Apresentam píleo

ou basidioma com diâmetro entre 2,4 e 8 cm, com morfologia globosa ou piriforme e pseudoestipe extenso e robusto, que pode atingir até 7,7 cm de comprimento e 3 cm de espessura. Internamente, a estrutura denominada himênio é responsável pelo armazenamento dos esporos (Figura 1). Quando jovem, o perídio apresenta colorações que variam desde palha até negro fosco. Porém, na maturidade ocorre a degradação do perídio, podendo então variar de verde oliváceo até negro (AYALA e OCHOA, 1996). Em cultura apresenta crescimento lento, com micélio cottonoso e coloração marrom claro (Figura 2).

Relatos demonstram que espécies desse gênero, especificamente *Pisolithus tinctorius*, foram amplamente utilizadas por aborígenes australianos como fonte de alimento, além de possuírem propriedades homeostáticas que beneficiaram indígenas norte-americanos (KALOTAS, 1996).

Apesar da escassez de estudos sobre a capacidade antimicrobiana deste fungo, Tsantrizos e colaboradores (1991), usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), purificaram dois pigmentos antifúngicos a partir de representantes do gênero, sendo elas pisolitina A e pisolitina B. Nessa circunstância, os autores averiguaram que essas substâncias eram produzidas pelo fungo para proteger a raiz da planta da associação com outros microrganismos.

Em 2011, Ameri e colaboradores identificaram atividade antimicrobiana de isolados desse gênero contra algumas bactérias gram-negativas e gram-positivas pelo método de difusão de extratos. Mamede e colaboradores (2012, dados não publicados), verificaram efeito atenuador do fungo frente à *Staphylococcus aureus* em estudos utilizando extratos de espécies do gênero coletadas em regiões de extração de carvão no estado de Santa Catarina.

Sabe-se que a extração de carvão mineral é uma atividade que provoca constantes degradações no ambiente natural, podendo afetar a concentração de elementos-traço e modificar a estrutura e caracterização do solo (ADRIANO, 2001). Outros fatores como temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, 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 e LOPES, 2007). Assim, habitar ambientes extremos pode condicionar certas espécies de organismos vivos a produzir componentes tipicamente sintetizados durante o metabolismo secundário, que servirão como protetores contra as adversidades sofridas por esses organismos.



Figura 1. Aspecto geral de basidiomas de *Pisolithus microcarpus*. No detalhe a estrutura interna do basidioma (gleba), que abriga os esporos (himênio).
Créditos: Valter Jacinto e Marcelo Sulzbacher

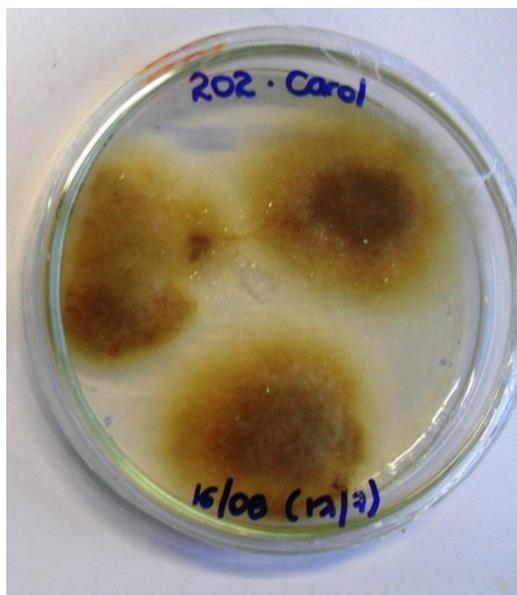


Figura 2. Aspecto geral do crescimento de um isolado de *Pisolithus microcarpus* em meio de cultura MNM.
Créditos: do Autor.

2.4 Produtos naturais como fonte de compostos de interesse biotecnológico

Compostos naturais tem sido foco de interesse para a raça humana desde tempos muito remotos. A investigação científica desses componentes, no entanto, tem histórico mais recente. Originalmente o interesse foi preponderantemente em espécies vegetais. Já para microrganismos, ocorreu um avanço mais acelerado com o advento do microscópio e das técnicas de isolamento microbiano. Mesmo com certa limitação, várias descobertas propiciaram o entendimento e uso de vários agentes extraídos ou produzidos por esses organismos. Avanços substanciais ocorreram a partir do século 21, onde foram descobertos diversos compostos isolados a partir de fungos ascomicetos e basidiomicetos com atividade antimicrobiana, citotóxica e antiparasitária. Entre eles diversos terpenóides, como o Wickerol A, um diterpeno inibidor da replicação do vírus Influenza, e os sesquiterpenos udalactaran A e udasterpurenol A, que possuem atividade antifúngica (SCHUEFFLER e ANKE, 2014).

Um dos exemplos mais citados de fármacos desenvolvidos a partir de produtos naturais é o ácido acetilsalicílico (AAS ou Aspirina[®]) sintetizado a partir da salicina, um glicosídeo natural encontrado no salgueiro (*Salix sp.*) (TAINTER e FERRIS, 1969).

Os produtos naturais disponíveis atualmente apresentam arquitetura molecular ampla e diversificada. Dentre a enorme variedade de compostos conhecidos pela ciência, no presente trabalho foram abordados apenas os fenólicos, flavonoides, terpenos, esteroides e alcaloides.

Compostos fenólicos podem possuir estruturas simples ou complexas, com a presença de pelo menos um anel aromático e uma molécula de hidrogênio substituída por um grupamento hidroxila. A classificação dos fenólicos ocorre de acordo com o tipo de esqueleto principal que constituirá o anel aromático. São amplamente encontrados em vegetais e microrganismos, como os ácidos fenólicos, derivados da cumarina, pigmentos hidrossolúveis, ligninas, taninos, alcaloides e terpenoides (PROENÇA DA CUNHA *et al.*, 2003). Fenóis simples (fenol, pirocateol, resorcinol e floroglucinol) têm distribuição restrita e estão presentes em líquens, proporcionando a esse um alto valor farmacêutico. Fenóis são raramente encontrados em bactérias, algas e fungos (SIMÕES *et al.*, 1999).

Flavonoides são compostos fenólicos que possuem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas entre si por uma cadeia de três carbonos ($C_6 - C_3 - O_2 - C_6$). São classificados de acordo com o tipo de ligação, quantidade de hidroxilas, e presença ou ausência de cetonas (SIMÕES *et al.*, 1999). Devido à resposta frente a ataques microbianos, esses compostos atuam como antifúngicos, antibacterianos e antivirais (GRAYER e HARBORNE, 1994).

Os terpenos são produzidos por uma grande variedade de plantas, especialmente as coníferas. A classificação dessas moléculas depende do número de unidades isoprênicas presentes. Monoterpenos possuem duas, sesquiterpenos três, diterpenos quatro, triterpenos seis, e tetraterpenos oito unidades. Quando ocorrem modificações químicas devido à oxidação ou rearranjo no esqueleto carbônico, dá-se a denominação geral de terpenóides. Alguns exemplos dessas moléculas são o mentol, o fitol, a vitamina A e o caroteno (RAI e VARMA, 2011). Os triterpenos apresentam diversos centros estereogênicos formados apenas por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio, e dependendo da estrutura, apresentam diversas atividades biológicas (BARREIRO e FRAGA, 2008). Os esteroides são triterpenos que participam da composição dos lipídios da membrana, além de atuarem como precursores de hormônios em animais (SILVA, 2013).

Os alcaloides são metabólitos encontrados predominantemente em Angiospermas (com exceção do fungo *Claviceps purpurea*, conhecido como esporão-de-centeio), e são compostos de grande valor para a indústria farmacêutica, devido à heterogeneidade química e ao potencial bioativo que apresentam (HENRIQUES *et al.*, 2002; ROBBERS *et al.*, 1997).

Em associações micorrízicas, a importância de alguns destes agentes abordados acima é bastante conhecida. Um bom exemplo é a dos terpenos, visto que esses compostos protegem a raiz das plantas contra infecções causadas por microrganismos (ABREU, 1987; BONNASSIS, 2007). A atividade antimicrobiana dos terpenos pode estar relacionada com suas propriedades lipofílicas e interações com as bicamadas fosfolipídicas das membranas das células bacterianas (DORMAN e DEANS, 2000). Essas substâncias atuam ainda na regulação do metabolismo intermediário, na ativação ou bloqueio de reações enzimáticas, na inibição da síntese proteica ou na alteração da estrutura das membranas (SINGH e SHUKLA, 1984). Considerando que o gênero *Pisolithus* contempla espécies que são obrigatoriamente ectomicorrízicas, principalmente com espécies de Angiospermas,

entende-se que a presença de substâncias dessa natureza possa estar relacionada com essas interações.

Esses compostos de origem natural, bem como outros sintetizados artificialmente, fazem parte do *roll* de componentes antimicrobianos amplamente utilizados pelo homem no controle e combate de infecções/doenças. Atualmente, o uso indiscriminado desses agentes antibacterianos/antimicrobianos disponíveis no mercado é responsável pela seleção de bactérias resistentes, o que conduz à necessidade de estudos com organismos potencialmente produtores de novas substâncias com caráter antimicrobiano.

Dessa forma, este trabalho buscou explorar a composição química dos extratos do fungo *Pisolithus microcarpus* relacionados com a atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas potencialmente causadoras de doenças. Com esse objetivo, foram realizadas análises químicas a fim de se verificar a presença de metabólitos secundários, além da avaliação da atividade antioxidante e quantificação de fenólicos e flavonoides presentes nos extratos do fungo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antibacteriano e antioxidante de isolados do fungo *Pisolithus microcarpus*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar se isolados de *Pisolithus microcarpus* de uma área impactada pela mineração de carvão apresentam atividade antibacteriana distinta daqueles de uma área sem a influência desse impacto;
- Verificar se extratos e exsudatos de *Pisolithus microcarpus* apresentam atividade antibacteriana;
- Aferir o potencial antioxidante do extrato e frações do fungo *Pisolithus microcarpus* coletado de área impactada pela mineração de carvão;
- Realizar a análise qualitativa do teor de fenólicos e flavonoides totais presentes no isolado coletado da área impactada pela mineração de carvão;
- Caracterizar a classe de metabólitos secundários produzidos pelos isolados fúngicos utilizando testes analíticos, técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento, cultivo e identificação de *Pisolithus*

A escolha do fungo foi feita a partir de uma triagem com fungos da coleção de microrganismos do Laboratório de Diversidade Microbiana, realizada em 2012 como parte de um trabalho de conclusão de curso. Foram testadas cerca de 20 espécies de fungos pertencentes ao filo Basidiomycota, das quais duas apresentaram atividade antibacteriana frente à *Staphylococcus aureus*: *Pisolithus microcarpus* e *Pycnoporus sanguineus*. A escolha de *P. microcarpus* se deu devido à escassez de estudos de atividade antimicrobiana utilizando esse organismo, em comparação àqueles existentes para *P. sanguineus*.

Os espécimes, denominados UFSC-Pt 221, UFSC-Pt 222, D5 e 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 (espécimes UFSC-Pt 221 e UFSC-Pt 222) e Senador Mourão, no município de Diamantina, Minas Gerais (17° 59' 30.40'' S; 43° 25' 40.90'' W e 17° 59' 23.40'' S; 43° 25' 34.10''), região isenta do impacto sofrido por qualquer atividade de mineração (espécimes D5 e D17).

A identificação morfológica das espécies foi feita pela observação dos esporos em microscópio óptico. Para isso, foi realizado um corte longitudinal nos basidiomas, permitindo a retirada dos esporos, os quais foram corados com reagente de Melzer. A identificação dos fungos baseou-se em Phillips (1991) e Burgess *et al.* (1995). No laboratório, os fungos foram isolados em meio Hagen seguindo a metodologia descrita por Marx (1977). Após o isolamento, o cultivo foi realizado em meio de cultura Merlin Norkrans Modificado (MNM) sólido, e os fungos mantidos a uma temperatura de 25 °C pelo período de 30 dias previamente à montagem dos experimentos. Após o crescimento em meio sólido, foi feito o cultivo em meio MNM líquido nas mesmas condições citadas anteriormente. Foram transferidos cinco discos de 7 mm de diâmetro para frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de meio de cultura, seguindo a metodologia descrita por Rossi *et al.* (2002).

4.2 Meios de cultura e soluções

Os fungos foram cultivados em meio Merlin Norkrans Modificado (MNM), com a seguinte composição: $C_6H_{12}O_6$ (10 g/L), extrato de malte (3 g/L), $(NH_4)_2HPO_4$ (0,25 g/L), KH_2PO_4 (0,5 g/L), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,05 g/L), NaCl (0,025 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,15 g/L), $FeCl_3$ (1%) (1,2 mL/L), Tiamina – HCl (100 μ g/L), agar-agar (15 g/L), água destilada (para 1000 mL), com pH ajustado para 5.8 ± 0.1 .

As estirpes bacterianas foram mantidas em meio ágar nutriente [digestão péptica de tecido animal (5 g/L), extrato de carne (1,5 g/L), extrato de levedura (1,5 g/L), cloreto de sódio (5 g/L) e ágar (15 g/L), em pH 7.4 ± 0.2].

Para os ensaios de difusão em disco foi utilizado o meio ágar Mueller-Hinton [infusão de carne (300 g/L), caseína ácida hidrolisada (17,5 g/L) e amido (1,5 g/L), em pH 7.4 ± 0.1]. Para a diluição das bactérias foi utilizada solução salina a 0,9% NaCl.

4.3 Atividade antibacteriana

Os experimentos para determinação da atividade antibacteriana de *P. microcarpus* foram realizados no Laboratório de Diversidade Microbiana, pertencente ao grupo de pesquisas Microorganismos e Processos Biotecnológicos, em parceria com o Laboratório de Farmacognosia, ambos localizados na Universidade Federal de Santa Catarina.

4.3.1 Preparo dos extratos

Após o crescimento dos fungos em meio MNM líquido como descrito no item 3.1, foi realizada a extração da biomassa utilizando o método de maceração. O conteúdo dos frascos de cultivo foi filtrado e o micélio e meio de cultura transferidos individualmente para frascos de vidro com tampa (capacidade 500 mL). Após a adição de metanol (aproximadamente 150 mL), cada frasco foi deixado em repouso durante três dias à temperatura ambiente. Posteriormente, o conteúdo de cada frasco foi depositado em balão volumétrico e evaporado em evaporador rotatório (BUCHI). O procedimento foi efetuado até que todo o metanol evaporasse e restasse somente o material aderido ao fundo do balão. O material foi raspado com espátula, armazenado em frascos ampola de vidro, e pesado em balança de precisão. Uma vez determinada a massa do extrato bruto obtido (metanólico), uma parte foi

armazenada a 4 °C e a outra particionada utilizando acetato de etila e butanol. O resíduo aquoso e as frações de acetato de etila e butanol foram separadas utilizando funil de separação, concentradas em evaporador rotatório e armazenadas a 4 °C.

4.3.2 Bactérias-teste

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados utilizando estirpes das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 e ATCC 6538P), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922 e ATCC 8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Esses microrganismos foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Antibióticos, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, e pelo Laboratório de Farmacognosia, do Departamento de Farmácia, ambos localizados na Universidade Federal de Santa Catarina.

As culturas bacterianas foram mantidas em meio de cultura ágar nutriente a 4 °C. Após o crescimento em meio TSA, foi utilizado caldo de infusão de cérebro e coração (*Brain heart infusion* – BHI) para o preparo do inóculo. Trezentos µL de cada cultura-estoque foram transferidos para 3 mL de caldo BHI, e em seguida as culturas foram incubados por 24 h a 36 °C. Após 8 h de incubação foi feita a verificação da pureza das culturas pela semeadura de subamostras em placas de ágar sangue. A concentração das suspensões foi ajustada com caldo de cultivo para uma concentração correspondente a 10⁸ UFC/mL (JOHANN, 2003; SOUZA *et al.*, 2005).

4.3.3 Ensaios de disco difusão em ágar

A atividade antibacteriana dos extratos e frações foi avaliada utilizando o método de difusão em ágar (BAUER *et al.*, 1966, com modificações), que consiste na deposição do agente a ser testado (impregnado em discos de nitrocelulose) em contato direto com o microrganismo-teste. Para isso, os extratos obtidos conforme descrito no item 4.3.1 foram impregnados em discos de papel filtro (Whatman nº 3) de 7 mm de diâmetro. Nos discos, foram colocados 20 µL de cada extrato, os quais foram deixados secar à temperatura ambiente, acondicionados em placas de Petri previamente esterilizadas.

As bactérias-teste foram cultivadas pelo período de 24 h, nas mesmas condições descritas anteriormente, e diluídas em solução de cloreto de sódio a 0,85%. Uma alíquota (1 mL) da suspensão bacteriana

diluída foi espalhada sobre a superfície do meio de cultura Mueller-Hinton utilizando hastes de algodão (*swabs*) esterilizadas (SMÂNIA *et al.*, 1997).

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. Após homogeneização, 20 µL do volume total foram aplicados sobre os discos de papel esterilizados. Como controle positivo, foram utilizados discos de antibiótico de referência para cada bactéria (ceftazidima para *Pseudomonas aeruginosa* e estreptomicina para as demais espécies). Os discos foram depositados sobre as placas inoculadas com o auxílio de uma pinça esterilizada. As placas foram então incubadas em estufa a 37 °C durante 24 h (BARATTO *et al.*, 2008; ARESI, 2011). Os testes foram executados em duplicata.

Os exsudatos liberados pelo fungo durante o cultivo também foram avaliados quanto à sua capacidade antibacteriana. Com o auxílio de uma seringa, o material foi extraído e aplicado sobre os discos de papel e as placas foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente.

A leitura dos testes foi realizada 18 horas após a incubação, pela medição do diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano. Como foram usados discos de papel com 7 mm de diâmetro, um resultado foi considerado positivo quando o halo de inibição de crescimento foi igual ou superior a 9 mm (SMÂNIA, 1995).

4.4 Caracterização química dos extratos e frações

Essa etapa foi realizada no Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.4.1 Análise qualitativa de flavonoides, alcaloides, esteroides e triterpenos

4.4.1.1 Pesquisa de flavonoides (Reação de Shinoda)

Os extratos brutos, assim como as frações particionadas com butanol e acetato de etila foram submetidos ao teste analítico de Shinoda a fim de se verificar a presença de flavonoides glicosídicos produzidos pelo fungo. Para isso, o material foi diluído com o mesmo solvente utilizado na maceração (metanol). Um volume de 0,3 mL de cada

extrato foi transferido para tubos de ensaio de 35 mL. Em seguida, foram adicionadas cinco limalhas de magnésio metálico e três gotas de HCl em cada tubo. No tubo contendo o controle negativo não foram colocadas as limalhas de magnésio. Após 1 h, os tubos foram observados quanto à presença de coloração avermelhada (SILVA, *et al.*, 2010; RODRIGUES e LIRA, 2013), o qual indica reação positiva.

4.4.1.2 Pesquisa de alcaloides

O extrato bruto e as frações acetato de etila e butanol foram solubilizados em 2 mL de etanol e, quando necessário, acrescido de algumas gotas de água destilada para auxiliar na solubilização das amostras. Para cada extrato/fração foram utilizados três tubos de ensaio de 35 mL e em cada um deles foram colocadas quatro gotas de cada extrato e duas gotas de reagentes de Meyer, Bertrand e Dragendorff (SILVA *et al.*, 2010; RODRIGUES e LIRA, 2013). Em seguida foi feita a observação visual dos tubos em relação à turbidez e/ou precipitação, características da presença desses compostos.

4.4.1.3 Pesquisa de esteroides e triterpenos

Para verificar a presença de esteroides e/ou triterpenos nos extratos foi feita a prova de Liebermann-Burchard, o teste mais utilizado para a identificação dessas substâncias. A reação consiste no tratamento do extrato/fração com anidrido acético em presença de ácido acético glacial e ácido sulfúrico. Na presença de esteroides no extrato, o sistema de anéis do ciclopentanoperidrofenantreno sofre desidratação seguida de oxidação (Figura 2), e a reação é evidenciada pelo aparecimento de uma coloração azul-esverdeada (BURKE, 1974; XIONG, 2007). Em tubos de ensaio de 35 mL foram adicionados 0,3 mL de cada extrato, acrescidos de duas gotas de anidrido acético e três gotas de ácido sulfúrico (SILVA *et al.*, 2010). Após 1 h foi feita a observação visual do resultado.

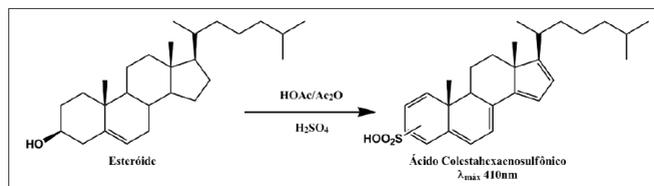


Figura 3. Reação de Liebermann-Burchard para detecção de esteroides e/ou triterpenos. Créditos: Gustavo Queiroz

4.4.2 Determinação do conteúdo de fenólicos

O teor de compostos fenólicos da fração acetato de etila foi determinado de acordo com o método descrito por Moresco *et al.* (2012), utilizando placas de 96 poços. A cada 0,5 mL de uma solução etanólica de extrato/fração (1000 µg/mL) foram adicionados 5,0 mL de água destilada e 0,25 mL do reativo de Folin-Ciocalteu. Após três minutos foi adicionado 1,0 mL de solução saturada de Na₂CO₃ e a mistura deixada em repouso por uma hora à temperatura ambiente. A intensidade da reação foi determinada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 725 nm e a concentração de compostos fenólicos no extrato/fração foi estimada com base na curva analítica construída com solução padrão de ácido gálico, nas concentrações de 25 a 400 µg/mL ($Y = 41,5 x$). Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de compostos fenólicos totais é expresso em equivalente de ácido gálico, ou seja, mg ácido gálico/g de extrato.

4.4.3 Determinação do conteúdo de flavonoides

A determinação do conteúdo de flavonoides foi feita em placas de 96 poços e baseou-se no método descrito por Moresco *et al.* (2012). Em 50 µL da fração acetato de etila a uma concentração de 1000 µg/mL, foram adicionados 200 µL de etanol e 50 µL de uma solução etanólica de AlCl₃ 2%. Após uma hora de repouso à temperatura ambiente, foram feitas as leituras das absorbâncias das misturas com auxílio de espectrofotômetro de UV-VIS a 415 nm. O teste foi feito em triplicata. Como controle foi utilizada uma solução preparada como descrito acima, porém sem a presença de AlCl₃. O conteúdo de flavonoides foi estimado com o uso de uma curva de calibração com solução de quercetina ($y = 67,0 x$) e expresso em mg de quercetina/g de extrato.

4.4.4 Avaliação da atividade antioxidante utilizando DPPH

A avaliação da ação sequestrante de radicais livres utilizando o DPPH baseou-se no método descrito por Moresco *et al.* (2012). Para esta avaliação adicionou-se uma alíquota de 100 µL de solução de DPPH em etanol (0,004%) a 60 µL de fração acetato de etila, na concentração de 1000 µg/mL, e 140 µL de etanol. Em espectrofotômetro UV-VIS, a mistura foi agitada e deixada repousar por 30 minutos. A

absorbância do DPPH nas soluções foi determinada a 517 nm. Como branco (Abs_{branco}) foi utilizado etanol (240 μL) adicionado das soluções das amostras diluídas (60 μL). Como controle (Abs_{controle}) foram utilizadas soluções com DPPH (100 μL) e etanol (200 μL). A análise foi realizada em triplicata. A absorbância (AA) de cada solução com a amostra (Abs_{amostra}) foi convertida em porcentagem da atividade antioxidante a partir da fórmula:

$$AA\% = 100 - [(Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco}}) \times 100] / Abs_{\text{controle}}$$

A concentração final da amostra foi de 200 $\mu\text{g/mL}$.

4.4.5 Potencial redutor

A metodologia de Moresco *et al.* (2012) foi seguida para a análise da atividade antioxidante pela determinação do potencial redutor. Misturas reacionais contendo 5 μL de solução de amostra (fração acetato de etila) diluídas em etanol (1000 ppm), 195 μL de água deionizada, e 50 μL de uma solução de FeCl_3 a 0,1 mol/L em HCl 0,1 mol/L foram preparadas em triplicata. Três minutos após o preparo das soluções, adicionou-se 50 μL de uma solução de ferricianeto de potássio 0,008 mol/L e a mistura foi agitada no espectrofotômetro. Após 15 minutos foi feita a leitura da absorbância das misturas a 720 nm. O aparecimento da cor azul da Prússia é indicativo de potencial redutor. Como controle utilizou-se uma solução preparada conforme o procedimento descrito anteriormente, porém sem a presença do extrato. As concentrações foram determinadas com o auxílio de uma curva de calibração utilizando solução de ácido ascórbico ($y = 72,5x + 4,8$), onde o potencial redutor é expresso como equivalente de ácido ascórbico, ou seja, mg de ácido ascórbico/g de amostra.

4.4.6 Cromatografia em Camada Delgada

Os extratos que demonstraram atividade antibacteriana foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Para isso, tanto o extrato bruto (metanólico) quanto as frações em acetato de etila e butanol foram aplicados em placas de gel de sílica (4 cm de altura x 3 cm de largura). Os solventes empregados foram hexano:acetato de etila (70:30); (30:70); clorofórmio:metanol (70:30); clorofórmio:etanol (10:90 e 70:30); etanol:clorofórmio (30:70).

Após a CCD, as placas foram observadas sob luz e UV visível e foram reveladas com o uso de anisaldeído sulfúrico (0,5 mL de anisaldeído, 10 mL de ácido acético, 85 mL de metanol e 5 mL H₂SO₄ concentrado).

4.4.7 Ressonância magnética nuclear de ¹H

A ressonância magnética foi realizada utilizando a fração acetato de etila solubilizada em metanol e acetona deuterados. O equipamento utilizado para as leituras foi um espectrômetro de ressonância magnética nuclear de 200 MHz, modelo AC 200 (Bruker), localizado na Central de Análises do Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da UFSC.

4.4.8 Espectroscopia de Infravermelho

O estudo dos grupos funcionais presentes na fração butanólica foi realizado através da espectroscopia de infravermelho. Para isso, foi feita uma pastilha de brometo de potássio (KBr) a partir da amostra seca (Figura 4), e esta foi analisada em espectrofotômetro de infravermelho (Modelo FTLA 2000, marca ABB). Os ensaios foram realizados na Central de Análises do Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina. A técnica da pastilha não altera o teor de cristalinidade do material e gera a obtenção de um espectro de infravermelho médio e distante (MATTOS *et al.*, 2002).



Figura 4. Pastilha de brometo de potássio (KBr) preparada a partir da fração butanólica para análise em espectroscopia de infravermelho.

Créditos: do Autor

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação dos fungos

A análise morfológica dos esporos (tamanho, forma, coloração, etc.) permitiu a identificação dos indivíduos fúngicos. O procedimento foi realizado a partir de um corte longitudinal feito nos basidiomas, seguido de remoção de parte da massa interna de esporos (gleba) e deposição destes em lamina de microscópio. As lâminas foram coradas utilizando reagente de Melzer e observadas em microscópio óptico.

Foram visualizados esporos, cujo tamanho variou de 7,2 a 8,5 μm , os quais apresentaram forma arredondada com apículos curtos (até 1 μm) e retos em seu entorno (KASUYA *et al.*, 2010). Essas características indicaram que os fungos pertencem à espécie *Pisolithus microcarpus*.

5.2 Ensaios de disco difusão em ágar

Os extratos metanólicos dos isolados UFSC-Pt 221, UFSC-Pt 222, D5 e D17, assim como as frações particionadas com acetato de etila e butanol, foram utilizados nos ensaios de difusão em disco para verificação da atividade antibacteriana frente às cepas selecionadas. Os primeiros ensaios de disco difusão em ágar indicaram que somente o extrato do meio de cultura filtrado do fungo UFSC-Pt 222 apresentou atividade antibacteriana, portanto a partição com acetato de etila e butanol foi realizada apenas para esse extrato. Dos extratos, frações e exsudatos testados quanto à atividade antibacteriana, o extrato metanólico e a fração butanólica obtidos do isolado UFSC-Pt 222 foram ativos tanto contra uma estirpe Gram-positiva (*S. aureus*) quanto contra uma estirpe Gram-negativa (*P. aeruginosa*). Na figura 5 podem ser observados os halos de inibição do crescimento de duas estirpes de *S. aureus* testadas no ensaio utilizando extrato metanólico do isolado UFSC-Pt 222 (halos de 18 mm de diâmetro). A figura 6 ilustra os halos de inibição do crescimento da cepa de *P. aeruginosa* resultantes do experimento utilizando o mesmo extrato (halos de 17 mm de diâmetro).

A tabela 1 apresenta os valores dos diâmetros dos halos encontrados nos ensaios utilizando os extratos provenientes da filtração do meio de cultura e do micélio dos fungos UFSC-Pt 221, UFSC Pt-222, D5 e D17.

Não foram observados halos de diâmetro maior que 9 mm (limite mínimo para atividade antimicrobiana segundo Smania *et al.*, 1995) nos ensaios com *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*. O ensaio utilizando os exsudatos do fungo D17 demonstrou que esse isolado não apresentou atividade antibacteriana. Portanto, o isolado UFSC-Pt 222, proveniente da região de Lauro Müller, foi o único com comprovada ação antibacteriana frente às cepas gram-positivas e gram-negativas testadas. Apesar de não existirem outros trabalhos demonstrando a atividade antibacteriana dessa espécie de fungo, esse resultado corrobora aquele obtido na Índia com extratos de *P. albus* em testes de difusão frente a *S. aureus* resistente à metilina (SARM) (AMERI *et al.*, 2011).

É possível que a atividade antibacteriana do isolado UFSC Pt-222 esteja relacionada com o seu hábitat original, ou seja, um solo com alta concentração de elementos-traço, como é o caso da região carbonífera de Santa Catarina. Nessa região, os elementos mais frequentes são alumínio, magnésio, zinco, cobre, níquel, cromo e chumbo (MENEZES, 2009). Outra razão pode ser a localização, já que esse isolado foi coletado em um gradiente latitudinal maior do que aqueles provenientes de Diamantina. Ainda, poderia ser sugerido que as condições ambientais nas quais o fungo cresceu fizeram com que ele desenvolvesse a atividade de produzir compostos antibacterianos, como maior exposição solar, temperaturas médias anuais mais baixas e seca. (STOCKER-WORGOTTER, 2001).

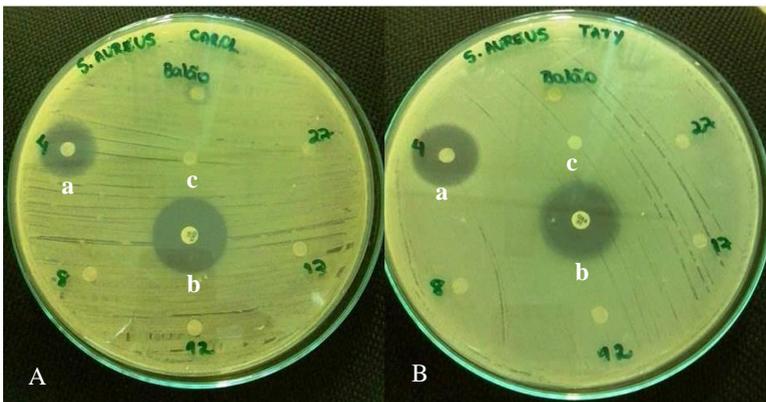


Figura 5. Ensaio de difusão em disco utilizando extratos metanólicos de isolados de *Pisolithus microcarpus*, contra *S. aureus* (A = ATCC 6538P; B = ATCC 25923) pelo isolado UFSC-Pt 222 verificada pela formação de halos de inibição de 18 mm de diâmetro (**a** = extrato do meio de cultura, **b** = controle

positivo, c = controle negativo). Os demais discos referem-se aos extratos que não apresentaram atividade.

Créditos: do Autor.

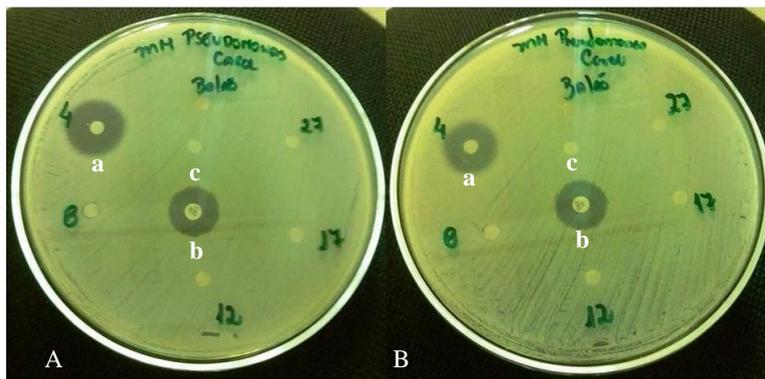


Figura 6. Inibição do crescimento de *P. aeruginosa* (A e B = ATCC 27853) pelos extratos metanólicos do isolado de *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt 222) verificada pela formação de halos de inibição de 17 mm de diâmetro (a = extrato do meio de cultura, b = controle positivo, c = controle negativo). Os demais discos referem-se aos extratos que não apresentaram atividade.
Créditos: do Autor.

Tabela 1. Diâmetro dos halos de inibição obtidos no ensaio de difusão em ágar

EXTRATO	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538P)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)
4	18 mm	18 mm	17 mm
8	-	-	-
12	-	-	-
17	-	-	-
27	-	-	-
Balão	-	-	-

4 - Extrato bruto do meio de cultura do isolado UFSC-Pt 222; 8 - D17; 12 - Extrato bruto do micélio do isolado UFSC-Pt 222; 17 - Extrato bruto do meio de cultura do isolado D5; 27 - Extrato bruto do meio de cultura do isolado UFSC-Pt 221; Balão - Extrato bruto do micélio do isolado D5.

Em estudo efetuado com o fungo *Thamnia vermicularis* var. *subuliformis*, Stocker-Worgotter (2001) foi demonstrado que a produção de dois metabólitos (ácido beomicésico e ácido esquamático) ocorreu somente após a exposição da cultura à uma condição de desidratação e de longa exposição à luz, em temperaturas relativamente baixas (15 °C) (STOCKER-WORGOTTER, 2001). Fungos liquenizados, quando cultivados em laboratório, demonstraram produção de metabólitos secundários que não estão presentes no organismo coletado no ambiente. Isso pode ocorrer devido à adaptação do fungo liquenizado às condições em meio de cultura artificial, induzindo a produção de vias metabólicas alternativas ou, ainda, ao fato da atividade enzimática ser desencadeada pela disponibilidade de certos elementos-traço, carboidratos, ou pH incomum do meio. Esses fatores podem afetar a expressão de genes envolvidos com a produção ou a regulação de metabólitos secundários responsáveis pela atividade antimicrobiana (DEDUKE *et al.*, 2012).

O pH também atua na regulação da expressão gênica em fungos, mediada pelo fator de transcrição *pacC*. Penalva e Arst (2002) demonstraram que, em condições de pH alcalino, mutações nesse fator de transcrição desencadearam o aumento da produção de penicilina pelos fungos *Aspergillus nidulans* e *Penicillium chrysogenum*. Genes que codificam os fatores de transcrição globais regulam múltiplos processos fisiológicos em resposta ao pH, temperatura e nutrientes. Essa regulação tem sido mais estudada em fungos patógenos para humanos e é necessária para que o fungo perceba as alterações ambientais e se adapte a essas mudanças (SHAPIRO *et al.*, 2011). Análises do solo da região de Diamantina indicaram pH variável entre 4,6 e 5,8 (FONSECA, 2013) e 3,4 a 4,7 para a região carbonífera de Lauro Müller (CESAR *et al.*, 2013).

A presença de elementos-traço pode causar um efeito estressante nos fungos, favorecendo a produção de substâncias bioativas que o auxiliem na sobrevivência em meio à hostilidade do ambiente. Alguns fungos podem crescer em ambientes desfavoráveis e sobreviver sob condições extremas de certos elementos químicos, que incluem elementos-traço e até radioativos. Um exemplo disso é o desastre nuclear de Chernobyl (1986), onde foram encontrados fungos crescendo nas paredes das construções que ficaram intactas, apesar de toda a radiação a que foram expostos. Nessas condições foram isoladas mais de 2000 cepas de 200 espécies e 98 gêneros, alguns inclusive crescendo diretamente na fonte da radiação ionizante (SECKBACH, 2006). Apesar dessa ocorrência expressiva de espécies nesse ambiente, não foram

encontrados na literatura consultada trabalhos que explorassem a capacidade de produção de compostos oriundos do metabolismo secundário naqueles organismos.

A literatura tem mostrado exemplos onde a distribuição geográfica de um indivíduo interfere na expressão e síntese de compostos do metabolismo secundário. Culberson e colaboradores (1977) demonstraram que para o fungo liquenizado *Cladonia chlorophae*, os níveis de ácido fumarprotocetrárico foram menores na costa americana da Carolina do Norte do que nas montanhas Apalachias (Appalachian mountains), no interior do estado. Os autores interpretaram essa diferença como uma proteção contra as condições severas presentes nas montanhas. Se o ambiente influencia na produção de metabólitos secundários, devem ser observadas alterações ao longo de um gradiente de condições ambientais sobre a distribuição das espécies. Dessa forma, devido às diferenças climáticas entre as regiões Norte e Sul, a relação entre a produção de metabólitos e a localização geográfica pode ser evidenciada. Apesar de não ter sido feito o acompanhamento das diferenças de temperatura para as duas regiões de coleta exploradas neste estudo, é sabido que as temperaturas médias anuais do estado de SC, especificamente na região de Lauro Müller, são menores (19 °C, segundo a classificação de Köppen-Geiger) que aquelas para a região de Diamantina (22,1 °C segundo o INMET). Esse fator climático pode explicar o motivo do fungo coletado na região de Lauro Muller (UFSC-Pt 222) apresentar atividade antibacteriana, enquanto que os isolados de Diamantina não demonstraram apresentar essa capacidade.

Apesar do isolado em discussão apresentar halos de inibição de diâmetro similar ao do controle positivo frente às bactérias testadas, deve-se considerar que esse fungo possa potencialmente servir como modelo biotecnológico visando uma produção escalonada do composto de interesse. As facilidades de se utilizar isolados desse organismo como produtor de um composto antimicrobiano de interesse se devem ao fato dos mesmos apresentarem bom crescimento em biorreator (ROSSI, 2002), não havendo a necessidade de um investimento muito alto, uma vez que os materiais requeridos para a produção desse fungo em larga escala não possuem um custo elevado.

5.3 Análises qualitativas de metabólitos secundários

O extrato bruto do fungo com atividade antibacteriana (UFSC-Pt 222) e as frações acetato e butanólica foram solubilizados em etanol e

acrescidos de reagentes indicadores da presença de alcaloides (Meyer, Bertrand e Dragendorff). Na fração butanólica do extrato observou-se turbidez com posterior formação de um precipitado, indicando a presença de alcaloides (Figura 7), especialmente no tubo contendo o reagente de Dragendorff, o qual foi utilizado como revelador na cromatografia em camada delgada (Figuras 11B e C).

O extrato bruto e a fração acetato de etila não apresentaram variações expressivas na turbidez.

A reação de Shinoda permite a caracterização de compostos que contêm um núcleo alfa-benzopirona pela formação de coloração que pode variar desde laranja até vermelha (FALKENBERG *et al.* 2003). O teste consiste na adição de ácido clorídrico e limalhas de magnésio em tubos contendo o extrato bruto e as frações acetato de etila e butanol, a fim de se verificar a presença de flavonoides glicosídicos. A reação resultou em uma coloração alaranjada no tubo contendo a fração butanólica (Figura 8). Uma vez que a coloração vermelha indica presença desses compostos, pode-se supor que, devido à coloração alaranjada, existe a presença de flavonoides nas amostras.

As amostras foram também avaliadas quanto à presença de esteroides e triterpenoides a partir da reação de Liebermann-Buchard, envolvendo anidrido acético e ácido sulfúrico. Um resultado positivo é indicado pela alteração na coloração, que pode variar do amarelo ao azul. Essa alteração ocorre devido à desidratação e oxidação do sistema de anéis de ciclopentanoperidrofenantreno, formando um esteroide aromático (BURKE, 1974; XIONG, 2007).

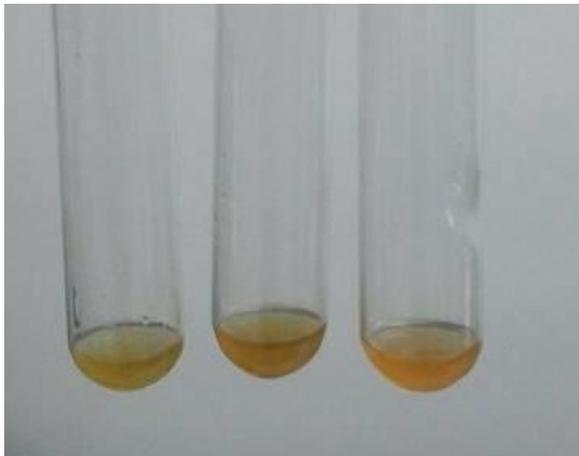


Figura 7. Análise qualitativa de alcaloides presentes na fração butanólica. Da esquerda para a direita: Meyer, Dragendorff e Bertrand.
Créditos: do Autor.

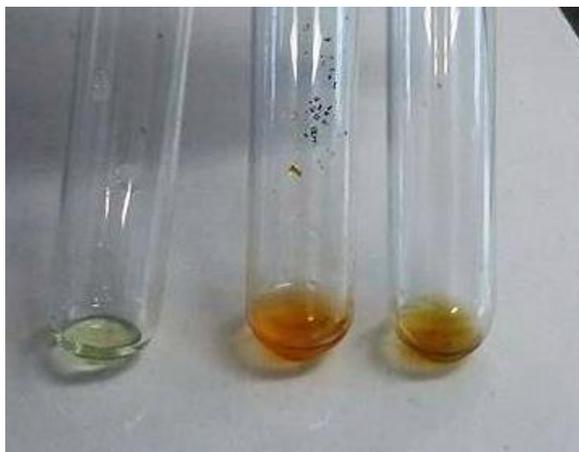


Figura 8. Reação de Shinoda para análise qualitativa de flavonoides na fração butanólica. O tubo do centro contém o extrato adicionado dos reagentes, enquanto que o tubo da esquerda contém a solução branco e o da direita somente o extrato.
Créditos: do Autor.



Figura 9. Reação de Liebermann-Burchard para análise qualitativa de esteroides. O tubo-teste (centro) contém o extrato acrescido dos reagentes. Tubo da esquerda contém a solução branco e o da direita o extrato. Créditos: do Autor.

A figura 9 mostra que o tubo-teste contendo as amostras e os reagentes mostrou uma leve alteração para uma coloração amarelada. Porém, não foi observada a coloração azul, esperada para essa avaliação. Dessa forma, a análise qualitativa foi negativa para esteroides.

A tabela 2 sintetiza os resultados obtidos nas análises qualitativas quanto à presença de alcaloides, flavonoides e esteroides no extrato bruto e frações.

Tabela 2. Análise qualitativa de alcaloides, flavonoides e esteroides presentes no extrato bruto e frações do fungo UFSC-Pt 222.

Extrato	Alcaloides	Flavonoides	Esteroides
EB	-	-	-
FAe	-	-	-
FB	+	+	-

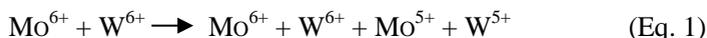
EB: extrato bruto; FAe: fração acetato de etila; FB: fração butanólica; - indica ausência e + indica presença de cada composto.

5.4 Avaliação da atividade antioxidante

5.4.1 Teor de fenólicos (Método de Folin-Ciocalteu)

Uma vez que a atividade antioxidante está relacionada à quantidade de compostos fenólicos presentes nos extratos, entre eles os flavonoides, avaliou-se o teor destes compostos no isolado fúngico que apresentou atividade antibacteriana, aquele isolado da área afetada pela exploração do carvão mineral (UFSC-Pt 222)

A técnica empregada para a determinação de compostos fenólicos utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu, que consiste de uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico ($H_3Mo_{12}PO_{40}$) e fosfotungústico ($H_3W_{12}PO_{40}$), no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ (Equação 1). Em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul (azul da Prússia). Nestes, a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6, e a coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras.



Na fração butanólica foi encontrado o valor de 46,96 mg de ácido gálico por grama de amostra. A fração acetato de etila apresentou 30,77 mg de ácido gálico por grama de amostra (Tabela 2). O extrato bruto não foi analisado por apresentar baixo rendimento.

5.4.2 Teor de flavonoides

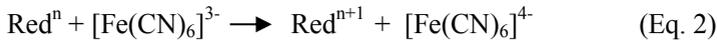
Para a determinação do conteúdo de flavonoides nas amostras foi utilizado um teste que tem como fundamento a formação de um anel estável contendo seis radicais do átomo de alumínio, proveniente do reagente $AlCl_3$, com o flavonoide, proveniente da amostra. A formação deste complexo entre o alumínio e o flavonoide provoca um deslocamento batocrômico, ou seja, a banda de absorção se desloca para um comprimento de onda maior, gerando uma intensificação da absorção que é analisada por espectrofotometria de UV/VIS.

Os valores obtidos nessa análise foram de 0,09 mg de quercetina por grama de amostra de fração acetato de etila e 0,18 mg de quercetina por grama de fração butanólica. Pode-se observar que a fração butanólica possui o dobro do conteúdo de flavonoides que a fração

acetato de etila, que está de acordo com o maior conteúdo de fenólicos encontrados na fração butanólica.

5.4.3 Determinação do potencial redutor

Um dos métodos mais utilizados na avaliação da capacidade antioxidante de uma amostra é o teste do potencial redutor. O método baseia-se na reação de redução de íons férricos (Fe^{+3}) a íons ferrosos (Fe^{+2}) por compostos elétron-doadores (Red). Dessa forma, os íons ferricianeto ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) são reduzidos a ferrocianeto ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) (Equação 2) que, por sua vez, formam um complexo com os íons ferro III de coloração azul intensa (azul da Prússia), apresentando pico de absorção em 720 nm ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) (Equação 3).



A quantificação de ácido ascórbico na fração acetato de etila foi de 338,92 mg de ácido ascórbico por grama de amostra, enquanto que na fração butanólica o valor encontrado foi de 346,10 mg de ácido ascórbico por grama de amostra, portanto a fração butanólica possui maior potencial redutor que a fração acetato de etila.

5.4.4 Determinação da ação sequestrante do radical livre DPPH

A atividade antioxidante do extrato e frações do fungo também foi determinada utilizando o teste com o radical livre estável DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil). Esta molécula apresenta coloração violeta intensa. Se uma substância presente no extrato ou frações é capaz de doar um átomo de H ao DPPH, a solução é descolorida.

O sequestro de radical pode ser promovido pela abstração de um átomo de hidrogênio (H^\cdot) agente redutor, geralmente um composto fenólico pelo DPPH, promovendo assim sua redução (Figura 10), formando consequentemente compostos radiculares mais estáveis que os presentes anteriormente (DPPH $^\cdot$). A partir desse princípio, pode-se determinar a sua atividade antioxidante via espectroscopia de UV-VIS (517 nm).

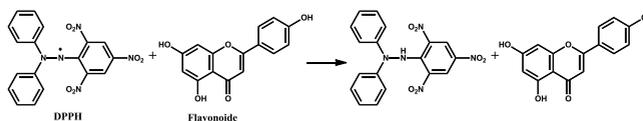


Figura 10. Reação entre um flavonoide e o radical livre DPPH

Créditos: Gustavo Queiroz

A porcentagem de DPPH encontrada na fração butanólica foi de 62,63%, e na fração acetato de etila 28,03%. Dessa maneira, a porcentagem de atividade antioxidante foi de 37,37% para a fração butanólica e 28,03% para a fração acetato de etila.

A tabela 3 sintetiza os valores obtidos nos testes de avaliação da atividade antioxidante, porcentagem de DPPH, determinação do conteúdo de fenólicos e flavonoides para o isolado UFSC-Pt222. Pode-se observar que a fração butanólica possui maior conteúdo de fenólicos e de flavonoides e também a maior atividade antioxidante quando avaliado pelo teste com DPPH e pela determinação do potencial redutor.

Tabela 3. Determinação da atividade antioxidante, porcentagem de DPPH, análise de fenólicos, flavonoides totais e potencial redutor de frações obtidas do isolado fúngico UFSC-Pt 222 e da planta *Bunchosia armeniaca* (ciruela).

Extrato	Fenólicos (mg a.g./g amostra)	Flavonoides (mg QE/g amostra)	Potencial redutor (mg a.a./g amostra)	DPPH (%)	A.A. (%)
ISOLADO FÚNGICO UFSC-Pt 222					
EB	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
FAe	30,77	0,09	346,10	71,97	28,03
FB	46,96	0,18	338,92	62,63	37,37
PLANTA <i>Bunchosia armeniaca</i> (Queiroz, 2012)					
EB	45,98	18,68	146,60	29,40	70,60
FI	14,35	17,56	122,00	22,70	77,30
FH	21,94	9,80	127,20	16,10	83,90
FAe	72,43	52,78	270,30	66,90	33,10
FB	59,83	24,60	204,30	37,20	62,80

EB: extrato bruto; FI: fração insolúvel; FH: fração hexano; FAe: fração acetato de etila; FB: fração butanólica; N/D: não determinado; a.g.: ácido gálico; QE: quercetina; DPPH: 2,2-difenil-picril-hidrazil; A.A.: atividade antioxidante; a.a.: ácido ascórbico.

A comparação desses valores com os valores obtidos por Queiroz (2012) em estudo utilizando a planta *Bunchosia armeniaca* (tabela 2), demonstra que o fungo *P. microcarpus* UFSC-Pt 222 possui menor

quantidade de fenólicos e de flavonoides. Adicionalmente, apresentou baixa porcentagem de atividade antioxidante (< 50%), na concentração de 200 µg/mL.

Apesar do isolado UFSC-Pt 222 ter apresentado resultado negativo para esteroides e triterpenos (tabela 2), estudos utilizando *Pisolithus tinctorius*, uma das espécies mais conhecidas desse gênero, demonstraram que ela produz pisosterol, um triterpeno que possui atividade antioxidante contra células tumorais (MONTENEGRO *et al.*, 2004). Anteriormente, Suh e colaboradores (1991) haviam demonstrado atividade antifúngica por fenólicos produzidos por essa espécie em cultivo submerso.

Outros fungos, tais como os endofíticos, constituem uma fonte alternativa de substâncias para amenizar o efeito da oxidação causada pela liberação de radicais livres em tecidos e órgãos (HUANG *et al.*, 2007). Exemplos de fungos endofíticos com atividade antioxidante são *Pestalotiopsis microspora*, associado à planta *Terminalia morobensis*, que produz os metabólitos pestacina e isopestacina (HARPER *et al.*, 2003; STROBEL *et al.*, 2003), e *Cephalosporium* sp. e *Microsphaeropsis olivacea*, associados à *Trachelospermum jasminoides* e *Pilgerodendro uviferum*, respectivamente, produtores do metabólito grafislactona A (SONG *et al.*, 2005). Normalmente, além da capacidade antioxidante, esses compostos apresentam atividade anti-inflamatória, antiviral, antibacteriana e antitumoral.

Exemplos de antioxidantes mais comuns são o beta-caroteno (precursor da vitamina A), que atua na diferenciação celular e prevenção de tumores (BIANCHI e ANTUNES, 1999), certos minerais, responsáveis pela funcionalidade enzimática em enzimas dependentes de íons para conversão de oxidantes, processo antagônico à carcinogênese (MACHLIN e BENDICH, 1987), e os flavonoides (fenólicos encontrados em plantas), os quais inibem a peroxidação lipídica (BIANCHI e ANTUNES, 1999; SOARES, 2002). Outros fenólicos, como as catequinas encontradas no chá verde e a quercetina, podem inibir tumores. Em plantas, sabe-se que a atividade antioxidante normalmente está relacionada aos elevados níveis de fenóis encontrados nos extratos desses organismos (CAI *et al.*, 2004).

Alguns gêneros como *Aspergillus*, *Mucor*, *Neurospora*, *Rhizopus* e *Penicillium* produzem tanase, enzima extracelular produzida na presença de ácido tânico, responsável pela redução de taninos em ácido gálico e glicose (LEKHA e LONSANE, 1997). Essa enzima possui importante aplicação biotecnológica, podendo atuar na indústria farmacêutica pela produção de drogas antibacterianas e na indústria

alimentícia, agindo na redução de taninos presentes em alimentos como, por exemplo, sucos de frutas (MUKHERJEE e BANERJEE, 2006). Os taninos ocorrem em uma ampla variedade de vegetais, podendo ser encontrados nas raízes, folhas, frutos, sementes e cascas de plantas (AGUILAR e GUTIÉRREZ-SANCHEZ, 2001). Esses compostos pertencem a um grupo de fenólicos provenientes do metabolismo secundário das plantas (HASLAM, 1996).

Estudos com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) demonstram que compostos fenólicos, especialmente do grupo dos flavonoides, tendem a estimular o desenvolvimento de diversas espécies de FMA e a consequente colonização do fungo nas raízes, aumentando os benefícios que os fungos proporcionam às plantas (ELIAS e SAFIR, 1987; TSAI e PHILLIPS, 1991; BÉCARD *et al.*, 1992; BATISTA e SIQUEIRA, 1994; KAMINSKI *et al.*, 1994; SILVA-JÚNIOR e SIQUEIRA, 1997).

Em estudo avaliando a atividade antioxidante de trufas (*Terfezia claveryi* Chatin e *Picoa juniperi* Vittadini) e cogumelos comestíveis (*Lepista nuda*, *Lentinus edodes*, *Agrocybe cylindracea*, *Cantharellus lutescens* e *Hydnum repandum*), Murcia *et al.* (2002) observaram que, em comparação com antioxidantes alimentícios, os fungos analisados apresentaram porcentagens de inibição de oxidação maiores que os antioxidantes comerciais testados (α -tocoferol, BHA, BHT e galato de propila).

Kasuga *et al.* (2006) estudaram a atividade antioxidante de dois pigmentos isolados do fungo ectomicorrízico *Suillus bovinus* em comparação aos antioxidantes BHA e tocoferol, os quais demonstraram atividade eficiente em sistema de emulsão.

Esses relatos indicam que, apesar de não existirem muitos estudos sobre a atividade antioxidante de fungos, em especial basidiomicetos, esses organismos produzem substâncias com essa capacidade.

5.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Com a finalidade de estimar a composição química dos extratos e frações do fungo que apresentou atividade antibacteriana (UFSC-Pt 222), foi realizada cromatografia em camada delgada com o extrato bruto e fração butanólica. Utilizou-se como eluentes o sistema de solventes CHCl_3 :EtOH 10:90 (v/v). Após o desenvolvimento da cromatografia, o cromatograma foi visualizado pela revelação do mesmo com anisaldeído sulfúrico (Figura 11). Tendo em vista que os compostos foram deslocados com o uso de um sistema de solventes

muito polar, pode-se sugerir que os mesmos também sejam de alta polaridade.

O cromatograma da fração acetato de etila (AcOEt) mostrou apenas duas manchas, uma no centro e outra próxima à borda superior da placa (Figura 12), Com sistema de solventes Hexano:AcOEt 70:30 (v/v). Em comparação com os cromatogramas desenvolvidos para o extrato bruto e fração butanol, a fração acetato de etila mostrou-se com menor número de compostos e menos polares. Esta amostra foi então encaminhada para análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e por espectroscopia de infravermelho (IV) a fim de se verificar a possível classe de metabólitos existentes nesta fração.

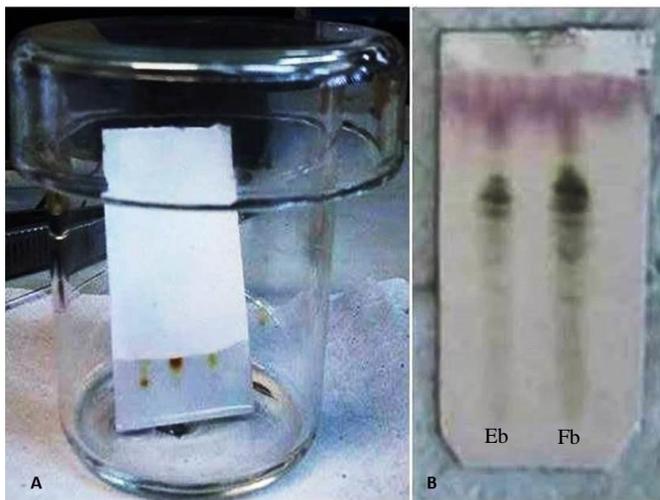


Figura 11. A) Placa cromatográfica em contato com o sistema de solventes composto por CHCl_3 :EtOH 10:90 (v/v). B) Cromatografia em camada delgada utilizando extrato bruto (Eb) e fração butanólica (Fb) revelada com reagente anisaldeído.

Créditos: do Autor.

No cromatograma do extrato bruto e da fração butanólica foram observadas duas manchas mais aparentes na revelação com anisaldeído sulfúrico (Figura 13A). A fim de se verificar se as substâncias coradas pertenciam à classe dos alcaloides, uma nova placa cromatográfica foi desenvolvida com o extrato bruto e as frações acetato de etila e butanol, utilizando reagente de Dragendorff como revelador (Figuras 13B e C). A coloração em tons de amarelo e marrom é um indicativo da presença de alcaloides nas amostras. Portanto, no extrato bruto e na fração acetato

de etila foi observada a presença de alcaloides. Na análise qualitativa, somente a fração butanólica foi positiva para a presença desses compostos.



Figura 12. Cromatograma do extrato bruto, fração butanólica e fração acetato de etila.

Créditos: do Autor.

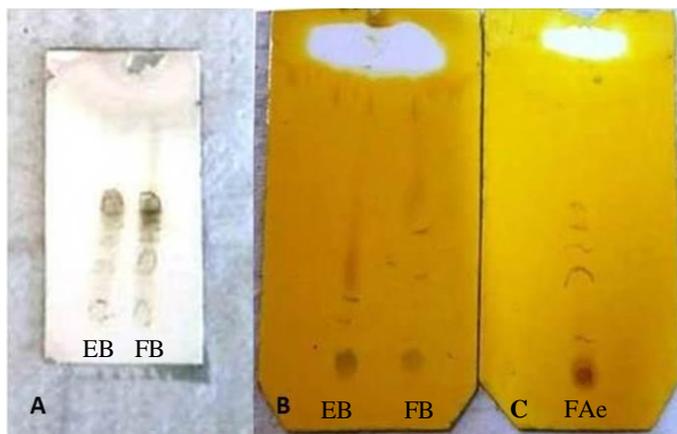


Figura 13. Cromatografia em camada delgada. A) Extrato bruto e fração butanólica reveladas com reagente anisaldeído. B) contém o extrato bruto e a fração butanólica. C) contém a fração acetato. Ambas as placas foram reveladas com reagente indicador para alcaloides (Reagente de Dragendorff).

Créditos: do Autor.

5.5 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

Nas análises cromatográficas observou-se que a fração acetato de etila apresentou menor número de manchas na CCD, além de possuir compostos pouco polares que se deslocaram a uma altura acima do esperado. Com a finalidade de se obter um espectro que permitisse a visualização dos grupos funcionais presentes na amostra, foi realizada a ressonância magnética nuclear de ^1H .

Inicialmente a amostra foi solubilizada em metanol deuterado, porém não se observaram muitos picos devido à baixa solubilidade da amostra (Figura 14).

Uma nova tentativa de análise de RMN de ^1H utilizando acetona deuterada como solvente mostrou um espectro com maior quantidade de picos. Na figura 15 pode-se observar a ocorrência de um pico em 12,24 ppm, indicativo de um hidrogênio de aldeído, e um pico em 7,67 ppm, corresponde a hidrogênios aromáticos. Os picos entre 4 e 5 ppm indicam a presença de hidrogênios ligados a carbonos, que estão ligados, por sua vez, a oxigênios ($\text{H}-\text{C}-\text{O}$). Os demais picos em campo alto, entre 1,93 a 0,13 ppm correspondem a hidrogênios ligados a carbonos sp^3 , sp^2 e sp .

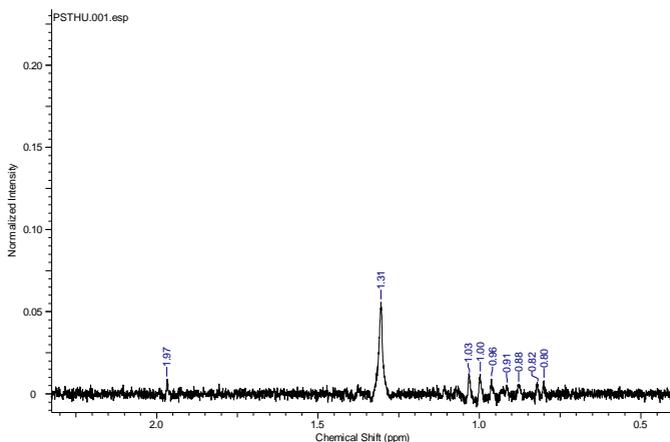


Figura 14. Espectro de RMN ^1H da fração acetato de etila do isolado UFSC-Pt 222 solubilizada em metanol deuterado.

Créditos: do Autor.

A observação do conjunto destes picos, em especial os picos em campo alto, sugere que o composto majoritário de interesse seja um triterpeno ou esteroide, embora o resultado do teste analítico tenha sido negativo para esta classe de compostos.

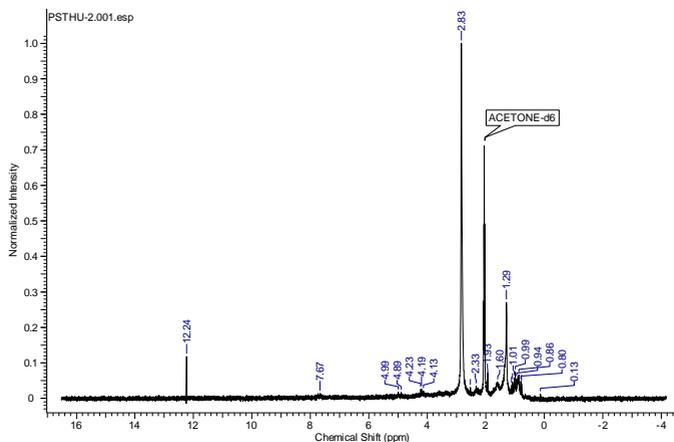


Figura 15. Espectro de RMN ^1H da fração acetato de etila do isolado UFSC-Pt 222 solubilizada em acetona deuterada.

Créditos: do Autor.

5.6 Análises por espectroscopia de Infravermelho (IV)

A espectroscopia de infravermelho (IV) estuda a vibração dos átomos da molécula ao receber uma radiação. É obtida geralmente pela passagem da radiação de IV através da amostra e pela determinação da radiação incidente absorvida a determinada energia. A energia de cada pico em um espectro de absorção corresponde à frequência de vibração de parte da molécula da amostra. É uma técnica muito importante na análise orgânica qualitativa, sendo amplamente utilizada nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas (LOPES e FASCIO, 2004). Entre as vantagens de se utilizar essa ferramenta estão a rapidez, o baixo custo, o uso de produtos não tóxicos, e o fato da análise das amostras não ser destrutiva (LEVASSEUR-GARCIA, 2012).

Para a verificação da classe de grupos funcionais existentes na amostra fúngica, a fração butanol foi submetida à análise por espectroscopia de Infravermelho (Figura 16). Neste caso, observa-se a

presença de uma banda intensa em $3383,72\text{ cm}^{-1}$ indicativas de grupos O – H, bandas em 2935 e 2902 cm^{-1} , indicativas de absorção de ligação C – H de carbonos alifáticos sp^2 e sp^3 , e uma banda intensa em 1032 cm^{-1} , estiramento característico de absorção de ligações C – O.

A análise conjunta destes dados indica a presença de compostos altamente hidroxilados, porém essas substâncias são comuns para diversas substâncias.

A presença de uma banda incomum para materiais de natureza como a do isolado UFSC-Pt222 em 1641 cm^{-1} pode indicar um grupo funcional das olefinas (alcenos), caracterizado pelas regiões entre 1680 – 1630 cm^{-1} (LOPES e FASCIO, 2004).

Terpenos, especificamente monoterpênicos, são olefinas ativadas que podem ser biotransformadas por fungos filamentosos, leveduras, bactérias, entre outros organismos (VAN DYK *et al.*, 1998; CARBALLEIRA *et al.*, 2004; CRAMAROSSA *et al.*, 2005).

Em análise de RMN de ^{13}C e IV, Zamuner e colaboradores (2005) verificaram a presença de quatro triterpenos derivados de lanostano (pisosterol, epi-pisosterol, agnosterol e lanosterol), além de um novo triterpeno, pisosterol, em *P. tinctorius*. Nessa ocasião, a análise por IV mostrou que os triterpenos apresentaram estiramentos entre 3463 – 3443 , 2927 – 2924 , 2877 – 2853 , 1739 – 1738 e 1636 – 1630 cm^{-1} .

Uma vez que o valor de 1641 cm^{-1} foi encontrado no presente trabalho, a substância de interesse pode ser um triterpenoide, devido à proximidade do valor encontrado no trabalho de Zamuner e colaboradores (2005), além de estar entre os valores característicos do grupamento das olefinas (1680 – 1630 cm^{-1}), como mencionado anteriormente.

O mecanismo de ação antimicrobiano dos terpenos ainda não está totalmente elucidado, entretanto acredita-se que esteja relacionado com a ruptura da membrana plasmática pelos compostos lipofílicos presentes nos terpenos (COWAN, 1999).

Tendo em vista a possibilidade da substância de interesse ser um triterpenoide, isso justificaria a baixa atividade antioxidante pelo fungo, uma vez que existe um grande número de hidroxilas, as quais não possuem natureza fenólica e, dessa forma, não geram radicais livres estéreis para ressonância.

Considerando que a análise qualitativa foi negativa para terpenos, investigações futuras são necessárias para elucidar a real identidade do composto identificado no espectro de infravermelho. Somente de posse dessa informação será possível determinar se moléculas dessa natureza estão sendo produzidas pelo fungo estudado nesse trabalho.

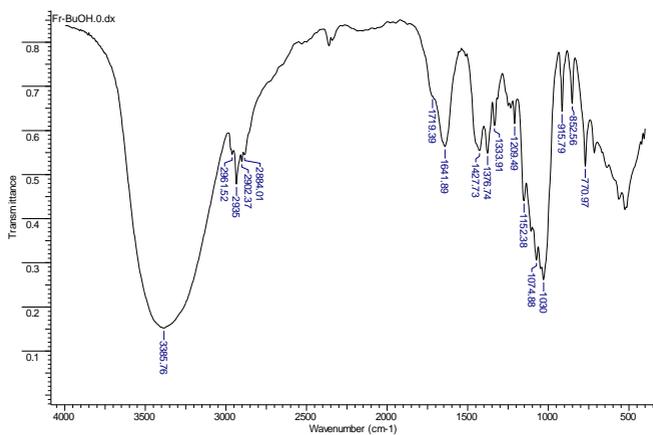


Figura 16. Espectro de Infravermelho referente à fração butanólica do fungo UFSC-Pt 222.

Créditos: do Autor.

6. CONCLUSÕES

- O fungo *Pisolithus microcarpus*, isolado UFSC-Pt 222, obtido de área impactada pela mineração de carvão, apresentou atividade antibacteriana frente às cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* empregadas no ensaio de difusão em ágar. Por outro lado, os isolados de área não impactada não apresentaram essa atividade.
- Os exsudatos do fungo D17 não apresentaram atividade antibacteriana no ensaio de difusão em ágar.
- A análise qualitativa utilizando o extrato e frações indicou a presença de alcaloides e flavonoides em baixas quantidades na fração butanólica do isolado oriundo de área degradada pela mineração de carvão.
- Os ensaios de determinação de fenólicos e flavonoides e atividade antioxidante avaliada pela captura de radicais livres pelo DPPH e pelo teste do potencial redutor culminaram em resultados pouco expressivos para os compostos/variáveis analisadas.
- As análises por RMN de ^1H e IV sugerem que as substâncias responsáveis pela atividade antibacteriana do fungo UFSC-Pt 222 pertencem à classe dos triterpenos e/ou esteroides, fato que justifica a baixa atividade antioxidante do fungo.

REFERÊNCIAS

- ABREU, P.M. **Produtos naturais do fungo *Pisolithus tinctorius*** (Tese). Universidade Nova de Lisboa, 1987.
- ADRIANO, D.C. Trace elements in terrestrial environments: biochemistry, bioavailability and risks of metals. 2a edição. **Springer Verlag**, 871 p, 2001.
- AGUILAR, C.N.; GUTIÉRREZ-SANCHEZ, G. Review: Sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Science Technology International**, v. 7, p.373–382, 2001.
- 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.
- AQUEVEQUE, P.; ANKE, T.; SAÉZ, K.; SILVA, M.; BECERRA, J. Antimicrobial activities of submerged cultures of Chilean Basidiomycetes. **Planta Medica**, v. 76, p. 1787–1791, 2010.
- 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.
- AYALA, N.; OCHOA, C. **Hongos conocidos de Baja California**. Mexicali, B.C.: UABC: SEP, 164 p, 1996.
- 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, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 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.

BATISTA, M.J. & SIQUEIRA, J.O. Efeito de flavonóides na germinação de esporos e no crescimento assimbiótico do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora gigantea*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 6, p. 127–134, 1994.

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.

BÉCARD, G.; DOUDS, D.D.; PFEFFER, P.E. Extensive *in vitro* growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonoids. **Applied Environment Microbiology**, v. 58, p. 821–825, 1992.

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

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

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123–130, 1990.

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

BONNASSIS, P.A.P. **Caracterização de isolados fúngicos ectomicorrízicos na promoção do crescimento e na colonização radicular de *Eucalyptus dunnii* Maiden** (Dissertação). Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

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

BURGESS, T.I.; MALAJCZUK, N.; DELL, B. Variation in *Pisolithus* based on morphological and cultural characteristics and analysis of polypeptides using 1D-SDS PAGE. **Mycological Research**, v. 99, p. 1–13, 1995.

BURKE, R. W.; DIANONDSTONE, B. I.; VELAPOLDI, R. A.; MENIS, O. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, n. 7, 794–801, 1974.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, p. 2157–2184, 2004.

CALIXTO, J.B.; JR., J.M.S. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78 (Suplemento 1), p. 98–106, 2008.

CAMELINI, C.M.; GOMES, A.; CARDOZO, F.T.G.S.; SIMÕES, C.M.O.; ROSSI, M.J.; GIACHINI, A.J.; PETRUS, J.C.C.; De MENDONÇA, M.M. Production of polysaccharide from *Agaricus subrufescens* Peck on solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 2, 2012.

CARBALLEIRA, J.; VALMASEDA, M.; ALVAREZ, E.; SINISTERRA GAGO, J.V. *Gongronella butleri*, *Schizosaccharomyces octosporus* and *Diplogelasinospora grovesii*: novel microorganisms useful for the stereoselective reduction of ketones. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 6, p. 611–623, 2004.

CESAR, R.G.; COELHO, M.B.; ALVARO, T.T.; COLONESE, J.P.; CASTILHOS, Z.C.; EGLER, S.G.; BIDONE, E.D.; POLIVANOV, H.; ALEXANDRE, N.Z. Disposição continental de resíduos de mineração de carvão: drenagem ácida, ecotoxicidade aguda e biodisponibilidade de metais. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, n. 2, p. 17–22, 2013.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999.

CRAMAROSSA, M. R.; NADINI, A.; BONDI, M.; MESSI, P.; PAGNONI, U.M.; FORTI, L. Biocatalytic reduction of (+) and (-) carvone by bacteria. **Comptes Rendus Chimie**, v. 8, n. 5, p. 849–852, 2005.

CULBERSON, C. F.; CULBERSON, W. L. ARWOOD, D. A. Physiography and fumarprotocetraric acid production in the *Cladonia chlorophaea* group in North Carolina. **Bryologist**, v. 80, p. 71–75, 1977.

DEACON, J.W. **Fungal Biology**. 4 ed. Blackwell Publishing, 384 p., 2005.

DEDUKE, C.; TIMSINA, B.; PIERCEY-NORMORE, M.D. **Effect of Environmental Change on Secondary Metabolite Production in Lichen-Forming Fungi**, International Perspectives on Global Environmental Change, Dr. Stephen Young (Ed.), 2012, ISBN: 978-953-307-815-1, InTech, Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/international-perspectives-on-global-environmental-change/effect-of-environmental-change-on-secondary-metabolite-production-in-lichen-forming-fungi>.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308–316, 2000.

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-MEKKAWY, S.; MESELHY R. M.; NAKAMURA, N.; TEZUKA, Y.; HATTORI, M.; KAKIUCHI, N.; SHI, K. Anti-hiv-1 and anti-hiv-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1651–1657, 1998.

ELIAS, K.S.; SAFIR, G.R. Hyphal elongation of *Glomus fasciculatus* in response to root exudates. **Applied Environment Microbiology**, v. 53:1928–1933, 1987.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. **Introdução à análise fitoquímica**. p. 229–245. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia – da planta ao medicamento*. Porto Alegre: EFRGS, 2003.

FIDALGO, O. **Adições à história da micologia brasileira. I. A coleta mais antiga**. *Rickia*, v. 5, p. 1–3, 1970.

FONSECA, A.J. **Seleção de isolados de *Pisolithus* para mudas clonais de *Eucalypto* em viveiro comercial** (Dissertação). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, 2013.

FUJIMOTO, H.; NAKAYAMA, M.; NAKAYAMA, Y.; YAMAZAKI, M. Isolation and characterization of immunosuppressive components of three mushrooms, *Pisolithus tinctorius*, *Microporus flabelliformis* and *Lenzites betulina*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** (Tokyo), v. 42, n. 3, p. 694–697, 1994.

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.

GRAYER, R.J.; HARBORNE, J.B. A survey of antifungal compounds from higher plants. **Phytochemistry**, 37, p. 1982–1993, 1994.

GUERRERO, R.T.; HOMRICH, M.H. **Fungos macroscópicos do Rio Grande do Sul: Guia para identificação**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 1983.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

GUTFINGER, T. Polyphenols in olive oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, p. 966–968, 1981.

HARPER, J.K.; ARIF, A.M.; FORD, E.J.; STROBEL, G.A.; PORCO, J.A.; TOMER, J.D.P.; ONEILL, K.L.; HEIDER, E.M.; GRANT, D.M. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. **Tetrahedron**, v. 59, p. 2471–2476, 2003.

HASLAM, E. Natural polyphenol as drugs: possible modes of action. **Journal Natural Products**, v.59, p.202–205, 1996.

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

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J.F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.F.; ERIKSSON, O.E.; HUHNDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P.M.; LÜCKING, R.; LUMBSCH, H.T.; LUTZONI, F.; MATHENY, P.B.; MCLAUGHLIN, D.J.; POWELL, M.J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C.L.; SPATAFORA, J.W.; STALPERS, J.A.; VILGALYS, R.; AIME, M.C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G.L.; CASTLEBURY, L.A.; CROUS, P.W.; DAI, Y.C.; GAMS, W.; GEISER, D.M.; GRIFFITH, G.W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D.L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R.A.; HYDE, K.D.; IRONSDALE, J.E.; KÖLJALG, U.; KURTZMAN, C.P.; LARSSON, K.H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIADLIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J.M.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASO, E.; REEB, V.; ROGERS, J.D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J.P.; SCHÜBLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R.G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W.A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE, M.M.; WINKA, K.; YAO, Y.J.; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, p. 509–547, 2007.

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.

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

JULIÃO, L.S.; TAVARES, E.S.; LAGE, C.L.S.; LEITÃO, S. G. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl., p. 36–38, 2003.

KALOTAS, A.C. Aboriginal knowledge and use of Fungi. Fungi of Australia. Volume 1B. **Australian Nature Conservation Agency**. Austrália, 1996.

KAMINSKI, J.; FRIES, L.L.M.; SAFIR, G.R. **Efeito da rotação de culturas e da formononetina na colonização de raízes do capim pensacola por fungos MA**. In: Reunião brasileira sobre micorrizas. Micorrizas e manejo agroflorestal sustentável, v. 5, p. 47, Resumos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1994.

KASUGA, A.; AOYAGI, Y.; SUGAHARA, T. Antioxidant activity of fungus *Suillus bovinus* (L: Fr.) O. Kuntze. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 5, p. 1113–1115, 1995.

KASUYA, M.C.M.; COELHO, I.S.; CAMPOS, D.T.S.; ARAÚJO, E.F.; TAMAI, Y.; MIYAMOTO, T. Morphological and molecular characterization of *Pisolithus* in soil under eucalyptus plantations in Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 6, p. 1891–1898, 2010.

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.

KÖPPEN-GEIGERPEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences*, v. 11, p. 1633–1644, 2007.

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.

LEKHA, P.K.; LONSANE, B.K. Production and application of Tannic Acyl Hidrolase: state of the art. **Advances in Applied Microbiology**, v. 44, p. 215–260, 1997.

LEVASSEUR-GARCIA, C. **Infrared Spectroscopy Applied to Identification and Detection of Microorganisms and Their Metabolites on Cereals (Corn, Wheat, and Barley)**. *Agricultural Science*, p. 185–196, 2012.

LIMA, M.A. **Potencial biotecnológico de basidiomicetos isolados no estado do Paraná** (Dissertação). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

LIVERMORE, D.M. Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 66, p. 1941–1944, 2011.

LOPES, W.A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do Infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670–673, 2004.

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

LUCAS, E.H. Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other Holobasidiomycetes. **Antibiotic Chemotherapy**, v. 7, p. 1–4, 1957.

MACHLIN, M.J.; BENDICH, A. **Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients.** Symposium presented by the American Institute of Nutrition at the 71st Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology, p. 441–445, 1987.

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

MARINELLI, F.; GENILLOUD, O. **Antimicrobials: New and old molecules in the fight against multi-resistant bacteria.** Springer, 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.

MATTOS, E.C.; VIGANÓ, I.; DUTRA, R.C.L.; DINIZ, M.F.; IHA, K. Aplicação de metodologias FTIR de transmissão e fotoacústica à caracterização de materiais altamente energéticos – Parte II. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 722–728, 2002.

MENEZES, J.C.S.S. **Produção de coagulantes férricos na mineração de carvão.** (Tese) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

MIRANDA, J.C.C. de. Utilização das micorrizas na agricultura. 3. ed. **Revista e atualizada Planaltina: EMBRAPA-CPAC**, 13 p. (EMBRAPA-CPAC – Documentos, 20), 1993.

MIZUNO, T. Food function and medicinal effect of mushrooms fungi. **Food e Food Ingredients Journal of Japan**, n. 158, p. 55–70, 1993.

MONTENEGRO, R.C.; JIMENEZ, P.C.; FARIAS, R.A.F.; ANDRADE-NETO, M.; BEZERRA, F.S.; MORAES, M.E.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V. Cytotoxic Activity of pisosterol, a triterpene isolated from *Pisolithus tinctorius* (Mich.: Pers.) Coker e Couch, 1928. **Zeitschrift für Naturforsch**, 2004.

MORESCO, H.H.; QUEIROZ, G.S.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C. Chemical constituents and evaluation of the toxic and antioxidant activities of *Averrhoa carambola* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 319–324, 2012.

MUKHERJEE, G.; BANERJEE, R. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by a co-culture of *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus foetidus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 207–212.

MURCIA, M.A.; Martínez-Tomé, M.; Jiménez, A.M.; Vera, A.M.; Honrubia, M.; Parras, P. Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): Losses during industrial processing. **Journal of Food Protection**, n. 10, p. 1614–1622, 2002.

PACHECO, S.M.V.; MORGADO, A. F.; JUNIOR, A. F. Biossíntese de vanilina pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* MIP 95001. **Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 1–9, 2013.

PENALVA, M.; ARST, H. N. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 426–446, 2002.

PHILLIPS, R. **Mushrooms and other fungi of North America**. 2 ed. Firefly Books, 320 p., Nova York, 2005.

PROENÇA DA CUNHA, A.; SILVA, A.; ROQUE, O. **Marmeleiro**. In: **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, 2003.

QUEIROZ, G.S. **Flavonoides de Bunchosia armeniaca e derivados de 2-arilideno-1- α -tetralona: Obtenção e atividades biológicas** (Dissertação). Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

RAI, M.; VARMA, A. **Diversity and biotechnology of ectomycorrhizae**. Springer-Verlag, 2011.

ROBLES-HERNÁNDEZ, L.; GONZÁLEZ-FRANCO, A.C.; SOTO-PARRA, J.M.; MONTES-DOMÍNGUEZ, F. Review of agricultural and medicinal applications of basidiomycete mushrooms. **Tecnociencia Chihuahua**, v. 2, p. 95–108, 2008.

RODRIGUES, M.L.; LIRA, R.K. Perfil fitoquímico e biológico do extrato hidroalcoólico dos rizomas do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v.8, n.1, p. 44–52, 2013.

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.

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

SECKBACH, J. **Life as we know it**. Springer Science & Business Media, v. 10, 2006.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug Resistance, and disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, p. 213–267, 2011.

SHUEFFLER, A.; ANKE, T. Fungal natural products in research and development. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 1425–1448, 2010.

SILVA, R.R.; COELHO, G.D. **Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas**. Instituto de Botânica – IBt, Jardim Botânico de São Paulo, 2006.

SILVA, N.L.A.; MIRANDA, F.A.A.; CONCEIÇÃO, G.M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, 2010.

SILVA, C.M.A. **Metabólitos secundários de plantas do semi-árido de Pernambuco – uma inovação no controle de fitopatógenos** (Dissertação). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SILVA-JÚNIOR, J.P.; SIQUEIRA, J.O. Aplicação de formononetina sintética ao solo como estimulante da formação de micorriza no milho e na soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 9, p. 35–41, 1997.

SIMÕES, C.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMÃO, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 1999.

SINGH, K.V.; SHUKLA, N.P. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. **Fitoterapia**, v. 55, p. 313–315, 1984.

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.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71–81, 2002.

SONG, Y.C.; HUANG, W.Y.; SUN, C.; WANG, F.W.; TAN, R.X. Characterization of graphis lactone A as the antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, an endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 506–509, 2005.

SOUZA, L.; SILVA, G.; OLIVEIRA, V. Eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de fósforo e na promoção do crescimento de eucalipto. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 39, n. 4, p. 349–355, 2004.

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

- STOCKER-WORGOTTER, E. Experimental studies of the lichen symbiosis: DNA-analyses, differentiation and secondary chemistry of selected mycobionts, artificial resynthesis of two- and tripartite symbioses. **Symbiosis**, v. 30, p. 207–227, 2001.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.
- STROHL, W.R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug discovery today**, v. 5, n. 2, p. 39–41, 2000.
- SUAY, I.; ARENAL, F.; ASENSIO, F.J.; BASILIO, A.; CABELLO, M.A.; DIEZ, M.T.; GARCIA, J.B.; GONZALEZ, D.E.L.; VAL, A.; GORROCHATEGUI, J.; HERNANDEZ, P.; PELAEZ, F.; VICENTE, M.F. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 78, p. 129–139, 2000.
- SUH, H.W.; CRAWFORD, D.L.; KORUS, R.A.; SHETTY, K. Production of antifungal metabolites by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* strain SMF. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, p. 29–36, 1991.
- TAINTER, M.L.; FERRIS, A.J. **Aspirin in modern therapy; a review**. New York: Bayer Co, 1969.
- 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.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 934 p, 2012.
- TSAI, S.M.; PHILLIPS, D.A. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores *in vitro*. **Applied Environment Microbiology**, v. 57, p. 1485–1488, 1991.
- TSANTRIZOS, Y.S.; KOPE, H.H.; FORTIN, J.A.; OGILVIE, K.K. Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1113–1118, 1991.

- VALGAS, C. **Avaliação de métodos de triagem para avaliação de atividade antibacteriana de produtos naturais** (Dissertação). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
- VAN DYK, M.S.; RENSBURG, E.; RENSBURG, I.P.B.; MOLELEKI, N. Biotransformation of monoterpenoid ketones by yeasts and yeast-like fungi. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, n. 1–4, p. 149–154, 1998.
- VIEIRA, L.M.; SOUSA, M.S.B.; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 888–897, 2011.
- 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.
- WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to Fungi**. 3^a ed, 2007.
- WILKINS, W.H. Investigation into the production of bacteriostatic substances by fungi. Preliminary examination of the fifth 100 species, all Basidiomycetes, mostly of the wood-destroying type. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 27, p.140–142, 1946.
- WOISKY, R. G; SALATINO, A. Analysis os propolis: some parameters ond prodecore for chemical fuality control. **Journal Apicultural Research**, 1998.
- XIONG, Q.; WILSON, W. K.; PANG, J. The Liebermann–Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangment of Cholesterol in Acid. **Lipids**, v. 42, 87–96, 2007.
- YANG, Q.Y.; JONG, S.C. Medicinal mushrooms in China, **Mushroom Science**, v. XII, n. 1, p. 631–643, 1989.
- ZAMUNER, M.L.M.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; LIMA, M.I.S.; RODRIGUES-FILHO, E. Lanostane Triterpenes from the Fungus *Pisolithus tinctorius*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n. 4, p. 863–867, 2005.