



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CONSTITUINTES
DOS EXTRATOS DE *Lentinus citrinus* Walley & Rameloo DPUA
1535 E *Pleurotus florida* Singer DPUA 1534.**

Bolsista: Michelle Soares Martins, CNPq

MANAUS
2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



**RELATÓRIO FINAL
PIB-S/0059/2009**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS
ORGÂNICOS DE *Lentinus citrinus* Walley & Rameloo DPUA 1535 E
Pleurotus florida Singer DPUA 1534.**

Bolsista: Michelle Soares Martins, CNPq
Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira
Colaborador: Prof^o Antônio Batista da Silva

MANAUS - AMAZONAS
2010

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas.

Na natureza nada se cria,
nada se perde, tudo se transforma.

Antoine Lavoisier

RESUMO

Estudos citam que a biomassa e/ou princípio ativo oriundo de espécies de cogumelos apresentam atividade terapêutica. Nesta pesquisa foram investigados compostos de basidiomas desidratados de *Lentinus citrinus* e *Pleurotus florida*, cogumelos comestíveis. Os basidiomas desidratados foram triturados em processador para obtenção dos extratos orgânicos. O solvente orgânico (50mL) foi adicionado a 20 g desta biomassa, seguindo-se a evaporação do solvente. O extrato seco foi diluído em solução alcoólica 50% até a obtenção de uma solução 1% e 0,5%. Seguido a esse procedimento, os extratos foram filtrados em membrana polietersulfônica esterilizada (0,22 μm). Como controle positivo foi utilizado Itraconazol a 1%. A reativação das culturas dos microorganismos-teste foi realizada por transferência do fragmento da cultura para ágar Sabouraud com glicose 2% (p/v), em tubo de ensaio. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo Método de difusão em ágar em *cup plates*. Em cada cultivo dos microorganismos-teste foi preparada uma suspensão celular através da adição de água destilada esterilizada. De cada suspensão celular foi retirado 200 μL para ser semeado na superfície do meio sólido, em estria, até formação de uma camada uniforme. Em cada cultivo foi inoculado 100 μL ou 200 μL de cada extrato orgânico. Todos os testes de antibiose foram realizados em triplicata 24 horas, a 25 °C. A atividade antimicrobiana foi expressa em milímetros, medindo-se o diâmetro do halo. Após a padronização dos resultados foi determinada a concentração inibitória mínima dos extratos selecionados. Os resultados dos testes de antibiose mostraram que *Fusarium oxysporum* e *Candida albicans* tiveram seu crescimento inibido pelos extratos orgânicos *L. citrinus* ACE 0,5% e 1%, *P. florida* ACE 0,5% e 1% e *L. citrinus* MET 0,5% e 1%, *L.citrinus* ACE 1% e *P. florida* MET 1%, respectivamente quando utilizados a 200 μL . *A. niger* mostrou-se sensível a todos os extratos. A concentração inibitória mínima determinada para *F. oxysporum* e *C. albicans*, sensíveis na avaliação preliminar, foi de 1,25 $\mu\text{g/mL}$ (extratos 0,5%) e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (extratos 1%). Conclui-se que os basidiomas de *L. citrinus* e *P. florida* podem ser objeto de futuras pesquisas e uma fonte promissora de substâncias com atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: *Lentinus*; *Pleurotus*; Extrato orgânico; Atividade antimicrobiana.

SUMÁRIO

1. JUSTIFICATIVA.....	8
2. INTRODUÇÃO.....	9
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1. Considerações iniciais.....	11
3.2. Cogumelos como fonte de compostos bioativos.....	12
3.3. Atividade antimicrobiana.....	14
4. OBJETIVOS.....	16
4.1. Objetivo geral.....	16
4.2. Objetivo específico.....	16
5. MATERIAL e MÉTODO.....	17
5.1. Cogumelos como fonte de substâncias antagônicas.....	17
5.2. Obtenção dos extratos para os testes de antagonismo.....	17
5.3. Microorganismo – Teste.....	18
5.3.1.Reativação das culturas.....	18
5.3.2. Determinação da atividade antimicrobiana em meio sólido (Método de difusão em ágar).....	18
5.4. Análise Estatística.....	19
5.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	19
6. RESULTADOS.....	21
6.1. Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos de <i>L. citrinus</i>	21
6.2. Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos de <i>P. florida</i>	22
6.3. Concentração Inibitória Mínima.....	23

7. CONCLUSÃO.....	25
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

1. JUSTIFICATIVA

Lentinus citrinus é uma espécie que está atraindo a atenção para estudos científicos devido as suas propriedades medicinais e por tratar-se de cogumelo comestível, inclusive, comumente consumida no Chile. Tem ocorrência em região de clima tropical e subtropical e já foi identificado na Região do Nordeste brasileiro. Está sendo produzido em resíduo agro-florestal em Manaus, no Estado do Amazonas, uma pesquisa que tem como finalidade investigar a potencialidade medicinal desse cogumelo (RENNEBRA, 2005).

Da mesma forma, *Pleurotus florida* tem ganhado popularidade pela disponibilidade e a facilidade de se encontrar substratos utilizados no seu cultivo. Estudos demonstram a atividade de extratos de *P. florida* como agentes antimicrobianos, hipoglicemiantes e hipocolesterolêmicos (HEARST *et al.*, 2009).

Levando em consideração a carência de estudos a cerca das propriedades de tais espécies justifica-se a realização desta pesquisa no contexto amazônico, região na qual os cogumelos têm sido pouco explorados para fins medicinais.

A importância medicinal dos cogumelos comestíveis e a disponibilidade da biomassa de *L. citrinus* e *P. florida* favorecem a realização deste estudo com a finalidade de se verificar a atividade antimicrobiana de seus compostos contra linhagens de *Aspergillus niger* DPUA 1472, *Candida albicans* DPUA 1340, *Fusarium oxysporum* DPUA 271, *Penicillium janthinellum* DPUA 426 e *Trichosporon beigelli* DPUA 211, espécies de leveduras e fungos filamentosos importantes causadores de micoses oportunistas nos seres humanos. Da mesma forma, diversos estudos já citaram os benefícios da biomassa e/ou princípio ativo proveniente de estruturas de cogumelos comestíveis quanto a sua atividade antimicrobiana.

Além disso, o presente estudo visa contribuir a cerca do conhecimento e potencialidade biotecnológica de cogumelos comestíveis.

2. INTRODUÇÃO

Os cogumelos comestíveis representam um dos maiores recursos inexplorados como novas fontes de biocompostos para a promoção da saúde do homem, por isso são considerados como alimentos nutracêuticos ou funcionais fisiológicos. Diversos estudos citam que a biomassa e/ou princípio ativo oriundo de espécies de cogumelos tem atividade antitumoral, anticarcinogênico, antiviral, antiinflamatório, hipoglicemiante, hipocolesterolêmico, hipotensivo, entre outros (BRIZUELA et al., 1998; FURLANI; GODOY, 2005; FORTES; NOVAES, 2006).

De acordo com Smânia et al. (1995), os cogumelos têm sido utilizados na medicina popular para o tratamento de inúmeras doenças em regiões da África e América. No Brasil, esses macrofungos, inclusive, vêm sendo utilizados em regiões rurais de Santa Catarina, sul do Brasil, para o tratamento de lesões de pele. Essa potencialidade medicinal exercida, explica o crescente estudo na busca de substâncias capazes de inibir o crescimento microbiano.

Nesse contexto, Furlani e Godoy (2005) citam que shiitake (*Lentinus edodes*) fortifica e restaura o organismo, por isso vem sendo indicado para o tratamento de enfermidades que envolvam o enfraquecimento do sistema imune. Outra espécie de importância medicinal e terapêutica é o *Agaricus blazei*, descoberta no Brasil, utilizado na forma de cápsula, chás e também como alimento para prevenção de câncer, doenças do aparelho circulatório, digestivo e urinário, dentre outros.

Além dos efeitos terapêuticos da biomassa de cogumelos, várias substâncias já foram identificadas, como a lentinana (polissacarídeo), potencializador do sistema imune; lentionina, composto sulfurado, que tem ação antibacteriana e antifúngica e o dimetilsulfonil, metildissulfito (derivado de lentionina) que têm forte ação inibitória contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (HATVANI, 2001).

Brizuela et al. (1998) destaca também a importância dos basidiomicetos como fonte de metabólitos secundários, a exemplo dos terpenóides, que possuem propriedades antibiótica e antifúngica, os nucleosídeos, os quais são destacados na revisão de Shittu et al. (2005), como compostos com alto grau de atividade frente a *M. smegmatis*, além dos poliacetilenos, estes, por sua vez, mais amplamente caracterizados por apresentar mais de 50 compostos insaturados com atividade antimicrobiana isolada a partir de espécies de *Cortinellus*, *Daedalea*, *Marasmius*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Russula* entre outros.

Em vista disso, *Lentinus citrinus* e *Pleurotus florida* foram os cogumelos escolhidos para o presente estudo, devido à sua biodisponibilidade e a potencial propriedade antimicrobiana do citado gênero (ISHIKAWA et al., 2001; SHITTU et al., 2006). Este trabalho visa avaliar as propriedades antimicrobianas de constituintes dos cogumelos comestíveis disponíveis para análise frente a linhagens selecionadas de fungos patógenos, os quais representam importantes espécies causadoras de micoses oportunistas em seres humanos e, portanto, são de grande interesse na prática médica pela frequência com que acometem a população, assim como por simularem outras patologias, chegando-se a catalogar muitos casos como mortais (COELHO et al., 2005; RIBEIRO et al, 2003; TAVARES; PENTEADO, 2007).

Nesta contextualização, o emprego de novas substâncias antimicrobianas tem sido considerado em virtude do surgimento de agentes infecciosos cada vez mais resistentes à terapia antimicrobiana. Com o objetivo de minimizar o desenvolvimento da resistência multi-droga, pesquisas têm sido estimuladas para avaliar novas substâncias antimicrobianas capazes de eliminar o agente causador das infecções e servir como opções aos esquemas terapêuticos preconizados (HEARST et al., 2009; TAVARES; PENTEADO, 2007).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão visa abordar aspectos relacionados aos cogumelos comestíveis *Lentinus citrinus* DPUA 1535 e *Pleurotus florida* DPUA 1534 e sua atividade antimicrobiana, com ênfase nos estudos referentes à identificação de compostos bioativos por meio do método de difusão em ágar, além da determinação da concentração inibitória mínima.

3.1. Considerações iniciais

Os cogumelos são alimentos muito apreciados desde a idade antiga por se acreditar em seu elevado valor nutritivo e em seu potencial medicinal, além de serem classificados como uma especiaria nobre em pratos culinários. As propriedades dos cogumelos vão muito além do sabor exótico e das suas formas graciosas. Essas iguarias têm também funções terapêuticas, como prevenir doenças e aumentar a capacidade de defesa do organismo. Os fungos basidiomicetos são utilizados na produção de biomassa de alto valor funcional como para uso terapêutico e industrial. (POUCHERET, P.; FONS, F.; RAPIOR, S., 2006).

Conhecidos desde a Antigüidade por seus efeitos de cura, os cogumelos eram considerados pelos egípcios e chineses uma dádiva dos deuses. Os antigos romanos os chamavam de “alimento dos deuses” e por isso deviam ser servidos apenas em ocasiões especiais. Acreditavam que chegaram a Terra através de raios jogados por Júpiter durante uma tempestade. Na Grécia antiga, os guerreiros acreditavam que os cogumelos os provinham de força e coragem. Os chineses os consideravam “elixir da vida”. Os índios mexicanos os utilizavam com propósitos terapêuticos e como alucinógenos em rituais religiosos e de feitiçarias. As civilizações orientais consagraram os cogumelos há milênios como alimento funcional, usando-os na gastronomia e na atividade medicinal (POUCHERET, P.; FONS, F.; RAPIOR, S., 2006).

No mundo ocidental sua disseminação é mais recente, mas já envolve um apreciável número de espécies. Os cientistas catalogaram 50.000 espécies de cogumelos e identificaram menos de 20.000 espécies de cogumelos diferentes. Alguns cientistas calculam que possa haver mais de 150.000 espécies de

cogumelos no reino dos fungos e, provavelmente, mais de 1,5 milhão de espécies totais (POUCHERET, P.; FONS, F.; RAPIOR, S., 2006).

Os biólogos descrevem menos de 5% de espécies de fungos. Mais de 600 espécies de cogumelos mostraram efeitos imunes, sendo as pesquisas focadas em uma gama mais estreita de menos de 50 espécies. (POUCHERET, P.; FONS, F.; RAPIOR, S., 2006)

3.2. Cogumelos como fonte de compostos bioativos

Os cogumelos medicinais mais pesquisados e que apresentam efeitos positivos incluem o maitake (*Grifola frondosa*), shiitake (*Lentinula edodes*), rei shi (*Ganoderma lucidum*), *Coriolus versicolor* ou *Trametes versicolor*, cogumelo do sol (*Agaricus blazei*), *Cordyceps sinensis*, juba-de-leão (*Hericium erinaceus*), e *Schizophyllum commune* (POUCHERET, P.; FONS, F.; RAPIOR, S., 2006).

Os principais alvos bioquímicos nos estudos das propriedades terapêuticas dos cogumelos são os polissacarídeos de ligação β (β glucanas), os heteropolissacarídeos e as glicoproteínas como agentes antitumorais e imunomoduladores, as fibras dietéticas como reguladores intestinais, as lecitinas na função de aglutinação de eritrócitos, os terpenóides como agente antitumoral e o lovastatin utilizado em cardiopatias (anticolesterol). (LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T.H.J.; JULICH, W., 2005)

Lentinula edodes (cogumelo “shiitake”) é um fungo basidiomiceto que apresenta propriedades nutricionais, medicinais e antibióticas. Compostos de interesse para o homem têm sido isolados do basidiocarpo e dos filtrados de cultura obtidos a partir do crescimento micelial. A atividade antibiótica de *L. edodes* foi demonstrada em experimentos envolvendo fungos, vírus e bactérias, a partir de compostos produzidos durante o crescimento micelial em laboratório assim como a partir de substâncias encontradas no Basidiocarpo. (LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T.H.J.; JULICH, W., 2005)

Na área médica, resultados positivos foram verificados com a utilização de *L. edodes* no combate a patógenos humanos, e também na ativação do sistema imunológico e na melhora de problemas de saúde como o colesterol, a asma e a úlcera. Entre as substâncias caracterizadas, destaca-se a lentinana, uma β -glucana

isolada do basidiocarpo por extração aquosa. A lentinana possui a capacidade de recuperar ou aumentar a resposta das células hospedeiras a substâncias biologicamente ativas, por estimular a maturação, diferenciação ou proliferação de células envolvidas nos mecanismos de defesa, aumentando a resistência do hospedeiro contra vários tipos de câncer e doenças infecciosas (HASSEGAWA, R.H., KASUYA, M.C.M., VANETTI, M.C.D., 2005).

De *Lentinus citrinus* isolaram dois tipos de sesquiterpenóides com atividade antimicrobiana. Enquanto, no mesmo trabalho, foi relatado o isolamento de três agentes antifúngicos obtidos de *Trametes pubesceris* e *Ganoderma lucidum*. (SHITTU et al., 2006).

Os fungos do gênero *Pleurotus* além de apresentarem propriedades nutricionais apresentam um vasto potencial de uso medicinal. Diversos trabalhos comprovam a existência de compostos terapêuticos, como por exemplo, a lecitina, que apresenta fator de coagulação sanguínea, e o D-glucano, produzido por *Pleurotus ostreatus*, que possui ação antitumoral e estimula o sistema imunológico. Conhece-se ainda sua ação antimicrobiana pela produção de antibióticos como, por exemplo, a pleurotina, produzida por *P. griseus*. Estudos científicos demonstram a capacidade de várias espécies do gênero *Pleurotus* de produzir agentes antimicrobianos. Já foram evidenciados resultados da atividade antimicrobiana de extratos obtidos de *P. ostreatus* frente à *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* (WISBECK, E.; ROBERT, A.P.; FURLAN, F.A., 2002).

Entre os benefícios que produz no organismo, destacam-se a renovação das células, melhora do quadro geral do organismo, melhora na defesa imunológica, redução dos efeitos colaterais do tabagismo, prevenção do câncer (pela eliminação de material cancerígeno), redução da glicose sanguínea, ação hipotensiva, redução do colesterol, redução da arteriosclerose, estimulação quantitativa e qualitativa das células NK (células que destroem células que estejam infectadas ou alteradas). (POUCHERET, P.; FONS, F.; RAPIOR, S., 2006).

A maioria dos efeitos benéficos à saúde proporcionada pelos cogumelos é atribuída aos seus polissacarídeos e complexos de proteína-polissacarídeo. Pesquisas de laboratório isolaram um tipo de polissacarídeo múltiplo dentro de cada espécie. (LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T.H.J.; JULICH, W., 2005)

Recentes pesquisas sobre cogumelos estão revelando os seus efeitos antimicrobiais. A pesquisa apresenta forte atividade dos extratos de cogumelo contra bactérias, como *E. coli*, *estafilococo* e ramificações de tuberculose, bem como contra uma ampla variedade de vírus, varíola e do vírus da influenza. Algumas destas novas evidências se baseiam nos testes realizados pelo *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID), durante os últimos anos. Mais de dois milhões de amostras de vários agentes foram submetidos ao NIAID. Uma das áreas mais intrigantes da recente pesquisa está no efeito dos cogumelos da espécie juba-de-leão sobre a sensibilidade ao mal de Alzheimer. (LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T.H.J.; JULICH, W., 2005)

Atualmente, a tendência mais significativa para os cogumelos medicinais está no seu uso para prevenção de doenças e em terapias alternativas. (LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T.H.J.; JULICH, W., 2005)

O AHCC é produto do extrato de uma forma de cogumelo medicinal que contém uma molécula de hexose bioativa, derivada da combinação de cogumelos *basidiomycetes*. Esse complexo de cogumelo é geralmente usado em pacientes que têm doenças como câncer, HIV/AIDS, diabetes e hepatites. (LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T.H.J.; JULICH, W., 2005)

Suay et al. (2000), ressalta que entre 204 cogumelos analisados, mais de 109 espécies apresentaram atividade antimicrobiana frente a patógenos humanos, com predomínio da atividade antibacteriana sobre a antifúngica.

3.3. Atividade antimicrobiana

Consta na literatura que diversas técnicas são utilizadas para a detecção de atividade antimicrobiana e/ou a localização dos constituintes bioativos, como difusão em ágar, em disco de papel e bioautografia, respectivamente (ISHIKAWA et al., 2000; SHITTU et al., 2006; YALTIRAK et al., 2009).

O Método de difusão em ágar tem sido citado como importante técnica indicadora da inibição do crescimento de microorganismos teste frente a compostos bioativos em diferentes concentrações (GAUTAM, R. et al., 2007). De acordo com Ostrosky et al. (2008), o teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um microorganismo é desafiado contra uma

substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada. A aplicação do método de difusão se limita a microrganismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de microrganismos. Como controle positivo, emprega-se um quimioterápico padrão, e como controle negativo o solvente utilizado para a dissolução dos extratos. É considerado um método qualitativo e constitui-se em uma metodologia econômica e de fácil execução para a determinação da potência de antimicrobianos (ESMERINO, L.A. et al., 2004).

Já o método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada (método quantitativo). A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano. Como controle positivo, utiliza-se o caldo com o quimioterápico padrão com a suspensão padronizada de microrganismo em teste. Duas metodologias podem ser empregadas: macro e microdiluição. (Ostrosky, E.A. et al., 2008).

A microdiluição utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL. Vários estudos citam essa técnica para determinação da concentração inibitória mínima (CMI). As menores concentrações sem crescimento aparente são definidas como as concentrações que inibem completamente o crescimento de fungos (Ostrosky, E.A. et al., 2008).

Gautam et al., (2007), cita o uso do Alamar Blue (indicador redução/oxidação) em testes de microdiluição como forma de tornar a técnica mais rápida e aumentar a sensibilidade do teste. Os resultados podem ser lidos visualmente, sem a necessidade de auxílio instrumental.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

- Verificar a atividade antimicrobiana de compostos extraídos do basidioma de *Lentinus citrinus* DPUA 1535 e *Pleurotus florida* DPUA 1534 frente a espécies de leveduras e fungos filamentosos causadores de infecções fúngicas oportunistas.

4.2. Objetivo Específico

- Determinar a atividade antimicrobiana de extratos orgânicos dos basidiomas de *Lentinus citrinus* DPUA 1535 e *Pleurotus florida* DPUA 1534 frente à *Aspergillus niger* DPUA 1472, *Candida albicans* DPUA 1340, *Fusarium oxysporum* DPUA 271, *Penicillium janthinellum* DPUA 426 e *Trichosporon beigelli* DPUA 210.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Cogumelos como fonte de substâncias antagonônicas

Nesta pesquisa foram investigados basidiomas desidratados de *Lentinus citrinus* DPUA 1535 e *Pleurotus florida* DPUA 1534, cedidos pelo acervo da Coleção de Cultura DPUA, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

5.2. Obtenção dos extratos para os testes de antagonismo

Para obtenção dos extratos a partir dos basidiomas de *Lentinus citrinus* DPUA 1535 e *Pleurotus florida* DPUA 1534, as estruturas foram trituradas e em seguida foi pesado 20g para ser adicionado em 100mL de acetato de etila P.A (Extrato acetato de Etila) ou 100 mL de Metanol P.A. (Extrato metanol). A biomassa residual resultante foi submetida a extração sucessiva. Após 72 horas de maceração os extratos foram separados da biomassa por filtração em papel de filtro, seguindo-se a evaporação sob baixa pressão para posterior utilização nos teste de difusão em ágar. Os extratos obtidos foram diluídos em etanol 50% para obtenção de uma solução 1% e 0,5% (HEARST *et al.*, 2009). Seguido a esse procedimento, os extratos foram filtrados em membrana polietersulfônica esterilizada (0,22 μ m).

Figura 1: Esquema da obtenção dos extratos orgânicos



5.3. Microorganismo – Teste

5.3.1. Reativação das culturas

Para reativação dos microrganismos teste (*Aspergillus niger* DPUA 1472, *Candida albicans* DPUA 1340, *Fusarium oxysporum* DPUA 271, *Penicillium janthinellum* DPUA 426) a partir das culturas conservadas em água destilada esterilizada, o vidro do tipo penicilina foi aberto assepticamente e fragmentos da cultura foram retirados em duplicata. Esses fragmentos foram semeados na superfície de ágar Sabouraud com glicose 2% (p/v), em tubo de ensaio medindo 170 mm x 15mm. Os cultivos foram mantidos a 25 °C por 48 h (leveduras) e 7 dias (fungos filamentosos).

Tabela 1: Método de preservação das espécies

Código da coleção (DPUA)	Espécie preservada	Método de conservação
210	<i>Trichosporon beigelli</i>	Óleo
271	<i>Fusarium oxysporum</i>	Óleo
426	<i>Penicillium janthinellum</i>	Óleo
1081	<i>Aspergillus niger</i>	Sílica/Óleo
1340	<i>Candida albicans</i>	Água

5.4. Determinação da atividade antimicrobiana em meio sólido (Método de difusão em ágar)

A atividade antimicrobiana foi determinada pelo Método de difusão em ágar (Larpent & Sanglier, 1989). Das cinco culturas, dois testes já foram realizados, incluindo *Candida albicans* DPUA 1340 e *Trichosporon beigelli* DPUA 210 foram cultivadas em ágar Sabouraud por 48 horas. Em cada cultivo das leveduras foi preparada uma suspensão celular com água destilada esterilizada. De cada cultura foi retirada uma alíquota com alça de platina para inoculação em 10 ml de água destilada esterilizada em tubos de ensaio de 19,8 x 1,8 milímetros. O preparado foi homogeneizado em Vortex até a obtenção de uma suspensão homogênea de turbidez semelhante à escala de Macfarland 1. Tratando-se dos fungos filamentosos foi adicionado 10 mL de água destilada esterilizada a cada cultura. De cada

suspensão celular foi retirado 200 μL , em condições assépticas, para ser semeado com swab em três direções na superfície do meio sólido (ágar Sabouraud), em estria, até formação de uma camada uniforme na placa de Petri (140x15mm). Nos *cup plates*, medindo 8 mm de diâmetro foi inoculado 100 μL ou 200 μL de cada extrato orgânico da biomassa de *Lentinus citrinus* e *Pleurotus florida*. Todos os testes de antibiose foram realizados em triplicata. Os testes de antagonismo foram realizados por 24 horas, a 25 °C. A atividade antimicrobiana foi expressa em milímetros, medindo-se o a zona ou o halo de inibição de crescimento partindo-se da circunferência do poço, até a margem onde há crescimento de microrganismos. Considerou-se, microrganismos sensíveis, quando o halo foi formado e, resistentes, quando não houve formação de halo. Como controle foi utilizado solução de Itraconazol 1% (p/v).

5.5. Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística descritiva (média do diâmetro dos halos).

5.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A concentração inibitória mínima foi realizada pelo Método de diluição em microplaca com 96 orifícios. Em cada poços foi colocado 100 μL de caldo Sabouraud. Os extratos foram diluídos em caldo Sabouraud a partir da solução estoque de 10 mg/mL e 5 mg/mL, obtendo-se soluções teste de 2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL, respectivamente. De cada solução foi retirado 100 μL para os respectivos poços. Na primeira coluna foi adicionado 100 μL de caldo Sabouraud e extrato (1:1; v/v) para controle de qualidade do solvente e na última coluna em cada poço foi colocado 100 μL da solução de Itraconazol 1%. Em cada poço, exceto o de controle dos extratos (controle negativo), foram adicionados 100 μL da suspensão celular em teste seguindo-se diluições seriadas (Colunas 2 a 11). Após as diluições seriadas do extrato a 1%, as concentrações finais na microplaca foram de 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,1562; 0,0781; 0,0390; 0,0195; 0,0097 e 0,0048 $\mu\text{g/mL}$. Para as soluções

teste a 0,5%, as concentrações finais foram 1,25; 0,625; 0,3125; 0,1562; 0,0781; 0,0390; 0,0195; 0,0097, 0,0048 e 0,0024 µg/mL. De cada poço da coluna 11 e do controle positivo desprezou-se 100 µL a fim de que o volume final de cada poço fosse 200 µL. As microplacas foram seladas com filme plástico e incubadas a 37°C por 24 horas. A inibição do crescimento fúngico foi evidenciada pela adição de corante estéril líquido Alamar Blue™ (Invitrogen), indicador fluorescente/colorimétrico com a propriedade oxidação/redução (FRANZBLAU, S.G. et al, 1998). A leitura das placas foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante com uma a quatro horas através da observação da viragem de cor. A concentração inibitória mínima foi determinada como a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento fúngico, evidenciado pela presença de coloração rósea em cada poço.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos de *L. citrinus*

Das culturas fúngicas selecionadas para teste frente aos extratos de *L. citrinus*, houve evidências de sensibilidade a alguns dos extratos nas diferentes concentrações conforme tabela 2.

Tabela 2: Atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos de *L. citrinus*

<i>Lentinus citrinus</i>								
Espécie	MET 0,5%		MET 1%		ACE 0,5%		ACE 1%	
	100µL	200µL	100µL	200µL	100µL	200µL	100µL	200µL
<i>A. niger</i> DPUA 1472	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>P. janthinellum</i> DPUA 426	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>F. oxysporum</i> DPUA 271	S	S	S	S	ND	2,0*	ND	1,53*
<i>T. beigelli</i> DPUA 210	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>C. albicans</i> DPUA 1340	ND	0,5*	ND	0,33*	ND	ND	ND	0,4*

S = Sensível

ND = Não determinado

MH * = Média do diâmetro dos halos em mm

De acordo com os resultados apresentados na tabela 2, houve atividade antimicrobiana quando se utilizou os extratos metanólico e acetato de etila nas diferentes concentrações pelo Método de difusão em ágar. O resultado foi positivo (fungistático e fungicida) para os fungos testados, exceto *T. beigelli* e *P. janthinellum*, prevalecendo a atividade fungistática para *A. niger*. A análise de *F. oxysporum* demonstrou sensibilidade aos extratos metanólicos a 0,5% e 1% e atividade fungicida frente aos extratos acetato de etila 0,5% e 1% utilizando-se 200 µL do referido extrato. *P. janthinellum* e *T. beigelli* mostraram-se resistentes a todos os extratos testados.

Os resultados para *C. albicans* foram positivos (atividade fungicida) para os extratos metanólico 0,5% e 1% e acetato de etila 1% utilizando-se 200 µL dos respectivos extratos. Esta análise diverge dos dados apresentados por Yuyama, et

al (2009) no qual os testes de atividade antimicrobiana foram negativos frente aos mesmos extratos de *L. citrinus* em análise bioautográfica. Provavelmente esta atividade positiva esteja relacionada com a potencialização entre os compostos do extrato testado.

6.2. Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos de *P. florida*

Das culturas fúngicas selecionadas para teste frente aos extratos de *P. florida*, houve evidências de sensibilidade a alguns dos extratos nas diferentes concentrações conforme tabela 3.

Tabela 3: Atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos de *P. florida*

<i>Pleurotus florida</i>								
Espécie	MET 0,5%		MET 1%		ACE 0,5%		ACE 1%	
	100µL	200µL	100µL	200µL	100µL	200µL	100µL	200µL
<i>A. niger</i> DPUA 1472	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>P. janthinellum</i> DPUA 426	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>F. oxysporum</i> DPUA 271	ND	ND	ND	ND	ND	1,66*	ND	1,6*
<i>T. beigelli</i> DPUA 210	ND	ND	ND	S	ND	S	ND	S
<i>C. albicans</i> DPUA 1340	ND	ND	ND	0,43*	ND	S	ND	S

S = Fungistático

ND = Não determinado

MH * = Média do diâmetro dos halos em mm

De acordo com os resultados apresentados na tabela 3 observou-se a atividade fungistática de todos os extratos de *P. florida* testados contra *A. niger*. Além disso, atividade fungistática foi demonstrada quando se utilizou os extratos metanólico na concentração de 1% e acetato de etila 0,5% e 1% frente a *T. beigelli* e *C. albicans* apresentou sensibilidade ao extrato acetato de etila 0,5% e 1%. Atividade fungicida foi observada para os fungos *F. oxysporum* frente a extrato acetato de etila 0,5% e 1% e *C. albicans* apresentou resultados positivos quando testada frente a extrato metanol 1%, evidenciados através dos halos formados pela inibição do crescimento

destas espécies. Os resultados foram positivos (fungicida) apenas quando se utilizou 200 µL dos extratos supracitados. *P. janthinellum* mostrou-se resistente frente a todos os extratos testados.

Wisbeck, et al. (2002), realizou atividade antimicrobiana de compostos bioativos de *P. ostreatus* no qual também foram encontrados resultados positivos (atividade fungicida) contra *C. albicans* através do Método de difusão com discos.

6.3. Concentração Inibitória Mínima

Os microorganismos sensíveis frente aos extratos na avaliação preliminar foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima pelo Método de Microdiluição colorimétrico por Alamar Blue (Invitrogen) em microplaca com 96 poços. Os extratos foram adicionados na microplaca nas concentrações de 2,5 µg/mL (extratos a 1%) e 1,25 µg/mL (extratos a 0,5%) seguindo-se diluições seriadas nos 9 poços sucessivos (colunas 2 a 11). Na tabela 4 foram apresentados os valores das concentrações inibitórias mínimas. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento fúngico (forma oxidada - azul) (RIBEIRO, M.O. et al., 2004).

Tabela 4: Concentração inibitória mínima pelo Método de microdiluição colorimétrica pelo Alamar Blue

Espécies	Extratos	Concentração inicial (µg/mL)	CIM (µg/mL)
<i>F. oxysporum</i>	<i>P. florida</i> ACE	1,25	1,25
		2,5	2,5
	<i>L. citrinus</i> ACE	1,25	1,25
		2,5	2,5
<i>C. albicans</i>	<i>L. citrinus</i> MET	1,25	1,25
		2,5	2,5
	<i>L. citrinus</i> ACE	2,5	2,5
		<i>P. florida</i> MET	2,5

CIM: Concentração inibitória mínima

As duas espécies submetidas ao Método de microdiluição em microplaca por Alamar Blue (Invitrogen) mostraram que somente as maiores concentrações nos testes realizados, com 1,25 µg/mL e 2,5 µg/mL, respectivamente, foram capazes de

inibir o crescimento fúngico, conforme tabela 4. Os resultados obtidos através do Método Alamar Blue confirmaram o perfil de sensibilidade dos fungos selecionados frente aos extratos.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados demonstrados neste estudo conclui-se que os extratos Acetato de etila e Metanol de *L. citrinus* e *P. florida* a 0,5 e 1,0% apresentou melhor atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *F. oxysporum* e *C. albicans*. Os resultados foram positivos (atividade fungicida) apenas quando se utilizou 200 µL de cada extrato. A atividade fungicida foi comprovada pela determinação da concentração inibitória mínima dos extratos.

Os basidiomas de *L. citrinus* e *P. florida* mostraram ser objeto de futuras pesquisas e uma fonte promissora de substâncias com atividade antimicrobiana.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

COELHO, M.P.P. et al. **Micoses observadas em pacientes atendidos no Hospital Universitário, Florianópolis, Santa Catarina.** RBAC, v. 37, p. 27-30, 2005.

ESMERINO, L.A. et al. **Método microbiológico para determinação da potência de antimicrobianos.** Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa, v. 1, n. 10, p. 53-60, 2004.

FORTES, R. C.; NOVAES, M. R. C. G. **Efeitos da suplementação dietética com cogumelos *Agaricales* e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer.** Revista Brasileira de Cancerologia, v. 52, n. 4, p. 363- 367, 2006.

FRANZBLAU, S.G. et al. **Rapid, low-technology CMI determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay.** J. microbiol. V. 36, p. 362-366, 1998.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. **Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão.** Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 64, n. 2, p. 149- 154, 2005.

GAUTAM, R.; SAKLANI, A.; JACHAK, S.M. **Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents.** Journal of Ethnopharmacology n.110 p. 200–234, 2007.

HASSEGAWA, R.H., KASUYA, M.C.M., VANETTI, M.C.D. **Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid supplemented with agricultural wastes.** Electronic Journal of Biotechnology, v. 8, n.2, p. 212-217, 2005.

HATVANI, N. **Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture.** International Journal of Antimicrobial Agents, v. 17, p. 71-74, 2001.

HEARST, R. *et al.* **An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms.** Complementary Therapies in Clinical Practice, v. 15, p. 5-7, 2009.

ISHIKAWA, N. K.; KASUYA, M. C. M.; VANETTI, M. C. D. **Antibacterial activity of *Lentinus edodes* grown in liquid medium.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 32, p. 206- 210, 2001.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T.H.J.; JULICH, W. **The Pharmacological potentiation of mushrooms.** eCAM, v. 2, n. 3, p. 285–299, 2005.

OSTROSKY, E.A. *et al.* **Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, n. 2, João Pessoa, abril/junho 2008.

POUCHERET, P.; FONS, F.; RAPIOR, S. **Biological and pharmacological activity of Higher Fungi: 20- years retrospective analysis.** *Cryptogamie, Mycologie*, v. 24, n. 4, p. 311-333, 2006.

RENNEBRA – **Rede de Coleções de Culturas de Microorganismos do Norte e Nordeste do Brasil: Implantação da rede e modernização das coleções para a conservação da diversidade microbiana e pesquisa biotecnológica.** Universidade Federal de Pernambuco – Edital CT- BIOTEC/MCT/CNPq – N° 021/2005.

RIBEIRO, E.L. *et al.* **Ocorrência de Leveduras de *Candida* em Hemoculturas Originadas de Infecções Nosocomiais.** NewsLab. Edição 60. 2003.

RIBEIRO, M.O. *et al.* **Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina.** J. Bras. Pneumol. v. 30, n. 4, São Paulo, 2004.

SHITTU, O.B.; ALOFE, F. V.; ONAWUNMMI, G. O.; TIWALADE, T. A. **Mycelial Growth and Antibacterial Metabolite Production by Wild Mushrooms**. African Journal of Biomedical Research, v. 8, p. 157- 162, 2005.

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.

TAVARES, W; PENTEADO, S. R. **Antimicrobianos – Critérios para o Uso Racional na Prática Clínica** In: TAVARES, W; MARINHO, L. A. C. Rotinas de Diagnóstico e Tratamento das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2007, cap.163, p. 1048-1062.

WISBECK, E.; ROBERT, A.P.; FURLAN, F.A. **Avaliação da produção de agentes antimicrobianos por fungos do gênero *Pleurotus***. Revista Saúde e Ambiente/ Health and Environment Journal, v. 3, n. 2, p. 7-10, 2002.

YALTIRAK, T.; ASLIM, B.; OZTURK, S.; ALLI, H. **Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr**. Food and Chemical Toxicology, doi: 10.1016/j.fct.2009.05.029, 2009.

YUYAMA, E. K.; TEIXEIRA, M.F.S.; SILVA, A.B. **Propriedade antimicrobiana de *L. citrinus* para futura aplicação no tratamento de infecções fúngicas e bacterianas**. Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas/ CNPq, PIB-B/0042/2008.