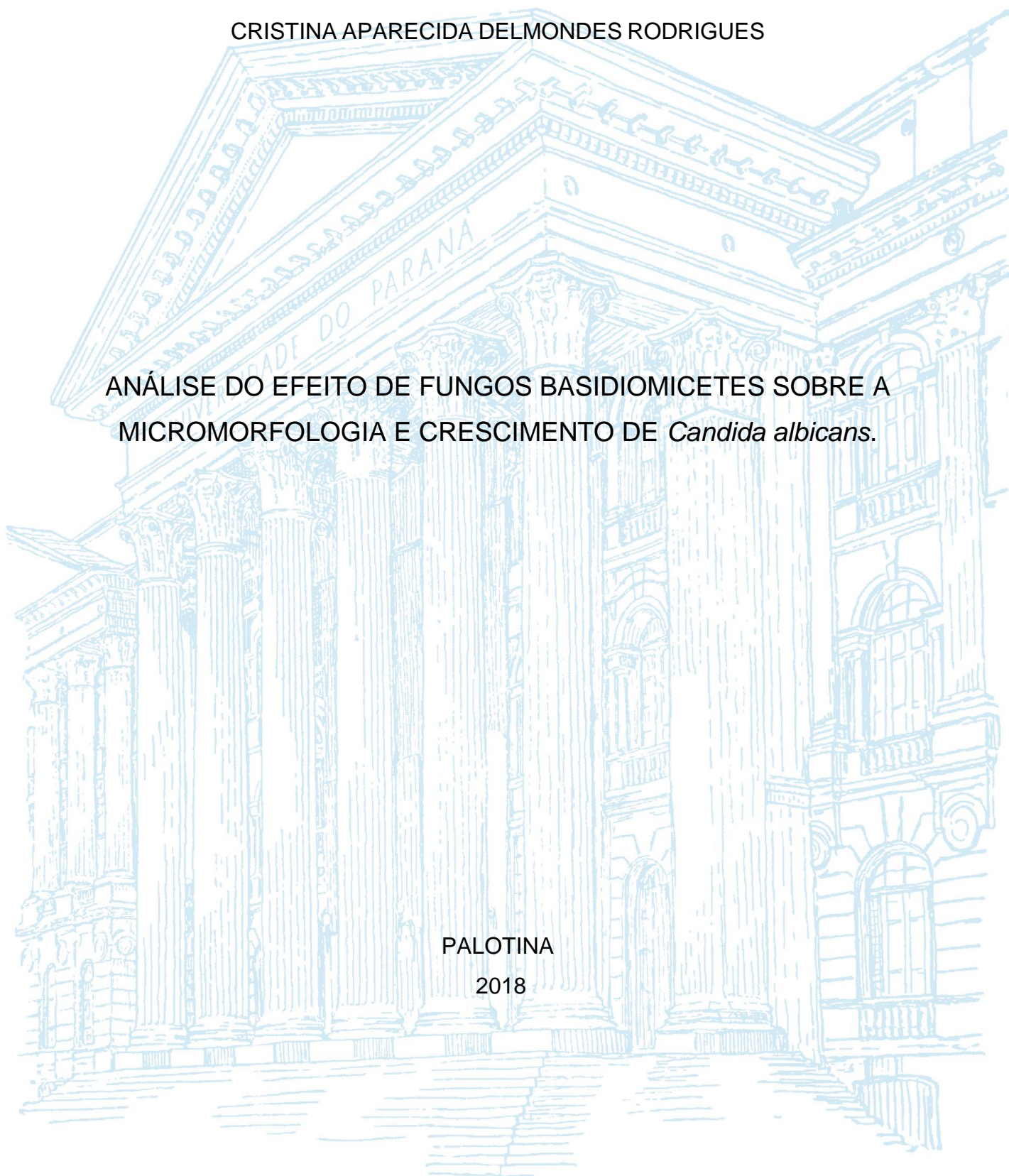


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CRISTINA APARECIDA DELMONDES RODRIGUES

ANÁLISE DO EFEITO DE FUNGOS BASIDIOMICETES SOBRE A
MICROMORFOLOGIA E CRESCIMENTO DE *Candida albicans*.

PALOTINA
2018



CRISTINA APARECIDA DELMONDES RODRIGUES

ANÁLISE DO EFEITO DE FUNGOS BASIDIOMICETES SOBRE A
MICROMORFOLOGIA E CRESCIMENTO DE *Candida albicans*.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Ciências Biológicas com Ênfase em
Gestão Ambiental da Universidade Federal do
Paraná, Setor Palotina como requisito à obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado

PALOTINA

2018

TERMO DE APROVAÇÃO

CRISTINA APARECIDA DELMONDES RODRIGUES

ANÁLISE DO EFEITO DE FUNGOS BASIDIOMICETES SOBRE A MICROMORFOLOGIA E CRESCIMENTO DE *Candida albicans*.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Ciências Biológicas com Ênfase em Gestão Ambiental, Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, pela seguinte banca examinadora:



Prof.^a. Dr.^a. Adriana Fiorini Rosado
Orientador - Departamento de Biociências. Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina.



Prof. Dr. Milton Rönnau
Departamento de Biociências. Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.



Jéssica Christine Gallego
Departamento Biociências Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

Palotina, 06 de Dezembro de 2018

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar e acima de tudo, agradecer a Deus e a Jesus, pela graça sobre a minha vida e pelo amor que me salvou e salva, todos os dias. Tudo é pra honra e glória do Senhor Jesus!

Quero agradecer também a minha família, especialmente a minha vó Gilda. Só nós sabemos o quanto difícil foi chegar até aqui e o que tudo isso custou.

A Universidade Federal do Paraná-Setor Palotina, seu corpo docente, direção, administração, e aos servidores terceirizados, por sempre oferecer toda ajuda e um ambiente agradável, deixo aqui a minha total admiração e agradecimento a toda equipe que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

A Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, por me acolher e sempre se fazer presente, nos bons momentos e nos ruins também, me dando ânimo pra continuar em frente.

Ao Prof. Dr. Milton Rönau e a Mra. Jéssica Gallego, por fazerem parte da banca avaliadora.

A mestranda Fernanda Buraslan e ao Mauro Pessoa, pelo tempo, pelas risadas e pelos momentos compartilhados durante os experimentos.

E aos meus amigos de laboratório Gabriéli Huff, Paulo Daniel Apolinário e Gabriela Cristina, pelas risadas, desabaços e conversas.

Aos meus amigos Anderson Scherer, Renan Appel e Vitória Trento, todo o meu amor e carinho, por toda a nossa amizade.

As minhas amigas Thaís Luft e Mayara Wisniewski, o meu amor e toda a minha gratidão por ter vocês comigo, perto ou longe, mas sempre presentes e sempre juntas. Amo vocês.

Ao meu amigo Felipe Welke, que mesmo a distância, se fez presente em uma parte da caminhada e mesmo estando bem longe, dentro dos limites, sempre se fez perto. Grata sou, pela sua vida.

Aos meus amigos Mayara Beatriz Inocencio, João Vitor Oliver e Estefany Carli, vou levar vocês sempre no coração, bem grudadinho, pra nunca esquecer o que foram os dias vividos com vocês! Amo vocês imensuravelmente.

Agradeço a todos os amigos que a universidade me deu a grande satisfação em conhecer, que puderam acompanhar todos os meus piores e melhores dias e que se fizeram presentes por todo o caminho. Isso é de vocês também!

A minha amiga Jaqueline Preussler que me acompanha desde o ensino médio, eu realmente espero que nossa amizade dure incontáveis anos e que você continue com essa essência fácil de amar! Te amo.

As minhas amigas Viviane Bertoldi, Andressa Mott e Jenifer Carina, amo nós e amo a nossa amizade.

A minha amiga Mariane Oliveira, sou grata por toda a nossa história e por tudo que ainda vamos viver. Te amo infinito.

E por último, mas não menos importante, minha amiga Esther Tietz. Que esteve comigo por boa parte do caminho me ajudando e consolando, mas acima de tudo, sendo irmã. Te amo forte.

“Há muito tempo que o meu axioma é de que, as pequenas coisas são infinitamente as
mais importantes.”

Sherlock Holmes, Arthur Conan Doyle.

RESUMO

Leveduras do gênero *Candida* são consideradas importantes patógenos oportunistas em humanos. A capacidade de espécies de *Candida* em alternar entre a forma leveduriforme e filamentosa tem sido associada à patogênese. Diversas condições ambientais podem desencadear essa mudança morfológica e são frequentemente utilizadas em modelos para estudos *in vitro* sobre o efeito de agentes antifúngicos. Os fungos basidiomicetes têm sido estudados devido à grande variedade de seus bioprodutos. *Macrocybe titans* foi recentemente relatado no Brasil. Existem poucos registros na literatura sobre o potencial biotecnológico deste fungo. Outro fungo basidiomicete, *Ganoderma lucidum*, exibe um amplo espectro de atividades antibacterianas e antivirais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de extratos aquosos de *M. titans* e *G. lucidum* na micromorfologia e crescimento de *Candida albicans*. Foi utilizada a cepa ATCC 90028 de *C. albicans* e os extratos de *M. titans* e *G. lucidum* pertencentes ao banco de germoplasma do Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA) da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. Para o preparo dos extratos de cogumelos foi utilizado basidiomas secos triturados, eluído. Uma parte do volume foi filtrada em filtro de 0.22 µM. Foram, portanto, obtidas as frações bruta e diluída dos extratos. Para a análise do efeito dos extratos sobre o crescimento de *C. albicans*, o inóculo inicial foi diluído para uma densidade ótica (D.O.) de 0,1 a 600 nm, e os extratos de cogumelos foram adicionados na proporção 1:10 e a cultura mantida por 12 horas. Foi verificada a D.O. após este período. Após 12 horas de cultivo, na presença e ausência dos extratos foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer. Também foi verificado o potencial efeito fungistático ou fungicida dos extratos de *M. titans* sobre a viabilidade de *C. albicans* através da técnica de contagem em placa de cultura por microgota. O efeito dos extratos dos basidiomicetes sobre a micromorfologia de *C. albicans* foi realizado cultivando a levedura em ágar fubá com Tween 80 na ausência e presença dos extratos. Após 72 horas, os microcultivos foram analisados através de microscopia ótica, para observação de estruturas típicas como pseudo-hifas, blastoconídios e clamidoconídios. Foi observado que, em todos os ensaios, os extratos inibiram o crescimento e alteraram a micromorfologia de *C. albicans*. Foi possível observar uma redução nos valores de D.O. de 86% e 44% e de 50% e 22% quando *C. albicans* foi cultivada na presença dos extratos bruto e filtrado de *M. titans* e *G. lucidum*, respectivamente. Os extratos bruto e filtrado de *M. titans* causaram uma inibição de 64,4% e 51,1%, respectivamente, no número de colônias de *C. albicans*, após 12 horas de contato. A contagem em câmara de Neubauer revelou uma diminuição de 56% e 42% no número de células viáveis, com os extratos bruto e filtrado de *M. titans* e de 49% e 42%, para *G. lucidum*, respectivamente, em relação ao controle. A análise da micromorfologia de *C. albicans*, após contato com o extrato filtrado revelou uma diminuição da formação de clamidoconídios e um aumento na filamentação das hifas, após tratamento com *M. titans* e um sutil aumento na formação de blastoconídio, em relação ao extrato de *G. lucidum*.

Palavras-chave: Micromorfologia, *Candida albicans*, *Macrocybe titans*, *Ganoderma lucidum*.

ABSTRACT

Candida spp. are considered important opportunistic pathogens in humans. The ability of *Candida* species to alternate between yeast and filamentous forms has been associated with pathogenesis. Several environmental conditions can trigger this morphological change and are often used in models for *in vitro* studies on the effect of antifungal agents. Basidiomycete fungi have been studied because of the wide variety of their bioproducts. *Macrocybe titans* was recently reported in Brazil. There are few records in the literature on the biotechnological potential of this fungus. Another basidiomycete fungus, *Ganoderma lucidum*, displays a broad spectrum of antibacterial and antiviral activities. The objective of this work was to evaluate the activity of aqueous extracts of *M. titans* and *G. lucidum* in the micromorphology and growth of *Candida albicans*. It was used the strain ATCC 90028 of *C. albicans* and the extract of the mushrooms, belonging to the germplasm bank of the Experimental Nucleus of Applied Mycology (NEMA) of the Federal University of Paraná - Palotina. A powdered dried extract, was used to prepare the extracts. A part of the volume was filtered through a 0.22 µm filter (diluted fraction). Therefore, the crude and diluted fractions of the extracts were obtained. The initial *C. albicans* inoculum was diluted to an optical density (O.D) of 0.1 to 600 nm. The extracts of the mushrooms were added in the ratio 1:10 and the culture maintained for 12 hours. The O.D. was verified after this period. After 12 hours of culture in the presence and absence of extracts, *C. albicans* cells were counted in Neubauer chamber. The potential fungistatic or fungicidal effect of the *M. titans* extracts on the viability of *C. albicans* was also verified through the microdrop culture plate counting technique. The effect of the extracts of mushrooms on the *C. albicans* micromorphology was carried out by culturing the yeast in corn-agar with Tween 80 in the absence and presence of basidiomycete extracts. After 72 hours, the microcultures were analyzed by optical microscopy, to observe typical structures such as pseudo-hifas, blastoconidia and chlamydoconides. It was observed that in all assays the extract of mushrooms inhibited growth and altered the micromorphology of *C. albicans*. It was possible to observe a decrease of 86% and 44% of O.D. when *C. albicans* was cultured with and without the concentrated and filtered extract of *M. titans*, respectively. It was possible to observe a reduction in the *C. albicans* growth of 86% and 44% and of 50% and 22% when the yeast was cultured in the presence of the crude and filtered extracts of *M. titans* and *G. lucidum*, respectively. The crude and filtered extracts of *M. titans* caused an inhibition of 64.4% and 51.1%, respectively, in the number of colonies of *C. albicans* after 12 hours of contact. The Neubauer chamber count revealed a 56% and 42% decrease in the number of viable cells with the crude and filtered extracts of *M. titans* and 49% and 42% with crude and filtered extracts of *G. lucidum*, respectively, relative to the control. The analysis of the micromorphology of *C. albicans* after contact with the filtered extract revealed a decrease in the formation of chlamydoconides and an increase in the filamentation of the hyphae, after treatment with *M. titans* and a subtle increase in the formation of blastoconidia, in relation to the extract of *G. lucidum*.

Keywords: Micromorphology, *Candida albicans*, *Macrocybe titans*, *Ganoderma lucidum*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Hifas (1), pseudo-hifas (2), clamidósporos (3), blastósporos (4) e células leveduriformes (5) de *C. albicans*. Imagens de Adriana Fiorini Rosado. 13
- Figura 2.** *Macrocybe titans* encontrado na região de Assis Chateaubriand – PR. Imagem de Claudemir Tezolin. Este espécime foi utilizado nesse trabalho. 15
- Figura 3.** *Ganoderma lucidum*. Fonte: <http://www.alkalineenergies.com/copy-of-energy-harmonising> 17
- Figura 4.** Efeito dos extratos de *Macrocybe titans* e *Ganoderma lucidum* no crescimento de *C. albicans*. As leveduras foram cultivadas durante 12 horas após contato com os extratos. Após este período, foi feita a leitura da absorbância em 600 nm e os valores expressos em densidade ótica (D.O.). Os valores do eixo Y correspondem à porcentagem de inibição do crescimento, em relação ao controle. 21
- Figura 5.** Contagem das células de *C. albicans* em placas de ágar Sabouraud em diferentes diluições, pela técnica de microgota, após cultivo por 12 horas na ausência (controle) e presença dos extratos bruto (B) e filtrado (F) de *M. titans*. 22
- Figura 6.** Efeito dos extratos bruto e filtrado de *G. lucidum* e *M. titans* na viabilidade de células de *C. albicans*. As leveduras foram cultivadas durante 12 horas após contato com os extratos. Após este período, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer com azul de metileno. Somente as células viáveis foram contadas 23
- Figura 7.** Efeito dos extratos de *Macrocybe titans* e *Ganoderma lucidum* sobre a micromorfologia de *C. albicans*. As células de *C. albicans* foram semeadas em ágar Fubá com Tween 80 na ausência e presença dos extratos filtrados de cada cogumelo. Imagens foram obtidas nos aumentos de 100 e 400x, em microscópio ótico depois de 3 dias de incubação a 28° C. 26
- Figura 8.** Efeito dos extratos de *Macrocybe titans* e *Ganoderma lucidum* sobre a micromorfologia de *Candida albicans*, mostrando maior formação de clamidoconídios (cabeças de seta) quando *C. albicans* foi cultivada na ausência do extrato de *M. titans* (A e B), prevalência de filamentação (setas pretas), quando *C. albicans* foi cultivada com o extrato de *M. titans* (C e D) e prevalência de blastoconídios (setas brancas), quando *C. albicans* foi cultivada com o extrato de *G. lucidum* (E e F). Cultivo em ágar Fubá com Tween 80. Todas as imagens foram obtidas nos aumentos de 400x, exceto a imagem B (1000x) em microscópio ótico depois de 3 dias de incubação a 28° C. 27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 <i>Candida albicans</i> , polimorfismo e virulência.....	12
2.2 <i>Macrocybe titans</i>	14
2.3 <i>Ganoderma lucidum</i>	16
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Local da pesquisa.....	18
4.2 Microrganismo.....	19
4.3 Preparo dos extratos de <i>M. titans</i> e <i>G. lucidum</i>	19
4.4 Análise do efeito dos extratos de <i>M. titans</i> e <i>G. lucidum</i> sobre o crescimento de <i>C. albicans</i>	19
4.5 Contagem de células de <i>C. albicans</i> após contato com os extratos de <i>M. titans</i> e <i>G. lucidum</i>	20
4.6 Contagem de colônias de <i>C. albicans</i> , após contato com os extratos de <i>M. titans</i> ...	20
4.7 Microcultivo de <i>C. albicans</i> com e sem os extratos dos cogumelos.....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

1. INTRODUÇÃO

Candida albicans é uma levedura oportunista encontrada associada à candidíase em animais e humanos, propagando-se na superfície de mucosas, causando infecções vulvovaginais, gastrointestinais e bucais, e eventualmente até doenças sistêmicas. Normalmente, encontra-se no organismo de forma assintomática. Entretanto, a partir de qualquer distúrbio ou disfunções no sistema imune, *C. albicans* pode proliferar e invadir qualquer região do hospedeiro (TSUI et al., 2016). Segundo Dantas et al. (2015), a cada ano estima-se 400.000 infecções sistêmicas causadas por *C. albicans* em todo o mundo, envolvendo risco de vida em pacientes imunocomprometidos, com uma taxa de mortalidade de até 42%.

Muitas leveduras são capazes de alterar sua morfologia de acordo com as condições ambientais. As espécies do gênero *Candida*, com destaque para *C. albicans*, diferenciam-se entre células leveduriformes, em meio de crescimento padrão, para a forma de cadeias filamentosas de células denominadas hifas, quando induzidas em diferentes condições. Essa habilidade de modificar a sua forma de crescimento, assim como a capacidade de produção de biofilmes, está relacionada a fatores de virulência, mais especificamente de crescer invasivamente e penetrar no sistema imune (MARTIN et al., 2005).

Devido à capacidade de muitas linhagens desta levedura adquirirem resistência a antibióticos e conseqüentemente estarem relacionadas a várias complicações clínicas, a pesquisa por novas substâncias que possuam efeito biológico e/ou terapêutico sobre essa levedura é de singular interesse. Apesar de a indústria farmacêutica ter investido e lançado novos antifúngicos nas três últimas décadas, as formas de resistência das leveduras a essas drogas têm aumentado. Novas alternativas devem ser consideradas quando se considera o problema de resistência à antibióticos como, por exemplo, controlar o uso de antifúngicos, entender os mecanismos genéticos de resistência, encontrar alvos potenciais para o desenvolvimento de novas drogas, oferecendo assim, um tratamento apropriado e eficiente com maior especificidade.

Uma das alternativas para a redução da utilização de antifúngicos comerciais é a utilização de produtos naturais, para a avaliação de moléculas com ações mais específicas. Estes produtos podem apresentar múltiplas ações terapêuticas, além de se constituírem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (NODARI e GUERRA, 2000).

Trabalhos mais antigos, realizados principalmente no Japão, demonstraram claramente que várias espécies de cogumelos apresentam valor medicinal e terapêutico, na prevenção e tratamento de tumores virais e bacterianos e outras doenças como hipercolesterolemia e agregação plaquetária (BREENE, 1990; CHANG et al., 1991; JONG e BIRMINGHAM, 1993). Trabalhos atuais têm mostrado o potencial antitumoral, anti-inflamatório, antidiabético e antimicrobiano, de cogumelos comestíveis (YAN et al., 2018; CHEN et al., 2018; MINATO et al., 2018; MILHORINI et al., 2018).

A proposta do projeto visa à utilização de extratos naturais (de cogumelos com potencial medicinal/biotecnológico) para o controle do crescimento e análise de possíveis alterações nos fatores de virulência de *C. albicans* como filamentação, formação de tubo germinativo e formação de clamidósporos.

Neste projeto foram realizados ensaios preliminares visando à padronização dos protocolos de análise do efeito dos extratos aquosos dos basidiomicetes *Macrocybe titans* e *Ganoderma lucidum* sobre o crescimento e a micromorfologia da cepa comercial *C. albicans* ATCC 90028, em condições normais e pós-exposição aos extratos dos cogumelos.

1.1 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2 2.1 CANDIDA ALBICANS, POLIMORFISMO E VIRULÊNCIA.

Candida albicans é um microrganismo polimórfico que altera sua morfologia de acordo com as condições ambientais existentes. Pode crescer na forma de levedura, hifa, pseudo-hifa e clamidósporo (Figura 1), sendo que em cada forma morfológica apresenta diferente potencial de virulência (GOW et al., 2012).

As hifas são estruturas tubulares, com intenso metabolismo apical, e alto fluxo de substâncias. O citoplasma é protegido por uma parede rígida que separa o fungo, fisicamente e funcionalmente, do meio extracelular. As hifas podem ser divididas em compartimentos (septos) ou serem interconectadas, de acordo com o grupo de fungo considerado. Uma pseudo-hifa pode ser muito semelhante a uma hifa e pode gerar dúvidas. Uma pseudo-hifa é definida como uma série de leveduras alongadas unidas entre si, que tem constrições nos sítios septais (VESES e

GOW, 2009). Ou seja, após o brotamento, as leveduras não se separam, alongando-se e ficando com o aspecto semelhante às hifas. A extensão de alongamento das células pode variar consideravelmente, dependendo das condições de crescimento.

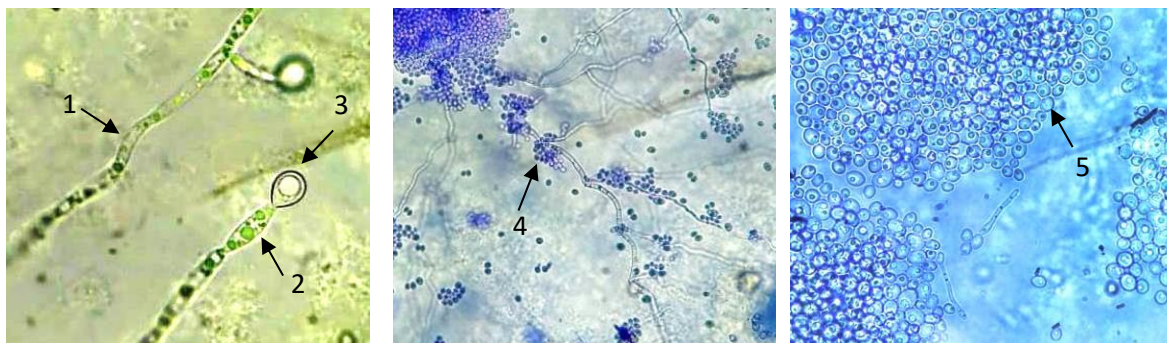


Figura 1. Hifas (1), pseudo-hifas (2), clamidósporos (3), blastósporos (4) e células leveduriformes (5) de *C. albicans*. Imagens de Adriana Fiorini Rosado.

C. albicans na sua forma leveduriforme, encontram-se no seu estado saprófito, conhecido por colonização assintomática (ALVARES et al., 2007). Já em sua forma filamentosa, de hifas e pseudo-hifas, são consideradas patológicas (NOBLE et al., 2017). Os clamidósporos são esporos arredondados que possuem uma espessa parede celular (ALVARES et al., 2007). Dentre os quatro tipos clássicos de células de *C. albicans*, leveduras e hifas são os mais bem caracterizados, enquanto pseudo-hifas e clamidósporos são menos compreendidos (NOBLE et al., 2017)

Transições morfológicas são características que definem as leveduras polimórficas, incluindo as espécies de *Candida*. Essas alterações geralmente podem ser induzidas por vários estímulos, incluindo temperatura, alterações no pH, nível de oxigênio e disponibilidade de nutrientes. Pesquisas atuais sobre a morfologia de *Candida* concentram-se principalmente na transição levedura-hifa, um fator chave de virulência especialmente em *C. albicans* (MAYER et al., 2013). Entretanto, outra estrutura morfológica, os clamidósporos (ou clamidoconídios), estruturas globulares de paredes espessas formadas por células encontradas nas pontas das hifas (ZAVALZA-STIKER et al., 2006) é frequentemente negligenciada e sua função biológica permanece ainda não elucidada. No entanto, o termo clamidósporo em *Candida* não se refere a uma unidade funcional, mas a uma unidade morfológica: embora os clamidósporos de *Candida* se assemelhem a esporos e sejam ricos em gotículas lipídicas para o fornecimento de energia

(JANSONS e NICKERSON, 1970a), eles não são mais resistentes ao calor, a falta de nutrientes ou ao ressecamento, em comparação com as células de leveduras (CITIULO et al., 2009).

O ambiente natural para a formação de clamidósporos permanece desconhecido, e nenhuma relação entre a formação de clamidósporos e o estilo de vida comensal ou patogênico de *Candida* foi demonstrado: apenas estudos esporádicos relataram o isolamento de clamidósporos de pacientes com candidemia (CHABASSE et al., 1988) e alguns isolados de *C. albicans* de espécimes clínicos não apresentavam clamidósporos. Assim, um possível envolvimento dos clamidósporos no processo de infecção ainda não é claro. No entanto, o fato de que a capacidade de formar clamidósporos ter sido conservada na grande maioria dos isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, as principais espécies patogênicas deste gênero, sugere uma importante função biológica para ambas as espécies (BÖTTCHER et al., 2016). Embora a função biológica dos clamidósporos ainda não tenha sido descoberta, os genes essenciais necessários para sua formação foram descritos (NOBILE et al., 2003).

A maioria das infecções causadas por *C. albicans* estão associadas à capacidade de formação de biofilmes (CAVALHEIRO e TEIXEIRA, 2018). O biofilme é caracterizado por uma comunidade de microrganismos aderidos a uma superfície e envoltos por uma matriz de proteínas extracelulares, que servem como uma barreira antifúngica. Este processo inicia-se com a adesão de células de leveduras que se proliferam formando estruturas filamentosas, sendo a formação de hifas uma característica do início da formação de biofilmes (JABRA-RIZK et al., 2004).

2.2 *Macrocybe titans*

Macrocybe titans é um fungo basidiomicete encontrado em regiões tropicais e subtropicais da América do Norte e do Sul, recentemente reportado no Brasil pelo especialista em taxonomia de macrofungos, André de Meijer, em Antonina, Paraná (WISNIEWSKI et al., 2010) (Figura 2).

Pode ser localizado crescendo em áreas urbanas, em gramados, áreas arenosas ou em solos perturbados pelo paisagismo, ou mesmo em áreas de cultivo agrônômico, geralmente em um ano após a perturbação do solo, onde se desenvolve sozinho ou em grupos durante o outono e inverno. Seu basidioma é considerado o terceiro maior entre os cogumelos lamelados,

desenvolvendo em condições ideais um píleo convexo de 8 a 100 cm, com tons que variam do creme ao ocre e marrom (PEGLER, 1998).



Figura 2. *Macrocybe titans* encontrado na região de Assis Chateaubriand – PR. Imagem de Claudemir Tezolin. Este espécime foi utilizado nesse trabalho.

Existem relatos deste cogumelo encontrado no Caribe, América Central, México, América do Sul e na Flórida e Geórgia, nos Estados Unidos (DELON e BREWER, 2013). Sete espécies do gênero *Macrocybe* foram relatadas no mundo, entre elas *M. crassa*, *M. gigantea*, *M. lobayensis*, *M. pachymeres*, *M. praegrans*, *M. spectabilis* e *M. titans*.

Algumas espécies de basidiomicetes têm sido utilizadas como suplementos alimentares ou iguarias gastronômicas, devido ao seu alto valor nutricional e sabor; além do uso terapêutico, fortalecendo o sistema imune e apresentando atividades antioxidante e antimicrobiana (VETCHINKINA, 2018). Estudos mostram que basidiomicetes de vários gêneros possuem moléculas bioativas com potencial contra uma ampla gama de doenças humanas, sendo que não são tóxicos e são alimentos funcionais, oferecendo inúmeros benefícios fisiológicos (GIRI et al., 2012; VETCHINKINA, 2018).

Há poucos registros que tratam da potencialidade de *M. titans* como produtor de substâncias bioativas. Ademais, não foram documentadas características fisiológicas, condições de cultivo e potencial biotecnológico para este fungo, tendo-se apenas conhecimento de estudos que indicam ausência de produção de toxinas clássicas (WISNIEWSKI et al., 2010).

O único artigo encontrado na literatura, até o presente momento, reportando alguma atividade medicinal de *M. titans* é um trabalho recente realizado por nossos colaboradores da UFPR – Curitiba. Neste artigo, os pesquisadores apresentam a caracterização, pelas técnicas de HPSEC-MALLS e GC-MS, além de C^{13} RMN e estudos de degradação enzimática, de um polissacarídeo homogêneo com peso molecular de $14,2 \times 10^3$ g/mol composto por galactose e fucose, de uma fração aquosa de *M. titans*. As análises de RMN e metilação confirmaram a presença de uma fucogalactana com capacidade de reduzir a migração de células tumorais *in vitro* (MILHORINI et al., 2018). Porém, outras espécies do gênero *Macrocybe* apresentam compostos bioativos com atividades antimicrobianas já estudadas, como é o caso de *M. crassa*, onde análises de extrato etanólico apresentaram componentes bioativos como fenóis, flavonóides, ácido ascórbico, β -caroteno e licopeno, sendo que a porção fenólica mostrou efeito antimicrobiano contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas (KHATUA e ACHARYA, 2014).

2.3 *Ganoderma lucidum*

O fungo *Ganoderma lucidum* é considerado um ilustre membro dos *Ganodermataceae*, caracterizada unicamente pelos seus basidiósporos de parede dupla (MALARVIZHI, 2014). O nome *lucidum* origina-se do latim para “lucidus”, o qual significa “brilhante”, e refere-se ao aspecto envernizado dos corpos de frutificação, que são estruturas resistentes, com a presença de sulcos, e de aparência distinta (HOBBS, 2003) (Figura 3). A espécie pode ser encontrada em florestas das Américas do Norte e Sul, Europa e Ásia, crescendo em árvores folhosas, principalmente carvalho, castanheira e ameixeira, individualmente ou em grupos (ROBERTS & EVANS, 2013). Apesar do seu desenvolvimento adaptável em madeira viva ou morta, sua ocorrência é sazonal; seus corpos de frutificação não crescem mais do que uma vez por ano, todavia estes podem durar meses (PERUMAL, 2009).

Ganoderma lucidum é comumente chamado de Reishi, no Japão, e Ling-Zhi, na China, onde há muito tem sido utilizado na medicina tradicional oriental para promoção da saúde e longevidade, sendo assim conhecido como “erva da potência espiritual”. A ele também são atribuídas propriedades terapêuticas, como efeitos tonificantes, fortalecimento das funções

cardíaca e respiratória, melhora da memória, tratamento de insônia e aumento da energia vital (WACHTEL-GALOR et al., 2011).

Estas crenças, no entanto, hoje podem ser fundamentadas em diversos estudos que demonstraram a eficácia do fungo na prevenção e tratamento de doenças humanas, como artrite, nefrite, bronquite, alergias, hepatopatia, hipertensão, câncer e asma (ĆILERDŽIĆ et al., 2014).



Figura 3. *Ganoderma lucidum*. Fonte: <http://www.alkalineenergies.com/copy-of-energy-harmonising>

Espécies de *Ganoderma* tem sido tradicionalmente usadas para tratar doenças infecciosas crônicas, como hepatite crônica e bronquite na Ásia, quando administrada isoladamente em combinação com agentes quimioterápicos. Estudos pré-clínicos (*in vitro* e *in vivo*) em animais, indicam que *Ganoderma* exibe um amplo espectro de atividades antibacterianas e antivirais, enquanto os dados em seres humanos são escassos (VAZIRIAN et al., 2014). Polissacarídeos ou triterpenóides de *Ganoderma* mostraram atividades *in vitro* contra vírus herpes simples, vírus da hepatite B, HIV e vírus Epstein-Barr ou em modelos animais (QUERESHI et al., 2010). As espécies de *Ganoderma* também contêm constituintes antibacterianos que inibem *in vitro* as bactérias Gram-positivas e/ou Gram-negativas (GAO et al., 2007). O potencial antimicrobiano da espécie *G. lucidum* tem sido bastante relatado (GAO et al., 2007; HELENO et al., 2007; KLAUS et al., 2007; KAMBLE et al., 2011; VAZIRIAN et al., 2014; NAVEEN KUMAR et al., 2018; OFODILE et al., 2005; QUERESHI et al., 2010; ROFULI III et al., 2005). O efeito de *G. lucidum* sobre *C. albicans* tem sido descrito por (SWATI et al., 2018; BHARDWAJ et al., 2017)

e para outras espécies de *Candida* por (CHABAVIZADEH et al., 2017; NAVEEN KUMAR et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

A pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de analisar o efeito de extratos dos fungos basidiomicetes *Macrocybe titans* e *Ganoderma lucidum* sobre o desenvolvimento e micromorfologia de *Candida albicans*.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar o efeito dos extratos bruto e filtrado de *M. titans* e *G. lucidum* sobre a multiplicação, em meio de cultura, de *C. albicans*;
- Quantificar, através das medidas da Densidade Ótica, o número de colônias e o número de células de *C. albicans*, após contato com os extratos.
- Verificar possíveis alterações na micromorfologia de *C. albicans*, após o contato com os extratos dos cogumelos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

O trabalho foi realizado no Laboratório de Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA) da Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina e Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, no período de Agosto a Novembro de 2018.

4.2 Microrganismo

Foi utilizada a cepa de *Candida albicans* ATCC (American Type Collection Culture) 90028 para avaliação do efeito dos extratos.

4.3 Preparo dos extratos aquosos de *M. titans* e *G. lucidum*

Um total de 12,5 g dos basidiomas secos triturados de *M. titans* e *G. lucidum* foi eluído em 50 mL água destilada, mantido *overnight* a 4° C e posteriormente filtrado em coador de voal (fração bruta). Uma parte do volume foi filtrada em filtro de 0,22 µM (fração diluída) com auxílio de uma seringa. Foram, portanto, obtidas as frações bruta e diluída dos extratos.

4.4 Incubação dos extratos de *M. titans* e *G. lucidum* sobre o crescimento de *C. albicans*

Uma colônia pura de *C. albicans* ATCC 90028, obtida por cultivo *overnight* em Ágar Sabouraud foi pré-inoculada em 10 mL de caldo YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 1% de dextrose) e mantida *overnight* em incubadora com temperatura controlada a 28 °C com rotação de 125 rpm. Após o período de incubação do inóculo inicial, a cultura foi diluída em 300 mL de meio YPD com o objetivo de se obter um inóculo com densidade ótica padronizada (D.O.) de 0,1 a 600 nm e posteriormente fracionados em Erlenmeyers com 50 mL do inóculo. Os extratos dos cogumelos foram adicionados na proporção 1:10, sendo 5 mL dos extratos em 50 mL do inóculo de *C. albicans*. A leitura da D.O. foi novamente verificada, sendo correspondente ao tempo zero. Os ensaios com o controle foram realizados adicionando 5 mL de meio de YPD ao inóculo. Os frascos foram incubados a 28°C com agitação de 125 rpm durante 12 horas. Após esse período, as D.O.s em espectrofotômetro, foram novamente verificadas.

4.5 Contagem de células de *C. albicans* após contato com os extratos de *M. titans* e *G. lucidum*

Após 12 horas de cultivo na presença ou na ausência dos extratos dos cogumelos, as culturas foram diluídas na proporção de 1:10 em salina estéril, fragmentado na proporção de 1:1 em azul de metileno, para a realização da contagem de células em câmara de Neubauer. Foram contadas as quatro partes externas referentes ao quadrante inferior esquerdo da câmara, obtendo-se assim o número de células viáveis (vivas) e inviáveis (mortas).

4.6 Contagem de colônias de *C. albicans*, após contato com os extratos de *M. titans*

A verificação do potencial fungistático ou fungicida dos extratos de *M. titans* sobre a viabilidade de *C. albicans* foi realizada pela técnica de contagem em placa de cultura por microgota (ROMEIRO, 2001). Após o período de incubação, na presença e ausência dos extratos filtrado e bruto de *M. titans*, a cultura de *C. albicans* foi diluída sequencialmente de 10^{-1} até 10^{-10} e um total de 5 μ L de cada diluição foi aplicado na superfície do ágar em duas placas, sendo uma para as diluições 10^{-1} até 10^{-4} e outra para as diluições 10^{-5} até 10^{-10} . As culturas foram incubadas por 18-24 horas à 28° C e após este período, foi feita a contagem das colônias.

4.7 Microcultivo de *C. albicans* com e sem os extratos dos cogumelos

Um total de 300 μ L dos extratos de *M. titans* e *G. lucidum* foi adicionado a 3 mL de ágar fubá (proporção 1:10) com Tween 80, exceto para o ensaio controle, no qual foi adicionado 300 μ L de água. Uma lâmina de microscopia foi coberta com o meio e inserida em uma placa de Petri (90x15 mm). Uma colônia pura de *C. albicans* foi diluída em 3 mL de salina estéril (NaCl 0,85%) e semeada no meio com auxílio de uma alça descartável calibrada de 10 μ L, com descarregamento inicial no início da lâmina e esgotamento em “zigue zague”. As estrias foram cobertas com uma lamínula estéril de 24x32 milímetros. Para evitar dessecação do meio, um ambiente úmido foi mantido adicionando água destilada a um papel filtro colocado no fundo da placa de Petri. Após 72 horas, os microcultivos foram analisados através de microscopia ótica, para observação de estruturas típicas como pseudo-hifas, blastoconídios e clamidoconídios.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados os efeitos dos extratos bruto e filtrado de *M. titans* e *G. lucidum* na inibição do crescimento de *C. albicans*. Após o contato por 12 horas com os extratos, as leveduras apresentaram, através de medida da D.O., uma diminuição de 86% e 44% na presença dos extratos bruto e filtrado de *M. titans*, e 50% e 22%, na presença dos extratos bruto e filtrado de *G. lucidum*, respectivamente (Figura 4).

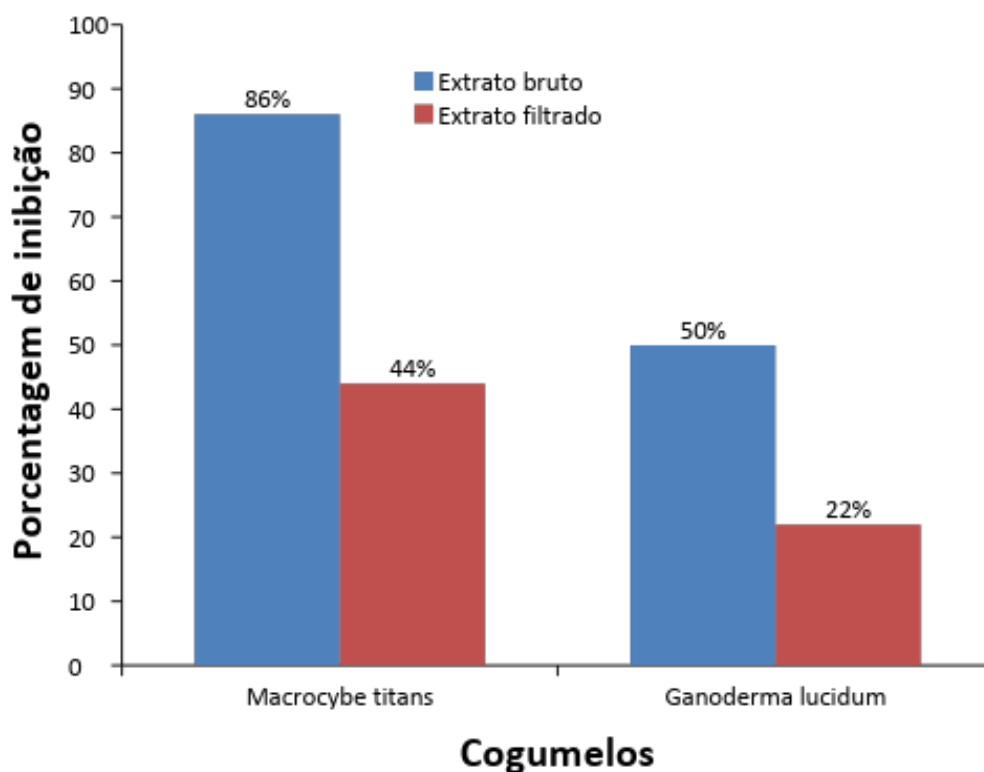
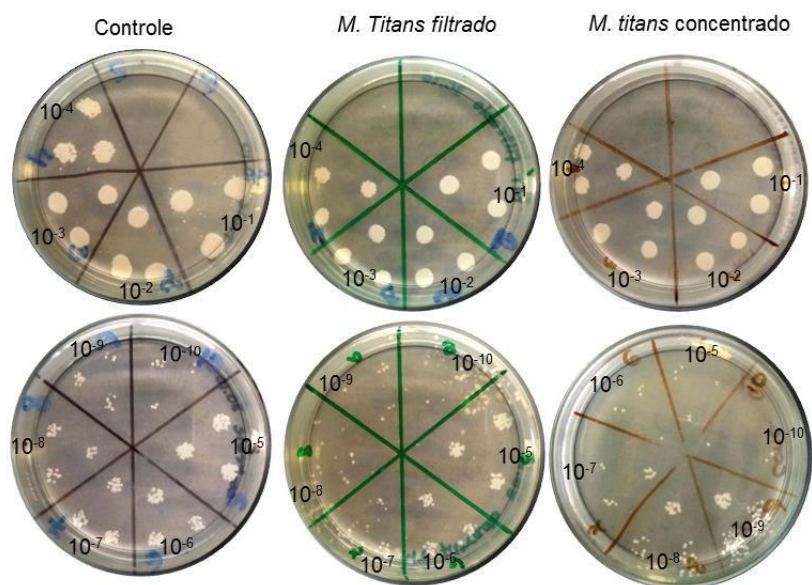


Figura 4. Efeito dos extratos de *Macrocybe titans* e *Ganoderma lucidum* no crescimento de *C. albicans*. As leveduras foram cultivadas durante 12 horas após contato com os extratos. Após este período, foi feita a leitura da absorbância em 600 nm e os valores expressos em densidade ótica (D.O.). Os valores do eixo Y correspondem à porcentagem de inibição do crescimento, em relação ao controle.

Após o cultivo em meio líquido por 12 horas na presença dos extratos de *M. titans*, as leveduras foram plaqueadas em ágar Sabouraud após diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-10} . O número de colônias teve uma redução de 64,4% e 51,1%, referentes aos ensaios com os extratos bruto e filtrado, respectivamente (Figura 5), sugerindo um possível efeito fungistático desse

cogumelo, pois, comparando com os resultados da medida da D.O., possivelmente as células voltaram a se multiplicar, quando os extratos foram removidos. O ensaio referente às leveduras tratadas com os extratos de *G. lucidum* foi realizado, porém os resultados foram insatisfatórios devido a uma contaminação das placas.



Diluições	Controle	<i>M. titans</i> (B)	<i>M. titans</i> (F)
	Número de colônias (% de inibição) em relação ao controle		
10^{-5}	25	36	29
10^{-6}	24	17 (29%)	15 (37,5%)
10^{-7}	20	6 (70%)	7 (65%)
10^{-8}	13	2 (85%)	3 (77%)
10^{-9}	7	2 (71%)	4 (43%)
10^{-10}	3	1 (67%)	2 (33%)
Média		64,4%	51,1%

Figura 5. Contagem das células de *C. albicans* em placas de ágar Sabouraud em diferentes diluições, pela técnica de microgota, após cultivo por 12 horas na ausência (controle) e presença dos extratos bruto (B) e filtrado (F) de *M. titans*.

Também foi avaliado o número de células de *C. albicans* após contato com os extratos de ambos os cogumelos, através de contagem em câmara de Neubauer. A média de células contadas no ensaio controle foi de $4,12 \times 10^8$ UFC/mL, usando o extrato bruto de *M. titans* foi de $1,80 \times 10^8$ UFC/mL, e $2,47 \times 10^8$ UFC/mL para o extrato filtrado. Para os extratos de *G. lucidum*, a média de células de *C. albicans* após contato com o extrato bruto foi de $2,09 \times 10^8$ UFC/mL e de $2,4 \times 10^8$ UFC/mL, quando se utilizou o extrato filtrado (Figura 6). Estes valores representam uma diminuição de 56 e 42% no número de células, comparando-se com o controle, quando as leveduras foram tratadas com os extratos bruto e filtrado, respectivamente, de *M. titans* e uma redução de 49 e 42%, quando foram tratadas com os extratos bruto e filtrado de *G. lucidum*. Foi possível verificar a presença de células mortas, principalmente quando se utilizou o extrato bruto.

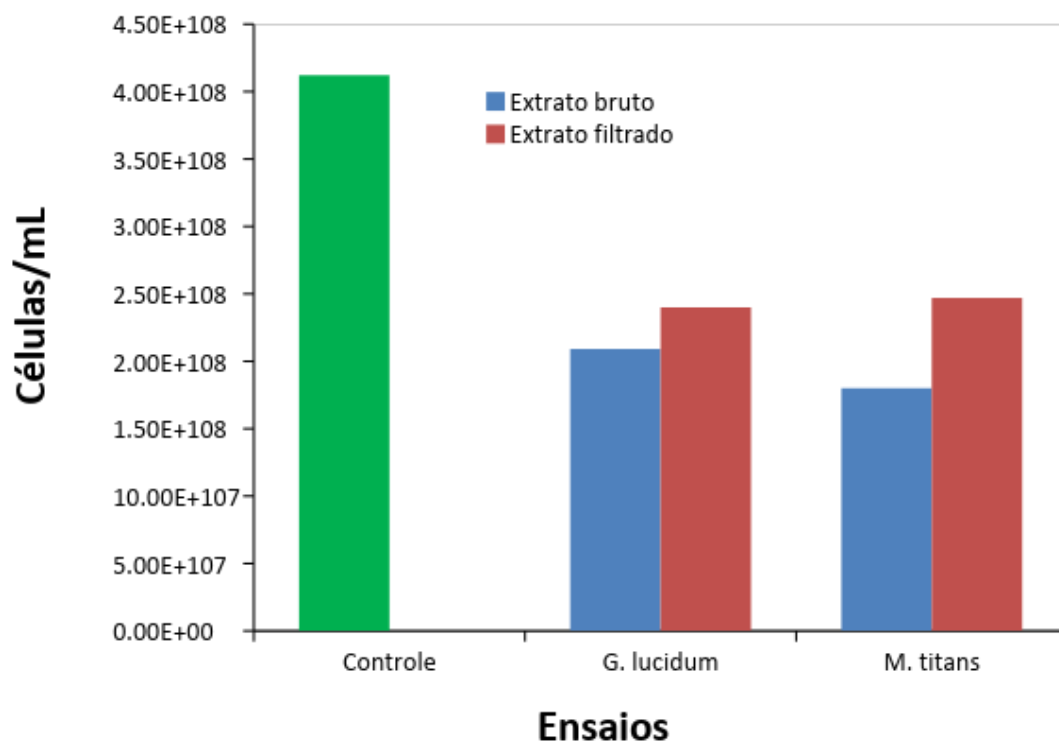


Figura 6. Efeito dos extratos bruto e filtrado de *G. lucidum* e *M. titans* na viabilidade de células de *C. albicans*. As leveduras foram cultivadas durante 12 horas após contato com os extratos. Após este período, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer com azul de metileno. Somente as células viáveis foram contadas.

O potencial antimicrobiano de *G. lucidum* tem sido extensivamente explorado por vários autores (GAO et al., 2007; HELENO et al., 2007; KLAUS et al., 2007; KAMBLE et al., 2011; VAZIRIAN et al., 2014; NAVEEN KUMAR et al., 2018; OFODILE et al., 2005; QUERESHI et al., 2010; ROFULI III et al., 2005);. O efeito de *G. lucidum* sobre *C. albicans* tem sido descrito por (SWATI et al., 2018; BHARDWAJ et al., 2017) e para outras espécies de *Candida* por (CHABAVIZADEH et al., 2017; NAVEEN KUMAR et al., 2018). No entanto, não há relatos sobre o potencial antifúngico e antibacteriano de *M. titans*.

Paccola et al. (2001) verificaram o potencial antagonista dos cogumelos comestíveis *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pholiota nameko*, *Macrolepiota bonaerensis* e *Agaricus blazei* Murill sobre *C. albicans*. Os autores utilizaram o micélio desses cogumelos em meio líquido e verificaram a diminuição do crescimento de *C. albicans* através de contagem de células em câmara de Neubauer. Verificaram que apenas *L. edodes* (Shiitake) apresentou ação inibitória sobre a multiplicação de *C. albicans*, com doses mínimas de 4%, 6% e 10% nos tempos 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Para verificar o potencial antifúngico de *L. edodes*, extrato seco e cogumelo fresco também foram testados, apresentando efeito fungistático sobre *C. albicans*. Ishikawa (1997) estudou o efeito inibitório de *L. edodes*, observando maior atividade sobre as bactérias Gram positivas, como também observado por Komemushi et al. (1996).

Em um estudo realizado por Naveen Kumar et al. (2018), o extrato aquoso e etanólico bruto do basidiomicete *Ganoderma lucidum* foi avaliado quanto à sua atividade antifúngica contra os fungos de importância clínica *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium marneffeii*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis*. O resultado mostrou que o extrato etanólico apresentou alta ação inibitória contra os fungos estudados quando comparado ao extrato aquoso. Tanto no extrato etanólico quanto no extrato aquoso foi observada a atividade máxima de inibição contra *Candida albicans*, seguida por *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Aspergillus niger*, *Penicillium marneffeii* e *Cryptococcus neoformans*.

Para se verificar se os extratos dos cogumelos causam alterações na micromorfologia de *C. albicans*, foi realizado o microcultivo, em ágar fubá com 1:10 do volume dos extratos filtrados. Os experimentos com os extratos brutos resultaram em total inibição do crescimento de *C. albicans* (dados não mostrados), para ambos os cogumelos. Esta proporção foi a mesma utilizada para os ensaios de análise da multiplicação em meio YPD, anteriormente descrita. *C.*

albicans pode apresentar variações na morfologia, dependendo das condições ambientais. Normalmente apresenta forma de levedura em condições de crescimento padrão (como por exemplo, em meios de cultura nutritivos). No entanto, pode apresentar filamentação, presença de hifas ou pseudo-hifas alongadas ou clamidoconídios (SUDBERY et al., 2004). Nós observamos que a formação de clamidoconídios foi mais abundante nas leveduras controle (sem extrato de cogumelos) (Figuras 8A e 8B).

A adição do extrato filtrado de *M. titans* no ágar fubá resultou em uma diminuição do número de clamidoconídios e um aumento na filamentação, após 3 dias de incubação (Figuras 7B, 7E, 8C e 8D). Foi também observado maior formação de células alongadas (Figuras 8C e 8D), na presença de *M. titans*, comparando-se com as leveduras controle. Essas células filamentosas se assemelham mais a pseudo-hifas do que a tubos germinativos devido à presença de uma constrição no entre a célula mãe e o filamento (Figura 8D, seta preta).

Quando as leveduras foram cultivadas em ágar fubá com o extrato de *G. lucidum*, foi possível observar um sutil aumento na formação de blastoconídios (Figuras 8E e 8F). Segundo Souza et al. (2016), os quais utilizaram o óleo essencial de *Coriandrum sativum* L. contra *C. albicans*, os blastoconídios representam uma estrutura comensal, não associada com virulência de leveduras, e portanto, não é interessante que eles apresentem alguma alteração.

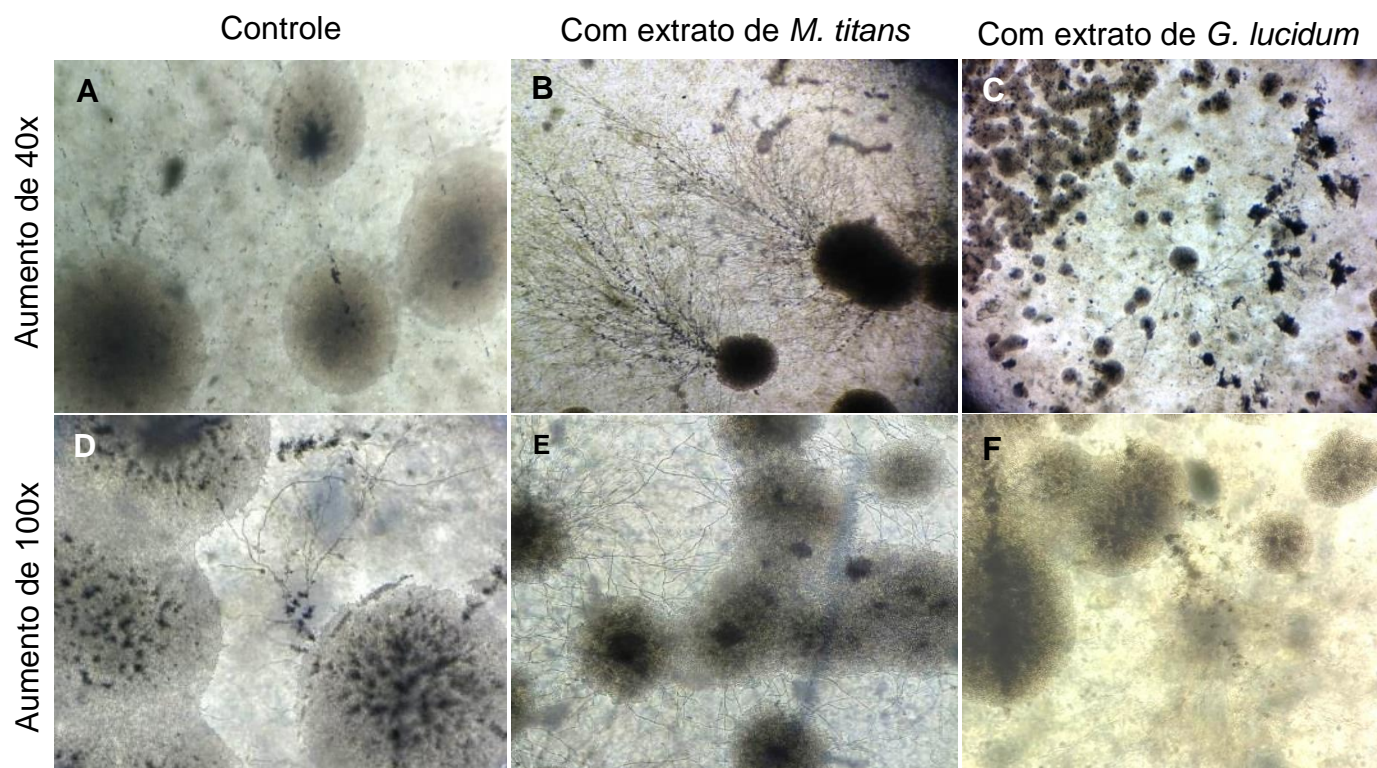


Figura 7. Efeito dos extratos de *Macrocybe titans* e *Ganoderma lucidum* sobre a micromorfologia de *C. albicans*. As células de *C. albicans* foram semeadas em ágar fubá com Tween 80 na ausência e presença dos extratos filtrados de cada cogumelo. Imagens foram obtidas nos aumentos de 100 e 400x, em microscópio ótico depois de 3 dias de incubação a 28° C.

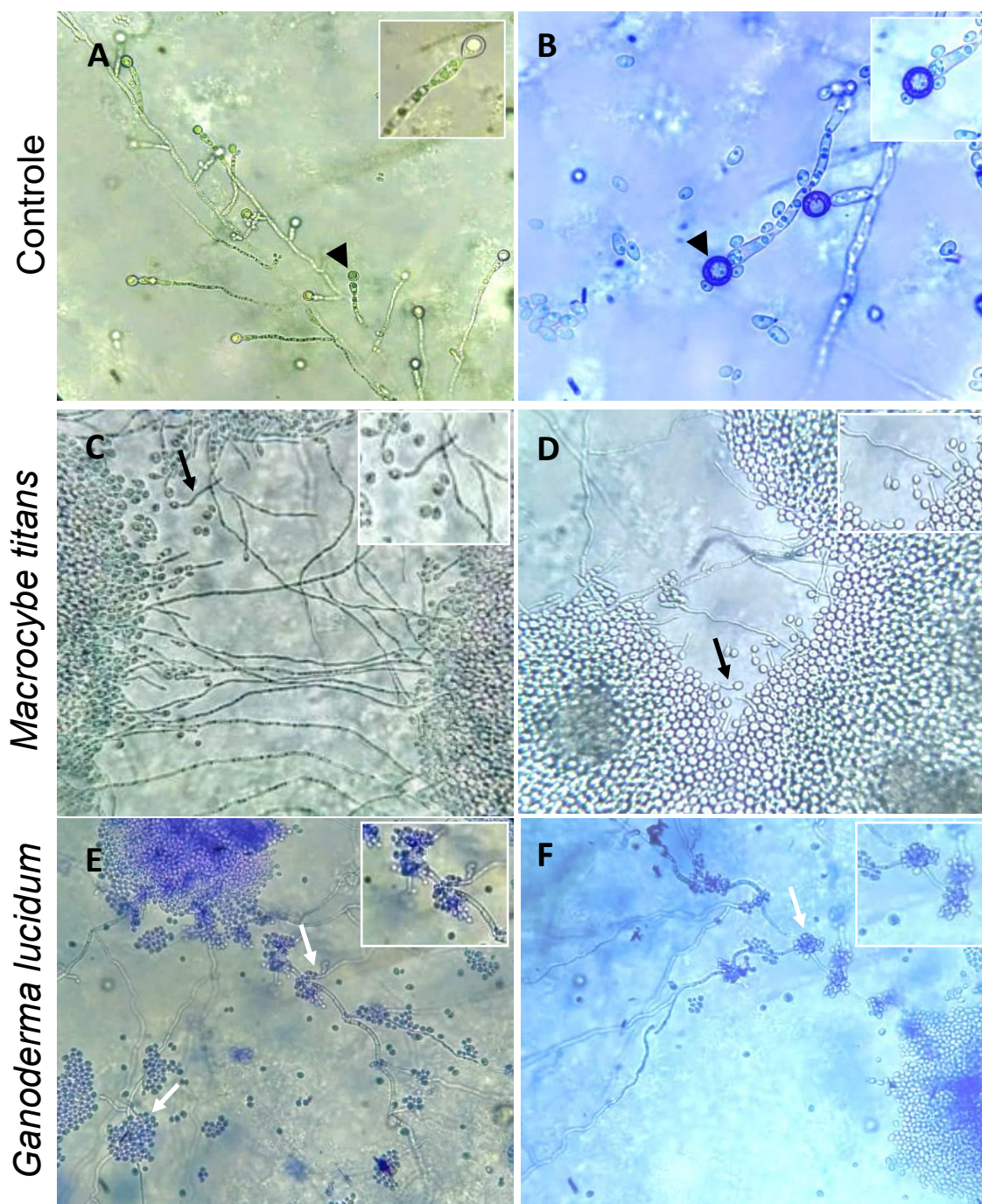


Figura 8. Efeito dos extratos de *Macrocybe titans* e *Ganoderma lucidum* sobre a micromorfologia de *Candida albicans*, mostrando maior formação de clamidoconídios (cabeças de seta) quando *C. albicans* foi cultivada na ausência do extrato de *M. titans* (A e B), prevalência de filamentação (setas pretas), quando *C. albicans* foi cultivada com o extrato de *M. titans* (C e D) e prevalência de blastoconídios (setas brancas), quando *C. albicans* foi cultivada com o extrato de *G. lucidum* (E e F). Cultivo em ágar Fubá com Tween 80. Todas as imagens foram obtidas nos aumentos de 400x, exceto a imagem B (1000x) em microscópio óptico depois de 3 dias de incubação a 28° C.

Ao contrário do que foi observado por Martin et al. (2005), em que a utilização do antifúngico natural farnesol provocou um aumento do número de clamidoconídios em *C. albicans*, em nosso trabalho, quando as leveduras foram semeadas em ágar fubá e incubadas, a 37° C, com extrato de *M. titans*, a presença de clamidoconídios foi dificilmente encontrada (Figura 8 C e D). Estes autores avaliaram também o efeito da temperatura de incubação (23 e 37° C) sobre a filamentação de *C. albicans* e observaram que uma maior filamentação foi observada na temperatura de 37° C. O papel dos clamidoconídios na infecção causada por *C. albicans* não é claro. Estas estruturas são definidas como esporos assexuais de paredes finas, derivados de hifas. No ciclo de vida de *C. albicans* o seu papel também não é compreendido, pois eles são raramente observados nos locais de infecção e também não há evidências sobre o papel sobre a resistência de *C. albicans*. No entanto, esta estrutura pode apresentar alguma contribuição na virulência de *Candida*, pois é característica das duas espécies mais patogênicas desse gênero (*C. albicans* e *C. dubliniensis*) (AL-HEDAITHY e FOTEDAR, 2002; AL MOSAID et al., 2003). Análises adicionais deverão ser realizadas para elucidar o papel biológico dos clamidoconídios.

Em um trabalho realizado por Castro et al. (2013), o uso de óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum blume* e nistatina inibiu a formação de pseudo-hifas e clamidoconídios de *C. albicans*, além de promover diminuição no crescimento da levedura. Leite e colaboradores (2014) reportaram que o agente Citral (3,7-dimethyl-2-6-octadienal) provocou uma diminuição na formação de pseudo-hifas e clamidoconídios em *C. albicans*. Xu et al. (2013), também comprovaram que não ocorre filamentação quando *C. albicans* foi cultivada a 23° C em meio YPD líquido. No entanto, quando a enzima β -1-3-Glucanase foi adicionada ao cultivo, houve a indução da filamentação. Um aumento da filamentação foi observado nas temperaturas de 30° C e 37° C, na presença dessa enzima. As β -1,3-Glucanases são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas do tipo β -1,3 presentes em β -D-glucanas, liberando glucose como produto principal. Considerando que cogumelos basidiomicetes apresentam altas concentrações de β -D-glucanas, a presença do extrato de *M. titans* nos cultivos de *C. albicans* poderia induzir a um aumento da produção da glucanase, e conseqüentemente a um aumento da filamentação. Os autores também mostraram que na presença de farnesol e β -1,3-Glucanases, houve uma redução na filamentação de *C. albicans*. Considerando que a filamentação em leveduras do gênero *Candida* é um fator de

virulência, estudos adicionais deverão ser realizados para entender melhor o papel da filamentação em *C. albicans* sob influência do extrato de *M. titans*.

Como os fungos microscópicos não possuem estruturas móveis (como cílios ou flagelos), a formação de filamentos fornece um mecanismo para alcançar nichos mais favoráveis (TREVIANO-CONTADOR et al., 2016). Em *Candida* spp., os blastoconídios dividem-se por brotamento em meios de cultura ricos em nutrientes, originando uma progênie de tamanho e morfologia similar. Mas em certas condições, os blastoconídios pode sofrer uma alteração que resulta na formação de filamentos. Pseudo-hifas são formadas quando blastoconídios originados por brotamento não se separam completamente. Em contraste, hifas verdadeiras são caracterizadas pela aparência de um tubo originado de um blastoconídio (que é denominado como tubo germinativo), que após o crescimento contínuo resulta em um longo filamento. Hifas podem conter septos que separam células com núcleos individuais, ou são contínuas com múltiplos núcleos (TREVIANO-CONTADOR et al., 2016).

Ainda há muito a ser explorado, mas acredita-se que, a regulação da morfogênese em *C. albicans*, como a alteração da forma de levedura para a forma filamentosa, está relacionada com a virulência desse patógeno oportunista e estudos adicionais deverão ser realizados para comprovar o efeito de extratos de fungos basidiomicetes nestas alterações.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste trabalho relacionados com o desenvolvimento de *C. albicans* cultivada na presença de extratos dos fungos basidiomicetes *M. titans* e *G. lucidum* mostram que houve uma inibição significativa do crescimento e no número de células viáveis da levedura, como demonstrado pela D.O., microcultivo, observações macro e microscópicas e técnica da microgota. Estes resultados permitem inferir que algum componente (s) presente (s) no extrato destes fungos basidiomicetes, é capaz de influenciar o crescimento e a diferenciação celular, e conseqüentemente a virulência, deste importante patógeno, já que a formação de estruturas específicas como os clamidoconídeos estão diretamente relacionados com a capacidade de invasão e colonização de tecidos do hospedeiro. Ainda são poucos os relatos na literatura que versam sobre as estruturas químicas isoladas a partir dos basidiomas, principalmente de *M. titans*, e nosso grupo de trabalho pretende dar continuidade nesta linha de pesquisa, através da purificação e análises técnicas como o HPLC, para a determinação das frações ativas que apresentam efeito biológico. Também pretende-se diversificar a metodologia de extração destas substâncias, e realizar ensaios para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) destas frações. Outra perspectiva é a avaliação do efeito desses cogumelos em outras espécies de leveduras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HEDAITHY, S. S. A.; FOTEDAR, R. Recovery and studies on chlamyospore-negative *Candida albicans* isolated from clinical specimens. **Medical Mycology**, v. 40, p. 301–306, 2002.

AL-MOSAID, A.; SULLIVAN, D. J.; COLEMAN, D. C. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's agar. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4787–4789, 2003.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n.5, p. 319-327, 2007.

BHARDWAJ, A.; GUPTA, P.; KUMAR, N.; MISHRA, J.; KUMAR, A.; RAKHEE, R.; MISRA, K. Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), Inhibits *Candida* Biofilms: A Metabolomic Approach. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.19, n. 8, p. 685-696, 2017. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.2017021225.

BÖTTCHER, B.; PÖLLATH, C.; STAIB, P.; HUBE, B.; BRUNKE, S. *Candida* species Rewired Hyphae Developmental Programs for Chlamyospore Formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 1697. eCollection, 2016.

BREENE; W.M. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. **Journal of Food Protection**, 53:883-894, 1990.

CASTRO, R.D.; LIMA, E.O.; FREIRES, I.A.; ALVES, L.A. Combined effect of *Cinnamomum zeylanicum blume* essential oil and nystatin on *Candida albicans* growth and micromorphology. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n.2, p.149-156, 2013.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. 28, 15 p., 2018.

CHABASSE, D., BOUCHARA, J.P., GENTILE, L., CHENNEBAULT, J.M. *Candida albicans* chlamyospores observed *in vivo* in a patient with AIDS. **Annales de Biologie Clinique**, v. 46, p. 817–818, 1988.

CHABAVIDAZE, J.; SADEGHI, M.; CHADEGANIPOUR, M.; GHAHRI, M.; DEHGHAN, P.; MAHAKI, B. The antifungal effects of alcoholic extract of *Ganoderma lucidum* on candida isolates. **Medical Mycology**, v. 3, n.2, 2017. DOI: 10.21767/2471-8521-C1-003.

CHANG, S.T.; BUSWELL, J.A.; MILES, P.G. Genetics and Breeding of edible mushrooms. **Gordon and Breach Science Publishers S.A.** Amsterdam, 1991, 322p.

CHEN, P.; QIN, H.J.; LI, Y.W.; MA, G.X.; YANG, J.S.; WANG, Q. Study on chemical constituents of an edible mushroom *Volvariella volvacea* and their antitumor activity *in vitro*. **Natural Product Research**, v. 20, p.1-6, 2018. doi: 10.1080/14786419.2018.1509324.

CITIULO, F., MORAN, G.P., COLEMAN, D.C., SULLIVAN, D.J. Purification and germination of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* chlamydospores cultured in liquid media. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 1051–1060, 2009. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00533.x

CONTADOR, N.T.; RUEDA, C.; ZARAGOZA, O. Fungal morphogenetic changes inside the mammalian host. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, n. 57, p. 100–109, 2016.

DANTAS, A. S.; DAY, A.; IKEH, M.; KOS, I.; ACHAN, B.; QUINN, J. Oxidative Stress Responses in the Human Fungal Pathogen, *Candida albicans*. **Biomolecules**, v. 5, p. 142-165, 2015.

DEBENDRA, N.R.; AZAD, A. K.; SULTANA, F.; ANISUZZAMAN, A.S.M. In-vitro antimicrobial activity of ethyl acetate extract of two common edible mushrooms. **The Journal of Phytopharmacology**, v. 5, n. 2, p. 79-82, 2016.

DELONG, J.; BREWER, M.T. ***Macrocybe titans*: Largest Mushroom Species in the Western Hemisphere Found Growing in Georgia**. University of Georgia Extension, 2013.

GAO, Y.; TANG, W.; GAO, H.; CHAN, E.; LAN, J.; LI, X.; ZHOU, S. Antimicrobial Activity of the Medicinal Mushroom *Ganoderma*. **Food Reviews International**, v. 21, n. 2, p. 211-229, 2005. DOI: 10.1081/FRI-200051893.

GIRI, S.; BISWAS, G.; PRADHAN, P.; MANDAL, S. C.; ACHARYA, K. Antimicrobial activities of basidiocarps of wild edible mushrooms of West Bengal, India. **International Journal of PharmTech Research**, v. 4, n.4, p. 1554-1560, 2012.

GOW, N. A.; VAN DE VEERDONK, F.L.; BROWN, A. J.; NETEA, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 22-112, 2012.

HELENO, S.A.; FERREIRA, I.C.; ESTEVES, A.P.; ČIRIĆ, A.; GLAMOČLIJA, J.; MARTINS, A.; SOKOVIĆ, M.; QUEIROZ, M.J. Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, *p*-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 95-100, 2013. doi: 10.1016/j.fct.2013.04.025.

ISHIKAWA, N. K. Avaliação da atividade antagonista de *Lentinula edodes*. Viçosa, 1997. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Viçosa – MG.

JABRA-RIZK, M. A.; FALKLER, W. A.; MEILLER, T. F. Fungal biofilms and drug resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n.1, p. 14-19, 2004.

JANSONS, V.K., NICKERSON, W.J. Chemical composition of chlamydospores of *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v. 104, n. 922–932, 1970a.

JONG, S.C.; BIRMINGHAM, J.M. Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom. **Advances in Applied Microbiology**, v. 39, p. 153-184, 1993.

KAMBLE, R.; VENKATA, S.; GUPTA, A.M. Antimicrobial Activity of *Ganoderma lucidum* Mycelia. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, October v. 5, n. 2, p. Proof, 2011.

KHATUA, S.; ACHARYA, K. Antioxidant and antimicrobial potentiality of quantitatively analysed ethanol extract from *Macrocybe crassa*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 29, n. 11, p. 53-60, 2014.

KLAUS, A.; NIRKŠIĀ, M. Influence of the extracts isolated from *Ganoderma lucidum* mushroom on some microorganism. **Proceedings of National Academy of Sciences, Matica Srpska Novi Sad**, n. 113, p. 219-226, 2007.

KOMEMUSHI, S.; YAMAMOTO, Y.; FUJITA, T. Purification and identification of antimicrobial substances produced by *Lentinus edodes*. **Journal Antifungal Agents**, v. 24, p. 21-25, 1996.

LEITE, M. C.; BEZERRA, A. P.; DE SOUSA, J. P.; GUERRA, F. Q.; LIMA, E. D. E. O. Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, ePub, 2014.

MARTIN, S. W.; DOUGLAS, L. M.; KONOPKA, J. B. Cell Cycle Dynamics and Quorum Sensing in *Candida albicans* Chlamydospores Are Distinct from Budding and Hyphal Growth. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 7, p. 1191-1202, 2005.

MAYER, F. L., WILSON, D., HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MILHORINI, S.D.S.; SMIDERLE, F.R., BISCAIA, S.M.P.; ROSADO, F.R.; TRINDADE, E.S.; IACOMINI, M. Fucogalactan from the giant mushroom *Macrocybe titans* inhibits melanoma cells migration. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, p. 50-56, 2018. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.02.063.

MINATO, K.I.; LAAN, L.C.; VAN DIE I.; MIZUNO, M. *Pleurotus citrinopileatus* polysaccharide stimulates anti-inflammatory properties during monocyte-to-macrophage differentiation. **International Journal Biological of Macromolecules**, v. 122, p. 705-712, 2018. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.157.

NAVEEN KUMAR, C.; JAYALAKSHMI, G.; CHIDAMBARAM, R.; SRIKUMAR, R. *In-vitro* Evaluation of Antifungal Activity of *Ganoderma lucidum* Against the Biofilm Producing *Candida* species. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 51, p. 623-630, 2017.

NAVEEN KUMAR, C.; SWATHI, S.; JAYALAKSHMI, G.; CHIDAMBARAM, R.; SRIKUMAR, R. Screening of Antifungal Activity of *Ganoderma Lucidum* extract Against Medically Important Fungi. **Indian Journal of Public Health Research & Development**, v. 9, n. 1, p. 269- 272, 2018. DOI: 10.5958/0976-5506.2018.00050.5.

NOBILE, C.J.; BRUNO, V.M.; RICHARD, M.L.; DAVIS, D.A.; MITCHELL, A.P. Genetic control of chlamydospore formation in *Candida albicans*. **Microbiology**, n. 149, Pt 12, p. 3629-3637, 2003

NOBLE, S. M.; GIANETTI, B. A.; WITCHLEY, J.N. *Candida albicans* cell type switches and functional plasticity in the mammalian host. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 96-108, 2017.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Implicações dos transgênicos na sustentabilidade ambiental e agrícola. **História, Ciências, Saúde Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 7, n.2, p.481-491, 2000.

OFODILE, L. N.; UMA, N. U.; KOKUBUN, T.; GRAYER, R. J.; OGUNDIPE, O. T.; SIMMONDS, M. S. J. Antimicrobial activity of some *Ganoderma* species from Nigeria. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 4, p. 310-313, 2005.

PACCOLA, E. A. S.; MAKI, C. S.; DE NOBREGA, G. M. A.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Antagonistic effect of edible mushroom extract on *Candida albicans* growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 176-178, 2001.

PEGLER, D.N.; LODGE, D.J.; NAKASONE, K.K. The pantropical genus *Macrocybe* gen. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 494–504, 1998. <https://doi.org/10.2307/3761408>

QUERESHI, S.; PANDEY, K.A.; SANDHU, S. Evaluation of antibacterial activity of different *Ganoderma lucidum* extracts. **People's Journal of Scientific Research**, v. 3, n. 1, p. 9-13,2010.

ROFULI III, N.B.; CRUZ, A.G.V.; MEDALLA, A.P.; BUENAVISTA, T.S. Antimicrobial and Antagonistic Properties of *Ganoderma lucidum* (W.Curt.: Fr.) Lloyd. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 7, n. 3, 2005.

ROMEIRO, R. S. Técnica de Microgota para Contagem de Células Bacterianas Viáveis em uma suspensão. Universidade Federal de Viçosa; Roteiro de aulas Práticas; 2001. Disponível em: <http://docslide.com.br/science/tecnica-de-microgota.html>. Acessado em: 20/09/2018.

SOUSA, J.P.; QUEIROZ, E.O.; GUERRA, F.Q.S.; MENDES, J.M.; PEDROSA, Z.V.; FILHO, A.A.O.; PEREIRA, F.O.; TRAJANO, V.N.; SOUZA, F.S.; LIMA, E.O. Morphological alterations and time-kill studies of the essential oil from the leaves of *Coriandrum sativum* L. on *Candida albicans*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 15, n. 6, p. 398-406, 2016.

SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 12, p. 317–324, 2004.

SWATI, A.; TIWARI, P.; NEGI, S.; MEENA, H.S. A comparative evaluation of in vitro anti-inflammatory and antifungal activity of *Ganoderma lucidum* strains DARK-4 and MS-1. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 12, n. 1, 2018. S126.

TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and Disease**, v. 4, n. 4, 2016. ftw018

VAZIRIAN, M.; FARAMARZI, M.A.; EBRAHIMI, S.E.; ESFAHANI, H.R.; SAMADI, N.; HOSSEINI, S.A.; ASGHARI, A.; MANAYI, A.; MOUSAZADEH, A.; ASEF, M.R.; HABIBI, E.; AMANZADEH, Y. Antimicrobial effect of the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes) and its main compounds. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 16, n. 1, p. 77-84, 2014.

VESES, V; GOW, NA. Pseudohypha budding patterns of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 47, n. 3, p. 268-275, 2009. doi: 10.1080/13693780802245474.

VETCHINKINA, E.; LOSHCHININA, E.; KUPRYASHINA, M.; BUROV, A.; PYLAEV, T.; NIKITINA, V. Green synthesis of nanoparticles with extracellular and intracellular extracts of basidiomycetes. **PeerJ - The Journal of Life and Environmental Sciences**, 2018. 6:e5237 <<https://doi.org/10.7717/peerj.5237>>.

WISNIEWSKI, A. C.; DE ALMEIDA, M. A. L.; PALMAS, M. B.; TAVARES, L. B. B. Produção de enzimas amilolíticas por *Macrocybe titans* em resíduo do processamento de cerveja. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 3, p. 185-293, 2010.

XU, H.; NOBILE, C. J.; DONGARI-BAGTZOGLU, A. Glucanase Induces Filamentation of the Fungal Pathogen *Candida albicans*. **PLoS One**, v. 8, n. 5, 2013. e63736

YAN, J.; ZHU, L.; QU, Y.; QU, X.; MU, M.; ZHANG, M.; MUNEER, G.; ZHOU, Y.; SUN, L. Analyses of active antioxidant polysaccharides from four edible mushrooms. **International Journal Biological of Macromolecules**, In press, 2018. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.079.

YOON, S.Y.; EO, S.K.; KIM, Y.S.; LEE, C.K.; HAN, S.S. Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics. **Archives of Pharmacal Research**, v. 17, n. 6, p. 438-442. 1994.

ZAVALZA-STIKER, A.; ORTIZ-SALDIVAR, B.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, M.; CASTILLO-CASANOVA, M.; BONIFAZ, A. Rapid production of *Candida albicans* chlamydo spores in liquid media under various incubation conditions. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 47, n. 3, p. 231-234, 2006.