

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA

GISELE DA SILVA CRUZ

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO COGUMELO
Psathyrella candolleana

PALOTINA

2018

GISELE DA SILVA CRUZ

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO COGUMELO
Psathyrella candolleana

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Tecnologia em Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina como requisito parcial à obtenção do título de Tecnólogo em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Roberta Paulert

PALOTINA

2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

GISELE DA SILVA CRUZ

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO COGUMELO

Psathyrella candolleana

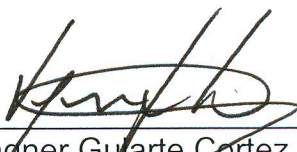
Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para aprovação na disciplina de Estágio Supervisionado Obrigatório do Curso Superior de Tecnologia Em Biotecnologia para a seguinte banca examinadora:



Prof^a. Dr^a. Roberta Paulert
Orientadora – Departamento de Ciências Agrônômicas
Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina



Prof. Dr. Isac George Rosset
Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina



Prof. Dr. Vagner Guarte Cortez
Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina

Palotina, 25 de Junho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela presença constante em minha vida, pela força e ajuda nos momentos difíceis.

À minha família, pela educação e ensinamentos concedidos, além do apoio emocional e financeiro, mesmo com a distância não me deixa esquecer o carinho e amor incondicional.

Agradeço a Universidade Federal do Paraná e aos professores pelo aprendizado que me foi proporcionado, pelas oportunidades e conhecimentos adquiridos ao longo do curso.

À minha orientadora Dra. Roberta Paulert, pela oportunidade e conhecimento partilhado. Também agradeço pela estrutura que é disponibilizada no laboratório e por todo o apoio para a realização deste trabalho.

Agradeço a minha irmã Kely que é um exemplo na minha vida, pelo apoio nos meus estudos e por ter me ajudado em tantas realizações em especial na minha graduação.

À colega Marina pelos ensinamentos, ajuda nos testes antimicrobianos e por todo conhecimento adquirido no laboratório.

Aos membros da Comissão Examinadora Dr. Vagner G. Cortez e Dr. Isac George Rosset, pelas contribuições nesse trabalho.

Aos técnicos do Departamento de Ciências Agrônômicas da UFPR Aline, Joelmir e Jamilson pela ajuda e suporte no laboratório.

As amigas que fiz durante a graduação em especial Leticia, Thais, Sabrina, Elisabeth, Maristela e Thaísa pelas conversas, momentos de descontração, ajuda e amizade.

A todos os colegas pelo apoio e incentivo durante essa caminhada obrigada.

*Opte por aquilo que faz o seu coração
vibrar, apesar de todas as consequências.*

(Osho)

RESUMO

Os fungos produzem uma ampla variedade de metabólitos secundários relatados como fontes promissoras de compostos bioativos e antimicrobianos. Estima-se que existam cerca de 22.000 espécies de basidiomicetos, mas apenas 5% foram estudados; a grande maioria é desconhecida do ponto de vista científico. Portanto, os cogumelos têm sido uma fonte de pesquisa e exploração biotecnológica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de *Psathyrella candolleana* frente a microrganismos patogênicos. O extrato orgânico foi obtido com acetato de etila, em sistema de Soxhlet, a partir dos basidiomas secos. Após a extração, o solvente foi eliminado em evaporador rotatório. Cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada com a fase móvel de clorofórmio: metanol (9:1) para verificar os compostos presentes no extrato. Os testes de atividade antimicrobiana foram conduzidos com quatro diferentes concentrações do extrato (1,25; 2,5; 5 e 10 mg/mL) frente as bactérias *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e levedura *Candida albicans*, utilizando o método de difusão em ágar e o teste de bioautografia direta. As placas foram incubadas a 36°C por 24 horas e a atividade antibacteriana foi observada pela formação de halos de inibição. Como resultados obtidos na CCD, foi possível observar a presença de seis substâncias diferentes visíveis à luz U.V. Quanto a atividade antimicrobiana, verificou-se que o extrato em acetato de etila não inibiu o crescimento dos cinco microrganismos patogênicos no teste de difusão em ágar nas concentrações testadas (1,25; 2,5; 5 e 10 mg/mL). No entanto, quando o extrato foi utilizado na CCD, separando as substâncias presentes, observou-se que apenas uma das seis substâncias presentes apresentou atividade frente às cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* no teste de bioautografia direta, indicando que estudos complementares devem ser realizados a fim de identificar este composto visando potenciais aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Produtos naturais, basidiomiceto, metabólitos secundários, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

The fungi produce a wide variety of secondary metabolites reported as promising sources of bioactive and antimicrobial compounds. It is estimated that there are about 22,000 species of basidiomycetes, but since only 5% were studied the vast majority are unknown from a scientific point of view. Therefore, mushrooms have been a source of research and biotechnology exploration. The purpose of this paper was to evaluate the antimicrobial activity of *Psathyrella candolleana* extract against pathogenic microorganisms. The organic extract was obtained from ethyl acetate, on Soxhlet System, through dry basidioma. After extraction, the solvent was removed on a rotary evaporator. A Thin Layer Chromatography (TLC) was made with mobile phase of chloroform: methanol (9:1) to verify the components in the extract. The antimicrobial activity tests were conducted with four different concentrations of the extract (1.25, 2.5, 5 and 10 mg/mL) against bacteria *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and yeast *Candida albicans*, using the agar diffusion method and the direct bioautography test. The plates were incubated at 36°C for 24 hours and the antibacterial activity was observed by the formation of inhibition halos. As obtained results from the TLC, it was possible to observe the presence of six different substances visible on UV light. As for the antimicrobial activity, the ethyl acetate extract did not inhibit the growth of the five pathogenic microorganisms in the agar diffusion test at the tested concentrations (1.25, 2.5, 5 and 10 mg / mL). However, when the extract was used in the TLC, separating the substances present, it was observed that only one of the six substances present showed activity against the strains of *S. aureus* and *P. aeruginosa* in the direct bioautography test, indicating that complementary studies should be carried out in order to identify this compound for potential biotechnological applications.

Keywords: Natural products, basidiomycete, secondary metabolites, antibacterial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR DO EXTRATO BRUTO OBTIDO COM ACETATO DE ETILA DOS BASIDIOMAS DE <i>Psathyrella candolleana</i>	23
FIGURA 2- CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA E BIOAUTOGRAFIA DIRETA DO EXTRATO BRUTO OBTIDO COM ACETATO DE ETILA DOS BASIDIOMAS DE <i>Psathyrella candolleana</i> NA FASE MÓVEL DE CLOROFÓRMIO: METANOL (9:1).....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	- American Type Culture Collection
BHI	- Brain Heart Infusion
CCD	- Cromatografia em camada delgada
DMSO	- Dimetilsulfóxido
MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
NaCl	- Cloreto de sódio
NBT	- Cloreto de Azul de Nitrotetrazólio
Rf	- Fator de retenção
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UV	- Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 FUNGOS BASIDIOMICETOS E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	13
2.2 AGENTES ANTIMICROBIANOS	15
2.3 GÊNERO <i>Psathyrella</i>	17
3 OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 MATERIAIS.....	20
4.1.1 Coleta da Amostra	20
4.1.2 Microrganismos empregados nos testes	20
4.2 MÉTODOS	20
4.2.1 Preparo do extrato fúngico.....	20
4.2.2 Extração soxhlet	20
4.2.3 Eliminação do solvente	21
4.2.4 Preparo dos meios de cultura	21
4.2.5 Preparo do inóculo microbiano	21
4.2.6 Teste de difusão em ágar	21
4.2.7 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	22
4.2.8 Bioautografia direta.....	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são seres eucariontes, encontrados como leveduras ou fungos filamentosos apresentando hifas septadas ou não. São heterotróficos e absorvem os compostos orgânicos pela liberação de enzimas. Exemplos de fungos da classe dos basidiomicetos são os cogumelos, que se caracterizam por serem macroscópicos e saprófitos, não possuindo clorofila e desta forma necessitando realizar a absorção de nutrientes do ambiente para sobrevivência (FUKUDA et al., 2009; SOUZA et al., 2016).

Os fungos são hoje representados por mais de 120.000 espécies, porém, o número aproximado de fungos na natureza pode chegar a 3,8 milhões. Estima-se que existam cerca de 150.000 espécies de cogumelos e destas apenas 22.000 são conhecidos. Das espécies de cogumelos conhecidas, somente 5% foram investigadas e, portanto, 7000 espécies ainda não descobertas poderão ser benéficas para a humanidade (LINDEQUIST et al., 2005; WASSER, 2010; ALVES et al., 2012; HAWKSWORTH;LUCKING, 2017).

Os cogumelos apresentam um grande potencial para a bioprospecção; esse fato pode ser observado pela experiência no uso etnomedicinal, na necessidade ecológica de fungos em produzir metabólitos secundários bioativos e as melhores possibilidades de análises genéticas, farmacológicas e químicas (LINDEQUIST et al., 2005).

Entre as fontes de produtos naturais, os cogumelos parecem ser altamente promissores em termos de novas substâncias. Nas últimas décadas, compostos foram isolados de basidiomicetos e utilizados como fonte de atividades antibacterianas, antifúngicas e outras atividades biológicas (BARNECHE et al., 2016).

Na natureza, os cogumelos produzem metabólitos antibacterianos para se protegerem contra microrganismos em seu ambiente, sendo esta uma estratégia de defesa química, e a diversidade metabólica significa que os macrofungos representam um valioso conjunto de moléculas bioativas (LIKTOR-BUSA et al., 2016).

Por esse motivo os basidiomicetos apresentam capacidade de produção de uma variedade de metabólitos, que demonstram atividade

antibacteriana, antitumoral, antifúngica, antioxidante, antiviral, antiparasitária, citostática, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, hipoglicêmica, entre outras propriedades (BRIZUELA et al., 1998; OYETAYO, 2009; ALVES et al., 2012; DHARMARAJ et al., 2014; KWAK et al., 2015; ELKHATEEB et al., 2018).

A atividade antimicrobiana dos cogumelos pode ser atribuída à presença de vários metabólitos secundários bioativos, fenois, flavonoides, ácidos gálicos, sesquiterpenos, terpenos, esteroides e antraquinonas (RAMESH; PATTAR, 2010; BALA et al., 2011b; ALVES et al., 2012). Considerando a ampla biodiversidade dos cogumelos, estes poderiam facilmente tornar-se acessíveis fontes de compostos antimicrobianos (RAMESH; PATTAR, 2010; BALA et al., 2011a; GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

Entre os compostos produzidos pelos cogumelos, os antibióticos representam um importante grupo de metabólitos com diferentes padrões moleculares utilizados para tratar várias doenças causadas por microrganismos, incluindo bactérias multirresistentes (CASTILLO et al., 2017). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do cogumelo *Psathyrella candolleana* frente a bactérias e uma levedura de importância clínica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FUNGOS BASIDIOMICETOS E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os cogumelos pertencem ao filo Basidiomycota e possuem alto valor medicinal. Estudos mostram que compostos extraídos de diferentes espécies apresentam uma ampla fonte de moléculas bioativas e, portanto, os cogumelos possuem importância para uma gama de novos produtos farmacêuticos. Eles apresentam um grande potencial terapêutico devido à atividade antimicrobiana contra vários patógenos (FAN, 2006; WASSER, 2010; BALA et al., 2011b; KWAK et al., 2015).

Os macrofungos apresentam atividades biológicas potenciais, tais como propriedades antioxidantes, imunomoduladoras, cardiovasculares, protetoras do fígado, antifibróticas, antiinflamatórias, antidiabéticas, antivirais, antimicrobianas, anti-hepatotóxicas, cardiotônicas, antialérgicas, redutoras de colesterol e antitumorais (ALVES et al., 2012; GAUR; RAO, 2017).

Extratos de cogumelos e seus ácidos fenólicos foram testados quanto à atividade antimicrobiana demonstrando propriedades antibacterianas e antifúngicas (HELENO et al., 2015). Alguns basidiomicetos como *Lentinula edodes*, *Ganoderma lucidum* e *Grifola frondosa* apresentam potencial na medicina e são conhecidos por exibir atividades antibacterianas e antifúngicas (IWALOKUN et al., 2007).

O uso de produtos naturais tem sido sucedido na descoberta de novos medicamentos, e os cogumelos são fontes de potenciais agentes antimicrobianos naturais. Os metabólitos bioativos dos cogumelos podem ser produzidos industrialmente ou cultivo submerso em biorreatores, mas a eficiência depende da possibilidade de desenvolver um procedimento tecnológico adaptado à cepa usada (VAMANU et al., 2011; ALVES et al., 2012; HELENO et al., 2015; APPIAH et al., 2017).

Na busca por uma explicação para os vastos usos medicinais, diferentes estudos de bioatividade foram conduzidos utilizando extratos brutos de *Pleurotus ostreatus*. O extrato de éter de petróleo de *P. ostreatus* mostrou exibir altos valores de inibição de crescimento contra bactérias e fungos. Análises micoquímicas deste extrato revelaram altas concentrações de

terpenoides e fenóis, os quais foram considerados responsáveis pelas atividades (IWALOKUN et al., 2007; COSTA et al., 2018).

Dharmaraj et al. (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana de *Pleurotus djamor*, *Agaricus bisporus* e *Ganoderma tsugae* usando cepas de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os compostos foram extraídos com acetona e dimetilsulfóxido e todos os extratos relataram atividade antibacteriana contra os patógenos.

Smania et al. (2007) avaliaram a atividade antifúngica e antibacteriana de *Ganoderma australe*. Entre as cerca de 250 espécies pertencentes ao gênero *Ganoderma*, *G. lucidum* é a mais estudada devido ao seu grande interesse medicinal. Desta espécie, triterpenoides foram descritos e muitos deles apresentaram alguma atividade biológica.

Variedades de extratos de macrofungos australianos foram testadas contra bactérias Gram-positivas (*B. cereus*, *L. monocytogenes*) e bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*). Os extratos etanólicos de todos os macrofungos testados inibiram o crescimento de um ou mais destes patógenos indicando como fonte potencial de antimicrobianos (BALA et al., 2011b).

Hirasawa e colaboradores (1999) demonstraram a atividade do fungo *Lentinus edodes* sobre bactérias da cavidade oral, mas não inibiram o crescimento de *Escherichia* spp., *Staphylococcus* spp. e *Candida* spp isoladas de outras regiões do corpo humano.

O potencial do micélio de dez espécies de cogumelos selvagens a serem usados como uma boa fonte de antibióticos naturais e antioxidantes foi previamente reatado por Kalyoncu e colaboradores (2010).

Extratos metanólicos de seis cogumelos silvestres comestíveis foram avaliados e as espécies *Lycoperdon perlatum*, *Clavaria vermiculris*, *Marasmius oreades*, *Pleurotus pulmonarius*, exibiram vários graus de efeitos antimicrobianos contra os microrganismos testados (RAMESHI E PATTAR, 2010).

2.2 AGENTES ANTIMICROBIANOS

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos que inibem o crescimento ou causam a morte de fungos ou bactérias. São classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (GUIMARÃES et al., 2010).

Grande parte dos fármacos de fungos são derivados de ascomicetos como exemplo *Penicillium* e *Aspergillus*, em um contexto industrial uma menor parte são obtidos de basidiomicetos (BALA et al., 2011a).

A penicilina foi o primeiro metabólito fúngico descoberto acidentalmente quando Alexander Fleming, em 1929, observou que placas de cultura de *Staphylococcus* foram contaminadas por um fungo presente no ar identificado como *Penicillium rubens* causando a lise da colônia (HOUBRAKEN et al., 2011).

Várias espécies de macrofungos foram investigados como fonte de substâncias inibitórias resultando na identificação de pleuromutilina um antibiótico isolado pelo fungo *Pleurotus mutilus* (KAVANAGH et al., 1951), utilizado para o tratamento de infecções causadas por micoplasma em animais (BRIZUELA et al., 1998).

Mas apesar do grande espectro de produtos farmacêuticos antimicrobianos, os medicamentos enfrentam desafios na cura dessas doenças (LIKTOR-BUSA et al., 2016). A evolução da resistência bacteriana aos antibióticos é um fenômeno natural resultado da pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos. Porém, o uso inadequado de antibióticos, doses incorretas, automedicação, ou quando obtidos na farmácia sem prescrição médica podem influenciar na resistência bacteriana. (LIMA et al., 2016; LOUREIRO et al., 2016). Antes mesmo do advento da resistência já havia um interesse considerável em investigações dos produtos ativos dos cogumelos (LIMA et al., 2016).

Nas últimas décadas vários microrganismos patogênicos desenvolveram multirresistência aos antibióticos, infecções por isolados de *Candida* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Helicobacter pylori*, *Streptococcus* spp. Desta forma, há interesse na busca de

substâncias derivadas de fontes alternativas e de novos mecanismos de ação para tratamento das doenças causadas por esses microrganismos (ROSA et al., 2003; ALVES et al., 2012; DOGAN et al., 2013; BONIFÁCIO et al., 2014).

A candidíase é uma micose causada por leveduras do gênero *Candida*, sendo a espécie *C. albicans* seu agente etiológico mais frequente e pacientes portadores de doenças como diabetes mellitus, leucemia e AIDS possuem maiores riscos de infecções fúngicas. A frequência de candidíase aumentou dez vezes, de forma que *C. albicans* se tornou o quarto isolado de cultura mais comum. É a espécie mais frequentemente descrita em casos de infecções hospitalares em diversos países (GRUPTE et al., 2002; LIMA et al., 2006; ALTHAUS et al., 2015).

A resistência antibacteriana ameaça a prevenção e tratamento de várias infecções induzidas por microrganismos como, por exemplo, *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e *Escherichia coli* multirresistente; sendo ameaças sérias para a saúde pública. Cada classe de antibiótico é cada vez mais comprometida por resistência, assim como muitos antifúngicos (WOOLHOUSE 2014; NOWACKA et al., 2015).

Diversos motivos justificam a necessidade de estudar novos agentes antimicrobianos: as doenças infecciosas são a segunda maior causa de mortalidade do mundo; o aumento da resistência microbiana especialmente em ambientes hospitalares; o decréscimo constante observado no número total de novos agentes antimicrobianos (GUIMARÃES et al., 2010). Assim, são imprescindível que sejam incrementadas pesquisas que direcionam a obtenção de novos compostos antimicrobianos.

Nos últimos anos o aparecimento e disseminação de patógenos resistentes aumentaram substancialmente, no mesmo período em que o desenvolvimento de novos antibióticos diminui de forma alarmante (CHARLES; GRAYSON 2004).

Existe uma necessidade constante de novos fármacos antibacterianos devido ao inevitável desenvolvimento de resistência. Cada antibiótico que é introduzido no uso clínico tem uma vida útil limitada, pois seleciona bactérias que têm algum mecanismo de resistência intrínseco ou adquirido. A resistência desenvolveu-se para todas as classes principais de antibióticos, tanto naturais como sintéticos (WALSH, 2003).

Portanto, não é surpreendente que compostos antimicrobianos com atividades diferenciadas possam ser isolados de muitos cogumelos e que possam ser benéficos para humanos. De especial interesse são compostos com atividades contra cepas bacterianas multirresistentes (LINDEQUIST et al., 2005).

2.3 GÊNERO *Psathyrella*

O gênero *Psathyrella* consiste de 400 a 600 espécies de cogumelos e inclui espécies com basidiomas finos e frágeis. É distribuído em todo o mundo e compreende uma diversidade extrema de espécies. A maioria das espécies tem sido descrita na Europa e América do Norte, mas muitas foram relatadas na África, Austrália, China, Índia, Japão, México e Sri Lanka (PADAMSEE et al., 2008; VASUTOVÁ et al., 2008; AL-HABIB et al., 2014; MORENO et al., 2015; ORSTADIUS et al., 2015; ERASLAN; GULER, 2017). A filogenia mais robusta e abrangente publicada até o momento mostra que as espécies tradicionalmente designadas para *Psathyrella* pertencem a pelo menos 12 diferentes clados (MORENO et al., 2015).

Com hábitos saprotróficos, a maioria ocorre no solo, grama ou na madeira; no entanto, alguns deles crescem em esterco de vários animais, como vaca, cavalo e javali, ou parasitando outros fungos (LARSSON E ORSTADIUS, 2008; NAGY et al., 2013).

Apresentam manchas escuras e são similares aos gêneros *Coprinellus*, *Coprinopsis* e *Panaeolus*. O discernimento entre *Psathyrella* e *Panaeolus* sempre foi confuso mesmo antes dos estudos contemporâneos de DNA. As espécies de *Psathyrella* geralmente requerem identificação microscópica cuidadosa (LARSSON E ORSTADIUS, 2008; ERASLAN; GULER, 2017).

Cogumelos da espécie *Psathyrella candolleana* são muito comuns, podem crescer solitários ou em grandes quantidades, agregados. Possuem estrutura frágil e basidiomas marrons. Pertencente ao filo Basidiomycota, ordem Agaricales e família Psathyrellaceae (CORTEZ; FERREIRA, 2015).

Conhecida por possuir propriedades medicinais com potencial para uso como cogumelo medicinal na saúde humana e veterinária. É uma espécie

comum encontrada em florestas naturais, parques e jardins e é conhecida por ocorrer na Europa, Ásia, África e América do Norte (AL-HABIB et al., 2014).

Algumas das espécies são cogumelos comestíveis bem conhecidos, como *Psathyrella hymenocéphala* que é usado como especiaria no Haiti (NAGY et al., 2013).

Nos estudos de Ayodele e Idoko (2011), os filtrados da cultura de *Psathyrella atroumbonata* foram eficazes contra cepas das bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Propriedades antifúngicas de *Psathyrella candolleana* e *P. spadiceaogrisea* contra espécies patogênicas de *Aspergillus* foram estudadas (ERASLAN; GULER, 2017).

O consumo regular de *Psathyrella tuberculata* pode prevenir a hipertensão arterial e doenças cardiovasculares, possuem compostos ricos em antioxidantes, minerais, proteínas e baixo teor de gordura (ATCHIBRI et al., 2017).

Wasser (2002) relatou 182 gêneros (incluindo *Psathyrella*) de espécies com polissacarídeos antitumorais ou imunostimulantes. Bala e colaboradores (2011) avaliaram macrofungos incluindo *Psathyrella* sp. como fonte de potencial antimicrobiano. Reinoso e colaboradores (2013) investigaram os extratos bioativos e seus constituintes químicos obtidos a partir da fermentação de seis linhagens de fungos saprófitos incluindo (*Psathyrella* sp.) com atividade antibacteriana.

Estudos avaliaram a atividade citotóxica de cogumelos nativos australianos *Psathyrella* contra uma variedade de linhas celulares de câncer (BEATTIE et al., 2011). Estudos relataram atividade antibacteriana de *Psathyrella candolleana* contra várias bactérias *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* e a levedura *Candida albicans* (AL-HABIB et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato bruto de *Psathyrella candolleana*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica pelo método de difusão em ágar;
- Analisar as substâncias presentes no extrato através de cromatografia em camada delgada;
- Avaliar a atividade antibacteriana das substâncias isoladas pelo método de bioautografia direta.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Aplicada e Plantas Medicinais do Departamento de Ciências Agrônômicas, da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Coleta da Amostra

Os cogumelos foram coletados na cidade de Palotina em outubro de 2017 e a identificação da espécie *Psathyrella candolleana* foi realizada pelo Prof. Dr. Vagner G. Cortez. As amostras foram secas em estufa a 40°C por três dias e armazenadas no freezer até o momento da preparação do extrato. Uma amostra da espécie foi depositada no herbário da Universidade.

4.1.2 Microrganismos empregados nos testes

A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando duas bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Bacillus cereus* ATCC 11778) e duas Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e a levedura (*Candida albicans* ATCC 10231) como microrganismos alvo.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo do extrato fúngico

Inicialmente, 39 g do cogumelo seco foram trituradas obtendo um pó para um melhor contato com o solvente e disposto em sacos de papel filtro para extração.

4.2.2 Extração soxhlet

A extração das substâncias de *Psathyrella candolleana* ocorreu em sistema de Soxhlet, durante oito horas, utilizando 800 mL de solvente orgânico acetato de etila. Durante o processo, o solvente foi aquecido até sua temperatura de ebulição por uma manta. O extrato obtido foi armazenado em geladeira até o processo de evaporação do solvente.

4.2.3 Eliminação do solvente

O extrato bruto resultante foi concentrado utilizando um evaporador rotativo a 45°C e baixa pressão, sob rotação de 100 rpm. Todo o solvente foi evaporado e o extrato bruto foi armazenado na geladeira.

4.2.4 Preparo dos meios de cultura

O meio de cultura utilizado para o repique dos microrganismos foi ágar Mueller-Hinton esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121 °C e 1 atm. Posteriormente, em capela de fluxo laminar, foram vertidos com 25 mL de meio em cada placa de Petri esterilizada. Foi utilizado o caldo de infusão de cérebro e coração BHI (Brain heart infusion) para o teste de bioautografia.

4.2.5 Preparo do inóculo microbiano

As cepas bacterianas foram cultivadas em ágar Mueller-Hinton e, com o auxílio de uma alça, foram adicionadas em 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%) para formar uma suspensão microbiana, e ajustado para a turbidez do padrão 0,5 de MacFarland ($1 \cdot 10^8$ UFC/mL). Em seguida um swab estéril foi mergulhado na suspensão, girado várias vezes e apertado contra a parede interna do frasco acima do líquido para a retirada de excesso do inóculo. A partir da suspensão dos patógenos e com o auxílio do swab foram semeados na superfície do meio nutritivo ágar Mueller-Hinton em duas direções, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo.

4.2.6 Teste de difusão em ágar

Inicialmente, para a solubilização do extrato bruto (10 mg) foram utilizadas 5 gotas do solvente dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida foram realizadas diluições seriadas com água destilada estéril partindo da concentração inicial de 10 mg/mL e assim foram obtidos os extratos nas concentrações de: 5; 2,5 e 1,25 mg/mL. Em cada placa contendo ágar Mueller-Hinton, foram feitos 6 poços de 7mm de diâmetro usando um perfurador estéril para a adição das diferentes concentrações do extrato. Como controle positivo foi usado gentamicina (para as bactérias) e nistatina (para a levedura) e como controle negativo foi utilizado água destilada. As concentrações do extrato e os

controles (40 μ L) foram distribuídos nos poços e as placas foram incubadas durante 24 horas a 36°C. A leitura foi efetuada medindo o halo de inibição de crescimento ao redor de cada poço. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.7 Cromatografia em camada delgada (CCD)

O extrato bruto foi analisado por CCD, utilizando cromatoplasas de sílica gel (Macherey-Nagel®, G/UV254) como fase estacionária. O extrato fúngico foi diluído em acetona e com o auxílio de um capilar foi aplicado em um ponto da placa de sílica gel. A eluição foi realizada usando um sistema de solventes fase móvel clorofórmio e metanol (9:1). As placas foram observadas sob a luz ultravioleta (UV), reveladas com vapores de iodo e utilizadas nos testes de bioautografia direta.

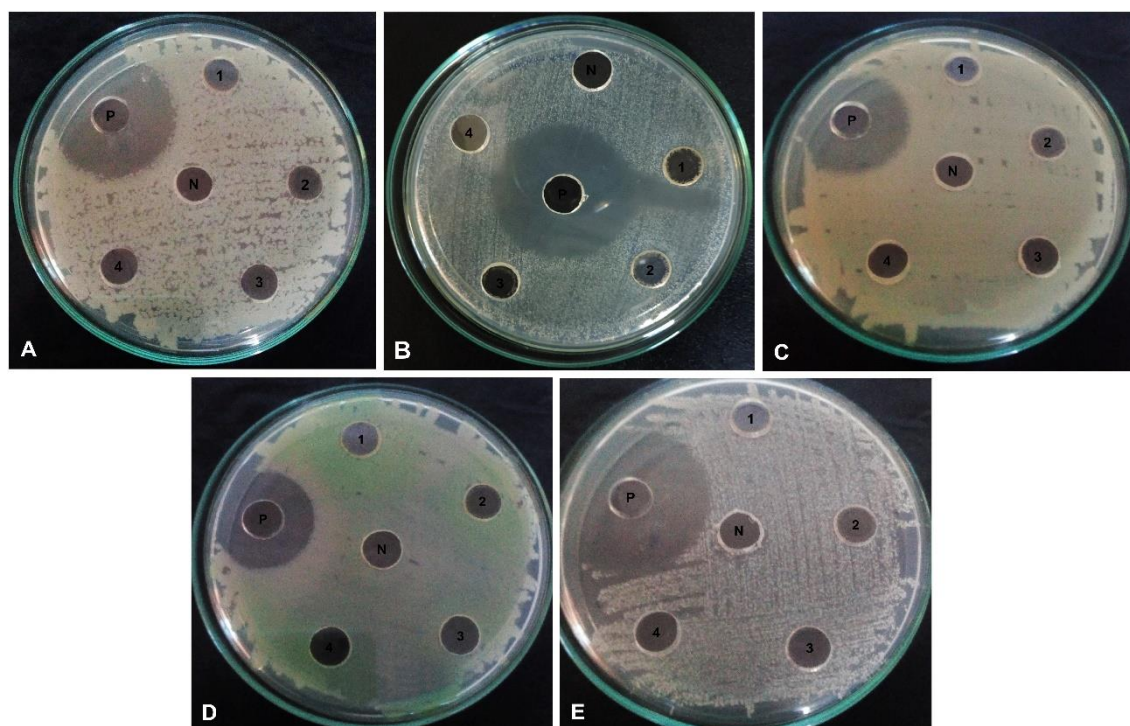
4.2.8 Bioautografia direta

Os microrganismos patogênicos inoculados em caldo de infusão de cérebro e coração BHI foram vertidos em placa de Petri estéril. As cromatoplasas (CCD) foram imersas durante 10 segundos na suspensão, após as placas cromatográficas foram transferidas para outras placas de Petri esterilizadas e adicionado algodão úmido; sendo incubadas a 36°C durante 24 horas. Para a revelação do teste de bioautografia foi utilizada uma solução de cloreto de azul de nitrotetrazólio (NBT) preparado com 30 mg e 12 mL de etanol 70%. Após o período de incubação a revelação foi realizada borrifando a solução e incubando a 36°C durante 4 horas para a observação da atividade antimicrobiana.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato bruto em acetato de etila obtido dos basidiomas secos da espécie *Psathyrella candolleana* não apresentou atividade antimicrobiana nos testes de difusão em ágar frente aos microrganismos patogênicos. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 1. Ao redor das concentrações utilizadas não verificou-se halos de inibição do crescimento.

FIGURA 1- TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR DO EXTRATO BRUTO OBTIDO COM ACETATO DE ETILA DOS BASIDIOMAS DE *Psathyrella candolleana*.



A: *Bacillus cereus*; B: *Candida albicans*; C: *Escherichia coli*; D: *Pseudomonas aeruginosa*; E: *Staphylococcus aureus*; P: Controle positivo; N: Controle negativo; 1: 10,0 mg/mL; 2: 5,0 mg/mL; 3: 2,5 mg/mL; 4: 1,2 mg/mL.

FONTE: O autor (2018).

No estudo feito por Rosenberger (2018) o teste de difusão em ágar utilizando o extrato metanólico de *Psathyrella candolleana* mostrou atividade contra a levedura *Candida albicans*. O extrato do cogumelo na concentração de 10 mg/mL inibiu o crescimento da levedura e apresentou um halo de inibição de 3,8 mm, mostrando-se moderadamente sensível. Por outro lado, não inibiu crescimento de *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Reinoso et al. (2013) avaliaram o caldo de cultura de *Psathyrella* sp., com extração por acetato de etila e apresentou atividade antibacteriana (pelo teste de difusão em ágar) em relação a *B. subtilis* (19 mm) e *E. faecalis* (16 mm), mas não inibiu crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

O extrato de *Psathyrella* sp. extraído com hexano, etanol e água foi utilizado um procedimento de microplaca de 96 poços com alto rendimento. Observou-se que o extrato em hexano apresentou a maior atividade antimicrobiana contra *E. coli* (BALA et al., 2011a).

O extrato de *Psathyrella* sp. foi avaliado utilizando um procedimento de microplaca de 96 poços com alto rendimento. Extraído os metabólitos com hexano, etanol e água, o extrato de hexano exibiu maior atividade antimicrobiana contra *E. coli* (BALA et al., 2011a).

Em outro estudo, o extrato metanólico de *P. atroumbonata* mostrou ampla zona de inibição contra *E. coli*, mas não apresentou atividade antifúngica contra *C. albicans* (JONATHAN et al., 2008).

Extrato de etanol de *Psathyrella* sp. foi eficaz na inibição dos patógenos testados apresentando atividade antibacteriana contra *B. cereus* e *P. aeruginosa* e antifúngica contra *G. candidum* e *S. cerevisiae* na concentração de 10 mg/mL. Outras espécies deste gênero coletados na Nigéria e na Espanha foram relatados com atividade antibacteriana e antifúngica (BALA et al., 2011b).

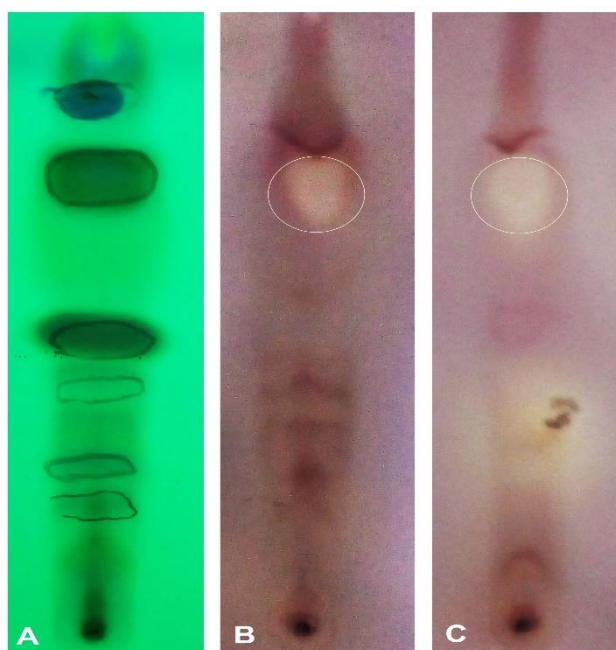
Eraslan e Gulan (2017) investigaram o potencial antifúngico de *Psathyrella candolleana* e *P. spadiceogrisea* contra (*Aspergillus niger* e *A. versicolor*). Etanol e metanol foram utilizados como solventes, no teste de disco difusão e o efeito antifúngico de ambos os extratos de *P. candolleana* contra ambas as espécies de *Aspergillus* não foi observado. A atividade antifúngica foi determinada com o extrato de *P. spadiceogrisea* exibindo halos de 20 mm contra *A. niger* e 17 mm contra *A. versicolor*.

Observando estas informações, um aspecto a ser ressaltado é na escolha do solvente, sendo fundamental para a obtenção dos extratos (FILHO; YUNES, 1998). Observou-se que o extrato metanólico apresentou atividade frente a *C. albicans* (Rosenberger, 2018), mas o extrato em acetato de etila não apresentou tal atividade. Este fato se deve a diferença de polaridade dos

extratos; sendo que o solvente metanol apresenta maior polaridade e pode ter extraído um número maior de substâncias bioativas.

O extrato foi utilizado para os testes bioautográficos utilizando como fase móvel os solventes clorofórmio e metanol (9:1). A fase móvel separou as substâncias presentes no extrato de *Psathyrella candolleana* (Figura 2 A) que foram visíveis à luz UV. Em uma das substâncias separadas pela CCD, foi visualizado halo de inibição apresentando atividade antibacteriana frente *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* como mostrado em destaque na Figura 2 B e C respectivamente.

FIGURA 2- CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA E BIOAUTOGRAFIA DIRETA DO EXTRATO BRUTO OBTIDO COM ACETATO DE ETILA DOS BASIDIOMAS DE *Psathyrella candolleana* NA FASE MÓVEL DE CLOROFÓRMIO:METANOL (9:1)



A: Visualização das bandas na luz UV; B: Bioautograma contra *S. aureus*; C: Bioautograma contra *P. aeruginosa*.

FONTE: O autor (2018).

Desta forma, foi observado que o extrato bruto não apresentou atividade frente aos microrganismos testados, no entanto uma substância isolada deste extrato mostrou-se ativa frente a duas bactérias: *S. aureus* e *P.*

aeruginosa. A substância responsável por essa atividade teve fator de retenção (Rf) de 0,58.

No estudo feito por Rosenberger (2018) o extrato metanólico de *Psathyrella* sp. utilizando a fase móvel acetato de etila e hexano (1:1) para a bioautografia em (CCD) mostrou atividade inibitória contra *S. aureus*. Para *E. coli*, *B. cereus* e *P. aeruginosa* os testes bioautográficos não detectaram nenhuma substância. Para o bioautograma não corrido de *P. aeruginosa*, o extrato de *P. candolleana* apresentou atividade antibacteriana.

Em outro estudo realizado por Valgas et al. (2007) o extrato de *Ganoderma anulare* utilizando fase móvel com etanol: diclorometano (8:2) para o teste de bioautografia direta apresentou atividade antibacteriana frente as cepas *S. aureus* e *E.coli*.

O extrato de *Ganoderma resinaceum* extraído com acetato de etila mostrou atividade antimicrobiana contra *Xanthomonas vesicatoria*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* no teste de bioautografia (BARNECHE et al., 2016).

A bioautografia é uma técnica eficiente sendo um método simples e economicamente viável, proporciona detecção de compostos com atividade biológica após separação cromatográfica. Não foram encontrados estudos na literatura utilizando bioautogramas a partir de extratos de *Psathyrella candolleana*. Sendo este um dos primeiros estudos, reforçando a importância de identificar a substância que apresentou atividade antibacteriana.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, o extrato em acetato de etila pelo teste de difusão em ágar não inibiu o crescimento dos patógenos. Enquanto no teste de bioautografia direta, uma das substâncias isoladas apresentou halo de inibição e, portanto, mostrou atividade antibacteriana frente às cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos neste trabalho devem ser complementados em trabalhos futuros, no sentido de estudar e elucidar a estrutura da substância que apresentou atividade antibacteriana.

- Deve-se continuar as pesquisas para otimização do extrato fúngico, sendo necessários estudos adicionais para determinar a melhor condição para a extração destes compostos;
- E utilização de outras metodologias para avaliação da atividade antimicrobiana, tendo em vista que os basidiomicetos têm sido fonte de exploração biotecnológica.

REFERÊNCIAS

- AL-HABIB, M. N.; HOLLIDAY, J.; TURA, D. The pale brittle stem mushroom, *Psathyrella candolleana* (higher basidiomycetes): an indigenous medicinal mushroom new to Iraq. **International Journal Of Medicinal Mushrooms**, v. 16, n. 6, p. 617-622, 2014.
- ALTHAUS, V. A.; REGGINATO, A.; BOSSETTI, V.; SCHMIDT, J.C. Espécies de *Candida* spp. em isolados clínicos e suscetibilidade a antifúngicos de uso hospitalar. **Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 1, p.7-17, 2015.
- ALVES, M. J.; FERREIRA, I. C. F. R.; DIAS, J.; TEIXEIRA, V.; MARTINS, A.; PINTADO, M. A review on antimicrobial activity of mushroom (basidiomycetes) extracts and isolated compounds. **Planta Medica**, v. 78, n. 16, p.1707-1718, 2012.
- APPIAH, T.; BOAKYE, Y. D.; AGYARE, C. Antimicrobial activities and time-kill kinetics of extracts of selected Ghanaian mushrooms. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, v. 2017, p.1-15, 2017.
- ATCHIBRI, A. L. O.; FARMAN, A. O.; PATRICE, A. Y. Y. D. Nutritional and therapeutic compounds of the edible dried mushroom *Psathyrella tuberculata* and prevention of the arterial hypertension. **Agriculture And Biology Journal Of North America**, v. 8, n. 1, p. 10-17, 2017.
- AYODELE, S. M.; IDOKO, M. E. Antimicrobial activities of four wild edible mushrooms in Nigeria. **International Journal Of Science And Nature**, v. 2, n. 1, p. 55-58, 2011.
- BALA, N.; AITKEN, E. A. B.; FECHNER, N.; CUSACK, A.; STEADMAN, K. J. Evaluation of antibacterial activity of Australian basidiomycetous macrofungi using a high-throughput 96-well plate assay. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 5, p.492-500, 2011a.
- BALA, N.; AITKEN, E. A. B.; CUSACK, A.; STEADMAN, K. J. Antimicrobial potential of Australian macrofungi extracts against foodborne and other pathogens. **Phytotherapy Research**, v. 26, p.465-469, 2011b.
- BARNECHE, S.; JORCIN, G.; CECCHETTO, G.; CERDEIRAS, M. P.; VÁZQUEZ, A.; ALBORÉS, S. Screening for antimicrobial activity of wood rotting

higher basidiomycetes mushrooms from Uruguay against phytopathogens. **International Journal Of Medicinal Mushrooms**, v. 18, n. 3, p. 261-267, 2016.

BEATTIE, K. D.; ULRICH, R.; GRICE, I. D.; UDDIN, S. J, BLAKE T. B.; WOOD K. A.; STEELE, J, IU, F. MAY T. W, TIRALONGO, E. Ethanollic and aqueous extracts derived from Australian fungi inhibit cancer cell growth in vitro. **Mycologia**, v. 103, n. 3, p. 458-465, 2011

BONIFÁCIO, B. V.; RAMOS, M. A. S.; SILVA, P. B.; BAUAB, T. M. Antimicrobial activity of natural products against *Helicobacter pylori*: a review. **Annals Of Clinical Microbiology And Antimicrobials**, v. 13, n. 54, p. 1-10, 2014.

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

CASTILLO, T. A.; PEREIRA, J. R. G.; ALVES, J. M. A.; TEIXEIRA, M. F. S. Mycelial growth and antimicrobial activity of species of genus *Lentinus* (agaricomycetes) from Brazil. **International Journal Of Medicinal Mushrooms**, v. 19, n. 12, p. 1135-1143, 2017.

CHARLES, P. G. P.; GRAYSON, M. L. The dearth of new antibiotic development: why we should be worried and what we can do about it. **The Medical Journal Of Australia**, v. 181, n. 10, p. 549-553, 2004.

CORTEZ, V. G.; FERREIRA, A. J. Macrofungos de Palotina. In: CORTEZ, V. G.; GONÇALVES, R. B. **Guia da biodiversidade de Palotina**. Palotina: PROEC/UFPR, 2015. p. 19-46.

COSTA, A. C.; SILVA, K. M. R.; ARAÚJO, E. T. H.; CARVALHO, M. L. Avaliação da atividade antibacteriana do *Pleurotus ostreatus* isolados de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 4, p.1-8, 2018.

DHARMARAJ, K.; KUBERAN, T.; MAHALAKSHMI, R. Comparison of nutrient contents and antimicrobial properties of *Pleurotus djamor*, *Agaricus bisporus* and *Ganoderma tsugae*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 6, p.518-526, 2014.

DOGAN, H. H.; DUMAN, R.; OZKALP, B.; AYDIN, S. Antimicrobial activities of some mushrooms in Turkey. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 6, p.707-711, 2013.

ELKHATEEB, W. A.; ZAGHLOL G. M.; EL-GARAWANI, I. M.; AHMED, E. F.; RATEB, M. E.; MONEIM, E. A. E. *Ganoderma applanatum* secondary metabolites induced apoptosis through different pathways: In vivo and in vitro anticancer studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 101, p. 264-277, 2018.

ERASLAN, H. G.; GULER, P. *Psathyrella candolleana* ve *Psathyrella spadiceogrisea* 'nın *Aspergillus* Türleri Üzerinde Antifungal Aktivitesi, **Life Sciences (NWSALS)**, v.12, n. 4, p. 42-47, 2017.

FAN, L.; PAN, H.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Advances in mushroom research in the last decade. **Food Technology And Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 303-311, 2006.

FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; MATIAS, A. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, M. L. C. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p.117-134, 2009.

GAUR, T.; RAO, P. B. Analysis of antibacterial activity and bioactive compounds of the giant mushroom, *macrocybe gigantea* (Agaricomycetes), from India. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 19, n. 12, p. 1083-1092, 2017.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agentes. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.

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

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 4, p. 1-17, 2017.

HELENO, S. A.; BARROS, L.; MARTINS, A.; MORALES, P.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; GLAMOCLIJ, J.; SOKOVIC, M.; FERREIRA, I. C. F. R. Nutritional value, bioactive compounds, antimicrobial activity and bioaccessibility studies

with wild edible mushrooms. **Food Science And Technology**, v. 63, n. 2, p. 799-806, 2015.

HIRASAWA M.; SHOUJI N., NETA T.; FUKUSHIMA K.; TAKADA K. Three kinds of bacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (shiitake, an edible mushroom). **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 11, n. 2, p. 151-157, 1999.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSO, R. A. Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. **International Mycological Association Fungus**, v. 2, n. 1, p. 87-95, 2011.

IWALOKUN, B. A.; USEN, U. A.; OTUNBA, A. A.; OLUKOYA, D. K. Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. **African Journal Of Biotechnology**, v. 6, n. 15, p.1732-1739, 2007.

KALYONCU, F.; OSKAY, M.; SAGLAM, H.; ERDOGAN, T. F.; TAMER, A. U. Antimicrobial and antioxidant activities of mycelia of 10 wild mushroom species. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 2, p. 415-419, 2010.

KAVANAGH, F.; HERVEY, A.; ROBBINS, W. J. Antibiotic substances from basidiomycetes. VIII. *Pleurotus multilus* (FR.) sacc. and *Pleurotus Passeckerianus* Pilat. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The Usa**, v. 37, p. 570-574, 1951.

KWAK, A. M.; MIN, K. J.; LEE, S. Y.; KANG, H. W. Water extract from spent mushroom substrate of *Hericium erinaceus* suppresses bacterial wilt disease of tomato. **Mycobiology**, v. 43, n. 3, p.311-318, 2015.

LARSSON, E.; ORSTADIUS, L. Fourteen coprophilous species of *Psathyrella* identified in the Nordic countries using morphology and nuclear rDNA sequence data. **Mycological Research**, v. 112, n. 10, p. 1165-1185, 2008.

LIKTOR-BUSA, E.; KOVÁCS, B.; URBÁN, E.; HOHMANN, J.; VÁNYOLÓS, A. Investigation of Hungarian mushrooms for antibacterial activity and synergistic effects with standard antibiotics against resistant bacterial strains. **Letters In Applied Microbiology**, v. 62, n. 6, p.437-443, 2016.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p.197-201, 2006.

LIMA, C. U. J. O.; GRIS, E. F.; KARNIKOWSKI, M. G. O. Antimicrobial properties of the mushroom *Agaricus blazei* – integrative review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 6, p.780-786, 2016.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T. H. J.; JULICH, W. D. The pharmacological potential of mushrooms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 3, p. 285–299, 2005.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

MORENO, G.; HEYKOOP, M.; ESQUEDA, M.; OLARIAGA, I. Another lineage of secotioid fungi is discovered: *Psathyrella secotioides* sp. nov. from Mexico. **Mycological Progress**, v. 14, n. 6, p. 1-8, 2015.

NAGY, L. G.; VÁGVOLGYI, C.; PAPP, T. Morphological characterization of clades of the Psathyrellaceae (Agaricales) inferred from a multigene phylogeny. **Mycological Progress**, v. 12, n. 3, p. 505-517, 2013.

NOWACKA, N.; NOWAK, R.; DROZD, M.; OLECH, M.; LOS, R.; MALM, A. Antibacterial, antiradical potential and phenolic compounds of thirty-one polish mushrooms. **Plos One**, v. 10, n. 10, p.1-13, 2015.

ORSTADIUS, L.; RYBERG, M.; LARSSON, E. Molecular phylogenetics and taxonomy in Psathyrellaceae (Agaricales) with focus on psathyrelloid species: introduction of three new genera and 18 new species. **Mycological Progress**, v. 14, n. 5, p.1-42, 2015.

OYETAYO, V. O. Free radical scavenging and antimicrobial properties of extracts of wild mushrooms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 380-386, 2009.

PADAMSEE, M.; MATHENY, P. B.; DENTINGER, B. T. M.; MCLAUGHLIN, D. J. The mushroom family Psathyrellaceae: Evidence for large-scale polyphyly of

the genus *Psathyrella*. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, v. 46, n. 2, p.415-429, 2008.

RAMESH, C. H.; PATTAR, M. G. Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka. **Pharmacognosy Research**, v. 2, n. 2, p.107-112, 2010.

REINOSO, R.; CAJAS-MADRIAGA, D.; MARTÍNEZ, M.; MARTÍN, A. S.; PÉREZ, C.; FAJARDO, V.; BECERRA, J. Biological activity of macromycetes isolated from chilean subantarctic ecosystems. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 58, n. 4, p. 1-4, nov. 2013.

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

ROSENBERGER, M. G. **Atividade antimicrobiana de cogumelos (Agaricales) nativos da floresta estacional do oeste do Paraná**. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal do Paraná, Palotina. 2018.

SMANIA, E. F. A.; MONACHE, F. D.; YUNES, R. A.; PAULERT, R.; JÚNIOR, A. S. Antimicrobial activity of methyl australate from *Ganoderma australe*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p.14-16, 2007.

SOUZA, N. B.; CONTESSA, C. R.; ALMEIDA, L.; MANERA, A. P.; MORAES, C.C. Determinação da atividade antimicrobiana do extrato purificado do cogumelo *Agaricus blazei* cultivado por fermentação em estado sólido. **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**, v. 2, n. 1, p.1-7, 2016.

VALGAS, C.; SOUZA, S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA, A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2007.

VAMANU, E.; ENE, M.; VAMANU, A.; SMARANDACHE, D.; SÂRBU, I.; POPA, O.; BABEANU, N.; NITA, S.; VEACESLAV, B. Antioxidant and antibacterial properties of the extracts from *Pleurotus ostreatus* EVFB1 and EVFB4. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, n. 1, p.40-46, nov. 2011.

VANDERLINDE, D. G.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* (linnaeus: fries) murril. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 1, p. 11-16, 2010.

VASUTOVÁ, M.; ANTONÍN, V.; URBAN, A. Phylogenetic studies in *Psathyrella* focusing on sections Pennatae and Spadiceae — new evidence for the paraphyly of the genus. **Mycological Research**, v. 112, n. 10, p. 1153-1164, 2008.

WALSH, C. Where will new antibiotics come from. **Nature Review Microbiology**, v. 1, p. 65-70, 2003.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 258-274, 2002.

WASSER, S. P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 1323-1332, 2010.

WOOLHOUSE, M.; FARRAR, J. An intergovernmental panel on antimicrobial resistance. **Nature**, v. 509, p. 555-557, 2014.