

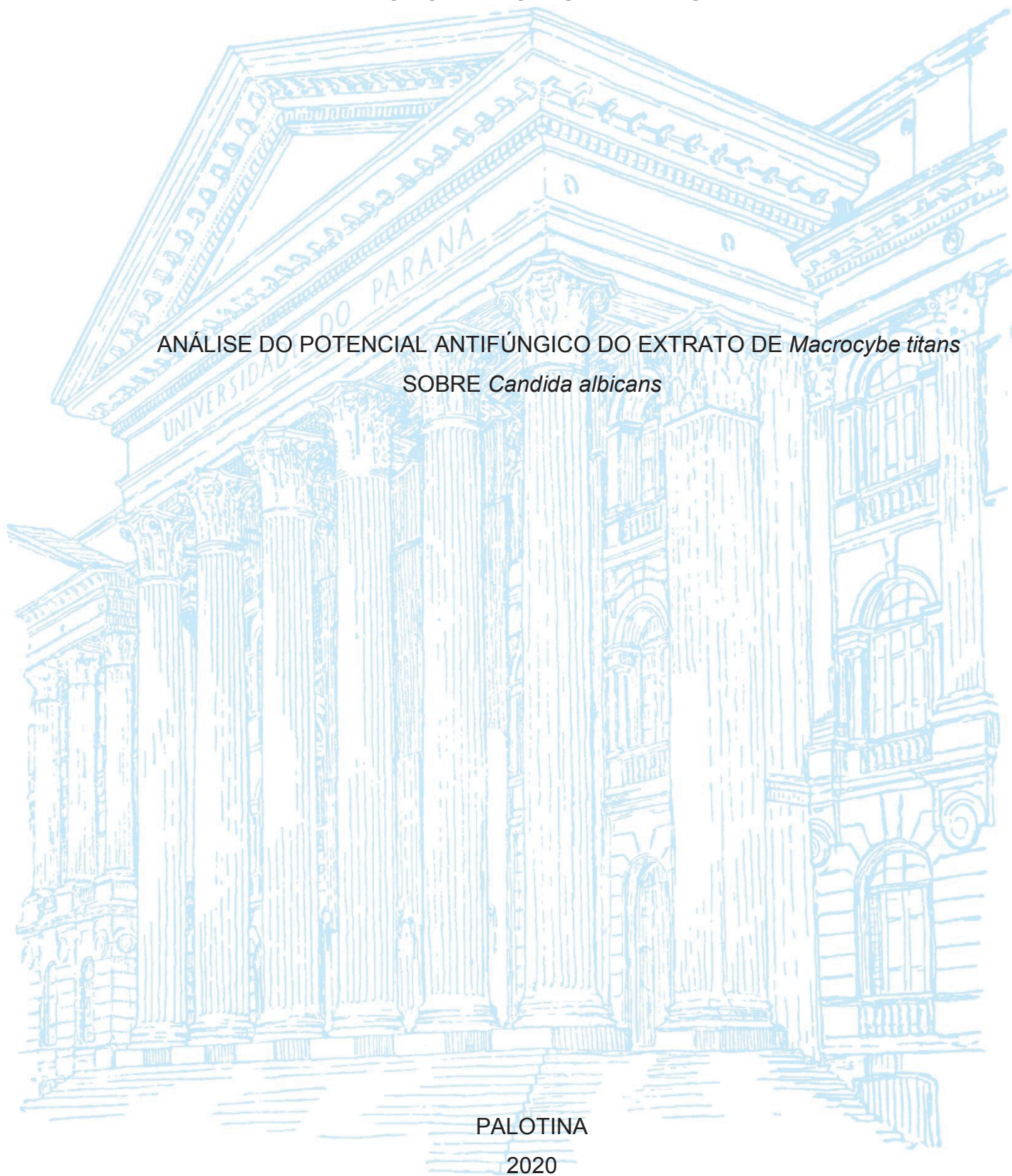
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA CRISTINA BURASLAN NEVES PEREIRA

ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO EXTRATO DE *Macrocybe titans*
SOBRE *Candida albicans*

PALOTINA

2020



FERNANDA CRISTINA BURASLAN NEVES PEREIRA

ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO EXTRATO DE *Macrocybe titans*
SOBRE *Candida albicans*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Fiorini Rosado

PALOTINA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P436 Pereira, Fernanda Cristina Buraslan Neves
Análise do potencial antifúngico do extrato de *Macrocybe titans* sobre *Candida albicans* / Fernanda Cristina Buraslan Neves Pereira – Palotina, 2020.
68f.

Orientadora: Adriana Fiorini Rosado
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

1. *Macrocybe titans*. 2. *Candida albicans*. 3. Produtos naturais. 4. Micromorfologia. 5. Extrato aquoso. I. Rosado, Adriana Fiorini. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 577

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **FERNANDA CRISTINA BURASLAN NEVES PEREIRA** intitulada: **Análise do potencial antifúngico do extrato de *Macrocybe titans* sobre *Candida albicans***, sob orientação da Profa. Dra. ADRIANA FIORINI ROSADO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 11 de Dezembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

14/12/2020 16:48:57.0

ADRIANA FIORINI ROSADO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

15/12/2020 07:25:18.0

PATRICIA DE SOUZA BONFIM DE MENDONÇA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

Assinatura Eletrônica

14/12/2020 14:58:57.0

FÁBIO ROGÉRIO ROSADO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Aos meus pais, Cristina e Fernando,
Aos meus amados avós, Êmina e Alfredo,
Aos meus anjos, Isabel e Benedito (*in memoriam*),

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de estudar em uma Universidade pública e de qualidade.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, em parceria com a Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, onde tive a oportunidade de cursar o Mestrado.

Ao Departamento de Biociências, em especial ao Laboratório de Microbiologia e ao Labiogen, pela disponibilização de equipamentos, e às servidoras técnicas do bloco Multidisciplinar, da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

Ao Núcleo Experimental de Micologia Aplicada, meu querido NEMA, da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, onde passei meus dias e construí verdadeiros laços de amizade. Estando presente neste laboratório desde meados de 2014, acompanhando sua edificação até onde nos encontramos atualmente, posso afirmar que a família formada aqui seguirá unida e promovendo a ciência.

Ao Laboratório de Pesquisa em Micologia Médica, da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade prazerosa e imperdível de agregar conhecimento, e em especial à mestranda Pollyanna Conrado, pela ajuda com os testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).

À Professora Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça, da Universidade Estadual de Maringá, pela breve, porém plena orientação. Saiba que os seus ensinamentos foram muito bem absorvidos e serão devidamente repassados.

Aos professores do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, por todo o conhecimento transmitido.

Muito especialmente, aos meus professores orientadores: Prof^a. Dr^a. Adriana Fiorini Rosado, que não hesitou ao me acolher com um coração de mãe, carinho, paciência e atenção, e que além da orientação científica colossal, é minha amiga, me incentivando a buscar sempre o melhor em todos os momentos; e Prof. Dr. Fábio Rogério Rosado, meu eterno orientador e pai científico, que me recebeu de braços abertos, e que foi indispensável para a realização desta pesquisa.

Aos meus colegas do NEMA, em especial ao Mauro Pessoa e à Cris Delmondes Rodrigues, companheiros de experimentos, por estarem presentes no início dessa jornada que rendeu frutos, à Vivian Mamede e Gabrieli Huff, sempre solícitas e dispostas a aprender e tentar o novo, que me acompanharam ao longo do último ano, e à Gabrielle Peiter e Marcos Polinarski, pelo grande auxílio com os ensaios finais. Agradeço também à Cássia Rambo, pela assistência com a obtenção dos extratos.

Aos meus queridos amigos conquistados no decorrer da vida acadêmica, em especial à Shayane da Silva Milhorini, Jéssica Schemmer e Vanessa Schneider, por todas as risadas que levo comigo, e pelas que ainda virão.

Aos meus pais, Cristina e Fernando, por sempre depositarem sua fé em mim e embarcarem nessa jornada, por todo o amor, paciência, ensinamentos, compreensão, apoio, incentivo e por sempre estarem ao meu lado nos momentos da minha vida. A minha força vem de vocês.

“Tudo o que temos de decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado.”

*(Gandalf, em O Senhor dos Anéis: A Sociedade do Anel,
J. R. R. TOLKIEN)*

RESUMO

Extratos de macrofungos têm sido estudados devido à grande variedade de seus bioprodutos. O cogumelo basidiomicete *Macrocybe titans* foi recentemente relatado no Brasil e existem poucos registros na literatura sobre o seu potencial antimicrobiano. Com o rápido surgimento de resistência de microrganismos aos antibióticos, a busca por novos agentes terapêuticos eficazes tem se tornado uma alternativa favorável no combate às doenças causadas por fungos, principalmente espécies de *Candida*. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos verificar o potencial antifúngico de extratos de *M. titans* sobre *Candida albicans* ATCC 90028, bem como os efeitos nos aspectos morfológicos dessa levedura. Foram utilizados cinco extratos obtidos de *M. titans*, sendo três frações aquosas (concentrada, filtradas EfraMat-45 e EfraMat-22 – valores em μm referentes à porosidade do filtro); extratos metanólico/acetato de etila a frio; extratos metanólico/acetato de etila a quente (Soxhlet). A susceptibilidade antifúngica foi avaliada por microdiluição em caldo e disco-difusão, de acordo com os protocolos do CLSI M27-A3 e M44-A2. Foi verificado que EfraMat-45 apresentou a melhor Concentração Inibitória Mínima entre os extratos (31,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Os aspectos micromorfológicos foram analisados por microcultivo em ágar-fubá com Tween 80 (1%), Microscopia de Fluorescência utilizando Calcofluor White e iodeto de propídio, e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Na análise por microcultivo foi possível observar completa inibição do crescimento da levedura nas lâminas referentes à concentração CIM, em todos os extratos aquosos de *M. titans*. Alterações morfológicas foram observadas nas lâminas de sub-CIM, ocorrendo maior formação de células alongadas e ausência de clamidósporos, comparando-se com as leveduras controle. Através da MEV, foi possível observar alterações morfológicas e danos sutis na superfície da estrutura das células tratadas com o EfraMat-45 na concentração CIM. A Microscopia de Fluorescência em células de *C. albicans* coradas com Calcofluor White evidenciou a presença de estruturas alongadas quando as células foram cultivadas em meio líquido com EfraMat-45 na concentração de CIM. A coloração por iodeto de propídio evidenciou morte celular nas leveduras tratadas com o extrato. Foi verificado que o EfraMat-45 apresentou elevada taxa de compostos fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante e ausência de citotoxicidade *in vitro*. Por fim, os resultados permitiram afirmar que o extrato aquoso de *M. titans* apresentou comportamento bastante promissor no que diz respeito à ação antifúngica, com alterações celulares certificando a morte celular, sendo necessária a continuação do estudo de purificação e elucidação estrutural dos compostos presentes, a fim de verificar se a ação antifúngica encontrada poderá ser atribuída a um composto específico ou depende de algum mecanismo sinérgico de compostos secundários.

Palavras-chave: *Macrocybe titans*. *Candida albicans*. Produtos naturais. Micromorfologia. Extrato aquoso. Filamentação.

ABSTRACT

Macrofungi extracts have been studied due to the wide variety of their bioproducts. The basidiomycete mushroom *Macrocybe titans* was recently reported in Brazil and there are few reports in the literature about its antimicrobial potential. With the rapid emergence of antibiotics resistant microorganisms, the search for new effective therapeutic agents has become a favorable alternative in the fight against diseases caused by fungi, mainly *Candida* species. Thus, the present study aimed to verify the antifungal potential of *M. titans* extracts on *Candida albicans* ATCC 90028, as well as the effects on the morphological aspects of this yeast. Were used five extracts obtained from *M. titans*: three aqueous fractions (concentrated, filtered EfraMat-45 and EfraMat-22 – values in μm related to filter porosity); methanolic/ethyl acetate extracts (cold method); methanolic/ethyl acetate extracts (hot Soxhlet extraction method). The antifungal susceptibility was evaluated by broth microdilution and disk-diffusion method, according to CLSI's M27-A3 and M44-A2 protocols. It was found that EfraMat-45 showed the best results for Minimum Inhibitory Concentration ($31.25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) among extracts. Micromorphological aspects were analyzed by microculture on cornmeal agar supplemented with 1% Tween 80, Fluorescence Microscopy using Calcofluor White and propidium iodide, and Scanning Electron Microscopy (SEM). In the microculture analysis, it was possible to observe complete inhibition of yeast growth on the culture slides referring to MIC, in all aqueous extract of *M. titans*. Morphological changes were observed on the slides of sub-MIC, with an increased formation of elongated cells and chlamydospores absence, compared to control yeasts. Through SEM, it was possible to observe morphological changes and slight damages on the surface of cells treated with EfraMat-45 MIC. Staining with Calcofluor White revealed the presence of elongated cells in *C. albicans* cultivated with EfraMat-45 at MIC in liquid medium. Propidium iodide staining revealed cell death on yeasts treated with the extract. It was verified that EfraMat-45 showed higher rates of phenolic and flavonoid compounds, antioxidant activity, and absence of *in vitro* cytotoxicity. Finally, the results suggest that the aqueous extract of *M. titans* showed a very promising pattern as regarded to antifungal action, with cellular changes certifying cell death, requiring a further study of purification and structural elucidation of the compounds, in order to verify whether the antifungal effect can be attributed to a specific compound or it depends on some synergistic mechanism of secondary compounds.

Keywords: *Macrocybe titans*. *Candida albicans*. Natural products. Micromorphology. Aqueous extract. Filamentation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – <i>Macrocybe titans</i> ENCONTRADO NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ	19
FIGURA 2 – MICROMORFOLOGIA DE <i>Candida albicans</i>	24
FIGURA 3 – RESULTADO DO ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA REGIÃO DO ESPAÇADOR INTERNO TRANSCRITO DO GENE RIBOSSOMAL 5.8S DE <i>Macrocybe titans</i> UTILIZANDO A FERRAMENTA BLASTn	36
FIGURA 4 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DA REGIÃO DO ESPAÇADOR INTERNO TRANSCRITO DO GENE RIBOSSOMAL 5.8S DO ISOLADO MT3 DE <i>Macrocybe titans</i> E MAIS 10 ISOLADOS	37
FIGURA 5 – ANÁLISE VISUAL DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA NA PLACA 1	39
FIGURA 6 – ANÁLISE VISUAL DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA NA PLACA 2	39
FIGURA 7 – ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA PARA OS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Macrocybe titans</i>	40
FIGURA 8 – ENSAIO DE DISCO-DIFUSÃO PARA <i>Candida albicans</i> COM OS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Macrocybe titans</i> E FLUCONAZOL	42
FIGURA 9 – ANÁLISE DO CRESCIMENTO DE <i>Candida albicans</i> EM MEIO SDA APÓS TRATAMENTO DA LEVEDURA COM OS EXTRATOS AQUOSOS FILTRADOS DE <i>Macrocybe titans</i>	45
FIGURA 10 – MICROPLACA DO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CONTENDO OS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Macrocybe titans</i>	46
FIGURA 11 – EFEITO NA MICROMORFOLOGIA DE <i>Candida albicans</i> CULTIVADA COM E SEM OS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Macrocybe titans</i> APÓS ENSAIO DE MICROCULTIVO	52
FIGURA 12 – MICROMORFOLOGIA DE <i>Candida albicans</i> OBSERVADA NAS LÂMINAS SUB-CIM DOS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Macrocybe titans</i>	53
FIGURA 13 – MICROMORFOLOGIA DE <i>Candida albicans</i> OBSERVADA NAS LÂMINAS DO ENSAIO CONTROLE DO MICROCULTIVO	54

FIGURA 14 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE <i>Candida albicans</i> APÓS TRATAMENTO COM EFRAMAT-45 DE <i>Macrocybe titans</i>	56
FIGURA 15 – ANÁLISE MICROSCÓPICA DE FLUORESCÊNCIA DOS ENSAIOS DE CAPTAÇÃO DE IODETO DE PROPÍDIO	58
FIGURA 16 – MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DOS ENSAIOS DE <i>Candida albicans</i> COM CALCOFLUOR WHITE APÓS TRATAMENTO COM EFRAMAT-45 DE <i>Macrocybe titans</i>	59
FIGURA 17 – MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DOS ENSAIOS DE <i>Candida albicans</i> COM CALCOFLUOR WHITE, COM E SEM O EXTRATO DE <i>Macrocybe titans</i>	60

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA TABELA 3.....	43
GRÁFICO 2 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS HaCaT APÓS CONTATO COM OS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Macrocybe titans</i>	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RENDIMENTO DOS EXTRATOS DO FUNGO <i>Macrocybe titans</i>	38
TABELA 2 – DIÂMETRO DOS HALOS OBTIDOS NO ENSAIO DE DISCO-DIFUSÃO PARA <i>Candida albicans</i> COM OS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Macrocybe titans</i>	41
TABELA 3 – VALORES OBTIDOS DO NÚMERO DE CÉLULAS/ML APÓS CONTAGEM DE CÉLULAS DE <i>Candida albicans</i> COM OS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Macrocybe titans</i> EM CÂMARA DE NEUBAUER	43
TABELA 4 – VALORES OBTIDOS DE UFC/ML APÓS CONTAGEM DE COLÔNIAS DE <i>Candida albicans</i> COM OS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Macrocybe</i> <i>titans</i>	44
TABELA 5 – RESULTADOS DO ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NOS EXTRATOS FILTRADOS DE <i>Macrocybe titans</i>	49
TABELA 6 – RESULTADOS DO ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES NOS EXTRATOS FILTRADOS DE <i>Macrocybe titans</i>	49
TABELA 7 – RESULTADOS DO ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO SEQUESTRO DO RADICAL DPPH NOS EXTRATOS FILTRADOS DE <i>Macrocybe titans</i>	50
TABELA 8 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO PODER DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP) NOS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Macrocybe titans</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau(s) Celsius
× g	Força centrífuga relativa
µg	Micrograma(s)
µl	Microlitro(s)
µm	Micrômetro(s)
µM	Micromolar
abs	Absorbância
ATCC	American Type Collection Culture
BHI	Brain Heart Infusion
BLASTn	Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotides
C ¹³ RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
cm	Centímetro(s)
Da	Dalton(s)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EfraMat-45	Extrato aquoso filtrado 0,45 de <i>Macrocybe titans</i>
EfraMat-22	Extrato aquoso filtrado 0,22 de <i>Macrocybe titans</i>
FBS	Fetal Bovine Serum
FRAP	Poder Antioxidante de Redução do Ferro
g	Gramas(s)
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
HaCaT	Human Keratinocyte Cells
HPSEC-MALLS	Cromatografia de Exclusão de Tamanho de Alto Desempenho combinada com Dispersão de Luz a Laser Multi-ângulo Online
ITS	Espaçador Transcricional Interno

L	Litro(s)
LTDA	Limitada
M	Molar
m ²	Metro(s) quadrado(s)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama(s)
MH	Mueller-Hinton
ml	Mililitro(s)
mm	Milímetro(s)
mm ²	Milímetro(s) quadrado(s)
mM	Milimolar
mol	Mol(e)
MOPS	3-N morfolinopropanosulfônico
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)- 2H-tetrazólio
n°	Número
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCBI	National Center for Biotechnology
NEMA	Núcleo Experimental de Micologia Aplicada
ng	Nanograma(s)
nm	Nanômetro(s)
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
rDNA	DNA Ribossomal
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotação(ões) por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SDS	Dodecil sulfato de sódio
sub-CIM	Concentração Sub-inibitória Mínima
TBE	Tampão Tris-base EDTA

TE	Tampão Tris-EDTA
U	Unidade(s)
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UTI	Unidade(s) de Tratamento Intensivo
YPD	Yeast Extract-Peptone-Dextrose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo geral	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 COGUMELO <i>Macrocybe titans</i>	19
2.2 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE COGUMELOS.....	21
2.3 <i>Candida albicans</i>	22
2.3.1 Importância clínica.....	23
2.3.2 Patogênese: polimorfismo e fatores de virulência	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DOS ENSAIOS	25
3.2 MICRORGANISMO	25
3.3 LINHAGEM E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO FUNGO BASIDIOMICETE .	25
3.3.1 Extração de DNA de <i>Macrocybe titans</i>	25
3.3.2 Amplificação da região ITS1-4 pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	26
3.3.3 Purificação, sequenciamento da região ITS1-4 e análise filogenética.....	27
3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>M. titans</i>	27
3.5 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DE <i>C. albicans</i> AOS EXTRATOS	29
3.6 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA POR DISCO-DIFUSÃO	30
3.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>C. albicans</i>	30
3.8 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS.....	31
3.9 ANÁLISE MICOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	32
3.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS SOBRE A MICROMORFOLOGIA DE <i>C. albicans</i>	33
3.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	33
3.12 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO FUNGO BASIDIOMICETE	35
4.2 RENDIMENTO DOS EXTRATOS	37
4.3 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DO MICRORGANISMO AOS EXTRATOS	38

4.4	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA POR DISCO-DIFUSÃO	41
4.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>C. albicans</i>	42
4.6	ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS.....	45
4.7	ANÁLISE MICOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	48
4.8	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS SOBRE A MICROMORFOLOGIA DE <i>C. albicans</i>	51
4.9	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE <i>C. albicans</i> APÓS INCUBAÇÃO COM EFRAMAT-45 ...	55
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Dentre os fungos causadores de doenças em humanos e animais, *Candida albicans* é reconhecidamente uma levedura de importância médica. As espécies do gênero *Candida*, com destaque para *C. albicans*, fungo patógeno oportunista, diferenciam-se entre células leveduriformes, em meio de crescimento padrão, e cadeias filamentosas de células denominadas hifas e pseudo-hifas, quando induzidas em diferentes condições. Essas alterações podem ocorrer devido a uma adaptação rápida a flutuações no pH ambiental, flexibilidade metabólica, sistemas de aquisição de nutrientes e mecanismos de resposta ao estresse. A habilidade de transição levedura-hifa está relacionada a fatores de virulência, associados à invasibilidade do tecido infectado e escape do sistema imune, mais especificamente de crescer invasivamente e penetrar no sistema imune (MARTIN *et al.*, 2005).

Ao mesmo tempo, apesar de a indústria farmacêutica ter investido e lançado novos antifúngicos nas três últimas décadas, as formas de resistência de microrganismos a essas drogas têm aumentado. Pesquisas envolvendo compostos naturais com propriedades antifúngicas podem contornar esse problema, pois novas alternativas devem ser consideradas em relação ao problema de resistência a antifúngicos, como por exemplo, controlar o seu uso indiscriminado, 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.

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). Além disso, em comparação com as drogas sintéticas, os produtos naturais têm muitas vantagens, como diversidade estrutural e toxicidade relativamente baixa (XIN *et al.*, 2017). Buscam-se assim, novas opções terapêuticas que devam ir além da atividade antifúngica, e também causar uma interferência nos fatores de virulência.

Ao longo dos anos, os cogumelos desenvolveram ou adaptaram seu metabolismo em seu habitat para sobreviver e competir com outros organismos. Muitos metabólitos secundários ou específicos produzidos no ciclo de vida dos cogumelos foram descobertos e demonstraram ter funções antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória, além de suas propriedades nutricionais e culinárias

(ZJAWIONY, 2004; SRIDHAR *et al.*, 2011). Uma grande variedade de moléculas bioativas foi isolada de cogumelos, tais como proteínas (ZHANG *et al.*, 2014), glicoproteínas (CUI *et al.*, 2013), metabólitos secundários (BABY *et al.*, 2015), lipopolissacarídeos (WASSER, 2011) e polissacarídeos (MENG *et al.*, 2017).

Publicações anteriores, realizadas principalmente no Japão, demonstraram claramente que várias espécies de cogumelos apresentam valor medicinal e terapêutico, na prevenção e tratamento de tumores de origem viral e bacteriana e outras doenças como hipercolesterolemia e coagulação intravascular (BREENE, 1990; CHANG *et al.*, 1991; JONG e BIRMINGHAM, 1993), além de serem alimentos funcionais não tóxicos, oferecendo inúmeros benefícios fisiológicos (GIRI *et al.*, 2012; VETCHINKINA, 2018). Trabalhos recentes têm mostrado que extratos de cogumelos comestíveis possuem potencial antitumoral, anti-inflamatório, antidiabético e antifúngico (OWAID *et al.*, 2015; YAN *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2018; MINATO *et al.*, 2018; MILHORINI *et al.*, 2018).

Ainda assim, existem espécies que são inexploradas e podem ter um potencial medicinal ainda desconhecido, como o gigantesco cogumelo comestível *Macrocybe titans* (H.E. Bigelow e Kimbr.) Pegler, Lodge e Nakasone (1998). Os registros na literatura que tratam da potencialidade deste cogumelo como produtor de substâncias bioativas ainda são muito poucos. Quanto ao gênero *Macrocybe*, existem poucas publicações sobre a atividade antimicrobiana.

Da mesma forma, até o presente momento não foram reportados trabalhos sobre este potencial, especialmente antifúngico, de extratos de *M. titans*, relacionando a ação antimicrobiana de *M. titans* contra *C. albicans*, assim como também não há relatos sobre o efeito dos extratos desse cogumelo sobre a morfologia desta levedura.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo verificar o potencial antifúngico de extratos de *Macrocybe titans* sobre *Candida albicans*, bem como os efeitos na micromorfologia da levedura.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Estudar a possível atividade antifúngica dos extratos aquosos, metanólico e de acetato de etila de *M. titans* sobre *C. albicans*, avaliando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos mesmos;
- b) Determinar o efeito dos extratos sobre o crescimento da levedura em cultura líquida e através de testes de disco-difusão;
- c) Avaliar a citotoxicidade dos extratos;
- d) Analisar a atividade antioxidante e micoquímica dos extratos;
- e) Observar o efeito dos extratos fúngicos sobre a micromorfologia de *C. albicans*, analisando a formação de estruturas típicas como pseudo-hifas, blastoconídios e clamidósporos;
- f) Analisar possíveis alterações e a viabilidade celular de *C. albicans* após contato com os extratos através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Fluorescência.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COGUMELO *Macrocybe titans*

M. titans é um fungo basidiomicete encontrado em regiões tropicais e subtropicais da América do Norte e do Sul, reportado no Brasil pelo especialista em taxonomia de macrofungos, André de Meijer, em Antonina-PR (WISNIEWSKI *et al.*, 2010).

Pode ser localizado em áreas urbanas, gramados, áreas arenosas, solos perturbados pelo paisagismo, ou mesmo em áreas de cultivo agrônômico, geralmente dentro do período de 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 no mundo, 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 1).

FIGURA 1 – *Macrocybe titans* ENCONTRADO NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ



FONTE: Claudemir Tezolin, Chácara Naturale, 2014.

NOTA: espécime utilizada neste trabalho.

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

Algumas espécies de macrofungos basidiomicetes têm sido utilizadas como suplementos alimentares ou iguarias gastronômicas devido ao seu alto valor nutricional ou sabor diferenciado, ou mesmo sendo relatados como possuindo importância medicinal, fortalecendo o sistema imune e apresentando atividade antioxidante e antimicrobiana (VETCHINKINA, 2018). Estudos científicos mostram que fungos 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).

Os registros na literatura que tratam da potencialidade de *M. titans* como produtor de substâncias bioativas ainda são muito poucos. 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* foi 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 atividade antimicrobiana já estudada, como é o caso de *M. crassa*, onde análises de extrato etanólico apresentaram componentes bioativos como fenóis, flavonoides, 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).

2.2 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE COGUMELOS

Embora muitas variedades de cogumelos tenham sido descobertas, apenas 2.000 entre 140.000 das espécies identificadas são seguras como alimento (BALAKUMAR *et al.*, 2011), e apenas 158 espécies de 88 gêneros foram reconhecidas como tendo propriedades antimicrobianas. Para identificar novas fontes de antimicrobianos em cogumelos, um processo de triagem inicial para espécies de macrofungos com propriedades antimicrobianas é frequentemente realizado com base na ecologia da região onde os cogumelos crescem, a fim de se evitar a coleta de espécimes com contaminantes bioacumulados, ou no uso tradicional destes (GIRI *et al.*, 2012). Por exemplo, Rosa *et al.* (2003) examinaram mais de 100 isolados de cogumelos de vários ecossistemas brasileiros e identificaram 13 isolados com atividades antimicrobianas. Giri *et al.* (2012) avaliaram 30 espécies de cogumelos selvagens comestíveis de Bengala Ocidental, na Índia, e descobriram que todos os seus extratos metanólicos mostraram diferentes níveis de atividades antimicrobianas.

Esses cogumelos incluem espécies silvestres que ocorrem naturalmente, especialmente espécies decompositoras de madeira, como *Agrocybe* spp., *Panus fulvus* e *Auricularia auricula-judae* (ROSA *et al.*, 2003; NWACHUKWU e UZOETO, 2010) e espécies comercialmente cultivadas, como *Agaricus bisporus* e *Pleurotus* spp. (JAGADISH *et al.*, 2009), além de macrofungos medicinais bem conhecidos em todo o mundo, como *Ganoderma* spp., *Lentinus edodes* e *Cordyceps militaris* (ISHIKAWA *et al.*, 2001). Algumas das primeiras pesquisas que relataram os compostos antitumorais e antimicrobianos das espécies *Ganoderma*, *L. edodes*, *Schizophyllum commune* e *Grifola frondosa* foram os principais temas de pesquisa (ZJAWIONY 2004; RAI *et al.*, 2005). Extratos do corpo de frutificação e do filtrado de cultura micelial (livre de células) de uma mesma espécie de cogumelo podem resultar em diferentes propriedades antibacterianas. De uma cultura submersa de 14 cepas de *P. ostreatus*, Gerasimenya *et al.* (2002) confirmaram que os extratos miceliais eram mais ativos contra bactérias testadas do que os extratos filtrados de culturas.

Durante o crescimento de cogumelos, uma variedade de metabólitos primários e secundários pode ser acumulada como produtos intracelulares e extracelulares, incluindo fenólicos, policetídeos, terpenóides, esteróides,

aminoácidos não-proteicos, proteínas antibacterianas ou antifúngicas e ácidos graxos voláteis (CHE *et al.*, 1998; ZJAWIONY 2004). Muitos compostos fenólicos, especialmente os compostos fenólicos de baixo peso molecular, foram identificados em vários cogumelos, e suas propriedades antimicrobianas foram demonstradas. Ishikawa (1997) estudou o efeito inibitório de *L. edodes* sobre *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia*, observando maior atividade sobre as bactérias Gram-positivas, como também observado por Komemushi *et al.* (1996).

As propriedades antifúngicas dos cogumelos são geralmente determinadas pela avaliação da inibição do crescimento micelial dos fungos. Os fungos mais comumente utilizados para essa determinação incluem os fungos filamentosos *Aspergillus* spp., *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium* spp., *Magnaphorthe grisea*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Penicillium* spp., *Physalospora piricola* e *Trichophyton mentagrophytes*, e as leveduras *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3 *Candida albicans*

Candida albicans é um importante patógeno oportunista em humanos. A habilidade das espécies de *Candida* de alternar entre sua forma leveduriforme e filamentosa tem sido associada com a patogênese e sua mudança morfológica pode ser desencadeada por diversas condições ambientais. São frequentemente utilizadas para estudos sobre o efeito de agentes antifúngicos, possuindo um papel importante tanto em termos clínicos quanto em seu uso como modelo experimental para investigações científicas (SELLAM e WHITEWAY, 2016).

O número limitado de drogas antifúngicas disponíveis e o crescente aumento da resistência dos fungos resultam em altas taxas de morbidade e mortalidade por infecções sistêmicas, demonstrando a necessidade de desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, tornando assim o estudo da biologia desse patógeno uma condição importante para a descoberta de novos alvos de medicamentos para terapia antifúngica (SELLAM e WHITEWAY, 2016).

2.3.1 Importância clínica

Dentre o gênero *Candida*, a espécie *C. albicans* merece destaque na micologia médica devido a sua alta patogenicidade. É o patógeno fúngico humano mais comum, causando doenças que atingem a mucosa até infecções sistêmicas.

C. albicans é um microrganismo natural da microbiota humana, onde, em estado comensal, coloniza assintomaticamente superfícies de mucosas. Entretanto, a partir de disfunções no sistema imune, este fungo pode proliferar e invadir qualquer área do hospedeiro (TSUI *et al.*, 2016), causando desde sepse tardia em pacientes imunocomprometidos e pacientes pediátricos, internados em UTIs, apresentando altas taxas de mortalidade por candidemia, a infecções vulvovaginais, gastrointestinais e candidose bucal (EGGIMANN *et al.*, 2003; NETO, 2004).

A frequência desta doença avançou drasticamente nas últimas décadas, devido ao aumento no número de pacientes imunocomprometidos. Consequentemente, *C. albicans* se tornou o agente fúngico mais frequente, responsável por infecções nosocomiais em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) no Brasil, com altas taxas de morbidade e mortalidade, mesmo em pacientes tratados com os atuais antifúngicos disponíveis (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

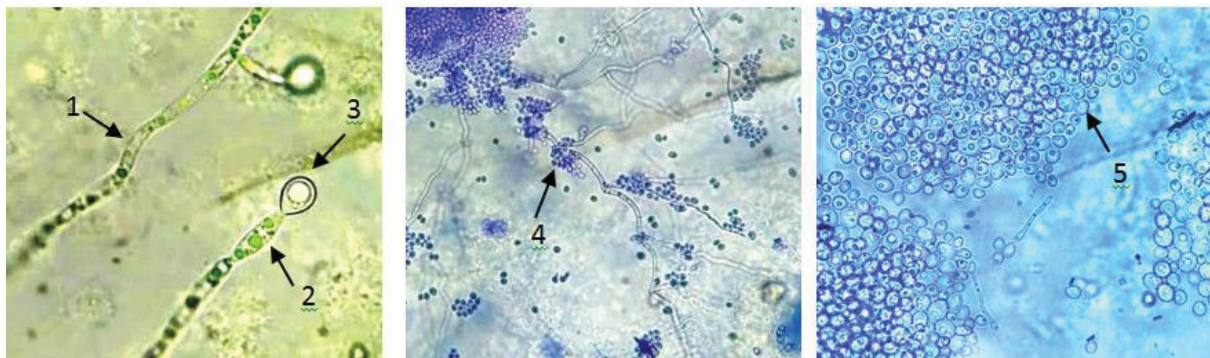
2.3.2 Patogênese: polimorfismo e fatores de virulência

As espécies do gênero *Candida*, com destaque para *C. albicans*, são organismos polimórficos capazes de alterar sua morfologia de acordo com as condições ambientais existentes, diferenciando-se entre células leveduriformes e cadeias filamentosas de células denominadas hifas, pseudo-hifas e clamidósporos (FIGURA 2), quando induzidas em diferentes condições, sendo que em cada forma morfológica apresenta diferente potencial de virulência (MARTIN *et al.*, 2005; GOW *et al.*, 2012).

Essas espécies diferenciam-se em células leveduriformes únicas, ovais a alongadas, e que exibem padrões de partição bipolar e axial, medindo de 2 a 8 µm de largura por 3 a 14 µm de comprimento. Por outro lado, quando a espécie apresenta formação de hifas, estas se apresentam como múltiplas unidades celulares alongadas, de lados paralelos, uniformes em largura e com septos verdadeiros sem constrições, além de poros nos septos para a comunicação entre

células. Os eventos de divisão nuclear e formação do anel do septo ocorrem inteiramente dentro do tubo germinativo (o filamento curto inicial) durante a primeira divisão celular (WEBB *et al.*, 1998 *apud* NETO, 2004; THOMPSON *et al.*, 2011).

FIGURA 2 – MICROMORFOLOGIA DE *Candida albicans*



LEGENDA: (1) hifas, (2) pseudo-hifas, (3) clamidósporos, (4) blastoconídios e (5) células leveduriformes de *C. albicans*.

FONTE: Adriana Fiorini Rosado, 2018.

Para alterar sua morfologia da forma leveduriforme para a forma de hifas são necessários fatores indutores, como um estágio nutritivo adequado e temperatura maior que 33°C (SAMARANAYAKE e MCFARLANE, 1990 *apud* NETO, 2004). Essa habilidade de alterar-se está relacionada a fatores de virulência, mais especificamente de crescer invasivamente e penetrar no sistema imune.

A parede celular de *C. albicans* é composta por carboidratos e proteínas ausentes em humanos, que ativam e regulam a resposta imune. A parede da levedura é constituída por uma camada externa composta de glicoproteínas e uma camada interna que contém polissacarídeos estruturais. Cerca de 80 a 90% da parede celular são carboidratos, enquanto que a camada externa consiste de polímeros de manose com ligações O- e N-, covalentemente associados a proteínas para formar glicoproteínas. A expressão de proteínas da parede celular é altamente regulada durante a transição de levedura para hifa, indicando fator de virulência, uma vez que essas proteínas específicas são, em sua maioria, antígenos que atuam como adesinas e invasinas para modular a resposta imune (GOW *et al.*, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DOS ENSAIOS

As pesquisas foram realizadas no Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA), Laboratório de Microbiologia e Laboratório de Bioquímica e Genética (Labiogen), da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina. O teste de microdiluição em caldo para avaliação da susceptibilidade antifúngica e o teste de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Micologia Médica, da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

3.2 MICRORGANISMO

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

3.3 LINHAGEM E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO FUNGO BASIDIOMICETE

Neste trabalho foi utilizada a linhagem identificada como MT3 do fungo basidiomicete *M. titans*, coletada na região oeste do estado do Paraná, e pertencente ao banco de germoplasma do NEMA. O sequenciamento de DNA do cogumelo foi realizado a fim de se confirmar a identificação fenotípica do fungo.

3.3.1 Extração de DNA de *Macrocybe titans*

A extração do DNA genômico de *M. titans* foi realizada com aproximadamente 100 mg do pó obtido a partir de basidiomas do cogumelo seco e triturado. Foi adicionado 1 ml de tampão de extração (SDS 1%, EDTA 0,05 M pH 8,0) com 6 pérolas de vidro, os microtubos foram agitados por 15 minutos em vórtex e incubados a 66°C por 20 minutos. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 13.000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 50 µl de RNase 20 mg/ml foram adicionados, seguido de incubação por 60 minutos a 37°C. A purificação foi realizada adicionando aos tubos 300 µl de fenol calibrado em tampão, com posterior

centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos. Na sequência, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionados 400 µl de fenol:clorofórmio álcool isoamílico (24:1), com nova centrifugação por 5 minutos a 13.000 rpm (por 2 vezes). O sobrenadante foi precipitado com 63 µl de acetato de potássio 5 M pH 4,8, seguido de incubação a 4°C durante 35 minutos e centrifugação a 13.500 rpm por 5 minutos a 4°C. O DNA do sobrenadante foi precipitado com 1 ml de etanol absoluto gelado, misturado delicadamente, centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos e o *pellet* lavado com etanol 70%. Após secagem, o *pellet* contendo DNA foi ressuspensionado com 100 µl de tampão TE pH 8,0 (10 mM Tris-HCl, EDTA 0,1 mM). A integridade do DNA extraído foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris-base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM pH 8,0), corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio, utilizando o padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotecnologia) e visualizado no fotodocumentador L.PIX (Loccus Biotecnologia). A quantidade de DNA foi mensurada através da razão 260/280 nm em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific).

3.3.2 Amplificação da região ITS1-4 pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O protocolo de PCR utilizado seguiu a recomendação do *kit* GoTaq Master Mix (Promega), com modificações. A região do espaçador transcricional interno (ITS1-4) do rDNA ITS1-5.8S-ITS2 (MIRHENDI *et al.*, 2006) foi amplificada, por PCR, em uma reação de 25 µl contendo 25 ng do DNA genômico, 0,4 µM do iniciador *forward* ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e do iniciador *reverse* ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), 0,8 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂ e 1 U de GoTaq DNA Polimerase no tampão apropriado da enzima. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; com extensão final a 72°C por 7 minutos; em termociclador Life Express MJ96 (Bioer). Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X, corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio, utilizando o padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotecnologia) e fotodocumentados utilizando o equipamento L.PIX (Loccus Biotecnologia).

3.3.3 Purificação, sequenciamento da região ITS1-4 e análise filogenética

Os produtos de amplificação foram purificados com PEG 6.000 20% e NaCl 2,5 M (LIS e SCHLEIF, 1975). Uma alíquota de 2 µl dos produtos de PCR foi quantificada e o grau de pureza determinado pela relação A260/280 em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific). As amostras foram secas em estufa a 50°C e enviadas para a empresa Ludwig Biotecnologia LTDA, Alvorada-RS, para a realização do sequenciamento. Foi utilizado o sequenciador automático ABI Prism 3500 (Applied Biosystems).

Os eletroferogramas obtidos foram analisados com o auxílio do software BioEdit Sequence Alignment Editor (1997-2013) e os resultados do sequenciamento foram comparados com as sequências depositadas no banco de dados GenBank, NCBI (National Center for Biotechnology), através da ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool – versão 2.215 do BLAST 2.0). O critério adotado para interpretação foi de que sequências com identidade $\geq 99\%$ são consideradas como pertencentes à mesma espécie e gênero; sequências $\geq 98\%$ pertencem ao mesmo gênero, porém representam variação dentro da espécie; e sequências $\geq 95\%$ e inferiores a 98% pertencem apenas ao mesmo gênero (GODINHO *et al.*, 2013).

Na análise filogenética foram utilizadas as seguintes sequências do rDNA ITS1-5.8S-ITS2 de *Macrocybe* sp. depositadas no GenBank: MT3 *Macrocybe titans* (deste trabalho), MN017547.1 *M. titans*, MN017546.1 *M. titans*, MN017548.1 *M. titans*, MN017544.1 *M. titans*, MK024240.1 *M. gigantea*, LC006057.1 *M. crassa*, LC029415.1 *M. crassa*, MW018915.1 *Macrocybe* sp., MN017543.1 *M. sardoa* e MF401593.1 *M. gigantea*. As sequências utilizadas na análise filogenética tinham 559 pb. A filogenia foi inferida usando o método Neighbor-Joining (SAITOU e NEI, 1987). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método da Máxima Verossimilhança Composto (TAMURA *et al.*, 2004). Esta análise envolveu 11 sequências de nucleotídeos. As análises evolutivas foram conduzidas no software MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018).

3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE *M. titans*

Após secagem dos basidiomas de *M. titans* em estufa a 70°C e trituração, foram preparados cinco extratos, sendo três frações aquosas (concentrada, filtradas

EfraMat-45 e EfraMat-22); extratos metanólico/acetato de etila a frio; extratos metanólico/acetato de etila a quente (Soxhlet).

Os extratos aquosos foram preparados a partir de um total de 5 g do pó embebido em 20 ml de água destilada autoclavada (1:4 ou 250 µg/µl) e mantido em repouso a 4°C durante 24 horas para se realizar a extração a frio. Posteriormente, o extrato foi filtrado em voal para obtenção da fração concentrada. Cerca de 2/3 do volume foi filtrado com auxílio de seringa em filtro estéril PES (polietersulfona) hidrofílico de 0,45 µm e metade deste volume final, em filtro estéril PES de 0,22 µm, obtendo-se as frações filtradas 0,45 e 0,22, respectivamente. Estas frações foram denominadas EfraMat-45 e EfraMat-22.

Para as extrações a frio, um total de 10 g do pó foi embebido em 200 ml de metanol ou acetato de etila 99,5% (1:20) e mantido sob agitação a 150 rpm, a 25°C durante 48 horas. Após esse período, o solvente foi separado por filtração em papel filtro Whatman n° 1 (gramatura 87 g/m², porosidade 11 µm) e rotaevaporado a 40°C sob vácuo para se obter os extratos metanólico e de acetato de etila a frio do cogumelo.

Para as extrações a quente, um total de 40 g do pó foi arranjado em um envelope preparado a partir de papel filtro qualitativo (gramatura 80 g/m², porosidade 25 µm) e embebido em 200 ml de metanol (1:5). O processo foi realizado em extrator de Soxhlet durante 3 horas e a fração foi rotaevaporada a 70°C sob vácuo. O mesmo procedimento foi realizado para a extração em Soxhlet com acetato de etila.

Todos os extratos foram armazenados ao abrigo da luz e mantidos a -20°C. Para a determinação do método de extração mais eficiente foi realizado o cálculo do rendimento das extrações de acordo com a equação:

$$\text{rendimento (\%)} = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100$$

Onde:

m_{extrato} = massa (g) do extrato obtido após evaporação do solvente;

m_{amostra} = massa total (g) da amostra utilizada.

3.5 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DE *C. albicans* AOS EXTRATOS

O método utilizado foi o de microdiluição em caldo para avaliação da susceptibilidade antifúngica, segundo o padronizado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008, M27-A3) com algumas modificações para produtos naturais, utilizando como meio líquido o RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco) com L-glutamina sem bicarbonato de sódio, tamponado com MOPS (3-N morfolinopropanosulfônico 0,165 M pH 7,2, Sigma-Aldrich), acrescido de 2% de glicose. Foram utilizados os cinco extratos descritos no item anterior.

A densidade celular de *C. albicans* foi ajustada em $2,5-5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias por ml (UFC/ml), em solução salina 0,9% estéril, através de contagem em câmara de Neubauer, a partir de cultura de 24 horas em ágar SDA (Sabouraud Dextrose Agar). A partir desta suspensão, foi realizada uma diluição 1:50 em solução salina estéril e 1:20 em RPMI, obtendo-se o inóculo final desejado de $2,5-5 \times 10^3$ UFC/ml.

Os testes foram realizados em microplacas estéreis de poliestireno de 96 poços, com linhas de A-H e colunas de 1-12. Na coluna 1, foram adicionados 200 µl do extrato de *M. titans* na concentração de 250 µg/µl. Nas colunas de 2-12, foram adicionados 100 µl de RPMI. Em seguida, foi realizada uma diluição seriada 1:2 a partir da coluna 1, da qual foram transferidos 100 µl para a coluna 2, seguida de homogeneização padronizada de 5x, e transferência de 100 µl da coluna 2 para a coluna 3, e assim sucessivamente até a coluna 10, da qual 100 µl foram descartados. Por fim, foram adicionados 100 µl do inóculo padronizado de *C. albicans* nas colunas de 1-10, obtendo-se as concentrações de 125 µg/µl a 0,244 µg/µl na placa. O controle positivo do experimento foi a coluna 11 (100 µl de RPMI e 100 µl de inóculo, sem extrato) e o negativo, a coluna 12 (100 µl de RPMI, apenas). As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 horas. A leitura foi realizada visualmente por meio de reflexão em espelho, e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada como a menor concentração onde não foi possível visualizar crescimento da levedura. O teste foi realizado em duplicata em dias diferentes.

Após a leitura da CIM, foi retirada uma alíquota de 2 µl de cada poço e inoculada em placas com meio SDA para o teste de Concentração Fungicida Mínima (CFM). As placas foram incubadas durante 24 horas a temperatura de 35°C. Após este período, foi observado se houve crescimento microbiano na placa, para então

determinar qual foi a menor concentração dos extratos capaz de causar a eliminação total de *C. albicans*.

3.6 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA POR DISCO-DIFUSÃO

O método de disco-difusão foi utilizado para avaliação da susceptibilidade antifúngica de leveduras, segundo o padronizado pelo CLSI (2018, M44-A2) com algumas modificações para produtos naturais. As células de *C. albicans* foram cultivadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) durante 24 horas. Após esse período, a densidade óptica foi ajustada para 0,08 abs em 530 nm e aproximadamente 100 µl do inóculo foram espalhados com auxílio de um *swab* em placas com meio MH (Mueller-Hinton). Em seguida, discos de 6 mm impregnados com 35 µl dos extratos EfraMat-45 e EfraMat-22 (250 µg/µl) foram fixados sobre o meio e as placas foram incubadas a 35°C por 18 a 24 horas. A dimensão dos halos formados ao redor dos discos foi mensurada para se determinar o efeito dos extratos sobre *C. albicans*. Discos de fluconazol a 25 µg foram utilizados como controle.

3.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS SOBRE O CRESCIMENTO DE *C. albicans*

Para a coleta das células de levedura, com e sem tratamento com os extratos aquosos filtrados, foi feita uma suspensão em solução salina estéril e a densidade celular foi ajustada para $2,5-5 \times 10^6$ UFC/ml através de contagem em câmara de Neubauer. A partir desta suspensão, foi realizada uma diluição 1:50 em salina estéril seguida de uma segunda diluição 1:20 em YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose), obtendo-se o inóculo final desejado de $2,5-5 \times 10^3$ UFC/ml.

Em seguida, foram preparados os ensaios em tubos cônicos de 15 ml com 1 ml do inóculo final, o volume referente às concentrações de CIM e sub-CIM dos extratos EfraMat-45 e EfraMat-22 (sendo 1.290 µl para a CIM e 645 µl para a sub-CIM) e YPD, até o volume final de 10 ml. Para os controles, os volumes dos extratos foram substituídos por água destilada estéril. Os tubos foram vedados parcialmente e incubados a 35°C, *overnight*, sob agitação de 126 rpm.

Após aproximadamente 14 horas, uma amostra de 10 µl de cada cultura foi analisada para contagem de células em câmara de Neubauer e determinação do

número de células/ml. Em seguida, foi preparada uma diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-5} em salina estéril e um total de 5 µl de cada diluição foi inoculado em placas com meio SDA e incubado a 31°C por 48 horas. Após esse período, foi observado o crescimento das colônias e as UFCs/ml foram determinadas.

3.8 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* dos extratos aquosos de *M. titans* foi realizado em linhagem de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT, ATCC PCS-200-011), em duplicata. As células foram mantidas rotineiramente em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) inativado pelo calor, com os antimicrobianos penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml), a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ umidificada. Depois que as células HaCaT atingiram a confluência, foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS), tripisinizadas a 37°C por 10 minutos e contadas. Um total de 2×10^5 células/ml foi adicionado em DMEM suplementado com 10% de FBS a 37°C em microplaca de 96 poços e incubado a uma atmosfera de 5% de CO₂, durante 24 horas. Após o período de incubação, o sobrenadante da cultura foi removido, 100 µl de DMEM foram acrescentados e 100 µl dos extratos aquosos dos cogumelos foram adicionados aos poços da microplaca em diferentes concentrações, e mantidos a 37°C por 24 horas, em atmosfera de 5% de CO₂. O sobrenadante foi removido e a microplaca foi lavada com PBS. Então, 100 µl da solução de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio), diluído em DMEM sem fenol na proporção de 1:100, foram adicionados em todos os poços da microplaca, exceto no branco da reação, e a microplaca foi incubada a 37°C, em atmosfera de CO₂ a 5%, ao abrigo da luz por 4 horas. O MTS foi removido, a microplaca foi agitada e a densidade óptica foi determinada a 492 nm para se determinar a concentração mais alta do extrato no qual 50% das células são viáveis, em comparação com o controle.

3.9 ANÁLISE MICOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para se estimar o conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos, foram adicionados 250 µl do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:1) a 250 µl da amostra diluída na proporção 1:10 (volume de extrato aquoso/volume de solvente extrator), na concentração final de 250 µg/µl. Em seguida, foram adicionados 500 µl da solução saturada de carbonato de sódio (106 g/mol) e 4 ml de água destilada. O tubo cônico de 15 ml foi agitado e mantido a 25°C por 25 minutos sob proteção da luz, e então centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. As mesmas etapas foram repetidas para se preparar o branco, utilizando 250 µl de metanol no lugar da amostra. Ácido gálico (0-200 mg/L) foi usado como solução padrão para a curva de calibração. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis a 725 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato.

Para a determinação do teor total de flavonoides, 500 µl da amostra (250 µg/µl) foram adicionados a 250 µl da solução de cloreto de alumínio 5% e 4,25 ml de metanol. Após agitação, o tubo cônico de 15 ml foi mantido a 25°C por 30 minutos e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis a 425 nm, utilizando metanol como branco. Os resultados foram expressos em termos de equivalente de quercetina (mg Q/g extrato), obtidos a partir da curva de calibração construída utilizando-se soluções conhecidas de quercetina, nas concentrações de 0 a 160 mg/L.

A atividade antioxidante foi determinada pelo método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). A amostra (250 µg/µl) foi pipetada no volume de 25 µl, em tubo cônico de 15 ml, em triplicata. Em seguida, foram adicionados 2 ml da solução metanólica de DPPH (0,1192 mM), agitada em vórtex e as amostras foram protegidas da luz por 30 minutos. A determinação da absorbância foi realizada a 517 nm contra o branco preparado com metanol. A leitura da absorbância da solução de DPPH foi realizada, utilizando soluções conhecidas do padrão antioxidante Trolox para construção da curva de calibração, variando as concentrações de 0 a 2.000 µmol/L. Os resultados foram expressos em termos de equivalente de Trolox por g de extrato (µmol T/g extrato).

O ensaio antioxidante para análise do poder de redução do ferro (Fe^{3+}) (FRAP) foi realizado em triplicata e sob proteção da luz. Inicialmente, foi

determinada a absorbância em 593 nm de 3 ml da solução do reagente FRAP pré-aquecida a 37°C, sendo este o branco. Em seguida, à solução anterior foram adicionados 100 µl da amostra (250 µg/µl) e 300 µl de água destilada (diluição 1/34). A solução foi incubada a 37°C em banho-maria por 40 minutos e a leitura da absorbância foi novamente realizada. Trolox foi utilizado para a construção da curva de calibração nas concentrações de 0 a 700 µM e os resultados foram expressos em µmol de Trolox por g de extrato.

3.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS SOBRE A MICROMORFOLOGIA DE *C. albicans*

Para o ensaio, células de *C. albicans* foram cultivadas em meio SDA por 48 horas e ressuspensas em salina 0,9% até o padrão de turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland, antes de serem estriadas em lâminas preenchidas com meio ágar-fubá (1,25% de fubá, 1% de ágar, 1% de Tween 80) contendo ou não os extratos aquosos filtrados (EfraMat-45 e EfraMat-22) e concentrado de *M. titans* (todos a 250 µg/µl). Os extratos aquosos foram adicionados ao ágar-fubá antes da solidificação, nas concentrações finais correspondentes à CIM e sub-CIM, sendo o controle composto por água destilada correspondente aos volumes dos extratos. Foram realizados três experimentos independentes, em dias diferentes. As células foram inoculadas no meio através de alças calibradas de 10 µl e estriadas em zigue-zague, cobertas com lamínulas e mantidas a 31°C, em câmara úmida e sob o abrigo da luz. Após 72 horas, as lâminas foram analisadas por microscopia óptica, para se verificar possíveis alterações na micromorfologia da levedura.

3.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para a realização da Microscopia Eletrônica de Varredura, a densidade celular de *C. albicans*, a partir de uma cultura pura, foi ajustada inicialmente para $2,5-5 \times 10^6$ UFC/ml através de contagem em câmara de Neubauer. A partir desta suspensão, foi realizada uma diluição 1:50 em solução salina estéril seguida de uma segunda diluição 1:20 em YPD, obtendo-se o inóculo final de $2,5-5 \times 10^3$ UFC/ml.

Em seguida, foi adicionado o extrato EfraMat-45 nas concentrações de CIM e sub-CIM. Para os controles, os volumes relativos ao extrato foram substituídos por

água destilada estéril. Os frascos foram incubados a 35°C sob agitação de 126 rpm, por 6 horas. Após o período de incubação, as células foram contadas em câmara de Neubauer e padronizadas em aproximadamente 1×10^7 UFC/ml, para a realização da MEV.

O *pellet* celular foi obtido por centrifugação a 3.500 rpm por 5 minutos, lavado com 1 ml de PBS 0,1 M pH 7,2 e fixado em 1 ml de solução de glutaraldeído 2,5% (diluída em PBS 0,1 M) durante 18 horas a 4°C. O volume de cada uma das amostras foi variável, para se obter aproximadamente a mesma quantidade de células. Após este período, as células foram centrifugadas a 3.500 rpm por 5 minutos e lavadas com 1 ml de PBS 0,1 M. A pós-fixação foi realizada adicionando 100 µl de tetróxido de ósmio 1% (em PBS 0,1 M) ao *pellet* obtido após centrifugação e mantidos por 1 hora a 50°C. Nova centrifugação e lavagem foram realizadas e o *pellet* foi ressuspendido com 100 µl de PBS 0,1 M. Lamínulas de vidro circulares de 13 mm de diâmetro foram cobertas com solução de poli-L-lisina 0,1% (30.000-70.000 Da, Sigma-Aldrich) por 2 horas, para fixação das células. Após o período de fixação e pós-fixação, 50 µl das amostras foram adicionadas nas lamínulas e mantidas a 50°C até secagem completa. Na sequência, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, de 50%, 70%, 80%, 90%, 95% a 100% (esta última por 2 vezes) durante 10 minutos cada. O ponto crítico foi realizado em secador de ponto crítico EM CPD300 (Leica) durante aproximadamente 2 horas e as imagens de MEV foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura VEGA3 (Tescan) com aumentos de 5.000 e 10.000 vezes.

3.12 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Para o ensaio de Microscopia de Fluorescência, foi utilizada uma alíquota das amostras padronizadas previamente para a MEV. As células foram lavadas com PBS 0,1 M pH 7,2 e centrifugadas a 3.500 rpm por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspendido em 150 µl da solução de PBS 0,1 M e 10 µl da amostra foram depositados em lâmina contendo hidróxido de potássio 10% e corante Calcofluor White (1 mg/ml, Sigma-Aldrich), na proporção de 1:1:1. Novas lâminas foram preparadas contendo 10 µl das amostras ressuspendidas e 10 µl de iodeto de propídio (1 mg/ml). As lâminas foram visualizadas em microscópio invertido de fluorescência FSX100 (Olympus).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO FUNGO BASIDIOMICETE

A sequência obtida a partir da amostra MT3 (linhagem utilizada neste trabalho) foi comparada com outras sequências depositadas no banco de dados GenBank (NCBI). A PCR da região ITS1-4, gerou um fragmento de aproximadamente 649 pb e uma sequência, no resultado do sequenciamento, do mesmo tamanho, com o *primer forward*. Dessas, 561 nucleotídeos apresentaram 100% de identidade com a espécie *M. titans*, de número de acesso MN017546.1, no GenBank (FIGURA 3).

Quando a pesquisa, através da ferramenta BLASTn, resulta em homologia de sequências igual ou superior a 99%, as espécies são consideradas idênticas. De acordo com o critério adotado, é seguro concluir que a amostra MT3 pertence à espécie *M. titans*, devido a altíssima qualidade do sequenciamento realizado. Vale ressaltar que, todas as sequências referentes à região do rDNA ITS (descrita no GenBank como: internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2) foram depositadas pelos mesmos autores, em abril de 2020, e ainda não há publicações relacionadas ao depósito dessas sequências.

A taxonomia de macrofungos é muitas vezes baseada apenas em características morfológicas, mas a pluralidade dos termos e critérios de identificação torna-a, às vezes, de difícil aplicação. Nessa perspectiva, a análise molecular da região ITS (rDNA) é normalmente utilizada como ferramenta auxiliar na identificação precisa das espécies de fungos. A construção da árvore filogenética foi realizada com a sequência do isolado utilizado nesse trabalho e mais dez sequências de *Macrocybe*, incluindo *M. crassa*, *M. gigantea*, *M. sardoa* e *Macrocybe* sp., obtidas do GenBank (FIGURA 4). A linhagem utilizada nesse trabalho alocou no mesmo cluster com outras sequências de *M. titans* do GenBank, suportado pelo *bootstrap* de 98% no ramo principal das espécies, e estão distantes de outras espécies, comprovando que o sequenciamento da região ITS é importante para se determinar com precisão a identificação no nível de espécie.

FIGURA 3 – RESULTADO DO ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA REGIÃO DO ESPAÇADOR INTERNO TRANSCRITO DO GENE RIBOSSOMAL 5.8S DE *Macrocybe titans* UTILIZANDO A FERRAMENTA BLASTn

Macrocybe titans voucher 59217 (FLAS-F) small subunit ribosomal RNA gene, pa 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2
Sequence ID: [MN017546.1](#) Length: 630 Number of Matches: 1

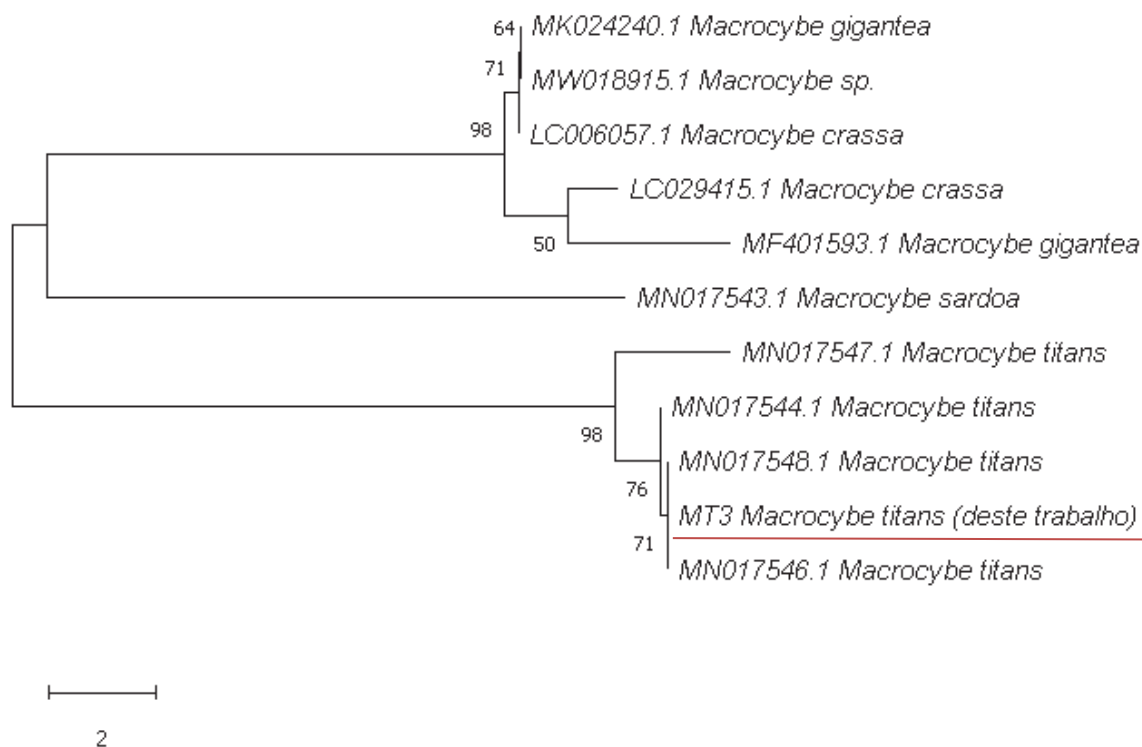
Range 1: 70 to 630 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Prev](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1037 bits(561)	0.0	561/561(100%)	0/561(0%)	Plus/Plus
Query	31	TTGTTGCTGGTTCTTTTAGAGCATGTGCACACTTGGCTCTCGTTTCTAAACCACTTGTGC		90
Sbjct	70	TTGTTGCTGGTTCTTTTAGAGCATGTGCACACTTGGCTCTCGTTTCTAAACCACTTGTGC		129
Query	91	ACCTTTTGTAGACTTGGGAGTTTGATTCAAGAGTGATCTTGGACCTTACGCTCTTGTCTA		150
Sbjct	130	ACCTTTTGTAGACTTGGGAGTTTGATTCAAGAGTGATCTTGGACCTTACGCTCTTGTCTA		189
Query	151	TGTCCTTTTCATGTCACTTACTCTGTGTATAAGAATGTTTTCTAAGGTATTTTTGATGCCT		210
Sbjct	190	TGTCCTTTTCATGTCACTTACTCTGTGTATAAGAATGTTTTCTAAGGTATTTTTGATGCCT		249
Query	211	TTAAATCATATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCA		270
Sbjct	250	TTAAATCATATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCA		309
Query	271	GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC		330
Sbjct	310	GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC		369
Query	331	ACCTTGCGCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATGAAATTCTCAAC		390
Sbjct	370	ACCTTGCGCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATGAAATTCTCAAC		429
Query	391	CTTTGTTACTtttttttGGTTTCAAAGTTGTCTGGATGTGGAGGTTGCTGGCTTTTGTTCG		450
Sbjct	430	CTTTGTTACTTTTTTTGGTTTCAAAGTTGTCTGGATGTGGAGGTTGCTGGCTTTTGTTCG		489
Query	451	AGAGTCAGCTCTTCTGAAATGCATCAGTGGGACCCATCGTTGACTAGCCCTTGGTGTGAT		510
Sbjct	490	AGAGTCAGCTCTTCTGAAATGCATCAGTGGGACCCATCGTTGACTAGCCCTTGGTGTGAT		549
Query	511	AGTTATCTACGCCGTGGCTTATCACGATAATGTGTGTGGTTCTGCTTTCTAAAACAGGAC		570
Sbjct	550	AGTTATCTACGCCGTGGCTTATCACGATAATGTGTGTGGTTCTGCTTTCTAAAACAGGAC		609
Query	571	AATAACTGTCTTTTGATAATT	591	
Sbjct	610	AATAACTGTCTTTTGATAATT	630	

LEGENDA: a sequência obtida (Query) apresentou 100% de identidade com a sequência do GenBank (MN017546 – Sbjct).

FIGURA 4 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DA REGIÃO DO ESPAÇADOR INTERNO TRANSCRITO DO GENE RIBOSSOMAL 5.8S DO ISOLADO MT3 DE *Macrocybe titans* E MAIS 10 ISOLADOS



LEGENDA: filogenia molecular usando o método Neighbor-Joining e distâncias evolutivas calculadas usando o método da Máxima Verossimilhança Composto. Esta análise envolveu 11 sequências de nucleotídeos, incluindo a sequência do isolado deste trabalho. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA X. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico (*bootstrap*, 500 repetições) são indicados acima dos ramos.

4.2 RENDIMENTO DOS EXTRATOS

Os rendimentos dos extratos foram calculados ao final das extrações através da fórmula descrita no item 3.4 e estão apresentados na Tabela 1. A extração a quente (Soxhlet) utilizando metanol apresentou maior eficiência, seguida da extração a frio com o mesmo solvente. Ambos os processos que utilizaram o solvente acetato de etila apresentaram rendimentos significativamente baixos.

TABELA 1 – RENDIMENTO DOS EXTRATOS DO FUNGO *Macrocybe titans*

Método	Extrato	Concentração final (µg/µl)	Rendimento (%)
A frio	Aquoso	250	– ¹
	Metanol	50	15,22
	Acetato de etila	50	0,34
A quente	Metanol	200	25,85
	Acetato de etila	200	2,91

¹ Como a fórmula utilizada para o cálculo de rendimento dos extratos requer a evaporação do solvente após a extração, não foi possível calcular a eficiência do processo para o extrato aquoso, pois não foi realizada a evaporação da água após filtração.

Dessa forma, os cinco extratos (metanol a frio, metanol Soxhlet, acetato de etila Soxhlet, aquoso concentrado e EfraMat-45) foram utilizados durante o teste de susceptibilidade. O extrato de acetato de etila a frio foi descartado por apresentar baixo rendimento e insuficiência.

4.3 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DO MICRORGANISMO AOS EXTRATOS

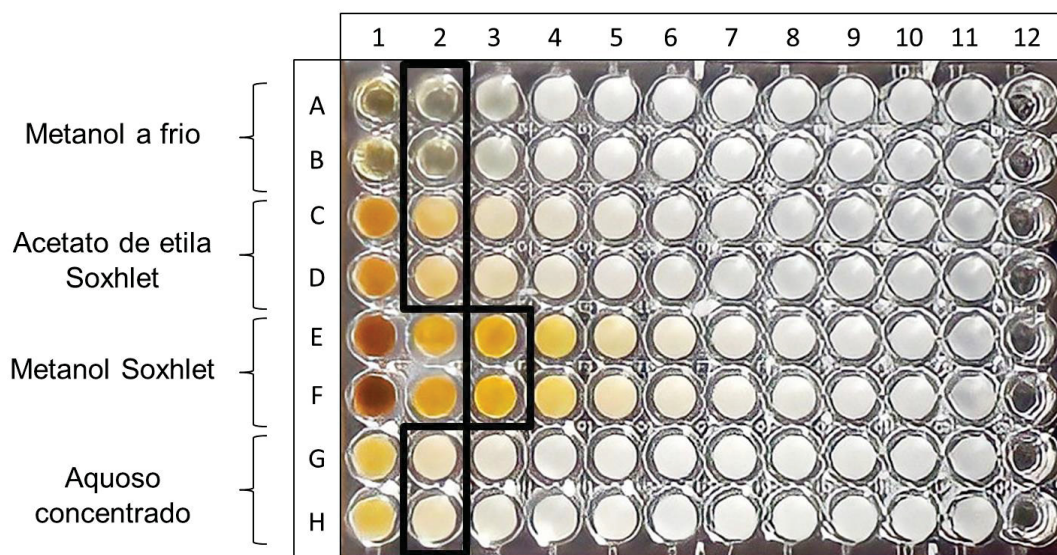
A determinação do ponto de Concentração Inibitória Mínima (CIM) no teste de susceptibilidade foi realizada através de análise visual, pois a coloração de caráter residual e turbidez dos extratos interferem na leitura de absorbância. Ademais, foram consideradas as concentrações calculadas a partir dos extratos originais.

A análise visual realizada após a homogeneização dos poços na placa 1 indicou que a CIM para os extratos à base de metanol a frio, acetato de etila Soxhlet e metanol Soxhlet ocorreu nas colunas 2 e 3, porém os resultados obtidos no teste foram coincidentes com a concentração de inibição apresentada pelo solvente DMSO utilizado para diluí-los. A partir deste ponto, os extratos à base destes solventes orgânicos foram descartados dos ensaios posteriores. Portanto, para o teste de susceptibilidade, foram considerados apenas os resultados dos extratos aquosos concentrado e EfraMat-45.

A determinação da CIM para o extrato aquoso concentrado ocorreu na coluna 2, correspondente à concentração de 62,5 µg/µl (FIGURA 5). A análise visual

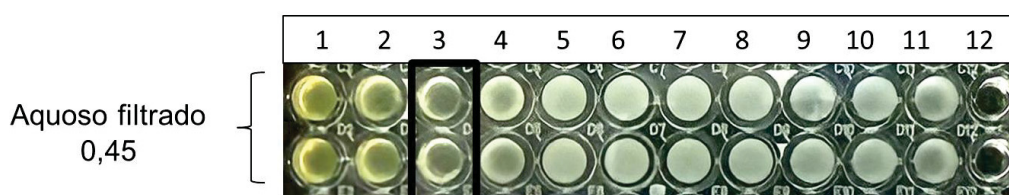
realizada após a homogeneização dos poços na placa 2 determinou que a CIM para o extrato EfraMat-45 ocorreu na coluna 3, referente à concentração de 31,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (FIGURA 6).

FIGURA 5 – ANÁLISE VISUAL DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA NA PLACA 1



LEGENDA: a concentração inibitória mínima para o extrato aquoso concentrado ocorreu no poço 2, correspondente à concentração de 62,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

FIGURA 6 – ANÁLISE VISUAL DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA NA PLACA 2

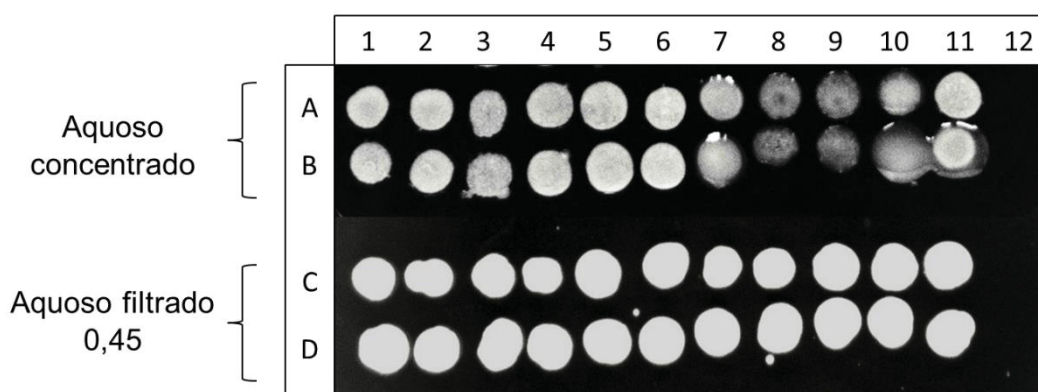


LEGENDA: a concentração inibitória mínima para o extrato EfraMat-45 (aquoso filtrado 0,45) ocorreu no poço 3, correspondente à concentração de 31,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Ao se realizar a análise da placa contendo o ensaio de Concentração Fungicida Mínima (CFM), notou-se que para o extrato aquoso concentrado, nas fileiras A e B, não foi possível determinar onde a inibição ocorreu, uma vez que houve o crescimento de *C. albicans* em todos os poços. O mesmo resultado ocorreu para o EfraMat-45, nas fileiras C e D. No entanto, como na CIM houve inibição nas

colunas 2 e 3 para os extratos aquosos concentrado e filtrado, respectivamente, admite-se que ambos apresentam característica fungistática, pois uma vez em contato com meio de cultura adequado, o microrganismo voltou a crescer, como apresentado na Figura 7.

FIGURA 7 – ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA PARA OS EXTRATOS AQUOSOS DE *Macrocybe titans*



LEGENDA: não foi possível determinar a CFM para os extratos aquosos, admite-se, portanto, que ambos tenham efeito fungistático sobre *C. albicans*.

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 nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas de contato com os extratos fúngicos. 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*.

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 *C. albicans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium marneffe*, *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 aquoso foi observado atividade de inibição contra *C. albicans*, seguido por *T. rubrum*, *M. canis*, *A. niger*, *P. marneffe* e *C. neoformans*.

4.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA POR DISCO-DIFUSÃO

O ensaio de disco-difusão utilizou discos, em triplicata, impregnados com os extratos EfraMat-45 e EfraMat-22 em placas inoculadas com *C. albicans* em duas concentrações distintas (0,03 e 0,06 abs). A dimensão dos halos formados ao redor dos discos foi mensurada para se determinar o efeito inibitório dos extratos sobre a levedura. Foi observado que, nas placas com EfraMat-45, halos menores foram formados, apresentando médias de 11,5 e 9,8 mm (FIGURA 8). O extrato EfraMat-22 demonstrou maior efeito inibitório, pois apresentou halos relativamente maiores, de diâmetros médios 12,9 e 13,2 mm, conforme evidenciado na Tabela 2. Este efeito pode ter sido causado pela maior facilidade de difusão desta fração comparando com EfraMat-45.

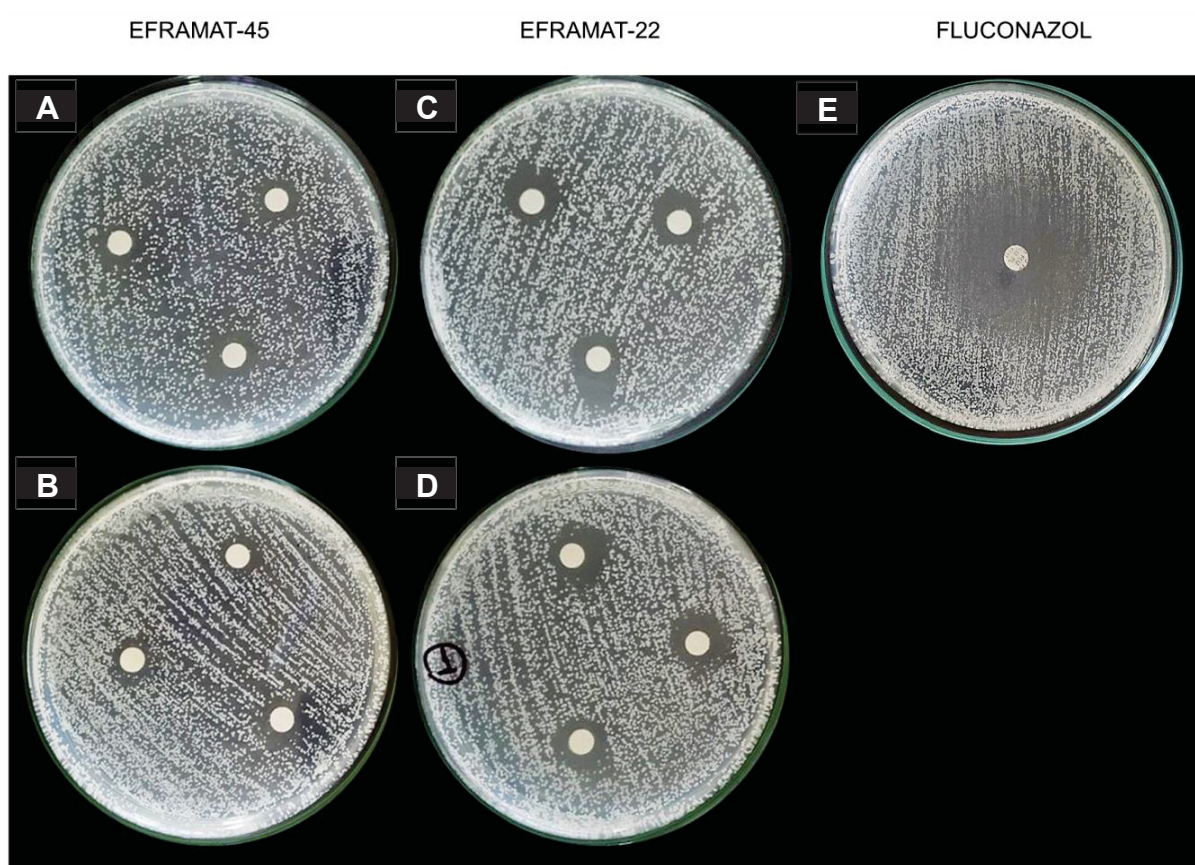
TABELA 2 – DIÂMETRO DOS HALOS OBTIDOS NO ENSAIO DE DISCO-DIFUSÃO PARA *Candida albicans* COM OS EXTRATOS AQUOSOS DE *Macrocybe titans*

Extrato	Placa	Abs	Volume dos discos (µl)	Diâmetro dos halos (média/mm)
EfraMat-45	A	0,03	35	11,5
	B	0,06		9,8
EfraMat-22	C	0,03	35	12,9
	D	0,06		13,2
Fluconazol (25 µg)	E	–	–	25,2

LEGENDA: Abs = absorbância dos inóculos.

Embora a metodologia de disco-difusão seja um procedimento rápido e de fácil execução, não determina a concentração exata capaz de causar a inibição do crescimento do microrganismo.

FIGURA 8 – ENSAIO DE DISCO-DIFUSÃO PARA *Candida albicans* COM OS EXTRATOS AQUOSOS DE *Macrocybe titans* E FLUCONAZOL



LEGENDA: (A e B) placas inoculadas com *C. albicans* e discos impregnados com EfraMat-45 apresentaram halos de diâmetros menores, enquanto (C e D) as placas com discos impregnados com EfraMat-22 apresentaram halos maiores. (E) Fluconazol.

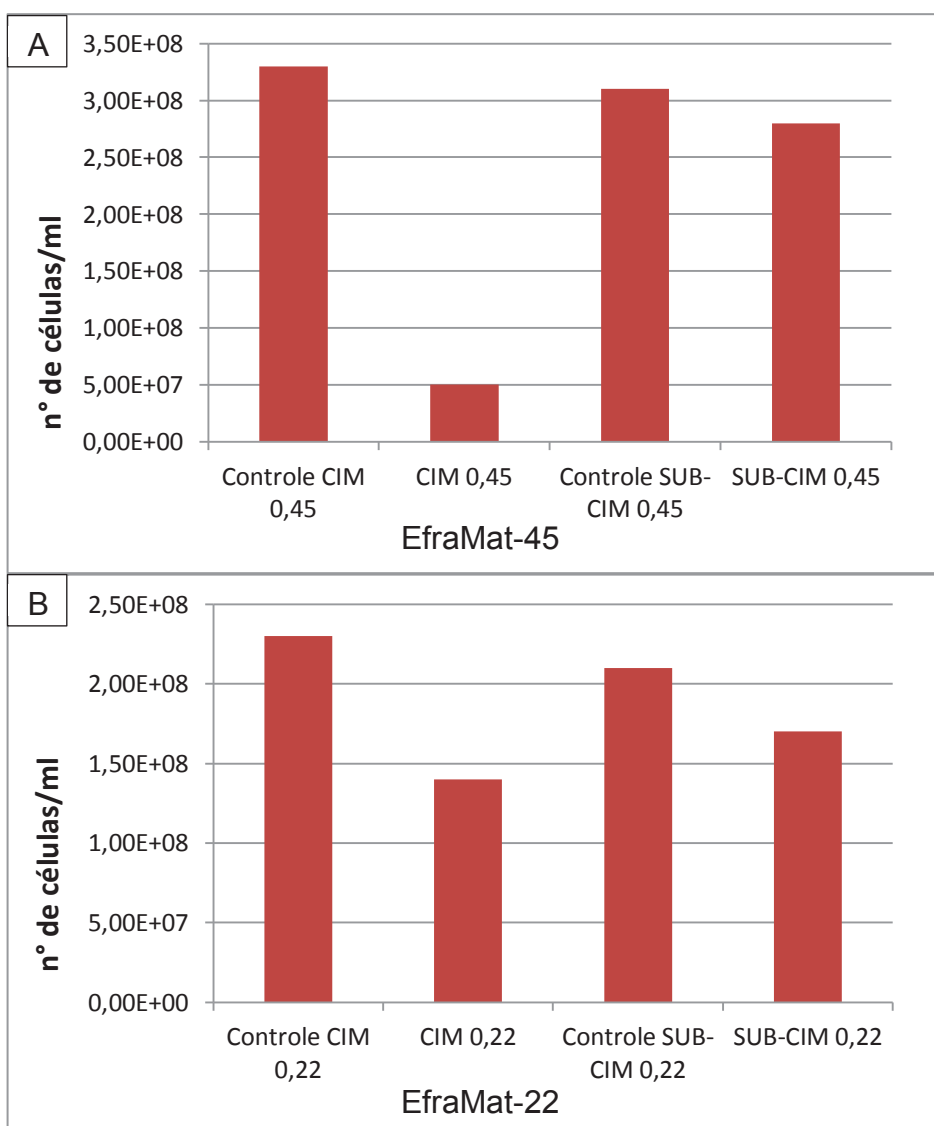
4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS SOBRE O CRESCIMENTO DE *C. albicans*

A fim de verificar se as frações aquosas testadas apresentaram efeito fungistático ou fungicida nas leveduras cultivadas em YPD líquido com as concentrações sub-CIM, CIM e sem o extrato, foram determinados o número de células/ml por contagem em câmara de Neubauer, logo após o tempo de contato com o extrato, e a UFC/ml por contagem de colônias obtidas em meio SDA. Os resultados da determinação do número de células/ml em câmara de Neubauer estão apresentados na Tabela 3 e no Gráfico 1. Foi possível observar redução no número de células de *C. albicans* em todas as concentrações dos extratos EfraMat-45 e EfraMat-22, comparados com os seus respectivos controles, sendo que os extratos na CIM apresentaram maior inibição do que sub-CIM (GRÁFICO 1).

TABELA 3 – VALORES OBTIDOS DO NÚMERO DE CÉLULAS/ML APÓS CONTAGEM DE CÉLULAS DE *Candida albicans* COM OS EXTRATOS AQUOSOS DE *Macrocybe titans* EM CÂMARA DE NEUBAUER

Extrato	Concentração	Nº células/ml
EfraMat-45	Controle CIM	$3,3 \times 10^8$
	CIM	5×10^7
	Controle sub-CIM	$3,1 \times 10^8$
	sub-CIM	$2,8 \times 10^8$
EfraMat-22	Controle CIM	$2,3 \times 10^8$
	CIM	$1,4 \times 10^8$
	Controle sub-CIM	$2,1 \times 10^8$
	sub-CIM	$1,7 \times 10^8$

GRÁFICO 1 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA TABELA 3



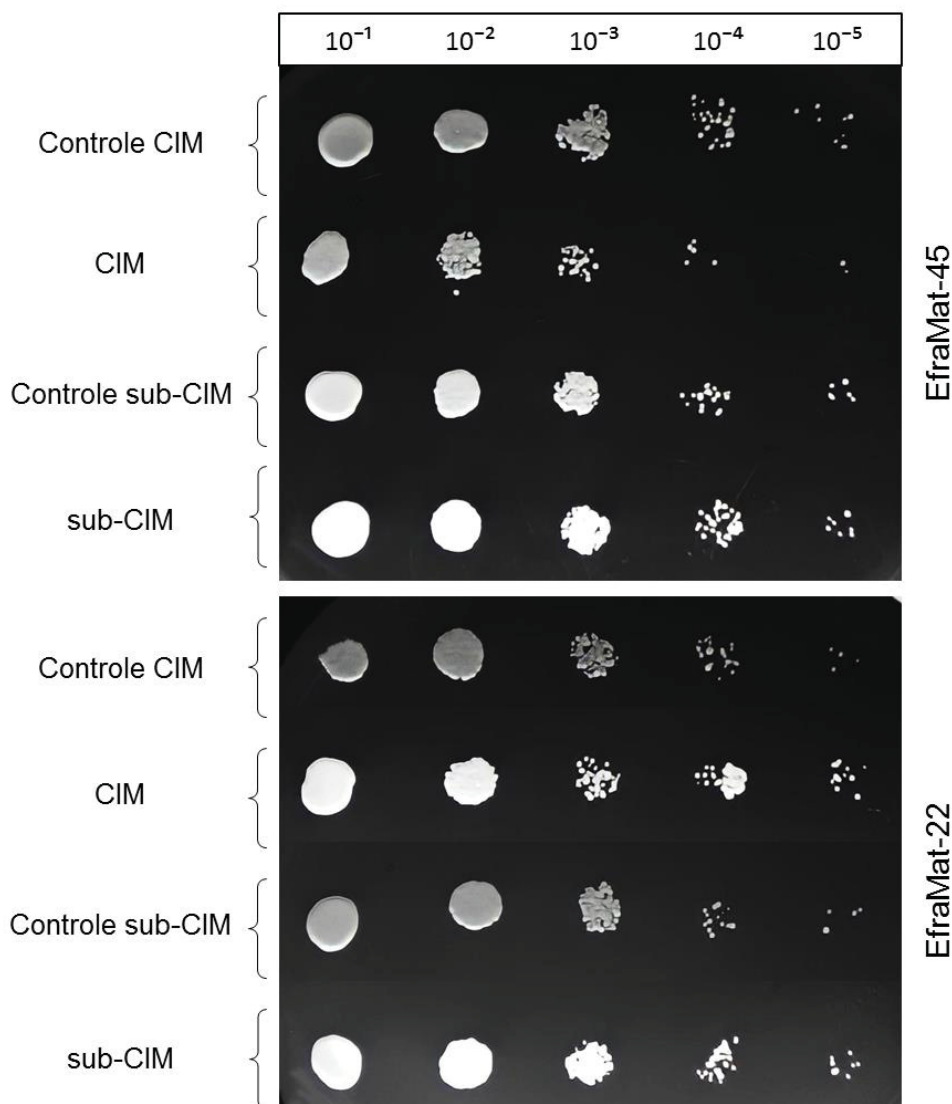
Quando uma alíquota de 5 µl de cada ensaio, diluída serialmente de 10^{-1} a 10^{-5} foi aplicada em placas de SDA e incubadas por 48 horas a 31°C , somente para o ensaio com EfraMat-45 houve diferenças na contagem de colônias viáveis, entre o controle e o ensaio de CIM, mas entre o controle e sub-CIM, os resultados não foram confiáveis. Em relação ao EfraMat-22, não foi possível verificar diferenças entre as concentrações testadas (TABELA 4 e FIGURA 9).

TABELA 4 – VALORES OBTIDOS DE UFC/ML APÓS CONTAGEM DE COLÔNIAS DE *Candida albicans* COM OS EXTRATOS AQUOSOS DE *Macrocybe titans*

Extrato	Concentração	Diluição	
		10^{-4} (UFC/ml)	10^{-5} (UFC/ml)
EfraMat-45	Controle CIM	5×10^7	$1,8 \times 10^8$
	CIM	1×10^7	4×10^7
	Controle sub-CIM	$3,2 \times 10^7$	1×10^8
	sub-CIM	5×10^7	$1,4 \times 10^8$
EfraMat-22	Controle CIM	$3,6 \times 10^7$	8×10^7
	CIM	5×10^7	$2,2 \times 10^8$
	Controle sub-CIM	$2,8 \times 10^7$	8×10^7
	sub-CIM	$4,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$

A redução no número de colônias viáveis quando em contato com EfraMat-45 mostra que o filtro de $0,22 \mu\text{m}$ é capaz de reter algum ou mais compostos responsáveis pela atividade biológica presentes nos extratos. Podemos inferir que a determinação de UFC/ml por contagem de colônias em meio sólido pode não ser um método adequado de quantificação.

FIGURA 9 – ANÁLISE DO CRESCIMENTO DE *Candida albicans* EM MEIO SDA APÓS TRATAMENTO DA LEVEDURA COM OS EXTRATOS AQUOSOS FILTRADOS DE *Macrocybe titans*



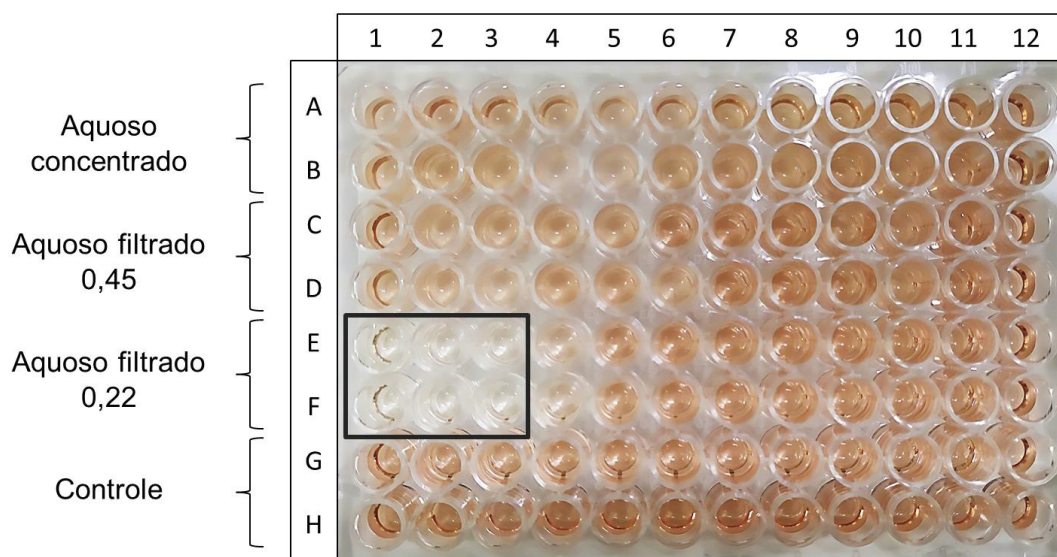
LEGENDA: placas inoculadas com alíquotas em diluição seriada (10^{-1} a 10^{-5}) dos ensaios contendo *C. albicans* cultivada com os extratos aquosos filtrados de *M. titans* nas concentrações de CIM e sub-CIM. Apenas para o ensaio com EfraMat-45 houve diferenças visíveis na contagem de colônias viáveis, entre o controle e o ensaio de CIM.

4.6 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS

Ao final do ensaio foi possível determinar a maior concentração do extrato na qual 50% das células são viáveis, em comparação com o controle. A reação ao MTS baseia-se no princípio de que as enzimas desidrogenase dependentes de NAD(P)H em células metabolicamente ativas causam a redução do composto de MTS ao produto solúvel colorido formazan. Como foi possível observar, houve um

aumento significativo na intensidade da cor conforme diminui a concentração dos extratos, correspondendo à maior atividade metabólica celular (FIGURA 10).

FIGURA 10 – MICROPLACA DO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CONTENDO OS EXTRATOS AQUOSOS DE *Macrocybe titans*

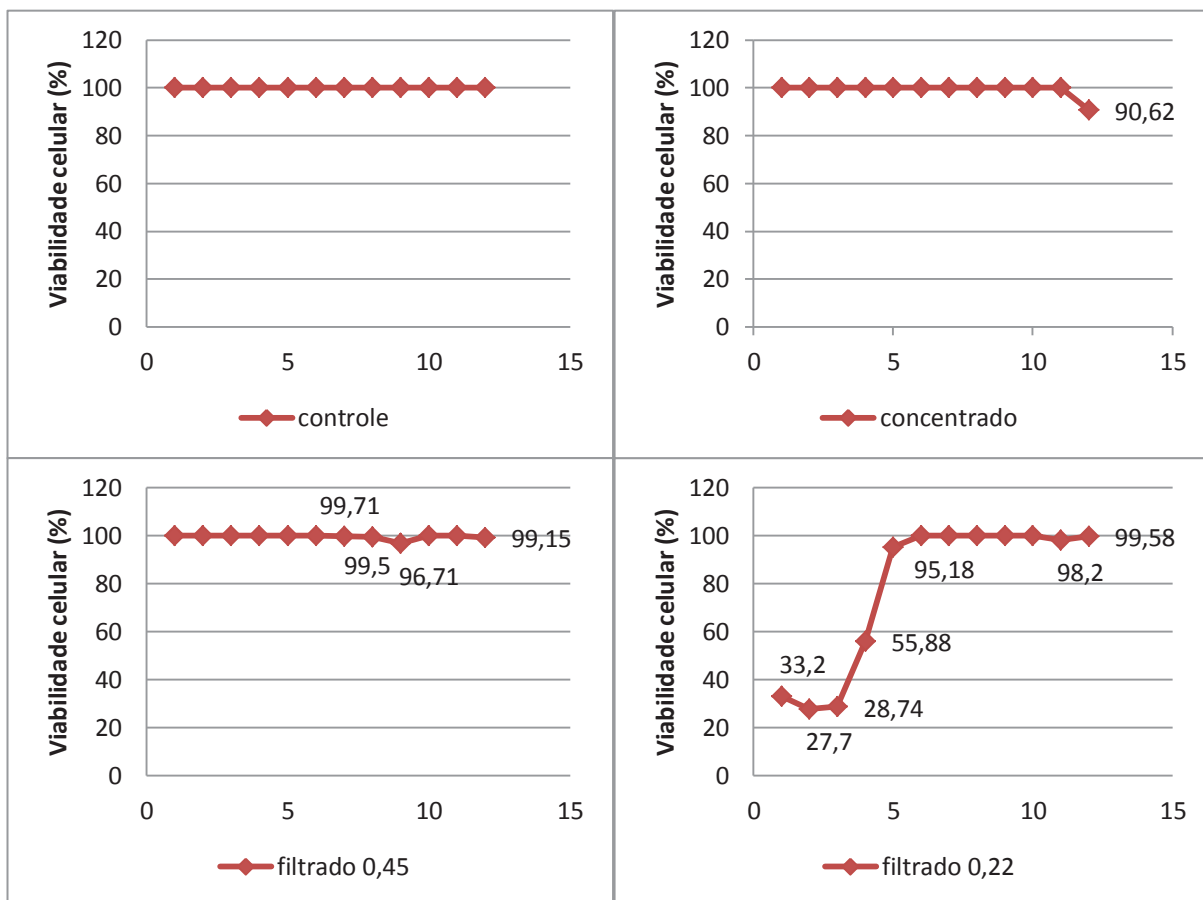


LEGENDA: os poços de 1 a 3 ($125 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ a $31,25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) do extrato EfraMat-22 (aquoso filtrado 0,22) apresentaram reação fraca ao MTS, indicando baixa atividade metabólica.

Através de análise visual, foi observado que o extrato EfraMat-22 apresentou reação ao MTS muito fraca nos poços 1 a 3, de concentrações $125 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ a $31,25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, indicando baixa atividade metabólica e possível morte ou efeito citostático. Os demais extratos obtiveram intensidade de coloração similar ao controle.

A análise da densidade óptica por leitura da absorbância determinou que o extrato EfraMat-22 apresentou taxas de viabilidade celular significativamente reduzidas nos poços 1 a 3, de 33,2%, 27,7% e 28,74%, respectivamente, sendo estes valores considerados citotóxicos. O poço 4, de concentração $15,62 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, apresentou viabilidade de 55,88% e, embora seja um valor reduzido se comparado aos demais extratos, está acima da taxa mínima aceitável, indicando atividade metabólica. O controle demonstrou viabilidade de 100% em todos os poços, como esperado (GRÁFICO 2).

GRÁFICO 2 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS HaCaT APÓS CONTATO COM OS EXTRATOS AQUOSOS DE *Macrocybe titans*



Através dos testes de citotoxicidade *in vitro* é possível prever a toxicidade humana de alguns compostos químicos (SCHEERS *et al.*, 2001). Os compostos citotóxicos frequentemente comprometem a membrana celular e sua integridade.

A maioria dos trabalhos que buscam verificar o efeito citotóxico de extratos de cogumelos visa mostrar o efeito desses extratos em inibir o crescimento de células tumorais. Nosso objetivo nesse trabalho foi verificar se os extratos EfraMat-45 e EfraMat-22 de *M. titans* possuíam algum efeito citotóxico em queratinócitos humanos não tumorais, mantendo sua atividade antifúngica, mas preservando a integridade de células humanas. Embora as células HaCaT tenham sido amplamente utilizadas para estudos dermatológicos, essa linhagem celular representa um modelo adequado para avaliar o risco citotóxico de substâncias químicas. Banlangsawan *et al.* (2015) mostraram que extratos irradiados e não irradiados de *Pleurotus ostreatus* são capazes de inibir a proliferação de células de

melanoma, mas não provoca inibição significativa em células HaCaT. Em um estudo realizado por Taofiq *et al.* (2019), foi comprovado que extratos ricos em compostos fenólicos e triterpenóides obtidos de *P. ostreatus* e *Ganoderma lucidum*, usando um sistema de extração Soxhlet, apresentaram ausência de toxicidade em queratinócitos e fibroblastos. Younis *et al.* (2019) obtiveram extratos de várias partes de três cogumelos comestíveis incluindo *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* e *P. ostreatus* utilizando diferentes solventes polares e apolares, e verificaram a eficácia desses extratos na inibição da proliferação de três linhagens de células de carcinoma através da metodologia do MTT, e assim observaram que os extratos de corpos de frutificação frescos e liofilizados apresentaram maior efeito de inibição do que extratos de micélios quando extraídos com água e metanol. A maior atividade citotóxica foi verificada quando se utilizou o extrato aquoso de corpos de frutificação liofilizados de *L. edodes* e *P. ostreatus*. O menor efeito foi observado com extrato de micélios com éter, de *L. edodes*.

Deste modo, é possível concluir que apenas EfraMat-22 apresentou citotoxicidade nas concentrações de 125 a 31,25 µg/µl, referentes aos poços 1 a 3, sendo seguro utilizar o mesmo em concentrações menores.

4.7 ANÁLISE MICOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os extratos filtrados 0,45 e 0,22 foram submetidos à análise quantitativa de diferentes compostos micoquímicos, dos quais foram determinados os teores de compostos fenólicos totais e flavonoides e a atividade antioxidante pelos métodos do sequestro do radical DPPH e pelo poder de redução do ferro (FRAP).

Os resultados obtidos após determinação do perfil fenólico demonstraram que o EfraMat-45 foi significativamente superior ao EfraMat-22, apresentando maior teor de compostos fenólicos totais (1,5 mg de equivalente de ácido gálico/g de extrato) (TABELA 5).

Quando analisado o teor de flavonoides, os resultados do ensaio demonstraram que os valores para ambos os extratos aquosos foram estatisticamente similares (TABELA 6).

TABELA 5 – RESULTADOS DO ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NOS EXTRATOS FILTRADOS DE *Macrocybe titans*

Extrato	Concentração (µg/µl)	Teor total (mg de AG/g de extrato)			Média (mg AG/ g extrato)
EfraMat-45	250	1,460425532	1,588085106	1,485957447	1,511489362
EfraMat-22	250	1,17106383	1,281702128	1,077446809	1,176737589

LEGENDA: os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (padrão de calibração da curva) por g de extrato. (AG = ácido gálico).

TABELA 6 – RESULTADOS DO ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES NOS EXTRATOS FILTRADOS DE *Macrocybe titans*

Extrato	Concentração (µg/µl)	Teor total (mg de Q/g de extrato)			Média (mg Q/ g extrato)
EfraMat-45	250	0,108258462	0,110350769	0,107643077	0,1087
EfraMat-22	250	0,107273846	0,108504615	0,10912	0,1082

LEGENDA: os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalente de quercetina (padrão de calibração da curva) por g de extrato. (Q = quercetina).

Acharya *et al.* (2015) realizaram análise qualitativa de compostos químicos a partir do extrato metanólico de *M. crassa* e determinaram o teor de fenólicos em 3,31 mg de equivalente de ácido gálico/g de extrato. Compostos fenólicos são antioxidantes naturais, assim como enzimas e vitaminas. São bioativos encontrados principalmente em vegetais, sendo os antioxidantes mais abundantes na natureza. Atuam como sequestradores de radicais livres, doando ou transferindo hidrogênios e reduzindo os danos do estresse oxidativo associado ao agravamento de patologias crônicas, a exemplo de doenças cardiovasculares, processos neurodegenerativos e cânceres. Dentre os compostos fenólicos, encontram-se subclasses, das quais aproximadamente um terço desses compostos encontrados em vegetais são ácidos fenólicos e dois terços pertencem à classe dos flavonoides, substâncias com capacidade de quelação de metais (BOROSKI *et al.*, 2015). É importante ressaltar ainda que cogumelos apresentam teores relevantes de compostos fenólicos em suas matrizes. Reis *et al.* (2012) determinaram os teores de compostos fenólicos em

extratos metanólicos a partir de basidiomas frescos de alguns cogumelos como 23,34 mg AG/g extrato para *A. bisporus* (variedade branca), 12,54 mg AG/g extrato para *P. ostreatus*, 7,14 mg AG/g extrato para *P. eryngii* e 8,84 mg AG/g extrato para *L. edodes*.

No mesmo estudo de Acharya *et al.* (2015), o teor de flavonoides no extrato metanólico de *M. crassa* foi mensurado em 3,53 mg de equivalente de quercetina/g de extrato. Extrações com solventes orgânicos tendem a recuperar maiores valores de compostos fenólicos, uma vez que o tipo de solvente e a polaridade podem alterar a transferência de elétrons e hidrogênios, das quais misturas aquosas com acetona, etanol ou metanol apresentam maior eficiência de extração (YILMAZ e TOLEDO, 2006; ROCKENBACH *et al.*, 2008).

Ao se determinar a atividade antioxidante dos extratos filtrados pelo método do DPPH, foi observado que EfraMat-22 apresentou atividade relativamente maior, mensurada em 4,77 μmol Trolox/g extrato (TABELA 7).

TABELA 7 – RESULTADOS DO ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO SEQUESTRO DO RADICAL DPPH NOS EXTRATOS FILTRADOS DE *Macrocybe titans*

Extrato	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Atividade AOH (μmol de T/g de extrato)			Média (μmol T/g extrato)
EfraMat-45	250	1,28267	1,562666667	3,909333333	2,25
EfraMat-22	250	3,602667	5,562666667	5,162666667	4,77

LEGENDA: os resultados obtidos foram expressos em μmol de equivalente do antioxidante Trolox (padrão de calibração da curva) por g de extrato. (AOH = antioxidante; T = Trolox).

Os resultados do ensaio são, no entanto, considerados estatisticamente similares. O método baseado na eliminação do radical DPPH é comumente aplicado em estudos de avaliação antioxidante de substâncias puras a matrizes complexas, e seu princípio se baseia em dois mecanismos: de transferência de um elétron ou de um átomo de hidrogênio para o radical orgânico livre estável DPPH. O método deve, no entanto, ser complementado por outros ensaios para se caracterizar um composto como antioxidante. Assim, o segundo ensaio realizado foi o determinante do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), o qual apresentou resultados de 11,455 μmol Trolox/g extrato aquoso filtrado 0,22 (EfraMat-22) (TABELA 8).

TABELA 8 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO PODER DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP) NOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Macrocybe titans*

Extrato	Concentração (µg/µl)	Atividade AOH (µmol de T/g de extrato)			Média (µmol T/ g extrato)
EfraMat-45	250	8,607272727	8,570909091	8,243636364	8,473
EfraMat-22	250	10,35272727	12,13454545	11,88	11,455

LEGENDA: os resultados obtidos foram expressos em µmol de equivalente do antioxidante Trolox (padrão de calibração da curva) por g de extrato. (AOH = antioxidante; T = Trolox).

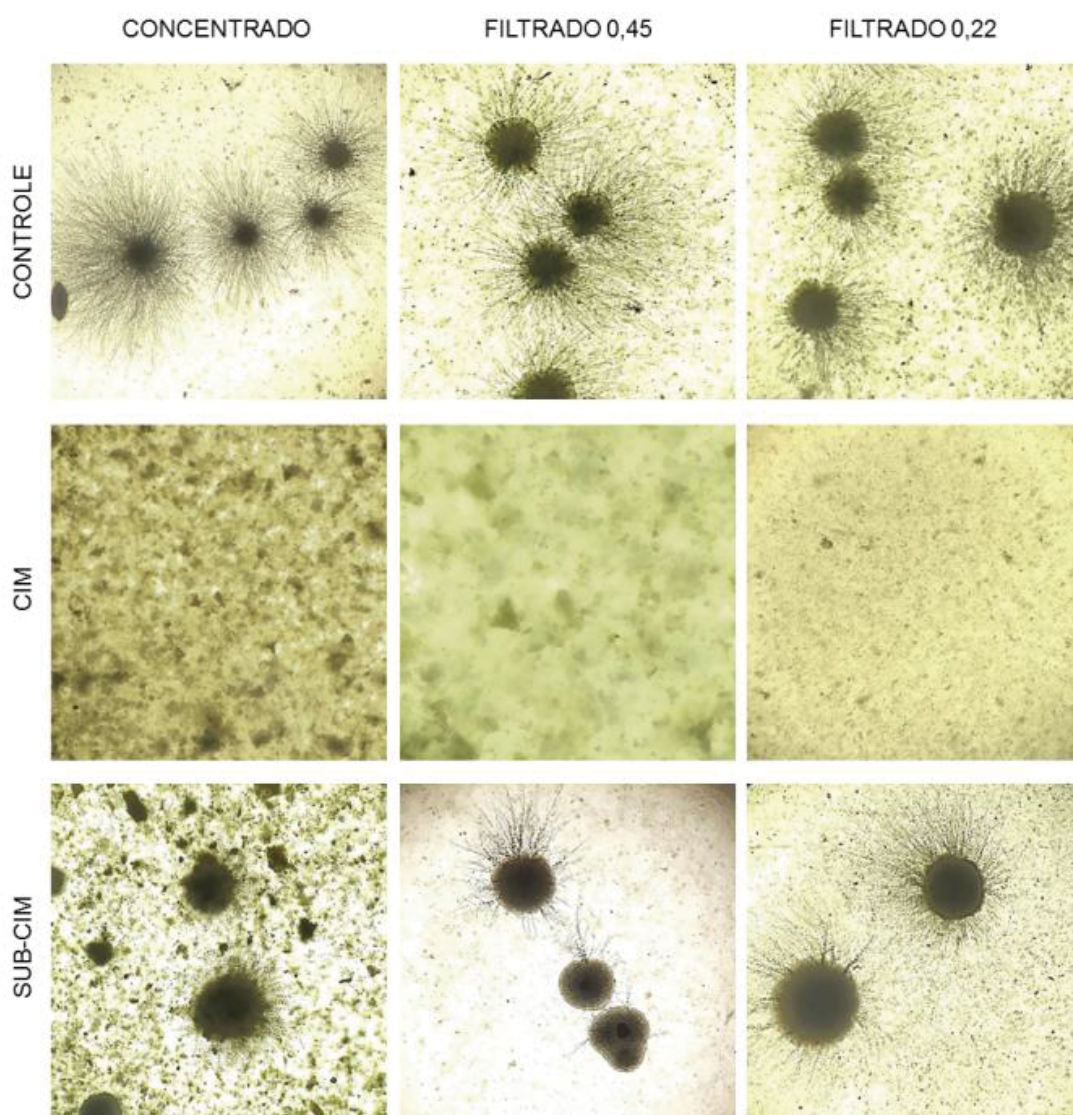
Ainda no estudo de Acharya *et al.* (2015), a atividade antioxidante de *M. crassa* foi estabelecida como 2,455 mg/ml, sendo este o valor de Concentração Efetiva 50% (EC50), a concentração mínima de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH. Reis *et al.* (2012) mensuraram a atividade antioxidante do DPPH para *A. bisporus* como 3,13 mg/ml, 6,54 mg/ml para *P. ostreatus*, 8,67 mg/ml para *P. eryngii* e 6,43 mg/ml para *L. edodes*.

Por fim, pode-se observar que os extratos filtrados de *M. titans* apresentaram teores de compostos fenólicos significativamente altos, o que infere seu amplo potencial antioxidante.

4.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS SOBRE A MICROMORFOLOGIA DE *C. albicans*

Os resultados das análises independentes das lâminas de microcultivo de *C. albicans*, cultivada ou não na presença dos extratos aquosos (concentrado, EfraMat-45 e EfraMat-22) na CIM e sub-CIM, foram reprodutíveis. Ocorreu completa inibição do crescimento da levedura nas lâminas referentes à concentração de CIM em ambos os extratos, comparando com o controle, e diminuição no número de colônias nas lâminas de sub-CIM por análise visual (FIGURA 11).

FIGURA 11 – EFEITO NA MICROMORFOLOGIA DE *Candida albicans* CULTIVADA COM E SEM OS EXTRATOS AQUOSOS DE *Macrocybe titans* APÓS ENSAIO DE MICROCULTIVO

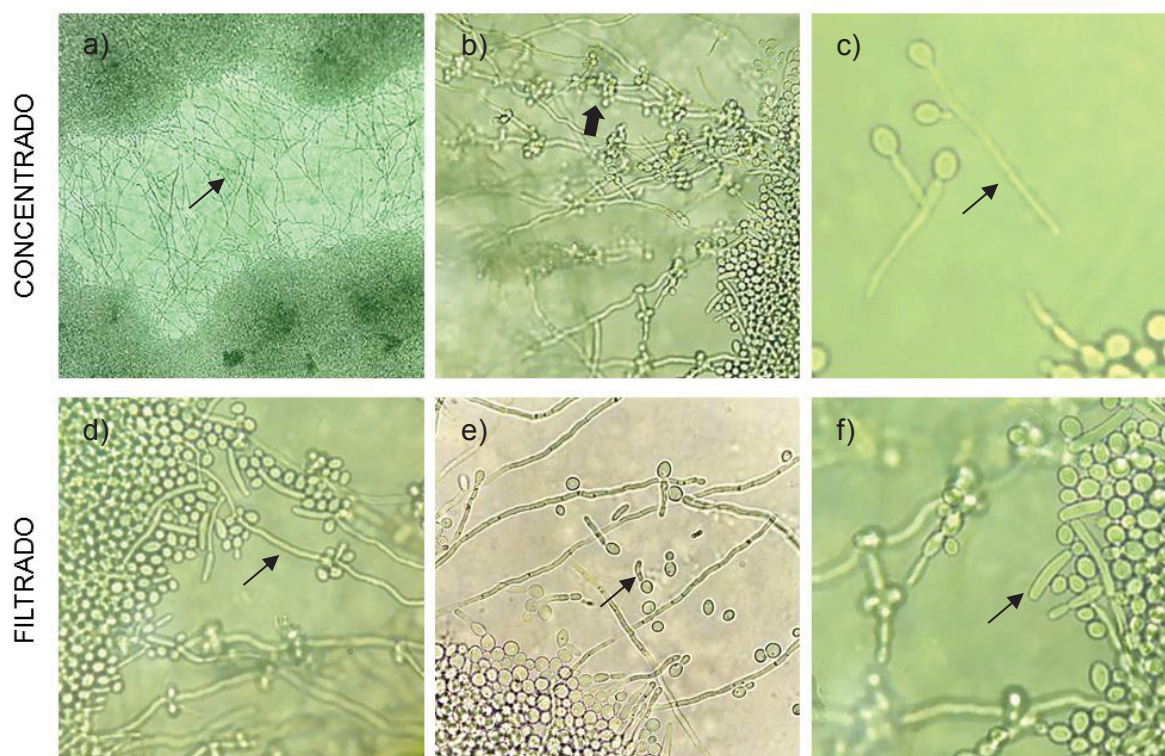


LEGENDA: imagens das lâminas de microcultivo de *C. albicans* apresentando diminuição no número de colônias quando as leveduras foram cultivadas na sub-CIM do extrato de *M. titans* comparando com o controle (sem extrato) e inibição total do crescimento quando cultivadas com o extrato na concentração referente à CIM. Aumento de 100x em microscópio óptico.

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 clamidósporos quando em meios de cultura mínimos, a exemplo do meio ágar-fubá (SUDBERY *et al.*, 2004).

Estas alterações foram observadas nas lâminas de sub-CIM, ocorrendo inibição do número de clamidósporos e presença de células alongadas, quando comparadas com as leveduras controle, após 3 dias de incubação (FIGURA 12).

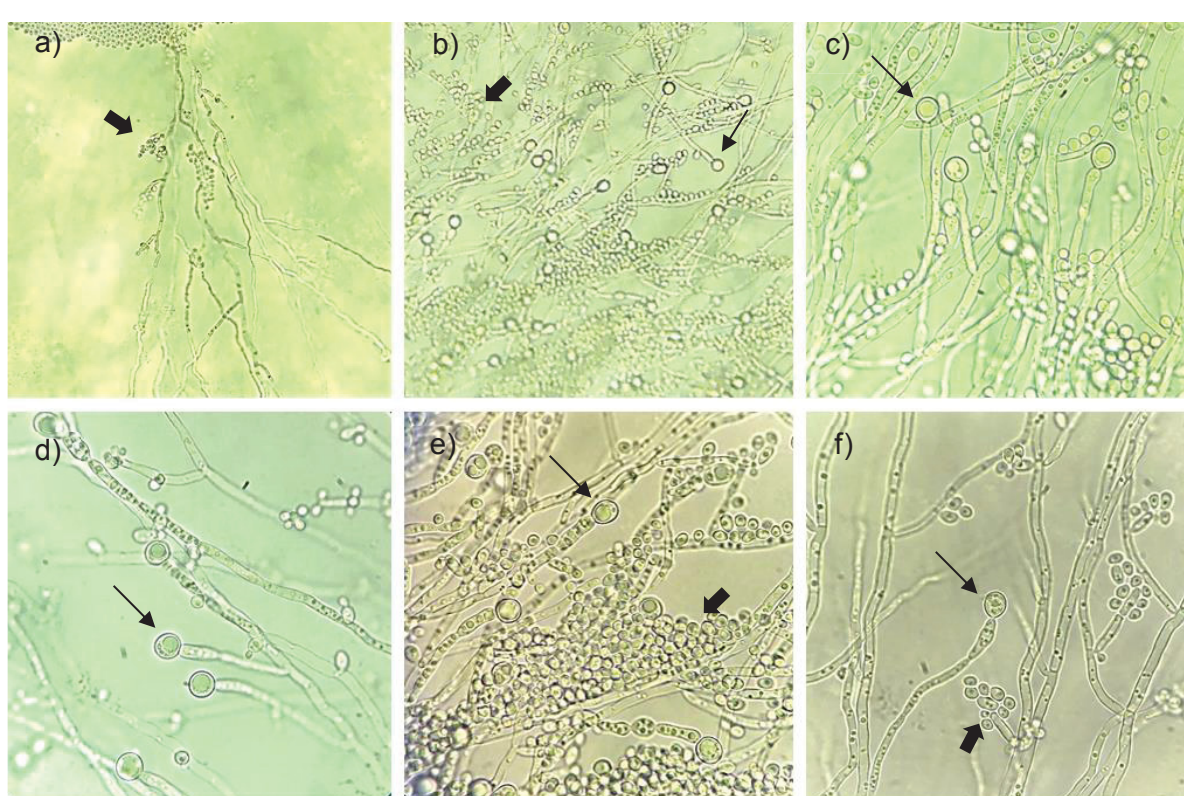
FIGURA 12 – MICROMORFOLOGIA DE *Candida albicans* OBSERVADA NAS LÂMINAS SUB-CIM DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Macrocybe titans*



LEGENDA: imagens das lâminas de *C. albicans* apresentando prevalência de filamentação das hifas, abundância de blastoconídios (seta grossa) e células alongadas (setas finas) após cultivo com extratos aquosos de *M. titans*. Aumentos de (a) 100, (b) 400 e (c-f) 1000x em microscópio óptico.

Essas células filamentosas se assemelham às hifas formadas quando *C. albicans* é mantida a 37°C em soro (tubo germinativo), porém as células nas lâminas de sub-CIM apresentam septos formados e/ou encontram-se no início do processo de formação de pseudo-hifas. Supõe-se que esta etapa da morfogênese tenha sido interrompida pela ação do extrato, estagnando as células na fase de crescimento exponencial. Nas lâminas controle foi observado maior prevalência de pseudo-hifas, ocorrendo também abundância de clamidósporos para os filtrados (FIGURA 13).

FIGURA 13 – MICROMORFOLOGIA DE *Candida albicans* OBSERVADA NAS LÂMINAS DO ENSAIO CONTROLE DO MICROCULTIVO



LEGENDA: imagens das lâminas de *C. albicans* apresentando filamentação das hifas e abundância de blastoconídios (setas grossas) e clamidósporos (setas finas) após cultivo sem o extrato de *M. titans*. Aumentos de (a-b) 400 e (c-f) 1000x em microscópio óptico.

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 clamidósporos em *C. albicans*, neste trabalho, quando as leveduras foram semeadas em ágar-fubá e incubadas a 31°C com o extrato de *M. titans*, a presença de clamidósporos foi extremamente rara. 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 clamidósporos na infecção causada por *C. albicans* não é claro. Estas estruturas são definidas como esporos assexuais de paredes finas, derivados de hifas, e apresentam alguma contribuição na virulência de *Candida*, pois são características das duas espécies mais patogênicas desse gênero: *C. albicans* e *C. dubliniensis* (AL-HEDAITHY e FOTEDAR, 2002; AL MOSAID *et al.*, 2003).

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 clamidósporos de *C. albicans*, além de promover diminuição no crescimento da levedura. Xu *et al.* (2013), também comprovaram quem 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.

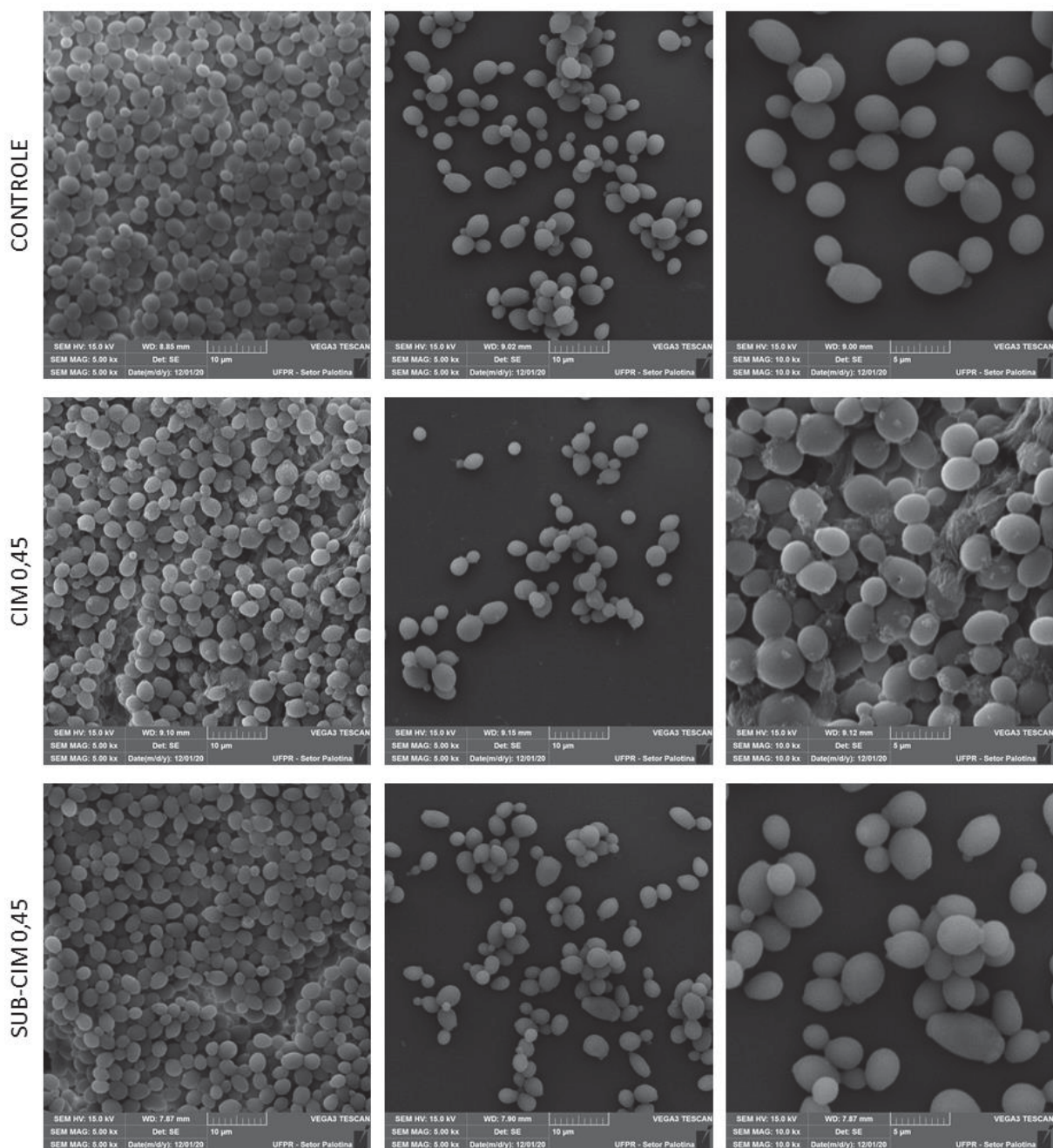
Considerando que cogumelos basidiomicetes apresentam altas concentrações de β -D-glucanas, a presença do extrato de *M. titans* nos cultivos de *C. albicans* poderia induzir a um aumento da produção da glucanase, e consequentemente a um aumento da filamentação, o que não ocorre quando o microrganismo é submetido à concentração do extrato determinada pela CIM, mas sim quando ele é submetido à concentração de sub-CIM.

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 moleculares adicionais serão realizados para entender melhor o papel da filamentação em *C. albicans* sob influência do extrato de *M. titans*.

4.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE *C. albicans* APÓS INCUBAÇÃO COM EFRAMAT-45

Células de *C. albicans* foram incubadas por 24 horas com a CIM e sub-CIM de EfraMat-45. Em seguida, as células foram fixadas e observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (FIGURA 14). As leveduras do ensaio controle e as tratadas com a sub-CIM foram caracterizadas por células arredondadas de forma regular, com parede celular lisa, homogênea e íntegra, de acordo com o esperado para células planctônicas.

FIGURA 14 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE *Candida albicans* APÓS TRATAMENTO COM EFRAMAT-45 DE *Macrocybe titans*



LEGENDA: as imagens em cada fileira possuem aumentos de 5.000, 5.000 e 10.000x (esquerda para a direita). O controle apresenta células planctônicas de *C. albicans*. Nas células tratadas com EfraMat-45 na concentração de CIM (31,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) é possível observar alterações morfológicas e danos na superfície da estrutura celular.

Por outro lado, as células tratadas com a CIM de EfraMat-45 apresentaram alterações morfológicas. Foram observados danos na superfície da célula, como a presença de orifícios na parede celular, formato irregular, além de extravasamento de material intracelular. Foi possível ainda notar a presença de células em processo de desintegração e frações de células já desintegradas.

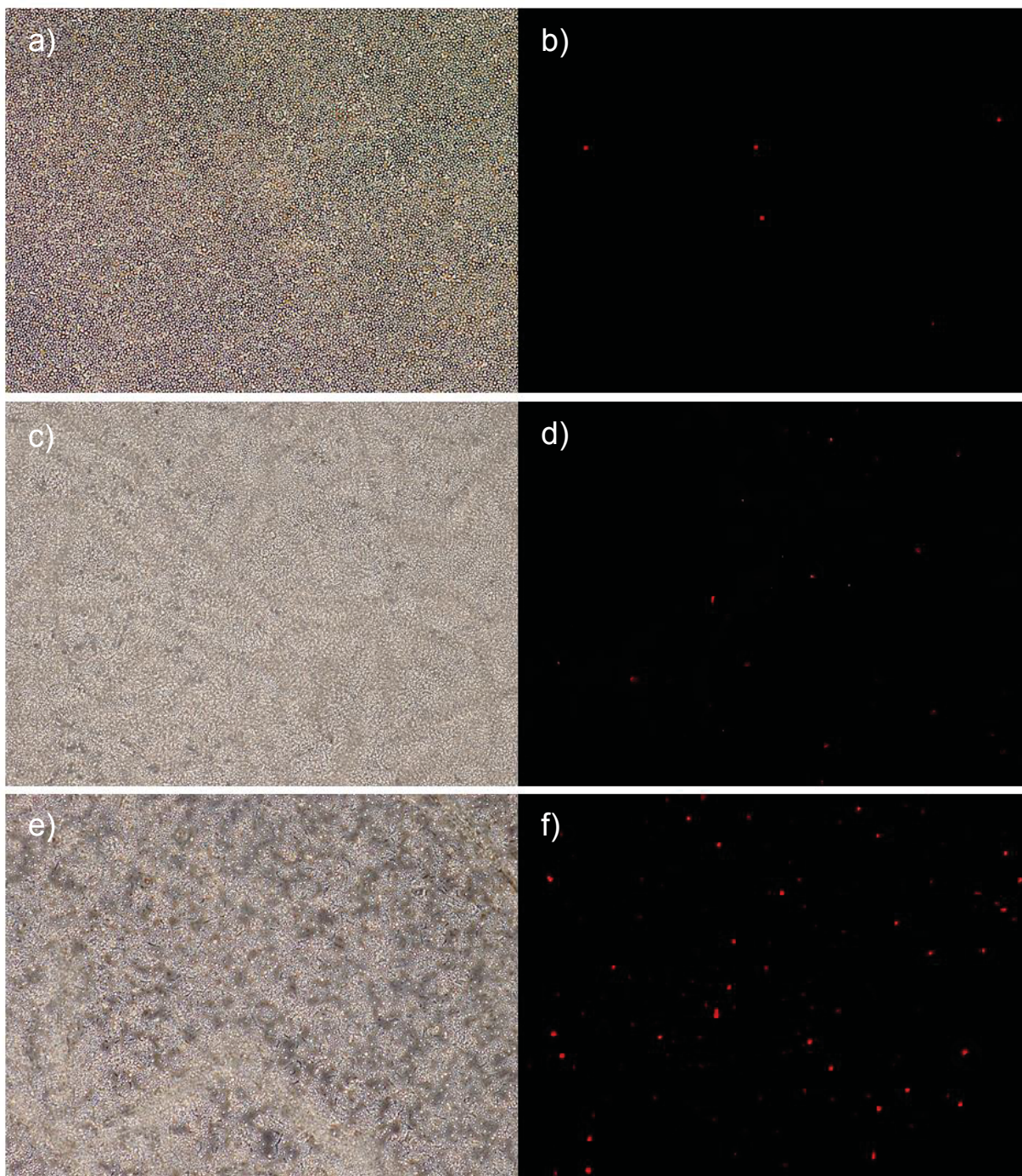
Embora existam trabalhos sobre o efeito antimicrobiano de extratos de cogumelos (revisão em SHENG *et al.*, 2017) e relatos sobre alterações morfológicas de bactérias em contato com extrato de cogumelos (MATIJAŠEVIĆ *et al.*, 2016), são escassos os relatos sobre as alterações na morfologia de microrganismos, principalmente *C. albicans*, sob ação desses extratos.

Os principais trabalhos encontrados foram de Younis *et al.* (2019), que observaram alterações morfológicas em *C. albicans* tratadas com extratos de *Laetiporus sulphureus* e de Yoo e Choi (2014), que avaliaram a ação de uma quitinase isolada do cogumelo *Coprinellus congregatus* sobre a morfologia de *C. albicans*.

Em seguida, a viabilidade de *C. albicans* tratada com o EfraMat-45 e controle foi avaliada por meio de Microscopia de Fluorescência pela coloração das células com iodeto de propídio. Esse corante é capaz de se ligar a ácidos nucleicos ao penetrar nas células através de acessos na membrana, evidenciando assim lesões na parede celular e, em maior probabilidade, morte celular, sendo útil para se determinar os efeitos de compostos que possam causar danos nas células.

A fluorescência do iodeto de propídio em células de *C. albicans* após exposição ao EfraMat-45 na CIM e sub-CIM, assim como o controle, é mostrada na Figura 15. A fluorescência de iodeto de propídio aumentou conforme a concentração do extrato, indicando que houve uma maior inviabilidade das células, quando tratadas com o EfraMat-45, em comparação com o controle, apresentando morte e degeneração celular.

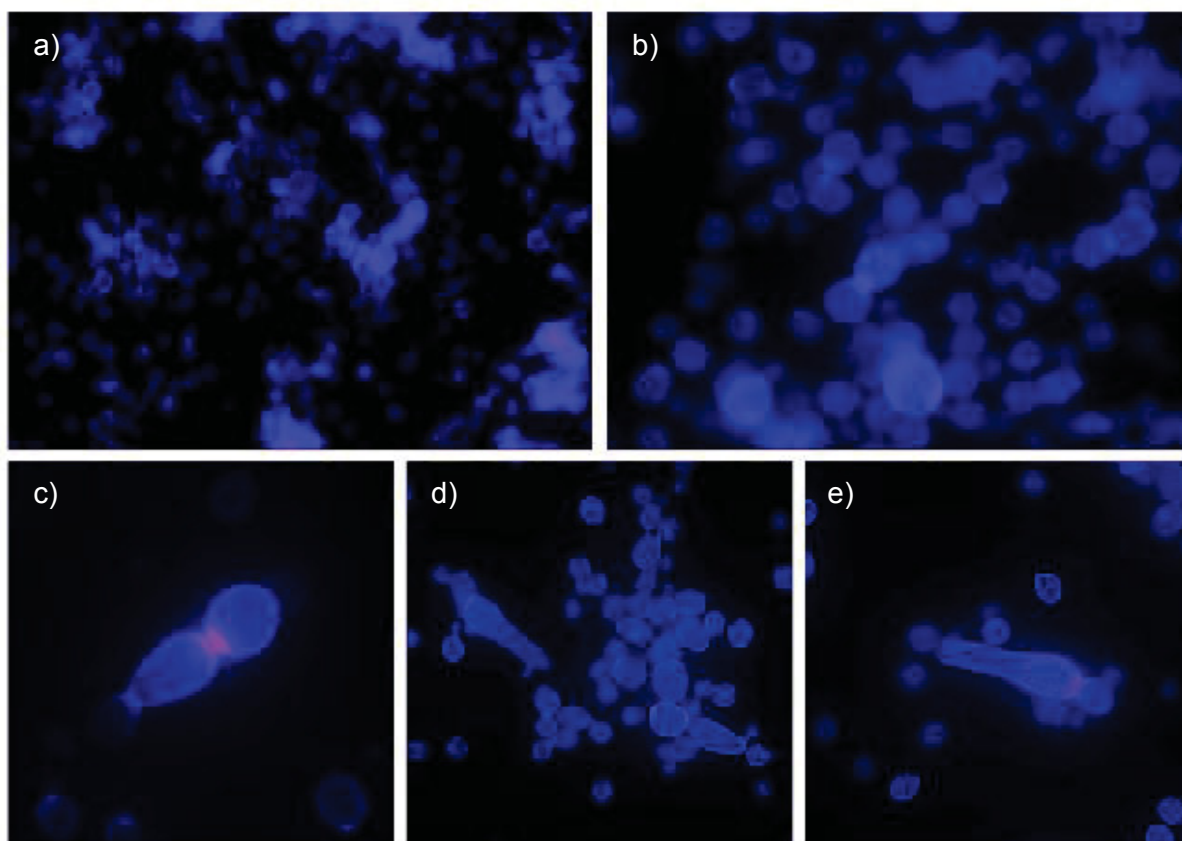
FIGURA 15 – ANÁLISE MICROSCÓPICA DE FLUORESCÊNCIA DOS ENSAIOS DE CAPTAÇÃO DE IODETO DE PROPÍDIO



LEGENDA: as micrografias retratam os mesmos campos na magnificação de 4x por contraste de fase (coluna esquerda) e fluorescência vermelha (coluna direita). (a) amostra controle apresentando células planctônicas vivas de *C. albicans* e (b) células com captação de iodeto de propídio. (c) *C. albicans* tratada com concentração sub-CIM do EfraMat-45 (15,6 µg/µl) e (d) células coradas com iodeto de propídio. (e) células tratadas com concentração CIM do EfraMat-45 (31,2 µg/µl) e (f) células apresentando maior inviabilidade celular. Aumento de 4x em microscópio de fluorescência.

Por fim, a morfologia celular de *C. albicans* tratada com EfraMat-45 foi analisada por Microscopia de Fluorescência após coloração com Calcofluor White. Este corante apresenta fluorescência de cor azul intensa quando excitado em luz ultravioleta e se liga predominantemente à camada de quitina nas paredes celulares dos fungos, principalmente nos locais de divisão de leveduras em brotamento. Células do ensaio controle de *C. albicans* coradas com o fluorocromo Calcofluor White em estado planctônico, isto é, cultivadas em meio líquido, apresentaram formato regular e ocorreram mais isoladamente. Em células incubadas com o EfraMat-45 na sub-CIM, ocorreu maior tendência de agregação de várias ou mais células. Após a aplicação do EfraMat-45 na CIM, os agregados celulares foram maiores e o número de células de formato irregular aumentou, sendo observadas também algumas células com formato alongado, do tipo pseudo-hifas (FIGURA 16).

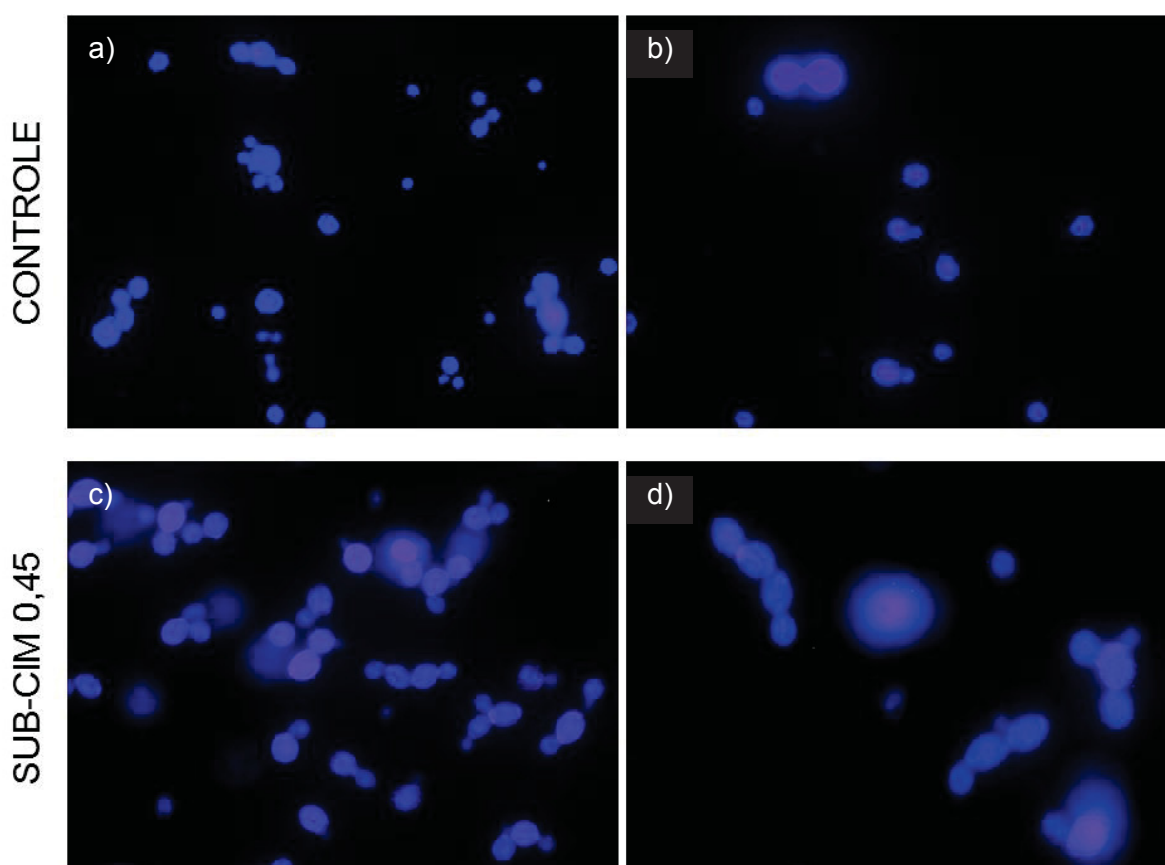
FIGURA 16 – MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DOS ENSAIOS DE *Candida albicans* COM CALCOFLUOR WHITE APÓS TRATAMENTO COM EFRAMAT-45 DE *Macrocybe titans*



LEGENDA: as imagens na primeira fileira apresentam células planctônicas de *C. albicans* após captação do corante Calcofluor White. As imagens detalhadas em c-e) apresentam células dimórficas com brotamento e formações de pseudo-hifas quando tratadas com o EfraMat-45 na concentração CIM (31,2 µg/µl). Aumentos de (a, c-e) 10x e (b) 40x em microscópio de fluorescência.

Os espessamentos da parede celular observados com frequência nos aglomerados das leveduras tratadas com a CIM do extrato foram caracterizados por fluorescência intensa ou mais rosada, representando deposição de quitina nos pontos de ramificação. Em hifas de *C. albicans*, encontra-se aproximadamente de 3 a 5 vezes maior quantidade de quitina, enquanto que em células leveduriformes o composto é encontrado nas cicatrizes. (GOW *et al.*, 2012). Já nas leveduras controle, foi observado material uniformemente corado (azul mais intenso e sem deposição de quitina) (FIGURA 17). A formação dessas estruturas do tipo pseudo-hifas e de células mais alongadas foi melhor visualizada quando as leveduras foram cultivadas em ágar-fubá, na presença de Tween 80 a 1%, por microcultivo.

FIGURA 17 – MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DOS ENSAIOS DE *Candida albicans* COM CALCOFLUOR WHITE, COM E SEM O EXTRATO DE *Macrocybe titans*



LEGENDA: as imagens para ambos os tratamentos apresentam células planctônicas de *C. albicans* e células em brotamento, é possível observar a ausência de estruturas morfológicas variadas. Aumentos de (a-c) 10x e (d) 40x em microscópio de fluorescência.

A presença de células do tipo pseudo-hifas nas leveduras tratadas com a CIM do EfraMat-45 poderia ter ocorrido devido ao crescimento das leveduras ter estacionado na fase exponencial, em que normalmente elas estão em processo de formação de hifas verdadeiras. Esse efeito foi reportado por Gil-Bona *et al.* (2016), estudando um mutante de *C. albicans* apresentando defeitos durante a fase de transição levedura para hifa.

Já no ensaio controle, as leveduras já se encontrariam na fase estacionária, caracterizada pela presença de células mais regulares, leveduriformes e com pouca ou nenhuma deposição de quitina. Efeitos similares na morfologia também foram observados por Fiolka *et al.* (2019), em células de *C. albicans* em contato com o fluido celômico da minhoca *Dendrobaena veneta*. As pseudo-hifas são consideradas uma morfologia intermediária entre levedura e hifas verdadeiras. Sabe-se que algumas condições como extremos de pH e temperatura também podem contribuir para uma maior transição ao estado de hifas. Para poder confirmar se o EfraMat-45 contribui para uma maior formação de pseudo-hifas ou se essas formas são mais frequentes na CIM do extrato, devido estarem na fase logarítmica de crescimento, será necessária uma análise mais detalhada através do acompanhamento em escalas de tempo, da morfologia da levedura.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que extratos a partir do cogumelo *M. titans* apresentam ação antifúngica contra *C. albicans*, observado através do ensaio de microdiluição em caldo, disco-difusão, contagem de células viáveis através de Microscopia óptica e de Fluorescência, MEV e contagem de colônias em meio sólido. Algumas frações foram obtidas e testadas, sendo a fração aquosa e filtrada com filtro de 0,45 µm (EfraMat-45), a que apresentou melhor atividade. As leveduras apresentaram alterações sutis na micromorfologia, como a presença de células alongadas (tipo pseudo-hifas), na presença de EfraMat-45, observado através do microcultivo e Microscopia de Fluorescência. O EfraMat-45 apresentou ausência de toxicidade celular, capacidade antioxidante e presença de compostos fenólicos. Estes resultados permitem inferir que componentes presentes no extrato de *M. titans* poderiam ser capazes de influenciar o crescimento e a diferenciação celular, e conseqüentemente a virulência, deste importante patógeno, já que a formação de estruturas específicas como os clamidósporos está diretamente relacionada 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 analisar a expressão de genes relacionados com a morfogênese de *C. albicans*. Outra perspectiva é a avaliação do efeito desses cogumelos em outros microrganismos.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, K.; KHATUA, S.; SAHID, S. Pharmacognostic standardization of *Macrocybe crassa*: An imminent medicinal mushroom. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 8, n. 7, p. 860–866, 2015.
- AL-HEDAITHY, S. S. A.; FOTEDAR, R. Recovery and studies on chlamydospore-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.
- BABY, S.; JOHNSON, A. J.; GOVINDAN, B. Secondary metabolites from *Ganoderma*. **Phytochemistry**, v. 114, p. 66–101, 2015.
- BALAKUMAR, R.; SIVAPRAKASAM, E.; KAVITHA, D.; SRIDHAR, S.; KUMAR, J. S. Antibacterial and antifungal activity of fruit bodies of *Phellinus* mushroom extract. **International Journal of Biosciences (IJB)**, v. 1, n. 3, p. 72–77, 2011.
- BANLANGSAWAN, N.; SRIPANIDKULCHAI, B.; SANOAMUANG, N. Investigation of antioxidative, antityrosinase and cytotoxic effects of extract of irradiated oyster mushroom. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 31–39, 2016.
- BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. **Antioxidantes: Princípios e Métodos Analíticos**. Appris: Curitiba, 1ª ed., 141 p., 2015.
- BREENE; W. M. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 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.
- CHANG, S. T.; BUSWELL, J. A.; MILES, P. G. Genetics and Breeding of edible mushrooms. **Gordon and Breach Science Publishers S.A. Amsterdam**, 322 p., 1991.
- CHE, Z. L.; GIOVANNI, V.; PAOLA, V. A new sesquiterpene from the mushroom *D. indusiata* Fisch. **Journal of Chinese Mass Spectrometry Society**, v. 19, p. 23–28, 1998.
- 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.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard, 3rd Edition. **CLSI document M27-A3**. Wayne, PA., 40 p., 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, 3rd Edition. **CLSI document M44-A2**. M44Ed3E, 44 p., 2018.

CUI, F.; ZAN, X.; LI, Y.; YANG, Y.; SUN, W.; ZHOU, Q.; DONG, Y. Purification and partial characterization of a novel anti-tumor glycoprotein from cultured mycelia of *Grifola frondosa*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 684–690, 2013.

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

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* Species Infections in Critically ill Non-Immunosuppressed Patients. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v. 3, p. 685–702, 2003.

FIOŁKA, M. J.; CZAPLEWSKA, P.; MACUR, K.; BUCHWALD, T.; KUTKOWSKA, J.; PADUCH, R.; KACZYŃSKI, Z.; WYDRYCH, J.; URBANIK-SYPNIEWSKA, T. Anti-*Candida albicans* effect of the protein-carbohydrate fraction obtained from the coelomic fluid of earthworm *Dendrobaena veneta*. **PLoS One**, v. 14, n. 3, e0212869. 2019.

GERASIMENYA, V. P.; EFREMENKOVA, O. V.; KAMZOLKINA, O. V.; BOGUSH, T. A.; TOLSTYCH, I. V.; ZENKOVA, V.A. Antimicrobial and antitoxical action of edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm extracts. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, p. 127–132, 2002.

GIL-BONA, A.; REALES-CALDERON, J. A.; PARRA-GIRALDO, C. M.; MARTINEZ-LOPEZ, R.; MONTEOLIVA, L.; GIL, C. The Cell Wall Protein Ecm33 of *Candida albicans* is Involved in Chronological Life Span, Morphogenesis, Cell Wall Regeneration, Stress Tolerance, and Host-Cell Interaction. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 64, 2016.

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.

GODINHO, V. M.; FURBINO, L. E.; SANTIAGO, I. F.; PELLIZZARI, F. M.; YOKOYA, N. S.; PUPO, D.; ALVES, T. M. A.; JUNIOR, P. A. S.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L.; CANTRELL, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **The ISME Journal**, v. 7, p. 1434–1451, 2013.

GOW, N. A. R.; VEERDONK, F. L. van de; BROWN, A. J. P.; NETEA, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 112–122, 2012.

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

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

JAGADISH, L. K.; KRISHNAN, V.V.; SHENBHAGARAMAN, R.; KAVIYARASAN, V. Comparative study on the antioxidant, anticancer and antimicrobial property of *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach before and after boiling. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 654–661, 2009.

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

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.

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.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547–1549, 2018.

LIS, J. T.; SCHLEIF, R. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. **Nucleic Acids Research**, v. 2, p. 383–390, 1975.

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.

MATIJAŠEVIĆ, D.; PANTIĆ, M.; RAŠKOVIĆ, B.; PAVLOVIĆ, V.; DUVNJAK, D.; SKNEPNEK, A.; NIKŠIĆ, M. The Antibacterial Activity of *Coriolus versicolor* Methanol Extract and Its Effect on Ultrastructural Changes of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Enteritidis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 1226, 2016.

MENG, M.; CHENG, D.; HAN, L.; CHEN, Y.; WANG, C. Isolation, purification, structural analysis and immunostimulatory activity of water-soluble polysaccharides from *Grifola Frondosa* fruiting body. **Carbohydrates Polymers**, v. 157, p. 1134–1143, 2017.

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.

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.

MIRHENDI, H.; MAKIMURA, K.; KHORAMIZADEH, M.; YAMAGUCHI, H. A one enzyme PCR RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 47, p. 225–229, 2006.

MORA-MONTES, H. M.; NETEA, M. G.; FERWERDA, G.; LENARDON, M. D.; BROWN, G. D.; MISTRY, A. R.; KULLBERG, B. J.; O'CALLAGHAN, C. A.; SHETH, C. C.; ODDS, F. C.; BROWN, A. J.; MUNRO, C. A.; GOW, N. A. Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 5, p. 1961–1970, 2011.

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.

NETO, P. V. Ação antifúngica de plantas medicinais e da própolis frente a leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. **Dissertação de Mestrado em Odontologia**. Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR, 2004.

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.

NWACHUKWU, E.; UZOETO, H. O. Antimicrobial activity of some local mushrooms on pathogenic isolates. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 2460–2465, 2010.

OWAID, M. N.; AL-SAEEDI, S. S. S.; AL-ASSAFFII, I. A. Antimicrobial activity of mycelia of oyster mushroom species (*Pleurotus* spp.) and their liquid filtrates (*in vitro*). **Journal of Medical and Bioengineering**, v. 4, n. 5, p. 376–380, 2015.

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. nov. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 494–504, 1998.

RAI, M.; TIDKE, G.; WASSER, S.P. Therapeutic potential of mushrooms. **Natural product radiance**, v. 4, p. 246–257, 2005.

REIS, F. S.; MARTINS, A.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between *in vivo* and *in vitro* samples. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1201–1207, 2012.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 28 (supl.), p. 238–244, 2008.

ROSA, L. E.; 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 Oswald Cruz**, v. 98, p. 967–974, 2003.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4 p. 406–425, 1987.

SCHEERS, M. E.; EKWALL, B. A.; DIERICKX, J. P. *In vitro* long-term cytotoxicity testing of 27 MEIC chemicals on HepG2 cells and comparison with acute human toxicity data. **Toxicology in Vitro**, v. 15, p. 153–161, 2001.

SELLAM, A.; WHITEWAY, M. Recent advances on *Candida albicans* biology and virulence. **F1000 Research**, v. 26, n. 5, p. 2582–2598, 2016.

SHENG, H.; SHAO, S.; CHEN, J.; ZHOU, T. Antimicrobials from Mushrooms for Assuring Food Safety. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 16, p. 316–329, 2017.

SRIDHAR, S.; SIVAPRAKASAM, E.; BALAKUMAR, R.; KAVITHA, D.; Evaluation of antibacterial and antifungal of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst fruit bodies extracts. Karst fruit bodies extracts. **West Journal of Science Technology**, v. 1, p. 8–11, 2011.

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

TAMURA K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v. 101, p. 1030–1035, 2004.

TAOFIQ, O.; RODRIGUES, F.; BARROS, L.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Mushroom ethanolic extracts as cosmeceuticals ingredients: Safety and *ex vivo* skin permeation studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 127, p. 228–236, 2019.

THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of Morphology and Virulence in *Candida* Species. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 9, p. 1173–1182, 2011.

TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 4, 2016.

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.

WASSER, S. P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushroom. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 89, n. 5, p. 1323–1332, 2011.

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.

XIN, L.; ZHIMING, M. A.; JINGXIAO, Z.; LONGFEI, Y. Antifungal Compounds against *Candida* Infections from Traditional Chinese Medicine. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

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

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, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.079. 2018.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 1, p. 41–48, 2006.

YOO, Y.; CHOI, H. T. Antifungal chitinase against human pathogenic yeasts from *Coprinellus congregatus*. **Journal of Microbiology**, v. 52, p. 441–443, 2014.

YOUNIS, A. M.; YOSRI, M.; STEWART, J. K. *In vitro* evaluation of pleiotropic properties of wild mushroom *Laetiporus sulphureus*. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 64, n. 1, p. 79–87, 2019.

ZHANG, Y.; LIU, Z.; NG, T. B.; CHEN, Z.; QIAO, W. F. Purification and characterization of a novel antitumor protein with antioxidant and deoxyribonuclease activity from edible mushroom *Pholiota nameko*. **Biochimie**, v. 99, p. 28–37, 2014.

ZJAWIONY, J.K. Biologically active compounds from *Aphylllophorales* (Polypore) fungi. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 300–310, 2004.