

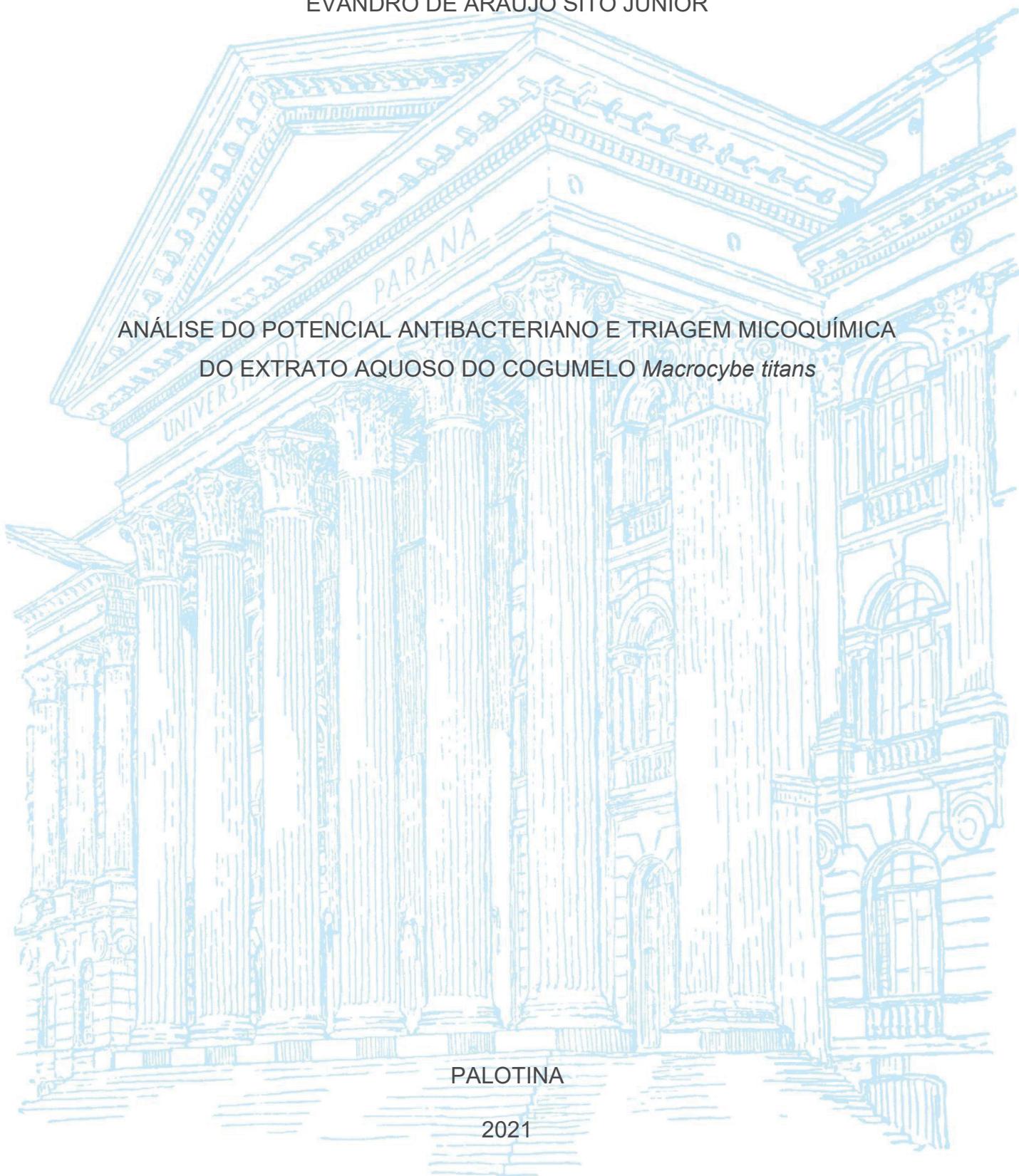
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EVANDRO DE ARAUJO SITO JUNIOR

ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO E TRIAGEM MICOQUÍMICA
DO EXTRATO AQUOSO DO COGUMELO *Macrocybe titans*

PALOTINA

2021



EVANDRO DE ARAUJO SITO JUNIOR

ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO E TRIAGEM MICOQUÍMICA
DO EXTRATO AQUOSO DO COGUMELO *Macrocybe titans*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sequinel

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Fiorini Rosado

PALOTINA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S623 Sito Junior, Evandro de Araujo
Análise do potencial antibacteriano e triagem micoquímica do extrato aquoso do cogumelo *Macrocybe titans* / Evandro de Araujo Sito Junior – Palotina, 2021.
49f.

Orientador: Rodrigo Sequinel
Coorientadora: Adriana Fiorini Rosado
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

1. *Macrocybe titans*. 2. Basidiomicete. 3. Triagem micoquímica. I. Sequinel, Rodrigo. II. Rosado, Adriana Fiorini. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 606



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA -
40001016083P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **EVANDRO DE ARAUJO SITO JUNIOR** intitulada: **ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO E TRIAGEM MICOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DO COGUMELO *Macrocybe titans***, sob orientação do Prof. Dr. RODRIGO SEQUINEL, que após terem inquirido o aluno 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, 16 de Dezembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

18/12/2021 15:30:49.0

RODRIGO SEQUINEL

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

17/12/2021 16:07:21.0

ELIANE HERMES

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

28/01/2022 12:50:33.0

FÁBIO ROGÉRIO ROSADO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

RUA PIONEIRO, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil

CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8500 - E-mail: mestradiotecufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 136988

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prrpg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 136988

Dedico esta dissertação à minha amada avó Deolinda (in memoriam) que sempre foi uma das maiores incentivadoras para que me dedicasse aos estudos. Espero estar te orgulhando.

Te amo...

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Evandro e Luzia e meu irmão José Vitor pelo amor e apoio condicional sempre.

Ao meu orientador Rodrigo Sequinel por sempre estar presente e solícito em todas as etapas desse processo e principalmente nessa etapa final da escrita e análise de dados. Meu muito obrigado, professor!!

À minha co-orientadora Adriana Fiorini Rosado, onde palavras são insuficientes para expressar o tamanho da admiração e carinho que tenho por você, uma inspiração para todos seus orientados, exemplo de docente, de pessoa e que me ensinou muito durante esse período.

Às minhas Gabi's (Gabi Huff e Gabi Peiter) por todo apoio, ajuda constante e participação nesse trabalho. Foram horas no laboratório, muitas videochamadas, reuniões e sem elas esse trabalho não teria saído. Vocês são incríveis e merecem tudo de melhor nessa vida. Amo muito vocês.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram, em especial Aline, Diogo, Lauri, Luciane e Débora. Eu amo nossa amizade e obrigado por serem quem são.

A todos os docentes e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFPR, Setor Palotina. Obrigado por todo conhecimento compartilhado.

RESUMO

O cogumelo basidiomicete *Macrocybe titans* foi reportado recentemente no Brasil despertando interesse científico. Na literatura, há poucos relatos quanto ao potencial antimicrobiano e micoquímico do macrofungo. Com base nisto, o presente trabalho teve por objetivo verificar a atividade antibacteriana do extrato aquoso do cogumelo *M. titans* e verificar seus efeitos bactericida e/ou bacteriostático e triagem micoquímica. A linhagem do macrofungo utilizado foi o *M. titans*, pertencente ao banco de germoplasma do Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA), da Universidade Federal do Paraná - UFPR, Setor Palotina, Paraná. Os microrganismos utilizados foram cepas ATCC de *Bacillus cereus* 10876, *Salmonella Typhimurium* 14028, *Salmonella* Enteritidis 13076, *Listeria monocytogenes* 19111, *Escherichia coli* 25922, *Escherichia coli* O157:H7 43888, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Staphylococcus aureus* 6538, *Bacillus subtilis* subespécie *spizizenii* 6633 e *Klebsiella pneumoniae* 13883. Para obtenção do extrato aquoso o basidioma seco do cogumelo foi triturado, diluído, mantido em repouso a 4°C e filtrado. As cepas foram reativadas e a padronização dos inóculos foi realizada de acordo com a escala de McFarland de 0,5 e ajustada em espectrofotometria. Diluições foram realizadas a fim de obter a concentração de trabalho. O teste de susceptibilidade dos microrganismos foi realizado pela técnica de microdiluição em caldo utilizando uma placa de 96 poços com a finalidade de avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato aquoso. Todas as cepas testadas apresentaram efeito inibitório e os melhores resultados foram para as bactérias Gram negativas *P. aeruginosa* e *S. Enteritidis*, e Gram positivas *L. monocytogenes*, *B. spizizenii* e *S. aureus* apresentaram efeito inibitório na com 0,78% (0,9765 mg/mL) do extrato. Através da concentração bactericida mínima (CBM) e do teste de susceptibilidade antibacteriana por disco-difusão foi possível confirmar a bioatividade do extrato em relação às cepas bacterianas testadas. Todas as cepas testadas apresentaram halos de inibição, no entanto, os melhores resultados observados foram para *S. aureus* e *K. pneumoniae*, apresentando tamanho médio de 18,25 e 14,38 mm, respectivamente. *S. aureus* e *P. aeruginosa*, foram analisadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), onde foi possível observar a diminuição evidente no número de células sem nenhuma alteração aparente na morfologia das bactérias.

Palavras-chave: *Macrocybe titans*. Basidiomicete. Atividade antimicrobiana.

Triagem micoquímica.

ABSTRACT

The basidiomycete mushroom *Macrocybe titans* was recently reported in Brazil, arousing scientific interest. In the literature, there are no reports on the antimicrobial and mycochemical potential of the macrofungus. Based on this, the present work aimed to verify the antibacterial activity of the aqueous extract of the mushroom *M. titans* and verify its bactericidal and/or bacteriostatic effects and mycochemical screening. The lineage of the macrofungus used was *M. titans*, belonging to the germplasm bank of the Experimental Nucleus of Applied Mycology (NEMA), at the Federal University of Paraná - UFPR, Setor Palotina, Paraná. The microorganisms used were ATCC strains of *Bacillus cereus* 10876, *Salmonella* Typhimurium 14028, *Salmonella* Enteritidis 13076, *Listeria monocytogenes* 19111, *Escherichia coli* 25922, *Escherichia coli* O157:H7 43888, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Staphylococcus aureus* 6538, *Bacillus subtilis* subspecies *Spizizenii* 6633 and *Klebsiella pneumoniae* 13883. To obtain the aqueous extract, the dried mushroom basidioma was crushed, diluted, kept at rest at 4°C and filtered. The strains were reactivated and the inoculum standardization was performed according to the 0.5 McFarland scale and adjusted in spectrophotometry. Dilutions were carried out in order to obtain the working concentration. The microorganism susceptibility test was performed using the broth microdilution technique using a 96-well plate in order to assess the minimum inhibitory concentration (MIC) of the aqueous extract. Through a visual analysis, all tested strains showed an inhibitory effect and the best results were for the Gram negative bacteria *P. aeruginosa* and *S. Enteritidis*, and Gram positive *L. monocytogenes*, *B. spizizenii* and *S. aureus* showed an inhibitory effect on column 8 with 0.78% (0.9765 mg/ml) of the extract. Through the minimal bactericidal concentration (CBM) and the antibacterial susceptibility test by disk-diffusion it was possible to confirm the bioactivity of the extract in relation to the bacterial strains tested. All strains tested showed inhibition halos, however, the best results were observed for *S. aureus* and *K. pneumoniae*, with an average size of 18.25 and 14.38 mm, respectively. *S. aureus* and *P. aeruginosa* were analyzed using Scanning Electron Microscopy (SEM), where it was possible to observe a clear decrease in the number of cells without any apparent change in the morphology of the bacteria.

Keywords: *Macrocybe titans*. Basidiomycete. Antimicrobial activity. Mycochemical screening.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – <i>Macrocybe titans</i> ENCONTRADO EM PARAÍSO DO NORTE – PR.....	22
FIGURA 2 – ANÁLISE VISUAL DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA PLACA TESTADA COM A BACTÉRIA <i>Staphylococcus aureus</i>	32
FIGURA 3 – ANÁLISE VISUAL DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA PLACA TESTADA COM A BACTÉRIA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
FIGURA 4 – CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DAS BACTÉRIAS TESTADAS.....	33
FIGURA 5 – ENSAIO DE DISCO-DIFUSÃO PARA <i>Staphylococcus aureus</i> (A) E <i>Klebsiella pneumoniae</i> (B) COM O EXTRATO DE <i>Macrocybe titans</i>	35
FIGURA 6 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA CEPA DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CONTROLE.....	37
FIGURA 7 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA CEPA DE <i>Staphylococcus aureus</i> CONTROLE.....	38
FIGURA 8 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA CEPA DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> APÓS TRATAMENTO COM EXTRATO AQUOSO DE <i>M. titans</i>	39
FIGURA 9 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA CEPA DE <i>Staphylococcus aureus</i> APÓS TRATAMENTO COM EXTRATO AQUOSO DE <i>M. titans</i>	39
FIGURA 10 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DO EXTRATO AQUOSO DE <i>Macrocybe titans</i>	40
FIGURA 11 – CROMATOGRAMA DOS PADRÕES UTILIZADOS.....	41
FIGURA 12 – ESPECTROS DE FTIR OBTIDOS DO EXTRATO AQUOSO DE <i>Macrocybe titans</i>	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO AQUOSO EXPRESSA EM MIC (mg/mL) DETERMINADA PELO ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO E ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA.....	34
TABELA 2 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO AQUOSO DE <i>M. titans</i> PELO ENSAIO DE DISCO-DIFUSÃO.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	- Grau(s) Celsius
× g	- Força centrífuga relativa
µg	- Micrograma(s)
µl	- Microlitro(s)
µm	- Micrômetro(s)
µM	- Micromolar
abs	- Absorbância
cm	- Centrímetro(s)
dNTP	- Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	- Gramas
L	- Litros
LTDA	- Limitada
M	- Molar
mg	- Miligrama(s)
mL	- Mililitro(s)
mm	- Milímetro(s)
mM	- Milimolar
mol	- Mol(e)
nm	- Nanômetro(s)
pb	- Pares de base
PBS	- Tampão fosfato-salino

PEG	- Polietilenoglicol
pH	- Potencial de hidrogênio
rpm	- Rotação por minuto
SDS	- Docedil sulfato de sódio
TBE	- Tampão Tris-base EDTA
TE	- Tampão Tris-EDTA
U	- Unidades

LISTA DE SIGLAS

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
CBM	- Concentração Bactericida Mínima
CLSI	- Clinical Laboratory Standards Institute
DNA	- Desoxirribonucleico
CG-MS	- Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
HPSEC	- Cromatografia de Exclusão de Tamanho de Alto Desempenho combinada com Dispersão de Luz a Laser Multi-ângulo Online
ITS	- Espaçador Transcricional Interno
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
MH	- Mueller-Hinton
NCBI	- National Center for Biotechnology
NEMA	- Núcleo Experimental de Micologia Aplicada
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
rDNA	- DNA Ribossomal
RNA	- Ácido Ribonucleico
UFC	- Unidades Formadoras de Colônias
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.1	Objetivos Específicos	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	O COGUMELO <i>Macrocybe titans</i>	19
2.2	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MICOQUÍMICA DOS COGUMELOS.....	20
2.3	MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	LOCAL DE DESENVOLVIMENTO	24
3.2	LINHAGEM DE <i>M. titans</i>	24
3.3	CEPAS BACTERIANAS	25
3.4	EXTRAÇÃO DE DNA	25
3.5	AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1-4 PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	26
3.6	PURIFICAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1-4.....	27
3.7	OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE <i>M. titans</i>	28
3.8	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE, POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO, DAS BACTÉRIAS AO EXTRATO DE <i>M. titans</i>	28
3.9	DETERMINAÇÃO DA CBM (CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA)	29
3.10	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIBACTERIANA POR DISCO-DIFUSÃO	30
3.11	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	30
3.12	ANÁLISE MICOQUÍMICA	31

3.13	ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO.....	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>M. titans</i>	33
4.2	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DOS MICRORGANISMOS AO EXTRATO AQUOSO DE <i>M. titans</i>	33
4.3	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIBACTERIANA POR DISCO-DIFUSÃO	37
4.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	39
4.5	ANÁLISE MICOQUÍMICA.....	41
4.6	ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO	43
5	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos são caracterizados por terem diversas funções, dentre elas medicinal (WASSER, 2010), antioxidante (GENG et al., 2016), antimicrobiana, anti-inflamatória (SHIGESUE et al., 2000), imunomoduladora (GAO et al., 2013), antitumoral (FAN et al., 2011; REIS et al., 2015), hepatoprotetora (ZHANG et al., 2002), antidiabética (KIM et al., 2010), propriedades prebióticas (SINGDEVSACHAN et al., 2016), dentre outras. São também considerados como alimentos nutracêuticos em todo o mundo devido à sua grande capacidade preventiva à vários distúrbios (VALVERDE et al., 2015). Podem apresentar diversos metabólitos secundários como fenóis, policetídeos, esteróides e terpenos, sendo os fenólicos o principal grupo de componentes dietéticos associados a propriedades antioxidantes (ACHARYA et al., 2015). Alguns desses compostos estão associados à efeitos antimicrobianos potentes e têm sido alvos de muitos estudos (SHEN et al., 2017).

Um dos representantes do filo Basidiomycota, o cogumelo *Macrocybe titans*, é de especial interesse em nossa equipe de pesquisa, pois, até onde se sabe, não há relato na literatura sobre o potencial antimicrobiano de extratos desse macrofungo. *M. titans* foi descrito pela primeira vez em 1980 como *Tricholoma titans* por Bigelow e Kimbrough na Flórida (EUA). Em 1998, Pegler e colaboradores renomearam o cogumelo para *M. titans*, onde novas considerações da morfologia, genética e ecologia validaram o novo gênero *Macrocybe*. Dentro desse gênero, existem setes espécies tropicais e subtropicais (todos sapróbios): *M. crassa*, *M. gigantea*, *M. lobayensis*, *M. pachymeres*, *M. praegrans*, *M. spectabilis* e *M. titans*.

Existem vários registros da descrição de *M. titans* no hemisfério norte e Ásia, caracterizando-o em uma distribuição pantropical. As descrições do gênero na América foram baseadas em materiais dos EUA e México. Recentemente a espécie foi registrada no sul do Brasil com uma maior distribuição, onde atinge latitudes que se assemelham com as dos EUA (RAMIREZ et al., 2017).

A atividade antimicrobiana de extratos fúngicos tem sido estudada por vários pesquisadores em todo o mundo. O principal foco das pesquisas é buscar alternativas naturais para o controle do aparecimento de cepas de microrganismos resistentes a antimicrobianos sintéticos e comerciais. O frequente surgimento de cepas bacterianas que não respondem a maioria dos antimicrobianos disponíveis são uma grande ameaça para a saúde humana, sendo o uso indiscriminado uma das principais causas para o desenvolvimento de bactérias cada vez mais resistentes às drogas (BALOUIRI et al., 2016). Como consequência, infecções oportunistas são mais incidentes e estão aumentando significativamente tanto em pacientes hospitalizados, quanto na população em geral (SHEN et al., 2017).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo principal verificar a atividade antibacteriana do extrato aquoso do cogumelo *Macrocybe titans* bem como verificar seus efeitos bactericida e/ou bacteriostático e realizar a triagem micoquímica do extrato.

1.1.1 Objetivos Específicos

- Verificar a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato aquoso do *Macrocybe titans* frente à cepas bacterianas para determinar a sua Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM);
- Verificar o efeito do extrato sobre o crescimento bacteriano através da técnica de susceptibilidade antibacteriana por disco-difusão;

- Verificar a composição micoquímica do extrato.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O COGUMELO *Macrocybe titans*

Em 1980 os autores Bigelow e Kimbrough encontraram, no centro e norte da Flórida, um cogumelo gigante com aproximadamente 75 cm. O cogumelo pertencia ao gênero *Tricholoma*, onde foi proposto uma nova espécie: *Tricholoma titans* Bigelow e Kimbrough, sp. nov. No ano de 1998, Pegler e colaboradores renomearam o cogumelo para *Macrocybe titans*, apresentando a seguinte classificação taxonômica: reino Fungi, filo Basidiomycota, classe Agaricomycetes, ordem Agaricales, Família Tricholomataceae, gênero *Macrocybe* e espécie *titans* (KARLASEN-AYALA e SMITH, 2020).

O gênero *Macrocybe* tem por característica hábito tricolomatóide de seus basidiomas com frequente formação de conato ou crescimento cespitosos, com superfície de seu píleo variando do branco e creme para tons mais escuros; basidiósporos subglobosos a amplamente elipsóide e liso; basídio sem granulação siderófila; pileipellis bem desenvolvida e cútis com hifas reptantes de parede fina; desenvolvimento de gimnocárpico e hábito saprófito (não ectomirrízico) diferenciando-o de outros gêneros como *Megatricholoma* e *Tricholoma* (RAMIREZ et al., 2017).

Na literatura, existem alguns estudos desenvolvidos com o gênero *Macrocybe*. Na Índia, pesquisadores utilizaram o extrato etanólico do cogumelo *M. crassa* com o objetivo de verificar atividade antimicrobiana, antioxidante e compostos presentes através do HPLC. Dos compostos presentes no cogumelo, o mais abundante foi o pirogalol sendo esse o possível agente causador da atividade antimicrobiana. Alguns outros compostos também foram identificados, como o ácido vanílico, ácido cinâmico e ácido p-cumárico (Khatua e Acharya, 2014). Em 2018, colaboradores da UFPR - Curitiba apresentaram a caracterização, pelas técnicas de HPSEC-MALLS e GC-MS, além de C¹³ 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*. Nesse trabalho, as análises de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) e metilação confirmaram a presença de uma fucogalactana com capacidade de reduzir a migração de células tumorais *in vitro* (MILHORINI et al., 2018). Até o momento, não foram encontrados relatos publicados de pesquisas desenvolvidas com o *M. titans* na avaliação de atividade antibacteriana e triagem micoquímica.

2.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MICOQUÍMICA DOS COGUMELOS

Na literatura existe uma variedade de cogumelos que foram descobertos, porém poucas espécies têm valor nutritivo e são considerados seguros (BALAKUMAR et al., 2011).

Independente da variedade de medicamentos antimicrobianos disponíveis, a infecção microbiana ainda é uma das maiores causas de mortalidade do mundo. O agravamento dessa ameaça se dá pela chegada de cepas bacterianas resistentes aos medicamentos atuais, tornando-se uma ameaça global (OLI et al., 2020). Hoje, o uso indiscriminado de antibióticos vem sendo uma das causas principais para o surgimento de cepas resistentes aos medicamentos (LI e WEBSTER, 2018). A complexidade no tratamento de infecções multirresistentes tem aumentado a busca por novos e eficazes antimicrobianos, especialmente advindos de produtos naturais (HAYASHI et al., 2013).

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-protéicos, 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.

Baseado no solvente de extração utilizado, o tipo e a concentração dos compostos bioativos se diversificam no extrato final e, como resultado reflete nos

efeitos das atividades farmacológicas, incluindo a atividade antimicrobiana (MATIJAŠEVIĆ et al., 2016).

2.3 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS

Em 2020, a Secretaria de Vigilância em Saúde publicou um boletim sobre a distribuição temporal dos surtos notificados de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, no período de 2007 a 2015. Foi constatado cerca de 2.243 pacientes em que o agente etiológico identificado foi causado principalmente por *Salmonella* (25,17%), *E. coli* (23,42%) e *Staphylococcus* (18,61%). Entre os surtos causados por *Salmonella*, 67,5% são devidos aos sorovares de *Salmonella* Enteritidis e 7,5 % para *Salmonella* Typhimurium. *Bacillus cereus* também foram notificados, cerca de 7,4 %. Além disso, algumas bactérias são causadoras epidemiológicas de infecções em pacientes hospitalares.

Bacillus cereus é uma bactéria Gram positiva aeróbica facultativo e formadora de endósporos. Este microrganismo pode ser encontrado facilmente em alimentos secos como temperos, ingredientes farináceos e leite em pó, na forma de esporos, sendo considerados resistentes ao calor. Os endósporos sobrevivem ao processo de cocção de alimentos. O fator de virulência varia de acordo com as linhagens. Dessa forma, *B. cereus* pode estar associado com a produção de toxinas, dentre elas: diarreica e emética (ARNESEN, et al., 2008; BOTTONE, 2020).

Salmonella spp. é um bacilo Gram negativo anaeróbio facultativo que pertence à família Enterobacteriaceae. *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são os sorovares de maior prevalência e causadoras de doenças, considerados importantes patógenos de origem alimentar. A salmonelose ocorre através de uma infecção alimentar ocasionada por alimentos crus ou mal processados, gerando no indivíduo gastroenterite, febre entérica e septicemia. Dentre todos os sorovares, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* têm a maior prevalência principalmente em casos de septicemia (TIWARI et al., 2017; HONGHU et al., 2019).

O gênero *Escherichia* pertence à bactérias bacilares Gram negativas anaeróbios facultativas, sendo *E. coli* a principal espécie. Um dos principais habitat é o intestino humano. Atualmente, existem seis grupos de *E. coli* diferenciados de acordo com a virulência e toxinas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC). *E. coli* O157: H7 é classificada dentro do grupo EHEC causando colite hemorrágica devido a produção de citotoxinas (toxinas Shiga) (GOMES et al., 2016).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria aeróbia com características morfotintoriais em forma de bastonetes móveis Gram negativos, não formadores de esporos. Podem ser responsáveis por infecções do trato respiratório inferior em pacientes hospitalizados, sendo associada ao aumento da mortalidade (YANG et al., 2019). Dentro do gênero *Pseudomonas*, diferentes espécies vêm apresentando resistência à diversos medicamentos (DING et al., 2016).

Listeria monocytogenes é um bacilo Gram positivo anaeróbio facultativo e não formador de esporos. A listeriose é uma doença ocasionada geralmente por alimentos contaminados pelo patógeno, afetando principalmente indivíduos com o sistema imunológico comprometido. Pode se espalhar pela corrente sanguínea chegando no sistema nervoso, ocasionando meningite. Gestantes entram no grupo de risco gerando em alguns casos, o aborto prematuro (DREVETS, 2008).

Staphylococcus aureus é um cocos Gram positivo encontrado facilmente na pele e mucosa de indivíduos, como um patógeno oportunista causando diversas infecções. De acordo com Weiner et al (2016), uma das principais causas por bacteremia em pacientes hospitalares é pela contaminação de *S. aureus*, representando um problema de saúde global. A bacteremia está associada a diversas infecções metastáticas, como endocardite infecciosa, artrite séptica e complicações, como choque séptico e sepse (MONTARELO et al., 2018).

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram negativo anaeróbio facultativo. Diversos estudos vêm demonstrando a resistência dessa bactéria em relação a

diversos antibióticos. Considerado um patógeno oportunista, implica em diferentes infecções do trato urinário em pacientes hospitalizados ou indivíduos imunocomprometidos. Além disso, é capaz de gerar pneumonia e infecções sanguíneas ou em feridas cirúrgicas (JASIM et al., 2020).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

A maior parte dos procedimentos foi realizada no Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA) e no Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina. As análises micoquímicas foram realizadas no Laboratório Multiusuário Central Analítica (LABCA), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo.

3.2 LINHAGEM DE *M. titans*

A linhagem utilizada de *M. titans* pertence atualmente ao banco de germoplasma do Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA), da Universidade Federal do Paraná - UFPR, Setor Palotina, Paraná. Foi inicialmente isolada pelo especialista Ednilson Clayton Rogério, em Paraíso do Norte - PR e cedida gentilmente para a realização da pesquisa. O cogumelo e as colônias de basidiomas foram encontrados em uma área rural do município e, em conjunto, totalizaram aproximadamente 20 Kg.

FIGURA 01 - *Macrocybe titans* ENCONTRADO EM PARAÍSO DO NORTE - PR



Fonte: Fabio Rogerio Rosado (2018).
Nota: Espécime utilizada neste trabalho

3.3 CEPAS BACTERIANAS

As bactérias utilizadas para analisar o efeito do extrato de *M. titans* foram as cepas ATCC (*American Type Collection Culture*) de *Bacillus cereus* 10876, *Salmonella* Typhimurium 14028, *Salmonella* Enteritidis 13076, *Listeria monocytogenes* 19111, *Escherichia coli* 25922, *Escherichia coli* O157:H7 43888, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Staphylococcus aureus* 6538, *Bacillus subtilis* subespécie *spizizenii* 6633 e *Klebsiella pneumoniae* 13883, que são bactérias patogênicas de grande importância para a saúde humana.

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA genômico de *M. titans* foi realizada segundo o protocolo descrito por Menegotto (2019) 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

de 3 mm de diâmetro, os tubos foram agitados por 15 min em vórtex e incubados a 66°C por 20 min. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados por 10 min 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 min a 37°C. A purificação foi realizada adicionando aos tubos 300 µl de fenol equilibrado em tampão Tris-HCL 0,1M, pH 8,0, com posterior centrifugação a 13.000 rpm por 10 min. Na sequência, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionados 400 µl de uma solução de fenol:clorofórmio álcool isoamílico (25:24:1), com nova centrifugação por 5 min 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 min e centrifugação a 13.500 rpm por 5 min 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 min e o *pellet* lavado com etanol 70%.

Após secagem, o *pellet* contendo DNA foi ressuscitado 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 fotodocumentado utilizando o equipamento Locus Biotecnologia L.PIX. A quantidade de DNA foi mensurada através do espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific).

3.5 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'), 0,2 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 min; 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 55°C por 45 s e extensão a 72°C por 1 min; com extensão final a 72°C por 7 min; em termociclador Bioer Life Express modelo MJ96. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1%, nas mesmas condições descritas no tópico 3.4.

3.6 PURIFICAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1-4

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 *Genetic Analyzer* (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 ≥ 99% são consideradas como pertencentes à mesma espécie e gênero; sequências ≥ 98% pertencem ao mesmo gênero, porém representam variação dentro da espécie; e sequências ≥ 95% e inferiores a 98% pertencem apenas ao mesmo gênero (GODINHO et al., 2013).

3.7 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *M. titans*

Basidiomas e estipe secos do cogumelo foram triturados, em moinho de faca, até a obtenção de um pó fino. Para obtenção da fração aquosa, pesou-se 12,5 g do pó fino do cogumelo seco e triturado e foi adicionado 50 mL de água destilada autoclavada (250mg/mL). Manteve-se por 18 h na geladeira a 4°C. Em seguida, o material foi centrifugado a 4000 g durante 10 minutos, onde o sobrenadante foi coado em filtro de voal e depois em um filtro de membrana estéril PES de 0,22 µM, obtendo-se o extrato aquoso da fração filtrada.

3.8 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE, POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO, DAS BACTÉRIAS AO EXTRATO DE *M. titans*

O ensaio de microdiluição em caldo foi realizado de acordo com a NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*, 2003, M7-A6) intitulado: “*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*.” A finalidade desta norma é fornecer informações sobre o teste de sensibilidade, sendo indicado para qualquer microrganismo responsável por um processo infeccioso que exija terapia antimicrobiana.

As bactérias foram inicialmente reativadas e cultivadas em ágar nutriente, de acordo com a ISO 11133:2014, que padroniza todas as categorias de meios de cultura preparados para uso em laboratórios que realizam análises microbiológicas e seus respectivos testes de proficiência. Após análise da viabilidade e obtenção de colônias puras, as bactérias foram armazenadas em freezer -20 °C, em meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*) com 5% de glicerol.

A preparação do inóculo inicial foi equivalente a uma solução padrão McFarland de 0,5 de BaSO₄ (Sulfato de Bário) e padronizada em 0,01 a 0,8 valores de absorvância (abs) por meio da técnica de nefelometria no comprimento de onda de 625 nm. Dessa forma, as culturas bacterianas foram

ajustadas chegando a uma concentração de 1 a 2×10^8 UFC/mL. Foi realizada uma diluição seriada para que o inóculo final esteja na concentração de até $1,0 \times 10^4$ UFC/poço da placa de ensaio.

O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de poliestireno contendo 96 poços, com linhas de A-H e colunas de 1-12. Na coluna 1 foram adicionados 200 uL do extrato *M. titans* na concentração de 250 mg/mL. Nas colunas de 2-12 foram adicionados 100 µl de BHI. Em seguida, foi realizada uma diluição seriada de 1:2 a partir da coluna 1, da qual foram transferidos 100 µl para a coluna 2, seguido de homogeneização 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 bacteriano ($1,0 \times 10^4$ UFC/poço) nas colunas de 1-10, obtendo-se concentrações de extrato entre 125 mg/mL a 0,244 mg/mL na placa. O controle positivo do experimento foi na coluna 11 (100 µl do BHI e 100 µl do inóculo, sem extrato) e o negativo na coluna 12 (100 µl de BHI apenas). Para cada bactéria, o teste foi feito preenchendo todos os poços da microplaca. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h em uma estufa de crescimento.

Por fim, a leitura do teste foi realizada em relação a concentração inibitória mínima (CIM), definida no primeiro poço que não houve crescimento microbiano, determinando qual foi a menor concentração do extrato capaz de causar a morte dos microrganismos.

3.9 DETERMINAÇÃO DA CBM (CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA)

O meio de cultura utilizado para este teste foi o ágar MH (Müller-Hinton) distribuído em Placas de Petri, determinando a CBM para bactérias que foram inibidas pelo extrato *M. titans*. Através da CIM realizada nas microplacas, foi retirado uma alíquota de 3 uL de cada poço e distribuído pela placa. Finalizado, as placas foram incubadas em estufa de crescimento a 37 °C durante 24 h a fim de analisar novamente se houve ou não o crescimento bacteriano, verificando qual foi a concentração mínima necessária para a inibição.

3.10 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIBACTERIANA POR DISCO-DIFUSÃO

O método de disco-difusão foi utilizado para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana das bactérias ao extrato de *M. titans*, segundo o CLSI (2015, M02-A2) com algumas modificações para produtos naturais. As bactérias foram cultivadas em caldo MH durante 24 h a 37 °C. Após esse período, a densidade óptica foi ajustada para 0,08 abs em 625 nm e 100 µl do inóculo foram espalhados com auxílio de um swab em placas com meio MH. Em seguida, discos de celulose de 6 mm, impregnados com 10 µl do extrato (250 mg/mL), foram fixados sobre o meio e as placas foram incubadas a 37 °C por 18 a 24 h. A dimensão dos halos formados ao redor dos discos foi medida para determinar o efeito dos extratos sobre as bactérias.

3.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para a realização da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram selecionadas uma bactéria Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) e uma Gram negativa (*Pseudomonas aeruginosa*). A densidade óptica foi ajustada inicialmente para concentração de 0,5 na escala de McFarland (D.O de 0,08 a 0,1) em solução salina estéril, padronizada por espectrofotometria a 625 nm, o que é equivalente a 1 a 2×10^8 UFC/mL, a partir de uma cultura pura. A partir dessa suspensão inicial foi realizada uma diluição seriada em solução de BHI, obtendo-se o inóculo final desejado de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL. O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de poliestireno contendo 96 poços. Um total de 200 µl foi adicionado em cada poço da placa, sendo 24 poços para o controle positivo (somente inóculo na concentração de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL e BHI na proporção 1:1), 48 poços na concentração intermediária entre a MIC e a sub-MIC (diluição de 170x da concentração inicial do extrato contendo inóculo e extrato de *M. titans*)

e 60 poços com o inóculo na presença do extrato de *M. titans* na MIC (diluição de 128x). Em todos os ensaios, a quantidade final de células foi de $1,0 \times 10^3$ UFC/mL. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h em uma estufa de crescimento. Após o tempo de incubação, o conteúdo dos poços foi coletado, centrifugado por 5 minutos a 3500 rpm, e o *pellet* bacteriano lavado com 1 ml de PBS 0,1 M pH 7,2. Após nova centrifugação, o *pellet* foi fixado com 1 ml de solução fixadora de glutaraldeído 2,5% em 0,1 M de PBS pH 7,2, por 1 h a 4°C. Os tubos foram novamente centrifugados e o *pellet* lavado novamente com PBS, mantendo um volume de 100ul, que foi utilizado para ressuspender as células. Lamínulas de vidro circulares, de 13 mm, foram cobertas e tratadas com solução de poli-L-lisina 0,1% (30.000-70.000 Da, Sigma-Aldrich), as quais foram lavadas com água destilada após 5 min de contato e mantidas por 1 h em estufa a 50°C. Após a secagem, 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 min cada. O ponto crítico foi realizado em equipamento Leica EM CPD300 *Critical Point Dryer* durante aproximadamente 20 min e as imagens de MEV foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura TESCAN VEGA3 SEM com aumentos de 1.000, 5.000 e 10.000 vezes.

3.12 ANÁLISE MICOQUÍMICA

A análise micoquímica foi realizada de acordo com o método de Çayan (2020) através de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (UHPLC) Dionex UltiMate 3000 (*Thermo Fisher Scientific*), equipado com um detector UV-VIS (VWD-3400RS), bomba quaternária (LPG-3400SD), forno (TCC-3400RS) e sistema de injeção manual (20uL). As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm; temperatura do forno 40 °C; comprimento de onda de detecção 280, 295 e 260 nm. A taxa de fluxo do solvente foi de 1,0 mL/min Para a fase móvel foi

utilizado (A) água ultrapura acidificada com ácido acético 0,5% (pH 3,03), (B) metanol acidificado com ácido acético 0,5% (pH 3,52), com eluição por gradiente. A composição inicial foi: 15–60% B (0–30 min); 60–95% B (30–35 min); mantendo a proporção final até 40 min.

3.13 ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO

A análise de espectroscopia de absorção no infravermelho com Transformada de Fourier foi realizada em espectrômetro de infravermelho Perkin Elmer, modelo Spectrum 65. A amostra foi preparada em pastilha de KBr. A leitura foi feita com 1% da amostra e 99% de brometo de potássio (KBr) grau espectroscópico (Sigma-Aldrich). A análise foi realizada entre 4000 e 600 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 16 scans.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *M. titans*

A sequência obtida a partir da amostra MT2 (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 600 pb e uma sequência, no resultado do sequenciamento, do mesmo tamanho, com o *primer forward*. A sequência obtida apresentou similaridades de 87 a 89% com outras sequências de *M. titans* pois não apresentou uma qualidade satisfatória e novo sequenciamento será realizado. No entanto, como a região ITS1-4 é altamente variável entre as espécies fúngicas, podemos afirmar que a linhagem utilizada pertence à espécie de *M. titans*.

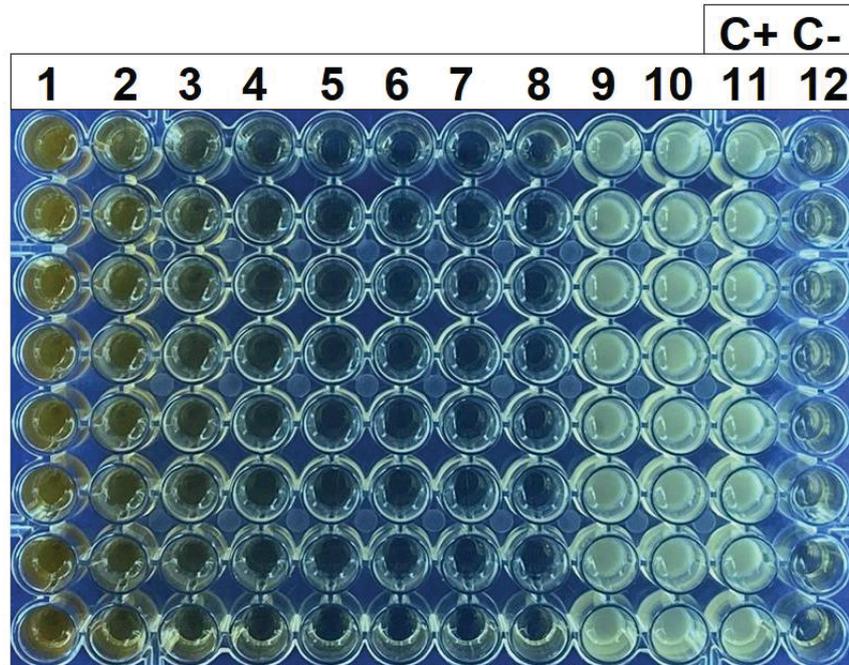
4.2 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DOS MICRORGANISMOS AO EXTRATO AQUOSO DE *M. titans*

A determinação da CIM foi realizada através de análise visual, partindo da coloração turva residual do extrato. Ademais, foram consideradas as concentrações calculadas a partir dos extratos originais.

A análise visual realizada nas placas indicou que a CIM com o melhor desempenho foi para as bactérias com características morfotintoriais Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Enteritidis* na coluna 8 com 0,78% (0,9765 mg/mL) de concentração de extrato aquoso de *M. titans* tendo como efeito inibitório. Já as bactérias com característica morfotintorial Gram positivas com melhor desempenho foram *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* e *Staphylococcus aureus*, também na linha 8 com 0,78% (0,9765 mg/mL) de concentração de extrato aquoso. Os resultados do

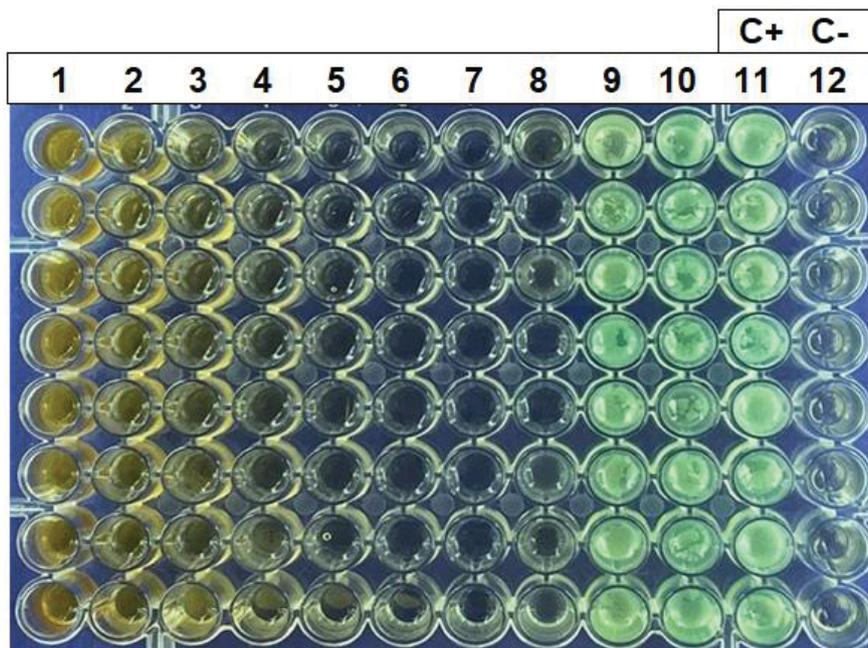
ensaio de Concentração Bactericida Mínima (CBM) (FIGURA 4) confirmaram os resultados obtidos visualmente pela CIM (FIGURA 2 e FIGURA 3).

FIGURA 2 - ANÁLISE VISUAL DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA PLACA TESTADA COM A BACTÉRIA *Staphylococcus aureus*



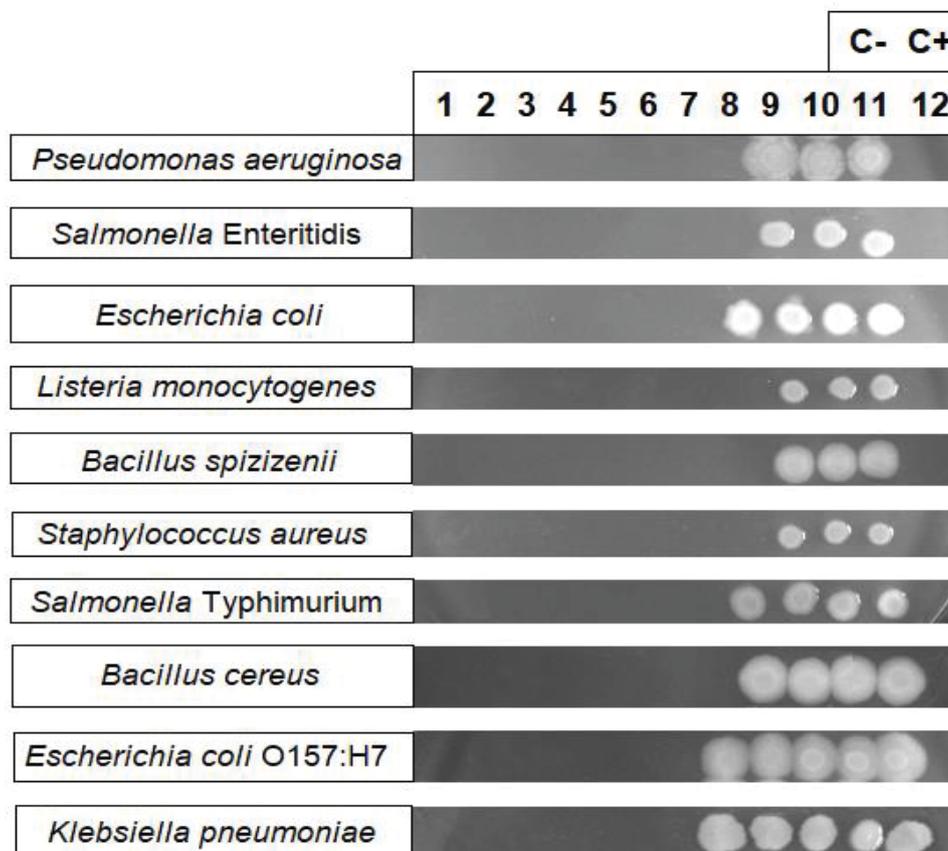
FONTE: O autor (2021).

FIGURA 3 - ANÁLISE VISUAL DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA PLACA TESTADA COM A BACTÉRIA *Pseudomonas aeruginosa*



FONTE: O autor (2021).

FIGURA 4 – CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DAS BACTÉRIAS TESTADAS



FONTE: O autor (2021).

Conforme mencionado no início deste trabalho, não há estudos na literatura frente ao uso do extrato aquoso *M. titans* em relação a diversas espécies de bactérias. Além disso, deve ser considerada a resistência e sensibilidade da bactéria em relação ao extrato natural pois depende da natureza deste microrganismo-teste utilizado (estirpe) e das condições de cultivo das mesmas.

Observando os resultados obtidos, o extrato aquoso apresentou bioatividade em todas as cepas bacterianas Gram negativas e Gram positivas testadas. É possível visualizar uma diminuição gradativa da turvação nos poços com maiores concentrações do extrato, indicando alguma sensibilidade do microrganismo ao extrato, o que sugere a possibilidade de que maiores concentrações do extrato possam vir a inibir totalmente essa bactéria.

Em relação à CBM, a ausência de crescimento após a inoculação e incubação do material da CIM em placa de Petri comprovou o efeito bactericida do extrato na mesma concentração obtida na microdiluição em caldo.

Logo, foi possível determinar, para cada microrganismo, a Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou seja, a menor concentração do extrato na qual não foi visualizado crescimento microbiano, e a Concentração Bactericida Mínima (CBM), isto é, a menor concentração em que há morte de todas as bactérias, visualizado pelo não crescimento em placa de Petri conforme demonstrado na Tabela 1.

TABELA 1 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO AQUOSO EXPRESSA EM MIC (mg/ml) DETERMINADA PELO ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO E ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

Cepa Bacteriana	Características Morfológicas	Fonte	Extrato Aquoso <i>M. titans</i> (MT2)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilos Gram-negativo	ATCC 27853	0,9765 ± 0.0*
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Bacilos Gram-negativo	ATCC 13076	0,9765 ± 0.0
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos Gram-negativo	ATCC 25922	1,9531 ± 0.0
<i>Listeria monocytogenes</i>	Bacilos Gram-positivo	ATCC 19111	0,9765 ± 0.0
<i>Bacillus Spizizenii</i>	Bacilos Gram-positivo	ATCC 6633	0,9765 ± 0.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos Gram-positivo	ATCC 6538	0,9765 ± 0.0
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Bacilos Gram-negativo	ATCC 14028	1,9531 ± 0.0
<i>Bacillus cereus</i>	Bacilos Gram-positivo	ATCC 10876	1,9531 ± 0.0
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Bacilos Gram-negativo	ATCC 43888	3,9063 ± 0.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacilos Gram-negativo	ATCC 13883	3,9063 ± 0.0

FONTE: O autor (2021).

NOTA: * Os dados são expressos como média ± DP (n=8).

Khatua et al. (2017) verificaram a atividade antimicrobiana do extrato metanólico de *Macrocybe lobayensis* frente a algumas bactérias patogênicas

pelo método de microdiluição em caldo, tendo as bactérias *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* com maior susceptibilidade ao extrato, enquanto *Klebsiella pneumoniae* mostrou a menor sensibilidade. Khatua e Acharya (2018) também avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Macrocybe lobayensis* tendo as bactérias *S. aureus*, *E.coli* e *B. spizizenii* como as mais susceptíveis aos efeitos do extrato.

4.3 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIBACTERIANA POR DISCO-DIFUSÃO

O ensaio de disco-difusão utilizou discos em triplicata, impregnados com o extrato 0,22 do MT2 em placas inoculadas com as bactérias. A dimensão dos halos formados ao redor do disco foi avaliada para determinação do efeito inibitório dos extratos sobre as bactérias (TABELA 2).

TABELA 2 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO AQUOSO DE *M. titans* PELO ENSAIO DE DISCO-DIFUSÃO:

Cepa Bacteriana	Fonte	Zona de Inibição (mm ^a)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	8,8 ± 0.6*
<i>Salmonella</i> Enteritidis	ATCC 13076	10,39 ± 0.2
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	10,40 ± 0.1
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	15,15 ± 0.0
<i>Bacillus spizizenii</i>	ATCC 6633	9,51 ± 0.4
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	18,25 ± 0.3
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 14028	10,11 ± 0.1
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	6,58 ± 0.1
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 43888	9,77 ± 0.4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	14,38 ± 0.8

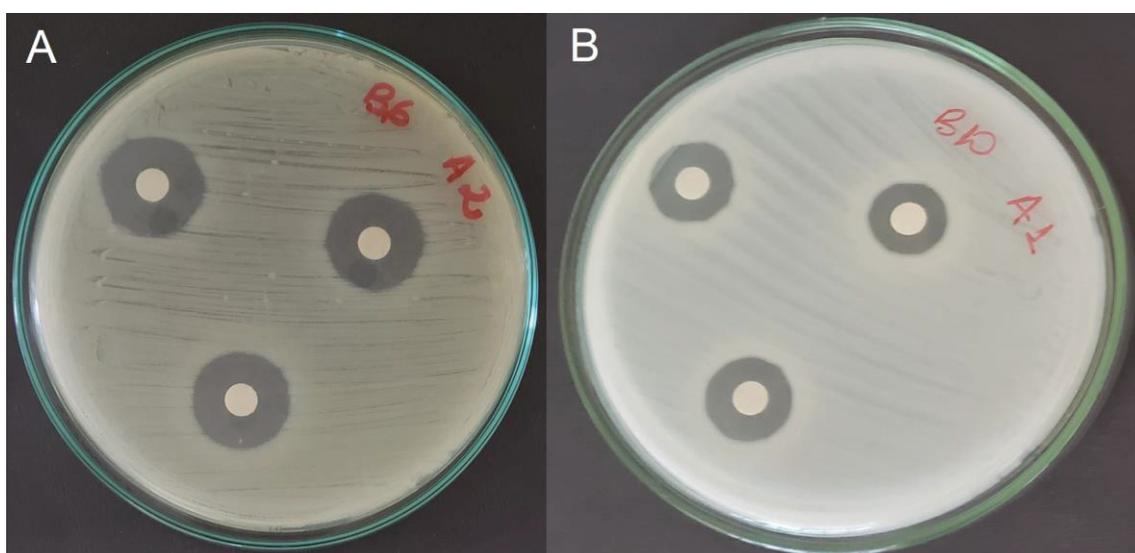
FONTE: O autor (2021).

NOTA: * Os valores são o desvio padrão médio (DP) a partir de três repetições.

^a Zonas de inibição incluem o diâmetro do disco de 6mm

Foi observado que a bactéria *Staphylococcus aureus* obteve a maior inibição do grupo das bactérias Gram positivas com halos regulares e sem presença de bactérias resistentes, apresentando tamanho médio de 18,25 mm (FIGURA 5A). Já do grupo das bactérias Gram negativas, a bactéria *Klebsiella pneumoniae* demonstrou maior efeito inibitório com halos regulares, bordas bem delimitadas e nenhuma presença de colônias resistentes apresentando tamanho médio de 14,38mm (FIGURA 5B).

FIGURA 5 - ENSAIO DE DISCO-DIFUSÃO PARA *Staphylococcus aureus* (A) e *Klebsiella pneumoniae* (B) COM O EXTRATO DE *Macrocybe titans*.



FONTE: O autor (2021).

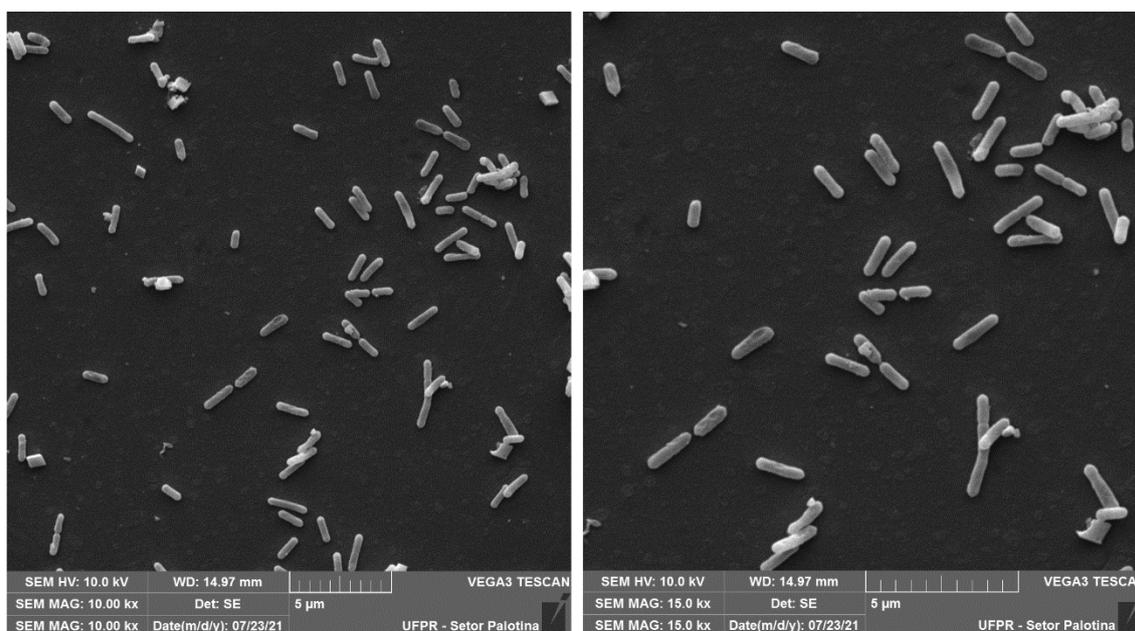
Embora a metodologia de disco-difusão seja um procedimento rápido e de fácil execução, não determina a concentração exata capaz de causar inibição do crescimento do microrganismo.

Venturini et al. (2008) realizaram um comparativo da atividade antibacteriana de diversos extratos em uma variedade de cogumelos, onde os extratos aquosos testados, em geral, apresentaram o maior potencial antibiótico na metodologia de disco-difusão. Acharya e Khatua (2014) relataram que em geral bactérias Gram positivas são consideradas mais sensíveis que bactérias Gram negativas para diferentes compostos antimicrobianos por conta da variação estrutural de suas paredes celulares.

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

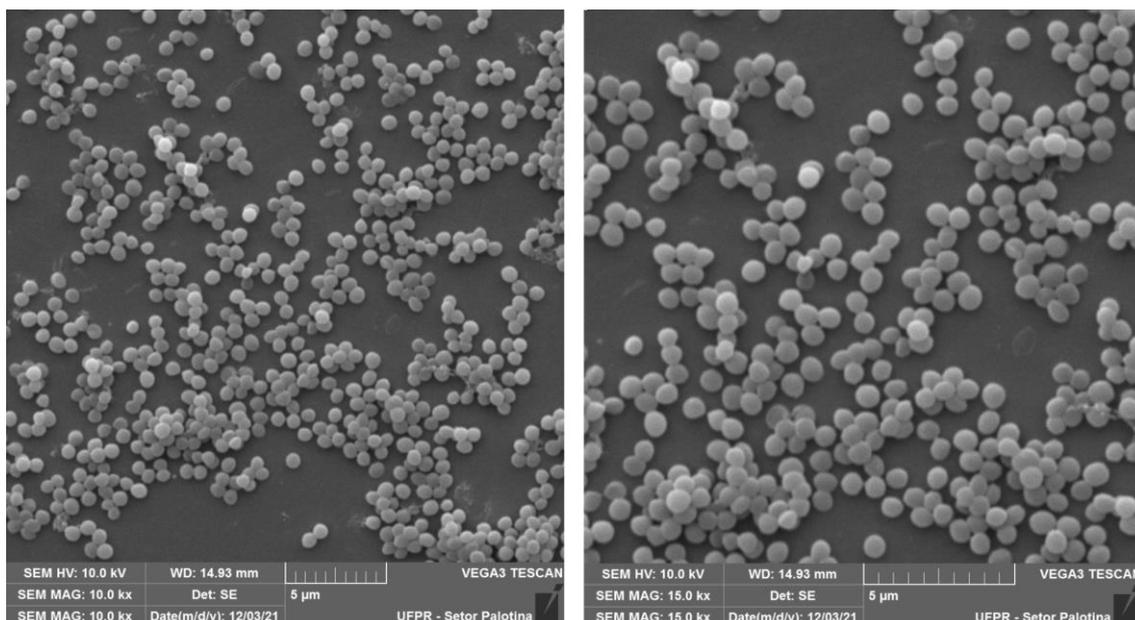
Células das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* foram incubadas por 24 h em uma concentração 1x menor que a CIM do extrato aquoso de *M. titans*. Em seguida, as células foram fixadas e observadas em microscópio eletrônico de varredura. Pelas imagens registradas é possível observar que tanto as células de *P. aeruginosa* (FIGURA 6), quanto as de *S. aureus* (FIGURA 7) do controle são morfologicamente características para as bactérias.

FIGURA 6 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA CEPA DE *Pseudomonas aeruginosa* CONTROLE



Fonte: O autor (2021).

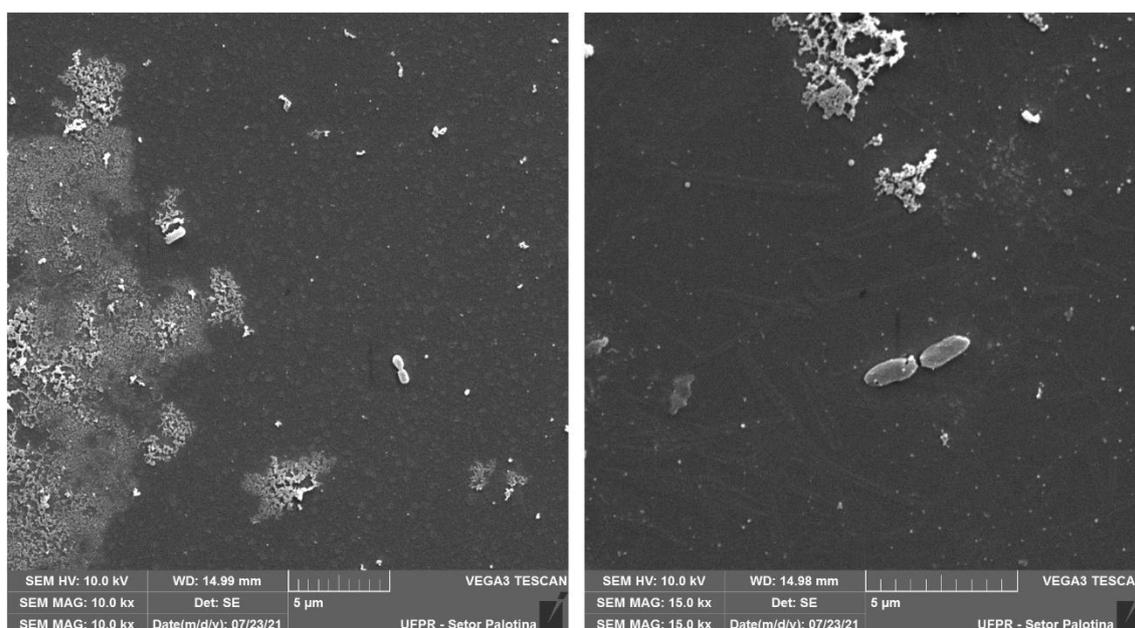
FIGURA 7 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA CEPA DE *Staphylococcus aureus* CONTROLE



Fonte: O autor (2021).

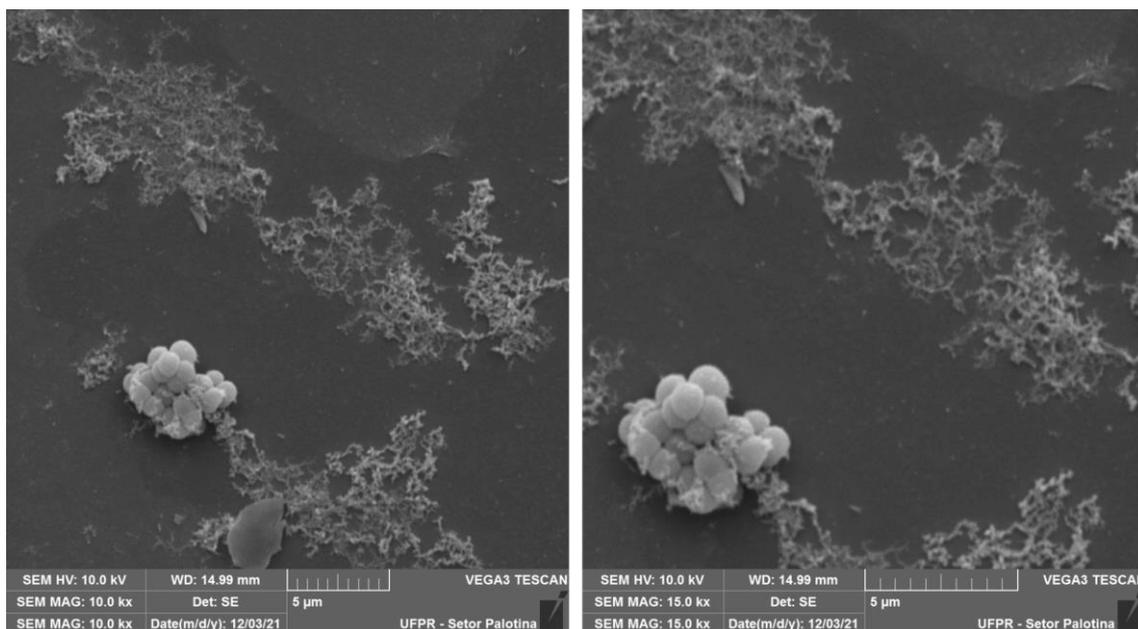
Entretanto, para as células das bactérias que foram tratadas com a concentração de 1x menor a CIM do extrato aquoso de *M. titans* é possível observar uma diminuição significativa no número de células (FIGURA 8; FIGURA 9).

FIGURA 8 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA CEPA DE *Pseudomonas aeruginosa* APÓS TRATAMENTO COM EXTRATO AQUOSO DE *M. titans*



FONTE: O autor (2021).

FIGURA 9 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA CEPA DE *Staphylococcus aureus* APÓS TRATAMENTO COM EXTRATO AQUOSO DE *M. titans*



FONTE: O autor (2021).

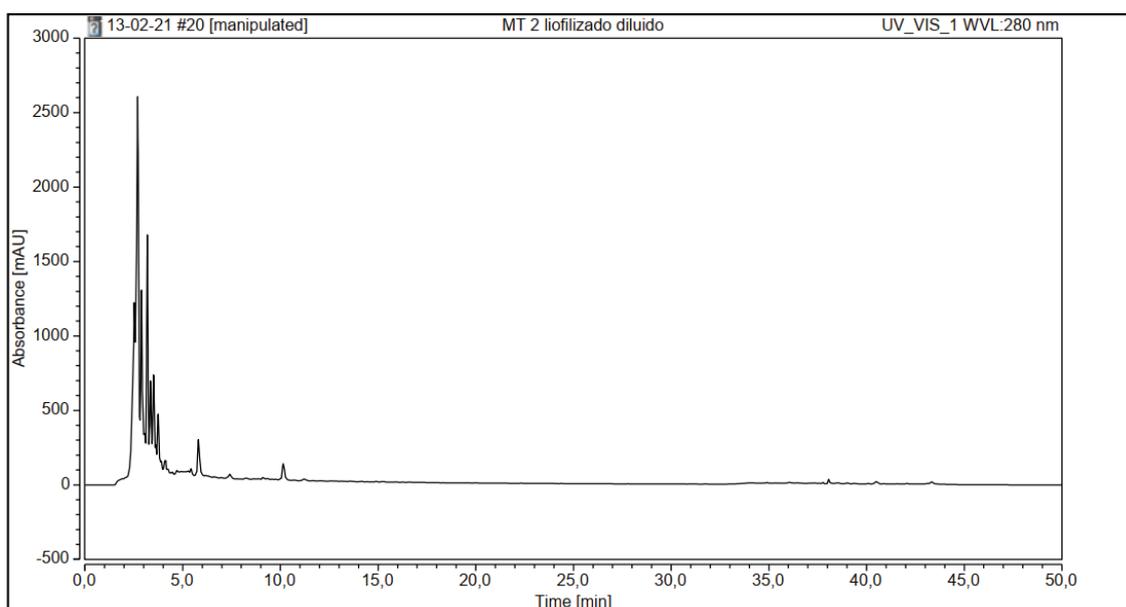
Embora existam trabalhos sobre o efeito antimicrobiano de extratos de cogumelos (SHENG et al., 2017) e relatos sobre alterações morfológicas de bactérias em contato com extrato de cogumelos (MATIJAŠEVIĆ et al., 2016), são escassos os relatos sobre as alterações na morfologia de microrganismos sob ação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

4.5 ANÁLISE MICOQUÍMICA

O teste para avaliar os compostos químicos do extrato aquoso de *M. titans* através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizou como padrão compostos fenólicos como o ácido gálico, catequina, ácido acético, ácido p-cumárico, propil galato, quercitina e kaempferide (Figura 11). Em comparação com os padrões utilizados, a amostra testada não detectou nenhum dos padrões alvo analisados (Figura 10) no extrato aquoso de *M. titans*, embora outros trabalhos da literatura como de Pereira et al. (2021) ao realizarem análise qualitativa do extrato aquoso de *M. titans* determinaram o teor de fenólicos totais em 1,51 mg de equivalente de ácido gálico/g de extrato.

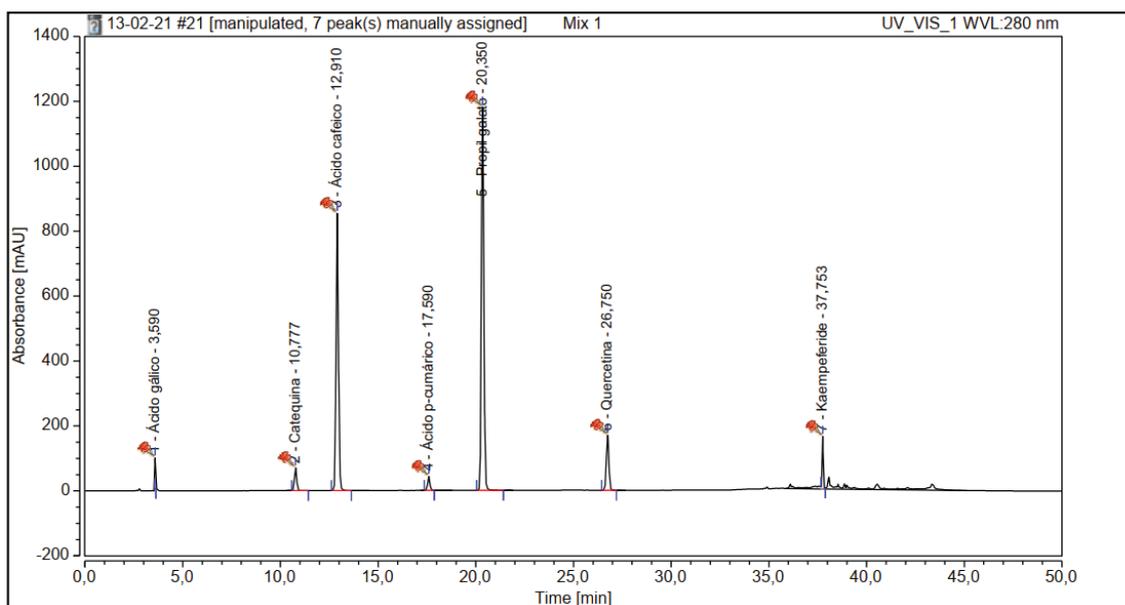
Na Figura 10 nota-se que a maior parte dos componentes da amostra foram detectados no início da corrida cromatográfica, em tempo de retenção anterior a 5 minutos. É um indicativo da presença de substâncias altamente polares pouco retidas na fase estacionária C18 e que podem ser melhor investigadas em outras condições cromatográficas para melhor elucidação da composição química do extrato aquoso.

FIGURA 10 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DO EXTRATO AQUOSO DE *Macrocybe titans*



FONTE: O autor (2021).

FIGURA 11 - CROMATOGRAMA DOS PADRÕES UTILIZADOS



FONTE: O autor (2021).

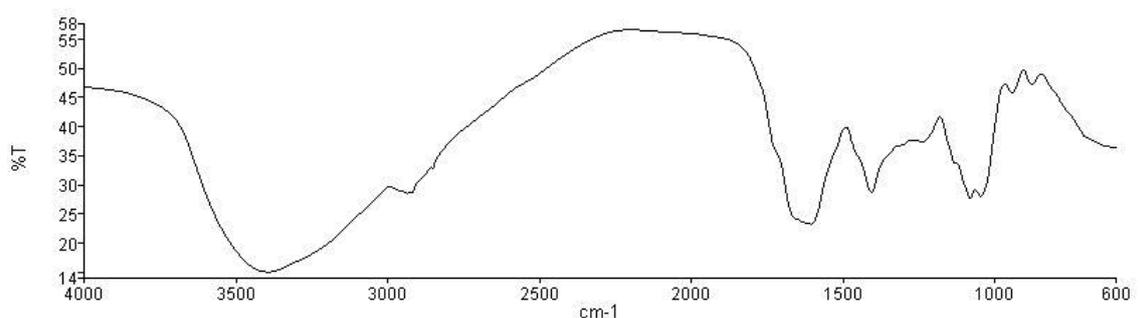
Diferentes extratos de cogumelos expressaram comportamentos contrários dependendo do tipo do solvente extrator. Gan et al. (2013) realizaram um comparativo entre extrato aquoso e etanólico provenientes de cogumelos e constataram uma maior quantidade de flavonoides no extrato etanólico em relação ao extrato aquoso. Yeh et al. (2011) em um estudo com *Grifola frondosa* (Maitake) obtiveram um teor de flavonoides significativamente maior em um extrato etanólico, quando comparado à extratos aquosos a quente e a frio. Isso se dá pelo fato dos grupos de ácidos fenólicos, flavonoides e lignanos contendo estruturas como -OH e -COOH serem extraídos com facilidade pelos solventes orgânicos de média a alta polaridade.

4.6 ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO

O extrato aquoso do fungo *M. titans* foi analisado por infravermelho para verificar a presença de alguns grupos funcionais característicos. O espectro do extrato indicou uma forte absorção ampla na faixa de 3500–3000 cm^{-1} correspondente à vibração de alongamento da hidroxila, que pode ser explicada pela interação molecular das cadeias de polissacarídeos conforme mostrado na Figura 12. Foi observada forte banda de absorção na região de 3400 cm^{-1} ,

característica de ligações OH e possivelmente aminas, comum em compostos orgânicos ácidos, fenólicos e álcoois. A banda próxima, de menor intensidade, é característica de compostos alcanos e pode ser atribuída a estiramentos simétricos e assimétricos de CH₂. Compostos lipídicos apresentam tal região de absorção, todavia não devem estar presentes visto que neste trabalho trata-se de extrato aquoso. A banda de média a forte absorção observada em 1600 cm⁻¹ pode ser proveniente de ligação C=O, assim como também é característica de deformação angular de N-H de aminas primárias. A absorção em 1400 cm⁻¹ pode ser proveniente de deformação angular de O-H e a absorção em 1050 é característica principalmente de estiramento C-O comum em álcoois. As bandas de absorção na região do infravermelho médio 1200–800 cm⁻¹ indicam a presença de polissacarídeos, que contêm diferentes estruturas e composições. O ombro próximo a 890 cm⁻¹ e bandas aproximadamente a 1110 cm⁻¹, indicam ligações β-glicosídicas e evidenciam a presença de β-glucanos (Sarangi et al., 2006; Synytsya et al., 2009; Kozarski et al., 2012; Milhorini et al., 2021). As bandas fracas em entre 850 cm⁻¹ e 930 cm⁻¹ indicam a presença de ligações α-glicosídicas (Šandula et al., 1999; Mohacek-Grošev et al., 2001; Synytsya et al., 2009).

FIGURA 12 - ESPECTROS DE FTIR OBTIDOS DO EXTRATO AQUOSO DE *Macrocybe titans*



FONTE: O autor (2021).

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o extrato aquoso a partir do fungo basidiomicete *M. titans* apresentou ação bactericida contra os microrganismos patogênicos testados, observado através do ensaio de microdiluição em caldo, disco-difusão e MEV. O extrato aquoso apresentou uma excelente bioatividade tanto nas bactérias Gram-positivas como nas bactérias Gram-negativas. Estes resultados permitem inferir que algum composto presente no extrato do *Macrocybe titans* é capaz de influenciar o crescimento, a diferenciação celular e conseqüentemente a virulência destes importantes patógenos.

Em relação à caracterização micoquímica, pela técnica de HPLC, não foi possível identificar, no extrato aquoso de *M. titans*, a presença dos compostos fenólicos alvo inicial deste trabalho. No entanto, notou-se a presença de componentes polares no cromatograma, pouco retidos na fase estacionária C18 e que devem ser melhor investigados, visto que o extrato aquoso apresentou atividade bactericida, podendo ser atribuída a algum componente presente nesta fração. O espectro de infravermelho apresentou evidências de bandas que podem ser atribuídas a presença de grupos funcionais ácidos, hidroxilados, aminas e mesmo a presença de sacarídeos.

Tais evidências apontam para uma perspectiva de necessidade de estudos complementares, visto que a comprovada ação bactericida do extrato pode ser atribuída a compostos não fenólicos, neste caso necessita-se de novas ferramentas analíticas para complementar o estudo. Fica também a perspectiva de se utilizar outras técnicas/metodologias de extração a fim de obter outros tipos de extrato e testá-los frente aos microrganismos.

REFERÊNCIAS

- ARNESEN, L. P. S., FOGERLUND, A., GRANUM, P. E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, p. 579-606, 2008.
- AYALA, E. K., SMITH, M. *Macrocybe titans*: The Mushroom Giant of the Western Hemisphere. **EDIS**. 2020. Disponível em: <<https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/PP/PP35600.pdf>>. Acesso: 23 out. 2021.
- 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**, v. 1, n. 3, p. 72–77, 2011.
- BALOUIRI, M., SADIKI, M., IBNSOUDA, S,K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 71–79, 2016.
- BOTTONE, E. J. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, 2020.
- 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.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, 3rd Edition. **CLSI document M44-A2**. M44Ed3E, 2018.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard-third edition. **CLSI document M27- A3**. Wayne, PA., 2008.
- ÇAYAN, Fatih et al. Identification and quantification of phenolic acid compounds of twenty-six mushrooms by HPLC–DAD. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 14, n. 3, p. 1690–1698, 2020
- DING, C., YANG, Z., WANG, J., LIU, X., CAO, Y., PAN, Y., HAN, L., ZHAN, S., Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with pneumonia in mainland China: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, vol. 49, pP. 119–128, 2016.

DREVETS, D. *Listeria monocytogenes*: Epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 151–165, 2008.

FAN, M. J., LIN, Y. C., SHIH, H. D., YANG, J. S., LIU, K. C., YANG, S. T. Crude extracts of *Agaricus brasiliensis* induce apoptosis in human oral cancer CAL 27 cells through a mitochondria-dependent pathway. **In Vivo Journal**, v. 25, p. 355–366, 2011.

GAN, C. H., AMIRA, B., ASMAH, R. Antioxidant analysis of different types of edible mushrooms (*Agaricus bisporous* and *Agaricus brasiliensis*). **International Food Research Journal**, v. 20, p. 1095–1102, 2013.

GAO, W., SUN, Y., CHEN, S., ZHANG, J., KANG, J., WANG, Y. Mushroom lectin enhanced immunogenicity of HBV DNA vaccine in C57BL/6 and HBsAg-transgenic mice. **Vaccine Journal**, v. 31, p. 2273–2280, 2013.

GENG, X., TIAN, G., ZHANG, W., ZHAO, Y., ZHAO, L., WANG, H. A tricholoma matsutake peptide with angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. **Scientific Reports**, v. 6, p. 24130, 2016.

GOMES, T.A.T., ELIAS, W.P., SCALETSKY, I.C.A., GUTH, B.E.C., FALCÃO, J., PIAZZA, R.M.F., FERREIRA, L.C., MARTINEZ, M.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Medical Microbiology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p.3-30, 2016.

JASIM, S. T., SAMI, A. Article Review: *Klebsiella Pneumonia*: epidemiology, virulence factors and treatment. **Journal of University of Anbar for Pure Science**, v. 14, n. 2, p. 5–10, 2020.

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. 2, p. 53–60, 2014.

KHATUA, S., GHOSH, S., ACHARYA, K. Chemical composition and biological activities of methanol extract from *Macrocybe lobayensis*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 10, p; 144–151, 2017.

KHATUA, S., ACHARYA, K. Functional Ingredients and Medicinal Prospects of Ethanol Extract from *Macrocybe lobayensis*. **Pharmacognosy Journal**, v. 10, n. 6, p. 1154–8, 2018.

KIM, H. M.; KANG, J. S.; KIM, J. Y.; PARK, S.-K.; KIM, H. S.; LEE, Y. J. Evaluation of antidiabetic activity of polysaccharide isolated from *Phellinus linteus*

in non-obese diabetic mouse. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 72–78, 2010.

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.

MENEGOTTO, J.B. **Isolamento e sequenciamento do gene PcAFP codificante para peptídeo antifúngico de *Penicillium crustosum***. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Graduação em Farmácia - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2019.

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.

MOHACEK-GROŠEV, V., BOŽAC, R., PUPPELS, G. J. Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. Spectrochim. **Acta A Mol. Biomol. Spectrosc**, v. 57, p. 2815–2829, 2001.

MONTARELO, D. P., VIEDMA, E., LARROSA, N., GONZÁLEZ, C. G., GOPEGUI, E. R. GALLEGO, I. M., JUAN, R. S., HIDALGO, N. F., ALMIRANTE, B., CHAVES, F. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteremia: association of molecular factors with the source of infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–11, 2018.

PEGLER, D. N., LODGE, D. J., NAKASONE, K. K. The pantropical genus *Macrocybe* gen. nov. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 494–504, 1998.

PEREIRA, F.C.B.N., 2020 - comunicação pessoal; dados não publicados

RAMIREZ, N. A., NIVEIRO, N., MICHLIG, A., POPOFF, O. F. First record of *Macrocybe titans* (Tricholomataceae, Basidiomycota) in Argentina. **The Journal of biodiversity data**, v. 13, n. 4, p. 153–158, 2017.

REIS F. S., LIMA R. T., MORALES P., FERREIRA I. C. F. R., VASCONCELOS M. H. (2015). Methanolic extract of *Ganoderma lucidum* induces autophagy of AGS human gastric tumor cells. **Journal of Molecules**, v. 20, n. 10, p. 17872–17882, 2015.

ŠANDULA, J., KOGAN, G., KACURÁKOVÁ, M., MACHOVÁ, E. Microbial (1→3)-β-D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydr. Polym.**, v. 38, p. 247–253, 1999.

SARANGI, I., GHOSH, D., BHUTIA, S. K., MALLICK, S. K., MAITI, T. K. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. **Int. Immunopharmacol.**, v. 6, 1287–1297, 2006.

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.

SHIGESUE, K.; KODAMA, N.; NANBA, H. Effects of maitake (*Grifola frondosa*) polysaccharide on collagen-induced arthritis in mice. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 84, p. 293–300, 2000.

SINGDEVSACHAN, S. K.; AUROSHREE, P.; MISHRA, J.; BALIYARSINGH, B.; TAYUNG, K.; THATOI, H. Mushroom polysaccharides as potential prebiotics with their antitumor and immunomodulating properties: a review. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 7, p. 1–14, 2016.

SUN, H. W., YUPING, D., PENGCHENG, B., BAI, L. The Epidemiology of Monophasic *Salmonella Typhimurium*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 17, n. 2, p. 87–97, 2019.

SYNYTSYA, A., MÍCKOVÁ, K., SYNYTSYA, A., JABLONSKÝ, I., SP EVÁ CEK, J., ERBAN, V. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: structure and potential prebiotic activity. **Carbohydr. Polym.**, v. 76, p. 548–556, 2009.

TIWARI, S., BHATT, P. *Salmonella* - A Review on Epidemiology, Pathogenesis and Prevention of Disease. **The Indian Journal of Basic and Applied Research**, v. 2, n. 1, p. 126–128, 2017.

VENTURINI, M. E., RIVERA, C.S., GONZALEZ, C., BLANCO, D. Antimicrobial activity of extracts of edible wild and cultivated mushrooms against foodborne bacterial strains. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 8, p. 1701–1706, 2008.

YANGA, X., LAIB, Y., LIA, C., YANGA, J., JIAA, M., SHENG, J. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from lower respiratory tract of ICU patients. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 2 p. 351–360, 2021.

YEH, J. Y., HSIEH, L. H., WU, K. T., TSAI, C. F. Antioxidant properties and antioxidant compounds of various extracts from the edible basidiomycete *Grifola frondosa* (Maitake). **Molecules**, v. 16, n. 4, p. 3197–3211, 2011.

WASSER, S. P. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 1–16, 2010.

WEINER, L. M., WEBB, A. K., LIMBAGO, B., DUDECK, M. A., PATEL, J., KALLEN, A. J. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 37, p. 1288–1301, 2016.

ZHANG, G.-L.; WANG, Y.-H.; NI, W.; TENG, H.-L.; LIN, Z.-B. Hepatoprotective role of *Ganoderma lucidum* polysaccharide against BCG-induced immune liver injury in mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 8, p. 728–733, 2002.

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