

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JAQUELINE SUELEN CAVAGLIERI

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO AQUOSO DO FUNGO  
BASIDIOMICETO *Macrocybe* sp.

PALOTINA

2023

JAUQUELINE SUELEN CAUAGLIERI

ANÁLISE DA ATIUIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO AQUOSO DO FUNGO  
BASIDIOMICETO *Macrocybe* sp.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Fiorini Rosado.

Coorientador: Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado.

PALOTINA

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIAS E EXATAS  
Rua Pioneiro, 2153, - - Bairro Jardim Dallas, Palotina/PR, CEP 85950-000  
Telefone: 3360-5000 - <http://www.ufpr.br/>

## ATA DE REUNIÃO

Aos quinze dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e três, às vinte e uma horas, na Sala 10 do Bloco Didático III, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Análise da Atividade Antimicrobiana do Extrato Aquoso do Fungo Basidiomiceto *Macrocybe* sp." apresentado pela discente Jaqueline Suelen Cavaglieri, orientado pela Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, a orientadora e Presidente da Banca concedeu a palavra à discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir o discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído ao discente as seguintes notas: Profa. Dra. Dilcemara Cristina Zenatti, nota: 98 (noventa e oito), Profa. Dra. Raquel Stroher, nota: 95 (noventa e cinco), e Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, nota: 100 (cem). A nota final do discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 98 (noventa e oito). As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pela discente sob acompanhamento de sua orientadora. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **RAQUEL STROHER, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 15/02/2023, às 23:21, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **DILCEMARA CRISTINA ZENATTI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 15/02/2023, às 23:21, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FIORINI ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 15/02/2023, às 23:22, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **5300824** e o código CRC **D85AF609**.

*Dedico este trabalho aos meus queridos e amados avô (in memoriam) e avó, que sempre acreditaram em meu potencial e nunca mediram esforços pela minha criação e educação, foram, sempre, grandes incentivadores para que eu me dedicasse aos estudos. Espero estar orgulhando vocês...*

*Vos amarei eternamente!*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar e acima de tudo, a Deus, pela minha vida, e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da graduação. Por ter me sustentado até aqui.

À Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina, em especial ao Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, por todos os momentos incríveis vividos, por todo o conhecimento adquirido e até mesmo pelos desafios enfrentados, que com certeza me fizeram crescer...

A todo o corpo docente: professores, vocês foram/são incríveis. Deixo aqui a minha total admiração e agradecimento.

Ao Laboratório de Microbiologia e em especial ao NEMA (Núcleo Experimental de Micologia Aplicada), locais em que pude desenvolver os experimentos da melhor forma possível... à toda a equipe de pesquisadores e técnicos, por sempre oferecer toda ajuda e um ambiente agradável para trabalharmos.

A minha orientadora, Adriana Fiorini Rosado, onde palavras são insuficientes para agradecer por todo o carinho, apoio, incentivo e conhecimento compartilhado. Obrigada por nunca ter medido esforços para estar presente e sempre orientando de forma magnífica. Tenha certeza que você inspira muita gente, inclusive a mim. Obrigada, de coração!

À minha família, em especial a minha avó, que sempre me incentivou e fez tudo que estava ao seu alcance para eu pudesse me formar com maestria. Te amo, vovó, obrigada por tudo!

À todos os amigos que fiz durante a trajetória acadêmica, e também, aos "velhos" amigos que cultivo desde sempre... Obrigada, meus amigos, pelo apoio e compreensão aos muitos convites recusados quando eu não podia me fazer presente, por conta dos compromissos da faculdade, trabalhos e provas.

Em especial, ao meu companheiro, Fred, que nunca mediu esforços para apoiar toda a minha trajetória acadêmica, estando ao meu lado nos momentos difíceis e também nos bons momentos de alegria. Amo você, com todo o meu coração!

Por fim, gostaria de agradecer a banca, pelo aceite em fazer parte. Com certeza irão contribuir com sugestões excelentes para este projeto. Muito obrigada!

## RESUMO

Cogumelos são macrofungos pertencentes ao filo Basidiomycota e representam cerca de 20.000 espécies em todo o mundo. São importantes decompositores da matéria orgânica e apresentam uma ampla variedade de bioprodutos oriundos de seus metabólitos secundários, os quais podem ter diversas aplicações, como a atividade antimicrobiana. Diante da problemática global do aumento de microrganismos resistentes à fármacos sintéticos, estudos acerca de novas substâncias farmacológicas têm sido cada vez mais importantes. Desta forma, o presente trabalho buscou avaliar o potencial antimicrobiano do extrato aquoso do cogumelo *Macrocybe* sp. frente à microrganismos patogênicos de importância médica. O cogumelo foi coletado na cidade de Toledo-PR e o extrato foi obtido pelo método de sonicação de ponteira, em água destilada, utilizando 2,5 g de basidiomas frescos. A atividade antimicrobiana do extrato foi testada contra as bactérias *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* O157:H7, leveduras (*Candida albicans* e *C. tropicalis*) e fungos filamentosos (*Sporothrix schenckii* e *Aspergillus fumigatus*), pelos métodos de microdiluição em caldo e poço-difusão. Os fungos filamentosos foram ensaiados apenas pelo método de poço-difusão. Para o teste de microdiluição em caldo foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato, capaz de inibir o crescimento dos microrganismos. Essa atividade foi confirmada pelos testes de CBM e CFM, os quais determinaram, respectivamente, as concentrações bactericida e fungicida mínima. O extrato apresentou pronunciada atividade contra as bactérias *K. pneumoniae* e *S. aureus*, e uma menor atividade contra *B. cereus* e *E. coli* O157:H7, para ambos os ensaios. Comparando as leveduras, *C. tropicalis* foi mais sensível ao extrato e não foi possível determinar a CIM para *C. albicans*. No teste de poço-difusão, não foi possível verificar a presença de halo de inibição para ambas as leveduras. Dentre os fungos, *S. schenckii* foi mais susceptível ao extrato do que *A. fumigatus*. Conclui-se que o extrato aquoso de *Macrocybe* sp. foi capaz de inibir de forma considerável o crescimento de bactérias e fungos, logo, seu potencial biotecnológico deverá ser explorado a fim de haja um melhor entendimento a respeito de sua atividade.

Palavras-chave: *Macrocybe* sp.. Atividade antimicrobiana. Biotecnologia. Bioensaios. Microrganismos patogênicos. Bactérias. Fungos.

## ABSTRACT

Mushrooms are macrofungi belonging to the phylum Basidiomycota and represent about 20,000 species worldwide. They are important decomposers of organic matter and present a wide variety of bioproducts from their secondary metabolites, which can have several applications, such as antimicrobial activity. Faced with the global problem of the increase in microorganisms resistant to synthetic drugs, studies on new pharmacological substances have been increasingly important. Thus, the present work sought to evaluate the antimicrobial potential of the aqueous extract of the mushroom *Macrocybe* sp. against pathogenic microorganisms of medical importance. The mushroom was collected in the city of Toledo-PR and the extract was obtained by the sonication method with a tip, in distilled water, using 2.5 g of fresh basidiomes. The antimicrobial activity of the extract was tested against bacteria *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* O157:H7, yeasts (*Candida albicans* and *C. tropicalis*) and filamentous fungi (*Sporothrix schenckii* and *Aspergillus fumigatus*), by microdilution methods in broth and well-diffusion. Filamentous fungi were tested only by the well-diffusion method. For the microdilution test in broth, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the extract, capable of inhibiting the growth of microorganisms, was determined. This activity was confirmed by CBM and CFM tests, which determined, respectively, the minimum bactericidal and fungicidal concentrations. The extract showed pronounced activity against *K. pneumoniae* and *S. aureus* bacteria, and a lower activity against *B. cereus* and *E. coli* O157:H7, for both assays. Comparing the yeasts, *C. tropicalis* was more sensitive to the extract and it was not possible to determine the MIC for *C. albicans*. In the well-diffusion test, it was not possible to verify the presence of an inhibition halo for both yeasts. Among fungi, *S. schenckii* was more susceptible to the extract than *A. fumigatus*. It was concluded that the aqueous extract of *Macrocybe* sp. was able to considerably inhibit the growth of bacteria and fungi, so its biotechnological potential should be explored in order to have a better understanding of its activity.

Keywords: *Macrocybe* sp. Antimicrobial activity. Biotechnology. Bioassays. Pathogenic microorganisms. Bacteria. Fungi.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA BÁSICA DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DOS COGUMELOS BASIDIOMICETOS.....	17
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO BASIDIOMA COMPLETO....	18
FIGURA 3 – SEPTO DOLIPORO COBERTO POR MEMBRANA, PARENTOSSOMA, EM AMBOS OS LADOS.....	19
FIGURA 4 – CICLO DE VIDA DOS BASIDIOMYCOTAS.....	20
FIGURA 5 – FOTOMICROGRAFIA de <i>Bacillus cereus</i> .....	25
FIGURA 6 – CULTURA E MICROMORFOLOGIA DE <i>Staphylococcus aureus</i> .....	25
FIGURA 7 – MICROMORFOLOGIA DE <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	26
FIGURA 8 – MICROMORFOLOGIA DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	27
FIGURA 9 – MICROMORFOLOGIA DE <i>Candida albicans</i> .....	28
FIGURA 10 – MICROMORFOLOGIA DE <i>Candida tropicalis</i> .....	29
FIGURA 11 – MICROMORFOLOGIA DE <i>Sporothrix</i> spp.....	30
FIGURA 12 – CICLO DE VIDA E MICROMORFOLOGIA DO FUNGO FILAMENTOSO <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	31
FIGURA 13 – ESPÉCIME DE <i>Macrocybe</i> sp. UTILIZADA NESTE TRABALHO.....	33
FIGURA 14 – ANÁLISE VISUAL DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA PLACA TESTADA COM A BACTÉRIA <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	38
FIGURA 15 – ANÁLISE VISUAL DA CIM DA PLACA TESTADA COM A BACTÉRIA <i>Bacillus cereus</i> .....	39
FIGURA 16 – ANÁLISE VISUAL DA CIM DA PLACA TESTADA COM A BACTÉRIA <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	39
FIGURA 17 – ANÁLISE VISUAL DA CIM DA PLACA TESTADA COM A BACTÉRIA <i>Staphylococcus aureus</i> .....	40

FIGURA 18 – ANÁLISE VISUAL DA CIM DA PLACA TESTADA COM A LEVEDURA <i>Candida albicans</i> .....	41
FIGURA 19 – ANÁLISE VISUAL DA CIM DA PLACA TESTADA COM A LEVEDURA <i>Candida tropicalis</i> .....	41
FIGURA 20 – CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) DO EXTRATO FRENTE ÀS BACTÉRIAS E LEVEDURAS TESTADAS.....	42
FIGURA 21 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE <i>Macrocybe</i> sp. PELA TÉCNICA DE POÇO-DIFUSÃO.....	45

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO APÓS AS DILUIÇÕES SERIADAS.....	35
FIGURA 2 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO AQUOSO EXPRESSA EM MIC (mg/mL).....	43
FIGURA 3 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFUNGICA DO EXTRATO AQUOSO DE <i>Macrocybe</i> sp. PELO ENSAIO DE POÇO-DIFUSÃO.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C - Grau(s) Celsius  
x 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 etilendiamino tetra-acético  
g - Gramas  
L - Litros  
M - Molar  
mg - Miligrama(s)  
mL - Mililitro(s)  
mm - Milímetro(s)  
mM - Milimolar  
mol - Mol(e)  
nm - Nanômetro(s)  
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  
U.V. - Radiação ultravioleta

## LISTA DE SIGLAS

ATCC - American Type Collection Culture  
BHI - *Brain Heart Infusion*  
TSA - Ágar Triptona de Soja  
C13 RMN - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13  
CBM - Concentração Bactericida Mínima  
CFM - Concentração Fungicida Mínima  
CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute*  
DNA – Ácido Desoxirribonucléico  
CG-MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas  
ITS - Espaçador Transcricional Interno  
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura  
CIM - Concentração Inibitória Mínima  
MH - Müeller-Hinton  
NCBI - National Center for Biotechnology  
NEMA - Núcleo Experimental de Micologia Aplicada  
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase  
rDNA - DNA Ribossomal  
RNA - Ácido Ribonucléico  
UFC - Unidades Formadoras de Colônias  
UFPR - Universidade Federal do Paraná  
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
HPSEC-MALLS - *High-Performance Size-Exclusion Chromatography coupled with on-line Multi-angle Laser Light Scattering*  
GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas  
RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
EHEC - *Escherichia coli* entero-hemorrágica  
VT – Verotoxina  
SLTs - Shiga-like toxinas  
DTA – Doenças de Transmissão Alimentar  
NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards*  
CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute, 2003, M7-A6*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 CONTEXTO E PROBLEMA.....	13
1.2 OBJETIVOS.....	15
1.2.1 Objetivo Geral.....	15
1.2.2 Objetivos Específicos.....	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1 REINO FUNGI .....	16
2.2 FILO BASIDIOMYCOTA .....	18
2.3 COGUMELOS DO GÊNERO <i>Macrocybe</i> .....	20
2.4 COMPOSTOS E SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE .....	21
2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	23
2.6 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS .....	24
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DOS ENSAIOS .....	32
3.2 CEPAS BACTERIANAS E FÚNGICAS .....	32
3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DO <i>Macrocybe</i> sp. ....	32
3.3.1 Coleta da espécie e caracterização .....	32
3.3.2 Preparo do extrato de <i>Macrocybe</i> sp. ....	33
3.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE, POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO, DAS BACTÉRIAS E LEVEDURAS AO EXTRATO DE <i>Macrocybe</i> sp. ....	34
3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) .....	35
3.6 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE POR POÇO-DIFUSÃO.....	36
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
4.1 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DOS MICRORGANISMOS AO EXTRATO AQUOSO DE <i>Macrocybe</i> sp. ....	37
4.1.1 CIM do extrato frente às bactérias .....	37
4.1.2 CIM do extrato frente às leveduras .....	40
4.1.3 Determinação da CBM e CFM .....	41
4.2 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DOS MICRORGANISMOS AO EXTRATO POR POÇO-DIFUSÃO EM ÁGAR.....	43
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>46</b>
REFERÊNCIAS .....	47

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONTEXTO E PROBLEMA

Os fungos são organismos eucariontes e heterotróficos, podendo ser unicelulares, como é o caso das leveduras, pluricelulares, como os filamentosos ou, até mesmo, dimórficos, podendo se apresentar nas duas formas (leveduriforme e filamentosa). Pertencem ao reino Fungi e sua classificação está em constante mudança com a descoberta de novas espécies. Durante um tempo, o reino Fungi foi dividido em quatro filos, sendo eles Ascomycota, Zygomycota, Deuteromycota e Basidiomycota (MAIA e CARVALHO, 2010). De acordo com Huff (2022), uma nova classificação surgiu, através de estudos filogenéticos, proposto por um grande grupo de micologistas, Hibbet e colaboradores (2007), definindo os fungos em sete novos filos, sendo eles Microsporidia, Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota. Assim, na nova classificação do reino dos fungos, são considerados sete filos, dez subfilos, trinta e cinco classes, doze subclasses e cento e vinte e nove ordens (HIBBETT et al., 2007).

Eles são produtores de esporos e em sua maioria sapróbios ambientais, degradando a matéria orgânica. Esta atividade de decomposição da biosfera, é de extrema importância, visto que, permite a ciclagem dos nutrientes nos diferentes tipos de ecossistemas, pois, para isso, possuem um rico complexo enzimático, o qual quebra as substâncias orgânicas, disponibilizando-nas novamente para a biosfera (MOORE et al., 2011).

Entre os basidiomicetos, estão os cogumelos, que são caracterizados pela produção do basídio, estrutura na qual são produzidos e armazenados os esporos (MOORE et al., 2011). Estima-se que o número de espécies de cogumelos na Terra seja cerca de 150.000, sendo atualmente reconhecidas e identificadas aproximadamente 22.000 espécies (WASSER, 2011; ALVES et al., 2012).

Os cogumelos, como outros fungos, produzem naturalmente uma grande diversidade de biomoléculas com propriedades nutricionais e medicinais, que são utilizadas em seu ambiente natural como estratégia para sobrevivência (ALVES et al., 2012; AVIN et al., 2012; KLAUS et al., 2015). Devido à síntese destas substâncias bioativas de seu metabolismo secundário, esses macrofungos têm sido alvo de muitos

estudos nos últimos anos e desta forma uma ampla variedade de substâncias de origem fúngica têm sido exploradas para uso farmacêutico, tais como, antibióticos, agentes hipocolesterolêmicos, antitumorais, antiparasitários, antivirais, antifúngicos, imunostimulantes, antioxidantes, imunossupressores, hepatoprotetores, entre outros (BRIZUELA et al., 1998; CARVALHO et al., 2007; WASSER, 2011; ALVES et al., 2012). Eles são considerados, também, alimentos nutracêuticos, devido à sua grande capacidade preventiva à várias disfunções e patologias (VALVERDE et al., 2015).

O Brasil é um país que oferece uma ampla biodiversidade, contribuindo para o desenvolvimento de novas pesquisas em busca de substâncias mais eficazes contra a resistência dos microrganismos patogênicos. Neste contexto, o grupo de pesquisa no qual o trabalho foi desenvolvido, Núcleo Experimental de Micologia Aplicada – NEMA, tem por objetivo a prospecção de fungos em diferentes processos biotecnológicos. Dentre suas linhas de pesquisa, vem realizando estudos sobre o potencial antimicrobiano de extratos do cogumelo Basidiomiceto *Macrocybe titans*. O gênero *Macrocybe* é conhecido devido a suas características morfológicas, já que as espécies desse gênero apresentam enormes basidiocarpos carnudos e coloração bege, crescendo, na maioria das vezes em madeira morta ou no solo, em grupos ou solitários e são considerados comestíveis (MATTOS, 2020).

O gênero *Macrocybe*, de grande abrangência na América do Sul e América Central, é de especial interesse em nossa equipe de pesquisa, pois há pouquíssimos relatos na literatura sobre o potencial antimicrobiano de seus extratos.

Atualmente, muitos medicamentos produzidos modernizaram a terapia medicinal, no entanto, novas doenças infecciosas vêm surgindo, gerando resistência a estes medicamentos (HUFF, 2022). Com o aumento desses microrganismos resistentes, principalmente os oportunistas, que acometem pacientes imunossuprimidos em ambientes hospitalares, estudos acerca de novas substâncias farmacológicas têm sido cada vez mais importantes.

Portanto, a contextualização proposta para o presente trabalho teve como enfoque gerar contribuições para a pesquisa, explorando um possível potencial antimicrobiano contra microrganismos patogênicos de interesse médico, através da ação do extrato aquoso de uma espécie não identificada de um macrofungo do gênero *Macrocybe*.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi testar e analisar a atividade antibacteriana e antifúngica do extrato aquoso do cogumelo basidiomiceto *Macrocybe* sp., frente ao crescimento de microrganismos patogênicos.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a atividade antibacteriana (bactericida e/ou bacteriostática) do extrato aquoso de *Macrocybe* sp. frente às cepas de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* O157:H7, para determinar a sua Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM);
- Verificar, por meio dos testes de CIM e Concentração Fungicida Mínima (CFM), a atividade fungicida e/ou fungistática do extrato, contra os fungos leveduriformes *Candida albicans* e *C. tropicalis*.
- Determinar o efeito do extrato sobre o crescimento das bactérias e leveduras citadas acima e, também, dos fungos *Sporothrix schenckii* e *Aspergillus fumigatus* através do teste de poço-difusão em ágar.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 REINO FUNGI

Fungo, do Latim *fungus* (genitivo singular), ‘fungo’; ‘cogumelo’. Os fungos foram reconhecidos como um reino “à parte” na década de 60, quando o pesquisador Whittaker (1956), propôs a nova classificação dos reinos, sendo estes: Animália, Fungi, Monera, Plantae e Protista. O Reino Fungi é representado por organismos aclorofilados, eucariontes, heterotróficos, que podem ser uni ou pluricelulares (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; REIS, 2010; CHUDZIK, 2015) e que possuem glicogênio como polímero de reserva (GUIMARÃES, 2011).

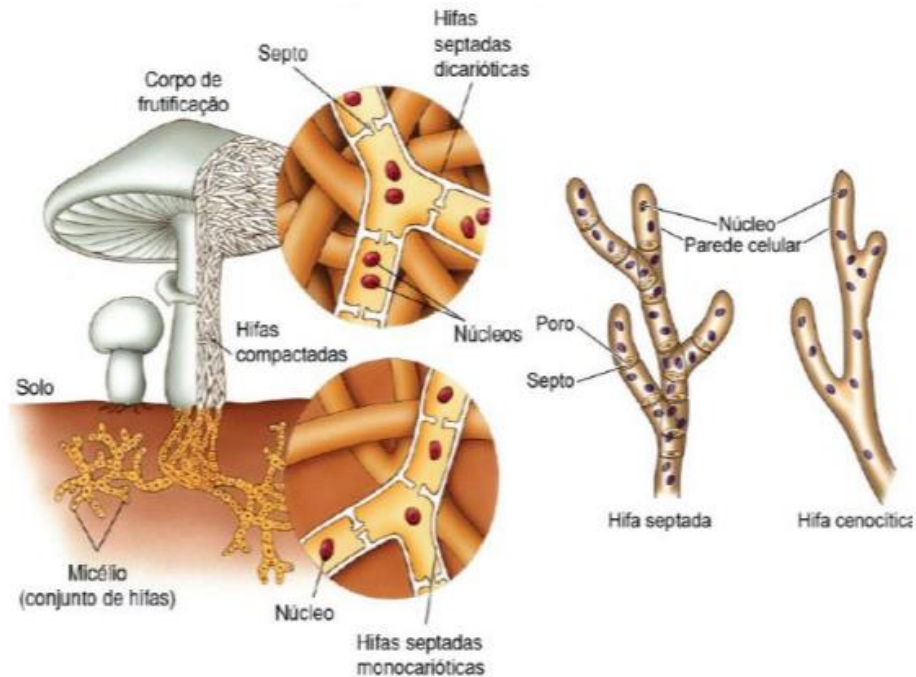
Os fungos são de grande interesse biotecnológico pois possuem extrema importância em áreas diversas, como na produção de alimentos fermentados e bebidas, na indústria farmacêutica, na síntese de substâncias de interesse médico, no processo de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, na produção de enzimas de interesse industrial, na biotransformação, entre outras. Além disto, os mesmos são os agentes mais importantes de degradação de matéria orgânica na Terra, visto que, degradam celulose e lignina com alta eficiência (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004). Isto se deve ao fato de sua peculiar digestão extracorpórea, onde lançam suas enzimas digestivas sobre a matéria orgânica e a absorvem após sua decomposição (MATTOS, 2020).

De acordo com Kirk et al. (2008), o Reino Fungi é dividido em 8 filos distintos, sendo estes: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Neocallimastigomycota, Glomeromycota, Microsporidia, Blastocladiomycota e Basidiomycota.

Os dois principais representantes de fungos superiores estão nos filos Ascomycota e Basidiomycota, e se distanciam entre 390 milhões e 1,5 bilhões de anos (LUCKING et al., 2009). Os Ascomicetos e Basidiomicetos são organismos heterótrofos, saprobiontes ou parasitas, cujas células são chamadas de hifas, essas, são uma espécie de malha filamentosa, que se agrupam formando um tecido denominado micélio, que organiza o corpo frutífero do cogumelo (FIGURA 1) (TERÇARIOLI et al., 2010). Para Mattos (2020), a presença do septo é característica bastante relevante de identificação dos grupos de fungos. Em um grupo estão os

fungos que possuem micélios sem septos, os cenocíticos e no outro, fungos cujo os micélios são septados, os apocíticos (FIGURA 1).

FIGURA 1 - ESTRUTURA BÁSICA DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DOS COGUMELOS BASIDIOMICETOS.



FONTE: O autor, imagem esquemática adaptada de Scholarly Community Encyclopedia.

De acordo com Mattos (2020), os fungos possuem, também, um sistema reprodutivo bastante elaborado. Quanto à sexualidade, eles podem ser sexuados ou assexuados, homotáticos (organismo que completa o ciclo de vida a partir de um único talo) ou heterotático (para completar o ciclo de vida necessita de dois talos compatíveis). Se reproduzem através de estruturas chamadas esporos, denominados de ascósporos, nascidos endogenamente em células chamadas ascas, para a classe dos Ascomycetes e, basidiósporos, que nascem exogenamente, em estruturas chamadas de basídios, para a classe dos Basidiomycetes (LUZ, 2008).

De acordo com Silveira (1995), enquanto os esporos sexuados são resultados da fusão de núcleos de duas linhagens opostas de cruzamento de uma mesma espécie de fungo. Os esporos assexuados formam-se por mitose e posterior divisão celular, sem fusão de núcleos. Assim, quando os esporos germinam, tornam-se organismos geneticamente idênticos ao parental.

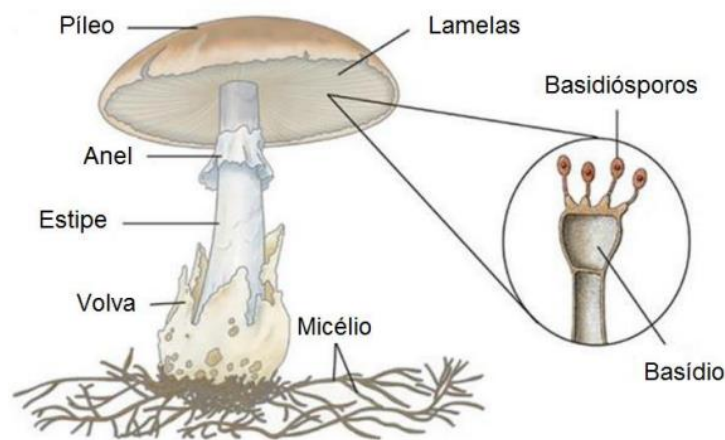
A respeito da grande diversidade existente no Reino Fungi, e da variedade de ambientes onde são encontrados, estima-se que 98% dos fungos conhecidos

pertencem ao grupo dos Ascomycetos e, os outros 2% estão incluídos no grupo dos Basidiomycetos (TERÇARIOLI et al., 2010).

## 2.2 FILO BASIDIOMYCOTA

O filo Basidiomycota é constituído por fungos conhecidos como “orelha-de-pau”, cogumelos, ferrugens, entre outros. É considerado o segundo maior filo do Reino Fungi. Decompositores plenamente adaptados à vida terrestre, são caracterizados por possuírem hifas septadas, as quais formam o basidioma, em alguns representantes do filo, como nos cogumelos. O basidioma é uma estrutura bem característica, que surge para a reprodução desses fungos, servindo como forma de dispersão dos esporos, é dito completo quando constituído por Píleo, Himênio, Estipe, Anel e Volva (FIGURA 2) (MENEZES, 2014).

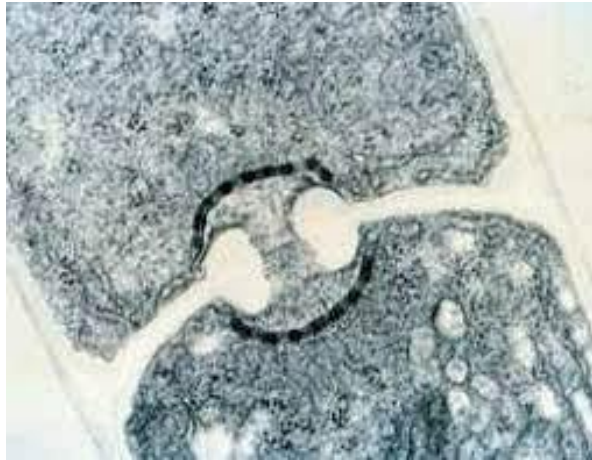
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO BASIDIOMA COMPLETO.



Fonte: O autor, adaptação de Menezes, 2014.

As paredes transversais das hifas possuem septos com poros, que, em muitas espécies, apresentam margem dilatada chamada dolíporo, cobertas em ambos os lados por uma membrana denominada parentossoma, que é formada pelo retículo endoplasmático, a qual impede a passagem dos núcleos mantendo a condição dicariótica (FIGURA 3). O basídio pode ser septado ou claviforme e unicelular, e os basidiósporos germinam por meio de hifas germinativas e raramente com esporos secundários ou conídios (BRESINSKY et al., 2012).

FIGURA 3 - SEPTO DOLIPORO COBERTO POR MEMBRANA, PARENTOSSOMA, EM AMBOS OS LADOS.



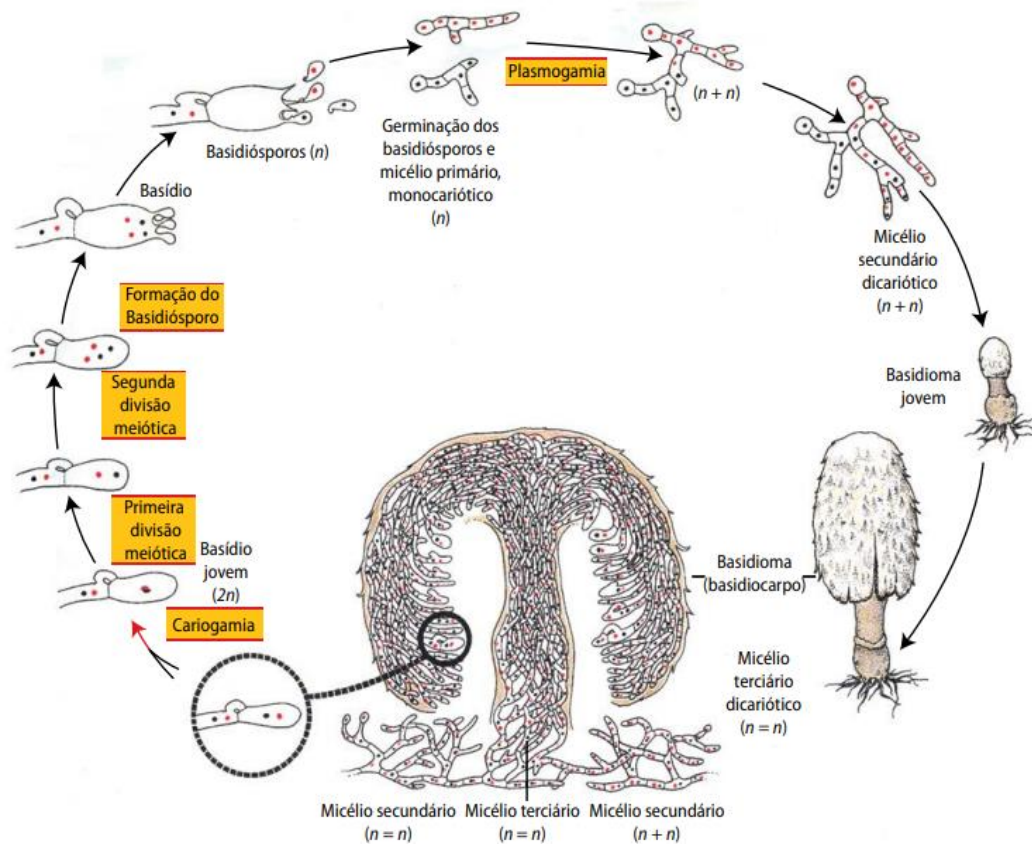
Fonte: Margarete Camargo, 2013. Disponível em: <<https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/fitossanidade/MARGARETECAMARGO/basidiomiceto2013.pdf>>

Ao longo do desenvolvimento dos Basidiomycota, a maioria passa pelas fases monocariótica (micélio primário) e dicariótica (micélio secundário e terciário). Algumas espécies podem apresentar células apicais, no micélio secundário, que são hifas modificadas ou “grampos de conexão”, conhecidos também como fíbulas ou ansas. Tal filo tem grande importância no ciclo do carbono e de outros elementos, como fósforo e nitrogênio, além de realizar a ciclagem de matéria orgânica (SANTOS, 2015).

A formação do basidioma, ainda dicariótico, ocorre em condições ambientais específicas, por meio de uma diferenciação. No basidioma, especificamente nos basídios, que formam a porção himenial, ocorre a cariogamia ( $2n$ ) seguida da meiose, que reestabelece a condição haploide ( $n$ ) nos esporos (basidiosporos), que por sua vez são maturados externamente ao basídio (FIGURA 4) (SANTOS, 2015).

Assim, basídios e ascos são considerados homólogos, mas diferentes, pois independentemente do número, um forma seus meiosporos externamente, enquanto no outro acontece internamente. Assim como nos Ascomycota, os basídios se originam em uma região específica do basidioma, conhecida como himênio, que macroscopicamente no basidioma pode configurar um tipo específico de himenóforo (lamelar, tubular, liso, denteado, etc.). Algumas espécies de Basidiomycota apresentam ciclos de vida mais complexos, como é o caso da ferrugem, onde ocorre até quatro tipos de esporos, sendo a principal semelhança com o ciclo anterior a formação de basídio que envolve a cariogamia (SANTOS, 2015).

FIGURA 4 – CICLO DE VIDA DOS BASIDIOMICETOS



Fonte: Representação esquemática adaptada de RAVEN (2001).

### 2.3 COGUMELOS DO GÊNERO *Macrocybe*

Historicamente, os autores Bigelow & Kimbrough (1980) encontraram um cogumelo gigante de cerca 75 cm de comprimento no centro e norte da Flórida. O cogumelo pertencia ao gênero *Tricholoma*, onde foi proposta uma nova espécie: *Tricholoma titans*. Durante um tempo, as espécies de *Macrocybe* eram confundidas com este gênero devido às semelhanças de seus basidiomas.

Em 1998, Pegler e colaboradores propuseram a caracterização do novo gênero *Macrocybe*, após considerações genéticas e morfológicas distintas do *Tricholoma*, incluindo a classificação taxonômica da espécie *titans*: Reino *Fungi*, Filo *Basidiomycota*, Sub-filo *Agaricomycotina*, Classe *Agaricomycetes*, Ordem *Agaricales*, Família *Tricholomataceae*, Gênero *Macrocybe* e Espécie *titans* (KARLSEN-AYALA e SMITH, 2020).

Sua distribuição é pantropical, sendo encontrado em regiões tropicais e subtropicais como Caribe, América Central, México, América do Sul e na Flórida e Geórgia, nos Estados Unidos.

De acordo com Brewer (2013), o gênero *Macrocybe* possui oito espécies, sendo elas: *M. crassa* – Sri Lanka, Índia, Malásia e Tailândia; *M. gigantea* – Índia (Bengala Ocidental), Paquistão e Nepal; *M. lobayensis* – África Ocidental; *M. pachymeres* – Sri Lanka e Índia; *M. praegrans* – Brasil; *M. sardoa* – Sardenha (ilha italiana no mar Mediterrâneo); *M. spectabilis* – Ilhas Maurício (África), Japão e Havaí; *M. titans* – EUA, México, Caribe, América Central e do Sul.

A espécie *M. titans* tem sido alvo de estudo pela nossa equipe de pesquisa, tendo sido testadas diversas linhagens dessa espécie. Na América do Sul, alguns pesquisadores identificaram o *M. titans* pela primeira vez em 2017, na Argentina (RAMIREZ et al., 2017). No Brasil, foi reportado pela primeira vez pelo especialista em taxonomia de macrofungos, André de Meijer, na cidade de Antonina-PR (WISNIEWSKI et al., 2010).

Em geral, o *M. titans* possui estrutura grande e robusta, tendo seu basidioma considerado o terceiro maior entre os cogumelos lamelados, com um tamanho que pode atingir de 8 a 100 cm, e um estipe de 7 a 20 cm, chegando a uma massa de 30 kg ou mais, quando desenvolvidos em condições ideais (PEGLER et al., 1998; DELONG e BREWER, 2013). Possui um píleo convexo com tonalidades que variam de branco e creme a tons escuros. Se desenvolvem sozinhos ou em grupos, podendo ser encontrados crescendo em áreas urbanas, gramados, áreas arenosas, em solos perturbados pelo paisagismo ou, até mesmo, em áreas de cultivo agrônômico, geralmente em aproximadamente um ano após a perturbação do solo (PEGLER et al., 1998).

## 2.4 COMPOSTOS E SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE

O cultivo de cogumelos para consumo humano ganhou popularidade mundial. Algumas espécies de basidiomicetos têm sido utilizadas como iguarias gastronômicas ou suplementos alimentares, devido ao seu sabor e alto valor nutricional; além do uso terapêutico, fortalecendo o sistema imune e apresentando atividades antioxidante e antimicrobiana (GIRI et al., 2012; VETCHINKINA, 2018).

Na literatura, existem alguns estudos desenvolvidos com o gênero *Macrocybe*. Em 2016, na Tailândia, Inyod e colaboradores associaram a espécie *M. crassa* para produção comercial, considerando uma espécie comestível, pois, essa, fornece alto teor de macronutrientes como proteínas, fibras e beta-glucanas e micronutrientes como potássio, cálcio, magnésio, sódio, ferro, zinco e manganês (CALONGE et al., 2007; MATTOS, 2020).

Na Índia, pesquisadores utilizaram o extrato etanólico do cogumelo *Macrocybe crassa* com o objetivo de verificar atividade antimicrobiana, antioxidante e compostos presentes através do HPLC. Dos compostos identificados, 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, ácido p-cumárico, compostos fenólicos, flavanoides, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno e licopeno, sendo que a porção fenólica mostrou efeito antimicrobiano contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas (KHATUA e ACHARYA, 2014).

No Brasil, o extrato de *Macrocybe titans* foi analisado por alguns pesquisadores que identificaram a presença de  $\beta$ -glucanas e ação antioxidante e citotóxica (KNAK et al., 2009).

De acordo com Sitó-Junior (2022), em 2018, colaboradores da UFPR, do campus de 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).

O grupo de pesquisa em que o trabalho foi realizado, têm desenvolvido diversos estudos com o *M. titans*. Recentemente, foi testado e provado o efeito antimicrobiano do extrato, frente a diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SITO-JUNIOR, 2022) e outras leveduras como *Trichosporon* e *Candida tropicalis* (JUSTO, 2020, BERTOCCO, 2022), observando resultados promissores.

Com isso, diante do grande potencial desses macrofungos e dos pouquíssimos relatos publicados de pesquisas desenvolvidas com este gênero,

vemos a importância de investigações e análises dessa e demais espécies do auspicioso *Macrocybe* e suas atividades biológicas.

## 2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A palavra “antibiótico” deriva do termo *antibiosis*, que literalmente significa “contra a vida” (anti = contra; bios = vida). O conceito formal, mais aceito pelos cientistas especializados, define antibiótico como uma substância química produzida por microrganismos que, em baixas concentrações, tem a capacidade de inibir ou matar seletivamente outros microrganismos. A definição formal não inclui os compostos sintéticos, no entanto, esses são incluídos na categoria de “antimicrobianos” juntamente com outros compostos naturais e seus derivados, que também podem ser subdivididos de acordo com o tipo específico de microrganismos que devem ser inibidos, como, por exemplo, antifúngicos, antibacterianos, etc (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Os antimicrobianos podem ser classificados de acordo com sua origem, efeito antimicrobiano, espectro de atividade e mecanismo de ação. Quanto à origem, podem ser naturais, sintéticos ou semi-sintéticos. Considerando o efeito dos antimicrobianos, existem os bacteriostáticos e os bactericidas. De acordo com o escopo de ação, os medicamentos antibacterianos são divididos em três categorias: espectro reduzido, espectro intermediário e amplo espectro (SILVA, 1999).

Independente da variedade de medicamentos antimicrobianos disponíveis, as infecções microbianas ainda são uma das principais causas de mortalidade mundial. Esta ameaça é agravada pelas cepas de microrganismos resistentes aos medicamentos atuais, tornando-se uma problemática global. Hoje, o uso excessivo de antibióticos e antifúngicos é uma das principais razões para o aumento da resistência aos medicamentos. A complexidade do tratamento das Infecções multirresistentes têm aumentado a busca por novos e eficazes antimicrobianos, especialmente oriundos de produtos naturais, como os cogumelos, por exemplo (LI e WEBSTER, 2018).

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 de cogumelos, um processo de triagem inicial para espécies de macrofungos com propriedades antimicrobianas é frequentemente baseado na ecologia da região onde os cogumelos crescem ou no uso tradicional destes (GIRI et al., 2012).

Durante o crescimento desses macrofungos, vários metabólitos primários e secundários podem ser acumulados como produtos intracelulares e extracelulares, incluindo compostos fenólicos, policetídeos, terpenóides, esteróides, aminoácidos não-protéicos, proteínas antibacterianas ou antifúngicas e ácidos graxos voláteis (CHE, et al., 1998; ZJAWIONY, 2004). Muitos destes compostos fenólicos citados, especialmente os de baixo peso molecular, foram identificados em vários cogumelos, e tiveram sua atividade antimicrobiana observada em diferentes ensaios.

Ainda, de acordo com o solvente que será utilizado na extração, o tipo e a concentração dos compostos bioativos se diversificarão no extrato final, refletindo nos efeitos das atividades biológicas, farmacológicas e antimicrobianas (MATIJAŠEVIĆ et al., 2016).

## 2.6 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS

### 2.6.1 Bactérias patogênicas: Gram-positivas e Gram-negativas

De acordo com um boletim sobre a distribuição temporal dos surtos notificados de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, publicado pela Secretaria de Vigilância em Saúde em 2020, no período de 2007 a 2015, foi constatado cerca de 2.243 pacientes em que o agente etiológico identificado foi causado principalmente por *Salmonella* spp. (25,17%), *Escherichia coli* (23,42%) e *Staphylococcus* (18,61%). *Bacillus cereus* também foram notificados, cerca de 7,4 % dos casos. Além disso, algumas bactérias são causadoras epidemiológicas de infecções em pacientes hospitalares (TACCONELLI et al., 2017).

*Bacillus cereus* é uma bactéria Gram-positiva, aeróbica facultativa que se apresenta sob forma de bastonetes (bacilos) de grandes dimensões e são, geralmente, móveis (FIGURA 5). Formadora de endósporos, que é uma estrutura dormente, altamente resistente e não reprodutiva, a qual permite à bactéria sobreviver sob condições adversas e voltar ao estágio metabolicamente ativo quando as condições são propícias. Este microrganismo pode ser encontrado facilmente em

alimentos secos como ingredientes farináceos, leite em pó e temperos sob forma de esporos. São resistentes ao calor, já que os endósporos sobrevivem ao processo de cocção dos alimentos. O fator de virulência varia de acordo com as linhagens e sua patogenicidade está associada à produção de toxinas diarreica e emética (ARNESEN, et al., 2008; BOTTONE, 2020).

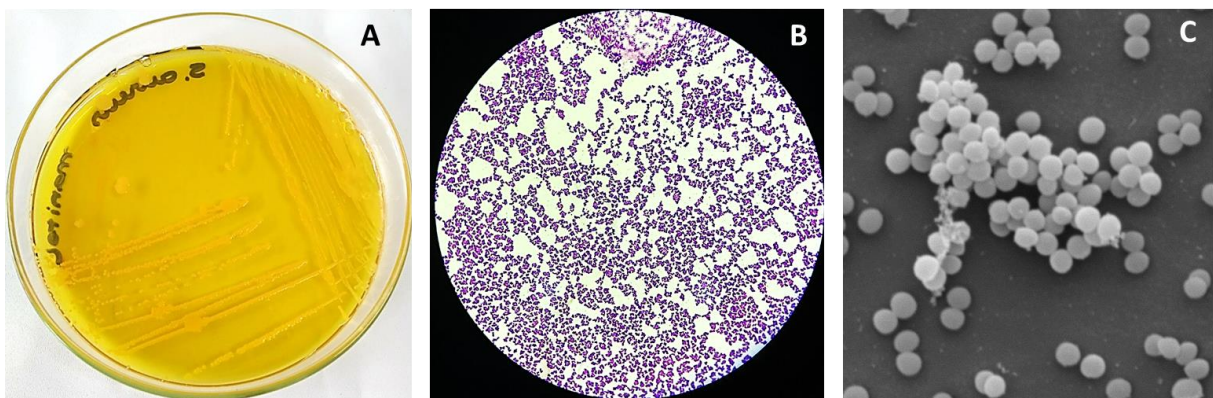
FIGURA 5 - FOTOMICROGRAFIA de *Bacillus cereus*



Fonte: Modificada de: < <https://animalia-life.club/qa/pictures/bacillus-cereus-gram-stain>>

*S. aureus* é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos Gram-positivos (FIGURA 6) 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).

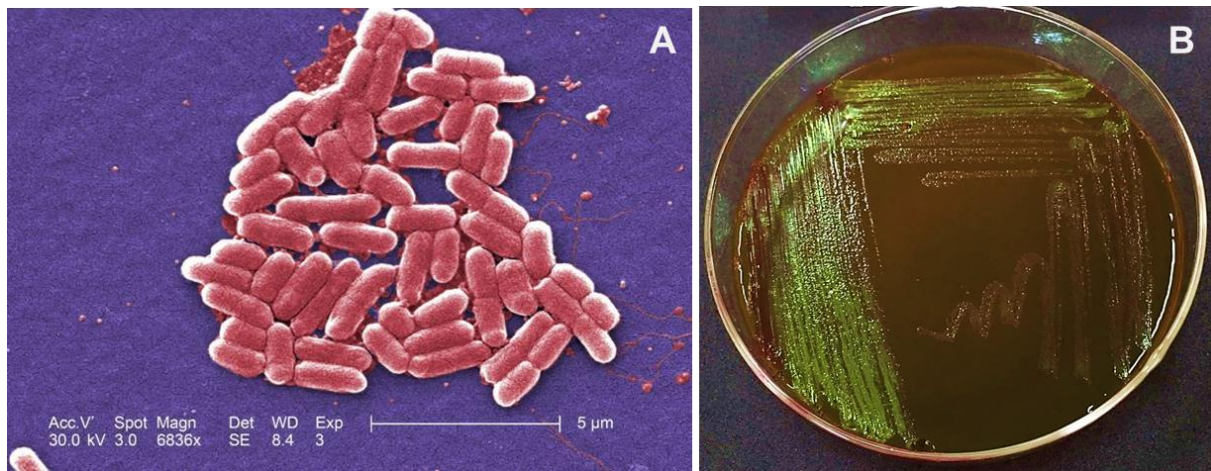
FIGURA 6 - CULTURA E MICROMORFOLOGIA DE *Staphylococcus aureus*



Legenda: A: Cultura de *S. aureus* em ágar Manitol. B: Microscopia ótica de *S. aureus* após coloração de Gram (1000x). C: Eletromicrografia por MEV de *S. aureus* (15.000x). Fonte: banco de imagens do NEMA.

O gênero *Escherichia* pertence à bactérias bacilares Gram-negativas anaeróbias facultativas, sendo *E. coli* a principal espécie (FIGURA 7). Um dos principais habitat é o intestino humano (GOMES et al., 2016). A *E. coli* O157:H7 é um sorotipo pertencente ao grupo *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC). Esse grupo inclui estirpes que produzem fatores citotóxicos descritos como verotoxinas (VTs) ou Shiga-like toxinas (SLTs) (DOYLE et al., 1997). Emergente nas últimas décadas, esse microrganismo é um importante patógeno causador de doença de transmissão alimentar (DTA), constituindo sério risco à saúde, sendo, algumas vezes, fatal, particularmente para crianças e idosos. Têm sido isoladas em numerosos surtos envolvendo colite hemorrágica, causando diarréia sanguinolenta aguda, que pode provocar síndrome hemolítico-urêmica (FOODBORNE, 2002). Como agente de DTA, tem sido especialmente associada ao consumo de alimentos de origem animal como carnes, leites e produtos derivados, uma vez que rebanhos bovinos leiteiros e de corte são os principais reservatórios para infecção humana por *E. coli* O157:H7 (GRIFFIN e TAUXE, 1991).

FIGURA 7 - MICROMORFOLOGIA DE *Escherichia coli* O157:H7



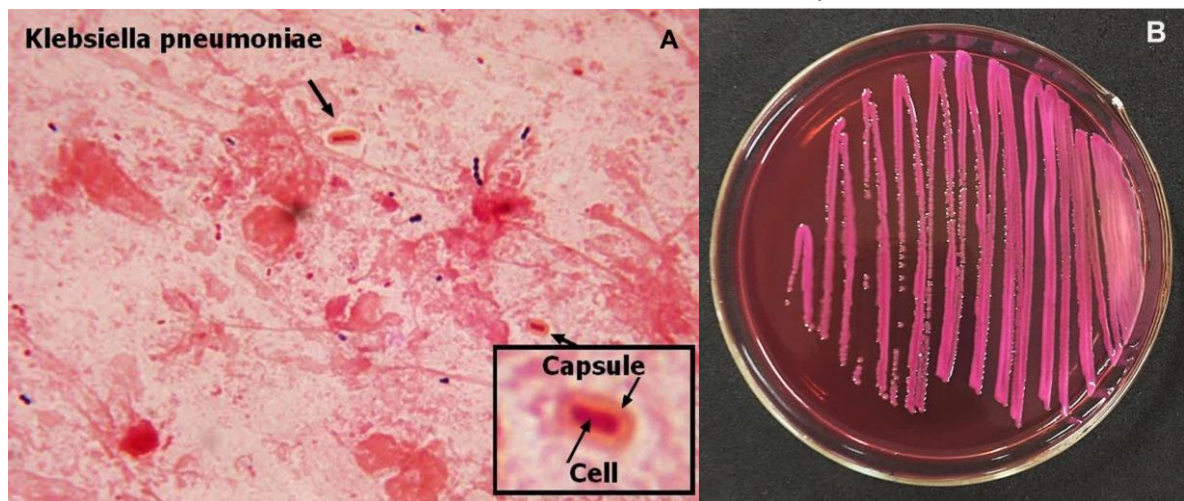
Legenda: A: *Escherichia coli* O157:H7 em visualização por microscopia eletrônica de varredura, sob alta ampliação de 6836x, colorida digitalmente. Fonte: Janice Haney Carr, 2006. Disponível em: <<https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=10068>>. B: Cultivo de *E. coli* O157:H7 em meio seletivo e diferencial EMB (Eosin Methylene Blue Agar). Fonte: O autor.

*K. pneumoniae* é um bacilo Gram-negativo anaeróbio facultativo, encapsulado (FIGURA 8), sendo considerado um microrganismo multirresistente que se destaca pela sua habilidade de desenvolver mecanismos de resistência enzimáticos (KOLPA et al., 2018). Patógeno oportunista, responsável por diversos tipos de infecções nosocomiais e do trato urinário em pacientes hospitalizados ou indivíduos

imunocomprometidos. Além disso, é capaz de causar pneumonia e infecções sanguíneas ou em feridas cirúrgicas (JASIM et al., 2020).

As doenças causadas por *K. pneumoniae*, geralmente, estão relacionadas com o estado imunológico do hospedeiro, e sua gravidade muitas vezes é potencializada devido à capacidade patogênica da cepa, capaz de criar um fenótipo de multirresistência ao uso exacerbado de antimicrobianos (PEREIRA et al., 2015).

FIGURA 8 - MICROMORFOLOGIA DE *Klebsiella pneumoniae*



Legenda: A: fotomicroscopia de *Klebsiella pneumoniae* com as células encapsuladas. Fonte: disponível em:

<<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2010/08/klebsiella-pneumoniae-capsule.html>>. B: cultura de *K. pneumoniae* em ágar MacConkey, utilizado para o isolamento e diferenciação de bactérias fermentadoras de lactose. Fonte: O autor.

### 2.6.2 Fungos patogênicos – Leveduriformes e filamentosos

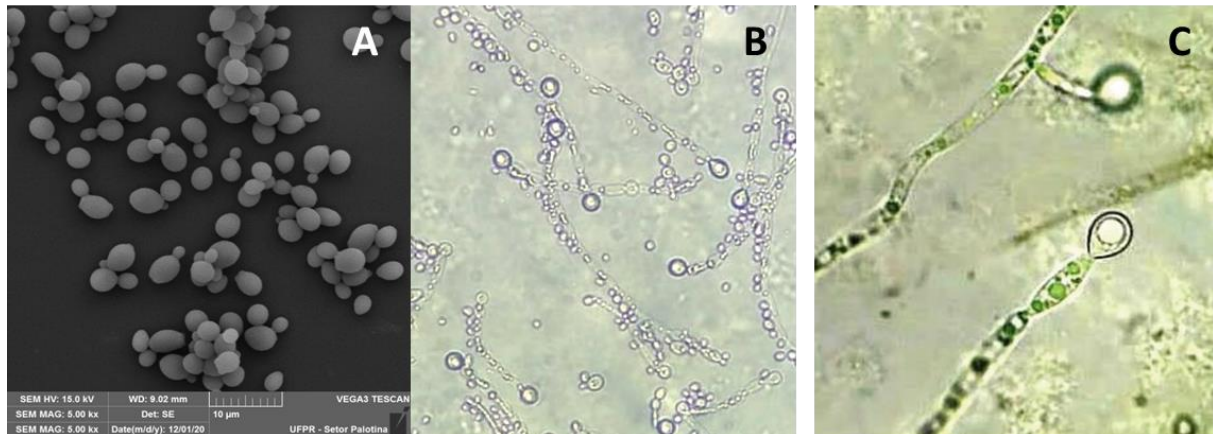
A *Candida albicans* é uma levedura oportunista encontrada associada à candidíase em animais e humanos, propagando-se na superfície de mucosas, causando infecções vulvovaginais, gastrointestinais e bucais, e eventualmente até doenças sistêmicas. Geralmente, está presente no organismo de forma assintomática.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

Muitas leveduras são capazes de mudar sua morfologia em resposta às condições ambientais, como é o caso dela, que diferencia-se entre células

leveduriformes, em meio de crescimento padrão, para a forma de cadeias filamentosas de hifas, quando induzidas em diferentes condições. Essa capacidade de alterar sua forma de crescimento, bem como produzir biofilmes, está associada a fatores de virulência, mais especificamente crescimento invasivo e penetração no sistema imunológico (MARTIN et al., 2005).

Em sua forma leveduriforme, encontra-se no seu estado saprófito, conhecido por colonização assintomática (ALVARES et al., 2007). Já em sua forma filamentosa, de hifas e pseudo-hifas, são consideradas patogênicas (NOBLE et al., 2017). Os clamidósporos são esporos arredondados que possuem uma espessa parede celular (FIGURA 9) (ALVARES et al., 2007).

FIGURA 9 - MICROMORFOLOGIA DE *Candida albicans*.



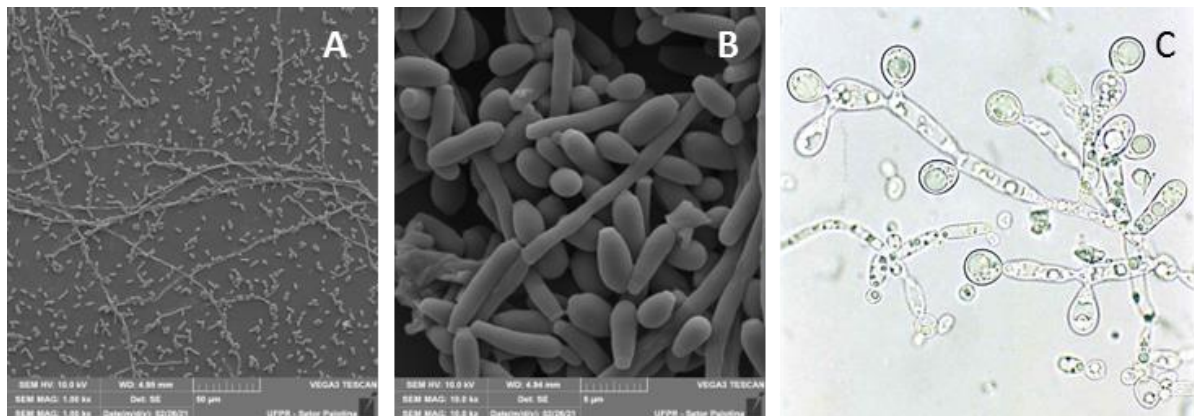
Legenda: A: Microscopia eletrônica de varredura de *C. albicans* ATCC 90028. B e C: *C. albicans* em microcultivo em ágar fubá. Fonte: banco de imagens do NEMA.

*Candida tropicalis* é um fungo dimórfico, sua organização celular se dá por meio da formação de pseudomicélio, constituído por estruturas longas, ramificadas, com blastoconídios esféricos ou ovoides isolados, em cadeias simples ou aglomerados e células de brotamento elipsoidais ou em forma de lágrima ao longo da pseudo-hifa (FIGURA 10) (MOREIRA, 2019). Embora a *C. albicans* continue sendo a espécie de *Candida* mais comum, a morbidade e mortalidade causada por espécies de não-*albicans* têm aumentado significativamente (JIANG et al., 2012). *C. tropicalis* foi amplamente considerada a segunda mais virulenta, precedida apenas pela *albicans*, esse microrganismo tende a causar infecções superficiais e sistêmicas em pacientes imunocomprometidos (JIANG et al., 2012). Além disso, tem sido reconhecida como causa crescente de infecções sanguíneas na América do Sul e na

Ásia (BRANDT e LOCKHART, 2012; SANGUINETTI et al., 2015). As razões para sua alta prevalência em certas regiões geográficas do mundo não são claras (BRANDT e LOCKHART, 2012).

Têm sido isolada em pacientes com malignidades, doenças hematológicas e neutropenia e dessa forma, os casos expressivos de candidemia por *C. tropicalis* em pacientes com idade superior a 70 anos pode estar relacionada ao aumento da frequência de tumores sólidos e neoplasias malignas hematológicas nessa faixa etária (SILVA et al., 2011; QUINDÓS, 2014). Os fatores de risco identificados incluem: leucemia aguda, quimioterapia antineoplásica, neutropenia, profilaxia prévia com cetoconazol e inserção de cateter (KRCMERY e BARNES, 2002).

FIGURA 10 - MICROMORFOLOGIA DE *Candida tropicalis*.



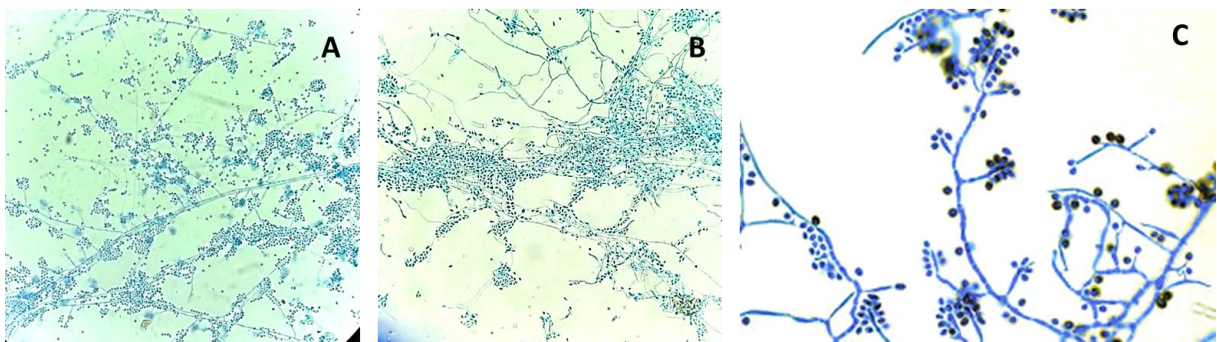
Legenda: A e B: imagens de microscopia eletrônica de varredura de *C. tropicalis* ATCC 750 (banco de imagens do NEMA). C: *C. tropicalis* em microcultivo em ágar fubá (fonte: Panizo e Moreno, 2022).

*Sporothrix schenckii* é uma espécie de fungo dimórfico (FIGURA 11) da família Ophiostomataceae. É o agente etiológico da esporotricose, micose subcutânea ou crônica, que pode acometer animais e seres humanos (BONIFAZ, 2010). A doença, até o final da década de 1990, era comum em jardineiros, agricultores ou pessoas que tivessem contato com plantas e solo em ambientes naturais onde o fungo pudesse estar presente em materiais orgânicos. Ocorre pelo contato do fungo com a pele ou mucosa por meio de trauma decorrente de acidentes com espinhos, palha ou lascas de madeira; contato com vegetais em decomposição; arranhadura ou mordedura de animais doentes, sendo mais comum os felinos. Só se contrai a doença pelo contato com meios ou animais contaminados, não havendo transmissão de pessoa para pessoa (GUARRO et al., 1999; BARROS et al., 2001; SCHUBACH et al., 2004, MARIMON et al., 2008).

A princípio, *S. schenckii* era a única espécie conhecida como sendo a responsável pela esporotricose. Após estudos genotípicos e fenotípicos de isolados ambientais, clínicos humanos e animais, verificou-se alta variabilidade entre os isolados e estabeleceu-se a existência de um Complexo *Sporothrix*, composto por seis espécies, que são elas: *S. albicans*, *S. luriei*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. schenckii stricto sensu* (MARIMON et al., 2008).

Possui ampla distribuição mundial, principalmente em regiões de clima tropical. A maioria dos casos descritos é proveniente da América Central e América do Sul, principalmente do México, Colômbia, Brasil e Peru, além do continente Africano (PAPPAS et al., 2000; KOVARIK et al., 2008). Na América do Sul, a maioria dos casos ocorrem no Brasil (LOPES et al., 1999), sendo a micose subcutânea de maior incidência no estado do Rio Grande do Sul (Da ROSA et al., 2005).

FIGURA 11 - MICROMORFOLOGIA DE *Sporothrix* spp.



Legenda: A e B: microscopia óptica de *S. schenckii* corada com lactofenol azul algodão. Aumento de 400x. Fonte: banco de imagens do NEMA. C: *Sporothrix* sp. Fonte: Moura et al. (2018).

Microrganismos do gênero *Aspergillus* são fungos filamentosos, sapróbios ubíquos, com inúmeras características biológicas que permitem sua sobrevivência em regiões que apresentam condições extremas, como áreas desérticas e regiões polares. Seus propágulos assexuados (conídios) são facilmente dispersos pelo ar, o que permite sua distribuição por amplas áreas, como ambientes abertos e fechados, incluindo hospitais (GUARRO, 2012).

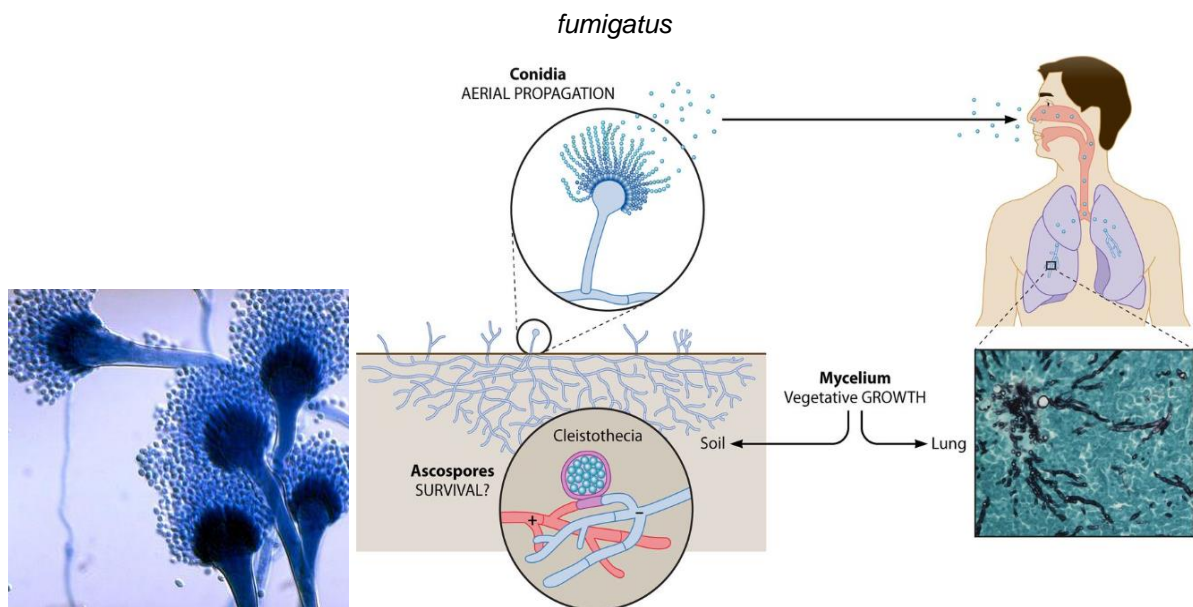
A aspergilose é uma doença infecciosa oportunista que surge quando o fungo filamentoso do gênero *Aspergillus* entra no organismo humano por meio da inalação de esporos por indivíduos com imunidade reduzida. Com destaque para a espécie patogênica *A. fumigatus*, responsável pela ocorrência de cerca de 90% dos casos. O *A. fumigatus* é o fungo patogênico mais frequentemente encontrado em ambiente

hospitalar. A aspergilose é atualmente uma das infecções com índices de mortalidade mais elevados, chegando a atingir 85 a 90% mesmo após a administração terapêutica de antifúngicos. É importante salientar que o fungo é perigoso, principalmente, para os doentes imunocomprometidos (GIACOMAZZI et al., 2016).

Segundo um boletim publicado pelo Ministério da Saúde (2020), na aspergilose, não existe transmissão inter-humana do fungo *Aspergillus*, nem de animais ao homem. No entanto, os indivíduos estão expostos ao risco por inalação de propágulos infectantes, dispersos no solo, sendo que a principal porta de entrada do fungo no organismo é a via inalatória (FIGURA 12). O órgão mais comumente afetado é o pulmão, a partir do qual o fungo pode disseminar-se na corrente sanguínea.

Recentemente um estudo estimou a frequência baseada em revisão de artigos que descreveram o número de casos de doenças fúngicas por tipo de doença, incluindo casos de aspergilose, por grupo específico de pacientes de risco (asmáticos, com fibrose cística e Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica). Os autores calcularam que 1.010.465 casos de doenças fúngicas ocasionadas por *Aspergillus* ocorrem no Brasil, incluindo aspergilose invasiva, aspergilose broncopulmonar crônica e asma ocasionada por sensibilização fúngica (GIACOMAZZI et al., 2016).

FIGURA 12 - CICLO DE VIDA E MICROMORFOLOGIA DO FUNGO FILAMENTOSO *Aspergillus*



LEGENDA: Representação esquemática mostrando a micromorfologia do *A. fumigatus*, seu ciclo de vida e como ocorre sua propagação e contaminação. Fonte: adaptado de Jean-Paul Latgé, Clinical Microbiology Reviews, 2019.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DOS ENSAIOS

As pesquisas foram realizadas no Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA) e no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina e Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR Campus Toledo.

#### 3.2 CEPAS BACTERIANAS E FÚNGICAS

As bactérias utilizadas para analisar o efeito do extrato de *Macrocybe* sp. foram as cepas ATCC (*American Type Collection Culture*) de *Bacillus cereus* 10876, *Escherichia coli* O157:H7 43888, *Staphylococcus aureus* 6538 e *Klebsiella pneumoniae* 13883. As leveduras utilizadas foram cepas ATCC de *Candida albicans* 90028 e *C. tropicalis* 750. Os fungos filamentosos foram *Aspergillus fumigatus*, isolado previamente de aspergilose pulmonar de um cão atendido no Hospital Veterinário (UFPR - Palotina) e *Sporothrix schenckii* (isolado de um felino, durante um projeto de pesquisadores do setor Palotina). Ambos os fungos foram encaminhados ao NEMA, para a identificação, e cedidos para fazerem parte da Micoteca do NEMA. Previamente à realização desse trabalho, as espécies foram confirmadas por sequenciamento da região do espaçador interno transcrito de genes ribossomais fúngicos (ITS1-4), pela professora orientadora e pesquisadores do núcleo experimental.

#### 3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DO *Macrocybe* sp.

##### 3.3.1 Coleta da espécime e caracterização

O cogumelo foi coletado em um parque público na cidade de Toledo, Oeste do Paraná, pela doutora Gabrielle Caroline Peiter, pesquisadora da equipe. Até o momento da escrita deste trabalho, foi realizada a caracterização macromorfológica do cogumelo. A caracterização molecular, através de sequenciamento da região ITS1-

4 está sendo realizada, para se determinar a espécie. O DNA do cogumelo já foi extraído e amplificado e será enviado para o sequenciamento.

FIGURA 13 – ESPÉCIME DE *Macrocybe* sp. UTILIZADA NESTE TRABALHO



Fonte: Imagem de Gabrielle Caroline Peiter (modificada).

### 3.3.2 Preparo do extrato de *Macrocybe* sp.

O preparo do extrato aquoso, assim como a coleta da amostra do cogumelo, foi realizado pela doutora Gabrielle Caroline Peiter, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR - Toledo/PR) e cedido gentilmente para a realização deste trabalho. Para o preparo, um total de 2,5 g de basidiomas do cogumelo foi pesado e misturado com 20 mL de água destilada autoclavada (na razão 0,05g/mL) utilizando um frasco becker encamisado, com passagem contínua de água equilibrada a 25°C, para a manutenção da temperatura.

A obtenção do extrato foi realizada através de sonicador de ponteira, por 10 minutos, sob uma potência de 365W. Após a sonicação, o material foi transferido para um tubo cônico de 15 mL e centrifugado a 6.000 RPMs, por 20 minutos, à 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e armazenado à -20°C, para utilização nos ensaios de atividade antimicrobiana.

### 3.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE, POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO, DAS BACTÉRIAS E LEVEDURAS AO EXTRATO DE *Macrocybe* sp.

Para as bactérias, 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.

Foram obtidas, em meio *Tryptic Soy Agar* (TSA), culturas puras das bactérias. A preparação do inóculo inicial foi equivalente a uma solução padrão McFarland de 0,5 de BaSO<sub>4</sub> (Sulfato de Bário) e padronizada em 0,01 a 0,8 valores de absorvância (abs) em espectrofotômetro de luz visível no comprimento de onda de 625 nm. Dessa forma, as culturas bacterianas foram ajustadas até a concentração de 1 a  $2 \times 10^8$  UFC/mL. Foi realizada uma diluição seriada em *Brain Heart Infusion* (BHI) para que o inóculo final ficasse na concentração de  $1,0 \times 10^4$  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 µL do extrato do cogumelo na concentração de 50 mg/mL (0,050g/mL como informado na seção 3.3.2). Nas colunas de 2-12 foram adicionados 100 µL de BHI. Em seguida, foi realizada, com auxílio de uma micropipeta multicanal, 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 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 2-10, obtendo-se concentrações de extrato entre 25 mg/mL a 0,097 mg/mL na placa (TABELA 1). 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 horas em uma estufa de crescimento. Por fim, a leitura do teste foi realizada em relação a concentração inibitória mínima (CIM), definida pelo poço anterior ao primeiro que houve crescimento

microbiano, determinando, assim, a menor concentração do extrato capaz de causar a morte dos microrganismos.

Para as leveduras, a microdiluição em caldo seguiu o protocolo padronizado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008, M27-A3) com algumas modificações para produtos naturais, utilizando como meio líquido o BHI. A densidade celular das leveduras foi ajustada em  $1,1 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias por mL (UFC/ml), em 2 mL de solução salina 0,9% estéril, através de contagem em câmara de Neubauer, a partir de cultura de 24 horas em ágar *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA). A partir desta suspensão foi realizada uma diluição 1:50 e depois 1:20 em BHI, obtendo-se o inóculo final desejado de  $1,1 \times 10^3$  UFC/mL.

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, da mesma forma que foi realizado para as bactérias, exceto que, a temperatura de incubação foi de 28°C. Os testes foram realizados em triplicata.

TABELA 1 - CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO APÓS AS DILUIÇÕES SERIADAS

Poço	Diluição	Concentração do extrato
1	-	<b>50,000</b> mg/mL
2	2x	<b>25,000</b> mg/mL
3	4x	<b>12,500</b> mg/mL
4	8x	<b>6,250</b> mg/mL
5	16x	<b>3,125</b> mg/mL
6	32x	<b>1,560</b> mg/mL
7	64x	<b>0,780</b> mg/mL
8	128x	<b>0,390</b> mg/mL
9	256x	<b>0,190</b> mg/mL
10	512x	<b>0,097</b> mg/mL

Fonte: O autor.

### 3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Após a realização dos ensaios de CIM, foi retirada uma alíquota de 2  $\mu$ L de cada poço, a qual foi inoculada em placas com ágar BHI para os testes de Concentração Fungicida Mínima (CFM), para as leveduras e Concentração Bactericida Mínima (CBM), para as bactérias. Esse segundo ensaio é realizado à fim

de confirmar e complementar o resultado do ensaio anterior, já que os testes de CBM e CFM nos dizem se a atividade inibitória da CIM ocorreu inibindo definitivamente os microrganismos (atividade bactericida ou fungicida) ou, apenas, inativando-os de forma que quando inseridos em um meio nutritivo, voltem a se desenvolver (bacteriostático e fungistático).

Sendo assim, as placas foram incubadas durante 24 horas a temperatura de 28°C, para as leveduras e 37°C, para as bactérias. 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 morte dos microrganismos.

### 3.6 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE POR POÇO-DIFUSÃO

O método de poço-difusão foi utilizado para avaliação da susceptibilidade das bactérias, leveduras e fungos filamentosos, analisados nesse trabalho, ao extrato de *Macrocybe* sp. Para todos os microrganismos, o inóculo foi ajustado de acordo com a escala 0,5 de McFarland, em solução salina estéril (NaCl 0,85%). O inóculo foi espalhado, em quatro planos sobre o meio de cultura, com auxílio de um *swab* estéril, em placas com ágar BHI, contendo poços formados com o auxílio de um cilindro estéril de 10 mm. Em seguida, os poços foram preenchidos, com auxílio de uma micropipeta de volume regulável, com 40 e 60 µL dos extratos, usando água destilada autoclavada como controle, e as placas foram incubadas a 37°C para as bactérias, e 28°C para as leveduras e fungos filamentosos e mantidas de 18 a 24 horas. As dimensões dos halos de inibição formados ao redor dos poços foi mensurada para se determinar o efeito dos extratos sobre os microrganismos testados.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

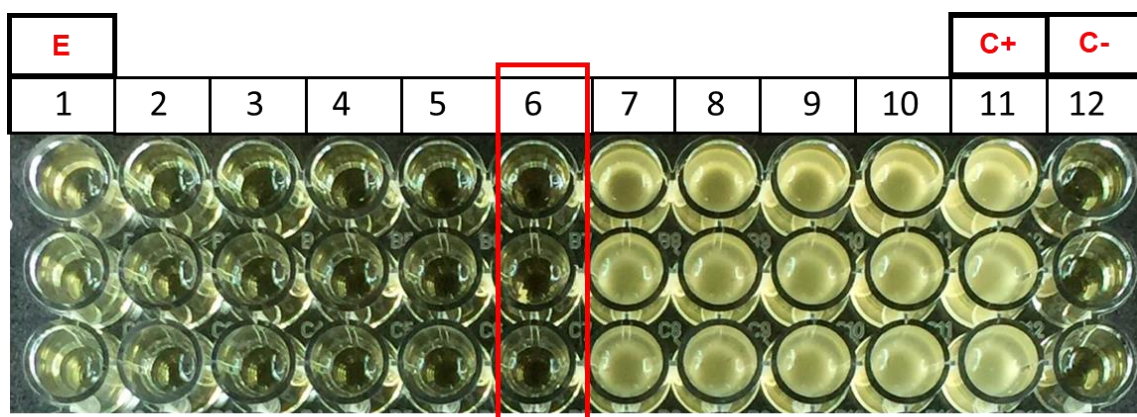
### 4.1 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DOS MICRORGANISMOS AO EXTRATO AQUOSO DE *Macrocybe* sp.

A determinação da CIM do extrato de *Macrocybe* sp. foi realizada através de análise visual (leitura aceitável quando a coloração de caráter residual e a turbidez do extrato interferem na leitura, através da verificação por absorbância). Ademais, foram consideradas as concentrações calculadas a partir do extrato original.

#### 4.1.1 CIM do extrato frente às bactérias

*E. coli* sorotipo O157:H7 apresentou a segunda maior resistência frente ao extrato, comparando com as outras bactérias testadas. A CIM foi observada no poço 6, na qual o extrato apresentou-se diluído 32 vezes, correspondente à concentração de 1,560 mg/mL (FIGURA 14). A cepa O157:H7 é enterohemorrágica (GOMES et al., 2016), sendo considerada a mais patogênica entre as linhagens existentes de *E. coli*, o que pode explicar sua resistência frente à antimicrobianos, como pôde ser observado neste trabalho.

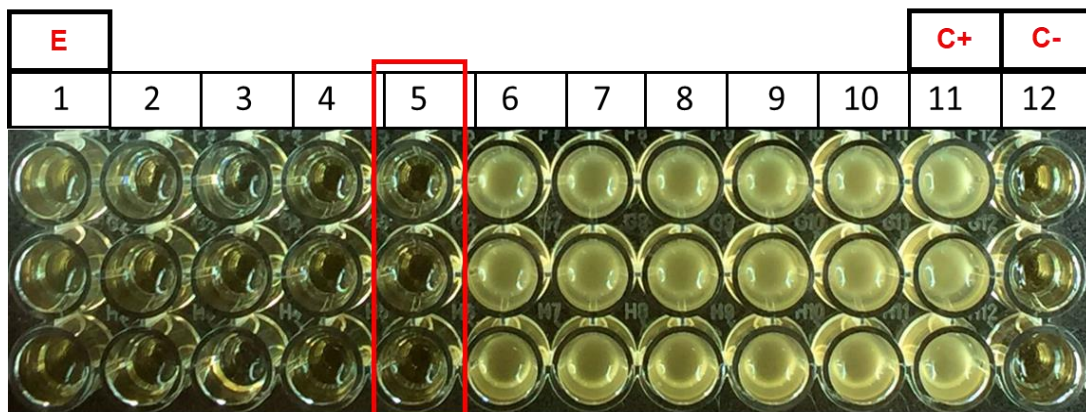
FIGURA 14 - ANÁLISE VISUAL DA CIM DA PLACA TESTADA COM A BACTÉRIA *Escherichia coli* O157:H7



LEGENDA: As 3 linhas correspondem as repetições realizadas em triplicata. Coluna 1: 200  $\mu$ L do extrato do *Macrocybe* sp. na concentração de 50 mg/mL, colunas de 2-10: correspondem às diluições do inóculo 1:2. Coluna 11: controle positivo, contendo o inóculo + caldo BHI. Coluna 12: controle negativo, contendo apenas BHI. Coluna 6 (em vermelho): onde ocorreu a CIM.

Quanto à *B. cereus*, a CIM do extrato ocorreu no poço 5 (diluição de 16 vezes), correspondente à concentração de 3,125 mg/mL (FIGURA 15), sendo considerada a mais resistente ao extrato, entre todas as cepas estudadas. Provavelmente, este resultado se deve à formação de endósporos, já que, com isso essa bactéria, além de apresentar uma maior resistência à agentes físicos, como o calor, pode explicar o fato de sua maior resistência ao extrato de *Macrocybe* sp. (BOTTONNE, 2020).

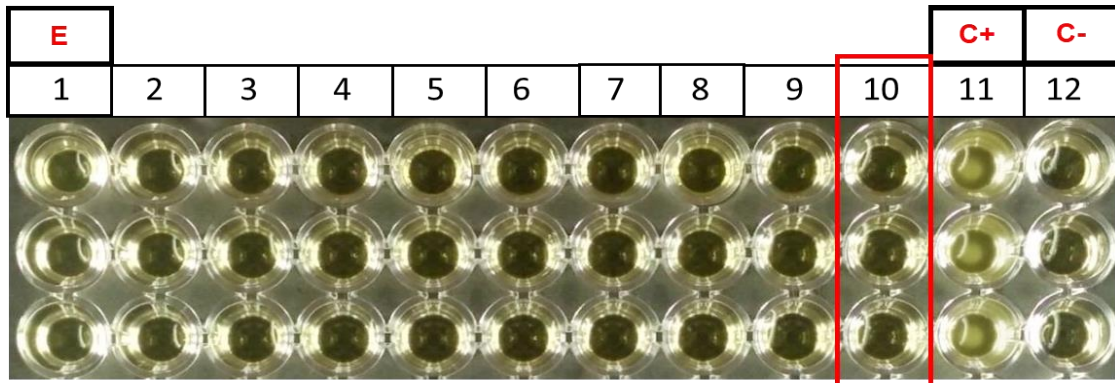
FIGURA 15 - ANÁLISE VISUAL DA CIM DA PLACA TESTADA COM A BACTÉRIA *Bacillus cereus*



LEGENDA: As 3 linhas: repetições realizadas em triplicata. Coluna 1: 200 µL do extrato do *Macrocybe* sp. (50 mg/mL). Colunas de 2-10: diluições do inóculo de 1:2. Coluna 11: controle positivo, contendo o inóculo + caldo BHI. Coluna 12: controle negativo, contendo apenas BHI. Coluna 5 (em vermelho): onde ocorreu a CIM.

O extrato foi capaz de inibir o crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* em todas as concentrações, não sendo possível determinar a CIM. Foi observado crescimento apenas no poço 11, correspondente à concentração de 0,097 mg/mL, do controle positivo, correspondente ao inóculo bacteriano, sem o extrato (FIGURA 16).

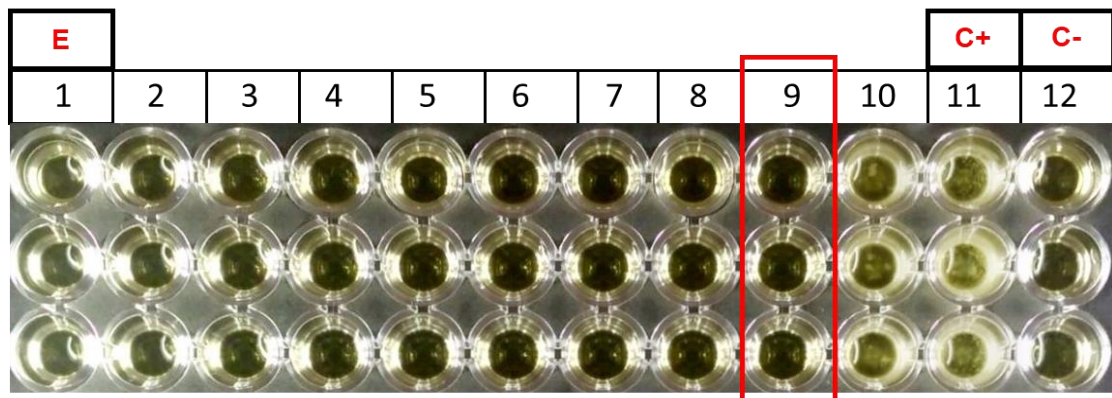
FIGURA 16 - ANÁLISE VISUAL DA CIM DA PLACA TESTADA COM A BACTÉRIA *Klebsiella pneumoniae*



LEGENDA: As 3 linhas: repetições realizadas em triplicata. Coluna 1: 200 µL do extrato do *Macrocybe* sp. (50 mg/mL). Colunas de 2-10: diluições do inóculo de 1:2. Coluna 11: controle positivo, contendo o inóculo + caldo BHI. Coluna 12: controle negativo, contendo apenas BHI. Coluna 10 (em vermelho): onde ocorreu a CIM.

Para *S. aureus*, um estafilococos Gram-positivo, a CIM foi observada no poço 9 (FIGURA 17), correspondente à uma diluição de 256 vezes (concentração de 0,190 mg/mL do extrato).

FIGURA 17 - ANÁLISE VISUAL DA CIM DA PLACA TESTADA COM A BACTÉRIA *Staphylococcus aureus*



LEGENDA: As 3 linhas: repetições realizadas em triplicata. Coluna 1: 200 µL do extrato do *Macrocybe* sp. (50 mg/mL). Colunas de 2-10: diluições do inóculo de 1:2. Coluna 11: controle positivo, contendo o inóculo + caldo BHI. Coluna 12: controle negativo, contendo apenas BHI. Coluna 9 (em vermelho): onde ocorreu a CIM.

Através do ensaio de microdiluição em caldo foi possível verificar que o extrato aquoso de *Macrocybe* sp. apresentou maior ação antibacteriana contra as bactérias *K. pneumoniae* (Gram-negativa) e *S. aureus* (Gram-positiva), comparando com as outras duas bactérias testadas *E. coli* O157:H7 (Gram-negativa) e *B. cereus* (Gram-positiva).

Khatua e colaboradores (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. spizizenni* como as mais susceptíveis aos efeitos do extrato.

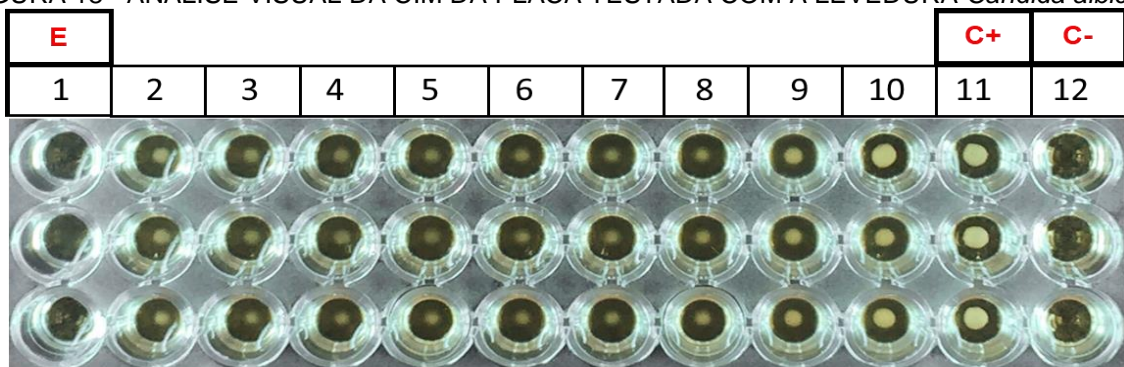
Um estudo realizado por Sitó-Junior (2021), com extrato aquoso de *Macrocybe titans*, apontou que, a bactéria *S. aureus* foi a mais sensível das bactérias Gram-positivas testadas. Já no grupo das bactérias Gram-negativas, a bactéria *K. pneumoniae* apresentou maior susceptibilidade.

#### 4.1.2 CIM do extrato frente às leveduras

O extrato aquoso de *Macrocybe* sp. apresentou pouca atividade antifúngica contra as duas leveduras testadas, *C. albicans* e *C. tropicalis*, quando comparadas com as bactérias.

Para *C. albicans*, foi possível observar que nos poços 2 a 9 (concentrações 25 a 0,190 mg/mL do extrato), houve uma diminuição do crescimento, evidenciado pela formação de um *pellet* no fundo do poço (FIGURA 18). No entanto, o extrato não inibiu completamente o crescimento da levedura, não sendo possível a determinação da CIM, já que ela cresceu em todos os poços em que havia inóculo.

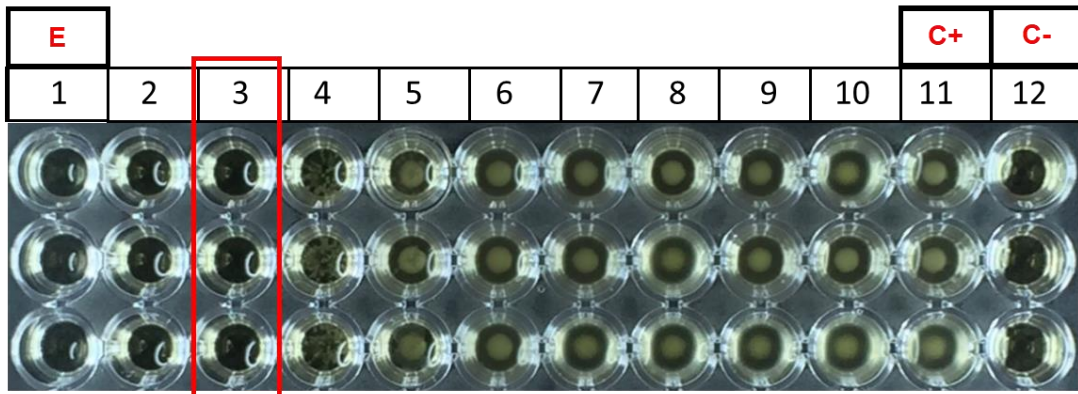
FIGURA 18 - ANÁLISE VISUAL DA CIM DA PLACA TESTADA COM A LEVEDURA *Candida albicans*



LEGENDA: As 3 linhas: repetições realizadas em triplicata. Coluna 1: 200 µL do extrato do *Macrocybe* sp. (50 mg/mL). Colunas de 2-10: diluições do inóculo de 1:2. Coluna 11: controle positivo, contendo o inóculo + caldo BHI. Coluna 12: controle negativo, contendo apenas BHI.

Já nos testes frente a *C. tropicalis*, a CIM foi observada no poço 3, que corresponde a uma diluição de 4 vezes e uma concentração inibitória mínima de 12,5 mg/mL. Foi possível observar, também, uma alteração da turvação no poço 4 (6,25 mg/mL do extrato) e um aspecto filamentososo do precipitado da levedura.

FIGURA 19 - ANÁLISE VISUAL DA CIM DA PLACA TESTADA COM A LEVEDURA *Candida tropicalis*



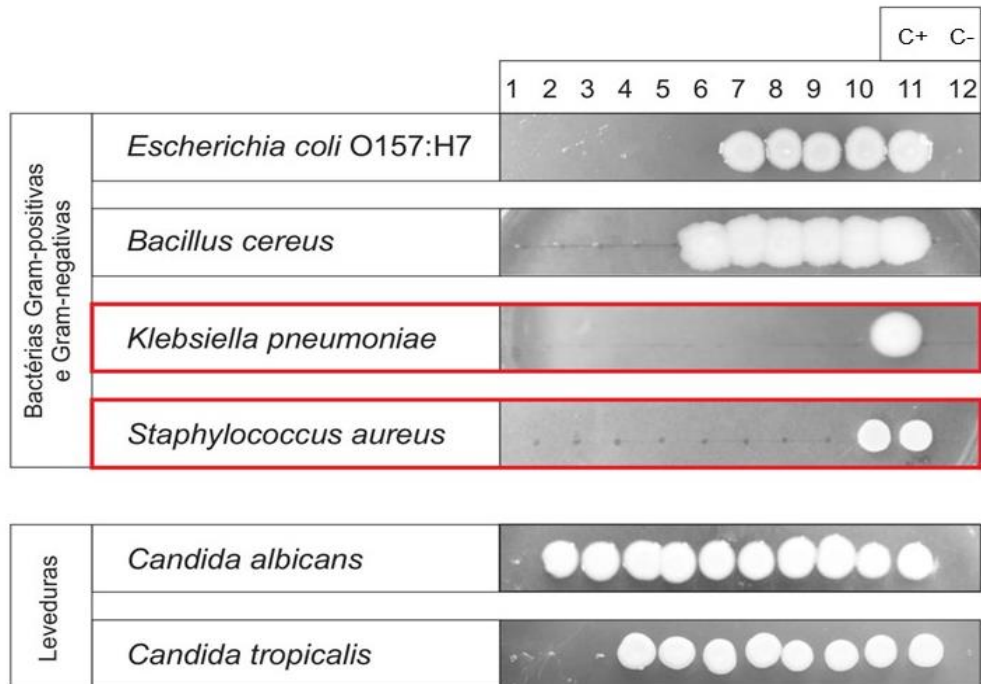
LEGENDA: As 3 linhas: repetições realizadas em triplicata. Coluna 1: 200 µL do extrato do *Macrocybe* sp. (50 mg/mL). Colunas de 2-10: diluições do inóculo de 1:2. Coluna 11: controle positivo, contendo o inóculo + caldo BHI. Coluna 12: controle negativo, contendo apenas BHI. Coluna 3 (em vermelho): onde ocorreu a CIM.

Desta forma, como observado por outros pesquisadores da nossa equipe, o extrato aquoso de *Macrocybe* spp. causou alterações no padrão de filimentação da *C. albicans* e da *C. tropicalis*, o que provavelmente explica a presença dessa característica (PEREIRA, 2020; JUSTO, 2021).

#### 4.1.3 Determinação da CBM e CFM

Em relação à CBM, a ausência de crescimento após a inoculação e incubação do material da CIM em placa de petri (FIGURA 20) comprovou o efeito bactericida do extrato na mesma concentração obtida na microdiluição em caldo. Logo, foi possível determinar, para cada microrganismo, a CIM, ou seja, a menor concentração do extrato na qual não foi visualizado crescimento bacteriano e, também, a CBM, isto é, a menor concentração em que houve a morte de todas as bactérias. Na Concentração Fungicida Mínima (CFM), também pudemos observar que o crescimento das leveduras aconteceu nas mesmas concentrações da CIM.

FIGURA 20 – CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) DO EXTRATO FRENTE ÀS BACTÉRIAS E LEVEDURAS TESTADAS



Legenda: 1-12: correspondem as mesmas colunas do teste CIM, onde a coluna 1 corresponde ao extrato do cogumelo, as colunas de 2-10 correspondem às diluições seriadas de 1:2 e as colunas 11 e 12 são as controle (positivo e negativo, respectivamente). Fonte: O autor (2022).

Sendo assim, podemos observar na TABELA 2 a atividade antibacteriana e antifúngica do extrato expressa em CIM (mg/mL) determinada pelo ensaio de microdiluição em caldo e ensaio de CBM e CFM.

TABELA 2 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO AQUOSO EXPRESSA EM CIM (mg/mL)

Microrganismo	Característica	Fonte	CIM Extrato Aquoso
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Bacilos Gram-negativo	ATCC 43888	1,560
<i>Bacillus cereus</i>	Bacilos Gram-positivo	ATCC 10876	3,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacilos Gram-negativo	ATCC 13883	0,097
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos Gram-positivo	ATCC 6538	0,190
<i>Candida albicans</i>	Fungo leveduriforme	ATCC 90028	-
<i>Candida tropicalis</i>	Fungo leveduriforme	ATCC 750	12,500

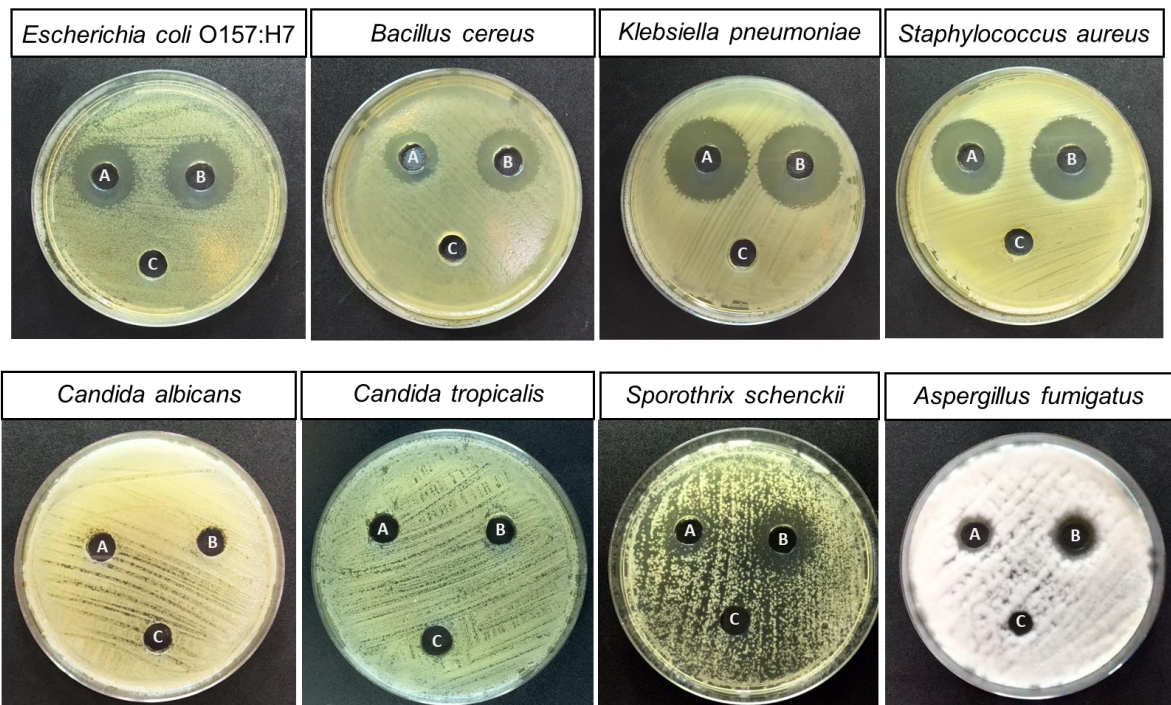
FONTE: O autor (2021).

## 4.2 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DOS MICRORGANISMOS AO EXTRATO POR POÇO-DIFUSÃO EM ÁGAR.

A atividade antimicrobiana do extrato também foi verificada, através do teste de poço-difusão em ágar, para as bactérias e leveduras já mencionadas e também para duas espécies de fungos filamentosos (*Aspergillus fumigatus* e *Sporothrix schenckii*). Para esses fungos não foi possível realizar o teste da microdiluição em caldo, devido à falta de protocolo de padronização para fungos filamentosos disponível durante o desenvolvimento do trabalho.

Para todos os microrganismos testados, em placas com 3 poços, foram adicionados a cada um deles, 40  $\mu$ L de extrato aquoso do *Macrocybe* sp., 60  $\mu$ L do extrato e 60  $\mu$ L de água destilada autoclavada, como controle. A dimensão dos halos formados ao redor dos poços foi medida e avaliada para determinação do efeito inibitório dos extratos sobre esses microrganismos (FIGURA 21).

FIGURA 21 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE *Macrocybe* sp. PELA TÉCNICA DE POÇO-DIFUSÃO



Legenda: A: 40  $\mu$ L do extrato aquoso do *Macrocybe* sp. B: 60  $\mu$ L do extrato aquoso do *Macrocybe* sp. C: 60  $\mu$ L de água destilada autoclavada. Fonte: O autor (2022).

Comparando os diferentes microrganismos ensaiados, foi possível observar que o extrato apresentou maior atividade sobre as bactérias. Dentre elas, a *K.*

*pneumoniae* foi a que apresentou maior sensibilidade ao extrato, com halos de inibição de 30 mm e 32mm, nas concentrações de 40 e 60  $\mu\text{L}$ , respectivamente. Seguida pela *S. aureus*, em segundo lugar, com halos de 26 mm e 29 mm. A terceira, foi a *E. coli* O157:H7, com 24 e 26 mm, sendo *B. cereus* a menos sensível, com halos de 19 mm e 23 mm para os volumes 40 e 60  $\mu\text{L}$ , corroborando com os resultados observados no ensaio (TABELA 3). A concentração do extrato nos poços foi de 2 mg/mL em 40  $\mu\text{l}$  e de 3 mg/mL quando se utilizou 60  $\mu\text{L}$  do extrato.

TABELA 3 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFUNGICA DO EXTRATO AQUOSO DE *Macrocybe* sp. PELO ENSAIO DE POÇO-DIFUSÃO.

Microrganismos	Zona de inibição (mm)	
	40 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	24 mm	26 mm
<i>Bacillus cereus</i>	19 mm	23 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30 mm	32 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	26 mm	29 mm
<i>Candida albicans</i>	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	-
<i>Sporothrix schenckii</i>	18 mm	24 mm
<i>Aspergillus fumigatus</i>	14 mm	18 mm

FONTE: O autor (2023). NOTA: \* Os valores são o desvio padrão médio (DP) a partir de três repetições. \* As zonas de inibição incluem o diâmetro do poço de 10 mm

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

Sitó-Junior (2021) avaliou o potencial antibacteriano do extrato aquoso do cogumelo *M. titans*, verificando ação bactericida do extrato contra dez bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, apresentando resultados promissores. Em seu estudo, a bactéria *S. aureus* obteve a maior inibição do grupo das bactérias Gram-positivas, com halos regulares e sem presença de bactérias resistentes apresentando tamanho médio de cerca de 18 mm. Já no grupo das bactérias Gram-negativas, a bactéria *K. pneumoniae* apresentou maior efeito inibitório com halos regulares, bordas bem delimitadas com tamanho médio de 14 mm.

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.

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 basidiomiceto *Ganoderma lucidum* foi avaliado quanto à sua atividade antifúngica contra os fungos de importância clínica *C. albicans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium marneffeii*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis*. O resultado mostrou que o extrato etanólico apresentou alta ação inibitória contra os fungos estudados quando comparado ao extrato aquoso. Tanto no extrato etanólico quanto no extrato aquoso foi observada a atividade máxima de inibição contra *C. albicans*, seguida por *T. rubrum*, *M. canis*, *A. niger*, *P. marneffeii* e *C. neoformans*.

Em um estudo recente realizado pelo grupo de pesquisa do presente trabalho, Justo (2021) avaliou o efeito do extrato aquoso de uma linhagem de *M. titans* sobre *C. tropicalis* e a levedura *Trichosporon* sp. A CIM observada para um extrato aquoso filtrado com filtro de 0,45 µm o extrato foi de 125 mg/ml e para o filtrado com filtro de 0,22 µm foi de 62,5 mg/ml, ambas consideradas altas, quando comparadas com os resultados deste trabalho.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o extrato aquoso do fungo basidiomiceto *Macrocybe* sp. apresenta ação antimicrobiana contra quatro bactérias, duas leveduras e dois fungos filamentosos, entretanto, nota-se um efeito mais pronunciado em bactérias.

Este potencial bioativo pode estar atribuído a diferentes classes de compostos químicos presentes no extrato utilizado, ou às interações entre os diferentes compostos. Investigações adicionais serão necessárias para avaliar e confirmar as atividades antimicrobianas desse extrato contra uma gama maior de microrganismos patogênicos, assim como, para se atribuir um determinado efeito a uma molécula ou grupo de moléculas específicas. Para essa finalidade, torna-se necessária a purificação gradual do extrato e posteriores testes biológicos, com as diferentes frações obtidas.

A caracterização, a nível de espécie, também será importante para a comparação de resultados já obtidos com outras linhagens da espécie *M. titans*, que estão sendo analisadas por nosso grupo de pesquisa, pois, comparando com os resultados obtidos por outros membros da equipe, aparentemente, esse extrato apresenta uma maior atividade, principalmente contra bactérias.

## REFERÊNCIAS

- ÁLVARES, C. A. et al. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n.5, p. 319-327, 2007.
- ALVES, M. J. et al. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. **Planta Medica**, v. 78, n. 16, p. 1707–1718, 2012.
- ARNESEN, L. P. S., et al. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, p. 579-606, 2008.
- AVIN, F. A., et al. Molecular classification and phylogenetic relationships of selected edible Basidiomycetes species. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 7, p. 7355-7364, 2012.
- BALAKUMAR, R., et al. Antibacterial and antifungal activity of fruit bodies of *Phellinus mushroom* extract. **International Journal of Biosciences**, v. 1, n. 3, p. 72–77, 2011.
- BARROS, M. B. L., et al. Spototrichosis: na emergente zoonosis in Rio de Janeiro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 96. n. 6, p. 777-779, 2001.
- BERTOCCO, A. R. P. **Ação do extrato aquoso do macrofungo *Macrocybe titans* contra a formação de biofilme de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*: morfologia do biofilme e expressão de genes de virulência.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Palotina (PR), 2005.
- BIGELOW, H. E.; KIMBROUGH, J. W. *Tricholoma titans*, a new species from Florida. **Mycotaxon**, v. 11, n. 2, p. 425-429, 1980.
- BONIFAZ, A. Esporotricosis. En: **Micología médica básica**. 3ª ed. McGraw-Hill, Ciudad de México, p:179-196, 2010.
- BOTTONE, E. J. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, 2020.
- BRANDT, M. E.; LOCKHART, S. R. Recent Taxonomic Developments with *Candida* and Other Opportunistic Yeasts. **Current Fungal Infection Reports**. v. 6, p. 170–177, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Distribuição temporal dos surtos notificados de doenças transmitidas por alimentos – 2007-2015.** Brasil, 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/distribuicao-temporal-dos-surtos-notificados-de-doencas-transmitidas-por-alimentos-2013-brasil-2007-2015.pdf/view>>

BRESINSKY, A., et al. **Tratado de Botânica de Strasburger**. 36. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

BRIZUELA, M. A., et al. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 15, p. 69-74, 1998.

CALONGE, D. F., et al. *Macrocybe titans*, um fungo espetacular presente em la Costa Rica, América Central. **Bulletin Semestriel de la Fédération des Associations Mycologiques Méditerranéennes**, v. 32, p. 21-24, 2007.

CARBONE, P. P., et al. **Gestão por competências e gestão do conhecimento**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora FGV, 2006.

CARVALHO, M. P., et al. **Investigation of the antibacterial activity of basidiomycetes**. *Biociências*, v. 15, n. 2, p. 173-179, 2007.

CHE, Z. L., et al. A new sesquiterpene from the mushroom *Dictyophora indusiata*. **Journal of Chinese Mass Spectrometry Society**, v. 19, p. 23–28, 1998.

CHUDZIK, G. **Educação na era do hipertexto**: uma experiência diferenciada na Biologia. Dissertação (Mestrado em Ensino de Ciências Humanas, Sociais e da Natureza) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.

DA ROSA, A. C. M., et al. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 52: 451-459, 2005.

DANTAS, A. S., et al. Oxidative Stress Responses in the Human Fungal Pathogen, *Candida albicans*. **Biomolecules**, v. 5, p. 142-165, 2015.

DELONG, J.; BREWER, M. T. **Macrocybe titans**: largest mushroom species in the western hemisphere found growing in georgia. University of Georgia Extension, 2013.

DOYLE, M. P., et al. *Escherichia coli* O157:H7. Foodborne pathogenic bacteria. In: **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. Washington, D.C. p.171-191, 1997.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 1. ed. Caxias do Sul: Educs, 2004.

FOODBORNE diseases, emerging. **World Health Organization**, Janeiro de 2002. Disponível em: <[www.who.int/mediacentre/factsheets/fs124/en](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs124/en)>.

GIACOMAZZI, J., et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145-150, 2016.

GIRI, S., et al. 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.

GOMES, T. A. T., et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Medical Microbiology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p.3-30, 2016.

GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiologic Reviews**, v.13, p.60-98, 1991.

GUARRO J., et al. Developments in Fungal Taxonomy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

GUARRO, J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, p. 33-39, 2012.

GUIMARÃES, L. C. **Métodos de preservação de fungos potencialmente toxigênicos**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de Lavras, Lavras, 2011.

HIBBETT, D. S., et al. A Higher-level Phylogenetic Classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007.

HUFF, G. M. **Efeito do extrato aquoso do cogumelo *Macrocybe titans* sobre biofilme e expressão do gene *HWP1* de *Candida albicans***. Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná, 2022.

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

JIANG, C., et al. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 4, p. 778-785, 2012.

JUSTO, V. E. M. S. Análise do potencial antimicrobiano do extrato de *Macrocybe titans* nas características morfológicas de *Candida tropicalis* e *Trichosporon* spp. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Curso de Ciências Biológicas com Ênfase em Gestão Ambiental da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, 2021.

KARLSEN-AYALA, E.; SMITH, M. E. *Macrocybe titans*: The Mushroom Giant of the Western Hemisphere. **Plant Pathology Department**, UF/IFAS Extension, 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.

KIRK, P. M. et al. **Dictionary of Fungi**. 10. ed. CABI Publishing, United Kingdom, 2008.

KLAUS, A., et al. Biological potential of extracts of the wild edible Basidiomycete mushroom *Grifola frondosa*. **Food Research International**, v. 67, p. 272-283, 2015.

KNAK, M. U., et al. Atividade citotóxica frente a *Artemia salina* e antioxidante do fungo *Macrocybe titans*. **Dynamis Revista Tecno-Científica**, v. 5, n. 81, 2009.

KOŁPA, M. et al. Incidence, microbiological profile and risk factors of healthcare-associated infections in intensive care units: a 10 year observation in a Provincial Hospital in Southern Poland. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.15, p.112, 2018.

KOVARIK, C. L., et al. Evaluation of cats as the source of endemic orotrichosis in Peru. **Medical Mycology**, v. 46, n. 1, p. 53-56, 2008.

KRCMERY, V.; BARNES, A. J.; Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, v. 4, p. 243-260, 2002.

LACAZ, C. S. **Guia para identificação: fungos actinomicetos algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998. BRASIL. Ministério da Saúde. Aspergilose. Brasil, 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aspergilose>>

LI, B.; WEBSTER, T. J. Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 1, p. 22–32, 2018.

LOPES, J. O. et al. Epidemiology of sporotrichosis in the central region of Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v, 32, n. 5, p. 541-545, 1999.

LUCKING, R. et al. Fungi evolved right on track. **Mycologia**, v. 101, n. 6, p. 810-822, 2009.

LUZ, W. C. **Micologia Avançada**. Vol. I Taxonomia de Basidiomicetos. Passo Fundo, RS: Ed. RAPP, 2008. 400 p.

MAIA, L. C.; CARVALHO JUNIOR, A. A. Introdução: os fungos do Brasil. Instituto de pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 43-48. vol. 1, 2010.

MARIMON, R., et al. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Medical Mycology**, v. 46, n. 6, p. 621-625, 2008.

MARTIN, S. W., et al. Cell cycle dynamics and quorum sensing in *Candida albicans* chlamydo spores are distinct from budding and hyphal growth. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 7, p. 1191-1202, 2005.

MATIJAŠEVIĆ, D., et al. 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.

MATTOS, J. L. H. **Bioprospecção de macrofungos da classe Basidiomycetes da floresta nacional Mário Xavier em Seropédica** - RJ. Tese de Doutorado - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Biblioteca Central, 2020.

MENEZES, T. M. F. **Isolamento dos polissacarídeos dos cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes*: caracterização estrutural, estudo reológico e potencial para uso terapêutico**. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Ceará, Ceará – FORTALEZA, 2014.

MILHORINI, S. D. S., et al. Fucogalactan from the giant mushroom *Macrocybe titans* inhibits melanoma cells migration. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, p. 50–56, 2018.

MONTARELO, D. P., et al. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteremia: association of molecular factors with the source of infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–11, 2018.

MOORE, D., et al. **21st Century Guidebook to Fungi**. Cambridge: Cambridge University Press. 2011.

MOREIRA, L. M. ***Candida tropicalis*: Epidemiologia Molecular de isolados clínicos em Hospital Universitário de Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas. Rio de Janeiro, 2019.

MOURA, et al. Esporotricose - protocolo de enfrentamento da doença em Belo Horizonte. Prefeitura de Belo Horizonte/MG, 2018.

NOBLE, S. M., et al. *Candida albicans* cell type switches and functional plasticity in the mammalian host. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 96- 108, 2017.

PANIZO, M. M.; MORENO, X. **Laboratory Identification of Fungal Infections**. Editor: Nima Rezaei, Encyclopedia of Infection and Immunity, Elsevier, p. 34-62, 2022.

PAPPAS, P. G. et al. Sporotrichosis in Peru: Description of an area of hyperendemicity. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 65-70, 2000.

PEGLER, D. N. et al. The pantropical genus *Macrocybe* gen. nov. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 494–504, 1998.

PEREIRA, F. C. B. N. **Análise do potencial antifúngico do extrato de *Macrocybe titans* sobre *Candida albicans***. Dissertação (mestrado no Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular). Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, 2020.

PEREIRA, P. S. et al. Clonal dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, p. 4453-4456, 2015.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 42–48, 2014.

RAMÍREZ, N. A. et al. First record of *Macrocybe titans* (Tricholomataceae, Basidiomycota) in Argentina. **Check List**, v. 13, n. 4, 153–158. 2017.

RAVEN, P. H. **Biologia Vegetal**. 6ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan, p. 906, 2019.

SITO JUNIOR, EVANDRO DE ARAUJO. **Análise do potencial antibacteriano e triagem micoquímica do extrato aquoso do cogumelo *Macrocybe titans***.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina. Palotina, PR, 2022.

TACCONELLI, E. et al. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **World Health Organization**, v. 27, p. 318-327, 2017.

VENTURINI, M. E. et al. 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.