

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**GLADYS ROSANE THOMÉ VIEIRA**

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE**  
*Polyporus tricholoma* Mont. VISANDO A  
**PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIBACTERIANAS**

**FLORIANÓPOLIS**

**FEVEREIRO 2005**

**GLADYS ROSANE THOMÉ VIEIRA**

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE**  
*Polyporus tricholoma* Mont. VISANDO A  
**PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIBACTERIANAS**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia**

**Orientador: Prof. Dr. Artur Smânia Júnior**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Lorena B. B. Tavares**

**FLORIANÓPOLIS**

**FEVEREIRO 2005**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Vieira, Gladys Rosane Thomé

Otimização das condições de cultivo de *Polyporus tricholoma* Mont. visando a produção de substâncias antibacterianas/ Gladys Rosane Thomé Vieira – Florianópolis, 2005.

120p.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina.

1. Polyporus.
2. Atividade antibacteriana.
3. Isodrimenediol.
4. Otimização de processo.

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *Polyporus tricholoma* Mont.  
VISANDO A PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIBACTERIANAS**

Por

**GLADYS ROSANE THOMÉ VIEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de pós-Graduação em Biotecnologia, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, pela Banca Examinadora, formada por:

---

Presidente: Prof. Artur Smânia Júnior, Dr., UFSC

---

Relatora: Prof<sup>ª</sup> Margarida Matos de Mendonça, Dra., UFSC

---

Membro: Prof. Ricardo Andrade Rebelo, Dr., FURB

---

Membro suplente: Prof<sup>ª</sup>. Elza de Fátima Albino Smânia, Dra., UFSC

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela força de vontade e saúde concedidas;

Ao meu esposo Itamar e meus filhos Itamar, João Paulo e Luís Augusto pelo amor, incentivo e compreensão em todos os momentos;

À minha mãe Norma por ter me acolhido em sua casa com tanto carinho, durante todo o mestrado e por seu imenso otimismo na vida;

A meu pai Nereu, falecido subitamente em 2004, e que infelizmente não pode ver meu trabalho finalizado, mas que desde menina foi o maior incentivador de meus estudos;

Ao Prof. Artur Smânia Júnior por sua orientação, sinceridade e conhecimentos transmitidos;

À Prof<sup>a</sup> Lorena Tavares, amiga, parceira, entusiasta, sempre me incentivando e ajudando com sua extrema competência;

A Mariane Liebl, por sua enorme colaboração, não medindo esforços e trabalhando com seriedade e eficiência a meu lado nos ensaios realizados;

Às acadêmicas do Curso de Farmácia, Franciele Valandro, Andréia Liliam Navarini e Mari Arimura, por sua cooperação técnica e amizade;

A todo pessoal dos Laboratórios de Microbiologia e Engenharia Bioquímica da FURB: à Carla Micheline Israel e em especial à Rita de Cássia Siqueira Curto Valle, pelo auxílio nos testes estatísticos;

Aos colegas, professores e secretárias do Mestrado em Biotecnologia, pela alegria, amizade, incentivo, cooperação, e bons momentos compartilhados;

Ao pessoal do Laboratório de Antibióticos da UFSC: em especial à amiga de mestrado Simone Souza, e à Roberta Paulert que auxiliou nos testes de atividade antibacteriana;

Às pesquisadoras do Instituto de Botânica de São Paulo, Marina Capelari e Adriana Gugliotta por fornecerem gentilmente as espécies de fungos utilizadas;

Aos amigos e professores da FURB, Mirele Calderari e Alessandro Guedes pelo apoio nos testes de extração e cromatografia;

Ao Prof. Alberto Wisniewski Júnior do Laboratório de Análise Cromatográfica do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Blumenau, da FURB, por efetuar as análises de CG-EM;

Ao Departamento de Ciências Naturais, em especial ao Prof. Sidney Sturmer, e à Universidade Regional de Blumenau, por oportunizarem a realização desta pós-graduação.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste sonho.

O Senhor faz sair da terra os medicamentos, não os rejeita o homem sensato. Pelos medicamentos se realiza a cura e a dor desaparece; com eles, prepara o farmacêutico diversas misturas.

(Eclesiástico, capítulo 38, versículos 4 e 7).

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 AGENTES ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA .....	3
1.2 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE NOVOS FÁRMACOS .....	9
1.3 BASIDIOMICETOS E SUAS PROPRIEDADES .....	12
1.4 GÊNERO <i>Polyporus</i> .....	21
1.4.1 Enquadramento taxonômico .....	21
1.4.2 Histórico e biogeografia .....	22
1.4.3 Características das espécies <i>Polyporus tenuiculus</i> e <i>Polyporus tricholoma</i> .....	24
1.4.4 Atividades biológicas do gênero <i>Polyporus</i> .....	28
1.5 CARACTERÍSTICAS CULTURAIS DOS FUNGOS .....	34
1.6 PROCEDIMENTOS PARA A OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIBACTERIANAS .....	37
1.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS FUNGOS .....	41
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	45
2.1 OBJETIVO GERAL .....	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	46
3.1 REAGENTES E MEIOS DE CULTURA .....	46
3.1.1 Meios de cultura usados no cultivo fúngico .....	46
3.1.2 Substâncias utilizadas na extração e solubilização das substâncias bioativas .....	47
3.1.3 Meios de cultura e materiais usados para bactérias .....	47
3.1.4 Reagente usado para revelação dos testes de atividade .....	47
3.1.5 Solventes para cromatografia .....	48
3.1.6 Fase estacionária para cromatografia .....	48
3.2 FUNGOS .....	48
3.3 CULTIVO MICELIAL DOS FUNGOS EM MEIO LÍQUIDO (GRUPO A) .....	49
3.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO (GRUPOS B e C) .....	49

3.4.1 Preparo do pré-inóculo .....	49
3.4.2 Cultivo submerso em diferentes condições .....	50
3.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....	52
3.5.1 Determinação da biomassa (g/L) .....	52
3.5.2 Determinação dos valores de pH .....	52
3.6 EXTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIBACTERIANAS .....	53
3.7 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	53
3.7.1 Bactérias .....	53
3.7.2 Inóculo bacteriano .....	53
3.7.3 Método de difusão em ágar .....	54
3.7.4 Bioautografia .....	54
3.7.5 Teste de concentração mínima inibitória .....	55
3.8 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIBACTERIANAS .....	55
3.8.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	55
3.8.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) .....	56
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	56
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
4.1. CARACTERÍSTICAS CULTURAIS DOS FUNGOS EM ÁGAR BDA .....	58
4.2 ENSAIOS DO GRUPO A .....	59
4.2.1 Crescimento celular dos fungos .....	59
4.2.2 Alterações do pH produzidas pelos fungos .....	62
4.2.3 Atividade antibacteriana dos fungos .....	63
4.3 ENSAIOS DO GRUPO B .....	67
4.3.1 Características culturais de <i>P. tricholoma</i> em caldo .....	67
4.3.2 Alterações do pH produzidas pelo fungo .....	69
4.3.3 Influência das condições de cultivo na atividade antibacteriana do fungo .....	70
4.4 ENSAIOS DO GRUPO C .....	74
4.4.1 Crescimento celular de <i>P. tricholoma</i> .....	74
4.4.2 Alterações do pH produzidas pelo fungo .....	78

4.4.3 Influência das condições de cultivo na atividade antibacteriana do fungo .....	79
4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIBACTERIANAS .....	82
4.5.1 Cromatografia em camada delgada .....	82
4.5.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) .....	82
4.6 BIOAUTOGRAFIA .....	86
4.7 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA .....	87
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>91</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>114</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Basidiomas de <i>Polyporus tenuiculus</i> .....	25
<b>Figura 2:</b> Microscopia de basidioma de <i>P. tenuiculus</i> .....	26
<b>Figura 3:</b> Basidiomas de <i>Polyporus tricholoma</i> .....	27
<b>Figura 4:</b> Microscopia de basidioma de <i>P. tricholoma</i> .....	27
<b>Figura 5:</b> Basidiósporos de <i>P. tenuiculus</i> e <i>P. tricholoma</i> .....	27
<b>Esquema 1:</b> Combinações de diferentes condições de cultivo de <i>P. tricholoma</i> , gerando 12 tratamentos, em caldo dextrosado de batata .....	51
<b>Esquema 2:</b> Combinações de diferentes condições de cultivo de <i>P. tricholoma</i> , gerando 8 tratamentos, em caldo dextrosado de batata .....	52
<b>Figura 6:</b> Características macroscópicas culturais de <i>P. tenuiculus</i> em ágar dextrosado de batata .....	59
<b>Figura 7:</b> Características macroscópicas culturais de <i>P. tricholoma</i> em ágar dextrosado de batata .....	59
<b>Figura 8:</b> Curva de crescimento dos fungos em caldo de extrato de malte peptonado ..	59
<b>Figura 9:</b> Curva de crescimento dos fungos em caldo dextrosado de batata .....	59
<b>Figura 10:</b> Variações médias do pH efetuadas pelos fungos em caldo de extrato de malte peptonado .....	62
<b>Figura 11:</b> Variações médias do pH efetuadas pelos fungos em caldo dextrosado de batata .....	62
<b>Figura 12:</b> Médias dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> , obtidas com os extratos dos fungos cultivados em caldo dextrosado de batata e caldo de extrato de malte peptonado.....	63
<b>Figura 13:</b> Método de difusão em ágar, variante poço, de extratos de <i>P. tricholoma</i> contra <i>S. aureus</i> .....	64
<b>Figura 14:</b> Crescimento de <i>P. tricholoma</i> em cultivo agitado a 150 rpm e sem agitação, em caldo dextrosado de batata .....	68
<b>Figura 15:</b> Variações médias do pH de cultivo de <i>P. tricholoma</i> em diferentes condições de processo .....	69

<b>Figura 16:</b> Médias dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento de <i>S. aureus</i> por <i>P. tricholoma</i> .....	71
<b>Figura 17:</b> Curva de crescimento de <i>P. tricholoma</i> em caldo dextrosado de batata, com agitação e em diferentes condições de processo .....	75
<b>Figura 18:</b> Curva de crescimento de <i>P. tricholoma</i> em caldo dextrosado de batata, sem agitação e em diferentes condições de processo .....	75
<b>Figura 19:</b> Média da biomassa de <i>P. tricholoma</i> , no tempo 35, cultivado em diferentes condições, com avaliação das concentrações de carboidratos .....	76
<b>Figura 20:</b> Variações médias do pH de cultivo de <i>P. tricholoma</i> , em diferentes condições de processo e com agitação .....	78
<b>Figura 21:</b> Variações médias do pH de cultivo de <i>P. tricholoma</i> , em diferentes condições de processo e sem agitação .....	78
<b>Figura 22:</b> Médias dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento de <i>S. aureus</i> , obtidas com extratos de <i>P. tricholoma</i> em diferentes condições de processo e com agitação .....	79
<b>Figura 23:</b> Médias dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento de <i>S. aureus</i> , obtidas com extratos de <i>P. tricholoma</i> em diferentes condições de processo e sem agitação .....	80
<b>Figura 24:</b> Cromatografia em camada delgada (CCD) e bioautografia de extrato de <i>P. tricholoma</i> contra <i>S. aureus</i> .....	82
<b>Figura 25:</b> Cromatografia gasosa (CG) de extrato de <i>P. tricholoma</i> .....	84
<b>Figura 26:</b> Espectrometria de massa (EM) de extrato de <i>P. tricholoma</i> .....	86
<b>Figura 27:</b> Concentração mínima inibitória (CMI), de extratos de <i>P. tricholoma</i> contra <i>S. aureus</i> .....	87

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Exemplos de medicamentos desenvolvidos de produtos naturais .....	11
<b>Tabela 2</b> – Solventes em ordem de polaridade crescente .....	39
<b>Tabela 3</b> - Médias dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento de <i>S. aureus</i> , obtidas com os extratos de <i>P. tricholoma</i> , cultivado em caldo dextrosado de batata e extrato de malte peptonado .....	65
<b>Tabela 4</b> – Tempo de retenção dos compostos obtidos de extrato de <i>P. tricholoma</i> , por cromatografia gasosa .....	84

## RESUMO

O aumento crescente de bactérias resistentes devido a múltiplos fatores incentiva à pesquisa de novas substâncias antibacterianas. Os fungos basidiomicetos do gênero *Polyporus* são fonte de metabólitos secundários de interesse medicinal entre os quais estão os compostos antibacterianos. Neste trabalho, ensaios em cultivo submerso de *Polyporus tenuiculus* e *Polyporus tricholoma*, em meios contendo extrato de malte peptonado, e caldo dextrosado de batata, visaram avaliar a produção de biomassa, variações do pH inicial e atividade antibacteriana. Maior crescimento micelial dos fungos ocorreu em caldo de extrato de malte peptonado, sendo que *P. tricholoma* teve a maior velocidade de crescimento. Apenas os extratos obtidos de *P. tricholoma*, pela extração com acetato de etila, apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 no método de difusão em ágar, variante poço, após 13 dias de cultivo, sendo maior atividade presente no caldo de malte peptonado. A concentração mínima inibitória (CMI) para esta bactéria foi de 1,0 mg/mL de extrato. Os extratos das duas espécies não inibiram o crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922. A espécie *P. tricholoma*, selecionada quanto à geração de metabólitos antibacterianos, foi cultivada em diversas condições visando otimizar o processo de produção destes, nos ensaios seguintes. A influência do pH inicial (4,5; 6,5 e 8,5) e da agitação (150 rpm) revelou que o fungo auto-regula o pH para valores entre 5,0 e 6,0 independente da agitação, mas esta estimula o crescimento micelial, comparativamente ao cultivo estático. Resultados similares foram encontrados nos ensaios com meios contendo diferentes fontes de carbono (glicose e lactose) e concentrações (1 e 4%), sob agitação de 150 rpm. A produção de biomassa aumentou com a agitação e com a maior concentração (4%) das fontes de carbono utilizadas, e o pH apresentou maior declínio nos tratamentos com agitação. Entre os fatores implementados ao cultivo, a concentração de lactose e glicose e a ausência de agitação tiveram maior importância na produção do metabólito antibacteriano. A caracterização da substância antibacteriana por cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, revelou um composto majoritário, o isodrimenediol, produzido pelo fungo *P. tricholoma*, com atividade contra *S. aureus*.

Palavras-chave: *Polyporus*. Atividade antibacteriana. Isodrimenediol. Otimização de processo.

## ABSTRACT

The growing increase in resistant bacteria due to multiple factors has led to the search for new antibacterial substances. Basidiomycete fungi of the *Polyporus* genus are a source of secondary metabolites which are of medicinal interest as antibacterial compounds. In this study, tests with submerged cultures of *Polyporus tenuiculus* and *Polyporus tricholoma*, in media containing malt extract peptone and potato dextrose broth were carried out with a view to evaluating the biomass production, variations in the initial pH and antibacterial activity. The greatest fungal mycelial growth occurred in the malt extract peptone broth, with *P. tricholoma* having the highest growth rate. Only the *P. tricholoma* extracts, extracted with ethyl acetate, showed activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 using the agar diffusion method, well variant, after 13 days of cultivation, and the best results were in malt peptone broth. The minimum inhibitory concentration (MIC) for this bacteria was 1.0 mg/mL of extract. The extracts of the two species did not inhibit the growth of *Escherichia coli* ATCC 25922. The species *P. tricholoma*, selected for the generation of antibacterial metabolites, was cultivated under several conditions aiming to optimize its production process, in the following tests. The influence of initial pH (4.5; 6.5 and 8.5) and of shaking (150 rpm) revealed that the fungi autoregulate the pH at values between 5.0 and 6.0, with or without shaking. However, shaking stimulated the mycelial growth in comparison to the stationary culture. Similar results were obtained in the tests with media containing different carbon sources (glucose and lactose) and concentrations (1 and 4 %), with shaking at 150 rpm. The biomass production increased with shaking and with the higher concentration (4%) of the carbon sources used, and the pH showed the greatest decrease in the treatments with shaking. Among the factors added to the culture, the lactose and glucose concentration and the stationary culture, had greater statistical significance in the production of the antibacterial metabolite. The characterization of antibacterial substances through a thin-layer chromatography and gaseous chromatography coupled to mass spectroscopy, revealed a main compound, isodrimenediol, produced by the fungus *P. tricholoma*, with activity against *S. aureus*.

Keywords: *Polyporus*. Antibacterial activity. Isodrimenediol. Process optimization.

## 1 INTRODUÇÃO

Metabólitos secundários são produzidos por plantas, fungos, bactérias, protozoários, algas, insetos, animais marinhos, e outros seres, em resposta a diversos estímulos externos como competição, mudanças nutricionais e infecções por agressores (STROHL, 2000).

O uso de produtos naturais, para o tratamento de doenças que acometem o ser humano é uma prática que vem sendo empregada há muito tempo. Antigos registros escritos por chineses e egípcios, ou a própria Bíblia descrevem a utilização de produtos naturais para fins medicinais, os quais eram usados de forma habitual por vários povos (GRUNWALD, 1995; CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997; CALIXTO, 2000).

O conhecimento gerado em decorrência da utilização de produtos naturais, especialmente as plantas superiores, os microorganismos e as toxinas animais, teve papel fundamental na descoberta de novos fármacos para a terapêutica moderna. Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis para o tratamento atual de doenças foram desenvolvidos de fontes naturais, sendo 25% de plantas, 13% de microorganismos e 3% de animais. No caso das drogas anticancerígenas e dos antimicrobianos este percentual atinge 70% (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997; SHU, 1998).

Diversos produtos naturais com propriedades farmacológicas importantes foram identificados, sendo estudados um grande número de componentes celulares e metabólitos secundários produzidos por eles. As substâncias produzidas apresentam atividade anti-helmíntica, anticancerígena, estimulante do sistema imune e antimicrobiana, entre outras (WASSER; WEIS, 1999).

Os agentes antimicrobianos são utilizados há tempos pela população, embora o estudo das suas atividades tenha se expandido com a descoberta da penicilina em 1928. Estas

substâncias são indicadas para o tratamento de doenças causadas por: bactérias, fungos e protozoários (DONÁDIO *et al.*, 2002).

O uso desta classe de fármacos revolucionou a terapêutica das infecções e, seu sucesso, gerou um certo otimismo em relação à prevenção e ao tratamento dos processos infecciosos (MONTELLI; SADATSUNE, 2001).

O desenvolvimento de novos antimicrobianos semi-sintéticos e quimioterápicos possibilitou um aumento na segurança e efetividade do tratamento. Contudo, o uso exagerado dos antibióticos levou ao problema de resistência bacteriana às drogas. O aumento da frequência das infecções hospitalares devido a patógenos multi-resistentes levou a uma busca de novos e mais eficientes agentes antimicrobianos. Nos últimos 40 anos, a maioria dos novos antibióticos foi desenvolvida a partir de modificações de fármacos já existentes. Nesta pesquisa de novas opções terapêuticas, diferentes estratégias foram utilizadas (DONÁDIO *et al.*, 2002; MCDERMOT; WALKER; WHITE, 2003; HALL, 2004).

Estudos recentes, realizados com derivados aromáticos de líquens mostraram significativa atividade contra bactérias Gram positivas, e moderada atividade antifúngica (PIOVANO *et al.*, 2002). Alguns extratos lipídicos de macroalgas foram ativos para várias espécies entéricas Gram-negativas, e as bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (LIMA-FILHO *et al.*, 2002), e notáveis efeitos antifúngicos e antibacterianos foram detectados em diatomáceas (LINCOLN; STRUPINSKI; WALKER, 1990).

Mas são os fungos, pertencentes ao filo Basidiomycota, usados na medicina popular desde tempos ancestrais, que apresentam maior importância na pesquisa de substâncias antivirais, antifúngicas e antibacterianas a partir de seus metabólitos secundários (HWANG *et al.*, 2003).

Fungos e animais são mais relacionados entre si do que com as plantas, tendo se diferenciado das plantas há mais de 460 milhões de anos atrás. Doenças das plantas normalmente não acometem o homem enquanto doenças fúngicas podem ocorrer. Desde que homens e fungos têm patógenos bacterianos comuns, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, os humanos podem se beneficiar das estratégias de defesa natural dos fungos produtores de antibióticos, para debelar as infecções dos microrganismos (MARTIN, 2001).

Portanto, há interesse de se pesquisar novas substâncias de importância terapêutica produzidas por fungos, tendo em vista o aparecimento de doenças infecciosas emergentes, a crescente multi-resistência bacteriana gerando morbidade e mortalidade, especialmente em imunocomprometidos e idosos, associados aos efeitos colaterais apresentados pelos antibióticos (DONÁDIO *et al.*, 2002).

Sendo as substâncias antimicrobianas pouco estudadas em muitas espécies de *Polyporus*, há interesse em investigar estes basidiomicetos políporos presentes na biodiversidade brasileira. No entanto, considerando que os compostos antimicrobianos são produzidos em pequenas quantidades pelos fungos, o estudo de condições de cultivo *in vitro* que otimizem sua produção é de fundamental importância, sendo uma importante área da biotecnologia (PARK *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2003).

## **1.1 AGENTES ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA**

Os antibióticos são substâncias produzidas por diversas espécies de microorganismos, entre eles as bactérias e fungos e que, em baixas concentrações, são capazes de impedir o crescimento ou eliminar seletivamente outros microorganismos. Esta definição exclui os compostos sintéticos que, juntamente com os compostos naturais e seus derivados, são denominados antimicrobianos (GOODMAN *et al.*, 2003).

A primeira importante descoberta entre os antibióticos, a penicilina, ocorreu acidentalmente quando Alexandre Fleming, em 1928, observou uma cultura de estafilococos eliminada por *Penicilium notatum*. Em 1941, Florey, Chain e colaboradores iniciaram a utilização experimental desta substância no tratamento de processos infecciosos em seres humanos. Robert Robinson e colaboradores, em 1943, identificaram a estrutura da penicilina-G, viabilizando sua síntese. Em 1944 foram isolados a estreptomicina e vários outros antibióticos produzidos por *Streptomyces griseus*. Os esforços na descoberta de novos antimicrobianos geraram a descoberta do cloranfenicol em 1947, da eritromicina em 1952, da cicloserina em 1955 e em 1962, o ácido nalidíxico (BARREIRO; FRAGA, 2001; AMARANTE, 2002).

Embora a pesquisa de novos antibióticos tenha continuado o número de descobertas se reduziu em relação às aquelas da “era de ouro dos antibióticos”, ou seja de 1940 até 1970, quando a maioria das famílias de compostos foi identificada (MCDEVITT; ROSENBERG, 2001).

Os antibióticos devem ser tóxicos para o patógeno, mas inócuos para o hospedeiro. Isso significa que o fármaco, em uma concentração tolerada pelo hospedeiro, deve ter capacidade para eliminar ou impedir o crescimento do parasita. Por esta razão, os antibióticos são caracterizados como fármacos de toxicidade seletiva (RANG; DALE; RITTER, 2001).

Existem várias formas de classificar os agentes antimicrobianos. De acordo com sua origem os antimicrobianos podem ser naturais, sintéticos ou semi-sintéticos. Conforme seu espectro de ação eles se dividem em três categorias: amplo espectro, espectro intermediário e espectro reduzido. Considerando-se o efeito dos antimicrobianos, eles podem ser bacteriostáticos ou bactericidas. Também é comum sua classificação considerando-se a estrutura química. Finalmente, os antimicrobianos se classificam de acordo com os mecanismos de ação, seja inibindo a síntese da parede celular, atuando na membrana

citoplasmática, inibindo a síntese protéica ou inibindo a síntese de ácidos nucléicos (AMATO NETO *et al.*, 2000; REESE; BETTS; GUMSTOP, 2002).

Desde sua introdução na clínica médica há mais de 60 anos, a antibioticoterapia se tornou a principal estratégia de controle das infecções, e o mercado global destes fármacos é estimado atualmente em mais de 25 bilhões de dólares anuais. Durante este tempo de utilização, bactérias resistentes a novos antimicrobianos lançados no mercado aparecem poucos anos após seu lançamento. A partir de 1994, pesquisadores verificaram que bactérias de amostras de pacientes se mostraram resistentes a todos antibacterianos disponíveis na época (WALSH, 2003). A resistência não só se desenvolve como também se dissemina rapidamente. Os principais mecanismos moleculares para a ocorrência de resistência envolvem genes externos aos cromossomos, os quais se localizam em plasmídios, além de outros elementos móveis de DNA como os transposons e os integrons. Estes genes podem ser transferidos de organismo a organismo, inclusive entre espécies distintas. Também a transformação natural *in situ* pode contribuir para a disseminação de genes responsáveis pela resistência (HALL; STOKES, 1993; HALL, 2004).

Existem dois tipos de resistência bacteriana, natural ou adquirida. A resistência natural é representada por grupos bacterianos que não são sensíveis a determinados antibióticos, como por exemplo, os microrganismos Gram-negativos resistentes à penicilina G, resistência esta existente antes da antibioticoterapia e é própria da espécie. A resistência adquirida ou secundária ocorre pelo desenvolvimento de mecanismos de defesa, seja por mutação ou por aquisição de material genético exógeno (AMATO NETO *et al.*, 2000).

Os principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos se incluem em três amplas categorias: inativação direta da molécula ativa, modificação da estrutura-alvo da ação do fármaco, e redução da concentração do antimicrobiano por efluxo. A resistência incluída na primeira categoria é a da produção da enzima  $\beta$ -lactamase que degrada os antibióticos  $\beta$ -

lactâmicos, mas diversas outras enzimas modificadoras de antibióticos já foram descritas (POOLE, 2002). Na segunda categoria, a diminuição da sensibilidade aos antibióticos gerada pela modificação do alvo estrutural engloba diversas estratégias dos microrganismos, sendo um exemplo a modificação na estrutura da parede celular dos enterococos resistentes a vancomicina (ARTHUR *et al.*, 1996). Uma nova proteína codificada por plasmídios, protege a DNA girase da inibição das quinolonas sem modificar o fármaco, por um mecanismo ainda em estudos (MARTINEZ-MARTINEZ; PASCUAL; JACOBY, 1998; TRAN; JACOBY, 2002). Mas, é a terceira categoria de mecanismos de resistência que ultimamente tem chamado mais a atenção dos pesquisadores. O acúmulo do antimicrobiano dentro da célula bacteriana é de fundamental importância para sua atuação, portanto as bombas de efluxo podem afetar tanto a resistência intrínseca como a adquirida para diversos antibióticos, usando energia para reduzir a concentração citoplásmica do fármaco (STOVER *et al.*, 2000; HOSKINS *et al.*, 2001). Alguns mecanismos propostos para o efluxo dos antimicrobianos incluem transportadores multi-drogas e uso da força próton-motora, para exportar os compostos nas bactérias Gram-negativas, sendo esta resistência facilmente transferida (BLACKMORE; MCNAUGHTON; VAN VEEN, 2001; HOGAN; KOLTER, 2002; LEVY, 2002). Outros dois mecanismos de resistência envolvidos são a mudança da permeabilidade da parede celular e da membrana, e a aquisição de uma via metabólica alternativa diferente daquela inibida pelo medicamento (MCDERMOTT; WALKER; WHITE, 2003).

Alguns patógenos adquiridos em hospital estão se tornando totalmente resistentes a antibióticos, como exemplos conhecidos: *Enterococcus faecalis* vancomicina-resistente (VRE), *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA) e vancomicina-resistente, e *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem-resistente. Também *Escherichia coli* e outros Gram-negativos produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro amplo (ESBL), inativam vários antibióticos que possuem o anel  $\beta$ -lactâmico (KOLLEF, 2000).

Os mecanismos de resistência empregados são sofisticados e difíceis de reverter. As bactérias multi-resistentes causam um aumento da morbimortalidade, aparentemente menos por sua virulência, mas principalmente por falta de opções terapêuticas. Estes fármacos, em geral, são de uso parenteral e custo elevado, aumentando o tempo de internação dos pacientes e tornando os cuidados hospitalares mais dispendiosos (THOMSON *et al.*, 2004; WALSH; AYMES, 2004).

O aumento crescente de bactérias resistentes pode ser devido a: 1) a elevação do número de pacientes imunocomprometidos (devido a AIDS, quimioterapia para o câncer e transplante de órgãos), 2) maior frequência de procedimentos médicos invasivos, 3) aumento de pacientes institucionalizados (geralmente idosos) e recebendo tratamentos múltiplos com antibióticos, 4) uso de antibióticos de largo espectro no tratamento sem diagnóstico, 5) mudanças sociais e tecnológicas, como as viagens aéreas, que aceleram a transmissão de bactérias resistentes. Mas, a pressão seletiva exercida pelo uso intenso dos antimicrobianos é o fator preponderante para a elevação da resistência (LIVERMORE, 2003; THOMSON *et al.*, 2004).

O uso rotineiro de antibióticos como promotores de crescimento em animais constitui-se em sério problema de saúde pública, especialmente quando as mesmas classes de antibióticos são utilizadas em humanos, criando a maior fonte animal de bactérias resistentes (WEGENER, 2003). Na área ambiental, alguns trabalhos têm chamado a atenção para os riscos associados ao descarte de antibióticos no meio ambiente, quer aqueles provenientes de dejetos de animais que utilizam promotores de crescimento, quer aqueles usados no tratamento humano e veterinário (KÜMERER, 2003).

Vale ressaltar, que o desenvolvimento de resistência bacteriana pode ser controlado com o uso de antibióticos apenas em casos de necessidade e selecionando os fármacos, com base em antibiogramas. Além disso, a administração sistêmica, o uso de concentrações

adequadas, respeitando a duração do tratamento, e as associações de múltiplas drogas também são medidas preventivas à resistência. A educação continuada dos profissionais da área da saúde e o trabalho de equipes multi-profissionais são itens importantes na prevenção da resistência (HAMILTON-MILLER, 2004).

A partir dos anos 80 o foco das indústrias farmacêuticas se direcionou para as doenças crônicas não infecciosas como a asma, diabetes, câncer, hipertensão arterial, hipercolesterolemia e doenças do sistema nervoso central. A idéia de que as doenças infecciosas estavam sob controle desestimulou à pesquisa de novos antimicrobianos (BARRETT; BARRETT, 2003), embora as estatísticas apontem as doenças infecciosas como segunda causa de morte em todo mundo (FAUCI, 2001).

Com relação às infecções fúngicas, os problemas relativos à geração de novos fármacos se concentram na dificuldade resultante de semelhanças celulares e fisiológicas entre o hospedeiro e o invasor, sendo que a descoberta de novos antifúngicos é premente (GUPTE; KULKARNI; GANGULI 2002).

A versatilidade das populações bacterianas em se adaptar a toxicidade ambiental, associada à facilidade em transferir material genético, demonstra que a resistência antibiótica é um fenômeno biológico inevitável e que continuará a ser um problema médico crônico. O uso adequado dos antimicrobianos em uso e o contínuo desenvolvimento de novos, são vitais para proteger a saúde dos homens e animais dos microrganismos patogênicos (MCDERMOTT; WALKER; WHITE, 2003).

Para minimizar o problema da resistência aos antimicrobianos já disponíveis no mercado diversas pesquisas usando novos produtos naturais, usados de forma empírica pela população, estão em andamento. Entre estes recursos naturais podem ser citados os fungos, entre os seres vivos com expressivo potencial para extração de novas substâncias antibióticas (ISHIKAWA *et al.*, 2001).

## 1.2 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE NOVOS FÁRMACOS

Com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas para isolamento e purificação de substâncias, a área de produtos naturais é a de maior crescimento no campo da química orgânica. Atualmente existem cerca de um milhão de substâncias derivadas de produtos naturais isoladas de diversas fontes, contribuindo para tal, por um lado, o desenvolvimento da biotecnologia e da bioengenharia e por outro, novas demandas na terapia humana (BERDY, 1989).

A pesquisa de novas substâncias de importância na agricultura, na indústria, e na medicina, vem sendo conduzida usando-se a técnica de *screening* de coleções de entidades químicas, denominadas bibliotecas, e empregando ensaios específicos para sua identificação (DONÁDIO, 2002).

Os compostos resultantes de reações químicas celulares são denominados metabólitos sendo divididos em primários, aqueles responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento do organismo (DEMAIN, 2000), e metabólitos secundários, aqueles que não são necessários às funções básicas intracelulares, mas que exercem funções específicas de interação micorganismo e ambiente, podendo ser interpretados como a interface química entre o organismo e os outros seres vivos (BRIZUELA *et al.*, 1998).

Plantas, organismos marinhos e microrganismos produzem um expressivo conjunto de substâncias químicas, embora todos os restantes grupos taxonômicos possam produzir importantes metabólitos (BENTLEY, 1997).

Entre as explicações sobre a origem de metabólitos secundários produzidos pelos organismos, está a pressão seletiva natural que inclui resposta a interações de competição, parasitismo, e modificações ambientais que alterem a disponibilidade de recursos. Como exemplos destes metabólitos, podem se citar as micotoxinas cuja ação pode visar impedir os

insetos predadores, a ação dos antibióticos na defesa territorial e o odor usado para atrair insetos para dispersão de esporos (STROHL, 2000).

Apesar de todo avanço na síntese química, química combinatória e planejamento racional de fármacos, os produtos naturais continuam a ser investigados (HARVEY, 2000).

Na medicina, os produtos naturais fornecem elevado número de fármacos úteis no caso de síntese química complexa e também podem servir de compostos básicos como modelos de fármacos sintéticos ou para modificações que diminuam sua toxicidade (DEMAIN, 1999). Esta afirmação é confirmada quando se comprova o importante número de medicamentos obtidos de produtos naturais, de maneira direta ou indireta, conforme tabela 1 (MIZUNO, 1999; CALIXTO, 2003).

As dificuldades no aproveitamento dos recursos naturais com o objetivo de desenvolver fármacos incluem o longo dispêndio de tempo, elevados custos, falta de leis específicas na exploração da biodiversidade, escassez de informações sobre a identidade dos compostos naturais, até a relutância em trabalhar com estes produtos pelos químicos tradicionais (STROHL, 2000).

A descoberta da penicilina despertou grande interesse no isolamento e identificação de metabólitos secundários produzidos por fungos com atividade antibiótica. Na literatura se encontram inúmeros relatos sobre a atividade de substâncias isoladas de fungos, destacando-se as várias classes de antibióticos (ZJAWIONY, 2003).

A biotecnologia é uma área de investigação que explora sistemas biológicos, microbianos ou de culturas vegetais e animais, visando à obtenção de produtos de interesse industrial. Devido aos microrganismos apresentarem crescimento rápido, menor custo e espaço para crescimento, possibilitando maior controle dos processos operacionais, há mais vantagens no seu uso, principalmente nos processos fermentativos (BENNETT, 1998; DEMAIN, 2000).

**Tabela 1-** Exemplos de medicamentos desenvolvidos de produtos naturais

<b>Fármaco</b>	<b>Uso terapêutico</b>	<b>Fonte</b>	<b>Referência</b>
Ciclosporina	Imunossupressor	<i>Tolypocladium inflatum</i>	CALIXTO, 2003
Digoxina	Insuficiência cardíaca	<i>Digitalis purpurea</i>	
Captopril	Antihipertensivo	<i>Bothrops jararaca</i>	
Estatinas	Tratamento das dislipidemias	<i>Aspergillus terreus</i>	
Morfina	Analgésico	<i>Papaver somniferum</i>	
Quinina	Antimalárico	<i>Cinchona spp</i>	
Paclitaxel	Câncer (ovário)	<i>Taxus brevifolia</i>	
Vimblastina	Câncer (mama)	<i>Catharanthus roseus</i>	
Vincristina	Câncer (leucemia)	<i>Catharanthus roseus</i>	
Pilocarpina	Glaucoma	<i>Pilocarpus jaborandi</i>	
Penicilina	Antibacteriano	<i>Penicillium chrisogenum</i>	
Bacitracina	Antibacteriano	<i>Bacillus licheniformis</i>	
Vidarabina	Antiviral	<i>Streptomyces antibioticus</i>	
Equinocandina	Antimicótico	<i>Aspergillus nidulans</i>	
Krestin	Antitumoral	<i>Coriolus versicolor</i>	MIZUNO, 1999
Lentinam	Antitumoral	<i>Lentinus edodes</i>	
Schizophyllan	Antitumoral	<i>Schizophyllum commune</i>	

Durante os processos fermentativos para a obtenção de metabólitos secundários de fungos existem duas fases distintas. A primeira é a tropofase, fase de crescimento da massa micelial, e a segunda é a idiofase, fase onde o crescimento fúngico é interrompido e se inicia a produção de metabólitos secundários. Estas duas fases dependem diretamente do ambiente nutricional, que pode afetar qualitativa e quantitativamente o metabolismo destes organismos (DEMAIN, 2000).

Devido a que, somente parte da diversidade biológica, tenha sido descrita e estudada, existe uma enorme e inexplorada reserva de compostos naturais de variedade estrutural muitos oriundos de fungos, como fonte potencial de novas substâncias antimicrobianas (STROHL, 2000).

Os progressos nas tecnologias de fermentação, isolamento e identificação dos compostos de basidiomicetos, despertaram novamente o interesse por estes organismos, preteridos pelos actinomicetos na busca de antibióticos, pela sua produtividade e facilidade de isolamento (ANKE, 1989).

### **1.3 BASIDIOMICETOS E SUAS PROPRIEDADES**

As últimas décadas têm fornecido inúmeras mudanças na sistemática dos fungos de tal forma que este grupo de microrganismos se divide em 4 filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota. O filo Basidiomycota inclui mais de 25.000 espécies descritas, a maioria macrofungos, mas também engloba as leveduras e alguns fungos que não formam frutificações macroscópicas. Os basidiomicetos superiores (cogumelos e orelhas-de-pau) não são um grupo taxonômico, mas incluem espécies que têm corpos de frutificação macroscópicos (basidioma ou basidiocarpo), facilmente visíveis a olho nu. A característica principal dos basidiomicetos superiores é a presença de um basídio asseptado com quatro basidiosporos unicelulares hialinos ou haplóides coloridos, que são disseminados pelo ar. No micélio secundário dicariótico há freqüentemente conexões em grampo. Os políporos constituem um grupo de fungos terrestres, caracterizados por himenóforo formado por inúmeros poros, do filo Basidiomycota, e juntamente com alguns fungos do filo Ascomycota são a maior fonte de substâncias de interesse medicinal (WASSER; WEIS, 1999; CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001; CHANG; MSHIGENI, 2001).

Os fungos xilófilos basidiomicetos são separados em duas categorias: espécies que apenas degradam celulose e hemicelulose causando a podridão castanha, e espécies que degradam a lignina causando a podridão branca. Considerando que um terço do peso seco da biomassa das florestas consiste de lignina, fica evidente a importância desses fungos no processo de reciclagem, já que eles são os únicos organismos capazes de decompor eficientemente este material. Eles também evitam a depleção de nutrientes, melhoram a estrutura do solo e facilitam o reflorestamento pela micorrização (STALPERS, 1978; WASSER; WEIS, 1999).

O papel dos basidiomicetos no tratamento de resíduos tóxicos no meio ambiente é relevante. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), de origem natural e antropogênica, são a maior classe de contaminantes que oferecem riscos à saúde devido às suas propriedades genotóxicas (MÜNCNEROVÁ; AUGUSTIN, 1994). Para remover estes poluentes do meio ambiente, microrganismos podem transformá-los levando a detoxificação ou completa mineralização (CERNIGLIA, 1992). Entre os basidiomicetos lignocelulolíticos, *Psilocybe spp* mostra eficiência em transformar pireno (SILVA *et al.*, 2003), a cepa Vh57 de *Bjerkandera adusta* degrada a dioxina (SATO *et al.*, 2003), e o basidiomiceto Euc-1 descolore tintas sintéticas e pigmentos secretando um potente sistema lignolítico (DIAS *et al.*, 2003).

Os basidiomas comestíveis característicos dos macrofungos têm alto valor nutricional, sendo ricos em proteína de qualidade, fibras, minerais e vitaminas, e apresentam baixo teor em lipídios e carboidratos. A concentração reduzida de componentes lipídicos indica sua utilização em problemas de obesidade, e também para pacientes diabéticos, pelo baixo teor de açúcares (WASSER; WEIS, 1999).

A composição química varia de acordo com a espécie de fungo e a linhagem avaliada. Depende também do substrato e das condições climáticas do cultivo do fungo. Em

geral, os basidiomas com base no peso seco, contém aproximadamente 40% de carboidratos, 17% de proteínas e 3% de gorduras, sendo o restante constituído por minerais (DERMIBAS, 2001; LATIF; DARAN; MOHOMED, 1996). Estudos com o *Agaricus blazei* Murril mostraram em sua composição vários aminoácidos, vitaminas do tipo B1 e B2, ergosterol, niacina, ferro, fósforo e cálcio (HASSEGAWA, 1998). A análise da composição química de cogumelos silvestres da Tanzânia, demonstrou seu valor nutricional devido à presença de dezesseis aminoácidos conhecidos, incluindo os essenciais, com exceção da isoleucina, (MDACHI *et al.*, 2004). O teor de sódio, de algumas espécies comestíveis de fungos apresenta quantidade baixa e constante, independente do habitat, tipo de nutrição e de sua taxonomia, gerando grande benefício nutricional aos consumidores (VETTER, 2003). Um comparativo do teor de vitamina D<sub>2</sub> em fungos revelou quantidade insignificante nos cultivados, mas elevadas concentrações nos silvestres. No entanto, o ergosterol, o mais abundante esterol encontrado nos cogumelos, teve maior teor naqueles cultivados (MATTILA *et al.*, 2002).

A qualidade nutricional dos cogumelos comercializados pode ser afetada pelos processos industriais a que são submetidos, como a cocção, desidratação, congelamento e envasamento, mesmo quando sob condições controladas. Os estudos também mostraram a rica composição destes macrofungos em fibras e compostos funcionais, e reduzido conteúdo em gorduras e açúcares (MANZI; AGUZZI; PIZZOFERRATO, 2001; MANZI *et al.*, 2004).

Uma expressiva parte da população em diversos países coleta macrofungos como contribuição à sua alimentação, porém é necessário conhecer os níveis de elementos essenciais e tóxicos nos cogumelos comestíveis. Mendil e colaboradores (2004), estudaram a concentração de alguns elementos essenciais e tóxicos, como Fe, Mn Zn, Cu, Pb e Ni, em cogumelos comestíveis cultivados perto de uma via de intenso tráfego. Os resultados

apresentaram valores diversos conforme as espécies de fungos analisados mas comprovaram que estes organismos podem absorver metais pesados da atmosfera.

Estudos recentes mostraram que os constituintes detectados nos fungos são bastante promissores, incluindo entre eles aqueles que dispõem de efeitos imunomoduladores, antibacterianos, antivirais, antitumorais, antiparasíticos e cardiovasculares. Também há pesquisas demonstrando significativas reduções nos níveis de colesterol total, triglicerídios, glicose e melhoria nos quadros inflamatórios (WASSER; WEIS, 1999).

Nos séculos XVIII e XIX foi relatado o uso do políporo *Fomes fomentarius* em bandagens hemostáticas,. O mesmo fungo, junto com *Piptoporus betulinus*, que possui uma variedade de usos medicinais, foi encontrado junto ao corpo mumificado do famoso “Ice Man”, de 5300 anos, em um glaciário dos Alpes italianos em 1991. Não foi descrita a forma como foram utilizados os fungos (PEINTNER; PODER; PUMPEL, 1998; STAMETS, 2002).

Uma variedade de proteínas e peptídeos com importantes atividades biológicas, são secretadas pelos fungos como: ribonucleases, proteínas antifúngicas, lecitinas, celulases, xilanases, lacases, invertases, com aplicações na indústria de alimentos, na medicina e produção química (NG, 2004). Proteínas bioativas constituem um importante grupo de agentes funcionais em cogumelos, como as aglutininas, lecitinas ou proteínas imunomoduladoras. Uma proteína imunomoduladora (APP), isolada do macrofungo *Auricularia polytricha*, testada em esplenócitos murinos atuou ativando a resposta imune do hospedeiro (SHEU *et al.*, 2004).

Polissacarídeos extraídos dos basidiomas de vários basidiomicetos, as glucanas, têm sido estudadas quanto às suas atividades biológicas. Um dos fungos mais estudados é *Ganoderma lucidum*, e os polissacarídeos extraídos apresentam atividades antitumorais e hipoglicêmicas (MIZUNO, 1985; HIKINO; MIZUNO, 1989). Três grupos de polissacarídeos de *Grifola frondosa* apresentaram expressiva atividade nos fibroblastos, aumentando a

biossíntese de colágeno (LEE *et al.*, 2003). Os polissacarídeos ligados à proteínas, obtidos de *Coriolus versicolor*, apresentaram ação antitumoral, imunomoduladora, aumento do apetite e melhora da função hepática (CUI; CHISTI, 2003). Os efeitos antitumorais, imunoprotetores e benéficos ao estômago e ao esôfago, dos polissacarídeos de *Hericiium erinaceus*, foram evidenciados após extração dos basidiomas (MIZUNO, 1999). O polissacarídeo CPS-1, obtido da cultura de *Cordyceps militaris*, apresentou significativa atividade antiinflamatória e supressão da imunidade humoral em ratos (YU *et al.*, 2004). O polissacarídeo extracelular obtido de *Agaricus brasiliensis* teve potente ação antitumoral contra a linhagem celular Sarcoma 180 (FAN *et al.*, 2003).

A investigação fitoquímica dos produtos de hidrodestilação de basidiomicetos levou à identificação de diversos monoterpenos e sesquiterpenos, como também a vários álcoois alifáticos, aldeídos, cetonas e diversos compostos aromáticos (RÖSECKE; PIETSCH; KÖNIG, 2000). Nagatsu e colaboradores (2004), isolaram e identificaram dois novos compostos aromáticos, do basidioma de *Phellinus linteus*, e suas atividades biológicas estão sendo pesquisadas. No entanto, os compostos feligríndinas C-F, derivados do fungo *Phellinus igniarius*, foram citotóxicos “*in vitro*” para linhagens celulares humanas de câncer de fígado e pulmão (MO *et al.*, 2004).

Com relação aos derivados terpênicos de basidiomicetos, pesquisas com *Ganoderma applanatum* revelaram quatro novos triterpenóides do tipo lanostano que tiveram suas estruturas elucidadas, para posteriores estudos da atividade biológica (SHIM *et al.*, 2004). Tsukamoto e colaboradores (2003), obtiveram os diterpenos chamados tricolomalides A-C, do extrato metanólico de *Tricholoma sp*, os quais apresentaram atividade neurotrópica, em células de feocromocitoma de ratos. O cogumelo não comestível *Thelephora aurantiotincta* apresentou oito derivados terpênicos denominados telefantinas A-H, com promissoras bioatividades (QUANG *et al.*, 2003a/b). Os estudos com o basidiomiceto *Hydnellum*

*caeruleum* também mostraram a presença dos derivados terpênicos, telefantinas I-N (QUANG *et al.*, 2004a).

Para minimizar a produção de radicais livres, e conseqüente dano celular, o uso de antioxidantes naturais tem sido intensivamente pesquisado. A pesquisa de propriedades antioxidantes de fungos do gênero *Auricularia* e da espécie *Tremella fuciformis* mostraram a presença de várias substâncias ativas (MAU; CHAO; WU, 2001), e as boletininas A-J de *Boletinus cavipes* inibiram a geração do ânion superóxido, causador de estresse oxidativo (KAMO *et al.*, 2004), mas os ácidos tiromícicos B-E de *Tyromyces fissilis*, não tiveram atividade antioxidante nem anti HIV (QUANG *et al.*, 2004b). O extrato aquoso de *Lentinula edodes* apresentou maior ação antioxidante do que o extrato metanólico e superior aos de *Volvariella volvacea* (CHEUNG *et al.*, 2003). O cogumelo *Albatrellus ovinus* produziu três derivados de neogrifolina, sendo que dois deles apresentaram potente atividade antioxidante (NUKATA *et al.*, 2002). Alvarado e colaboradores (2003), estudaram o processo biotecnológico de transformação do ácido  $\rho$ -cumárico em ácido cafeico por *Pycnoporus cinnabarinus*, como alternativa de produção de um potente antioxidante natural.

Os primeiros trabalhos sobre antibióticos de basidiomicetos foram realizados em 1941 por Anchel, Hervey e Wilkins, que examinaram extratos de mais de 2.000 espécies e detectaram diversas atividades antibióticas (FLOREY *et al.*, 1949), sendo que o primeiro antibiótico produzido industrialmente a partir de basidiomicetos foi o mucidim, de nome comercial *Mucidermin Spofa*<sup>®</sup>, com atividade antibacteriana e antifúngica, e isolado de *Oldemansiella mucida* (SUBICK *et al.*, 1974). O interesse na pesquisa de metabólitos de basidiomicetos declinou porque os estreptomicetos foram considerados uma fonte mais abundante de antibióticos, e de fácil manipulação (ANKE, 1989), mas recentemente devido aos custos e dificuldades de isolamento de novos compostos bioativos deste grupo, é que os fungos superiores voltaram a ser investigados (BRIZUELA *et al.*, 1998).

De acordo com recente avaliação, realizada com número superior a 200 espécies de macrofungos, mais de 75% dos políporos apresentaram potente atividade antimicrobiana. Estas atividades não estão apenas associadas aos metabólitos secundários, mas também aos polissacarídeos de elevado peso molecular da parede celular (SUAY *et al.*, 2000). Existe também interesse em isolar compostos dos esclerócios de macrofungos uma vez que estas estruturas apresentam longa vida e persistência no solo, sendo portanto resistentes ao parasitismo e competição com outros fungos e insetos (AYER; SUN; BROWNE, 1992).

Contrastando com o expressivo número de informações sobre proteínas antifúngicas produzidas por plantas, existe um número menor de publicações com as proteínas antifúngicas produzidas por fungos (NG, 2004). Um novo peptídeo antifúngico denominado erigina, isolado do basidioma do fungo *Pleurotus eryngii*, inibiu o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* e *Mycosphaerella arachidicola* (WANG; NG, 2003). Uma ribonuclease isolada de *Pleurotus sajor-caju*, apresentou atividades antimitogênica, antiproliferativa e antimicrobiana, em relação às bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e aos fungos *Fusarium oxysporum* e *Mycosphaerella arachidicola* (NGAI; NG, 2004).

Conforme estudos de Gerasimenya e colaboradores (2002), analisando cepas de *Pleurotus ostreatus*, estas foram ativas contra *Aspergillus niger*, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O extrato do caldo micelial de *Pleurotus ostreatus* não inibiu o crescimento da levedura patogênica *Candida albicans*, enquanto o fungo *Lentinula edodes* apresentou efeito fungistático em relação a este patógeno humano (PACCOLA *et al.*, 2001). A partir do fungo desidratado *Lentinula edodes*, foram obtidas substâncias inibidoras de bactérias da cavidade oral, como o *Streptococcus mutans*, *Prevotella spp* e *Actinomyces spp*, mas não inibiram o crescimento de *Escherichia spp*, *Staphylococcus spp* e *Candida spp* isoladas de outras regiões do corpo humano (HIRASAWA *et al.*, 1999). De acordo com Ishikawa e colaboradores (1998), 35 diferentes isolados de *Lentinula edodes*, apresentaram atividade

inibitória para *Bacillus subtilis*, sendo que um dos isolados também inibiu o crescimento de bactérias deterioradoras de alimentos. O micélio obtido do cultivo submerso de *L. edodes* apresentou elevada composição proteica (23%) assim como atividade estimuladora de imunidade humoral (LOBANOK *et al.*, 2003).

Toyota e Hostettmann (1990), identificaram dois ésteres diterpênicos antifúngicos extraídos de *Boletinus cavipes* que inibiram o fungo fitopatogênico *Cladosporium cucumerinum*, sendo que a mesma atividade foi exercida pelas higrforonas A-G, isoladas de espécies do basidiomiceto *Hygrophorus* (LÜBKEN *et al.*, 2004).

Além da bioatividade dos polissacárides anteriormente mencionada, os basidiomicetos do gênero *Ganoderma* apresentam outras aplicações terapêuticas e inclusive propriedades antimicrobianas, relacionadas aos seus metabólitos secundários. A partir do extrato de *G. annulare*, foram isolados os ácidos aplanoxídicos, que inibiram o crescimento dos fungos *Microsporium cannis* e *Trichophyton mentagrophytes* (SMÂNIA *et al.*, 2003). Duas novas farnesil hidroquinonas, denominadas ganomicinas A e B, extraídas de *G. pfeifferi* exibiram atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MOTHANA *et al.*, 2000). Os valores semelhantes obtidos nos testes de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima, utilizando compostos extraídos do basidioma de *G. applanatum*, sugerem que esses possuem efeito bactericida (SMÂNIA *et al.*, 1999). O extrato metanólico de *G. australe* e algumas de suas frações, triterpenos e esteróis, apresentaram maior atividade inibitória frente às bactérias Gram-positivas, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* do que contra as Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (GERBER *et al.*, 2000). A atividade antibiótica do micélio e do caldo cultural de *G. lucidum* e *G. resinaceum* em relação à bactéria *Bacillus subtilis* foi positiva, mas apenas a última espécie inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* (BIANCO COLETTI; MONDINO, 1990). De acordo com Gao e colaboradores (2003), estudos *in vitro* e em

animais, indicaram que *G. lucidum* e *Ganoderma spp.*, exibiram atividades antibacterianas e antivirais de amplo espectro. Os triterpenóides isolados de *G. lucidum* apresentaram um efeito inibitório potente sobre o vírus Epstein-Barr (IWATSUKI *et al.*, 2003).

A atividade antimicrobiana do extrato metanólico do macrofungo *Pholiota adiposa*, mostrou resultados inibitórios expressivos para *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *S. aureus* e *Mycobacterium smegmatis*, mas ausência de efeitos em relação a *Candida albicans* (DULGER, 2004).

A cinabarina obtida do caldo micelial de *Pycnoporus sanguineus* teve atividade antibacteriana contra diferentes estirpes isoladas de humanos: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *S. aureus* e *Streptococcus spp.* Houve maior inibição de crescimento frente aos cocos Gram-positivos (SMÂNIA *et al.*, 1995). Esta substância quando testada contra onze espécies bacterianas isoladas de alimentos, foi mais eficiente em relação a *Bacillus cereus* e *Leuconostoc plantarum* (SMÂNIA; SMÂNIA; LOGUÉRCIO- LEITE, 1998).

Dois novos sesquiterpenos do tipo cupareno, denominados enokipodinas C e D, isolados de culturas de *Flammulina velutipes*, apresentaram atividade contra o fungo *Cladosporium herbarum* e contra as bactérias Gram-positivas, *B. subtilis* e *S. aureus*, porém foram inativos contra as bactérias Gram-negativas, *E. coli* e *Pseudomonas fluorescens* (ISHIKAWA *et al.*, 2001).

Os compostos fenólicos, hispidina e hispolona, obtidos do extrato de *Inonotus hispidus*, mostraram atividade frente ao vírus influenza dos tipos A e B (AWADH ALI *et al.*, 2003).

## 1.4 GÊNERO *Polyporus*

Este gênero caracteriza-se principalmente, por apresentar basidioma estipitado e sistema hifálico dimítico, com hifas conectivas do tipo “Bovista”. Os basidiósporos são hialinos, lisos, cilíndricos a elípticos. A análise do tamanho dos poros e também dos esporos, é importante na identificação das espécies deste gênero. Todas as espécies são heterotáticas e tetrapolares, lignícolas e portanto causadoras de podridão branca, atuando na decomposição da celulose, hemicelulose e da lignina, contribuindo para a ciclagem de nutrientes em ambientes terrestres. *Polyporus tuberaster* é a espécie tipo do gênero *Polyporus*. (GILBERTSON; RIVARDEN, 1987; PETERSEN; GORDON, 1994; NUNEZ; RYVARDEN, 1995).

### 1.4.1 Enquadramento Taxonômico segundo Kirk *et al.* (2001)

Reino:	Fungi
Filo:	Basidiomycota
Subclasse:	Basidiomycetes
Classe:	Agaricomycetidae
Ordem:	Polyporales
Família:	Polyporaceae
Gênero:	<i>Polyporus</i>

### 1.4.2 Histórico e biogeografia

Inicialmente *Polyporus* foi considerado um gênero com número reduzido de espécies, caracterizadas por basidiomas duros e estipitados e himenóforos poróides em trabalhos de Micheli, 1729 e Adanson em 1763. Posteriormente foram citadas 130 espécies para este gênero (DONK, 1960).

Na mais recente monografia sobre o gênero foram descritas 32 espécies dividindo-as em seis grupos infragenéricos que são *Dendropolyporus*, *Polyporus s. str.*, *Polyporellus*, *Melanopus*, *Admirabilis* e *Favolus*, baseando-se em diferenças morfológicas. A delimitação das espécies nos grupos pode ser passível de alteração uma vez que existem dúvidas quanto ao enquadramento de alguns grupos (NUÑEZ; RYVARDEN, 1995).

A classificação filogenética para o gênero encontra-se em desenvolvimento, mas os grupos possivelmente não são monofiléticos. Informações nos últimos 30 anos sobre a nomenclatura e a sistemática baseados em seqüências de DNA, sugerem alterações no nome destes fungos, de forma a refletir sua caracterização situação filogenética. Existem portanto dúvidas quando se compara a literatura antiga, com estudos mais recentes, uma vez que o mesmo fungo pode ser identificado com nomes diferentes (HIBBET; THORN, 2001; KRUEGER, 2002).

Quanto à distribuição geográfica de *Polyporus spp.*, esta pode ser assim sintetizada: o grupo *Favolus* é limitado ao habitat tropical, enquanto os outros grupos, *Polyporus*, *Melanopus*, *Polyporellus*, *Admirabilis* e *Dendropolyporus* não são restritos a uma biozona, segundo dados de Nunez e Ryvardeen (1995).

O conhecimento da biodiversidade fúngica em regiões tropicais, e especialmente no Brasil, é bastante restrito a poucas áreas e existindo número reduzido de publicações sobre o tópico. Na Bahia, Góes-Neto (1999), realizou uma revisão bibliográfica sobre a distribuição

dos fungos políporos, desde os estudos pioneiros de L veill  (1846) e do jesuíta Camille Torrend a partir de 1913, chegando a situa o atual em que o g nero *Polyporus*   representado por oito espécies em diferentes locais amostrados do estado.

Os fungos políporos foram descritos pela primeira vez no Estado de Santa Catarina, em 1815 pelo naturalista viajante Adalberto Chamisso e subsequentemente, em 1846, L veill  publicou um estudo dos exemplares coletados no Brasil Meridional e que estão depositados em Paris. Ernest Henrich Ule começou a coleta de fungos no estado em 1883, e enviou os exemplares a diversos especialistas no exterior, entre eles Hennings, que descreveu em 1897, cinco espécies de *Polyporus*, entre outros fungos. Em 1890, chegou a Blumenau Friederich Moller, que realizou suas pesquisas durante 20 meses, sendo suas coletas estudadas e publicadas por Bresadola em 1896. Com rela o aos pesquisadores brasileiros, Furlani em 1988, estudou Aphyllophorales na localidade de Rio Tavares, em Florianópolis, SC, e Loguércio-Leite concluiu trabalho de doutorado sobre políporos da ilha de Santa Catarina (LOGUÉRCIO-LEITE, 1990; GÓES-NETO, 1999).

Os trabalhos mais recentes realizados na ilha de Santa Catarina, descrevem sete espécies de *Polyporus* com seu estudo e chave de identifica o, baseados em características macroscópicas, entre elas as cores, contagem de poros por milímetro e aspectos gerais dos basidiomas, e também a análise microscópica das estruturas e suas medidas (LOGUÉRCIO-LEITE, 1992).

Nos estudos de Silveira e Wright (2002), seis espécies do g nero *Polyporus* (*P. ciliatus*, *P. tucumanensis*, *P. dictyopus*, *P. melanopus*, *P. tenuiculus* e *P. philippinensis*), foram estudadas para investigar sua compatibilidade sexual, tendo como propósito contribuir para uma melhor delimita o das espécies deste fungo existentes na América do Sul; confirmar o tipo de cruzamento; verificar a presença de alelos múltiplos nas popula es

estudadas e averiguar a eficiência de cruzamentos de cultura de monósporos, como uma ferramenta para identificação de espécies de *Polyporus*.

Uma pesquisa recente com *P. ciliatus*, *P. tenuiculus* e *P. tucumanensis* teve como objetivo estudar a taxonomia dessas espécies, bem como sua sexualidade e semelhança isoenzimática. O gênero *Polyporus* foi escolhido devido ao seu ciclo de vida facilmente adaptável ao laboratório. Para tal experimento foram usadas isoenzimas como marcadores genéticos, com a vantagem de se conseguir diferenciar homozigotos de heterozigotos, sem a necessidade de experiências genéticas. A aplicação de eletroforese de isoenzimas para fungos foi utilizada para diferenciar as espécies, devido a sua grande especificidade. O uso simultâneo de caracteres morfológicos e moleculares, análise numérica e a produção de basidiomas, tornaram possível uma delimitação das espécies de *Polyporus* presentes no Sul da América (SILVEIRA, SAIDMAN; WRIGHT, 2003).

#### **1.4.3 Características das espécies *P. tenuiculus* e *P. tricholoma***

O fungo *P. tenuiculus* (Beauv.) Fr. está classificado no grupo infragenérico *Favolus* enquanto *P. tricholoma* Mont. está classificado no grupo *Polyporellus* (ÑUNEZ; RYVARDEN, 1995).

A distribuição das duas espécies é pantropical, sendo a espécie *P. tricholoma* de origem americana e *P. tenuiculus* originário da Nigéria (LOGUÉRCIO-LEITE, 1992).

##### **✓ *Polyporus tenuiculus* (Beauv.) Fr.**

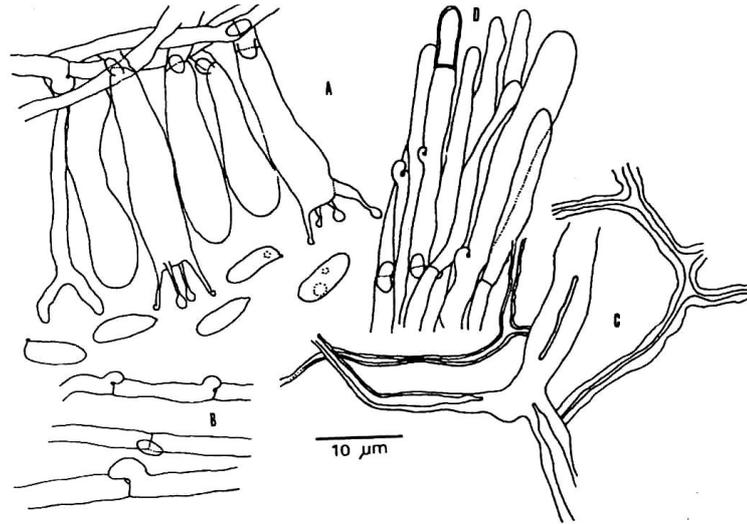
**Características macroscópicas:** basidiocarpo anual, solitário, imbricado ou em pequenos grupos com vários basidiomas originados do mesmo ponto de inserção; flabeliforme, espatulado, dividido ao meio e semicircular; quando fresco mole e quando seco quebradiço e leve. A superfície superior branca quando fresca, ao secar se torna amarela (8/8

10 YR) e de margens mais escuras, de tom vermelho amarelado (4/8 5YR); superfície regular, sem pelos ou asperezas, exceto na parte basal onde podem ocorrer linhas ou estrias radiais. A superfície himenal apresenta poros angulares a radialmente alargados, 1-2 poros/mm e esporos com 8,0-10,0  $\mu\text{m}$  de largura (LOGUÉRCIO-LEITE, 1992; NUNEZ; RYVARDEN, 1995). Os basidiomas são apresentados na figura 1.

**Exame microscópico:** hifas dos fascículos hifais apresentam fíbulas evidentes, 3,96- 5,40  $\mu\text{m}$  de diâmetro e as hifas ligadoras possuem parede grossa e hialina. Os basídios são claviformes, hialinos, de parede delgada e com 4 esterigmas, com basidiósporos cilíndricos, hialinos e de parede delgada (2,88-) 3,60-7,20 x (1,80-) 2,16-3,60  $\mu\text{m}$  (LOGUÉRCIO-LEITE, 1992; NUNEZ; RYVARDEN, 1995). Microscopia de basidiomas e basidiósporos de *P. tenuiculus* são mostrados nas figuras 2 e 5, respectivamente.



**Figura 1:** Basidiomas de *Polyporus tenuiculus*  
Fonte: BARONI, 1998



**Figura 2:** Microscopia de basidioma de *Polyporus tenuiculus*. A: himênio; B: hifas generativas fibuladas; C: hifas ligadoras; D: cobertura do píleo  
Fonte: LOGUÉRCIO-LEITE, 1992

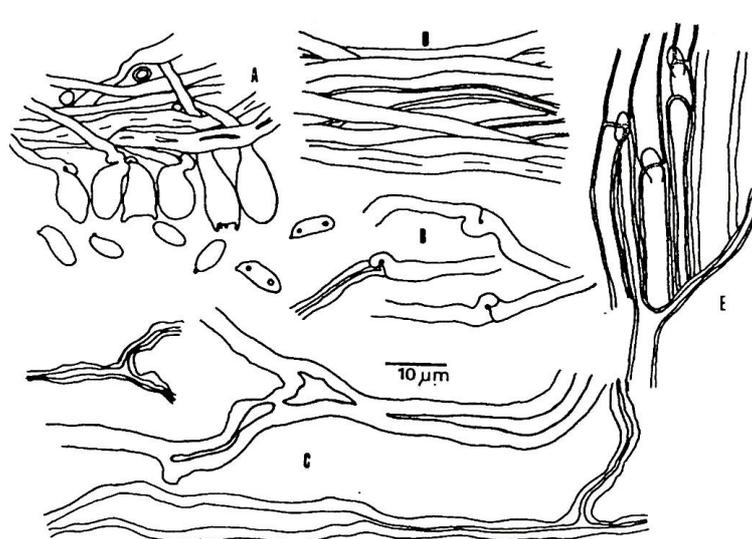
✓ ***Polyporus tricholoma* Mont**

**Características macroscópicas:** basidiocarpo anual, solitário, central a excentricamente estipitado, delgado, píleo aplanado a umbonado. Superfície superior lisa, com píleo branco a creme quando fresco, de cor castanha a amarelada (5/6, 5/8 10YR), amarela acastanhada (6/8 10YR), castanha forte (5/6 7.5YR), quando seco deflexo. Presença variável de cílios, de cor castanha forte, na margem, e pequenos poros, 5-10/mm, circulares a angulares (ROY; DE, 1977; LOGUÉRCIO-LEITE, 1992). Basidiomas são apresentados na figura 3.

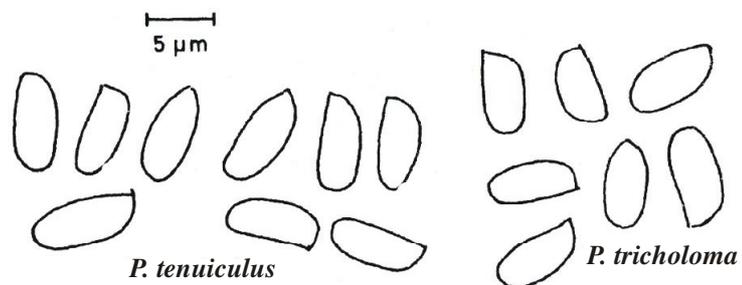
**Exame microscópico:** sistema hifal dimítico, hifas generativas fibuladas, de parede delgada (1,80-2,16  $\mu\text{m}$ ); basídios claviformes, hialinos e de parede delgada, com 4 esterigmas e base fibulada e com basidiósporos cilíndricos, hialinos, de paredes delgadas (5,40-) 5,76-7,20 (-7,56) x (1,80) 2,16-2,52 (-2,88)  $\mu\text{m}$  (ROY; DE, 1977; LOGUÉRCIO-LEITE, 1992). Microscopia dos basidiomas e basidiósporos são mostrados nas figuras 4 e 5.



**Figura 3:** Basidiomas de *Polyporus tricholoma*  
Fonte: LEGON, 1998



**Figura 4:** Microscopia de basidiomas de *Polyporus tricholoma*. A: himênio; B: hifas generativas fibuladas; C: hifas ligadoras; D: cobertura do píleo; E: cobertura da estípite  
Fonte: LOGUÉRCIO-LEITE, 1992



**Figura 5:** Basidiósporos de *Polyporus tenuiculus* e *Polyporus tricholoma*  
Fonte: NUNEZ; RYVARDEN, 1995

Número reduzido de estudos estão disponíveis sobre produção de compostos e atividades biológicas da espécie *P. tenuiculus* e, nenhum trabalho científico foi encontrado na literatura pesquisada sobre os mesmos aspectos, quanto à espécie *P. tricholoma*.

#### **1.4.4 Atividades biológicas do gênero *Polyporus***

Diversos trabalhos têm sido publicados sobre os metabólitos secundários biologicamente ativos de basidiomicetos. Mas, entre os basidiomicetos, são os fungos políporos segundo vários autores, a maior fonte de produtos naturais farmacologicamente ativos, além de sua importância para a natureza (ZJAWIONY, 2003).

As enzimas oxidases e peroxidases produzidas por fungos têm importante papel na degradação da lignina. Os chamados “fungos da podridão branca” possuem relevante papel ecológico devido à suas enzimas lignolíticas, pois estas detoxificam os compostos xenobióticos tóxicos por sua degradação parcial ou completa mineralização (PASCZYNSKI; CRAWFORD, 1995). Dentre estes fungos, o basidiomiceto *Polyporus tulipiferae* é eficiente em ligar pentaclorofenol a substâncias úmidas, durante a biorremediação do solo, como também remove hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e bifenóis policlorados (RUTTIMANN-JOHNSON; LAMAR, 1997).

Recentemente, várias outras aplicações destes organismos e suas enzimas têm sido comprovadas. A lista inclui clareamento em indústrias de papel, tratamento de efluentes industriais, dessulfurização do carvão e petróleo, produção de aromáticos da lignina, e outras aplicações biotecnológicas (KIRK; FARRELI, 1987). As enzimas lignolíticas extracelulares: lacase, lignina peroxidase e lignina peroxidase manganês dependente de *P. tulipiferae*, possuem polimorfismo e alto grau de diversidade (ROTHSCHILD *et al.*, 2002). A produção de lignina peroxidase e manganês peroxidase por *P. ostreiformis*, demonstrou sua aplicação

no controle da poluição da água degradando tintas, no processo biológico de descoloração (DEY; MAITI; BHATTACHARYA, 1994).

O aumento da produção de catecolase (o-difenol oxidoreductase) por *Polyporus versicolor*, é incrementado à temperatura de 20°C a 30°C assim como o crescimento celular. A produção de catecolase foi estudada como um possível índice do potencial do organismo secretar o sistema enzimático de degradação da lignina, importante na conversão dos lignocelulósicos em produtos úteis (CARROAD; WILKE, 1977).

O papel de glicosidases específicas, no estudo da configuração e arranjos de unidades de açúcares em glicoproteínas e glicolipídios, é de muita importância. Por esta razão cada glicosidase deve estar livre de contaminações com outras glicosidases. Wan e colaboradores (1976) isolaram e purificaram do basidioma de *Polyporus sulfureus* uma  $\beta$ -manosidase mais pura, diferente da encontrada em outras fontes, como as extraídas do caracol, cevada ou abacaxi, que são inconvenientemente ricas em  $\alpha$ -manosidase.

Outros estudos sobre enzimas, produzidas por fungos do gênero *Polyporus*, incluem a produção de pectinases por *P. squamosus* e xilanases por *P. tulipiferae* (KANDA; AMANO; NISIZAWA, 1985; ANTOV; PERICIN, 2001). Antov e Pericin (2003), verificaram o efeito de sais inorgânicos no particionamento da pectinase produzida por *P. squamosus* em um sistema bifásico.

Os fungos comestíveis têm sido utilizados como alimento humano há séculos, sendo apreciados por sua textura e sabor, bem como suas propriedades medicinais. Estudos têm mostrado que alguns fungos possuem quantidades apreciáveis de fibras dietéticas, em diferentes estágios de seu desenvolvimento, incluindo micélio, basidiomas e principalmente o esclerócio, com cerca de 70% do peso seco total em fibras (CHEUNG, 1997). O consumo de fibras dietéticas solúveis e insolúveis, confere uma proteção efetiva contra doenças crônicas, como diabetes, doenças coronarianas, câncer de cólon, constipação e diverticulites (JALILI;

WILDMAN; MEDEIROS, 2000). De acordo com Wong e colaboradores (2003), as fibras insolúveis obtidas do esclerócio de *Polyporus rhinoceros*, são em substancial quantidade (84,4% da massa seca) e puras, sugerindo elevado potencial como fonte alternativa de fibras.

A pesquisa de aromas de origem natural para uso na indústria de alimentos, tem aumentado nas últimas décadas. Os cultivos miceliais de fungos em meios sintéticos, são uma fonte potencial de substâncias aromáticas. Os terpenos são produzidos por vários gêneros de basidiomicetos, incluindo *Polyporus*, e são responsáveis pelas propriedades aromáticas dos óleos essenciais. As espécies *P. abducens* e *P. frondosus* produzem odor de cereja e louro, respectivamente, enquanto o aroma de anis é obtido com *P. schweinitzii* (GROSS; ASTHER, 1989; JANSSENS *et al.*, 1992).

Uma série de pesquisas com lecitinas obtidas de fungos comestíveis, têm mostrado sua atividade antitumoral, imunomoduladora e antiproliferativa (KAWAGISHI *et al.*, 1988). A lecitina obtida do fungo silvestre *Polyporus adusta*, inibiu proliferação de três linhagens de células tumorais e estimulou mitogênese em esplenócitos de ratos (WANG; NG; LIU, 2003). Esta lecitina, denominada adustina, a primeira isolada de um macrofungo silvestre, é um peptídeo pequeno que inibe a tradução na síntese protéica em células de coelho, como demonstrado recentemente por Ng e Wang (2004). A partir do corpo de frutificação de *P. squamosus* foi purificada e caracterizada uma lecitina (designada PSA) com estrutura importante para estudos glicobiológicos, especialmente na pesquisa e diagnóstico de câncer (MO; WINTER; GOLDSTEIN, 1999).

As propriedades medicinais do fungo *Polyporus umbellatus* foram estudadas por Ishida e colaboradores (1999) que demonstraram sua atividade estimulante no crescimento capilar, através dos princípios ativos, polyporusteronas A e B. Sete compostos denominados polyporusteronas A-G, isolados de *P. umbellatus* e com suas estruturas determinadas, possuem ação citotóxica na proliferação de células leucêmicas L-1210 (OHSAWA *et al.*,

1992). Um componente diurético anti-aldosterona foi extraído do esclerócio de *P. umbellatus* e denominado ergona. Este fungo é usado na medicina popular chinesa como promotor da diurese (YUAN *et al.*, 2004). No tratamento da hepatite B, um grave problema mundial de saúde pública, são utilizadas comumente na China, ervas medicinais adicionadas a polissacarídeos de *P. umbellatus*. No entanto, são necessários estudos mais detalhados e de qualidade para comprovar sua eficácia na cura da doença (LIU; MCINTOSH; LIN, 2001).

As pesquisas relacionadas à atividade imunomoduladora do extrato micelial de *Polyporus squamosus* em ratos, demonstraram resultados promissores para potenciais estudos clínicos (BABAKHIN *et al.*, 1996). A cepa *P. squamosus* 64 (PS-64), testada *in vitro* na proliferação de células mononucleares humanas revelou propriedades imunomoduladoras que podem influenciar o reconhecimento antigênico pelas células imunocompetentes e síntese de citocinas (BABAKHIN *et al.*, 1999).

Atividade antitumoral expressiva foi verificada em cinco complexos xiloglicanas-proteínas, fracionados dos polissacarídeos, extraídos do basidioma (*ningyotake*), do basidiomiceto *Polyporus confluens*. Um polissacarídeo mucilaginoso, extraído do cultivo líquido micelial desta espécie, também apresentou atividade inibitória de células do tumor sólido Sarcoma 180, em ratos (MIZUNO *et al.*, 1992).

Sendo o aumento dos níveis de colesterol sanguíneo, causa de inúmeras patologias, como o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral, a pesquisa de fármacos inibidores de sua síntese vem sendo constante. O extrato etanólico de *P. confluens* foi fracionado em cinco substâncias, sendo que a grifolina e neogrifolina apresentaram ação de hipocolesterolemia em animais de experimentação (SUGIYAMA *et al.*, 1992).

Um campo de pesquisa pouco explorado nos fungos poliporóides, se refere à sua atividade antimicrobiana, tendo seu uso popular uma longa história entre os povos indígenas (ATSUMI *et al.*, 1990).

Os metabólitos secundários de *Polyporus benzoinus*, o ácido triterpenóide (ácido poliporênico C) e o ácido ungulínico testados com os organismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium phlei* apresentaram forte atividade do primeiro contra as micobactérias e moderada atividade do ácido ungulínico para *S. aureus* (MARCUS, 1952).

Hispidina, uma esterilpirona do extrato de *Polyporus schweinitzii*, apresentou boa atividade quando testada com as bactérias, *Mycobacterium smegmatis*, *Bacillus subtilis* e *S. aureus* (BENEDICT, 1972). Esta substância já havia sido estudada por Ueno e colaboradores (1964), ao analisar o basidioma deste fungo.

Em contraste com vários relatos na literatura de proteínas antifúngicas originadas de animais e de plantas florais, há poucos estudos sobre proteínas antifúngicas de basidiomicetos (GRENIER; POTVIN; ASSELIN, 2000). Um polipeptídeo com massa molecular de 28 kDa, isolado de *Polyporus alveolaris*, inibiu quatro espécies fúngicas: *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella arachidicola* e *Physalospora piricola* (WANG; NG; LIU, 2004).

Um dos mais diferentes fungos subterrâneos é o *tuckahoe* (pão indígena) canadense, que se assemelha a uma grande pedra escura e que na verdade é o esclerócio do fungo *Polyporus tuberaster*. A partir do esclerócio pulverizado foi extraída a substância denominada *tuckolide* que mostrou fraca atividade antifúngica em relação a *Alternaria alternata*, *Verticillium dahliae* e *Trichoderma harzianum*, usados como organismos teste (AYER; SUN; BROWNE, 1992).

A utilização de duas enzimas, a piranose 2-oxidase e a aldose-2-ulose desidratase, purificadas de *Polyporus obtusus*, possibilitou a síntese do antibiótico cortalcerona, em uma via biossintética a partir da d-glicose (KOTHS; HALENBECK; MORELAND, 1992).

O extrato micelial obtido de *Polyporus badius* inibiu o crescimento de *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*, mas o extrato do caldo de cultura não apresentou atividade antibiótica (BIANCO COLETTI; PIZZINATI; ROSSI, 1993).

O composto isodrimenediol obtido de *Polyporus arcularius* DSM 1021, teve moderada atividade antimicrobiana em relação à levedura *Sporobolomyces salmonicolor* e à bactéria Gram-positiva *S. aureus* (FLECK *et al.*, 1996). Estudos efetuados com as espécies: *P. arcularius*, *P. meridionalis*, *P. rhizophilus* e *P. squamosus* em relação a um conjunto de cepas bacterianas e fúngicas, mostraram como resultados mais expressivos, forte atividade do *P. meridionalis* para *Bacillus subtilis* e moderada atividade de *P. arcularius* frente a *Staphylococcus aureus* (SUAY *et al.*, 2000). No entanto, nas pesquisas de Cabrera e colaboradores (2002), extratos de cultivo líquido de *P. arcularius*, *P. ciliatus* e *P. tenuiculus* não foram ativos contra *S. aureus*, e também para *B. subtilis*, *E. coli*, *Candida albicans* e *Cladosporium cucumerinum*.

Conforme Rosa e colaboradores (2003), extratos obtidos de duas cepas de *Polyporus* sp., avaliadas quanto à sua atividade antifúngica e antibacteriana, em um painel de microrganismos patogênicos e não patogênicos, não apresentaram resultados satisfatórios.

O metabólito secundário denominado “beauvericina”, produzido pelo políporo amarelo claro *Polyporus sulphureus*, conhecido como *chicken-of-the-woods*, é um forte antagonista de *S. aureus* (SUAY *et al.*, 2000). Esta mesma substância exibiu significativa atividade inseticida (MORRISON *et al.*, 2002).

## 1.5 CARACTERÍSTICAS CULTURAIS DOS FUNGOS

Os fungos são heterotróficos e exibem nutrição absorptiva e devem liberar enzimas para o meio externo para digerir os nutrientes e transformá-los em moléculas menores e mais solúveis. Há necessidade de água livre no meio para a difusão dos nutrientes solúveis para o interior das células. O substrato que determinada espécie utiliza como nutriente depende das enzimas que ela produz (GRIFFIN, 1994).

Outros fatores que influenciam o crescimento fúngico são a temperatura, os valores de pH e o oxigênio. A temperatura ótima para a maioria das espécies varia entre 25 e 30° C. Já para o pH a variação é bastante ampla, entre 4,0 a 9,0 e a maioria se desenvolve bem em aerobiose, incluindo as leveduras que são anaeróbias facultativas (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001).

Entre as formas de cultivo para fungos, há vantagens em efetuar o cultivo submerso dos basidiomicetos pelas seguintes razões: alguns fungos são raramente encontrados na natureza; o tempo de cultivo (2 a 3 semanas) é inferior aquele necessário para obtenção do corpo de frutificação (2 a 3 meses); o espaço para o cultivo é pequeno e há menor chance de contaminação. Além disso há possibilidade de otimizar o meio para produção dos metabólitos secundários (TANG, ZHONG, 2002; KIM *et al.*, 2003).

A síntese dos metabólitos secundários está associada à diferenciação ou desenvolvimento celular, sendo bem observada nos fungos que apresentam crescimento filamentoso, com morfologia complexa (CALVO *et al.*, 2002). Comumente o metabolismo secundário está relacionado aos processos de esporulação nestes organismos, podendo os metabólitos induzir a esporulação, serem concomitantes, ou produzidos após este processo (ADAMS; YU, 1998). Os metabólitos extraídos do corpo de frutificação nem sempre correspondem àqueles obtidos nas culturas miceliais, para uma mesma espécie fúngica

(ANKE, 1989). Para incrementar a produção dos metabólitos secundários há necessidade de controle genético, através da seleção e mutagênese, e controle fisiológico que inclui: regulação das fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, assim como diferentes tipos de inibição por *feedback*, e efeito de compostos auto-reguladores (SPIZEK; TICHY, 1995).

É importante o estudo das condições de cultivo da espécie fúngica pesquisada, porque pode ocorrer incremento tanto da biomassa micelial, quanto dos metabólitos secundários e exopolissacarídios, importantes em várias atividades biológicas deste fungo (HWANG *et al.*, 2003). As condições ideais para o crescimento micelial podem não ser as mesmas do que aquelas para a produção dos compostos bioativos de interesse. A regulação fisiológica varia com organismos diferentes, e diferentes vias metabólicas (LUCHESE; HARRIGAN, 1993).

Com relação aos nutrientes, são o carbono e o nitrogênio os elementos dominantes na fermentação porque estão diretamente ligados à produção de biomassa e dos metabólitos. Também a natureza e a concentração da fonte de carbono podem regular o metabolismo secundário através do fenômeno conhecido como repressão catabólica. A relação C:N é outro fator importante, e na maioria dos fungos, a limitação de nitrogênio diminui o crescimento mas incrementa a produção das substâncias bioativas (MANZONI *et al.*, 1999; LÓPEZ *et al.*, 2003). Pesquisas recentes com várias fontes, e quantidades de carbono e nitrogênio mostraram variações conforme a espécie estudada, e o implemento de biomassa ou metabólito (KIM *et al.*, 2002; TANG; ZHONG, 2002; HWANG *et al.*, 2003; ELISASHVILI; WASSER; TAN, 2003; WU *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2004; WAGNER *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2004).

As temperaturas ótimas para a produção de substâncias bioativas são geralmente mais baixas do que aquelas para o crescimento micelial, mas podem variar consideravelmente. Também o tempo de incubação é outro ponto importante, e é dependente das condições de cultivo e das características de crescimento do fungo (BARBEREL;

WALKER, 2000; PARK *et al.*, 2001; KNIGHT *et al.*, 2003; JONATHAN; FASIDI; AJAYI, 2004; LEE *et al.*, 2004).

De acordo com Kim e colaboradores (2002), o pH ótimo foi 6,0 tanto para o crescimento micelial como para a produção de exopolissacarídios por *Paecilomyces sinclairii*, no entanto a maior produção da cinabarina, um antibacteriano sintetizado por *Pycnoporus sanguineus*, ocorreu em pH 9,0 (SMÂNIA *et al.*, 1997), e outros valores de pH recentemente testados, foram mais adequados para outras espécies fúngicas (KIM *et al.*, 2001; ELMAHDI *et al.*, 2003; SHU; LUNG, 2004; JONATHAN; FASIDI; AJAYI., 2004; LEE *et al.*, 2004).

Aeração e agitação do caldo de fermentação propiciam a demanda de oxigênio no cultivo submerso. A condição de agitação da cultura em caldo é importante, aumentando a biomassa micelial, exopolissacarídios e outros produtos fúngicos (MANTZOURIDOU; ROUKAS; KOTZEKIDOU, 2002; KIM *et al.*, 2003). Outro fator a ser considerado é a aeração do meio, pois a fermentação submersa se caracteriza por um aumento da viscosidade do caldo e mudanças na morfologia celular, afetando o suporte de oxigênio, logo diminuindo o crescimento e a produção de metabólitos (TANG; ZHONG, 2003; XU; YUN, 2004).

Vários genes e mecanismos fisiológicos estão envolvidos no desenvolvimento da morfologia dos fungos sendo que em cultivo submerso diversos fatores contribuem para as várias morfologias apresentadas. A influência do tamanho do inóculo, e também a composição do meio, pH e agitação, influenciam a morfogênese fúngica e esta atua na formação dos produtos e exopolissacarídios (DOMINGUES *et al.*, 2000; SINHA *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2002a; HWANG *et al.*, 2004; PAPAGIANNI, 2004).

A suplementação do meio de cultivo com determinados óleos vegetais e ácidos graxos, estimula a produção de exo-biopolímeros (PARK *et al.*, 2002b).

Com o objetivo de aumentar a biomassa e as substâncias produzidas por alguns organismos, a utilização do ultrassom em biorreatores, denominados sonobiorreatores, tem se mostrado eficiente (CHISTI, 2003).

Portanto, os vários trabalhos comprovam que há diferenças entre os vários fungos, quanto à otimização das condições de cultivo, e o conhecimento destes aspectos pode melhorar a produção de substâncias de interesse medicinal (KIM *et al.*, 2002).

## **1.6 PROCEDIMENTOS PARA A OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIBACTERIANAS**

Quando se tem o objetivo de identificar novos constituintes químicos naturais ou confirmar a presença de alguns já descritos, a pesquisa na área de química pode apontar os grupos de metabólitos secundários importantes, nas amostras analisadas. No estudo de uma classe específica de constituintes ou de substâncias responsáveis por determinada atividade biológica, o direcionamento da investigação será para o isolamento e a elucidação estrutural das mesmas (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003).

Com a coleta adequada do material da natureza, como o fungo ou vegetal, se inicia a investigação. Os principais dados a serem anotados são: data, hora e local da coleta, que são variáveis importantes quanto ao acúmulo dos metabólitos secundários (ALVES; PAVANI, 1991). Fotografar o espécime antes da coleta, assim como preparar uma exsicata é essencial para a identificação e documentação do mesmo. Em se tratando de coleta de fungos, o tempo úmido e quente facilita o crescimento dos fungos. O material coletado deve ser acondicionado com sua ficha, individualmente, em sacos de papel manteiga (MEIJER, 2001). O material fresco deve ser imediatamente processado ou conservado em baixas temperaturas, enquanto o

material seco exige cuidados especiais, impedientes das reações metabólicas após a coleta (LIST; SCHMIDT, 1989).

A extração dos compostos ativos pode ser realizada diretamente do fungo fresco ou após a secagem e estabilização do material coletado. No entanto, vários estudos utilizam o micélio e o filtrado do cultivo líquido, após isolamento do macrofungo, pois poucos exemplares de uma mesma espécie, normalmente são coletados, dificultando a extração diretamente dos basidiomas. O cultivo de cogumelos para produção de fármacos data somente do final dos anos 70 e as pesquisas mostraram que as maiores atividades biológicas ocorrem nos exudatos metabólicos liberados no caldo (LOMBERT *et al.*, 2000).

Na escolha de um método extrativo deve-se avaliar sua eficiência, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade dos meios e o custo do processo escolhido, considerando a finalidade do extrato que se quer preparar. Existem atualmente vários procedimentos para retirada das substâncias antibióticas do meio de cultura, através de métodos fundamentais, como precipitação, adsorção ou extração com solvente imiscível, sendo este último o mais utilizado para a maioria dos antibióticos (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997). Dependendo do tipo de solvente usado na extração, diferentes quantidades e tipos de produtos podem ser obtidos. O emprego de solventes apolares como o éter de petróleo ou solventes altamente polares, como metanol e água, são seletivos para certos grupos de compostos (VERPOORTE, 1998). Na tabela 2 estão ordenados os solventes mais comuns de acordo com sua polaridade.

Dependendo da natureza química da substância a ser extraída solventes de baixa, média ou alta polaridade, devem ser utilizados no processo. O princípio geral utilizado é de que o semelhante dissolve o semelhante, portanto o solvente não polar extrairá a substância não polar.

**Tabela 2:** Solventes em ordem de polaridade crescente

---

**Solventes em ordem de polaridade crescente**

---

Hexano – Éter de petróleo

Benzeno – Tolueno

Dietileter

Clorofórmio

Diclorometano

Acetato de etila

Acetona

Butanol

Etanol

Metanol

Água

Ácidos e bases em solução aquosa

---

Fonte: HOUGHTON; RAMAN, 1998

Na extração do tipo líquido-líquido, quando um extrato dissolvido em um líquido, por exemplo um caldo de cultivo, é misturado a um solvente orgânico não miscível, duas camadas se formarão e o solvente extrator retirará as substâncias do meio aquoso. Dois solventes de média polaridade frequentemente usados na extração são o acetato de etila e o clorofórmio que são misturados ao filtrado micelial e passados por funil de separação, no método gravimétrico (MATOS, 1997).

Os métodos de extração dependem de fenômenos de difusão, logo a renovação do solvente e a agitação são importantes na eficácia e duração do processo. A extração de compostos de média polaridade de extratos aquosos por alguns solventes imiscíveis pode ser melhorada pelo *salting out*, que se constitui na utilização de uma solução aquosa saturada de

cloreto de sódio, usada após o processo de extração com solvente orgânico, com o objetivo de reduzir a solubilidade de compostos não iônicos em água (HOUGHTON; RAMAN, 1998).

O material líquido deve ser concentrado em rotavapor e obtém-se o resíduo do extrato, que pode ser diluído no solvente usado, em hidróxido de amônio ou em dimetilsulfóxido (DMSO). É este extrato, que será usado na análise microbiológica e cromatográfica (ISHIKAWA *et al.*, 2001; SHIONO *et al.*, 2004). O DMSO é uma substância, que facilita a difusão e tem pouca interferência nos compostos. Estudos da estabilidade de compostos farmacêuticos em DMSO, foram realizados com resultados satisfatórios, sendo que à temperatura ambiente em 3 meses, 92% mantiveram sua integridade (KOZIKOWSKI *et al.*, 2003).

A cromatografia é um método freqüentemente utilizado para a separação de misturas de substâncias presentes no extrato, para a identificação ou determinação da pureza. Tem diversas aplicações na análise química, utilizando técnicas diversas entre si pela natureza das fases móveis e estacionárias (sólida, líquida e gasosa), bem como os equipamentos usados e as características químicas e físicas envolvidas na separação (WATERMAN; MOLE, 1994). Cromatografia seria o processo de análise imediata por migração diferencial dos componentes de uma mistura, dentro do sistema cromatográfico. Este sistema é o conjunto formado pela mistura a ser analisada, pela fase fixa ou estacionária (representada por um sólido poroso) e a fase móvel, representada pelo solvente ou eluente, que fluindo através da fase fixa irá deslocar os solutos (MATOS, 1997).

As técnicas cromatográficas mais utilizadas para extratos vegetais e de fungos são a cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida em coluna aberta (CC), cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo importante o acoplamento de métodos de detecção adequados a estas técnicas visando à

determinação do teor dos constituintes ativos ou principais (HOSTETTMANN; WOLFENDER; RODRIGUEZ, 1997).

Recentemente vem sendo realizado o monitoramento das frações por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrofotômetro de ultravioleta e espectrofotômetro de massa (CLAE/UV/EM) ou de ressonância nuclear magnética (CLAE/RNM). A união desses métodos permite direcionar os fracionamentos para o isolamento dos compostos de maior interesse na pesquisa em desenvolvimento, em função dos dados espectrais que se obtém (HOSTETTMANN; WOLFENDER; RODRIGUEZ, 1997).

Na identificação dos compostos naturais, o ponto final do trabalho é a elucidação de suas estruturas, o que é possível empregando métodos físicos sofisticados como a espectroscopia de massa (EM) ou no ultravioleta (UV), no infravermelho, e também as ressonâncias nucleares magnéticas (RNM) (BARREIRO; FRAGA, 2001). Técnicas especiais de RNM, como NOE, COSY, HETCOR, INADEQUATE, são ainda fundamentais para a elucidação da estrutura molecular de substâncias naturais complexas (CORDELL, 1995). Também o uso da cristalografia de raios X e a regioquímica permitem avaliar a estereoquímica destas substâncias (WONG; GAFFIELD, 1993).

## **1.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS FUNGOS**

Na literatura há descrição de vários métodos, para demonstrar a atividade antimicrobiana dos extratos de produtos naturais sendo que os diferentes métodos não são igualmente sensíveis. Logo os resultados obtidos passam a ser influenciados pelo método selecionado, mas também pelos microrganismos usados para realizar o teste e pelas características de solubilidade de cada substância (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991).

Devem ser usadas cepas padrão, adquiridas de coleções de cultura como ATCC (American Type Culture Collection), para que os resultados obtidos possam ser comparados entre os diversos laboratórios de pesquisa. Há necessidade de priorizar bioensaios simples e baratos para uma rápida triagem de extratos e frações contra uma variedade de alvos (HOSTETTMANN; WOLFENDER; RODRIGUEZ, 1997).

Os métodos de triagem mais usados são os de difusão e o bioautográfico, que são considerados qualitativos, pois apenas mostram se existe ou não atividade antibiótica no extrato (RIOS, RECIO; VILLER, 1988).

O método de difusão em ágar consiste na semeadura da bactéria em um meio de cultura sólido, geralmente ágar Mueller-Hinton, no qual são colocados discos de papel impregnados com o extrato a testar. Uma variante deste método, utiliza a dispensação direta do extrato, em poços feitos com um perfurador metálico no ágar. Em ambos métodos, as placas podem ser colocadas na geladeira por um período de 1 a 3 horas, para facilitar a difusão dos extratos, e após são incubadas em estufa bacteriológica, a 37°C, durante 24 horas. No dia seguinte, realiza-se a medida dos halos de inibição de crescimento, sendo que a maioria dos autores considera ideal halo maior que 9 mm (SMÂNIA *et al.*, 1995; ISHIKAWA *et al.*, 2001).

Segundo Valgas (2002), no método com poço, o produto natural difunde radialmente fazendo uma trajetória horizontal, podendo alcançar distâncias maiores no mesmo intervalo de tempo alcançado para o método de disco, logo apresenta melhores resultados.

O método bioautográfico foi acrescentado aos protocolos tradicionais usados na pesquisa de produtos naturais com atividade antibacteriana em 1946, por Goodall e Levi. Atualmente este método é usado por integrantes de laboratórios de química de produtos naturais, devido às facilidades de execução. A variante direta do método bioautográfico consiste em quatro etapas principais: 1) preparação e aplicação dos extratos em placas de

cromatografia em camada delgada (CCD), revestidas com gel de sílica G60 F254; 2) preparação e aplicação do inóculo bacteriano, por imersão, nas placas de CCD; 3) incubação dos sistemas por 24h a 36°C em caixa fechada; 4) revelação do crescimento bacteriano com sal violeta de p-iodonitrotetrazólio (INT) e leitura dos halos de inibição. Este método é considerado mais sensível que o método de difusão em ágar, mas a opção entre os dois métodos depende das condições de cada laboratório (ELOFF, 2001).

As vantagens dos métodos de difusão são: a pequena quantidade das amostras usadas no *screening* e a economia na utilização de apenas uma placa para testar 5 ou 6 compostos (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991).

Para os extratos que apresentarem atividade contra os microrganismos, nos métodos de triagem, como o de difusão em ágar, devem ser realizadas técnicas de quantificação. A determinação da concentração mínima inibitória (CMI), utiliza três técnicas: diluição em caldo, diluição em ágar e microtécnica de diluição em caldo. A técnica baseia-se na adição de uma série de diluições do extrato a testar em relação a uma mesma concentração da bactéria (KONEMAN *et al.*, 2001).

A técnica macro, de diluição em tubos é atualmente pouco utilizada devido a ser trabalhosa e dispendiosa. No método de diluição em ágar, os compostos são dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionados ao meio em várias concentrações, em mg/mL, semeia-se o inóculo, sendo as placas incubadas a 37° C e lidas após 24 h (PIOVANO *et al.*, 2002).

A microtécnica de diluição é a mais usada, e se colocam diferentes concentrações do extrato em uma série de orifícios em placa de microdiluição, contendo uma suspensão padronizada ( $10^8$  unidades formadoras de colônias/mL) do microrganismo a ser testado. A concentração mínima inibitória corresponde a menor quantidade de extrato que inibe o

crescimento bacteriano. Deve ser realizado controle de crescimento em um orifício, sem adição do extrato (ELLOF, 1998; LAMBERT; PEARSON, 2000).

A leitura do teste pode ser facilitada utilizando-se uma leitora de ELISA ou indicadores de crescimento, como a rezazurina, diacetato de fluoresceína e o INT, p-iodonitrotetrazolium (ESPINEL- INGROFF *et al.*, 1997; LAMBERT; PEARSON, 2000; DEVIENNE; RADDI, 2002).

A partir das diluições do extrato que não apresentaram crescimento, pode-se repicar para placa de ágar ou cultura em caldo e verificar a concentração mínima bactericida (CMB), que seria aquela quantidade do extrato que não só inibe o crescimento, mas sim inativa o microrganismo (KONEMAN *et al.*, 2001).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os parâmetros de cultivo dos fungos *Polyporus tenuiculus* e *Polyporus tricholoma* com o objetivo de maximizar a produção de substâncias antibacterianas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a biomassa, pH e atividade antibacteriana das espécies *P. tenuiculus* e *P. tricholoma* em dois meios de cultura diferentes.

Avaliar a influência de diferentes fontes e concentrações de carbono, do pH inicial do meio de cultivo e da agitação na produção de massa micelial e de substâncias antibacterianas.

Testar a atividade antibacteriana dos extratos obtidos, por método qualitativo.

Determinar as concentrações mínimas inibitórias dos extratos fúngicos para as bactérias que mostraram sensibilidade nos testes de triagem.

Caracterizar quimicamente as substâncias antibacterianas produzidas por *Polyporus*.

### 3 METODOLOGIA

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Antibióticos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina e nos Laboratórios de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química e de Microbiologia do Departamento de Ciências Naturais da Fundação Universidade Regional de Blumenau. Para atender aos objetivos do trabalho, este foi dividido em três grupos de ensaios (A, B e C), não isolados e seqüenciais. Os ensaios do grupo A visaram o aprofundamento do estudo de características biológicas, fisiológicas e atividade antibacteriana de *P. tenuiculus* e *P. tricholoma*, sendo que os outros ensaios (B e C), avaliaram diferentes condições de cultivo, para implementação da produção de metabólitos da espécie selecionada no grupo A.

#### 3.1 REAGENTES E MEIOS DE CULTURA

##### 3.1.1 Meios de cultura usados no cultivo fúngico

Para manutenção e crescimento dos fungos foi utilizado o meio de cultura, batata dextrose ágar (BDA), (DIFCO®).

Para o cultivo micelial dos ensaios do grupo A, foram usados os meios, caldo dextrosado de batata (CDB) e caldo extrato de malte peptonado (CEMP), (DIFCO®).

Nos ensaios dos grupos B e C, foi realizado um pré-inóculo utilizando o meio líquido CEMP/CDB, constituído de 2,4% de CDB, 1% de extrato de malte e 0,1% de peptona de soja.

Para o cultivo micelial dos ensaios B e C, utilizou-se o meio com 2,4% de CDB com 0,1% de extrato de malte, adicionado de 1 ou 4% de lactose, como variável do processo. Nos ensaios do grupo C, além da lactose, foi testada a glicose, ambas em concentrações de 1 e 4%.

### **3.1.2 Substâncias utilizadas na extração e solubilização das substâncias bioativas**

Para a extração foi usado o acetato de etila (DINÂMICA<sup>®</sup>), sendo seguida de lavagem com solução saturada de cloreto de sódio (CROMATO<sup>®</sup>), e secagem com sulfato de sódio puro (VETEC<sup>®</sup>). O dimetilsulfóxido (DMSO), da marca CROMATO<sup>®</sup>, foi usado para solubilizar e diluir os extratos. Os solventes usados foram de grau P.A. (para análise).

### **3.1.3 Meios de cultura e materiais usados para bactérias**

Para a manutenção das bactérias foi utilizado o caldo infusão de cérebro e coração (BHI, “brain heart infusion”).

O ágar sangue (ágar Mueller-Hinton adicionado de 5% de sangue de carneiro) foi usado para testar a pureza das culturas bacterianas.

O caldo e ágar Mueller-Hinton foram usados nos testes de difusão em ágar.

Na realização da bioautografia foram utilizadas, como suporte, cromatofolhas de alumínio (MERCK<sup>®</sup>) e caldo Mueller-Hinton.

Na determinação da concentração mínima inibitória foram usados o caldo Mueller-Hinton e placas de microdiluição (KARTELL S. p. A.).

Todos os meios utilizados para bactérias foram do laboratório MERCK<sup>®</sup>.

### **3.1.4 Reagente usado para revelação dos testes de atividade**

Para a revelação dos testes de bioautografia e concentração mínima inibitória foi usada uma solução a 0,2mg/mL do sal violeta de p-iodonitrotetrazólio (INT), SIGMA<sup>®</sup>, em etanol a 70%.

### 3.1.5 Solventes para cromatografia

Na cromatografia em camada delgada foram utilizados os solventes clorofórmio (SYNTH<sup>®</sup>) e metanol (DINÂMICA<sup>®</sup>), de grau P.A.

### 3.1.6 Fase estacionária para cromatografia

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada em cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60 F254, (MERCK<sup>®</sup>).

## 3.2 FUNGOS

Foram utilizadas duas espécies de fungos do gênero *Polyporus*, *Polyporus tenuiculus* (CCB-685) e *Polyporus tricholoma* (CCB-684), nativos do Brasil, coletados no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, ambos pertencendo à coleção de cultivo de basidiomicetos (CCB) do Instituto de Botânica de São Paulo e cedidos pela pesquisadora Dra. Adriana Gugliotta. O Parque Estadual das Fontes do Ipiranga está situado no município de São Paulo, na latitude de 23°39' S e longitude de 46°37' W, e ocupa uma área de 549,31 ha, cuja vegetação remanescente é uma mata de planalto.

Os isolados CCB-685 e CCB-684 foram mantidos sob refrigeração à 4°C em tubos de meio BDA inclinado. Antes do preparo dos inóculos fúngicos, as culturas foram repicadas para placas de Petri contendo o mesmo meio, sendo incubadas a 25°C em estufa, em aerobiose e na ausência de luz, por período de 7 dias.

### **3.3 CULTIVO MICELIAL DOS FUNGOS EM MEIO LÍQUIDO (GRUPO A)**

Foram retirados com um perfurador metálico, 5 discos de 7 mm de diâmetro do micélio das espécies *P. tenuiculus* e *P. tricholoma* cultivados em placas, sendo transferidos para frascos de vidro de 500 mL transparentes, autoclaváveis, cilíndricos, vedados com tampas metálicas, com abertura de ½ polegada coberta com papel filtro, contendo 100 mL de meio CDB, conforme Ishikawa (2001), e de meio CEMP (SILVEIRA *et al.*, 2003). Os frascos foram incubados a 25°C, em aerobiose, na ausência de luz, por um período de até 30 dias, sendo os ensaios realizados em triplicata. Durante este tempo, foram coletadas alíquotas de 5 em 5 dias para determinação da concentração celular em massa seca (biomassa-g/L), valores de pH e da atividade antibacteriana.

A cada coleta de amostra, a massa micelial produzida foi separada do meio de cultivo por filtração a vácuo e utilizada na determinação da biomassa. No filtrado, determinou-se o pH e, em seguida, realizou-se a extração dos compostos antibacterianos.

### **3.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO (GRUPOS B e C)**

#### **3.4.1 Preparo do pré- inóculo**

Para os ensaios dos grupos B e C em que se utilizou o *P. tricholoma*, foi realizado um pré-inóculo retirando 20 discos de micélio, cultivado em placas com BDA e transferindo-os para um erlenmeyer contendo 400 mL de meio CEMP/CDB (CDB-2,4%, extrato de malte-1% e peptona de soja-0,1%), previamente autoclavado. O cultivo foi incubado a 25°C durante 5 dias, conforme Hwang e colaboradores (2003). O objetivo deste pré-cultivo foi garantir homogeneidade do inóculo a ser distribuído nos vários frascos, submetidos a diferentes condições.

### 3.4.2 Cultivo submerso em diferentes condições

A partir do pré-inóculo, 10 mL do cultivo foram vertidos para frascos de 200 mL, contendo 90 mL do meio de cultura CDB (2,4%) e 0,1% de extrato de malte (fonte de nitrogênio). As culturas foram incubadas a 25°C em aerobiose e na ausência da luz. Como variáveis do processo para estimular a síntese de compostos antibacterianos, nos ensaios do grupo B, foram estudados os seguintes parâmetros:

- a) pH inicial: 4,5; 6,5; 8,5
- b) Agitação: 150 rpm e 0 rpm (ausência)
- c) Concentração de lactose: 1 e 4%

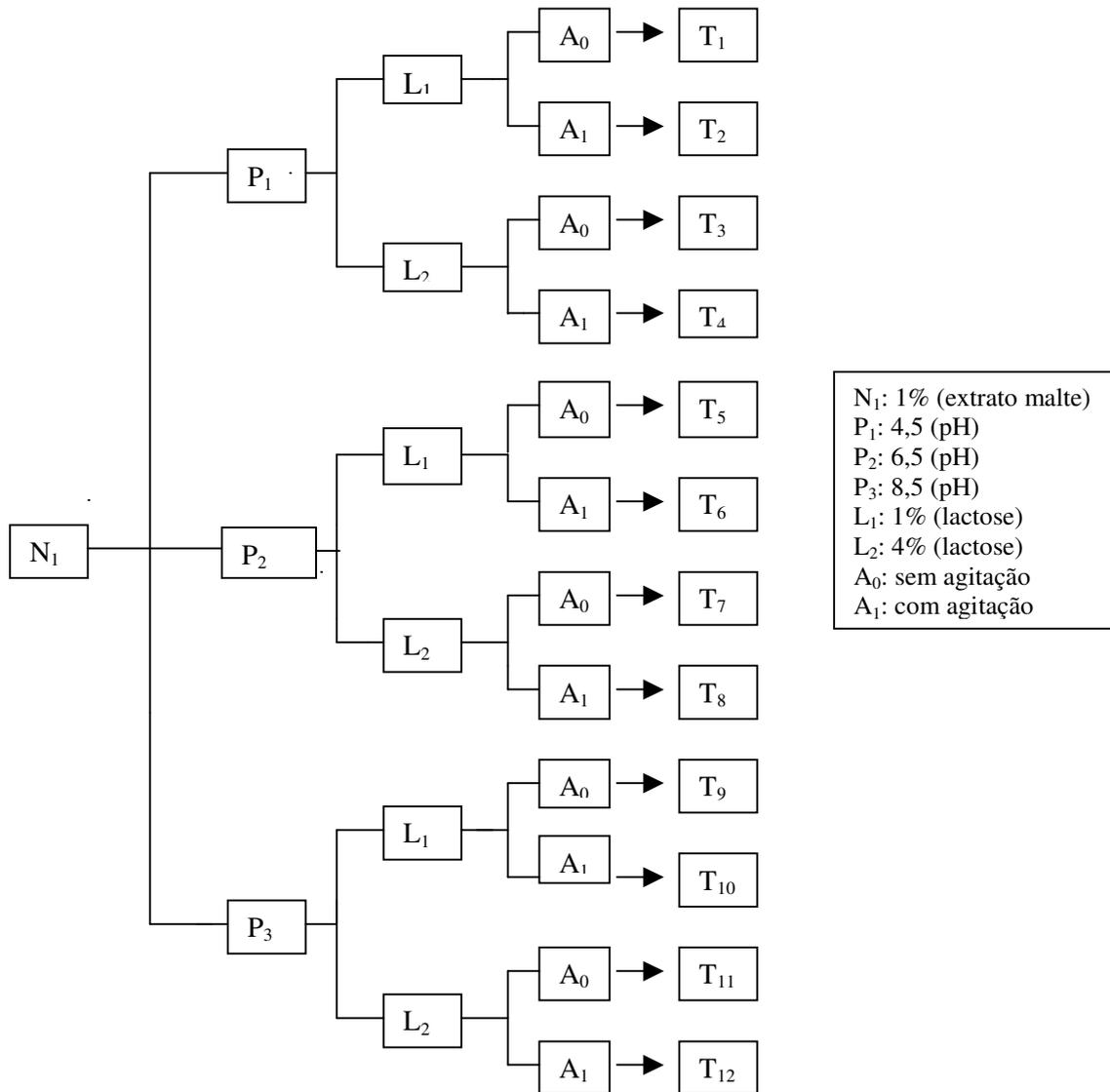
O período de incubação foi de 15 dias, sendo as amostras analisadas no final deste período. Estes parâmetros foram avaliados em diferentes combinações, gerando 12 tratamentos (esquema 1). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Para os ensaios do grupo C, o pH foi mantido em 4,5 e as variáveis do processo foram as seguintes:

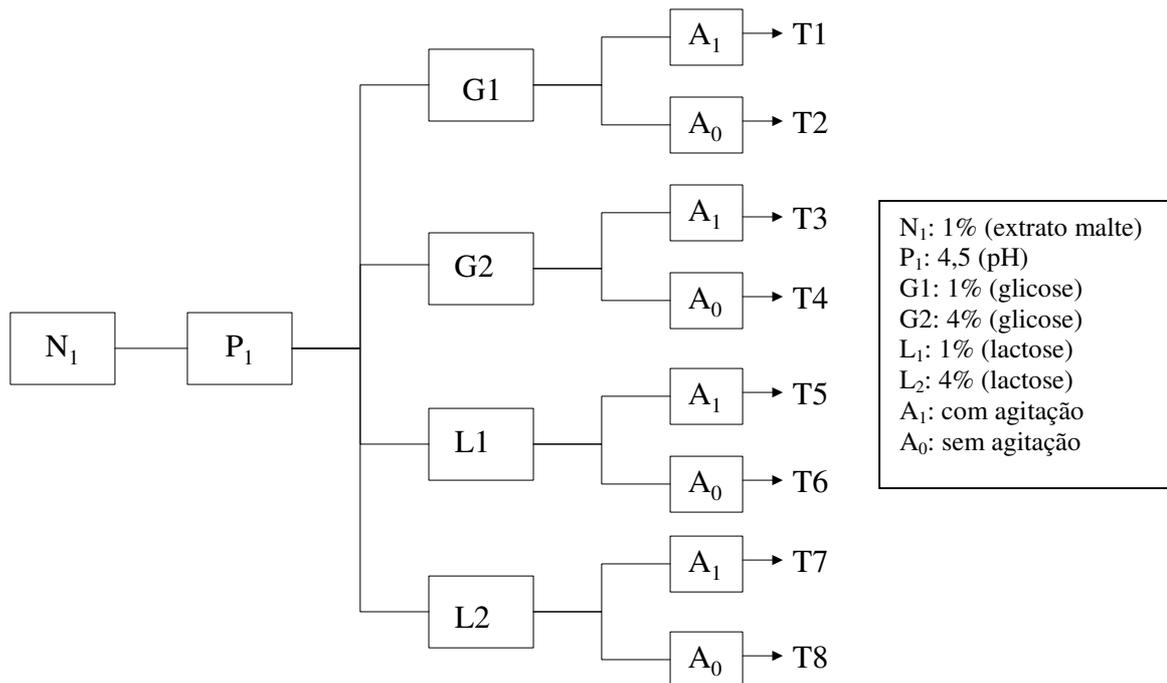
- a) Concentração de glicose: 1 e 4%
- b) Concentração de lactose: 1 e 4%
- c) Agitação: 150 rpm e 0 rpm (ausência)

Os cultivos foram incubados por até 35 dias e as amostras retiradas a cada 5 dias. As diferentes combinações das condições geraram 8 tratamentos diversos (esquema 2).

As amostras dos ensaios B e C, ao final do cultivo, tiveram o mesmo procedimento descrito para os ensaios do grupo A, quanto à separação da massa micelial do caldo de cultivo.



**Esquema 1:** Combinações de diferentes condições de cultivo do fungo *Polyporus tricholoma*, gerando 12 tratamentos (T1 a T12) em meio caldo dextrosado de batata 2,4% (CDB), em 15 dias de cultivo.



**Esquema 2:** Combinações de diferentes condições de cultivo do fungo *Polyporus tricholoma*, gerando 8 tratamentos (T1 a T8), em meio caldo dextrosado de batata 2,4% (CDB), em 35 dias de cultivo.

### 3.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

#### 3.5.1 Determinação da biomassa (g/L)

Para a determinação da biomassa, o cultivo foi filtrado a vácuo e o micélio retido no filtro foi secado em estufa a 80°C, até peso constante, sendo a concentração celular expressa em gramas de micélio por litro de meio.

#### 3.5.2 Determinação dos valores de pH

O pH foi medido em todas as amostras diretamente no meio de cultivo filtrado utilizando o método potenciométrico.

### **3.6 EXTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIBACTERIANAS**

Após separação do micélio por filtração a vácuo, os metabólitos presentes nos filtrados dos ensaios dos grupos A, B e C foram extraídos com acetato de etila (3 vezes de 25 mL para 50 mL de filtrado), em funil de separação. A seguir foram realizadas 2 lavagens com solução saturada de cloreto de sódio e secagem com sulfato de alumínio. O solvente resultante foi evaporado com auxílio de um rotavapor com pressão reduzida e temperatura controlada, e o resíduo resultante pesado (ISHIKAWA *et al.*, 2001).

### **3.7 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

#### **3.7.1 Bactérias**

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos dos fungos, foram usadas cepas da coleção ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD) das bactérias: Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e a Gram-negativa, *Escherichia coli* ATCC 25922.

#### **3.7.2 Inóculo bacteriano**

As cepas liofilizadas foram reconstituídas com caldo Mueller-Hinton e incubadas por 24h a 37°C . A pureza foi comprovada em ágar sangue e a turvação ajustada, com o auxílio da escala de Mac Farland (Biolab-Mérieux®), para 10<sup>8</sup> UFC/mL, com o próprio caldo de cultivo.

### 3.7.3 Método de difusão em ágar

O inóculo preparado conforme descrito acima, foi semeado na superfície do ágar Mueller-Hinton, com o uso de swab estéril. Os meios foram previamente perfurados de modo a conter 5 poços com 7 mm de diâmetro. Os extratos obtidos conforme item 3.6., foram colocados nos orifícios perfurados no ágar, sendo 50 µl em cada poço, e as placas incubadas na temperatura de 37°C durante 24 horas, em condições de aerobiose. A leitura foi efetuada medindo o halo de inibição de crescimento ao redor do poço, sendo considerado resultado positivo o diâmetro de, no mínimo, 9 mm. Como controle positivo foram utilizados discos comerciais impregnados com 30 µg de Cloranfenicol (Cecon<sup>®</sup>), aos quais as cepas bacterianas são sensíveis e, como controles negativos, 50 µl dos solventes usados na extração e solubilização dos extratos (SMANIA *et al.*, 1995). Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.7.4 Bioautografia

Nas placas de CCD (gel de sílica) foram aplicados 10 µl dos extratos. As placas foram submersas durante 5 segundos em uma suspensão de *S. aureus* em caldo Mueller-Hinton contendo 10<sup>9</sup> UFC/mL e incubadas 37°C durante 24 horas. A revelação foi feita borrifando 1,0 mL de sal violeta de p-iodonitrotetrazólio (INT) e incubando a 37°C durante 4 horas. Os halos de inibição de crescimento foram observados e mensurados em milímetros (mm) de hora em hora.

### **3.7.5 Teste de concentração mínima inibitória**

Os extratos foram diluídos em 200 µl de DMSO e adicionados de 1800 µl de caldo Mueller-Hinton. Posteriormente foram preparadas diluições seriadas em concentrações variando de 2,0 a 0,0078 mg/mL em caldo Muller Hinton. Em cada poço da microplaca foram pipetados 100 µl de cada diluição e, a seguir, 5 µl da suspensão de *S. aureus* na concentração  $10^8$  UFC/mL. A placa foi incubada na temperatura de 37°C, durante 24 horas em condições de aerobiose. A leitura foi realizada em leitora de ELISA (modelo CLX800 BIO-TEK INSTRUMENTS, INC), em 630 nm e, posteriormente, com o uso de um revelador de crescimento microbiano, o sal de INT, observando-se a menor concentração do extrato com capacidade de inibir o crescimento da bactéria.

## **3.8 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIBACTERIANAS**

O extrato bruto em acetato de etila foi caracterizado por cromatografia em camada delgada (CCD), e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).

### **3.8.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)**

A aplicação dos extratos foi feita em placas de camada delgada de alta resolução (CCDAR), com sílica gel PF254 em folhas de alumínio. A eluição foi realizada usando-se um sistema de solventes clorofórmio e metanol,  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (98:2 a 85:15). As placas foram observadas em luz ultravioleta (UV) em 254 e 365 nm e, então, reveladas com o uso de anisaldeído sulfúrico.

### 3.8.2 Cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM)

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Análise de Combustíveis-Cromatografia, do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Blumenau (IPTB) da FURB.

A análise por CG-EM (70 eV) foi realizada em um espectrômetro Varian Saturn 2000 do tipo injetor *split*. A coluna capilar CP-Sil-8CB (30m X 0,25 mm, 0,25 µm de espessura do filme) foi operada a 60°C por 3 minutos e, então, programada para 60°C-220°C a 5°C/min, após o que foi deixada isotérmica a 220°C por 5 minutos. O gás hélio foi injetado a 250°C e os componentes do extrato foram identificados pela comparação dos fragmentos obtidos em espectro de massa, com aqueles encontrados na literatura e bases de dados. A percentagem relativa dos componentes individuais foi calculada a partir das áreas dos picos correspondentes.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios dos grupos A, B e C foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) usando o programa Statistica® 6.0. Quando a análise de variância demonstrou efeito sobre o resultado ( $p < 0,05$ ), foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância de 5%, para comparação entre médias.

Para os ensaios do grupo A, a análise foi efetuada para verificar a diferença entre o tamanho dos halos obtidos com os meios empregados, e foi realizado o teste em cada tempo amostrado.

Os ensaios do grupo B foram avaliados por meio de um projeto fatorial (ANOVA), em que são considerados os efeitos isolados, e avaliadas as possíveis interações que podem ocorrer entre os fatores estudados nos níveis estabelecidos.

Para os ensaios C, a biomassa total formada ao final de 35 dias foi avaliada utilizando um projeto fatorial, como feito com os ensaios do grupo B. Para avaliar a influência do fator concentração de carboidrato, fez-se o teste de Tukey (5% de significância) apenas relacionando o fator concentração de carboidrato, porém o efeito médio do fator agitação também foi considerado no cálculo. Para a formação de halo de inibição foi feita a análise de variância e comparação entre médias somente no tempo 21 dias em que foram obtidos os maiores valores (mm) dos halos de inibição de crescimento.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERÍSTICAS CULTURAIS DOS FUNGOS EM ÁGAR BDA

Os fungos *Polyporus tenuiculus* (Beauv.) Fr. e *Polyporus tricholoma* Mont, apresentaram as seguintes características culturais macroscópicas quando cultivados em aerobiose a 25°C em ágar dextrosado de batata (BDA):

- ✓ *Polyporus tenuiculus* (CCB-685): micélio tênue, aderido ao meio, formando tufo mais altos e algodonosos nas bordas. O micélio apresentou cor branca e também cresceu submerso no ágar. A borda foi irregular e o odor do cultivo foi fraco e indeterminado. Atingiu o diâmetro da placa ao final de 14 dias. Reverso da placa apresentou-se inalterado. Características culturais podem ser vistas na figura 6.
- ✓ *Polyporus tricholoma* (CCB-684): micélio de aspecto flocoso a farináceo, aderido ao meio. O micélio apresentou cor branca de início, com cor marrom próxima ao inóculo e cresceu na superfície e submerso. A borda foi regular e o odor do cultivo foi fraco a indeterminado. Atingiu o diâmetro da placa ao final da primeira semana. Reverso da placa com cores desiguais, algumas áreas descoloridas e esbranquiçadas e outras marrom. Resultados da cultura do fungo na figura 7.



**Figura 6:** Características macroscópicas de cultura de *Polyporus tenuiculus* em agar dextrosado de batata  
Fonte: VIEIRA, 2004

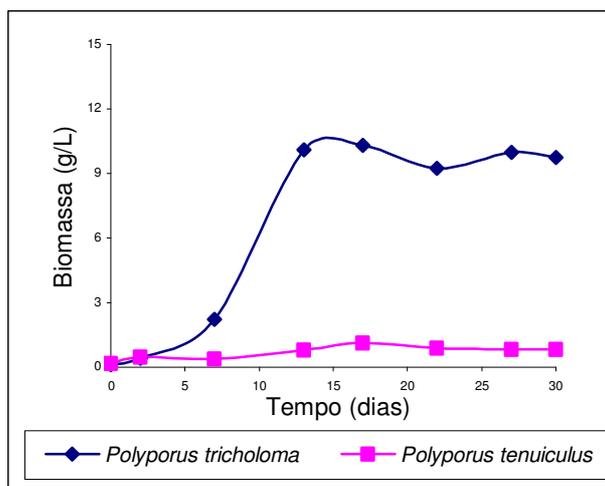


**Figura 7:** Características macroscópicas de cultura de *Polyporus tricholoma* em agar dextrosado de batata  
Fonte: VIEIRA, 2004

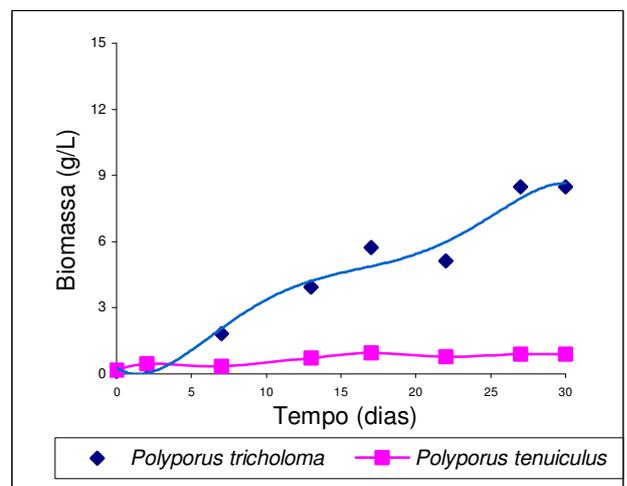
## 4.2 ENSAIOS DO GRUPO A

### 4.2.1 Crescimento celular dos fungos

A curva de crescimento dos fungos estudados encontra-se representada nas figuras 8 e 9. Estas mostram a proporção direta entre a biomassa em g/L, relacionada aos dias de cultivo, nos diferentes meios utilizados. Os valores médios de biomassa são apresentados na tabela A1 do apêndice deste trabalho.



**Figura 8:** Curva de crescimento dos fungos *Polyporus tricholoma* e *Polyporus tenuiculus*, em caldo extrato de malte peptonado (CEMP), em pH 4,5 e a 25°C.



**Figura 9:** Curva de crescimento dos fungos *Polyporus tricholoma* e *Polyporus tenuiculus*, em caldo dextrosado de batata (CDB), em pH 4,5 e a 25°C.

O meio de cultivo teve pouca influência no crescimento de *P. tenuiculus* que apresentou crescimento reduzido nos dois meios usados. Já a velocidade de crescimento micelial do fungo *P. tricholoma* foi maior no meio caldo extrato de malte peptonado, onde se observou aumento progressivo da biomassa até o 13º dia de cultivo. A partir daí seu crescimento permaneceu constante. A velocidade média de crescimento micelial para *P. tricholoma* foi de 0,83 g/L.dia, enquanto para *P. tenuiculus* o valor foi inferior a 8% do primeiro (0,066 g/L.dia), considerando o período exponencial de crescimento. Já no caldo dextrosado de batata, constatou-se que a produção de biomassa foi progressiva ao longo do tempo, não apresentando uma fase estacionária de crescimento celular, conforme observado no ensaio com meio CEMP (Figura 8). Santos e Tavares (2004), estudando o crescimento micelial em placas de ágar, das mesmas espécies fúngicas, obtiveram diferença de crescimento entre as linhagens de 57,65% em favor de *P. tricholoma*. Os resultados obtidos demonstraram a influência da fisiologia de cada espécie e sua resposta frente a fatores nutricionais, tais como o nitrogênio.

A importância do nitrogênio no crescimento micelial foi observada por Kim e colaboradores (2002), que utilizaram fontes inorgânicas e orgânicas de nitrogênio e concluíram serem as últimas, melhores para incrementar a produção de biomassa e exopolissacarídeos. O uso das fontes orgânicas de nitrogênio como peptona de soja e extrato de levedura, sob condições limitantes de nitrogênio, proporcionou maior crescimento e produção de lovastatina por *Aspergillus terreus* (LÓPEZ *et al.*, 2003). Houve diminuição da velocidade de crescimento de *Lentinula boryana* e *Lentinula edodes* quando usadas fontes inorgânicas de nitrogênio em concentrações a partir de 1%, enquanto que, o meio suplementado com extrato de malte mostrou ser o melhor mesmo com o incremento da concentração até 2% (FARIA ; MITCHELL; AMAZONAS, 2003). Também para *Phellinus linteus* o extrato de malte foi fonte adequada de nitrogênio para produção de biomassa e

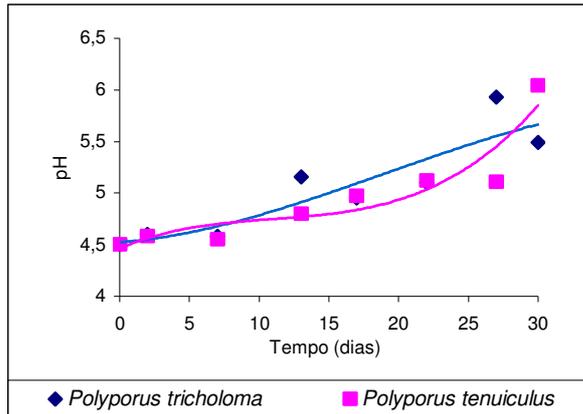
exopolissacarídios (HWANG *et al.*, 2003). A produção máxima de massa micelial e polissacarídios extracelulares do fungo *Tremella mesenterica*, ocorreu quando foram utilizados peptona ou extrato de milho como fontes de nitrogênio (ELISASHVILI; WASSER; TAN, 2003). Crescimento significativo do cogumelo *Psathyrella atroumbonata*, foi obtido quando da utilização de extrato de malte e l-triptofano, enquanto com a suplementação do meio com nitrato de sódio e sulfato de amônio, a produção micelial apresentou o pior resultado. O efeito estimulatório das duas fontes orgânicas pode ser atribuído ao seu conteúdo de carbono e nitrogênio (JONATHAN; FASIDI, 2001). Embora o extrato de malte, a farinha de soja e o caldo de milho sejam utilizados como fontes de nitrogênio, eles também são fonte de carbono. O conteúdo de nitrogênio do caldo de milho é 6,7% e o de carbono, 36,3% em peso seco. Como os fungos possuem sistemas enzimáticos eficientes podem desdobrar facilmente moléculas mais complexas do que a glicose para seu desenvolvimento (LÓPEZ *et al.*, 2003).

Ao contrário, as fontes inorgânicas, como os íons nitrato, têm sido implicados em efeitos inibitórios de crescimento de alguns basidiomicetos (GRIFFIN, 1994), e o íon sulfato é um radical grande que pode apresentar dificuldades em atravessar a membrana fúngica e promover o crescimento (GARRAWAY; EVANS, 1984).

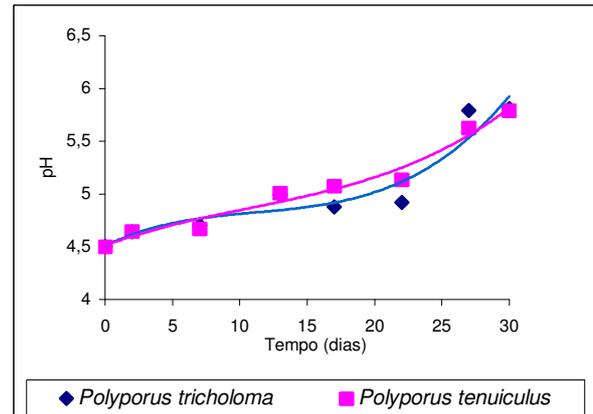
Logo, os resultados de maior biomassa em meio com extrato de malte e peptona, neste trabalho, podem ser atribuídos por ser o nitrogênio um substrato limitante ao crescimento e sua presença influencia a concentração celular, já que o mesmo está envolvido na síntese de proteínas (ADRIO; DEMAIN, 2003).

#### 4.2.2 Alterações do pH produzidas pelos fungos

O crescimento das duas espécies de fungos, *P.tenuiculus* e *P. tricholoma*, em meios CEMP e CDB, com pH inicial de 4,5, proporcionou em todos meios, aumento do pH. (Figuras 10 e 11). Os dados dos valores médios estão representados na tabela A2 do apêndice.



**Figura 10:** Variações médias do pH de cultivo dos fungos *Polyporus tenuiculus* e *Polyporus tricholoma*, em caldo extrato de malte peptonado.



**Figura 11:** Variações médias do pH de cultivo dos fungos *Polyporus tenuiculus* e *Polyporus tricholoma*, em caldo dextrosado de batata.

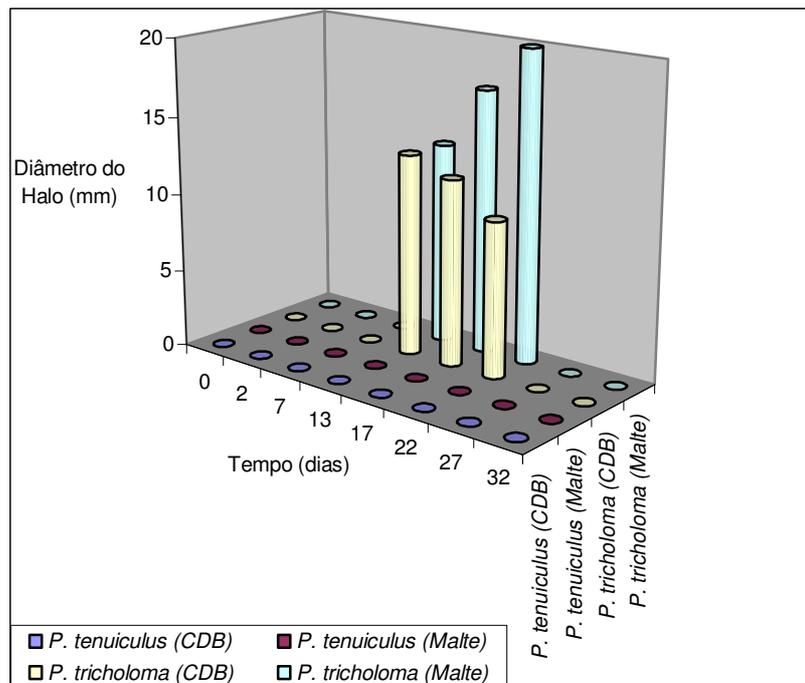
Comparando o crescimento micelial dos fungos (Figuras 8 e 9), e as modificações de pH ocorridas nos meios utilizados (Figuras 10 e 11), verificou-se que *P. tenuiculus* apresentou crescimento reduzido, mesmo com o aumento do pH ao longo do tempo de cultivo. Mas, o fungo *P. tricholoma* teve um aumento pronunciado de sua massa micelial no meio caldo extrato de malte peptonado, no tempo 13º dia de cultivo, quando ocorreu uma pequena elevação no pH. Pelas figuras acima, constata-se que as duas espécies apresentaram elevação do pH de 4,5 para 6,0, porém responderam de modo distinto à produção de biomassa.

O pH do caldo de cultivo é um dos parâmetros mais críticos que afetam o crescimento e a biossíntese de metabólitos, e que varia com diferentes organismos, condições operacionais e meios de cultivo utilizados (LACROIX *et al.*, 1985; YANG; LIAU, 1998). Em estudos realizados em frascos, onde o pH não é controlado ao longo do tempo, pode-se avaliar somente, a influência do pH inicial no crescimento e também na produção de metabólitos (FANG; ZHONG, 2002).

Em experimentos com *Lentinula edodes* foi constatada uma diminuição do pH dos meios de cultivo, refletindo em uma maior produção micelial em pH 3,0 e 3,5 (HASSEGAWA, 1998). Em cultivo submerso de *Phellinus linteus*, o pH inicial ótimo foi 5,0 para a produção de biomassa, enquanto que para a síntese de polissacarídios o valor foi 4,0 (HWANG *et al.*, 2003). O pH ótimo para o crescimento de *Hypsizygos marmoreus* foi 7,2 resultando em produção de 8,1g/L de biomassa (LOMBERT *et al.*, 2000).

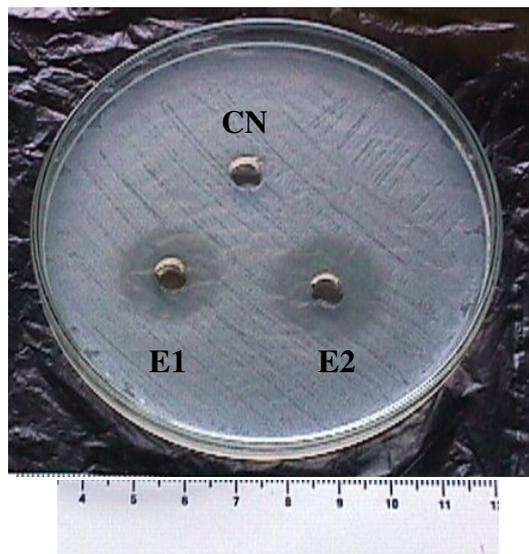
#### 4.2.3 Atividade antibacteriana dos fungos

Na figura 12, são apresentados os resultados dos ensaios de atividade antibacteriana do grupo A. Estes resultados expressam as médias dos valores dos diâmetros dos halos de inibição, obtidos pelos extratos concentrados, provenientes dos cultivos dos fungos *P. tenuiculus* e *P. tricholoma*, ambos cultivados nos meios de caldo dextrosado de batata (CDB) e caldo de extrato de malte peptonado (CEMP).



**Figura 12:** Médias dos diâmetros dos halos de inibição (mm) do crescimento de *Staphylococcus aureus*, pelos fungos *Polyporus tricholoma* e *Polyporus tenuiculus*, em caldo dextrosado de batata (CDB) e caldo extrato de malte peptonado (CEMP), em 30 dias de cultivo.

A produção de substâncias antibacterianas por *P. tenuiculus* não foi observada em nenhum dos meios utilizados no cultivo, frente às bactérias testadas. De acordo com os trabalhos de Cabrera e colaboradores (2002), os ensaios de atividade deste fungo contra as mesmas bactérias usadas neste trabalho, também se apresentaram negativos. O fungo *P. tricholoma* não teve atividade contra o bacilo Gram-negativo *Escherichia coli*, nos testes de difusão em ágar, utilizando os extratos obtidos nos vários tempos. Porém, mostrou atividade inibitória para *Staphylococcus aureus*, em ambos meios de cultivo, a partir do 13º dia de incubação, sendo que o maior halo de inibição de crescimento foi de 22 mm de diâmetro, no tempo 22 em meio CEMP, conforme mostra a figura 12. Resultado deste halo de inibição de crescimento é observado abaixo, na figura 13. A partir do tempo 22 até o final do período de incubação (30 dias), os resultados de atividade antibacteriana foram negativos.



**Figura 13:** Método de difusão em ágar, variante poço, de extratos de *Polyporus tricholoma* contra *Staphylococcus aureus*. Controle negativo com DMSO (CN) e extratos positivos (E1 e E2), no tempo 22 de cultivo.

Fonte: VIEIRA, 2004

É possível relacionar o início da produção do metabólito antibacteriano, no 13º dia, com a produção micelial de *P. tricholoma*, que atingiu a fase estacionária neste mesmo período, e se estendendo até o tempo 22, totalizando um período de 9 dias de síntese. O tempo

de produção de antimicrobianos difere entre as várias espécies geneticamente distintas e de acordo com as condições ambientais, podendo ser de horas (4 a 20) até 9 a 10 dias na produção industrial (SCHUZ; FIELDLER; ZÄHNER, 1993). É desejável que o meio de fermentação produza biomassa em curto espaço de tempo e sustente a fase estacionária produtiva pelo maior tempo possível (LANCINI; LORENZETTI, 1993). Embora a biomassa de *P. tricholoma* tenha atingido máxima concentração no tempo 13, no meio caldo extrato de malte peptonado, a maior atividade antibacteriana ocorreu aos 22 dias de cultivo. Em caldo dextrosado de batata a maior produção de massa micelial de *P. tricholoma*, foi aos 27 dias de cultivo, mas a maior atividade contra *S. aureus* ocorreu no tempo 13. Estes resultados demonstram que o melhor crescimento nem sempre está relacionado com a maior produção do metabólito secundário. Bu'Lock (1967), chamou o período de formação dos metabólitos secundários de idiofase devido à natureza especial (idiossincrática) dos produtos formados.

Analisando os resultados das médias dos halos de inibição, representados na tabela 3, observou-se diferença estatística nos resultados de inibição de *S. aureus*, com os extratos obtidos de *P. tricholoma* dos meios CDB e CEMP, sendo este último superior nos tempos 17 e 22.

**Tabela 3:** Médias dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de *S. aureus* por *P. tricholoma* cultivado em caldo dextrosado de batata (CDB) e caldo extrato de malte peptonado (CEMP)

	CDB	CEMP
Tempo	Halo (mm)	Halo (mm)
13	13,33a	13,00a
17	12,17b	17,17a
22	9,83b	22,17a

Médias seguidas da mesma letra na fila, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

No presente estudo, o meio com extrato de malte e peptona, além de promover crescimento micelial (Figura 8), proporcionou maior síntese de metabólitos antimicrobianos

(Figura 12). Estes resultados podem ser justificados por serem as substâncias acima citadas, fontes orgânicas complexas de nitrogênio. A regulação do nitrogênio afeta tanto o metabolismo primário como o secundário. O controle da síntese de enzimas é realizado, geralmente, pelo nitrogênio intracelular. Muitas fontes de nitrogênio, favoráveis ao crescimento de alguns fungos, como os sais de amônio, afetam negativamente diversas vias metabólicas secundárias, portanto, aminoácidos de assimilação lenta são, freqüentemente, usados para melhorar a produção dos metabólitos (DEMAIN, 1996; ADRIO; DEMAIN, 2003). A peptona de soja utilizada na obtenção de antibióticos de actinomicetos, tem a vantagem de ser metabolizada lentamente, logo, sais de amônio e aminoácidos repressivos não se acumulam (MARTIN; DEMAIN, 1980). O uso de caldo nutriente de milho em um processo típico de fermentação da penicilina resultou em significativa proliferação micelial e elevada produção do metabólito secundário (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

A alteração do pH dos meios de cultura observada no item 4.3, pode estar relacionada com a atividade antibiótica das culturas, pois *P. tricholoma* após ter modificado o pH inicial do meio CEMP, de 4,5 para 5,1 no tempo 22, apresentou a maior atividade antibacteriana. O mesmo ocorreu no meio CDB, só que no 13º dia e com a variação de pH para 5,0.

A influência do pH na síntese de metabólitos secundários tem sido descrita por diversos pesquisadores, com espécies fúngicas distintas. A produção de antibióticos é controlada por enzimas que dependem de um pH intracelular para sua ótima atividade, sendo que para *Fusidium coccineum*, o pH básico favoreceu a síntese (SHIPANOVA *et al.*, 1995). Smânia e colaboradores (1995), concluíram que o pH 9,0 propiciou a maior produção do antimicrobiano cinabarina por *Pycnoporus sanguineus*, embora o maior crescimento micelial tenha ocorrido em pH próximo da neutralidade. O pH ótimo do meio de cultivo para obter

maior crescimento de *Lentinula edodes* foi de 3,0 a 3,5, diferente do pH 4,5 responsável pela maior produção das substâncias antibacterianas (HASSEGAWA, 1998).

### **4.3 ENSAIOS DO GRUPO B**

Para este grupo de ensaios foi utilizada apenas a espécie *P. tricholoma* que foi selecionada por apresentar atividade antibacteriana nos experimentos do grupo A, sendo implementadas ao meio de cultura as seguintes variáveis: pH (4,5; 6,5; 8,5), lactose 1 e 4% e agitação de 150 rpm e ausência de agitação.

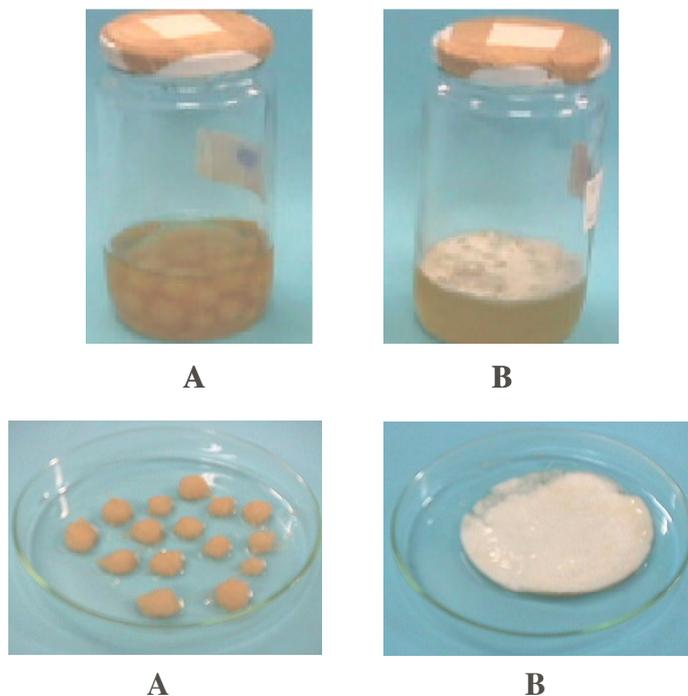
#### **4.3.1 Características culturais de *Polyporus tricholoma* em caldo**

Os meios de cultura depois de esterilizados possuem baixo teor de oxigênio dissolvido, por isto quando os inóculos não são cultivados em condições de aeração, utilizam-se discos de micélio-ágar, que tendem a crescer na superfície e captar o oxigênio diretamente do ar (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001).

As características culturais de *P. tricholoma* foram diferentes nos frascos mantidos sem agitação, onde o crescimento ocorreu na superfície formando uma camada de micéliol e, naqueles com agitação em que houve o agrupamento do crescimento em “*pellets*”, pequenas formas circulares de aproximadamente 6 mm de diâmetro. As duas morfologias são mostradas na figura 14.

O cultivo submerso é o sistema empregado industrialmente para a produção de uma variedade de metabólitos importantes econômica e socialmente e produzidos por fungos filamentosos, como a produção do ácido cítrico na indústria de alimentos e dos antibióticos, penicilinas e cefalosporinas para tratar infecções bacterianas (ELANDER; LOWE, 1992). Os processos de fermentação envolvendo fungos filamentosos são complexos comparados com

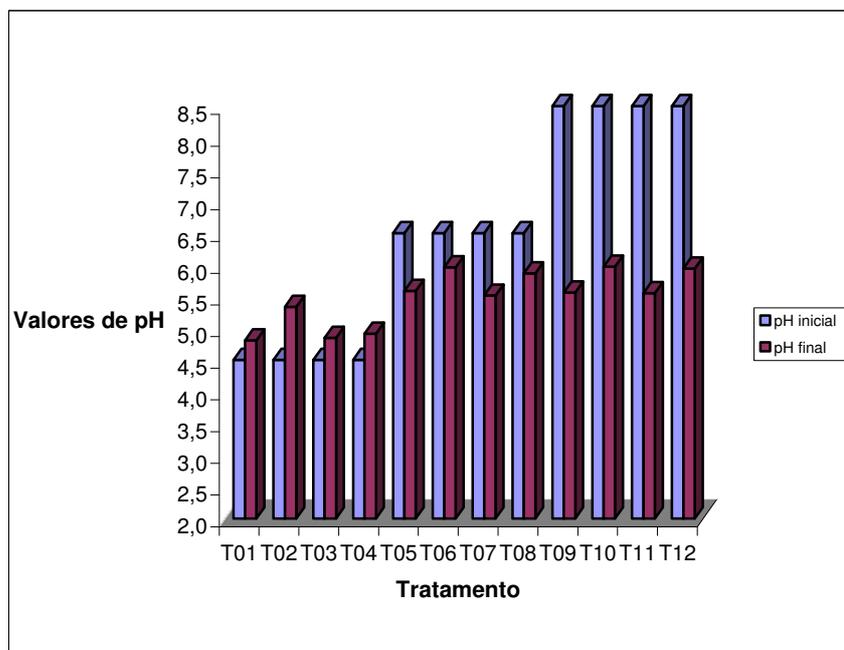
aqueles que utilizam organismos unicelulares, porque a maior variedade morfológica dos organismos filamentosos produz distintos efeitos na viscosidade do caldo, interferindo com a produtividade dos metabólitos desejados (GBEWONYO; HUNT; BUCKLAND, 1992). A maioria dos basidiomicetos apresenta duas morfologias típicas em cultivo em meio líquido: formas filamentosas livres e “*pellets*” (que são massas miceliais densamente agrupadas na forma redonda). Muitos genes e mecanismos fisiológicos estão envolvidos no processo de morfogênese fúngica, sendo que em cultivo submerso, a natureza do inóculo, assim como as condições químicas (constituintes do meio), como as físicas (temperatura, pH, forças mecânicas), contribuem para uma forma particular exibida (PAPAGIANNI, 2004). A agitação aplicada durante a fermentação, cria forças que podem afetar os organismos de várias maneiras, como danificar a estrutura celular, mudar a morfologia ou, ainda, variar a taxa de crescimento e formação de metabólitos (KOSSEN, 2000). Portanto, a condição de agitação de 150 rpm, implementada como uma das variáveis de cultivo deste trabalho como já era esperado, resultou na alteração da morfologia, levando a formação de “*pellets*”.



**Figura-14:** Crescimento de *Polyporus tricholoma*, em cultivo agitado (A) e em cultivo estático (B).  
Fonte: VIEIRA, 2004

### 4.3.2 Alterações do pH produzidas pelo fungo

Na figura 15 são apresentados os valores comparativos de pH do *P. tricholoma* no início e no final do cultivo, nos 12 tratamentos. Constatou-se que houve um ajuste médio do pH para o valor de 5,5 e, como consequência, os valores iniciais de pH não foram mantidos. Nos ensaios com pH inicial de 6,5 e 8,5, o pH do sistema foi diminuído, enquanto que nos ensaios com pH inicial igual a 4,5, este foi aumentado pelo fungo. Valores iniciais e finais do pH encontram-se no apêndice deste trabalho, na tabela A3.



**Figura 15:** Variações médias do pH de cultivo por *Polyporus tricholoma*, em diferentes condições de processo, durante 15 dias de cultivo. T1 a T4: pH 4,5; T5 a T8: pH 6,5; T9 a T12: pH 8,5. Lactose 1%: T1, T2, T5, T6, T9, T10. Lactose 4%: T3, T4, T7, T8, T11 e T12. Tratamentos ímpares sem agitação. Tratamentos pares com agitação.

Estes resultados comprovam aqueles obtidos nos ensaios do grupo A, em que o pH inicial do meio de cultivo de *P. tricholoma* foi alterado, atingindo valores da ordem de 5,0 no 22º dia (Figura 10). Segundo Santos (2001), algumas espécies de fungos possuem uma característica de auto-regulação do pH do substrato, estabilizando-o no valor considerado ótimo para seu desenvolvimento. O estudo de *P. tricholoma* em fermentação sólida, em

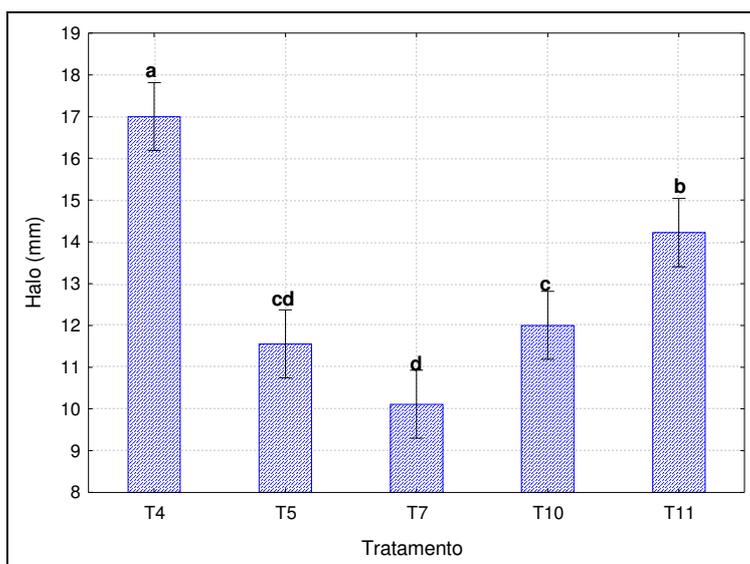
diferentes valores de pH (4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0), mostrou que este parâmetro não influenciou na velocidade de seu crescimento micelial (SANTOS; TAVARES, 2004). Os fungos de podridão branca apresentam maior crescimento em pH ácido em torno de 4,0 a 5,0, mas há exceções de algumas espécies que têm crescimento idêntico em pH alcalino (BARBOSA *et al.*, 1997).

A concentração da fonte de carbono (lactose 1% e 4%) também não apresentou influência sobre os valores de pH obtidos ao final do cultivo (15 dias).

Hasegawa (1998) cita em seu experimento, que a redução do pH do meio de cultivo por *Lentinula edodes* é consequência da produção de diversos ácidos orgânicos em meio líquido, como ácido acético e succínico produzidos pelo fungo. Já o aumento do pH no meio de caldo de milho macerado resultou da liberação de amônia pela desaminação dos aminoácidos (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

#### **4.3.3 Influência das condições de cultivo na atividade antibacteriana**

A propriedade inibitória do fungo *P. tricholoma* sobre *S. aureus*, foi avaliada pela comparação entre os halos de inibição de crescimento de extratos em acetato de etila, obtidos do cultivo do fungo em diferentes condições (item 3.4.2). Resultados positivos foram observados nos tratamentos T4, T5, T7, T10 e T11, enquanto as demais combinações de condições de cultivo não induziram à produção do metabólito antibacteriano. Resultados destes ensaios podem ser vistos na figura 16. Os valores médios dos halos de inibição são mostrados na tabela A4 do apêndice.



**Figura 16:** Médias dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento (mm) de *Staphylococcus aureus* por *Polyporus tricholoma* nos tratamentos T4 (pH 4,5; lactose 4%; com agitação); T5 (pH 6,5; lactose 1%; sem agitação); T7 (pH 6,5; lactose 4%; sem agitação); T10 (pH 8,5; lactose 1%; com agitação) e T11 (pH 8,5; lactose 4%; sem agitação), no 15º dia. As barras denotam intervalo de confiança de 95% e os tratamentos com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise estatística (tabela A5 do apêndice), revelou que todos os fatores (pH, concentração de lactose e agitação) exerceram influência ( $p < 0,05$ ) na produção do halo de inibição de *P. tricholoma* frente à bactéria *S. aureus*, inclusive apresentando interação significativa entre estes fatores. Entretanto, o fator que demonstrou o maior efeito isolado foi a concentração de lactose, sendo o efeito positivo à medida que se aumenta a concentração deste carboidrato no intervalo estudado (Figura A1 do apêndice).

Observando-se a figura 16, onde se tem uma análise de variância entre as médias obtidas entre os ensaios que apresentaram inibição, verificou-se que houve superioridade no resultado com o extrato de *P. tricholoma* cultivado segundo o tratamento T4, diferindo dos demais tratamentos que apresentaram inibição. O segundo maior valor obtido foi o tratamento T11. Estes resultados sugerem que a produção do composto antibacteriano pelo fungo ocorreu melhor em concentrações de 4% de lactose, ainda que no tratamento T7 o halo tenha sido menor, pois o fato de ter apresentado atividade pode justificar a superioridade dos tratamentos executados com 4% de lactose.

Neste experimento em que o objetivo foi otimizar as condições do processo para a produção de compostos antibacterianos, o aumento da concentração de lactose no meio para 4%, resultou em maior número de testes positivos e entre estes, o maior halo de inibição (17mm). O aumento da quantidade de carbono com limitação de nitrogênio, assim como, a escolha de uma fonte de carbono que não atue na repressão metabólica como observado para a glicose, são opções para melhorar a produção de metabólitos secundários. Em processos de fermentação visando a obtenção de metabólitos secundários é preferível utilizar polissacarídeos, como o amido; oligossacarídeos, como a lactose, e óleos como o de soja (DEMAIN,1996; ADRIO; DEMAIN, 2003). O aumento da biomassa e dos exopolissacarídeos de *Tremella mesenterica*, ocorreu quando houve um aumento da concentração inicial de sacarose de 1 para 6% (ELISASHVILI; WASSER; TAN, 2003).

Quanto à agitação, os resultados demonstraram que o fator teve menor influência isolada no processo de produção do metabólito uma vez que um número maior de culturas em cultivo sem agitação inibiu o crescimento bacteriano, embora, o tratamento 4, agitado a 150 rpm, apresentou o maior halo, resultado que pode ter tido um efeito casual. (Tabela A5 e Figura A2 do apêndice).

Alguns autores relacionam a formação de “*pellets*”, que pode ser causada pela agitação, com a melhor produção de antibióticos e outros metabólitos. Como exemplo, a produção de ácidos, cítrico e itacônico por *Aspergillus niger* é incrementada quando o fungo está na forma citada acima (EL-ENSHASY; HELLMUTH; RINAS, 1999). Também foi observado para *Paecilomyces japonica*, que os “*pellets*” representaram a morfologia mais produtiva para a produção de exo-biopolímeros (SINHA *et al.*, 2001). Ao contrário, o crescimento disperso foi preferível para a produção de amilase por *Aspergillus niger* (ELMAYERGI; SCHARER, 1973), de penicilina por *Penicillium chrysogenum* (SMITH; LILLY; FOX, 1990), e cefalosporina por *Cephalosporium acremonium* (QUEENER; ELLIS,

1975). Hasegawa (1998), observou que *Lentinula edodes* produziu maior atividade antibacteriana em cultura estática, após 20 dias de incubação. A maioria dos metabólitos secundários é produzida em condições normais de aeração, mas alguns requerem menores e outros, elevadas concentrações de oxigênio, que podem ser implementadas pela agitação (BARBEREL; WALKER, 2000).

Analisando os diferentes valores de pH inicial, implementados aos diversos tratamentos, este demonstrou ter efeito isolado e sinérgico com os demais fatores estudados (Tabela A5 do apêndice). Maiores valores de pH iniciais demonstraram ter maiores efeitos sobre a produção do halo de inibição (Figura A3 do apêndice).

Em adição, a análise da figura 15 mostra que, no decorrer do tempo de cultivo, os diferentes valores de pH do meio foram levados a valores semelhantes pelo metabolismo do fungo, independente do pH inicial.

Estudos realizados com *Volvariella esculenta* evidenciaram que o crescimento em ocorreu em uma faixa variada de pH do meio, de 4,0 a 9,0, embora em pH 6,0 ocorreu o crescimento vegetativo ótimo (JONATHAN; FASIDI; AJAYI, 2004). As condições ótimas para a biossíntese dos metabólitos secundários não são idênticas, necessariamente, às do crescimento. As regulações fisiológicas variam com os diferentes organismos e as diferentes vias metabólicas (KNIGHT *et al.*, 2003). O pH inicial ótimo para a maior produção de exopolissacarídeos de *Grifola frondosa* foi 5,5, entretanto nos experimentos com controle, o pH de 5,0 e a agitação de 166 rpm otimizaram o processo (LEE *et al.*, 2004). De acordo com Kim e colaboradores (2002), o pH inicial do meio de cultivo de *Paecilomyces sinclairii*, variou de 5,0 até o pH final 6,4, em um sistema sem controle de pH. No entanto, a produção de massa micelial e exopolissacarídeos foi três vezes maior no meio com controle deste parâmetro. Informações limitadas podem ser obtidas sobre os efeitos do pH em estudos

realizados em frascos, uma vez que o pH não é controlado nestes ensaios, ao contrário dos biorreatores (WAGNER *et al.*, 2003).

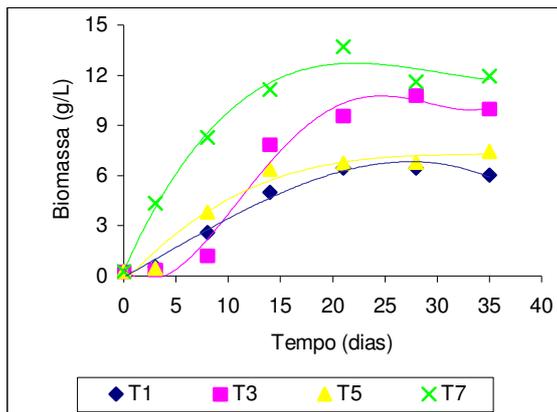
Relacionando o teste de atividade antibacteriana utilizado com os resultados obtidos, segundo Vanden Berghe e Vlietinck (1991), os métodos de difusão dão uma idéia da presença ou ausência de substâncias com atividade antimicrobiana no extrato, mas a potência da substância ativa só pode ser determinada em compostos puros e por métodos quantitativos. E, a realização de experimentos com maiores repetições, podem confirmar a resposta obtida na análise estatística efetuada.

#### **4.4 ENSAIOS DO GRUPO C**

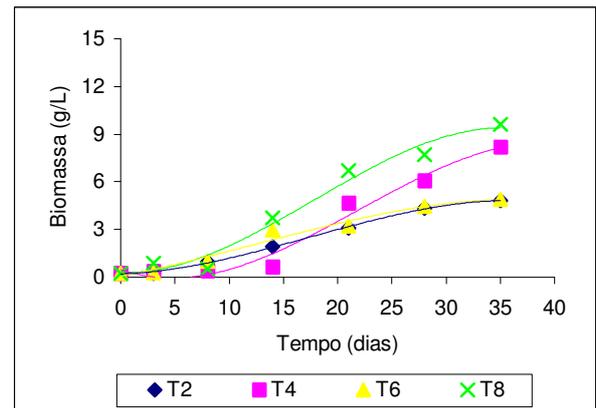
Os ensaios do grupo C visaram estudar a influência de diversas fontes e concentrações de carbono (glicose e lactose) do meio de cultivo, bem como a agitação, na produção de biomassa, nos valores de pH, e na atividade antibacteriana de *P. tricholoma*, apresentando os resultados a seguir.

##### **4.4.1 Crescimento celular de *Polyporus tricholoma***

O crescimento celular está demonstrado nas figuras 17 e 18, conforme as variáveis do meio de cultura. A figura 17 mostra que nos cultivos com agitação houve maior produção de biomassa do que nos cultivos estáticos (figura 18). Os valores médios experimentais se encontram nas tabelas A6 e A7 do apêndice.



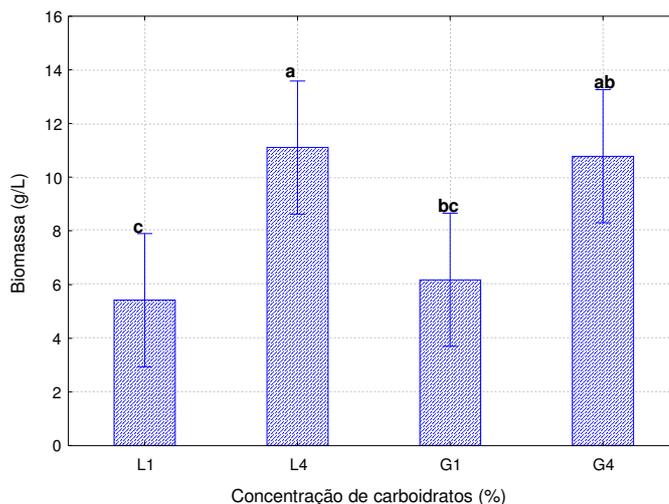
**Figura 17:** Curva de crescimento de *Polyporus tricholoma* em caldo dextrosado de batata e 1% de extrato de malte peptonado, incubado a 25°C, pH 4,5, durante 35 dias, nos tratamentos: T1 (1% de glicose), T3 (4% de glicose), T5 (1% de lactose) e T7 (4% de lactose), **com agitação**.



**Figura 18:** Curva de crescimento de *Polyporus tricholoma* em caldo dextrosado de batata e 1% de extrato de malte peptonado, incubado a 25°C, pH 4,5, durante 35 dias, nos tratamentos T2 (1% de glicose), T4 (4% de glicose), T6 (1% de lactose) e T8 (4% de lactose), **sem agitação**.

Analisando os valores de biomassa ao longo do tempo observa-se que, os tratamentos com maior concentração de carboidratos, T3 e T4 (glicose 4%) e T7 e T8 (lactose 4%) implementaram maior crescimento, sendo que, entre estes, foi a lactose a melhor fonte de carbono para a produção micelial, com produção de 13,72 g/L no 21º dia. Embora a glicose já se apresente na forma monomérica, ideal para ser prontamente absorvida pelo fungo, foi a lactose, que precisa ser hidrolizada para se transformar em glicose e galactose, que foi mais rapidamente metabolizada.

A análise estatística revelou, conforme figura 19, que não há diferença na concentração de biomassa formada pelo fungo se for analisada ao final de 35 dias, nos cultivos realizados com lactose e glicose. Mas, a concentração destes carboidratos demonstrou ter relevância ( $p < 0,05$ ), porque os tratamentos que apresentaram os maiores valores médios foram os que continham 4% no meio de cultura. Estatisticamente, a concentração de glicose não afetou o crescimento do fungo, enquanto para a lactose, a concentração maior apresentou resultados muito superiores de crescimento micelial.



**Figura 19:** Média da biomassa de *Polyporus tricholoma*, no tempo 35, cultivado em diferentes condições com avaliação das concentrações de carboidratos, L1: lactose 1%; L4: lactose 4%; G1: glicose 1%; G4: glicose 4%. As barras denotam intervalo de confiança de 95% e os tratamentos com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação às fontes de carbono, para produção de crescimento micelial, há muita diversidade de acordo com a espécie de fungo pesquisada. Os carboidratos frutose, lactose, maltose e sorbitol não levaram a uma diferença significativa no crescimento de *Phellinus linteus*, sendo que a sacarose (50 g/L), apresentou a maior produção de biomassa e polissacarídios (HWANG *et al.*, 2003). Para *Grifola frondosa*, foi a glicose em concentração de 30 g/L que otimizou a produção micelial e de exopolissacarídios (LEE *et al.*, 2004). Os trabalhos com *Ganoderma lucidum* demonstraram que a lactose foi a promotora da maior massa micelial, enquanto a produção de exopolissacarídios foi aumentada pelo uso da sacarose (TANG; ZHONG, 2002).

Analisando a figura 17, verificou-se que, no meio agitado, o incremento de biomassa foi progressivo até o 20º dia, mantendo-se constante até o final do cultivo. Constatou-se, também, que no meio agitado, os tratamentos com glicose (T1 e T3) apresentaram fase de latência (lag fase) mais pronunciada assim como em todos tratamentos dos cultivos estáticos, conforme figura 18.

A agitação foi significativa no crescimento micelial, com um aumento da biomassa nos tratamentos com sistema agitado a 150 rpm, e não houve interação significativa ( $p > 0,05$ ) entre os fatores concentração de carboidratos e agitação (tabela A8 do apêndice).

Os estudos em sistema agitado com *Pleurotus tuber-regium*, mostraram que as fontes de carbono utilizadas, incluindo a glicose, produziram uma curva de crescimento logarítmica com uma fase estacionária muito curta (WU *et al.*, 2003). Esta fase é o período em que ocorre o aumento do tamanho celular e teor de proteínas (CHANG; MILES, 1989).

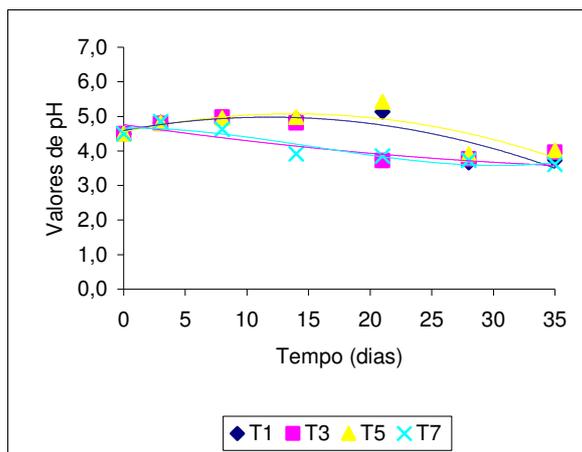
Como já relatado, nos ensaios do grupo B, a agitação alterou a morfologia do micélio, agrupando-o na forma de “*pellets*” de cerca de 6 mm de diâmetro, diferentemente dos tratamentos estáticos em que o crescimento ocorreu na superfície do meio formando uma camada de massa celular. Há um maior crescimento celular em tratamentos com agitação do que nos estáticos, isto se deve a uma maior homogeneização do meio e, também, maior transferência de massa (nutrientes) e calor, mantendo condições físicas e químicas mais homogêneas e disponibilizando mais oxigênio (MANTZOURIDOU; ROUKAS; KOTZEKIDOU, 2002). No meio estático, as células absorvem os nutrientes logo abaixo do seu micélio, tornando-se difícil a absorção de moléculas que estão presentes na porção inferior do frasco. Este fato explica a maior biomassa nos tratamentos em que o meio dispunha da agitação, conforme valores constantes da tabela A5 do apêndice deste trabalho.

A intensidade da agitação também é um parâmetro importante na produção de biomassa e metabólitos. Kim e colaboradores (2003), concluíram que o fungo *Paecilomyces sinclairii*, produziu maior quantidade de exopolissacarídios e massa micelial quando em cultivo agitado a 250 rpm, mas para *Agaricus bisporus* o cultivo em condições estáticas, intercalado com períodos de agitação a 300 rpm durante 60 minutos por dia, proporcionou maior crescimento (FRIEL; MCLOUGHLIN, 2000). A velocidade de 50 rpm foi utilizada na produção de biomassa e polissacarídios de *Phellinus linteus* (HWANG *et al.*, 2003), enquanto

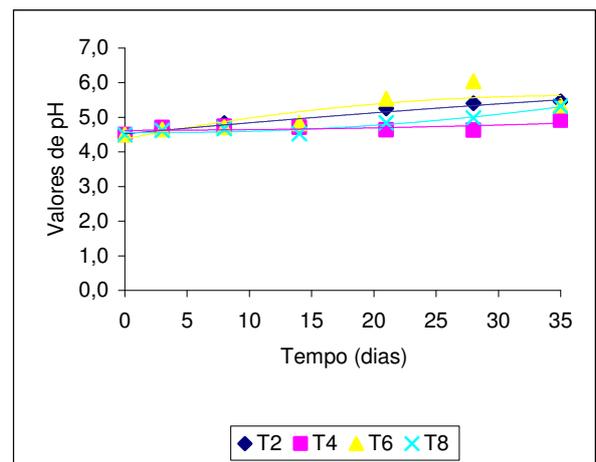
para o políporo *Antrodia cinnamomea*, em velocidade de 100 rpm houve maior crescimento micelial (YANG; HUANG; YANG, 2003) e para a produção de lovastatina por *Aspergillus terreus*, no sistema agitado a 150 rpm (LÓPEZ *et al.*, 2003).

#### 4.4.2 Alterações do pH produzidas pelo fungo

As variações no pH do meio de cultivo, nos diversos tratamentos utilizados, durante 35 dias de incubação, podem ser observadas nas figuras 20 nos cultivos agitados e 21, nos ensaios estáticos. Os valores médios dos dados experimentais se encontram nas tabelas A9 e A10 do apêndice.



**Figura 20:** Variações médias do pH de cultivo de *Polyporus tricholoma* em caldo dextrosado de batata e 1% de extrato de malte peptonado, pH 4,5, durante 35 dias, nos tratamentos: T1 (1% de glicose), T3 (4% de glicose), T5 (1% de lactose) e T7 (4% de lactose), **com agitação**.



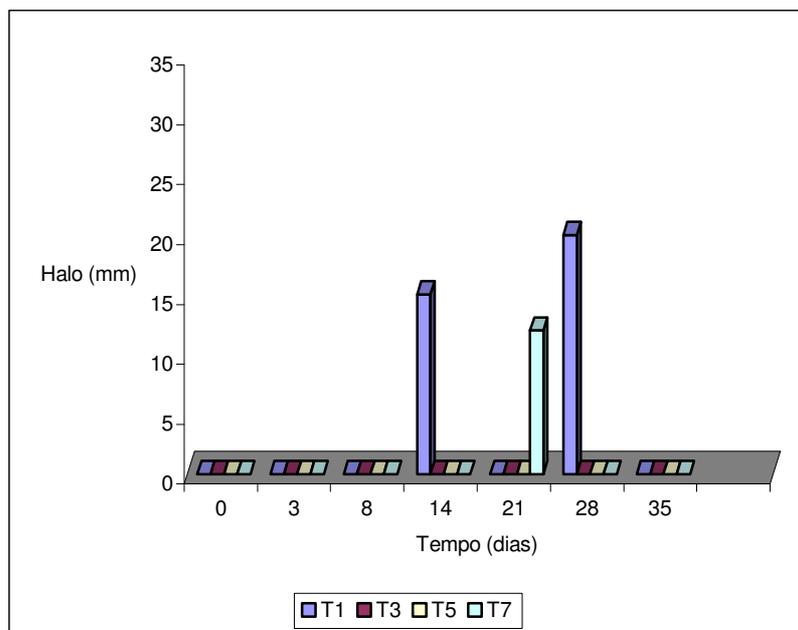
**Figura 21:** Variações médias do pH de cultivo de *Polyporus tricholoma* em caldo dextrosado de batata e 1% de extrato de malte peptonado, pH 4,5, durante 35 dias, nos tratamentos: T2 (1% de glicose), T4 (4% de glicose), T6 (1% de lactose) e T8 (4% de lactose), **sem agitação**.

Nos tratamentos com agitação (figura 20), se verifica uma diminuição do pH de 4,5 até a média final de 3,8 havendo um declínio mais pronunciado após o 21º dia, nos tratamentos 3 e 7 com glicose e lactose a 4%, enquanto que, nas concentrações menores (1%) destes carboidratos, a queda foi mais tardia. Nos tratamentos agitados há maior produção de biomassa, consumo de carboidratos e, provavelmente, liberação de compostos ácidos no meio,

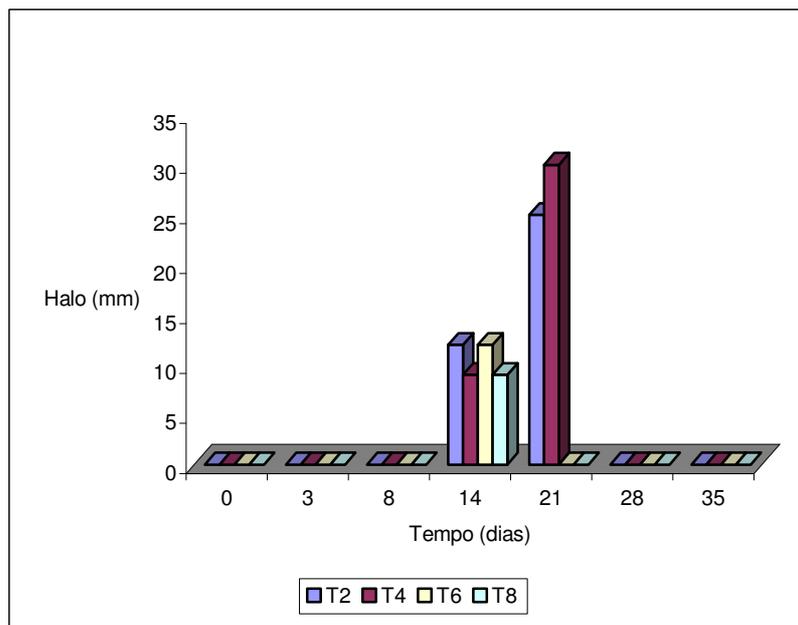
diminuindo o pH. Nos ensaios agitados do grupo B não se observou este declínio devido ao período curto de incubação. Nos cultivos estáticos, em que o crescimento celular não foi tão expressivo, o consumo da fonte de carbono foi, possivelmente, menor, pelos problemas de difusão e oxigenação, gerando aumento discreto do pH, atingindo valores da ordem de 5,0. Este valor médio obtido nos ensaios sem agitação foi semelhante aos valores observados nos ensaios dos grupos A e B.

#### 4.4.3 Influência das condições de cultivo na atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos extratos avaliada em relação à bactéria *Staphylococcus aureus*, só foi detectada a partir do 14º dia, para os tratamentos representados nas figuras 22 e 23. Nos extratos obtidos dos tratamentos T3 (glicose 4%, com agitação) e T5 (lactose 1%, com agitação), não foi observada atividade antibacteriana. Valores experimentais médios dos halos de inibição se encontram nas tabelas A11 e A12 do apêndice.



**Figura 22:** Médias dos diâmetros dos halos de inibição (mm) do crescimento de *Staphylococcus aureus* por *Polyporus tricholoma*, no meio caldo dextrosado de batata, **com agitação**, durante 35 dias, nos tratamentos: T1 (1% de glicose), T3 (4% de glicose), T5 (1% de lactose) e T7 (4% de lactose).



**Figura 23:** Médias dos diâmetros dos halos de inibição (mm) do crescimento de *Staphylococcus aureus* por *Polyporus tricholoma*, no meio caldo dextrosado de batata, **sem agitação**, durante 35 dias, nos tratamentos: T2 (1% de glicose), T4 (4% de glicose), T6 (1% de lactose) e T8 (4% de lactose).

O composto antibacteriano só começou a ser produzido por *P. tricholoma* quando o fungo chegou à fase estacionária de crescimento, a partir do 14º dia de cultivo, conforme anteriormente demonstrado nos outros ensaios. A produção de lovastatina por *Aspergillus terreus* é geralmente associada com a fase estacionária, com o crescimento com limite de nitrogênio, quando o excesso de carbono pode ser canalizado para o metabolismo secundário (LÓPEZ *et al.*, 2003).

O tratamento que apresentou maior atividade antibacteriana (halo de inibição de 30 mm) foi o T4, no qual foi usada glicose a 4%, sem agitação, e no tempo 21. Os tratamentos estáticos dos cultivos que utilizaram a glicose apresentaram maior número de ensaios positivos. Uma hipótese para a baixa produção de compostos antibacterianos nos tratamentos com agitação seria devido à redução do pH (4,5 para 3,7), não sendo este o ideal para a síntese de tais compostos para o fungo estudado. Já nos tratamentos estáticos como o pH foi mais elevado (em torno de 5,3), houve maior síntese de metabólitos antibacterianos. A biossíntese

de eritromicina por *Saccharopolyspora erythraea* teve aumento significativo, como também sua biomassa, com o controle do pH do meio (ELMAHDI *et al.*, 2003).

Há diferenças entre a melhor fonte de carbono para o crescimento e aquela que promove a produção do metabólito secundário. A glicose que foi excelente fonte de carbono para o crescimento, reprimiu a síntese de uma série de metabólitos como a actinomicina e a cefalosporina. No entanto, ela não interferiu com a produção de aminoglicosídeos e cloranfenicol (LUCHESE; HARRIGAN, 1993). Além da glicose, outras fontes de carbono e outros nutrientes do meio podem reprimir a síntese de antibióticos (MARTIN; DEMAIN, 1980). Tang e Zhong (2002), compararam vários carboidratos e comprovaram ser a lactose, a melhor fonte de carbono para promover o crescimento micelial e a produção de ácido ganodérico e polissacarídeos de *Ganoderma lucidum*.

A análise estatística no tempo 21, em que ocorreram os maiores halos, mostra que há diferenças entre os tratamentos T2, T4 e T7, figura A4 do apêndice. A realização de experimentos com maiores repetições podem confirmar a resposta da análise estatística.

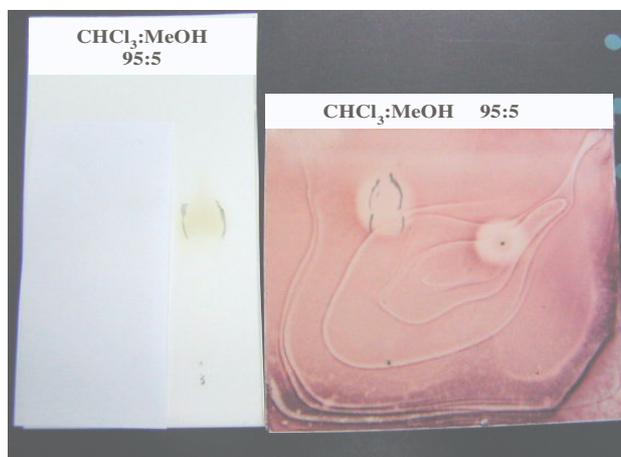
Pelas condições de cultivo implementadas e os resultados obtidos, verificou-se que, de acordo com Demain (1998), a regulação fisiológica global é muito complexa devido à diversidade de fungos e à variedade de vias metabólicas e seus controles. As questões principais são: se o controle da fonte de carbono envolve enzimas de síntese dos metabólitos secundários diretamente, ou pela provisão de energia, pela introdução do precursor na célula, por formação de um precursor comum ao metabolismo primário ou secundário, ou excreção do produto da via no meio.

## 4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIBACTERIANAS

Os metabólitos antibacterianos foram extraídos do caldo de cultivo com o acetato de etila e foram caracterizados com o uso de cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

### 4.5.1 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada foi efetuada com um extrato em acetato de etila, obtido do cultivo estático de *P. tricholoma*, em caldo de extrato de malte peptonado, incubado por período de 20 dias, e que apresentou atividade contra *S. aureus* (halo de 20 mm). Foi utilizada como fase móvel, o sistema de solventes, clorofórmio:metanol (95:5). O cromatograma foi realizado em conjunto com a bioautografia (Figura 24).



**Figura 24:** Cromatografia em camada delgada e bioautografia de extrato de *Polyporus tricholoma* contra *Staphylococcus aureus*. Fonte: VIEIRA, 2004

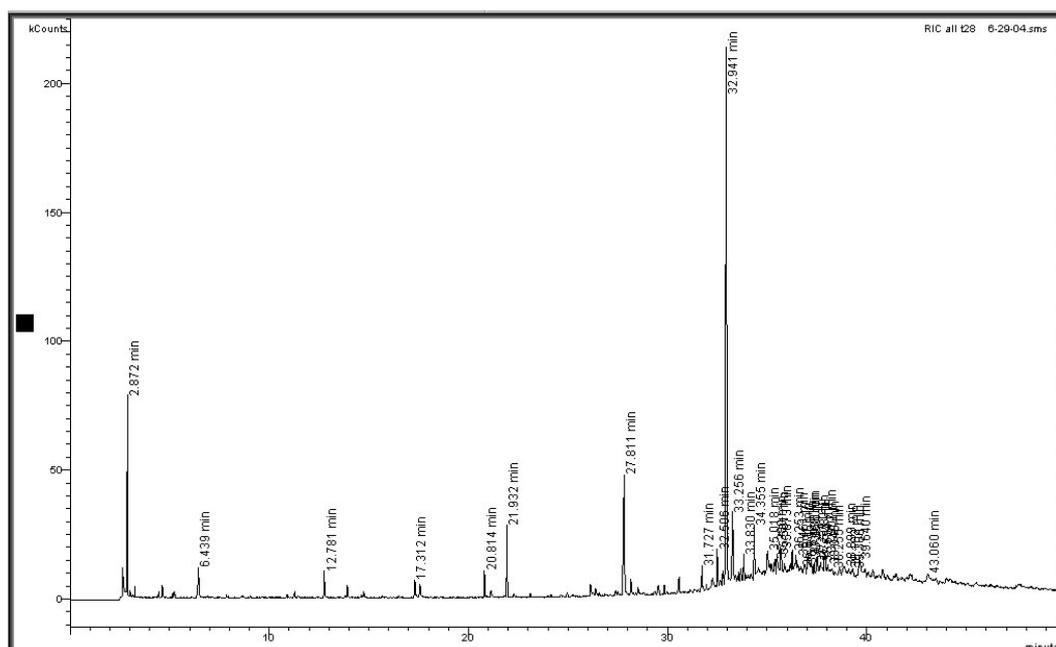
### 4.5.2 Cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM)

O resíduo do extrato concentrado, após evaporação do acetato de etila, foi submetido à cromatografia gasosa, seguida de espectrofotometria de massa. Os dados espectrais revelaram a existência de uma estrutura sesquiterpênica da classe dos drimanes. O extrato

utilizado nesta análise cromatográfica foi obtido no ensaio do grupo C, no 28º dia de cultivo, no tratamento com 1% de glicose e agitação e apresentou halo de inibição de 20 mm contra *S. aureus*.

A substância majoritária da amostra analisada teve concentração relativa de 29,49% com tempo de retenção de 32.941 minutos. Esta foi encontrada entre C<sub>20</sub> (R.T. 32.506 min) e C<sub>21</sub> (R.T. 34.354 min) e foi identificada, de acordo com a biblioteca NIST 98 MS, como isodrimenediol (C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>) (5-Hidroximetil-1,1,4a-trimetil-6-metilenodecahidro-naftaleno-2-ol). A caracterização por EIMS (70 eV) mostrou  $m/z$  (%) = 238 (M<sup>+</sup>, 1); 220 (M<sup>+</sup>- H<sub>2</sub>O, 8); 202 (M<sup>+</sup>- 2H<sub>2</sub>O, 12); 187 (18); 176 (16); 152 (23); 135 (100); 119 (28); 107 (63); 91 (43); 79 (39); 67 (24); 55 (13). Estes resultados são mostrados nas figuras 25 e 26 e tabela 4.

O isodrimenediol isolado de *P. tricholoma* foi descrito por Fleck e colaboradores (1996), a partir da espécie *Polyporus arcularius*, como um intermediário da biossíntese dos norsesquiterpenos drimanos deste fungo. O isolamento deste composto de uma cepa fúngica também produtora de outras estruturas do tipo drimanos, indica que estes compostos podem ser biossintetizados via isodrimenediol, como um intermediário. Estes autores também relataram a moderada atividade do isodrimenediol e do 7-drimano-3,11,12-triol, contra bactérias Gram-positivas como o *Staphylococcus aureus* SG511, e leveduras como *Sporolomyces salmonicolor* 549. A descoberta do isodrimenediol do cultivo de *P. arcularius*, é um exemplo de um produto natural que foi primeiro sintetizado, e só depois encontrado a partir de uma fonte natural. A ciclização oxidativa do acetato de farnesil na presença de radicais oxibenzoílicos, resultou no produto sintético isodrimenediol, 5-Hidroximetil-1,1,4<sup>a</sup>-trimetil-6-metilenodecahidronaftaleno-2 ol (BRESLOW; OLIN; GROVES, 1968). Trabalhos recentes revelaram novos sesquiterpenos, os ácidos isocriptopóricos H e I obtidos de *P. arcularius*, enquanto o ácido criptopórico H e seu éster metílico foram encontrados em *Polyporus ciliatus* (CABRERA *et al.*, 2002).



**Figura 25:** Cromatograma de extrato de *Polyporus tricholoma*. Cromatografo Gasoso Varian® CP-3800. Coluna: CP-Sil 8 CB Low Bleed/MS 30 m x 0.25mm – filme 0.25µm.

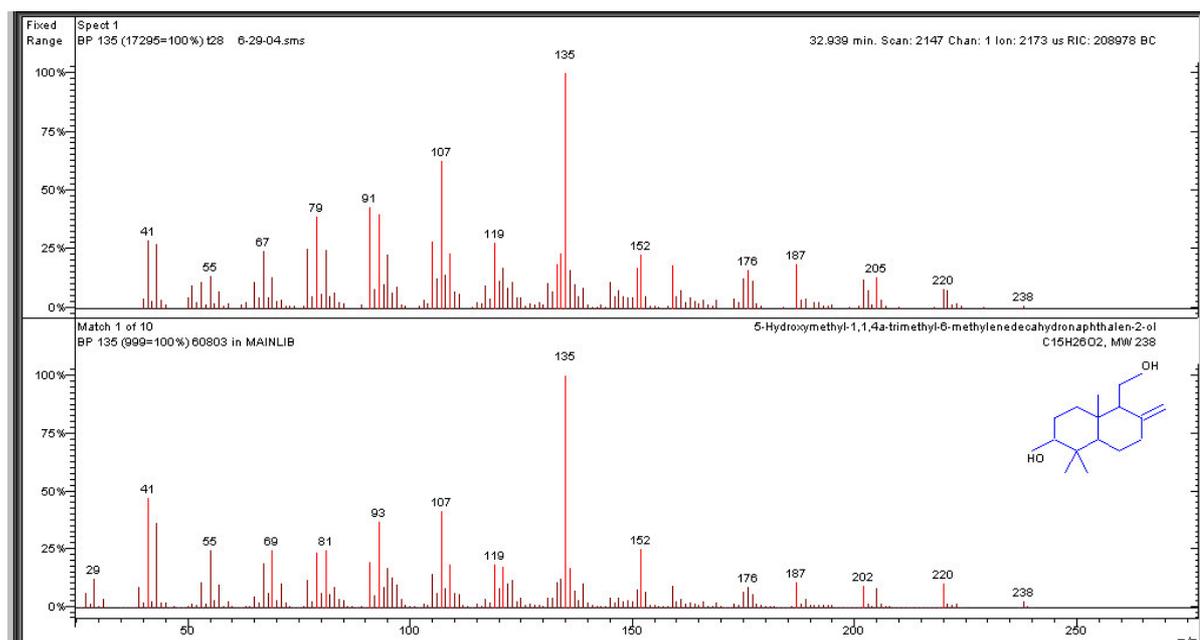
**Tabela 4:** Tempo de retenção dos compostos e com a composição relativa (%) da fração através da normalização das áreas

Index	Time	Peak Name	CAS No.	Result Type	Status	Area	Height	Results	Units
1 (1)	2.872	No Search	None	Unknown		108519	77202	5.395	%
2 (2)	6.439	No Search	None	Unknown		32700	11457	1.626	%
3 (3)	12.781	No Search	None	Unknown		25707	10223	1.278	%
4 (4)	17.312	No Search	None	Unknown		22654	6681	1.126	%
5 (5)	20.814	No Search	None	Unknown		25542	10302	1.270	%
6 (6)	21.932	No Search	None	Unknown		75715	28029	3.764	%
7 (7)	27.811	No Search	None	Unknown		159968	46786	7.953	%
8 (8)	31.727	No Search	None	Unknown		31644	9929	1.573	%
9 (9)	32.506	No Search	None	Unknown		42679	14945	2.122	%
10 (10)	32.941	No Search	None	Unknown		593208	207714	29.49	%
11 (11)	33.256	No Search	None	Unknown		104132	26777	5.177	%
12 (12)	33.830	No Search	None	Unknown		33482	10196	1.665	%
13 (13)	34.355	No Search	None	Unknown		53508	20219	2.660	%
14 (14)	35.018	No Search	None	Unknown		40585	8324	2.018	%
15 (15)	35.380	No Search	None	Unknown		20986	5823	1.043	%
16 (16)	35.501	No Search	None	Unknown		34181	7302	1.699	%
17 (17)	35.673	No Search	None	Unknown		49952	9739	2.483	%
18 (18)	36.253	No Search	None	Unknown		37281	9389	1.853	%
19 (19)	36.461	No Search	None	Unknown		51536	7531	2.562	%
20 (20)	36.691	No Search	None	Unknown		22689	3046	1.128	%
21 (21)	36.899	No Search	None	Unknown		25959	3997	1.291	%
22 (22)	37.036	No Search	None	Unknown		24636	8209	1.225	%
23 (23)	37.068	No Search	None	Unknown		27187	7237	1.352	%
24 (24)	37.354	No Search	None	Unknown		20860	5128	1.037	%
25 (25)	37.528	No Search	None	Unknown		39095	6965	1.944	%
26 (26)	37.684	No Search	None	Unknown		25379	5313	1.262	%
27 (27)	37.907	No Search	None	Unknown		43423	9056	2.159	%
28 (28)	38.048	No Search	None	Unknown		24065	4314	1.196	%
29 (29)	38.255	No Search	None	Unknown		31762	2919	1.579	%
30 (30)	38.899	No Search	None	Unknown		45530	3961	2.263	%
31 (31)	39.102	No Search	None	Unknown		22043	3349	1.096	%
32 (32)	39.300	No Search	None	Unknown		22406	3054	1.114	%
33 (33)	39.540	No Search	None	Unknown		63672	6889	3.165	%
34 (34)	43.060	No Search	None	Unknown		28807	3730	1.432	%

Conforme Brizuela e colaboradores (1998), o metabolismo secundário dos basidiomicetos é rico em terpenos, especialmente sesquiterpenos, muitos dos quais possuem estruturas que somente foram detectadas nesta classe de microrganismos. Os metabólitos secundários se originam de intermediários diferentes do metabolismo primário, sendo que uma das fontes metabólicas é a via do ácido mevalônico, a partir da acetil coenzima A, que irá produzir unidades isoprenóides precursoras das diversas estruturas terpênicas (GRIFFIN, 1994).

Os efeitos de três álcoois terpênicos, denominados farnesol, nerolidol e plaunotol, sobre *S. aureus* foram estudados e as conclusões sugerem sua ação sobre a membrana celular desta bactéria (INOUE *et al.*, 2004). Estes sesquiterpenoides naturais estão agrupados no grupo farnesane, enquanto o isodrimenediol é um intermediário da biossíntese de terpenos do grupo biciclofarnesane (FRAGA, 2003). Como as estruturas químicas dos dois grupos são semelhantes, existe a possibilidade do mecanismo de ação do isodrimenediol sobre *S. aureus* seguir o modelo previamente descrito.

Embora estudos específicos sobre a estabilidade do composto não tenham sido realizados, foi observado que o extrato bruto quando mantido sob refrigeração ou mesmo à temperatura ambiente, por período de 30 dias, reteve a atividade antibacteriana, mostrando ser um composto estável, pelo menos durante o período citado.



**Figura 26:** Espectro de Massas (Superior) do composto majoritário (T. R. 32.939 min) encontrado nesta fração e proposta da estrutura (Inferior) obtida pela biblioteca NIST 98 MS Library. Espectrômetro de Massas Saturn<sup>®</sup> 2000.

#### 4.6 BIOAUTOGRAFIA

A bioautografia foi realizada com um extrato em acetato de etila, obtido de cultivo do fungo em meio caldo de extrato de malte peptonado, incubado por 20 dias em cultivo estático. Este extrato apresentou halo de inibição de crescimento de 20 mm, pelo método de difusão em ágar, variante poço. A bioautografia foi feita sobre o cromatograma em que foi utilizado o sistema de solventes, clorofórmio:metanol (95:5), utilizando a bactéria *S. aureus*. Foi observada apenas uma zona de inibição de crescimento, no entanto, não significa que se trata de apenas uma substância, porque podem ter outras substâncias com Rfs semelhantes (Figura 24, já apresentada).

#### 4.7 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

Com o mesmo extrato usado no teste de bioautografia, foi determinada a concentração mínima inibitória. A bactéria teste foi *S. aureus* e a CMI foi de 1,0 mg/mL (Figura 28).



**Figura 27:** Concentração mínima inibitória de *Polyporus tricholoma* contra *Staphylococcus aureus*, mostrando CMI de 1,0 mg/mL para os extratos 2 e 5, sendo a 1ª linha controle de cor do extrato e as duas penúltimas colunas controles de esterilidade do extrato e de crescimento da bactéria, respectivamente.

Fonte: Vieira, 2004

O isodrimenediol, isolado de *Polyporus arcularius*, segundo relatos de Fleck e colaboradores (1996), apresentou CMI de 10 µg/mL para *S. aureus* SG511, e de 5,0 µg/mL contra a levedura *Sporobolomyces salmonicolor* 549. O ácido triterpenóide (ácido poliporênico C), obtido de *P. benzoinus*, mostrou forte atividade contra *Mycobacterium smegmatis*, na diluição 1/1.280.000, mas para *S. aureus* a atividade foi fraca (MARCUS, 1952). Foi isolada do extrato de *P. schweinitzii*, uma stirlipirona responsável pela atividade contra *S. aureus* na CMI de 50-100 µg/mL (BENEDICT; BRANDY, 1972). Também pertencendo ao gênero *Polyporus*, a espécie *P. adusta*, produz um polipeptídeo antifúngico que mostrou atividade inibitória contra *Physalospora piricola* na concentração de 120 µg/15 µl de tampão (WANG *et al.*, 2004). Para a cinabarina, substância antibacteriana extraída de

*Pycnoporus sanguineus*, os maiores valores de CMI foram observados para as bactérias Gram-negativas, enquanto que os menores valores, de 0,019 a 0,039 mg/mL, foram obtidos contra espécies de *Streptococcus*. Para *S. aureus*, a concentração mínima inibitória desta substância foi de 0,156 mg/mL (SMÂNIA *et al.*, 1995). Os triterpenos, ácidos aplanoxídicos A, C e F, extraídos de *Ganoderma annulare*, apresentaram atividade contra os fungos *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis* nas concentrações de 500 a 1000 µg/mL (SMÂNIA *et al.*, 2003). A concentração mínima inibitória de compostos esteróides isolados de *Ganoderma applanatum*, foi menor para as bactérias Gram-positivas, sendo de 1,0 a 2,0 mg/mL para *S. aureus*. Este mesmo microrganismo testado contra os extratos obtidos de *Pholiota adiposa*, mostrou resultado de CMI de 1,25 mg/mL (DULGER, 2004).

O advento das placas de microdiluição para a realização das diluições em série das substâncias antibacterianas, visando a obtenção de resultados quantitativos, foi um grande avanço. Com este método é possível estabelecer de maneira simplificada, a concentração de determinada substância necessária para inibir o crescimento dos microorganismos (KONEMAN, 2001).

## 5 CONCLUSÕES

Os fungos *Polyporus tenuiculus* e *Polyporus tricholoma* são adaptáveis ao ambiente laboratorial e, seu cultivo em ágar batata dextrosado, foi diferente macroscopicamente, possibilitando a diferenciação entre as duas espécies.

A espécie *P. tricholoma* apresentou maior velocidade de crescimento nos meios testados em comparação a *P. tenuiculus*, tendo maior produção de biomassa no meio caldo de extrato de malte peptonado (CEMP). O meio de cultivo teve pouca influência para *P. tenuiculus* que apresentou crescimento lento nos meios utilizados.

A produção de biomassa de *P. tricholoma*, ao longo do tempo de cultivo, aumentou com a agitação, com o tipo de carboidrato (lactose) e com a maior concentração (4%), de glicose e lactose. Analisando somente o tempo final de cultivo, tempo 35, não houve diferença significativa entre os dois tipos de carboidratos e a produção de biomassa, mas a concentração da lactose mostrou relevância.

O fungo *P. tricholoma* ajustou o pH inicial do meio para valores finais entre 5,0 e 6,0 no decorrer do cultivo, independente do pH inicial, entretanto houve declínio do pH nos meios de cultivo adicionados de maior concentração de carboidratos, com a agitação e maior tempo de cultivo.

Os extratos das duas espécies não inibiram o crescimento de *Escherichia coli*. Apenas os extratos obtidos de *P. tricholoma* inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus*, sendo a concentração mínima inibitória de 1,0 mg/ml. Estes extratos poderão ser avaliados com outras bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, assim como para fungos.

A produção do metabólito antibacteriano iniciou a partir do 13º dia e mostrou maior número e diâmetro dos halos de inibição de crescimento de *S. aureus*, em torno do 20º dia de cultivo.

Os cultivos sem agitação e com concentração de lactose e glicose de 4% apresentaram maior número de resultados de atividade antibacteriana positivos. No entanto, os resultados de otimização do meio para incrementar a produção de substâncias antibacterianas não foram conclusivos pelas metodologias empregadas e utilizando os extratos brutos.

A caracterização do extrato revelou a presença do isodrimenediol e o fracionamento cromatográfico para obtenção desta substância pura, deve ser realizado para melhor padronização dos estudos sobre a otimização de sua produção.

A utilização correta dos antimicrobianos existentes, e a busca contínua de novas substâncias, com o emprego da biotecnologia, é vital para proteger a saúde humana contra as bactérias patogênicas. Logo, para elevar o rendimento escasso dos produtos derivados de basidiomicetos como *P. tricholoma*, deve-se continuar as pesquisas de otimização dos processos com estes fungos.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, T. H.; YU, J. H. Coordinated control of secondary metabolite production and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 674-677, 1998.
- ADRIO, J. L.; DEMAÏN, A. L. Fungal Biotechnology. **International Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 191-199, 2003.
- ALVARADO, I. E. *et al.* Fungal biotransformation of coumaric acid into caffeic acid by *Pycnoporus cinnabarinus*: an alternative for producing a strong natural antioxidant. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 157-160, 2003.
- ALVES, P. L.; PAVANI, M. C. M. D. **Instruções Básicas para a Coleta e Preparo do Material Botânico a ser Herborizado**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. 48 p.
- AMARANTE, J. Prevalência de ESBL pode chegar até 100% das bactérias isoladas em hospitais. **Revista Fato Hospitalar**, n. 7, p. 24-26, 2002.
- AMATO NETO, *et al.* **Antibióticos na Prática Médica**. 5. ed. São Paulo: Roca, 2000. 304 p.
- ANKE, T. Basidiomycetes: a source for new bioactive secondary metabolites. **Progress Industrial Microbiology**, n. 27, p. 51-56, 1989.
- ANTOV, M.; PERICIN, D. Production of pectinases by *Polyporus squamosus* in aqueous two-phase system. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 28, p.467-472, 2001.
- \_\_\_\_\_. Effect of some inorganic salts on the partitioning of pectinase of *Polyporus squamosus* in polyethylene glycol/crude dextran aqueous two-phase system. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 151-156, 2003.
- ARTHUR, M. *et al.* Mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. **Journal of Infectology**, v. 32, p. 11-16, 1996.
- ATSUMI, S. *et al.* Production, isolation and structure determination of a novel beta-glucosidase inhibitor cyclophelitol, from *Phellinus sp.* **Journal of Antibiotics**, v. 43, n. 1, p. 49-53, 1990.

AYER, W. A.; SUN, M.; BROWNE, L. M. Chemical investigation of the metabolites from the canadian *tuckahoe*, *Polyporus tuberaster*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 5, p. 649-653, 1992.

AWADH ALI, N. A. *et al.* Antiviral activity of *Inonotus hispidus*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 483-485, 2003.

BABAKHIN, A. A. *et al.* Immunomodulating activity of the extract from high mycelium fungus *Polyporus squamosus*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 97, n. 1, p. 229, 1996.

BABAKHIN, A. A. *et al.* *In vitro* immunosuppression induced by a novel immunomodulator-the extract of the mycelium fungus *Polyporus squamosus*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 82, p. 97, 1999.

BARBEREL, S.; WALKER, J. The effect of aeration upon secondary metabolism of microorganisms. **Biotechnology Genetic Engineering Rev**, v. 17, p. 281-323, 2000.

BARBOSA, M. C. S. *et al.* Prospects for production of *Pleurotus sajor-caju* from casava fibrous waste. In: ROUSSOS, S. *et al.* **Advances in Solid State Fermentation**. Montpellier, France: Kluewer Academic Publishers, 1997. p. 515-527.

BARONI, T. J. **Fotografia de Basidioma de *Polyporus tenuiculus* (Beauv.) Fr., 1998**. Disponível em: <[www.cortland.edu/nsf/8526poly.HTML](http://www.cortland.edu/nsf/8526poly.HTML)>. Acesso em 12 dezembro 2004.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001, 230 p.

BARRETT, C. T.; BARRETT, J. F. Antibacterials: are the new entries enough to deal with the emerging resistance problems? **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 621-626, 2003.

BENEDICT, R. G.; BRADY, L. R. Antimicrobial activity of mushrooms metabolites. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, p. 1820-1822, 1972.

BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 101-107, 1998.

BENTLEY, R. Secondary metabolites play primary roles in human affairs. **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 40, n. 2, p. 197-221, 1997.

BERDY, J. The discovery of new bioactive microbial metabolites. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 27, p. 3-25, 1989.

BIANCO COLETTI, M. A.; MONDINO, P. Basidiomiceti in relazione all' antibiosi. Nota V. Attività antibiòtica dei miceli e dei liquidi colturali. **Allionia**, v. 30, p. 61-64, 1990.

BIANCO COLETTI, M. A.; PIZZINAT, M.; ROSSI, M. Basidiomiceti in relazione all' antibiosi. Nota VII. Attività antibiòtica dei miceli e dei liquidi colturali. **Allionia**, v. 32, p. 79-83, 1993.

BLACKMORE, C. G.; MCNAUGHTON, P. A.; VAN VEEN, H. W. Multidrug transporters in prokaryotic and eukaryotic cells: physiological functions and transport mechanisms. **Molecular Membrane Biology**, v. 18, p. 97-103, 2001.

BRESLOW, R.; OLIN, S. S.; GROVES, J. T. Oxidative cyclization of farnesyl acetate by a free radical path. **Tetrahedron Letters**, v. 15, p. 1837-1840, 1968.

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

BU'LOCK, J. D. **Essays in biosynthesis and microbial development**. New York: Wiley-Liss, 1967. 71 p.

CABRERA, G. M. *et al.* Cryptoporic and isocryptoporic acids from the fungal cultures of *Polyporus arcularius* and *P. ciliatus*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 189-193, 2002.

CALIXTO, J. B. Efficacy, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents). **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CALVO, A. M. *et al.* Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 447-459, 2002.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The fungi**. 2. ed. London: Academic Press, 2001. 587 p.

CARROAD, P. A.; WILKE, C. R. Cell growth and catecholase production for *Polyporus versicolor* in submerged culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 836-839, 1977.

CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**, v. 3, p. 351-368, 1992.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Edible mushrooms and their cultivation**. Boca Raton: CRC Press, 1989. 345 p.

CHANG, S. T.; MSHIGENI, K. E. **Mushrooms and human health: their growing significance as potent dietary supplements**. UNDP/UNOPS/ University of Namibia, 2001. 79 p.

CHEUNG, P. C. K. Dietary fiber content and composition of some edible fungi determined by two methods of analysis. **Journal Science Food Agricultural**, v. 73, p. 255-260, 1997.

CHEUNG, L. M. *et al.* Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, v. 81, p. 249-255, 2003.

CHISTI, Y. Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 89-93, 2003.

CORDELL, G. A. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1585-1612, 1995.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. .J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 52-60, 1997.

CUI, J.; CHISTI, Y. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses and production. **Biotechnology Advances**, v. 21, p. 109-122, 2003.

DEMAIN, A. L. Fungal secondary metabolism: regulation and functions. In: SUTTON, B. A **Century of Mycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p. 233-254.

\_\_\_\_\_. Microbial natural products: alive and well. **Natural Biotechnology**, v. 16, p. 3-4, 1998.

\_\_\_\_\_. Metabolites, primary and secondary. In: FLICKINGER, M. C.; DREW, S. C. **Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation**. New York: Wiley, 1999. p. 1713-1732.

\_\_\_\_\_. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 26-31, 2000.

DERMIBAS, A. Heavy metal bioaccumulation by mushrooms from artificially fortified soils. **Food Chemistry**, v. 74, p. 293-301, 2001.

DEVIENNE, K. F.; RADI, M. S. G. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 166-168, 2002.

DEY, S.; MAITI, T. K.; BHATTACHARYA, B. C. Production of some extracellular enzymes by a lignin peroxidase-producing brown rot fungus, *Polyporus ostreiformis*, and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 11, p. 4216-4218, 1994.

DIAS, A. A. *et al.* *In vivo* and laccase-catalysed decolourization of xenobiotic azo dyes by a basidiomycetous fungus: characterization of its ligninolytic system. **World Journal Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 969-975, 2003.

DOMINGUES, F. C. *et al.* The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 394-401, 2000.

DONÁDIO, S. *et al.* Targets and assays for discovering novel antibacterial agents. **Journal of Biotechnology**, v. 99, p.175-185, 2002.

DONK, M. A. The generic names proposed for Polyporaceae. **Persoonia**, v. 1, p. 196-265, 1960.

DULGER, B. Antimicrobial activity of the macrofungus *Pholiota adiposa*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 395-397, 2004.

ELANDER, R. P.; LOWE, D. A. Fungal biotechnology: an overview. In: ARORA, D. K.; ELANDER, R. P.; MUKERJI, K. G. **Handbook of Applied Mycology**, v. 4, p. 1-34. New York: Marcel Dekker, 1992.

EL-ENSHASY, H.; HELLMUTH, K.; RINAS, U. Fungal morphology in submerged cultures and its relation to glucose oxidase excretion by recombinant *Aspergillus niger*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 81, p. 1-11, 1999.

ELISASHVILI, V.; WASSER, S. P.; TAN, K. K. Effects of carbon and nitrogen sources in the medium on *Tremella mesenterica* Retz.:Fr. (Heterobasidiomycetes) growth and polysaccharide production. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 5, n. 1, p. 48-56, 2003.

ELMAHDI, I. *et al.* pH control in microwell fermentations of *S. erythraea* CA340: influence on biomass growth kinetics and erythromycin biosynthesis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 299-310, 2003.

ELMAYERGI, H.; SCHARER, J. M. Physiological studies on *Aspergillus niger* fermentation with polymer addition. **Journal of General Applied Microbiology**, v. 19, p. 385-392, 1973.

ELOFF, J. N. A sensitive and quickmicroplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1998.

\_\_\_\_\_. Antibacterial activity of *Marula* (*Sclerocarya Birrea* (A. rich.) Hochst. Subsp. Caffra (Sond.) Kokwaro Anacardiaceae) bark and leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p. 305-308, 2001.

ESPINEL-INGROF, A. *et al.* Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. **Journal of Clinic Microbiology**, v. 35, p. 139-143, 1997.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2003. p. 229-245.

FAN, L. *et al.* Production of polysaccharide by culinary medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis* S. Wasser *et al.* LPB 03 (Agaricomycetideae) in submerged fermentation and its antitumor effect. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2003.

FANG, Q. H.; ZHONG, J. J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, p. 61-65, 2002.

FARIA, R. O.; MITCHELL, D. A.; AMAZONAS, M. A. L. Cinética de crescimento micelial de *Lentinula boryana* (Berk & Mont.) Pegler em Comparação com *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. In: **Simpósio Nacional de Fermentações, 2003**, Florianópolis (SC). Programa/Trabalhos Completos, CD-ROM, UFSC (Florianópolis).

FAUCI, A. S. Infections diseases: considerations for the 21st century. **Clinical Infections Diseases**, v. 32, p. 675-685, 2001.

FLECK, W. F. *et al.* Isolation of isodrimenediol, a possible intermediate of drimane biosynthesis from *Polyporus arcularius*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 780-781, 1996.

FLOREY, H. W. *et al.* **Antibiotics**. London: Oxford University Press, 1949. 120 p.

FRAGA, B. M. Natural sesquiterpenoids (Review). **Natural Products Reports**, v. 20, p. 392-413, 2003.

FRIEL, M. T.; MCLOUGHLIN, A. J. Production of a liquid inoculum/spawn of *Agaricus bisporus*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 351-354, 2000.

GAO, Y. *et al.* Antibacterial and antiviral value of the genus *Ganoderma* P. Karst. Species (Aphyllphoromycetideae): a review. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 5, n. 3, p.20-32, 2003.

GARRAWAY, O. M.; EVANS, C. R. **Fungal nutrition and physiology**. New York: John Wiley, 1984. 230 p.

GBEWONYO, K.; HUNT, G.; BUCKLAND, B. Interactions of cell morphology and transport processes in the lovastatin fermentation. **Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 1-7, 1992.

GERASIMENYA, V. P. *et al.* Antimicrobial and antitoxic action of edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm. extracts. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, n. 2, p. 48-54, 2002.

GERBER, A. L. *et al.* Triterpenes and sterols from *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. (Aphyllophoromycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 2, p. 303-311, 2000.

GILBERTSON, R. L.; RIVARDEN, L. **North American Polypores**. Vol. 1 and 2. Oslo: Fungiflora, 1987. 885 p.

GÓES-NETO, A. Polypore diversity in the state of Bahia, Brazil: a historical review. **Mycotaxon**, v. 72, p. 43-56, 1999.

GOODMAN, G. A. *et al.* **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. 2148 p.

GRENIER, J.; POTVIN, C.; ASSELIN, A. Some fungi express  $\beta$ -1-3 glucanases similar to thaumatin-like proteins. **Mycologia**, v. 92, p. 84-88, 2000.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. 2. ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 485p.

GROSS, B.; ASTHER, M. Aromes de basidiomycetes: caractéristiques, analyses et productions. **Sciences des Aliments**, v. 9, p. 427-454, 1989.

GRUNWALD, J. The European phytomedicines market figures, trends, analyses. **Herbal Gram**, v. 34, p. 60-65, 1995.

GUPTE, M.; KULKARNI, P.; GANGULI, B. N. Antifungal antibiotics. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 58, p. 46-57, 2002.

HALL, R. M.; STOKES, H. W. Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. **Genetica**, v. 90, p. 115-132, 1993.

HALL, B. G. Predicting the evolution of antibiotic resistance genes. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 2, p. 430-435, 2004.

HAMILTON-MILLER, J. M. T. Antibiotic resistance from two perspectives: man and microbe. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, p. 209-212, 2004.

HARVEY, A. Strategies for the discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 294-300, 2000.

HASSEGAWA, R. I. **Produção de micélio com atividade antibacteriana de *Lentinula edodes***. Dissertação (Especialização). Universidade Federal de Viçosa, 1998. 35p.

HIBBET, D. S.; THORN, R. C. **Basidiomycota: Homobasidiomycetes. Vol. VII. Part B (Mycota)**. New York: Springer, 2001. p. 121-168.

HIKINO, H.; MIZUNO, T. Hypoglycemic action of some heteroglycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. **Planta Medica**, v. 55, p. 385, 1989.

HIRASAWA, M. *et al.* Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (*Shiitake*, an edible mushroom). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 11, n. 2, p. 151-157, 1999.

HOGAN, D.; KOLTER, R. Why are bacteria refractory to antimicrobials? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 472-477, 2002.

HOSKINS, J. *et al.* Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5709-5717, 2001.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J. L.; RODRIGUEZ, S. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. **Planta Medica**, v. 63, p. 2-10, 1997.

HOUGHTON, P. J.; RAMAN, A. **Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts**. Great Britain: Chapman & Hall, 1998. 199 p.

HWANG, H. J. *et al.* Production and molecular characteristics of four groups of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus gilvus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 708-719, 2003.

HWANG, H. J. *et al.* Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1296-1305, 2004.

INOUE, Y. *et al.* The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, p. 325-331, 2004.

ISHIDA, H. *et al.* Studies of the active substances in herbs used for hair treatment. II. Isolation of hair regrowth substances, acetosyringone and polyporusterone A and B, from

*Polyporus umbellatus* Fries. **Biological Pharmaceutical Bull**, v. 22, n. 11, p. 1189-1192, 1999.

ISHIKAWA, N. K. **Atividade antibacteriana em *Lentinula edodes***. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 1998. 33p.

ISHIKAWA, N.K. *et al.* Antimicrobial Cuparene-Type Sesquiterpenes, Enokipodins C e D, from a mycelial culture of *Flamulina velutipes*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 7, p. 932-934, 2001.

IWATSUKI, K. *et al.* Lucidenic acids P and Q, methyl lucidenate P and other triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum* and their inhibitory effects on Epstein-Baar virus activation. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1582-1585, 2003.

JALILI, T.; WILDMAN, R. E. C.; MEDEIROS, D. M. Nutraceutical roles of dietary fiber. **Journal of Nutraceuticals and Functional Medical Foods**, v. 2, p. 19-34, 2000.

JANSSENS, L. *et al.* Production of flavours by microorganisms. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 195-215, 1992.

JONATHAN, S. G.; FASIDI, I. O. Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Psathyrella atroumbonata* (Pegler), a Nigerian edible mushroom. **Food Chemistry**, v. 72, p. 479-483, 2001.

JONATHAN, S. G.; FASIDI, I. O.; AJAYI, E. J. Physico-chemical studies on *Volvariella esculenta* (Mass) Singer, a Nigerian edible fungus. **Food Chemistry**, v. 85, p. 339-342, 2004.

KAMO, T. *et al.* Gernylgeraniol-type diterpenoids, boletinins A-J, from *Boletinus cavipes* as inhibitors of superoxide anion generation in macrophage cells. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 958-963, 2004.

KANDA, T.; AMANO, Y.; NISIZAWA, K. Purification and properties of two endo-1,4-beta-xylanases from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). **Journal of Biochemistry**, v. 98, n. 6, p. 1545-1554, 1985.

KAWAGISHI, H. *et al.* Isolation and properties of a lectin from the fruiting bodies of *Agaricus blazei*. **Carbohydrate Research**, v. 183, p. 150-154, 1988.

KIM, D. H. *et al.* Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom *Phellinus linteus*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 513-517, 2001.

KIM, S.W. *et al.* Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 389-393, 2002.

KIM, S.W. *et al.* Effect of aeration and agitation on the production of mycelial biomass and exopolysaccharides in an entomopathogenic fungus *Paecilomyces sinclairii*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 321-326, 2003.

KIRK, P.M. *et al.* **Dictionary of the fungi**. 9. ed. Netherlands: CAB International, 2001. 624 p.

KIRK, T. K.; FARRELI, A. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Rev. Microbiology**, v. 41, p. 465-505, 1987.

KNIGHT, V. *et al.* Diversifying microbial natural products for drugs discovery. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 62, p. 446-458, 2003.

KOLLEF, M. H. Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. **Clinical Infections Diseases**, v. 31, n. 4, p. 131-138, 2000.

KONEMAN, E.W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico: texto e Atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 1465 p.

KOSSEN, N. W. F. The morphology of filamentous fungi. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 70, p. 1-33, 2000.

KOTHS, K.; HALENBECK, R.; MORELAND, M. Synthesis of the antibiotic cortalcerone from d-glucose using pyranose 2-oxidase and a novel fungal enzyme, aldose-2-lyase dehydratase. **Carbohydrate Research**, v. 232, p. 59-75, 1992.

KOZIKOWSKI, B. A. *et al.* The effect of room-temperature storage on the stability of compounds in DMSO. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 8, n. 2, p. 205-209, 2003.

KRUEGER, D. **Monographic Studies in the Genus Polyporus (Basidiomycotina)**. Dissertation (Ph. D). University of Tennessee, USA, 2002.

KÜMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 5-7, 2003.

LACROIX, C. *et al.* Effect of pH on batch fermentation of pullulan from sucrose medium. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 202-207, 1985.

LAMBERT, R. J. W.; PEARSON, J. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 784-790, 2000.

LANCINI, G.; LORENZETTI, R. **Biotechnology of Antibiotics and Other Bioactive Microbial Metabolites**. New York: Plenum Press, 1993. 236 p.

LATIF, L. A.; DARAN, A. B. M.; MOHAMED, A. B. Relative distribution of minerals in the pileus and stalk of some selected edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 56, p. 115-121, 1996.

LEE, B. C. *et al.* Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 574-581, 2003.

LEE, B. C. *et al.* Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 369-376, 2004.

LEGON, N. W. **Fotografia de Basidioma de *Polyporus tricholoma* Mont, 1998**. Disponível em: <[www.cortland.edu/nsf/nlpotr.HTML](http://www.cortland.edu/nsf/nlpotr.HTML)>. Acesso em 12 dezembro 2004.

LEVY, S. B. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, (suppl 1), p. 65S-71S, 2002.

LIMA-FILHO, J. V. M. *et al.* Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern brazilian coast. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 311-313, 2002.

LINCOLN, R. A.; STRUPINSKI, K.; WALKER, J. M. Biologically active compounds from diatoms. **Diatom Research**, v. 5, p. 337-349, 1990.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. London: Heiden, 1989. 374 p.

LIU, J.; MCINTOSH, H.; LIN, V. Chinese medicinal herbs for chronic hepatitis B: a systematic review. **Liver**, v. 21, n. 4, p. 280-286, 2001.

LIVERMORE, D. M. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. **Clinical Infection Disease**, v. 36, n. 1, p. 811-823, 2003.

LOBANOK, A. G. *et al.* Composition and biological activity of submerged mycelium of the xylophilic basidiomycete *Lentinus edodes*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, p. 60-64, 2003.

LOGUÉRCIO LEITE, C. Revisão histórica sobre fungos poliporóides (Aphylophorales) xilófilos de Santa Catarina, Brasil. **Insula**, n. 20, p. 3-10, 1990.

\_\_\_\_\_. El género *Polyporus* (Polyporaceae) em la isla de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil. **Boletim Soc. Argentina de Botânica**, v. 28, p. 27-36, 1992.

LOMBERT, M. A. *et al.* Investigations of mycelium growth and fruit body development of different strains of the beech mushroom *shimeji* (*Hypsizygus marmoreus* Bull: Fries) Singer. In: **15<sup>nd</sup> International Congress of Science and Cultivation of Edible Fungi**, Rotterdam, 2000, p. 763-770.

LÓPEZ, J. L. C. *et al.* Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 270-277, 2003.

LÜBKEN, T. *et al.* Hygrophorones A-G: fungicidal cyclopentenones from *Hygrophorus* species (basidiomycetes). **Phytochemistry**, v. 64, p. 1061-1071, 2004.

LUCHESE, R.; HARRIGAN, W. Biosynthesis of aflatoxin- the role of nutritional factors. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p. 5-14, 1993.

MANTZOURIDOU, F.; ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Effect of the aeration rate and agitation speed on  $\beta$ -carotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in a stirred tank reactor: mathematical modeling. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, p. 123-135, 2002.

MANZI, P.; AGUZZI, A.; PIZZOFERRATO, L. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. **Food Chemistry**, v. 73, p. 321-325, 2001.

MANZI, P. *et al.* Comercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. **Food Chemistry**, v. 84, p. 201-206, 2004.

MANZONI, M. *et al.* Production of statins by filamentous fungi. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 253-257, 1999.

MARCUS, S. Antibacterial activity of the triterpenoid acid (polyporenic acid C) and of ungulinic acid, metabolic products of *Polyporus benzoinus* (Wahl) Fr. **Biochemistry Journal**, v. 50, n. 4, p. 516-517, 1952.

MARTIN, J. F.; DEMAIN, A. L.; Control of antibiotic biosynthesis. **Microbiology Reviews**, v. 44, p. 230-251, 1980.

MARTIN, G. Nature pharmacy: mushroom proponent finds interesting rising; many germ-busting fungi hold promise for medicine. **San Francisco Chronicle**. Nov, 2001.

MARTINEZ-MARTINEZ, L.; PASCUAL, A.; JACOBY, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **Lancet**, v. 351, p. 797-799, 1998.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: Editora da UFC, 1997. 141 p.

MATTILA, P. *et al.* Sterol and vitamin D<sub>2</sub> contents in some wild and cultivated mushrooms. **Food Chemistry**, v. 76, p. 293-298, 2002.

MAU, J. L.; CHAO, G. R.; WU, K. T. Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5461-5467, 2001.

MCDERMOTT, P. F.; WALKER, R. D.; WHITE, D. G. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. **Internal Journal of Toxicology**, v. 22, n. 2, p. 135-143, 2003.

MCDEVITT, D.; ROSENBERG, M. Exploiting genomics to discover new antibiotics. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 611-617, 2001.

MDACHI, S. J. M. *et al.* Amino acid composition of some Tanzanian wild mushrooms. **Food Chemistry**, v. 86, p. 179-182, 2004.

MEIJER, A.A.R. Mycological work in the Brazilian state of Paraná. **Nova Hedwigia**, v. 72, n. 1-2, p. 105-159, 2001.

MENDIL, D. *et al.* Determination of trace elements on some wild edible mushroom samples from Kastamonu, Turkey. **Food Chemistry**, v. 88, p. 281-285, 2004.

MIZUNO, T. *et al.* Fractionation, chemical modification and antitumor activity of water-insoluble polysaccharides of the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, v. 59, p. 1143-1151, 1985.

MIZUNO, T. *et al.* Antitumor activity of some polysaccharides isolated from an edible mushroom, *ningyotake*, the fruiting body and the cultured mycelium of *Polyporus confluens*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 56, n. 1, p. 34-41, 1992.

MIZUNO, T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 9-29, 1999.

MO, H.; WINTER, H. C.; GOLDSTEIN, I. J. Purification and characterization of a Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4Glc/GlcNac-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 14, p. 10623-10629, 1999.

MO, S. *et al.* Phelligidins C-F: cytotoxic pyrano[4,3-c][2]benzopyran-1,6-dione and furo[3,2-c]pyran-4-one derivatives from the fungus *Phellinus igniarius*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 823-828, 2004.

MONTELLI, A.C.; SADATSUNE, T. **Antibioticoterapia para o Clínico**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, p. 7-10, 2001.

MORRISON, E. *et al.* Mycotoxin production by *Fusarium avenaceum* strains isolated from Norwegian grain and the cytotoxicity of rice cultures extracts to porcine kidney epithelial cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3070-3075, 2002.

MOTHANA, R. A. A. *et al.* Ganomycins A and B, a new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 416-418, 2000.

MUNCNEROVÁ, D.; AUGUSTIN, J. Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. **Bioresource Technology**, v. 48, p. 97-106, 1994.

NAGATSU, A. *et al.* Identification of novel substituted fused aromatic compounds, meshimakobnol A and B, from natural *Phellinus linteus* fruit body. **Tetrahedron Letters**, v. 45, p. 5931-5933, 2004.

NG, T. B. Peptides and proteins from fungi. **Peptides**, v. 25, p. 1055-1073, 2004.

NG, T. B.; WANG, H. Adustin, a small translation-inhibiting polypeptide from fruiting bodies of the wild mushroom *Polyporus adusta*. **Peptides**, v. 25, p. 689-692, 2004.

NGAI, P. H. K.; NG, T. B. A ribonuclease with antimicrobial, antimitogenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Peptides**, v. 25, p. 11-17, 2004.

NUNEZ, M.; RYVARDEN, L. **Polyporus (Basidiomycotina) and related genera**. Oslo: Groenland Grafic, 1995, 85 p.

NUKATA, M. *et al.* Neogrifolin derivatives possessing anti-oxidative activity from the mushroom *Albatrellus ovinus*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 731-737, 2002.

OHSAWA, T. *et al.* Studies on constituents of fruit body of *Polyporus umbellatus* and their cytotoxic activity. **Chemical Pharmaceutical Bull**, v. 40, n. 1, p. 143-147, 1992.

PACCOLA, E. A. S. *et al.* Antagonistic effect of edible mushroom extract on *Candida albicans* growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 176-178, 2001.

PAPAGIANI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189-259, 2004.

PARK, J. P. *et al.* Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 76-81, 2001.

PARK, J. P. *et al.* Effect of agitation intensity on the exo-biopolymer production and mycelial morphology in *Cordyceps militaris*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 433-438, 2002a.

PARK, J. P. *et al.* Stimulatory effect of plant oils and fatty acids on the exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 250-255, 2002b.

PASCZYNSKI, A.; CRAWFORD, R. L. Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology Progress**, v. 11, p. 368-379, 1995.

PEINTNER, U.; PODER, R.; PUMPEL, T. The iceman's fungi. **Mycological Research**, v. 102, p. 1153-1162, 1998.

PETERSEN, R. H.; GORDON, S. A. Mating systems in hymenomycetes: new reports and new species. **Mycologia**, v. 86, p. 743-757, 1994.

PIOVANO, M. *et al.* Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 47, p. 235-240, 2002.

POOLE, K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 44, p. 2233-2241, 2002.

QUANG, D. N. *et al.* Thelephantins A, B and C: three benzoyl  $\rho$ -terphenyl derivatives from the inedible mushroom *Thelephora aurantiotincta*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 109-113, 2003a.

QUANG, D. N. *et al.* Thelephantins D-H: five  $\rho$ -terphenyl derivatives from the inedible mushroom *Thelephora aurantiotincta*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 919-924, 2003b.

QUANG, D. N. *et al.* Thelephantins I-N:  $\rho$ -terphenyl derivatives from the inedible mushroom *Hydnellum caeruleum*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1179-1184, 2004a.

QUANG, D. N. *et al.* Tyromycic acids B-E, new lanostane triterpenoids from the mushroom *Tyromyces fissilis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 148-151, 2004b.

QUEENER, S. W.; ELLIS, L. F. Differentiation of mutants of *Cephalosporium acremonium* in a complex medium: the formation of unicellular arthrospores and their germination. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 21, p. 1981-1996, 1975.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 703 p.

REESE, R. E.; BETTS, R. F.; GUMSTOP, B. **Manual de Antibióticos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2002. p

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLER, A. Screening as methods for natural products with antimicrobial activity: review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127-149, 1998.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372 p.

ROSA, L. H. *et al.* Screening of brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 98, p. 967-974, 2003.

RÖSECKE, J.; PIETSCH, M.; KÖNIG, W. A. Volatile constituents of wood-rotting basidiomycetes. **Phytochemistry**, v. 54, p. 747-750, 2000.

ROTHSCHILD, N. *et al.* Ligninolytic enzymes of the fungus *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*): isolation and characterization of lignin peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 627-633, 2002.

ROY, A.; DE, A. B. A record of *Polyporus tricholoma* Mont from India. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 68, n. 3, p. 442-444, 1977.

RUTTIMANN-JOHNSON, C.; LAMAR, R. T. Binding of pentachlorophenol to humic substances in soil by the action of white rot fungi. **Soil Biological Biochemistry**, v. 29, p. 1143-1148, 1997.

SANTOS, E. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* ATCC 204492 em cultivo semi-sólido utilizando bagaço de cana de açúcar**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2001.

SANTOS, F.; TAVARES, L. B. B. Resíduo do processamento de palmito como substrato para a caracterização biológica e frutificação de fungos do gênero *Polyporus*. In: **Fórum Nacional de Iniciação Científica (FAIC)**, Universidade Regional de Blumenau, 1 CDROM, 2004.

SATO, A. *et al.* Screening for dioxin-degrading basidiomycetes from temperate and tropical forests. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 763-766, 2003.

SCHÜZ, T. C.; FIELDLER, H. P.; ZÄHNER, H. Optimized nicksomycin production by fed-batch and continuous fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 39, p. 433-437, 1993.

SHEU, F. *et al.* Isolation and characterization of an immunomodulatory protein (APP) from the Jew's ear mushroom *Auricularia polytricha*. **Food Chemistry**, v. 87, p. 593-600, 2004.

SHIM, S. H. *et al.* New lanostane-type triterpenoids from *Ganoderma applanatum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1110-1113, 2004.

SHIONO, Y. *et al.* Fascicularones A and B from a mycelial culture of *Naematoloma fasciculare*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 491-496, 2004.

SHIPANOVA, I. *et al.* Relationship between intracellular pH and antibiotic biosynthesis in *Fusidium coccineum*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 43, p. 514-517, 1995.

SHU, Y.Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

SHU, C. H.; LUNG, M. Y. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 931-937, 2004.

SILVA, M. *et al.* Screening filamentous fungi isolated from estuarine sediments for the ability to oxidize polycyclic aromatic hydrocarbons. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 399-405, 2003.

SILVEIRA, R. M. B.; WRIGHT, J. E. *Polyporus s. str.* in southern South America: mating tests. **Mycological Research**, v. 106, n.11, p. 1323-1330, 2002.

SILVEIRA, R. M. B.; SAIDMAN, B. O; WRIGHT, J. E. *Polyporus s. str.* in southern South America: isoenzyme analysis. **Mycological Research**, v. 107, n. 5, p. 597-608, 2003.

SINHA, J. *et al.* Effect of substrate concentration on broth rheology and fungal morphology during exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica* in a batch bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 392-399, 2001.

SMÂNIA, A. Jr. *et al.* Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p. 177-181, 1995.

SMÂNIA, E. F. A. *et al.* Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. **Journal Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 70, p. 57-59, 1997.

SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA, A. Jr.; LOGUÉRCIO LEITE, C. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. **Revista de Microbiologia**, v. 29, n. 4, p. 1-7, 1998.

SMÂNIA, A. Jr. *et al.* Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (Aphylophoromycetideae) fruit body. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 325-330, 1999.

SMÂNIA, E. F. A. *et al.* Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 4, p. 375- 377, 2003.

SMITH, J. J.; LILLY, M. D.; FOX, R. I. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. **Biotechnology Engineering**, v. 35, p. 1011-1023, 1990.

SPÍZEK, J.; TICHY, P. Some aspects of overproduction of secondary metabolites. **Folia Microbiologica**, v. 40, n. 1, p. 43-50, 1995.

STALPERS, J. A. Identification of wood-inhabiting fungi in pure culture. **Studies in Mycology**, v. 16, p. 1-248, 1978.

STAMETS, P. Novel antimicrobials from mushrooms. **HerbalGram**, v. 54, p.28-33, 2002.

STOVER, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, p. 959-964, 2000.

STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 2, p. 39-41, 2000.

SUAY, I. *et al.* Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 78, p. 129-139, 2000.

SUBICK, J. *et al.* Mode of action of Mucidin, a new antifungal antibiotic produced by the basidiomycete *Oudemansiella mucida*. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v. 343, p. 363-370, 1974.

SUGIYAMA, K. *et al.* Isolation of plasma cholesterol-lowering components from *ningyotake* (*Polyporus confluentis*) mushroom. **Journal of Nutrition and Science Vitaminology**, v. 38, n. 4, p. 335-342, 1992.

TANG, Y. J.; ZHONG, J. J. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 20-28, 2002.

\_\_\_\_\_. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of Ganoderma polysaccharide and ganoderic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 478-484, 2003.

THOMSON, C. J. *et al.* Antibacterial research and development in the 21<sup>st</sup> century - an industry perspective of the challenges. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 445-450, 2004.

TOYOTA, M.; HOSTETTMANN, K. Antifungal diterpenic esters from the mushroom *Boletinus cavipes*. **Phytochemistry**, v. 29, n.5, p. 1485-1489, 1990.

TRAN, J. H.; JACOBY, G. A. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. **Process Natural Academic Science**, v. 99, p. 5638-5642, 2002.

TSUKAMOTO, S. *et al.* Tricholomalides A-C, new neurotrophic diterpenes from the mushroom *Tricholoma sp.* **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1578-1581, 2003.

UENO, A. *et al.* Studies on the components of *Phaeolus schweinitzii* (Fr.) PAT. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 12, p. 376-378, 1964.

VALGAS, C. **Avaliação de Métodos de Triagem pra Determinação de Atividade Antibacteriana de Produtos Naturais**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M.; HARBONE, J. B. **Methods Plant Biochemistry**, p. 47-69, London: Academic Press, 1991.

VERPOORTE, R. Exploration of nature chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, v. 3, p. 232-238, 1998.

VETTER, J. Data on sodium content of common edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 81, p. 589-593, 2003.

VIEIRA, G. R. T. **Fotografias de experimentos com o gênero *Polyporus* (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia)**, Blumenau e Florianópolis, 2004. 6 fotos.

XU, C. P.; YUN, J. W. Influence of aeration on the production and the quality of the exopolysaccharides from *Paecilomyces tenuipes* C240 in a stirred-tank fermenter. **Enzyme Microbial Technology**, v. 35, p. 33-39, 2004.

YANG, F. C.; LIAU, C. B. Influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 5, p. 547-553, 1998.

YANG, F. C.; HUANG, H. C.; YANG, M. J. The influence of environmental conditions on the mycelial growth of *Antrodia cinnamomea* in submerged cultures. **Enzyme Microbial Technology**, v. 33, p. 395-402, 2003.

YU, R. *et al.* Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 462-472, 2004.

YUAN, D. *et al.* An anti-aldosteronic component (drain dampness) in *Polyporus sclerotium*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 867-870, 2004.

ZJAWIONY, J. K. Biologically active compounds from Aphyllophorales (Polypore) fungi. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1053-1071, 2003.

WAGNER, R. *et al.* Current techniques for the cultivation of *Ganoderma lucidum* for the production of biomass, ganoderic acid and polysaccharides. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 371-382, 2003.

WAGNER, R. *et al.* Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide. **Journal of Biotechnology**, v. 114, p. 153-164, 2004.

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

WALSH, F. M.; AYMES, S. G. B. Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 439-444, 2004.

WAN, C. C. *et al.*  $\beta$ -mannosidase from the mushroom *Polyporus sulfureus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 14, p. 4384-4388, 1976.

WANG, H.; NG, T. B. Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. **Peptides**, v. 25, p. 1-5, 2003.

WANG, H.; NG, T. B.; LIU, Q. A novel lectin from the wild mushroom *Polyporus adusta*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, p. 535-539, 2003.

\_\_\_\_\_. Alveolarin, a novel antifungal polypeptide from the wild mushroom *Polyporus alveolaris*. **Peptides**, v. 25, p. 693-696, 2004.

WASSER, P. S.; WEIS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 31-62, 1999.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of Phenolic Plant Metabolite**. USA: Ed. University of Nebraska at Lincoln, p. 143-167, 1994.

WEDGE, D. E.; NAGLE, D. G. A. A new 2D-TLC bioautography method for the discovery of novel antifungal agents to control plant pathogens. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1050-1054, 2000.

WEGENER, H. C. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 439-445, 2003.

WONG, K. H. *et al.* Biochemical and microstructural characteristics of insoluble and soluble dietary fiber prepared from mushroom sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*, *Polyporus rhinocerus*, and *Wolfiporia cocos*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7197-7202, 2003.

WONG, R. Y.; GAFFIELD, W. **Bioactive Natural Products**. USA: Ed. Colegate, CRC Press, 1993.

WU, J. Z. *et al.* Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 1. physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency. **Food Chemistry**, v. 81, p. 389-393, 2003.

WU, J. Z. *et al.* Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. **Food Chemistry**, v. 85, p. 101-105, 2004.

## APÊNDICE A

## ENSAIOS A

**Tabela A1:** Valores experimentais médios da concentração micelial (g/L), de *Polyporus tricholoma* e *Polyporus tenuiculus*, em 30 dias de cultivo em caldo dextrosado de batata (CDB) e caldo de extrato de malte peptonado (CEMP).

Tempo	CDB		CEMP	
	<i>P. tricholoma</i>	<i>P. tenuiculus</i>	<i>P. tricholoma</i>	<i>P. tenuiculus</i>
0	0,1065	0,1700	0,1065	0,1700
2	0,3710	0,4740	0,4305	0,4690
7	1,8290	0,3375	2,2280	0,4005
13	3,9330	0,7275	10,094	0,8105
17	5,7390	0,9465	10,2995	1,1215
22	5,1275	0,7715	9,2415	0,8850
27	8,4810	0,9100	9,9930	0,8410
30	8,4790	0,9102	9,7540	0,8310

**Tabela A2:** Valores médios de pH do início ao final do cultivo de *Polyporus tricholoma* e *Polyporus tenuiculus*, em caldo dextrosado de batata (CDB) e caldo de extrato de malte peptonado (CEMP).

Tempo	CDB		CEMP	
	<i>P. tricholoma</i>	<i>P. tenuiculus</i>	<i>P. tricholoma</i>	<i>P. tenuiculus</i>
0	4,50	4,50	4,50	4,50
2	4,64	4,65	4,60	4,58
7	4,70	4,67	4,58	4,55
13	4,99	5,01	5,16	4,80
17	4,88	5,08	4,95	4,97
22	4,92	5,14	5,10	5,12
27	5,79	5,63	5,93	5,11
30	5,81	5,79	5,49	6,04

## ENSAIOS B

**Tabela A3:** Valores médios de pH do início (T0) ao final do cultivo (T30) de *Polyporus tricholoma* em caldo dextrosado de batata (CDB), dos ensaios T1 a T12 com diferentes condições de processo.

TRATAMENTO	pH INICIAL	pH FINAL
T <sub>1</sub>	4,5	4,81
T <sub>2</sub>	4,5	5,34
T <sub>3</sub>	4,5	4,85
T <sub>4</sub>	4,5	4,92
T <sub>5</sub>	6,5	5,59
T <sub>6</sub>	6,5	5,96
T <sub>7</sub>	6,5	5,52
T <sub>8</sub>	6,5	5,86
T <sub>9</sub>	8,5	5,56
T <sub>10</sub>	8,5	5,97
T <sub>11</sub>	8,5	5,55
T <sub>12</sub>	8,5	5,94

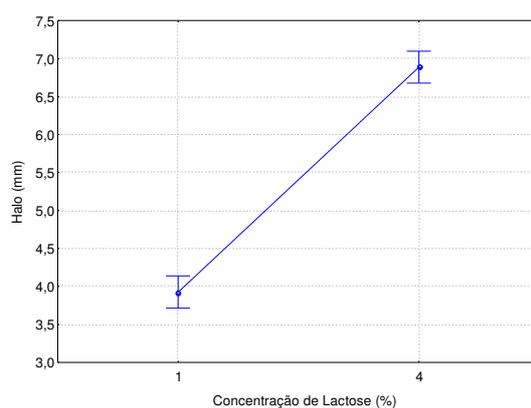
**Tabela A4:** Médias dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de *Staphylococcus aureus* por extratos de *Polyporus tricholoma* cultivado 20 dias em caldo dextrosado de batata (CDB), nos tratamentos com atividade.

TRATAMENTO	HALO (mm)
T4-L4%-CA-pH 4,5	17,00
T5-L1%-SA-pH 6,5	11,55
T7-L4%-SA-pH 6,5	10,11
T10-L1%-CA-pH 8,5	12,00
T11-L4%-SA-pH 8,5	14,22

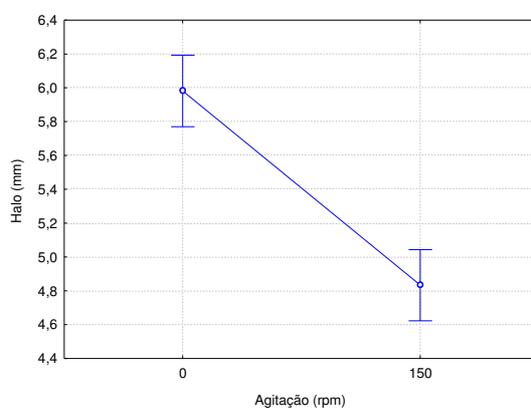
L: lactose; CA: com agitação; SA: sem agitação

**Tabela A5:** Sumário da análise de variância (ANOVA) dos efeitos do pH, concentração de lactose e agitação sobre a produção de halo de inibição de crescimento de *Staphylococcus aureus* por *Polyporus tricholoma*.

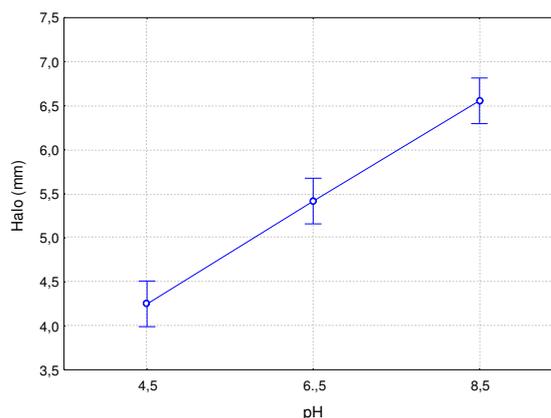
Variável	SQ	GL	QM	F	p
pH	95,685	2	47,843	78,288	0,000000
Lactose	237,037	1	237,037	387,879	0,000000
agitação	35,593	1	35,593	58,242	0,000000
pH*Lactose	429,019	2	214,509	351,015	0,000000
pH*agitação	1682,019	2	841,009	1376,197	0,000000
Lactose*agitação	45,370	1	45,370	74,242	0,000000
pH*Lactose*agitação	2156,685	2	1078,343	1764,561	0,000000
Erro	58,667	96	0,611		



**Figura A1:** Efeito da concentração de lactose no halo de inibição de crescimento (mm) de *Staphylococcus aureus* por *Polyporus tricholoma*. As barras verticais denotam intervalo de confiança de 95%.



**Figura A2:** Efeito da agitação no halo de inibição de crescimento (mm) de *Staphylococcus aureus* por *Polyporus tricholoma*. As barras verticais denotam intervalo de confiança de 95%.



**Figura A3:** Efeito dos valores de pH no halo de inibição de crescimento (mm) de *Staphylococcus aureus* por *Polyporus tricholoma*. As barras verticais denotam intervalo de confiança de 95%.

## ENSAIOS C

**Tabela A6:** Valores experimentais médios da concentração micelial (g/L) de *Polyporus tricholoma*, em caldo dextrosado de batata (CDB), com agitação.

Tempo de cultivo (dias)	Trat. 1 1% Glicose	Trat. 3 4% Glicose	Trat. 5 1% Lactose	Trat. 7 4% Lactose
0	0,26	0,26	0,26	0,26
3	0,55	0,38	0,44	4,36
8	2,61	1,21	3,80	8,27
14	4,98	7,85	6,37	11,16
21	6,47	9,59	6,77	13,72
28	6,44	10,80	6,80	11,61
35	6,04	14,02	7,45	11,95

**Tabela A7:** Valores experimentais médios da concentração micelial (g/L), de *Polyporus tricholoma* em caldo dextrosado de batata (CDB), sem agitação.

Tempo de cultivo (dias)	Trat. 2 1% Glicose	Trat. 4 4% Glicose	Trat. 6 1% Lactose	Trat. 8 4% Lactose
0	0,26	0,26	0,26	0,26
3	0,25	0,36	0,28	0,87
8	0,95	0,40	0,99	0,52
14	1,93	0,65	2,95	3,72
21	3,09	4,66	3,21	6,47
28	4,34	6,05	4,46	7,72
35	4,81	8,19	4,90	9,62

**Tabela A8:** Sumário da análise de variância (ANOVA) dos efeitos da concentração de lactose e agitação sobre a produção de biomassa por *Polyporus tricholoma*.

Variável	SQ	GL	QM	F	p
<b>açúcar</b>	107,214	3	35,738	7,7189	0,009532
<b>agitação</b>	35,665	1	35,665	7,7030	0,024094
<b>açúcar*agitação</b>	11,727	3	3,909	0,8443	0,507162
<b>Erro</b>	37,040	8	4,630		

**Tabela A9:** Valores experimentais médios de pH do cultivo de *Polyporus tricholoma*, em caldo dextrosado de batata (CDB), com agitação.

Tempo de cultivo (dias)	Trat. 1 1% Glicose	Trat. 3 4% Glicose	Trat. 5 1% Lactose	Trat. 7 4% Lactose
0	4,50	4,50	4,50	4,50
3	4,82	4,79	4,81	4,85
8	4,97	4,98	4,95	4,63
14	4,93	4,81	4,98	3,92
21	5,13	3,72	5,42	3,85
28	3,67	3,77	3,91	3,73
35	3,74	3,96	4,02	3,61

**Tabela A10:** Valores experimentais médios de pH do cultivo de *Polyporus tricholoma*, em caldo dextrosado de batata (CDB), sem agitação.

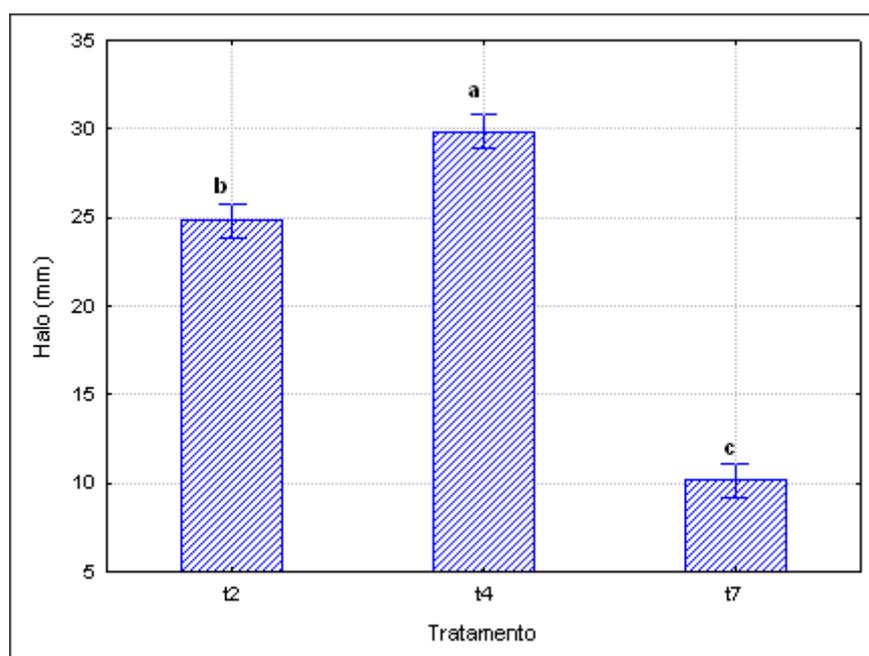
Tempo de cultivo (dias)	Trat. 2 1% Glicose	Trat. 4 4% Glicose	Trat. 6 1% Lactose	Trat. 8 4% Lactose
0	4,50	4,50	4,50	4,50
3	4,68	4,70	4,65	4,62
8	4,83	4,74	4,71	4,68
14	4,76	4,71	4,82	4,53
21	5,26	4,64	5,53	4,84
28	5,40	4,63	6,04	4,98
35	5,46	4,92	5,34	5,32

**Tabela A11:** Médias dos diâmetros dos halos de inibição (mm), de *Staphylococcus aureus* por *Polyporus tricholoma* cultivado em caldo dextrosado de batata (CDB), com agitação.

Tempo de cultivo (dias)	Trat. 1 1% Glicose	Trat. 3 4% Glicose	Trat. 5 1% Lactose	Trat. 7 4% Lactose
0	-	-	-	-
3	-	-	-	-
8	-	-	-	-
14	15	-	-	-
21	-	-	-	10
28	20	-	-	-
35	-	-	-	-

**Tabela A12:** Médias dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de *Staphylococcus aureus* por *Polyporus tricholoma* cultivado em caldo dextrosado de batata (CDB), sem agitação.

Tempo de cultivo (dias)	Trat. 2 1% Glicose	Trat. 4 4% Glicose	Trat. 6 1% Lactose	Trat. 8 4% Lactose
0	-	-	-	-
3	-	-	-	-
8	-	-	-	-
14	12	9	12	9
21	25	30	-	-
28	-	-	-	-
35	-	-	-	-



**Figura A4:** Médias dos halos de inibição (mm) de *Staphylococcus aureus* por *Polyporus tricholoma* no tempo 21 de cultivo, nos tratamentos: T2 (glicose 1%, sem agitação), T4 (glicose 4%, sem agitação) e T7 (lactose 4%, com agitação). Médias com letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade