



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

ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DO FUNGO *Antrodia albida* (Fr.) Donk.
CULTIVADO EM LABORATÓRIO

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal
de Santa Catarina, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Artur Smânia Júnior

LAILA HÜTTNER BEKAI

Florianópolis/SC
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

B424a Bekai, Laila Hüttner

Atividade antibiótica do fungo *Antrodia albida* (fr.)
donk. cultivado em laboratório [dissertação] / Laila
Hüttner Bekai ; orientador, Artur Smânia Júnior. -
Florianópolis, SC, 2010.

55 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. Resistência bacteriana. 3.
Basidiomicetos. 4. Atividade antimicrobiana. 5. Fungos. I.
Smânia Junior, Artur. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III.
Título.

CDU 577.23

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida.

**...Acorde de manhã e decida entre duas coisas:
ficar de mau humor e transmitir isso adiante ou
sorrir... Bom mesmo é ter problema na cabeça,
sorriso na boca e paz no coração!**

(Arnaldo Jabor)

RESUMO

O basidiomiceto *Antrodia albida* foi cultivado em quatro diferentes caldos de cultivo para estudo da produção da biomassa e da substância bioativa. Os extratos obtidos a partir de micélio cultivado no meio MNM apresentaram maiores halos de inibição do crescimento bacteriano em comparação com os obtidos a partir de micélios cultivados nos outros meios. Foi observado um aumento progressivo da biomassa fúngica até o 30º dia de incubação. A substância ativa começou a ser produzida a partir do 15º dia de cultivo. Os extratos se mostraram instáveis quando armazenados sob vácuo por um período de tempo superior a 30 dias. A atividade antibacteriana de extratos obtidos a partir de *A. albida* foi avaliada contra três espécies bacterianas Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048) e três espécies Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus* sp., *Bacillus cereus* ATCC 11778). Os extratos foram ativos contra *S. aureus*, *B. cereus*, *Micrococcus* sp. e *P. aeruginosa*. A partir do cultivo em meio sólido foi possível determinar a concentração inibitória mínima para *S. aureus* (15 mg/ml) e para *E. coli* (20 mg/ml). Os extratos obtidos foram caracterizados quimicamente através de GC-MS. As análises químicas realizadas identificaram um total de dezessete diferentes substâncias presentes nos extratos testados, dentre as quais, seis destas substâncias apresentam registros sobre atividades biológicas e importância econômica na literatura consultada, tais como: efeito imunossupressor, efeito supressor da proliferação de linhagens de células cancerosas, diminuição dos níveis de colesterol, atividade neuroprotetora e hepatoprotetora, atividade antiinflamatória, atividade inibitória de “Quorum Sensing” e formação de biofilmes.

Palavras chave: *Antrodia albida*, resistência bacteriana, Basidiomycetes, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The basidiomycete *Antrodia albida* was grown in four different broths to study the production of biomass and bioactive substance. The extracts obtained from mycelium grown in MNM medium showed greater inhibition zones of bacterial growth compared with those obtained from mycelia grown in other media. It was observed a progressive increase in fungal biomass until the 30th day of incubation. The active substance began to be produced from the 15th day of cultivation. The extracts were unstable when stored under vacuum for a period exceeding 30 days. Antibacterial activity of extracts from *A. albida* was evaluated against three Gram-negative bacterial species (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13 048) and three Gram-positive species (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus* sp., *Bacillus cereus* ATCC 11 778). Extracts were active against *S. aureus*, *B. cereus*, *Micrococcus* sp. and *P. aeruginosa*. From the cultivation on solid medium was possible to determine the minimum inhibitory concentration for *S. aureus* (15 mg / ml) and *E. coli* (20 mg / ml). The extracts were chemically characterized by GC-MS. The chemical analysis identified a total of seventeen different substances in the tested extracts. Six of these substances have been reported in the literature as having biological activities and economic importance, such as immunosuppressive effects, suppressive effects in the proliferation of cancer cell lines , decreased levels of cholesterol, neuroprotective and hepatoprotective activities, antiinflammatory activities, inhibitory activities of “Quorum Sensing” and biofilm formation.

Key words: *Antrodia albida*, bacterial resistance, Basidiomycetes, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismos de resistência bacteriana: (A) inativação da droga, (B) alteração do alvo, (C) prevenção da entrada da droga, (D) extrusão ativa da droga de dentro da célula (Adaptada de Putman et al., 2000).....24
- Figura 2.** Genética e propagação da resistência bacteriana. Genes de resistência bacteriana podem ser transmitidos de uma bactéria para outra através de vários mecanismos, tais como: conjugação, transdução e transformação (Adaptada de Levy & Marshall, 2004).....26
- Figura 3.** O processo de “descoberta” de novos agentes antimicrobianos a partir de produtos naturais microbianos (Adaptada de Peláez, 2006)29
- Figura 4.** Halos de inibição dos extratos fúngicos obtidos em meio MNM, contra *S. aureus*.....43
- Figura 5.** Controles do solvente utilizado (metanol) para as duas bactérias testadas.....43
- Figura 6.** Halos de inibição dos extratos fúngicos obtidos em meio MNM, contra *E. coli*.....44
- Figura 7.** Curva de crescimento da estirpe fúngica em relação à biomassa fresca produzida.....45
- Figura 8.** Peso seco produzido pela estirpe fúngica durante o período de cultivo.....45
- Figura 9.** Média das massas os extratos produzidos pela estirpe fúngica durante o cultivo.....46
- Figura 10.** Avaliação da CIM dos extratos obtidos a partir de meio sólido. As linhas nomeadas com EC correspondem aos poços inoculados com *E. coli*. As linhas nomeadas com AS correspondem aos poços inoculados com *S. aureus*. A penúltima coluna corresponde ao controle negativo e a última coluna, ao controle

positivo. A cor avermelhada indica crescimento bacteriano.....49

Figura 11. Halos de inibição dos extratos fúngicos obtidos em meios sólidos ADB e MNM contra *S. aureus* e *E. coli*..... 49

Figura 12. GC-MS de extratos metanólicos de *A. albida* obtidos a partir de meio sólido ABD..... 50

Figura 13. GC-MS de extratos metanólicos de *A. albida* obtidos a partir de meio sólido MNM..... 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de medicamentos obtidos a partir de produtos naturais (Adaptada de Vieira, 2005).....	27
Tabela 2. Agentes antibacterianos lançados no mercado entre 1995 e 2005, com suas respectivas classes e origem (Adaptada de Butler & Buss, 2006).....	28
Tabela 3. Avaliação da produção de biomassa e da atividade antimicrobiana de <i>A. albida</i> cultivada em quatro meios diferentes.....	42
Tabela 4. Médias dos halos de inibição do crescimento bacteriano gerado por discos de micélio, em duas temperaturas de incubação.....	48
Tabela 5. Concentração inibitória mínima dos extratos obtidos a partir do micélio cultivado em meio ABD e ágar MNM contra duas estirpes bacterianas.....	48
Tabela 6. Médias dos halos de inibição do crescimento bacteriano produzidos pelos extratos fúngicos obtidos a partir de meios sólidos.....	50
Tabela 7. Tempo de retenção dos compostos identificados de extratos de micélio cultivados em meio ABD e em meio ágar MNM e seus respectivos nomes	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. JUSTIFICATIVA.....	34
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo Geral.....	35
3.2. Objetivo específico.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Meios de cultura e reagentes	36
4.1.1. Meio de cultura para manutenção e produção de amostras fúngicas e biomassa.....	36
4.1.2. Meio de cultura para os testes de detecção de atividade antimicrobiana.....	36
4.1.3. Solvente utilizado para solubilização e diluição dos extratos.....	36
4.1.3. Solvente utilizado para solubilização e diluição dos extratos.....	36
4.1.4. Reagentes utilizados para a revelação dos testes de crescimento bacteriano.....	36
4.2. Estirpe fúngica	36
4.3. Cultivo do fungo	37
4.3.1. Definição do meio de cultura para obtenção de biomassa fúngica e incremento da produção de substância antimicrobiana.....	37
4.3.2. Padronização do cultivo da estirpe fúngica.....	37
4.4. Obtenção de extratos a partir da biomassa.....	39
4.4.1. Avaliação da estabilidade dos extratos.....	39
4.5. Atividade antimicrobiana dos extratos	39
4.5.1. Microrganismos-teste.....	39
4.5.1.1. Obtenção dos inóculos bacterianos.....	39
4.5.2. Teste de difusão.....	40
4.5.3. Determinação da concentração inibitória mínima.....	40
4.5.4. Cinética de produção da substância ativa.....	41
4.6. Caracterização química dos extratos obtidos	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1. Escolha do meio de cultura para produção de biomassa.....	42
5.2. Cinética do crescimento fúngico e da produção da substância ativa.....	44
5.3. Atividade antibacteriana dos extratos obtidos.....	46
5.3.1. Estabilidade dos constituintes dos extratos obtidos.....	47
5.3.2. Influência da temperatura na atividade da substância bioativa.....	48
5.3.3. Influência do pH na produção da substância bioativa.....	48
5.3.4. Cultivo em meio sólido.....	48

5.4. Caracterização química dos extratos.....	50
6. CONCLUSÕES	54
7. REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

Os fungos constituem um diverso grupo de organismos eucarióticos e heterotróficos, que se destacam pelo modo de nutrição absorptiva que apresentam. Estão distribuídos por todo o globo terrestre, explorando diversos nichos ecológicos (Esposito & Azevedo, 2004; Galvagno & Forchiassin, 2004).

Especificamente, os fungos da classe Basidiomycetes, popularmente chamados de orelhas-de-pau ou de cogumelos, apresentam grande importância na indústria alimentícia, na biorremediação de áreas degradadas, no processo de biopolpação do papel, e principalmente na indústria farmacêutica, entre outros usos, devido à extensa aplicabilidade dos metabólitos secundários produzidos pelos mesmos (Worrall et. al., 1997). Por esses motivos, o grupo dos basidiomicetos tem sido objeto de inúmeros estudos.

Os metabólitos secundários são produzidos por plantas, fungos, bactérias, protozoários, insetos e animais, em resposta aos estímulos externos como alterações nutricionais, modificações das condições do ambiente como pH e temperatura, infecções e competição. O termo “metabólito secundário” foi primeiramente utilizado por Bu'Lock no início dos anos 60, para caracterizar metabólitos microbianos, não essenciais para o metabolismo basal da célula, produzidos à partir da diferenciação bioquímica de um organismo. Muitos desses metabólitos têm sido relacionados com a atividade biológica, representando importante fonte de novos medicamentos. Aproximadamente um terço das drogas mais vendidas no mundo são produtos naturais ou derivados destes. O ponto decisivo foi a descoberta da penicilina em 1928 e a sua posterior industrialização durante a segunda Guerra Mundial. O incrível sucesso do desenvolvimento dos produtos naturais com atividade antibacteriana no período pós-guerra estimulou pesquisas relacionadas a novos agentes derivados destes produtos (Strohl, 2000; Lancini & Lorenzetti, 1993).

Segundo Stadler e Keller (2008), mais de 1500 metabólitos fúngicos, estudados entre 1993 e 2001, apresentaram atividade antibiótica ou antitumoral, e 57% dos cogumelos já estudados contêm potentes substâncias antibióticas (Martin, 2001). Portanto, os fungos têm se revelado fontes promissoras para a obtenção de novos compostos com atividade antimicrobiana.

A primeira investigação sobre o potencial dos basidiomicetos como fonte de antibióticos foi desenvolvida por Anchel, Hervey e Wilkins em 1941, quando examinaram extratos do basidioma e do

micélio de mais de 2000 espécies, detectando atividade antibiótica (Brizuela et al., 1998). Estudos subseqüentes levaram ao isolamento e identificação de pleuromutilina, um diterpenóide utilizado no tratamento de infecções causadas por micoplasma e a partir deste composto, foi desenvolvido o primeiro antibiótico comercial originado de um basidiomiceto. Porém, o interesse na produção de antibióticos derivados de basidiomicetos diminuiu consideravelmente após o início dos trabalhos com bactérias filamentosas (actinobactérias) e “mofos” (deuteromicetos), pois estes se mostraram mais produtivos e de fácil cultivo, sendo amplamente investigados como uma das principais fontes de novos metabólitos. A indústria farmacêutica, então, desviou-se das pesquisas com basidiomicetos e concentrou-se nos deuteromicetos. Atualmente, devido ao desenvolvimento de novas tecnologias de fermentação e purificação, os basidiomicetos tornaram-se, novamente, fonte potencial de novos antibióticos (Stamets, 2006; Rosa et al., 2003; Suay et al., 2000; Brizuela et al., 1998; Gragg et al., 1997).

O grande potencial biotecnológico da diversidade fúngica brasileira contrasta com os poucos estudos relacionados com a descoberta de novos compostos bioativos a partir de basidiomicetos em nosso país (Rosa et al., 2003). Dentre os estudos desenvolvidos, figura a produção de cinabarina por estirpes de *Pycnoporus sanguineus* (L.) Mur; substância esta, ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; pesquisas sobre a atividade antifúngica de esteróides e triterpenóides isolados de *Ganoderma annulare* (Fr.) Pat. e de *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat., além da atividade antibiótica de outras 84 espécies de basidiomicetos contra 12 espécies bacterianas de importância clínica (Rosa et al., 2003; Smânia et al., 2003; Smânia et al., 1999; Smânia et al., 1998; Smânia et al., 1995a).

Estudos dessa natureza também vêm sendo realizados em outros países. Na Espanha, por exemplo, foram coletadas 204 espécies de basidiomicetos, dentre as quais 109 apresentaram atividade antimicrobiana (Suay et al., 2000). Na Alemanha, foram isolados sesquiterpenóides de culturas de basidiomicetos do gênero *Gloeophyllum*, que foram submetidos a testes quanto a atividades biológicas (Rasser et al., 2000). O desenvolvimento tecnológico na área biológica despertou o interesse a respeito dos fungos como fonte inovadora de novos compostos, uma vez que as culturas fúngicas são de fácil manipulação genética, podendo gerar um aumento da diversidade e produção de metabólitos secundários (Stadler & Keller, 2008).

Agentes antimicrobianos e resistência bacteriana:

A antibioticoterapia é provavelmente a mais bem sucedida forma de controle de doenças infecciosas desenvolvida no século XX, que vem sendo atualizada até os dias de hoje (Wright, 2007; Putman et al., 2000; Gold & Moellering, 1996). Cerca de um terço de todos os pacientes hospitalizados recebe em algum momento de sua internação tratamento com agentes antimicrobianos (Corrêa, 2004).

As primeiras descrições sobre o uso de agentes antimicrobianos datam de 3000 anos, quando os médicos chineses usavam bolores para tratar tumores inflamatórios e feridas infectadas (Tavares; 2009).

Há, porém, uma grande confusão ao redor dos termos “antibiótico” e “antimicrobiano”. Segundo o conceito original de Waksman, estabelecido em 1942, antibióticos são substâncias extraídas de seres vivos, geralmente microscópicos (microrganismos) e que tem ação antimicrobiana. São metabólitos microbianos que em baixas concentrações são capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos. Essa inibição pode ser permanente, ou seja, quando a substância é capaz de matar a célula microbiana. Nesse caso são utilizados os termos “bactericida”, “fungicida” entre outros relacionados ao microrganismo alvo. A inibição também pode ser temporária, agindo somente enquanto o antibiótico está presente, inibindo o crescimento e reprodução do microrganismo. Nesse caso utiliza-se o termo “bacteriostático”. Os antibióticos utilizados na prática médica são derivados principalmente de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Cephalosporium*, de actinobactérias dos gêneros *Streptomyces*, *Nocardia* e *Micromonospora* e de outros grupos de bactérias, incluindo os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, chamados de antibióticos naturais. Já os antibióticos semi-sintéticos são obtidos através da adição de radicais ao núcleo ativo do antibiótico natural. As penicilinas semi-sintéticas, por exemplo, são obtidas a partir da adição de diferentes radicais ao seu núcleo ativo, o ácido 6-aminopenicilânico. Existe também a possibilidade de se adicionar às culturas de microrganismos, diferentes substâncias químicas capazes de alterar a estrutura molecular das substâncias produzidas, originando dessa forma os antibióticos biossintéticos, como por exemplo, a penicilina V. Alguns antibióticos como o cloranfenicol, o qual foi obtido inicialmente através do cultivo da bactéria *Streptomyces venezuelae*, passaram a ser sintetizados em laboratório, por apresentarem estrutura molecular simples. Essas substâncias passaram a ser designadas sintobióticos (Tavares, 2009; Neto et al., 1994). Segundo Corrêa (2004), os quimioterápicos são substâncias estritamente sintéticas, produzidas em laboratório. Porém,

para Neto e colaboradores (1994) e Tavares (2009) os quimioterápicos podem englobar, além de substâncias sintéticas, também aquelas produzidas por plantas. O termo antimicrobiano é utilizado para designar o conjunto dos antibióticos e quimioterápicos (Corrêa, 2004; Neto et al., 1994; Lancini & Lorenzetti, 1993). Alguns autores consideram estes termos como sendo sinônimos. Porém, no presente trabalho foi adotada a definição descrita acima.

As primeiras pesquisas relacionadas aos agentes antimicrobianos foram realizadas no final do século XIX, e durante o século XX, duas linhas de pesquisa desenvolvidas em paralelo obtiveram sucesso na área de antibióticos: o isolamento de produtos naturais com atividade biológica e o desenvolvimento de antimicrobianos semi-sintéticos. Estas descobertas abriram caminho para a “era de ouro” dos antibióticos (1940-1960) durante a qual a maioria das classes de antimicrobianos atualmente utilizados na medicina foi caracterizada (Wright, 2007; Clardy et al., 2006). No entanto, em pouco tempo, o “aparecimento” e a disseminação da resistência aos antimicrobianos entre organismos patogênicos, tornaram ineficientes muitos dos medicamentos disponíveis para o tratamento de algumas doenças infecciosas (Cirz et al., 2005; Putman et al., 2000).

As conseqüências da resistência bacteriana são preocupantes, uma vez que a variedade de organismos resistentes, as localidades afetadas por tais microrganismos e a amplitude da resistência em um único organismo são sem precedentes (Levy & Marshall, 2004). Com isso, agentes etiológicos que eram sensíveis a determinados medicamentos, durante a década de 80, agora causam doenças reemergentes, de difícil tratamento, mesmo com o uso de antimicrobianos de última geração (Donadio et al., 2002).

A resistência bacteriana vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas, enquanto que o ritmo de descoberta de novos antibióticos está decaindo, não acompanhando a adaptação dos microrganismos patogênicos. Alguns microrganismos tornaram-se resistentes a quase todos os antimicrobianos usados na clínica. Entre estes, devem ser destacadas estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, *Enterococcus* sp. resistentes à vancomicina e de *Micobacterium tuberculosis* multi-resistentes (Guzmán-Blanco, et al., 2009; Migliori, et al., 2009; Zárate, et al., 2007; Russel, 2002).

A seleção de estirpes bacterianas resistentes teve início em hospitais, onde o uso de antibióticos é intenso. Estirpes de *Streptococcus pyogenes* resistentes às sulfonamidas emergiram em hospitais militares nos anos 30. Já *S. aureus* resistente à penicilina começou a aparecer em

hospitais civis pouco tempo após a introdução da penicilina na prática clínica, na década de 40. Em seguida, a situação se agravou com o surgimento de organismos multi-resistentes, que se tornaram um grande desafio a ser superado pela medicina moderna (Levy & Marshall, 2004; Russel, 2002; Wright, 2007).

A resistência aos múltiplos fármacos foi primeiramente detectada entre o final dos anos 50 e o início dos anos 60, em bactérias entéricas como *Escherichia coli*, *Shigella* sp. e *Salmonella* sp. Posteriormente, próximo a década de 70, organismos causadores de doenças respiratórias e geniturinárias (*Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*, respectivamente) começaram a apresentar resistência a ampicilina, bem como ao clorafenicol e as tetraciclina. Devido ao uso abusivo de antibióticos, o nível e espectro da multi-resistência aumentaram, propagando-se em diferentes espécies bacterianas, principalmente nos países em desenvolvimento, onde os antibióticos podem ser adquiridos sem prescrição médica, as condições sanitárias são precárias e não há recursos financeiros para a aquisição de medicamentos eficazes (Levy & Marshall, 2004; Russel, 2002).

Mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos:

Os agentes antimicrobianos atuam nas células bacterianas através dos principais mecanismos de ação descritos abaixo:

-Inibição da síntese de peptidoglicanos: a parede celular da célula bacteriana, tanto Gram-positiva quanto Gram-negativa, possui diversos componentes, sendo sua camada basal constituída por peptidoglicanos. Os peptidoglicanos são polímeros mucopeptídeos complexos, rígidos que tem como componentes dois açúcares (o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglicosamina) e quatro peptídeos (a l-alanina, o ácido d-glutâmico, a l-lisina e a d-alanina). Alguns antimicrobianos são capazes de interferir na síntese de peptidoglicanas, implicando na formação de uma parede celular incompleta, ocasionando a lise da célula bacteriana. Os antimicrobianos β -lactâmicos, como por exemplo, as penicilinas e as cefalosporinas, atuam bloqueando a transpeptidação, processo responsável pela união dos componentes individuais da peptidoglicana. Já a bacitracina impede a união dos precursores da peptidoglicana com a substância lipídica responsável por seu transporte através da membrana plasmática para o meio extracelular. A vancomicina, por sua vez, impede a liberação destes precursores, que permanecem ligados à substância lipídica.

-Alteração da função da membrana plasmática: uma vez que a estrutura da membrana citoplasmática é alterada, o conteúdo da célula sofre extravasamento. Dependendo das condições da membrana celular bacteriana, íons, moléculas pequenas e macromoléculas podem deixar o interior da célula, com prejuízo variável ao seu metabolismo. As polimixinas, por exemplo, possuem afinidade por radicais fosfato existentes na membrana citoplasmática. Ligando-se a esses radicais, as polimixinas induzem alterações funcionais, resultando na perda de conteúdo celular e morte da bactéria.

-Interferência na síntese de ácidos nucléicos: os antimicrobianos deste grupo interferem na síntese de DNA, de RNA ou de ambos, atuando geralmente como bactericidas. As rifamicinas, por exemplo, interferem na atividade da RNA-polimerase, formando complexos estáveis com a enzima, inibindo o processo de transcrição da informação genética. Já os quimioterápicos do grupo das quinolonas, atuam inibindo a ação da DNA-girase. Assim a dupla hélice de DNA não se forma completamente, resultando na morte da célula bacteriana .

-Interferência na síntese de proteínas: os antibióticos deste grupo atuam inibindo a síntese de proteínas ou ocasionando a formação de proteínas anormais. O clorafenicol e os macrolídeos, por exemplo, atuam inibindo a síntese protéica fixando-se sobre a subunidade 50S dos ribossomos. As tetraciclina inibem a síntese de proteínas através da ligação a subunidade 30S dos ribossomos. Já os antibióticos aminoglicosídeos, como a neomicina, a gentamicina, entre outros; fixam-se na subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, provocando um erro na leitura e incorporação de aminoácidos ao peptídeo em formação, gerando uma proteína defeituosa que é letal para a célula bacteriana (Tavares, 2009; Franklin & Snow, 2005; Russel, 2002; Neto et al., 1994).

É através dessas interações que o agente antimicrobiano bloqueia o crescimento do patógeno e eventualmente causa a sua morte. Porém, a eficácia de um antibiótico depende basicamente de três fatores: atuação específica no alvo molecular, acesso ao alvo dentro do patógeno e a interação do antimicrobiano com o hospedeiro do patógeno (Donadio et al., 2002).

Mecanismos de resistência bacteriana:

Alguns dos mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos são bastante conhecidos. Basicamente, os principais mecanismos de resistência envolvem: redução da entrada dos

antibióticos na célula, degradação do antimicrobiano e modificação de sítios de ligação específicos (Poole, 2002; Russel, 2002).

-Modificação ou destruição enzimática: o mecanismo predominante e mais eficaz de resistência bacteriana através da modificação ou destruição enzimática recai sobre a produção de β -lactamases (figura 1a). Estas são enzimas que inativam o agente antimicrobiano (antibiótico β -lactâmico) através da hidrólise do anel β -lactâmico da molécula. Quatro classes de β -lactamases são reconhecidas: Classe A (penicilinases), Classe B (metalo- β -lactamases), Classe C (cefalosporinas) e Classe D (oxacilinases). A aquisição desse tipo de resistência se dá através da não supressão de genes cromossômicos ou através da aquisição de elementos extra-cromossômicos que possuem os genes de resistência. Da mesma forma, a resistência à aminoglicosídeos é baseada em uma modificação na molécula do agente antimicrobiano, o que compromete a sua ligação ao sítio-alvo. Três tipos de modificação são conhecidos, catalisadas por O-fosfotransferases, O-adeniltransferases e N-acetiltransferases (Wright, 2007; Poole, 2002; Putman et al., 2000).

-Alteração de sítios-alvo: esse mecanismo de resistência talvez seja o mais específico (figura 1b). Mudanças nos sítios-alvo, nos quais se ligam os medicamentos, interferem ou limitam a interação do patógeno com o antibiótico, prevenindo o efeito bacteriostático e/ou bactericida, promovendo então a resistência bacteriana a estes medicamentos. Um mecanismo muito comum de resistência a uma classe de antibióticos, por exemplo, envolve a modificação dos seus sítios-alvo no ribossomo, especialmente a metilação de um resíduo de adenina. A resistência a β -lactâmicos devido à alteração nos sítios-alvo é também bastante comum. Resistência à meticilina em *S. aureus* é de maneira geral devida a produção de proteínas ligadoras de penicilina de baixa afinidade, o que confere resistência a virtualmente todos os β -lactâmicos. A vancomicina, por exemplo, tem como sítio-alvo a extremidade D-alanina-D-alanina do pentapeptídeo precursor das peptidoglicanas. As estirpes resistentes sintetizam peptídeos com extremidades alteradas e de baixa afinidade à vancomicina. Da mesma forma, a resistência a fluoroquinonas tem sido atribuída a mutações que afetam os sítios-alvo, como mutações na DNA girase e nas topoisomerase (Wright, 2007; Poole, 2002;).

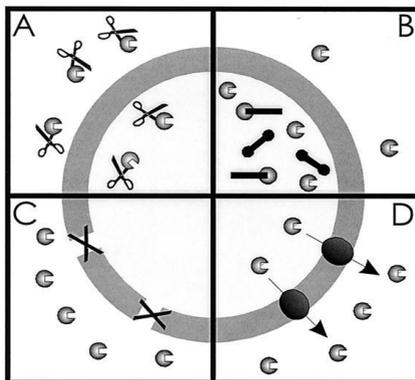


Figura 1: Mecanismos de resistência bacteriana: (A) inativação da droga, (B) alteração do alvo, (C) prevenção da entrada da droga, (D) extrusão ativa da droga de dentro da célula (Adaptada de Putman et al., 2000).

-Alteração de permeabilidade: para que os antibióticos efetivamente exerçam sua função bactericida e/ou bacteriostática eles devem ter acesso aos alvos intracelulares (Denyer & Maillard, 2002; Poole, 2002). Para isso, especificamente em bactérias Gram-negativas, eles devem ultrapassar a membrana externa, cuja permeabilidade é o maior determinante de resistência nesse grupo de bactérias (figura 1c). A presença da membrana externa explica, em parte, a maior resistência em bactérias Gram-negativas, em comparação às bactérias Gram-positivas, já que essas não possuem a barreira físico-química da membrana externa que restringe a entrada de agentes antimicrobianos (Lambert, 2002; Poole, 2002). A resistência intrínseca, apresentada por muitos organismos Gram-negativos, se deve a permeabilidade limitada de sua membrana externa. Estes organismos regulam a permeabilidade de sua membrana externa através da presença de canais hidrofílicos conhecidos como “porinas”, que podem ser classificadas como porinas específicas e não-específicas. Alterações no tamanho destas porinas, ou a perda destes canais, pode interferir na entrada de substâncias antimicrobianas na célula. Em *Enterobacter aerogenes*, por exemplo, o surgimento da multi-resistência está associado a uma diminuição da permeabilidade da membrana externa, relacionada à perda de porinas. Da mesma forma, a resistência a β -lactâmicos, adquirida por muitos organismos Gram-negativos, se deve a alterações na membrana externa, o que leva a redução da permeabilidade. Porém, estudos recentes afirmam que a membrana externa só é realmente efetiva como mecanismo de resistência quando atua de forma combinada com outros mecanismos. Os biofilmes, por exemplo, conferem às bactérias altos

níveis de resistência a muitos antimicrobianos, em parte, por impedirem ou limitarem a entrada de antimicrobianos nas células (Denyer & Maillard, 2002; Poole, 2002).

-Efluxo: embora muitos microrganismos apresentem barreiras, que impedem que o antimicrobiano penetre no interior da célula bacteriana, uma vez que essas drogas ganhem o conteúdo citoplasmático, essas barreiras não são capazes de evitar os danos causados pelos agentes antimicrobianos (figura 1d). É necessário que haja um sistema de efluxo eficaz, para manter níveis insuficientes de antibióticos dentro da célula (Putman et al., 2000). Alguns transportadores, como as “bombas de efluxo de tetraciclina”, são sistemas dedicados à extrusão de um determinado medicamento, ou de uma classe deste. Ao contrário destes transportadores específicos, os chamados “transportadores multi-drogas” são capazes de transportar para fora da célula uma variada gama de compostos diferentes. Estes transportadores podem ser classificados da seguinte forma: os transportadores multi-drogas secundários, que utilizam o gradiente transmembrana de prótons ou íons sódio para expulsar os agentes antimicrobianos do interior da célula; e os transportadores dependentes de ATP, que utilizam energia da hidrólise do ATP para bombear o antibiótico para fora da célula. Estes transportadores contribuem para a resistência intrínseca e adquirida de um patógeno (Wright, 2007; Poole, 2002; Putman et al., 2000).

Propagação da resistência a agentes antimicrobianos:

Elementos gênicos móveis têm um papel crucial na disseminação dos genes de resistência aos antimicrobianos entre a população bacteriana (figura 2). Porém, os fatores ambientais e genéticos que regulam a transferência desses genes ainda não são totalmente conhecidos. O mecanismo de resistência bacteriana é “móvel”, ou seja, os genes de resistência podem ser transferidos entre bactérias de diferentes grupos taxonômicos e ecológicos através de elementos genéticos móveis como bacteriófagos, plasmídeos ou transposons. Estes genes oferecem resistência a um único tipo ou família de antimicrobianos, porém, múltiplos genes, cada um pertencente a uma via de resistência, podem se acumular no mesmo organismo. Além da resistência codificada por DNA extra-cromossômico, como citado acima, a bactéria pode adquirir resistência através de mutações cromossômicas durante a exposição ao medicamento. Esse processo foi responsável, por exemplo, pela emergência inicial de resistência à tetraciclina e penicilina em *Neisseria gonorrhoeae*. A habilidade das

bactérias de mobilizar genes e a pressão seletiva realizada pelos agentes antimicrobianos facilita a disseminação dos genes de resistência antimicrobiana entre populações bacterianas. Dessa forma, o fenômeno da resistência se espalha mesmo na ausência de pressão contínua (Wright, 2007; Cirz et al., 2005; Beaber et al., 2004; Levy & Marshall, 2004).

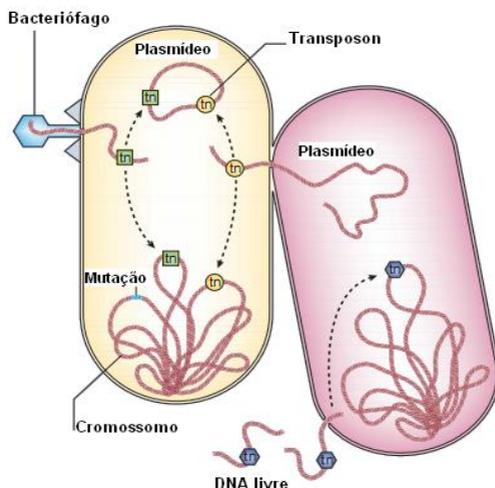


Figura 2: Genética e propagação da resistência bacteriana. Genes de resistência bacteriana podem ser transmitidos de uma bactéria para outra através de vários mecanismos, tais como: conjugação, transdução e transformação (Adaptada de Levy & Marshall, 2004).

Produtos naturais como fontes de novos antibióticos:

A natureza evoluiu ao longo do tempo para produzir uma grande diversidade de metabólitos secundários. Com base na cultura popular, os extratos de produtos naturais foram os primeiros, e durante muito tempo, os únicos medicamentos disponíveis para a humanidade. Produtos naturais representam uma fonte rica em compostos biologicamente ativos e são um exemplo de diversidade molecular, com grande potencial na descoberta e desenvolvimento de medicamentos. Um grande número de produtos naturais como, por exemplo, morfina e quinina, ainda estão em uso atualmente (Ganesan, 2008; Mishra et al., 2008; Rishton, 2008; Singh & Barrett, 2006). Na tabela 1 estão apresentados exemplos de medicamentos obtidos a partir de produtos naturais.

Tabela 1: Exemplos de medicamentos obtidos a partir de produtos naturais (Adaptada de Vieira, 2005).

Fármaco	Uso terapêutico	Fonte
Ciclosporina	Imunossupressor	<i>Tolypocladium inflatum</i>
Digoxina	Insuficiência cardíaca	<i>Digitalis purpúrea</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</i> sp.
Paclitaxel	Câncer (ovário)	<i>Taxus brevifolia</i>
Vimblastina	Câncer (mama)	<i>Catharantus roseus</i>
Vincristina	Leucemia	<i>Catharantus 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>
Lentinam	Antitumoral	<i>Lentinus edodes</i>
Shizophyllan	Antitumoral	<i>Schizophyllum commune</i>

Embora atualmente exista uma série de estratégias disponíveis para a investigação de produtos naturais, as quais dizem respeito à seleção e coleta de amostras, técnicas de isolamento, elucidação da estrutura, avaliação da atividade biológica, desreplicação, biossíntese, bem como a otimização do processo de produção, a velocidade de descoberta de novos compostos naturais com atividade biológica tem diminuído. Ao longo dos últimos 20 anos, houve uma diminuição de 56% no número de antibióticos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) e ao longo da última década, somente 22 novas drogas antibacterianas foram lançadas, sendo 12 destas derivadas de produtos naturais (tabela 2). Mesmo assim, muitos autores têm apontado para a importância da continuidade das pesquisas com compostos derivados de microrganismos, plantas e animais visando o tratamento de doenças humanas. Na área oncológica e de doenças infecciosas, entre 1981 e 2002, 60 e 75% das novas drogas, respectivamente, foram obtidas a partir de fontes naturais (Mishra et al., 2008; Lam, 2007; Butler & Buss, 2006). Na tabela 2 estão listados os agentes antibacterianos lançados no mercado entre 1995 e 2005, suas classes e origem.

Os esforços da indústria farmacêutica, em apoiar atividades básicas relacionadas à descoberta de drogas e identificação de novas classes de agentes antibacterianos, diminuíram drasticamente. Isso se deve a interesses econômicos divergentes e à concorrência de outras áreas terapêuticas. Por outro lado, nas últimas décadas, a importância da natureza da resistência bacteriana tem sido reconhecida, e é essencial que novas classes de agentes antibacterianos sejam desenvolvidas, como parte de uma estratégia para controlar patógenos resistentes reemergentes (Barrett, 2005).

Tabela 2: Agentes antibacterianos lançados no mercado entre 1995 e 2005, com suas respectivas classes e origem (Adaptada de Butler & Buss, 2006).

Ano	Nome comercial (composto ativo)	Classe	Origem (*produto natural)
1995	Cefozopran	β -lactâmico	derivado PN*
1997	Cefcapene pivoxil	β -lactâmico	derivado PN
1997	Faropenem	β -lactâmico	derivado PN
1997	Fluritromicina	Macrolídeo	derivado PN
1998	Cefoselis	β -lactâmico	derivado PN
1998	Trovafloxacino	Quinolona	sintético
1999	Quinupristina e Dalfopristina	Estreptogramina	derivado PN
1999	Gatifloxacino	Quinolona	sintético
1999	Moxifloxacino	Quinolona	sintético
2000	Linezolida	Oxazolidinona	sintético
2001	Ertapenem	β -lactâmico	derivado PN
2001	Telitromicina	Macrolídeo	derivado PN
2002	Biapenem	β -lactâmico	derivado PN
2002	Balofloxacin	Quinolona	sintético
2002	Pazufloxacino	Quinolona	sintético
2002	Prulifloxacino	Quinolona	sintético
2002	Voriconazole	Quinolona	sintético
2003	Daptomicina	Daptomicina	PN
2004	Gemifloxacino	Quinolona	sintético
2004	Fosfluconazole	Quinolona	sintético
2005	Doripenem	β -lactâmico	derivado PN
2005	Tigeciclina	Tetraciclina	derivado PN

Segundo Peláez (2006), a porcentagem de estirpes fúngicas e bacterianas produtoras de compostos bioativos em ensaios de difusão em ágar varia entre 30 e 80%, dependendo do grupo taxonômico. No

entanto, embora o número de substâncias bioativas na natureza possa ser muito grande, a maioria delas já é conhecida ou de pouca aplicabilidade (não são específicas para as bactérias, são tóxicas, com baixa atividade, não apresentam as propriedades farmacocinéticas desejadas). O sucesso na descoberta de novos antibióticos a partir de produtos naturais microbianos (figura 3) depende de que determinado microrganismo seja cultivado em condições adequadas para induzir a produção do metabólito desejado, que é então extraído e testado no intuito de detectar sua viabilidade. Este composto deverá ser isolado a partir do extrato original e identificado.

Diferentes abordagens utilizadas para aumentar a produção de metabólitos secundários e obter estirpes superprodutoras estão sendo revistas. As técnicas para incrementar a produção de compostos biologicamente ativos incluem desde o controle fisiológico, como por exemplo: inibição por *feedback*; regulação de fontes de energia, de carbono, hidrogênio, fósforo, entre outros; investigação de novas atividades biológicas para substâncias já conhecidas; biotransformação de compostos, a fim de aumentar a solubilidade e a atividade biológica; além do controle genético aliado a biologia molecular (Spizek & Tichy, 1995).

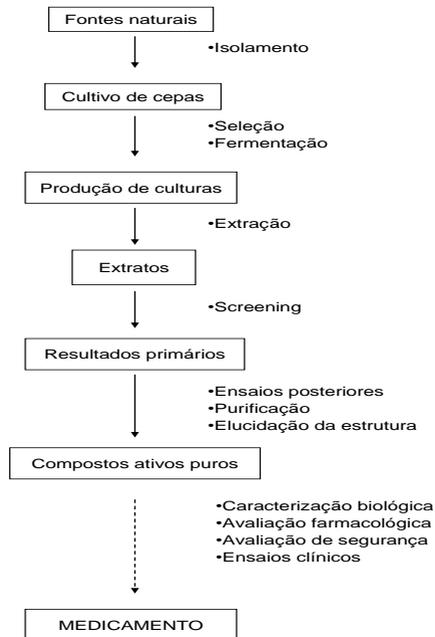


Figura 3: O processo de “descoberta” de novos agentes antimicrobianos a partir de produtos naturais microbianos (Adaptada de Peláez, 2006).

A prevalência de agentes antibacterianos derivados de produtos naturais pode estar relacionada à evolução dos metabólitos secundários como compostos biologicamente ativos, que conferem vantagens aos organismos produtores. É provável que os produtos naturais tenham evoluído para penetrar nas membranas celulares e interagir com alvos específicos. Por isso, os produtos naturais são, muitas vezes, o ponto de partida lógico para a descoberta de novos medicamentos para o tratamento de doenças infecciosas. Os produtos naturais microbianos ainda figuram como as mais promissoras fontes de novos antibacterianos. A diversidade estrutural, o fato de que o campo ainda inexplorado é grande, o potencial para desencadear a expressão de vias silenciadas através da manipulação das condições de cultivo e o número de alvos moleculares a serem explorados pela antibioticoterapia, são argumentos que depõem a favor desta idéia. O processo de descoberta de antibióticos a partir de produtos naturais é complexo, porém progressos significativos têm sido feitos durante os últimos anos, contribuindo para a eficiência do processo. Os recursos necessários são significativos, porém, o resultado destes esforços pode levar à solução de uma das mais graves ameaças à saúde que poderemos enfrentar nos próximos anos (Peláez, 2006).

Muito tem se discutido a respeito de como as empresas farmacêuticas podem ser incentivadas a investir atividades de pesquisa e desenvolvimento de agentes antimicrobianos. Em países como os Estados Unidos, a “Sociedade Americana de Doenças Infecciosas” (Infectious Diseases Society of America) têm sugerido vários incentivos, como a aceleração do processo de aprovação de novos antibióticos, oferecendo créditos nos impostos, limitando a responsabilidade pelos efeitos adversos e oferecendo compromissos de compra pelo governo (Butler & Buss, 2006).

O gênero *Antrodia* como fonte de substâncias bioativas:

A espécie fúngica a ser estudada no presente trabalho é *Antrodia albid*a e está classificada taxonomicamente, segundo Kirk et al. (2001):

Classe: *Basidiomycetes*

Sub Classe: *Agaricomycetidae*

Ordem: *Polyporales*

Família: *Meripilaceae*

*Antrodia albid*a (Fr.) Donk., **Persoonia** 4:339, 1966.

Trata-se de um basidiomiceto causador de podridão castanha, que ocorre na natureza preferencialmente em associação com gimnospermas, degradando a madeira de forma que esta escurece e se

quebra em cubos. Pode ser encontrado predominantemente nas regiões temperadas, mas ocorre também em regiões tropicais, como o Brasil (Tuomela, et al., 2000; Green III & Highley, 1997; Tuor et al., 1995).

No gênero *Antrodia*, espécies como *A. camphorata* e *A. cinnamomea* têm sido alvo de inúmeros estudos relacionados à produção de compostos com atividade biológica. Porém, para a espécie *A. albida*, não se dispõe de muitos dados dessa natureza na literatura.

Antrodia camphorata é um conhecido cogumelo medicinal utilizado nos países orientais. Tradicionalmente, *A. camphorata* tem diversas aplicações medicinais, como no tratamento de intoxicações, diarreia, dores abdominais, hipertensão, entre outras. Também têm sido descritas para os extratos brutos dos basidiomas, do micélio e do filtrado de *A. camphorata*, atividades antioxidante, antiinflamatória, anti-hepatite, hepatoprotetora, antitumoral, vasodilatadora, neuroprotetora, imunomodulatória e também como adjuvante no tratamento de tumores (Kuo et al., 2008).

Lee e colaboradores (2002) relataram que os polissacarídeos do micélio de *A. camphorata* exibiam também efeito contra o vírus da hepatite B, enquanto que Shen e colaboradores (2003) isolaram 14 princípios ativos do basidioma de *A. camphorata*, alguns dos quais apresentaram efeitos imunomodulatórios em leucócitos humanos. Posteriormente, o potencial antiinflamatório de seis diferentes extratos obtidos a partir do micélio cultivado de *A. camphorata* foi confirmado, bem como as propriedades e os componentes antioxidantes dos extratos metanólicos de dois tipos de micélios desde basidiomiceto, obtidos a partir de dois processos fermentativos diferentes (Mau et al., 2004; Shen et al., 2004).

Outra espécie do mesmo gênero, *Antrodia cinnamomea*, foi avaliada por Tsai e colaboradores (2007) com relação às propriedades antioxidantes dos polissacarídeos obtidos do micélio em cultura submersa. Foi observado que estes polissacarídeos são capazes de proteger células do fígado contra danos no DNA induzidos por H_2O_2 .

Portanto, fungos do gênero *Antrodia* têm apresentado resultados promissores em trabalhos visando à produção de compostos biologicamente ativos, justificando a investigação de atividades biológicas da espécie *Antrodia albida* neste trabalho.

Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa na identificação de compostos com atividade biológica:

A cromatografia consiste em um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura, no qual os compostos

presentes são distribuídos entre duas fases: uma estacionária e outra móvel. A separação ocorre porque os compostos têm diferentes afinidades com a fase estacionária e com a fase móvel, resultando em migrações diferenciais destes compostos. O método foi inicialmente desenvolvido pelo botânico russo Mikhail Semenovich Tswett, que utilizou, em 1906, colunas de carbonato de cálcio para separar pigmentos de folhas arrastando-os com éter de petróleo. A cromatografia se classifica quanto à natureza da fase estacionária e quanto ao processo de separação (Aquino Neto et al., 2003; Collins et al., 1990).

A cromatografia gasosa (CG) é um método físico de separação de componentes volatilizáveis de uma mistura através de uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa). A amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás adequado específico para cada detector. Este fluxo de gás com a amostra vaporizada passa por um tubo contendo a fase estacionária, onde ocorre a separação da mistura. As substâncias separadas saem da coluna dissolvidas no gás de arraste e passam por um detector, que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluído. O registro deste sinal em função do tempo é o cromatograma, sendo que as substâncias aparecem nele como picos com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa (Aquino Neto, 2003; Berezkin e Viktorova, 2003; Collins, et al. 1990).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa é uma técnica analítica que serve a uma ampla gama de aplicações que visam a identificação da amostra e/ou determinação quantitativa. Na realidade, o espectrômetro de massa atua no papel de detector. Nessa técnica, as amostras provenientes do cromatógrafo a gás, no estado gasoso, adentram a câmara de ionização do espectrômetro de massa onde são bombardeadas por um feixe de elétrons de alta energia e quebradas gerando íons positivos, negativos e radicais. O aparelho então detecta e registra os fragmentos gerados pelo impacto dos elétrons e a partir dos valores de massa molecular de cada um desses fragmentos, monta-se a molécula. O espectro de massa é um gráfico gerado a partir da relação entre abundância e a razão massa/carga (m/z), onde aparecem picos de intensidades variáveis. A intensidade do pico sugere a abundância relativa de cada íon molecular. O íon mais abundante dá origem ao pico mais alto do espectro de massa, chamado pico base. Frequentemente aparecem no gráfico vários picos, de intensidade muito baixa. A grande maioria deles não deve ser considerada na análise do espectro, pois correspondem a fragmentos de difícil identificação. A

abundância relativa de todos os outros picos do espectro é apresentada como porcentagens relativas à abundância do pico base (Fialkov et al., 2007; Fialkov et al., 2006; Maštovská e Lehotay, 2003; Pavia et al., 1996; Silverstein et al., 1991)

2. JUSTIFICATIVA

A busca por novos agentes farmacologicamente ativos obtidos através da seleção de fontes naturais tem levado à descoberta de diversas drogas muito úteis no tratamento de diversas doenças. Trabalhos têm demonstrado que aproximadamente 60% dos agentes antitumorais e anti-infecciosos disponíveis hoje no mercado, 39% das 520 novos fármacos aprovados entre 1983 e 1994 são oriundas de produtos naturais (Harvey, 2008; Harvey, 2000; Shu, 1998).

Estima-se que o Brasil tenha cerca de 2.000.000 espécies distintas entre animais, vegetais e microrganismos distribuídos em uma grande variedade de ecossistemas. Grande parte destes organismos é fonte de substâncias biologicamente ativas, que apresentam uma enorme diversidade em termos de estrutura e propriedades químicas e que podem ser utilizadas direta ou indiretamente no desenvolvimento de novos fármacos. O Brasil, com toda sua diversidade apresenta-se, portanto como uma importante fonte de recursos naturais para o desenvolvimento de novas substâncias de interesse biológico (Sandes & Di Blasi, 2000).

Este projeto tem o propósito de explorar uma espécie fúngica na busca por novos compostos biologicamente ativos, que possam servir como base para o desenvolvimento de novos fármacos, podendo ter utilidade na cura ou abrandamento de doenças que acometem o homem. Para isso, o Laboratório de Antibióticos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), coordenado pelos professores Artur Smânia Jr. e Elza de Fátima Albino Smânia, com ampla experiência em testes de atividade antimicrobiana e também com formação na área de Química de Produtos Naturais, vêm interagindo com pesquisadores de outras áreas e outros centros de pesquisa, favorecendo o desenvolvimento de projeto desta natureza.

3.OBJETIVOS

3.1.Objetivo Geral

Estudar a atividade antimicrobiana do fungo *Antrodia albida* visando o controle de microrganismos patogênicos para o homem.

3.2.Objetivos Específicos

- ✓ Cultivar a espécie fúngica em laboratório para obtenção de biomassa fúngica;
- ✓ Obter a cinética de crescimento da estirpe fúngica;
- ✓ Extrair as substâncias bioativas com o uso de solventes orgânicos
- ✓ Obter a cinética de produção da substância ativa;
- ✓ Determinar as concentrações mínimas inibitórias e mínimas bactericidas dos extratos obtidos;
- ✓ Caracterizar quimicamente os extratos bioativos obtidos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Meios de cultura e reagentes

4.1.1. Meio de cultura para manutenção e produção de amostras fúngicas e biomassa:

O meio ágar batata dextrose (ABD) (BD) foi utilizado para a manutenção das culturas fúngicas. O caldo batata dextrose (CBD) (BD), o meio Melin-Norkrans modificado (MMN) (Marx, 1969), o caldo extrato de malte (CEM) (Sigma) e uma variação mais diluída do meio Pridham-Gottlieb modificado por Kuek (1996) (PGKM) (Rossi et. al., 2002) foram utilizados para estudo da biomassa e produção da substância ativa.

4.1.2. Meio de cultura para os testes de detecção de atividade antimicrobiana:

Caldo de infusão de cérebro e coração (Brain heart infusion-BHI) (BD) foi utilizado para manutenção das culturas bacterianas e preparo do inóculo. O meio ágar sangue (ágar base para ágar sangue (Himedia) adicionado de 5% de sangue de carneiro) foi utilizado para os testes de pureza bacteriana. O caldo e o ágar Mueller-Hinton (Difco) foram utilizados nos testes de atividade antimicrobiana.

4.1.3. Solvente utilizado para solubilização e diluição dos extratos:

Os solventes utilizados na dissolução e diluição dos extratos foram o dimetilsulfóxido (DMSO) (Nuclear) e o hidróxido de amônio (NH₄OH) (Vetec) a 0,01N.

4.1.4. Reagentes utilizados para a revelação dos testes de crescimento bacteriano:

Sempre que possível, o crescimento bacteriano foi observado através da densidade óptica (DO), em leitora de microplacas. Contudo, quando a turvação ou coloração do extrato testado interferiu na leitura da DO, o crescimento bacteriano foi avaliado através do uso de sal de tetrazólio (solução a 0,2 mg/mL de sal de p-iodonitrotetrazolium violete - INT (Sigma) - em etanol a 70%), que é um eficiente revelador de crescimento bacteriano.

4.2. Estirpe fúngica:

Foi utilizada uma cultura dicariótica de *Antrodia albida* (n^o 531) pertencente à Micoteca de Culturas do Laboratório de Micologia (BOT/CCB/UFSC), isolada de basidioma coletado no estado de Santa Catarina e armazenado no Herbário FLOR (Departamento de Botânica –

Universidade Federal de Santa Catarina). A cultura vem sendo mantida através de repicagens periódicas (a cada dois meses) em tubos contendo ágar batata dextrose (ABD) e armazenada a $5^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.3. Cultivo do fungo:

3.3.1. Definição do meio de cultura para obtenção de biomassa fúngica e incremento da produção de substância antimicrobiana:

O meio líquido utilizado para os estudos subseqüentes foi selecionado de acordo com a produção de biomassa (peso fresco e peso seco) e a atividade antimicrobiana dos extratos através de teste de difusão (vide item 10.1). Foram testados quatro diferentes caldos de cultivo: CBD, PGKM, CEM e MNM (Rossi et al., 2002; Smânia et al., 1995a). Os caldos, em volume de 150 ml, foram inoculados e as culturas mantidas em estufa B.O.D. (Dist) a 25°C por 20 dias.

Após o período de incubação, o micélio foi separado do caldo por filtração com o auxílio de papel filtro. Para a avaliação do peso fresco, pequenas alíquotas de micélio foram pesadas. Essas alíquotas foram mantidas em estufa a 105°C , até que o peso se mantivesse constante. Com os valores obtidos foi possível estimar a biomassa seca final. Posteriormente, os extratos obtidos foram testados quanto à atividade antimicrobiana, permitindo selecionar o meio que proporcionou o melhor crescimento fúngico e produção da substância bioativa para uso nos experimentos seguintes. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.2. Padronização do cultivo da estirpe fúngica:

4.3.2.1. Preparação do inóculo para o cultivo do fungo em meio líquido:

A cultura fúngica foi primeiramente inoculada em placas de Petri contendo meio ABD. Após dez dias de crescimento em estufa a 25°C , dez parcelas de micélio de aproximadamente 7 mm de diâmetro, feitas com cortador estéril, foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo 150 mL de caldo de cultivo MNM. As culturas foram mantidas por 20 dias, na temperatura mencionada acima. Para preparação do inóculo, o micélio foi fragmentado.

4.3.2.2. Cinética de crescimento da estirpe fúngica em meio líquido:

Para estabelecer a cinética de crescimento fúngico, alíquotas de 15 ml do inóculo preparado como descrito no item anterior, foram transferidas para garrafas de Roux contendo 150 ml do meio MNM. As culturas foram incubadas por um período de até trinta dias. A cada cinco

dias, três garrafas foram analisadas quanto à massa miceliana produzida. A massa miceliana obtida foi triturada juntamente com uma alíquota do caldo de crescimento e a suspensão obtida foi filtrada a vácuo com uso de papel filtro. O resíduo obtido foi pesado, para a avaliação da biomassa fresca e depois mantido em estufa a 105 °C para mensuração do peso seco (Smânia et al., 1995a).

4.3.2.3. Influência do pH na produção da substância bioativa:

Diferentes lotes do caldo MNM foram ajustados para os pHs 4,0 e 7,0 com a finalidade de se estudar a influência do pH do meio líquido na produção da substância bioativa. As culturas foram incubadas a 25°C em garrafas de Roux, em estufa BOD por 20 dias e os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3.2.4. Confirmação da produção da substância bioativa pela estirpe fúngica:

O teste de difusão foi realizado para confirmar se a estirpe fúngica, ao longo dos experimentos, continuava produzindo a substância ativa. Discos de micélio recém cultivado em ABD foram colocados sobre as bactérias-teste semeadas em ágar Müeller-Hinton. Este teste foi executado contra seis estirpes bacterianas: três Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 - American Type Culture Collection, *Bacillus cereus* ATCC 11778 e *Micrococcus* sp.) e três Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048). As culturas foram incubadas por 24 horas em duas temperaturas, 25°C e 37°C, para avaliar a influência da temperatura de incubação na atividade antimicrobiana da substância bioativa. As leituras foram feitas medindo-se o halo de inibição em milímetros. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3.2.5. Cultivo do fungo em meio sólido:

Como a estirpe fúngica deixou de apresentar atividade antibacteriana quando cultivada em meio líquido, as culturas passaram a ser realizadas nos meio sólidos ADB e MNM, para avaliar se a mudança da consistência do meio de cultura influenciaria na produção da substância bioativa. A cultura fúngica foi primeiramente inoculada em placas de Petri contendo meio ABD. Após dez dias de crescimento em estufa BOD a 25°C, três discos de micélio de aproximadamente 7 mm de diâmetro, feitos com cortador estéril, foram transferidos para placas de Petri contendo ágar MNM. As culturas foram mantidas por 20 dias, em estufa à 25°C.

4.4. Obtenção de extratos a partir da biomassa:

Os metabólitos secundários presentes na biomassa obtida no item anterior, foram extraídos utilizando-se metanol.

A decisão de se utilizar o metanol como solvente na obtenção dos extratos deve-se ao fato de que extratos metanólicos de cogumelos mostram maior atividade antioxidante e teores mais elevados de metabólitos bioativos em relação a outros solventes (Shu & Lung, 2008).

Seguiu-se a evaporação do solvente com o auxílio de um evaporador rotatório e o balão contendo o resíduo foi deixado em dessecador sob vácuo por seis horas para evaporação total dos líquidos presentes. Posteriormente esse resíduo foi pesado e dissolvido em hidróxido de amônio (NH₄OH). Essa suspensão foi utilizada nos testes de detecção de atividade antimicrobiana (Smânia et al., 1999; Smânia et al., 1995a).

Os experimentos foram realizados em triplicata. À medida que os extratos foram sendo obtidos, foram armazenados em freezer (-20°C). Após a última extração, todos os extratos foram testados quanto à presença de atividade antibacteriana através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

4.4.1. Avaliação da estabilidade dos extratos:

Para verificar a estabilidade das substâncias bioativas presentes nos extratos os mesmos foram mantidos, imediatamente após a obtenção, em câmara de dessecação, sob vácuo e a temperatura ambiente. A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada imediatamente a extração e então a cada 5 dias até que ocorresse a perda de pelo menos 20% de seu potencial (Cleeland e Grunberg, 1986). A atividade antibacteriana foi avaliada através da determinação da CIM.

4.5. Atividade antimicrobiana dos extratos:

4.5.1. Microrganismos-teste:

As seguintes estirpes bacterianas foram utilizadas para os testes de atividade antimicrobiana: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus* sp., *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. As bactérias são mantidas em caldo BHI a -20 °C, no Laboratório de Antibióticos (Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – Universidade Federal de Santa Catarina).

4.5.1.1. Obtenção dos inóculos bacterianos:

Os inóculos bacterianos foram preparados a partir da transferência 300 µL de cada cultura-estoque para 3 mL de caldo BHI, e

incubados durante 24 horas a 36 °C. A pureza das culturas bacterianas foi verificada após 8 horas de incubação através de semeadura em meio ágar sangue. A concentração das suspensões foi ajustada com caldo de cultivo para a turvação correspondente a 10^7 UFC/mL (Souza et al. 2005).

4.5.2. Teste de difusão:

Para detecção da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos, foi utilizado inicialmente o teste de difusão. Para esse teste, o inóculo bacteriano foi semeado em toda a superfície de placas de Petri contendo meio ágar Müeller-Hinton com a ajuda de um swab estéril. Os extratos fúngicos obtidos no item 8 foram dissolvidos e diluídos em DMSO e/ou NH_4OH até a concentração final de 100 mg/mL. Dessa suspensão, 100 μL foram aplicados em orifícios de 7 mm de diâmetro, previamente feitos no ágar. Os sistemas foram incubados por 24 horas a 36 °C em estufa bacteriologia e sob condições aeróbicas. Após o período de incubação, as placas foram observadas quanto à homogeneidade do crescimento bacteriano e nos casos em que foi verificada a inibição do crescimento bacteriano o diâmetro dos halos foi medido em milímetros. O mesmo solvente usado para dissolver os extratos fúngicos foi utilizado como controle (Valgas et al., 2007). Após os testes de difusão, os extratos que apresentaram maior atividade antimicrobiana foram selecionados para a caracterização dos metabólitos presentes.

4.5.3. Determinação da concentração inibitória mínima:

A atividade antimicrobiana dos extratos obtidos foi determinada quantitativamente através da concentração inibitória mínima (CIM), pelo método de microdiluição em caldo. Os extratos foram dissolvidos em DMSO, previamente esterilizado em autoclave. Posteriormente, foram preparadas diluições seriadas em concentrações variando entre 20 mg/mL e 0,078 mg/mL, que foram distribuídas em volumes de 100 μL em placa de microdiluição de 96 poços. Como controle positivo foi utilizada apenas a mistura de caldo de cultura e inóculo bacteriano, e como controle negativo, foi utilizada a mistura de caldo de cultura e extrato dissolvido. Em cada orifício-teste e controle positivo foram adicionados 5 μL de inóculo bacteriano. Os experimentos foram desenvolvidos em duplicata e as placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C. A leitura dos experimentos, sempre que possível, foi realizada através da densidade óptica (DO) com uso de leitora de ELISA (modelo CLX800-BioTek Instruments, Inc.). Nos casos em que a turvação e a coloração do produto natural interferiram na leitura da DO, foi utilizado 20 μL de revelador de crescimento bacteriano, o INT. A concentração inibitória mínima foi considerada a menor concentração de

extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano. O resultado foi expresso em mg/mL (Souza et al., 2005).

4.5.4. Cinética de produção da substância ativa:

A biomassa obtida no item 3.2.3 e os conseqüentes extratos (item 4) foram testados quanto à atividade antibacteriana através da determinação da concentração inibitória mínima, com o objetivo de avaliar a cinética de produção das substâncias bioativas.

4.6. Caracterização química dos extratos obtidos:

Os principais componentes dos extratos obtidos a partir de culturas de *Antrodia albida* foram identificados através de análises por cromatografia gasosa (CG) acoplada a espectrometria de massa (EM), realizadas no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As análises foram realizadas utilizando CG – EM/EM (CG – Varian 3800, EM/EM – Varian 1200L) em coluna Zebron ZB – 5HT (30 m x 0,25 mm, 0,10 µm) (Phenomenex, Torrance, CA).

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas utilizando injeção fracionada (split-mode), com o injetor a uma temperatura de 300°C. A velocidade de fluxo para o gás de arraste (hélio) foi de 1mL/min. A temperatura inicial da coluna foi de 50°C, mantida por 1 minuto, com velocidade de aquecimento de 6°C/min até 300°C, e mantida novamente por 5 minutos. O espectro de massa foi obtido por impacto de elétrons (EI) a 70 eV, e a escala de massa foi de 40 a 70 m/z.

Os componentes dos extratos foram identificados por comparação dos resultados das análises por espectrometria de massa com os espectros disponíveis no banco de dados de produtos naturais “Standart Reference Data Series” do “National Institute of Standart and Technology” (NIST – Mass-Spectral Library with Windows search program – Version 2), onde os resultados da espectrometria de massa foram comparados (Michielin et al., 2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Escolha do meio de cultura para produção de biomassa

Os valores de peso seco, peso do extrato obtido e halo de inibição de crescimento bacteriano são apresentados na tabela 3. De acordo com os dados apresentados na tabela 3, os meios PGKM e CEM proporcionaram a maior produção de biomassa pelo fungo. Porém, o meio selecionado para a produção de biomassa foi o caldo de Melin-Norkrans modificado (MNM), uma vez que este foi o único meio cujos extratos apresentaram atividade inibitória contra as duas espécies bacterianas testadas.

Tabela 3: Avaliação da produção de biomassa e da atividade antimicrobiana de *Antrodia albida* cultivada em quatro meios diferentes.

Meios de cultura	Percentual de peso seco	Peso do extrato (mg)	Atividade antibacteriana	
			<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
PGKM	16,45*	46,3	-	11**
MNM	15,75	82,16	12	19
CEM 1	19,6	66,03	10	19
CBD 1	9,65	37,9	-	11

*Média de 3 repetições.

**Média dos halos de inibição do crescimento bacteriano em milímetros.

As figuras 4 e 6 ilustram os halos de inibição gerados pela ação dos extratos fúngicos a partir do meio MNM sobre as duas espécies bacterianas, em contraste com a atividade inócua do solvente usado (metanol) para a dissolução dos extratos (figura 5).



Figura 4: Halos de inibição dos extratos fúngicos obtidos em meio MNM, contra *S. aureus*.

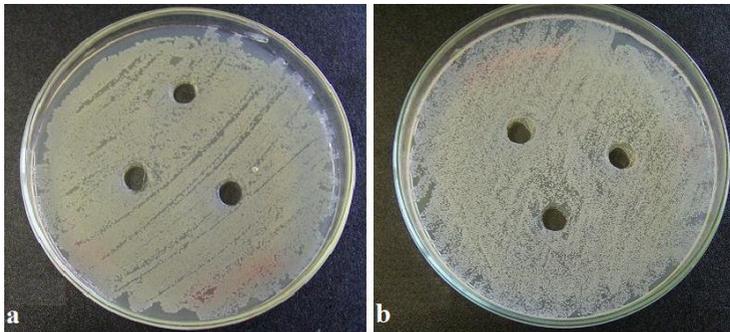


Figura 5: Controles do solvente utilizado (metanol) para as duas bactérias testadas, *E. coli* (a) e *S. aureus* (b).

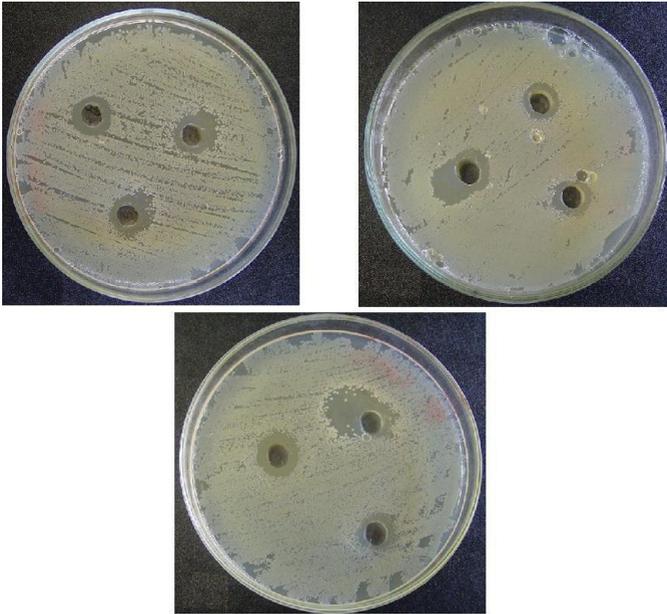


Figura 6: Halos de inibição dos extratos fúngicos obtidos em meio MNM, contra *E. coli*.

5.2. Cinética do crescimento fúngico e da produção da substância ativa

A cultura fúngica cultivada em caldo MNM apresentou pouca produção de biomassa nos 10 primeiros dias de crescimento (figura 7). Isso já era esperado, pois em estudos anteriores, esta estirpe fúngica, em meio sólido, teve seu maior desenvolvimento a partir da segunda semana de observações (Bekai, 2007).

O aumento significativo da biomassa fúngica foi observado entre o 10^o e o 15^o dia, passando de 1,16 a 5,58 gramas de biomassa fresca produzida (figura 7). Após o 15^o dia, a cultura manteve seu crescimento estável, até o 30^o dia. Esses dados sugerem portanto que, o período ideal de crescimento para obtenção de biomassa para esta estirpe é de pelo menos 15 dias.

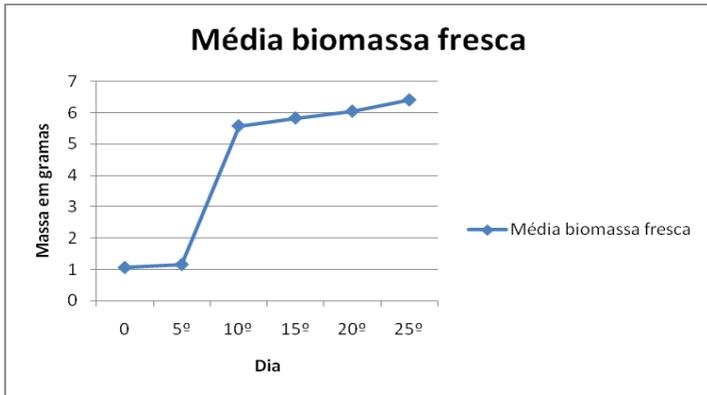


Figura 7: Curva de crescimento da estirpe fúngica em relação à biomassa fresca produzida.

O peso seco obtido a partir do micélio produzido pela estirpe fúngica também aumentou consideravelmente a partir do 10º dia de incubação (figura 8).

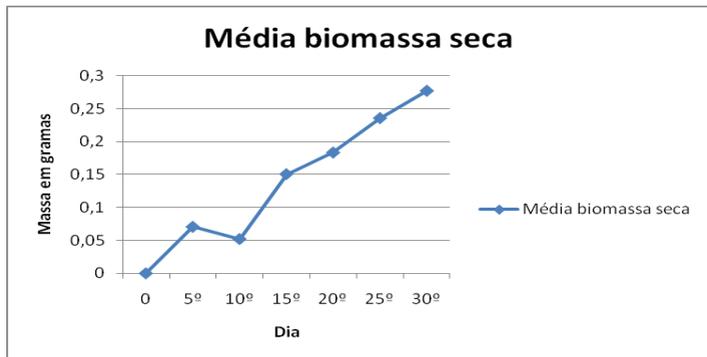


Figura 8: Peso seco produzido pela estirpe fúngica durante o período de cultivo.

Na figura 9 são apresentadas as médias das massas dos extratos obtidos durante o período de cultivo do micélio.

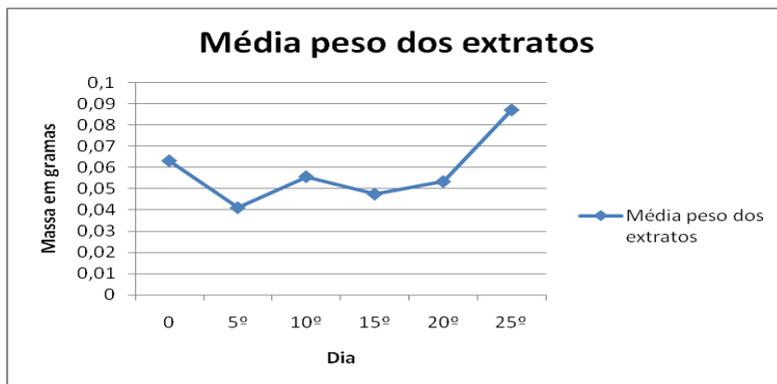


Figura 9: Média das massas os extratos produzidos pela estirpe fúngica durante o cultivo.

Como se pode observar na figura 9, o extrato gerado a partir da biomassa não seguiu o mesmo padrão apresentado para o crescimento fúngico. Constatou-se que no final do período de observação (30º dia) obteve-se a maior quantidade tanto de extrato (figura 9) quanto de biomassa produzida pela estirpe fúngica (figuras 7 e 9).

5.3. Atividade antibacteriana dos extratos obtidos

A concentração inibitória mínima dos extratos para *S. aureus*, foi superior a 20 mg/ml e para *E. coli*, inferior a 0,078 mg/ml. Como o esperado para produtos naturais é uma ação inversa, ou seja, o extrato ser mais ativo contra bactérias Gram-positivas do que contra Gram-negativas, foi determinada qual a maior concentração de DMSO (que foi usado como veículo do extrato nos testes) era inócua às duas espécies.

Foi observado que até a concentração de 25%, o DMSO não interferiu no crescimento de *S. aureus*, porém foi ativo contra *E. coli* (dados não mostrados). Assim, o DMSO passou a ser utilizado na concentração de 1% e sempre que possível, foi substituído por hidróxido de amônia (NH₄OH) à 0,1N. O DMSO e o NH₄OH na concentração informada acima não interferem no crescimento das espécies bacterianas utilizadas no experimento, porém, os extratos deixaram de apresentar atividade antimicrobiana pela técnica de microdiluição. Entretanto, os extratos continuaram a ser ativos quando testados através do teste de difusão.

Os resultados frustrados referentes a não detecção de atividade antibacteriana dos extratos pela técnica de microdiluição pode estar

relacionada com algumas hipóteses que explicariam a baixa produção de substância ativa:

- As substâncias bioativas presentes nos extratos podem ser instáveis, e nos poços das placas de microdiluição estão mais expostas ao contato com o oxigênio do que quando difundem em meio sólido durante o teste de difusão;

- A estirpe fúngica utilizada para obtenção dos extratos pode ter se adaptado às condições de cultivo mantidas em laboratório, ou necessitaria de condições específicas (variação de temperatura, pH ou umidade, etc.) para a produção de uma maior quantidade do metabólito secundário com atividade biológica. O pH do meio de cultura é um parâmetro do processo de fermentação e pode influenciar significativamente a fisiologia de microrganismos em culturas submersas. Alterações no pH podem afetar o rendimento de compostos bioativos produzidos pelo organismo e a atividade dos extratos. Baixos valores de pH favorecem o crescimento celular, porém valores mais altos favorecem a produção de substâncias ativas, sugerindo que culturas com pH superior facilitariam o transporte de metabólitos do micélio para o caldo de cultivo, resultando em baixos níveis intracelulares do metabolito e altos níveis deste no filtrado (Shu e Lung, 2008). A temperatura é outro importante parâmetro de cultivo e também pode influenciar a produção de compostos bioativos. Segundo Smânia e colaboradores (1997) a temperatura ótima de cultivo de *cinabarina* pelo basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus* é de 25°C. Já a biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados pelo zigomiceto *Mortierella alpina* é ótima entre 18°C e 20°C (Linderberg e Molin, 1993; Jang et al., 2000).

- ou, mesmo mantida sob condições específicas em laboratório, a estirpe fúngica pode produzir determinada substância de maneira cíclica, o que seria determinado geneticamente.

5.3.1. Estabilidade dos constituintes dos extratos obtidos

Como a oxidação pelo oxigênio atmosférico era uma das possíveis causas da diminuição da atividade das substâncias contidas nos extratos, estes foram testados logo após a sua obtenção, apresentando resultados positivos com relação à atividade antimicrobiana. Embora os extratos tenham sido armazenados sob vácuo, os mesmos mantiveram a atividade somente até o 10º dia.

Esses dados corroboram com os resultados encontrados por Smânia e colaboradores (1995b) quando avaliaram a estabilidade dos extratos obtidos a partir do basidiomiceto *P. sanguineus*. Segundo os autores, os extratos deste fungo também se apresentavam instáveis na

presença de oxigênio, mantendo sua atividade biológica apenas quando armazenados sob vácuo.

5.3.2. Influência da temperatura na atividade da substância bioativa

Como pode ser observado na tabela 4, a estirpe fúngica exerceu antibiose contra estirpes bacterianas Gram-positivas, nas duas temperaturas em que os experimentos foram desenvolvidos, sendo que a 25°C foi ativa também contra a espécie bacteriana Gram-negativa, *P. aeruginosa*.

Tabela 4: Médias dos halos de inibição do crescimento bacteriano gerado por discos de micélio, em duas temperaturas de incubação.

Bactérias	37°C	25°C
<i>S. aureus</i>	16*	14
<i>B. cereus</i>	12	16
<i>Micrococcus sp.</i>	15	18
<i>E. coli</i>	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	16
<i>E. aerogenes</i>	-	-

*Média de 3 repetições, expressas em milímetros.

5.3.3. Influência do pH na produção da substância bioativa

Os extratos obtidos tanto a partir de micélio cultivado em pH 4.0 quanto em pH 7.0 não apresentaram atividade antibacteriana em sucessivos experimentos realizados. Dessa forma o cultivo do fungo passou a ser realizado em meio sólido no qual o pH foi de aproximadamente 5.5.

5.3.4. Cultivo em meio sólido

Como o fungo passou a expressar as substâncias bioativas em baixas concentrações quando cultivado em meio líquido (atividade detectada pelo teste de difusão), passou-se a cultivar o fungo em meio sólido e a partir desse micélio, obter os extratos. Assim, nos testes de microdiluição, os extratos obtidos a partir de meio ABD foram ativos contra *S. aureus* e *E. coli*, enquanto que os extratos obtidos a partir de micélio cultivado em ágar MNM apresentaram atividade somente para a estirpe Gram-positiva (tabela 5 e figura 10).

Tabela 5: Concentração inibitória mínima dos extratos obtidos a partir do micélio cultivado em meio ABD e ágar MNM contra duas estirpes bacterianas.

Bactérias	ABD	Ágar MNM
<i>S. aureus</i>	10 mg/ml	20 mg/ml
<i>E. coli</i>	20 mg/ml	-

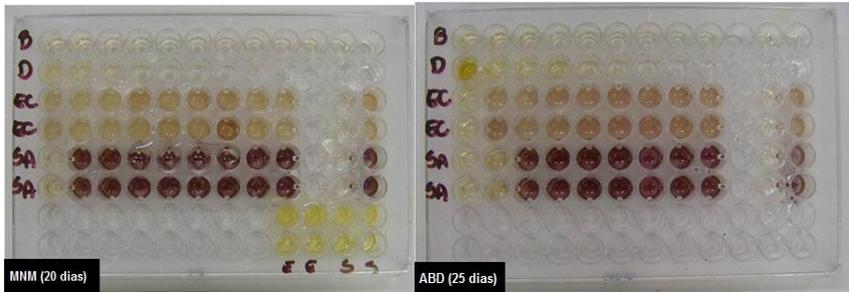


Figura 10: Avaliação da CIM dos extratos obtidos a partir de meio sólido. As linhas nomeadas com EC correspondem aos poços inoculados com *E. coli*. As linhas nomeadas com SA correspondem aos poços inoculados com *S. aureus*. A penúltima coluna é o controle negativo, a última coluna o controle positivo. A cor avermelhada indica crescimento bacteriano.

Conforme já havia sido observado a partir de culturas fúngicas em meio líquido, a atividade antimicrobiana, quando avaliada por teste de difusão apresentou-se mais proeminente, demonstrando atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (tabela 6 e figura 11).



Figura 11: Halos de inibição dos extratos fúngicos obtidos em meios sólidos ABD e MNM contra *S. aureus* e *E. coli*.

Tabela 6: Médias dos halos de inibição do crescimento bacteriano produzidos pelos extratos fúngicos obtidos a partir de meios sólidos.

Bactérias	ABD	Agar MNM
<i>S. aureus</i>	21*	18
<i>E. coli</i>	20	19

*Média de 3 repetições expressa em milímetros.

5.4. Caracterização química dos extratos

Um total de 17 substâncias de diferentes classes químicas foram separadas e identificadas através da análise por GC-MS dos extratos de *A. albida*. Na figura 12 é apresentado o cromatograma do extrato metanólico obtido a partir de micélio cultivado em ágar batata dextrose (ABD).

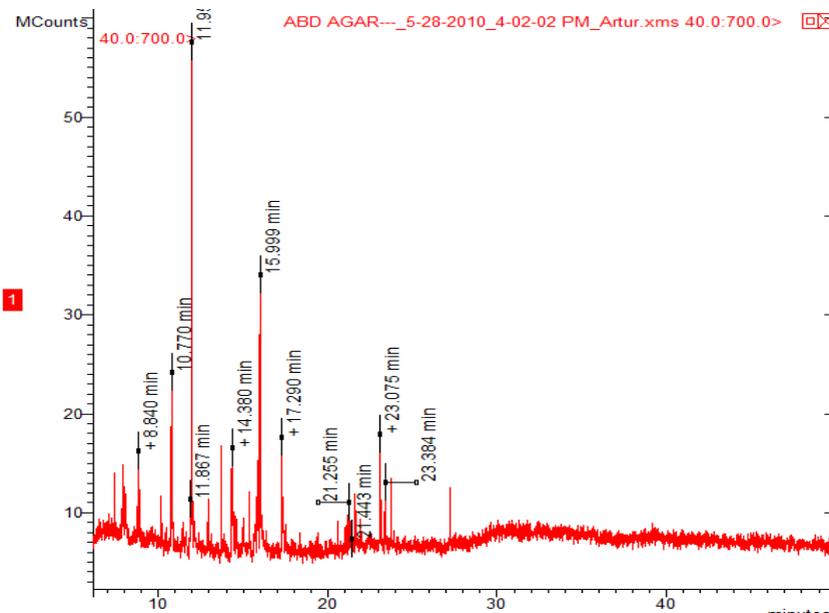


Figura 12: GC-MS de extratos metanólicos de *A. albida* obtidos a partir de meio sólido ABD.

A figura 13 mostra o espectro do extrato metanólico obtido a partir de micélio cultivado em ágar Melin-Norkrans modificado (MNM). Os dois cromatogramas foram comparados a fim de analisar o perfil das substâncias químicas mais abundantes presentes nos extratos

obtidos a partir do micélio cultivado nos dois meios (ABD e ágar MNM) (tabela 7).

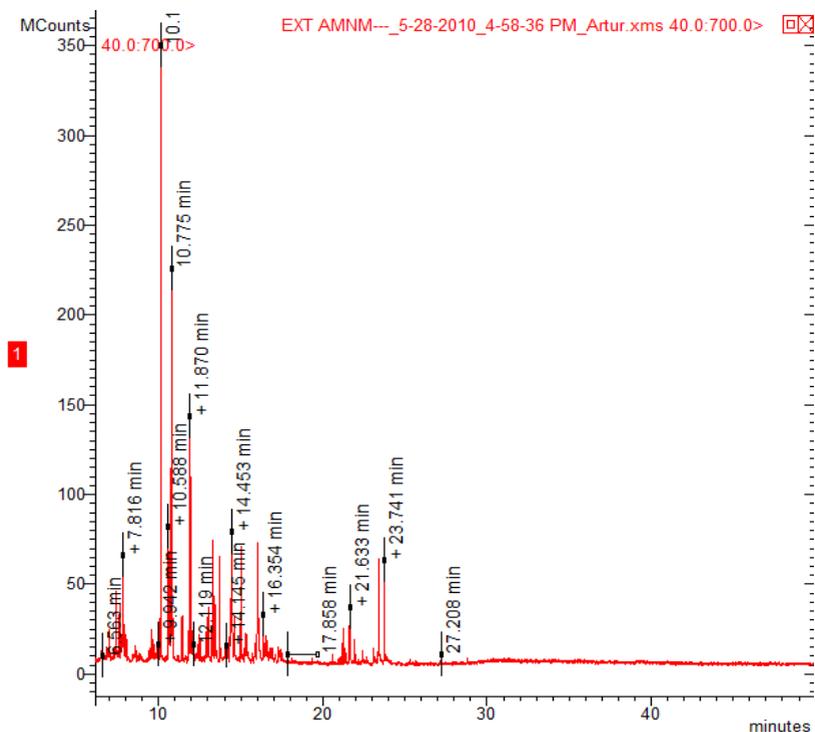


Figura 13: GC-MS de extratos metanólicos de *A. albida* obtidos a partir de meio sólido MNM.

Tabela 7: Tempo de retenção dos compostos identificados de extratos de micélio cultivados em meio ABD e em meio ágar MNM e seus respectivos nomes.

Tempo de retenção*		Substância
Extrato ABD	Extrato MNM	
6.464	-	2(5H)-furanona
7.413	7.413	5-metil, 2-furancarboxaldeído
11,961	11.969	5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldeído
15.996	-	D-allose
-	16.038	1,6 anidro – β – D – glicopirranose
23.729	23.739	ácido octadecanóico

Algumas das substâncias produzidas em maior concentração pela estirpe fúngica estão relacionadas com diferentes atividades biológicas e importância econômica.

A 2(5H) furanona, ou furanona, foi identificada no extrato metanólico obtido a partir do cultivo em meio ABD. Na literatura, tem sido descrita a atividade de furanonas na inibição de Quorum Sensing (QS) contra uma ampla gama de N-acil homoserina-lactonas (AHL) e também na inibição da formação de biofilmes. Acredita-se que estes compostos atuam como um agente potencial de inibição de QS em uma comunidade bacteriana formadora de biofilme. As furanonas atuam mimetizando o sinal das AHLs, provavelmente ocupando o sítio de ligação da proteína regulatória, tornando-o altamente instável e então resultando na rápida interrupção da regulação do QS mediada por gene (Ponnusamy et al., 2010, Ndagijimana et al., 2006) (tabela 7).

O 5-metil-2-furancarboxaldeído, também conhecido, entre outros sinônimos, como furfural e/ou metilfurfural (NIST, 2010; NCBI, 2010). É uma substância frequentemente encontrada em alimentos processados e é formado durante tratamentos térmicos ou armazenamento sob temperaturas inapropriadas, através de uma reação conhecida como Reação de Maillard (Yuan & Chen, 1998; Ramírez-Jiménez et al., 2000; Albalá-Hurtado et al., 1997). O furfural é também um dos mais importantes subprodutos, em termos de concentração, formado a partir da hidrólise da lignina e da celulose. Os efeitos do furfural em diferentes estirpes de leveduras, incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, têm sido estudados por diversos autores, observando-se que este diminui a viabilidade das leveduras, a sua taxa de crescimento e de fermentação. A presença de furfural nas rotas metabólicas de leveduras pode explicar a sua presença nos extratos analisados, pois ambos os organismos pertencem ao Reino Fungi. No entanto, o mecanismo inibitório do furfural não está totalmente esclarecido (Hristozova et al., 2008; Taherzadeh, et al., 2000; Boyer et al., 1992; Sanchez e Bautista, 1988). A presença de furfural foi observada nos extratos metanólicos obtidos a partir do micélio cultivado em ambos os meios (ABD e ágar MNM) (tabela 7).

O 5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldeído ou hidroximetilfurfural (HMF) é um aldeído cíclico formado pela decomposição ácida de monossacarídeos. Assim como o furfural, também está relacionado à inibição do metabolismo oxidativo e fermentativo de leveduras, porém em menor escala. É um intermediário de interesse industrial, importante para a produção de plásticos, polímeros e combustíveis (Teixidó et al.,

2006; Silva et al., 2008; Melo et al., 2003; Ohara et al., 2010). Foi observado nos extratos ABD e nos extratos MNM (tabela 7).

Presente no extrato ABD (tabela 7) a D-allose é um açúcar raro, presente em quantidades mínimas na natureza. Os efeitos biológicos dos açúcares raros não têm sido investigados em detalhes, em parte porque eles são de difícil obtenção e em parte porque a síntese é laboriosa, demorada e muitas vezes ineficiente. Dentre os açúcares raros, a D-allose tem sido estudada em relação à sua atividade biológica. O efeito imunossupressor da D-allose em experimentos de transplante de fígado, em comparação com o de FK506, um potente imunossupressor usado freqüentemente, tem sido observado. O efeito inibitório da D-allose sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) também tem sido relatado. Recentemente foi demonstrado o efeito inibitório da D-allose sobre cinco diferentes linhagens de células cancerosas, e este glicosídeo também se mostrou eficaz na supressão da proliferação da linhagem MOLT-4F de células leucêmicas (Hirata et al., 2009; Yokohira et al., 2008). Estes resultados sugerem que a D-allose pode ser benéfica no tratamento do câncer ou no uso preventivo em pacientes de risco, fato que estimula o estudo da atividade anticarcinogênica de *A. albida*.

A 1,6 anidro - β - D - glicopirranose ou levoglucosano tem grande potencial industrial. Pode ser utilizado na fabricação de plásticos, surfactantes, explosivos, propelentes e resinas e como substituto de baixo custo do sorbitol (Lakshmanan et al., 1969; Ohara et al., 2010). Foi identificado apenas no extrato obtido em meio MNM (tabela 7).

A sexta substância identificada nos extratos metanólicos ABD e MNM é o ácido esteárico, ácido octadecanóico ou vanicol, um ácido graxo saturado, de cadeia longa, formado por 18 átomos de carbono. Estudos em humanos e em animais experimentais têm sugerido que a ingestão de ácido esteárico proporciona a diminuição dos níveis de colesterol. Além disso, o ácido esteárico tem ação sobre o processo de coagulação resultando na diminuição do risco de ocorrência de trombozes. O ácido esteárico também tem sido estudado devido a sua atividade neuroprotetora, já que possui capacidade de proteger fatias de córtex e hipocampo contra danos causados por peróxido de hidrogênio e pela privação de oxigênio e glicose. Este composto também apresenta atividade hepatoprotetora, que está intimamente ligada ao seu potencial antiinflamatório (Pan et al., 2010; Wang et al., 2006).

6. CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos nesse trabalho revelam que o basidiomiceto da espécie *Antrodia albida* apresenta discreta atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Também se observou que os extratos metanólicos obtidos a partir do micélio deste fungo, em diferentes condições de cultivo, são quimicamente instáveis, perdendo sua atividade biológica.

Os experimentos também evidenciaram que as substâncias bioativas presentes nos extratos são secretadas para o meio, ou seja, são compostos extracelulares.

As análises químicas realizadas identificaram um total de 17 diferentes compostos presentes nos extratos testados, e 6 destes compostos apresentaram registros sobre atividades biológicas e importância econômica na literatura consultada.

Dentre as principais atividades biológicas apresentadas pelos compostos identificados estão: efeito imunossupressor, efeito supressor da proliferação de linhagens de células cancerosas, diminuição dos níveis de colesterol, atividade neuroprotetora e hepatoprotetora, atividade antiinflamatória, atividade inibitória de Quorum Sensing e formação de biofilmes.

7. REFERÊNCIAS:

ALBALÁ-HURTADO, S.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M. C. Determination of free and total furfural compounds in infant Milk formulas by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45(6): 2128-2133, 1997.

AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**, Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2003. p. 23, 71.

BARRETT, J. F. Can biotech deliver new antibiotics? **Current Opinion in Microbiology**, 8: 498-503, 2005.

BEABER, J. W.; HOCHHUT, B.; WALDOR, M. K. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. **Letters to Nature**, 427: 72-74, 2004.

BEKAI, L. H. **Estudo biológico e aplicado de culturas dicarióticas de Basidiomycetes em Santa Catarina, Brasil**. 2007. 55 f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BEREZKIN, V. G. VIKTOROVA, E. N. Changes in the basic experimental parameters of capillary gas chromatography in the 20th century. **Journal of Chromatography A**, 985: 3–10, 2003.

BOYER, L. J. KLASSON, K. T.; CLAUSEN, E. C.; GADDY, J. L. The effects of furfural on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biomass and Bioenergy**, 3 (1): 41-48, 1992.

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

BUTLER, M. S.; BUSS, A. D. Natural products – The future scaffolds for novel antibiotics? **Biochemical Pharmacology**, 71: 919-929, 2006.

CIRZ, R. T.; CHIN, J. K.; ANDES, D. R.; CRÉCY-LAGARD, V.; CRAIG, W. A.; ROMESBERG, F. E. Inhibition of Mutation and Combating the Evolution of Antibiotic Resistance. **PLoS Biology**, 3(6): 1024-1033, 2005.

CLARDY, J.; FISCHBACK, M. A.; WALSH, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature Biotechnology**, 24 (12): 1541-1550, 2006.

CLEELAND, R.; GRUNBERG, E. Laboratory evaluation of new *antibiotics in vitro* and in experimental animal infection. In: LORIAN, V. (org.). **Antibiotics in Laboratory Medicine**. London: Williams and Wilkins, 1986. p. 825-876.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**, 4a Ed., Campinas: Editora da Unicamp, 1990. p. 143.

CORRÊA, J. C. **Antibióticos no dia-a-dia**, 3^a Ed., Rio de Janeiro: Livraria e Editora Rubio, 2004. p. 5-6.

DENYER, S. P.; MAILLARD, J. -Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, 92: 35-45, 2002.

DONADIO, S.; CARRANO, L.; BRANDI, L.; SERINA, S.; SOFFIENTINI, A.; RAIMONDI, E.; MONTANINI, N.; SOSIO, M.;

GUALERZI, C. O. Targets and assays for discovering novel antibacterial agents. **Journal of Biotechnology**, 99 (3): 175-185, 2002.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Introdução. In: _____ (org.). **FUNGOS, uma introdução á biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS-Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2004. p. 9-11.

FIALKOV, A. B.; STEINER, U.; JONES, L.; AMIRAV, A. A new type of GC-MS with advanced capabilities. **International Journal of Mass Spectrometry**, 251 (47-58), 2006.

FIALKOV, A. B.; STEINER, U.; LEHOTAY, S. J.; AMIRAV, A. Sensitivity and noise in GC-MS: Achieving low limits of detection for difficult analytes. **International Journal of Mass Spectrometry**, 260 (31-48), 2007.

FRANKLIN, T. J.; SNOW, G. A. **Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action**, 6th Ed., New York: Springer Science + Business Media, Inc., 2005. p. 85-105.

GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (org.). **FUNGOS, uma introdução á biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS-Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2004. p. 125-169.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, 12: 306-317, 2008.

GOLD, H. S.; MOELLERING, R. C. Jr. Antimicrobial-drug resistance. **The New England Journal of Medicine**, 335: 1445-1453, 1996.

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

GREEN III, F.; HIGHLEY, T. L. Mechanism of brown-rot decay: Paradigm or Paradox. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 39 (2-3):113-124, 1997.

GUZMÁN-BLANCO, M.; MEJÍA, C.; ISTURIZ, R.; ALVAREZ, C.; BAVESTRELLO, L.; GOTUZZO, E.; LABARCA, J.; LUNA, C. M.; RODRÍGUEZ-NORIEGA, E.; SALLES, M. J. C.; ZURITA, J.; SEAS, C. Epidemiology of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 34: 304 – 308, 2009.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, 13(19/20): 894-901, 2008.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, 5(7): 294-300, 2000.

HIRATA Y.; SAITO, M.; TSUKAMOTO, I.; YAMAGUCHI, F.; SUI, L.; KAMITORI, K.; DONG, Y.; UEHARA, E.; KONISHI, R.; JANJUA, N.; TOKUDA, M. Analysis of the inhibitory mechanism of D-allose on MOLT-4F leukemia cell proliferation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 107 (5): 562-568, 2009.

HRISTOZOVA, T.; GOTCHEVA, V; TZVETKOVA, B.; PASKALEVA, D.; ANGELOV, A. Effect of furfural on nitrogen assimilating enzymes of the lactose utilizing yeasts *Candida blankii* 35 and *Candida pseudotropicalis* 11. **Enzyme and Microbial Technology**, 43: 284-288, 2008.

JANG, H. D.; LIN, Y. Y.; YANG, S. S. Polyunsaturated fatty acids production with *Mortierella alpine* by solid substrate fermentation. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, 41: 41-48, 2000.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. A. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**, 9th Ed., Wallingford, CAB International, UK, 655p, 2001.

KUEK, C. Shake-flask culture of *Laccaria laccata*, an ecto-mycorrhizal basidiomycete. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 45: 319-326, 1996.

KUO, M. C.; CHANG, C. Y.; CHENG, T. L.; WU, M. J. Immunomodulatory effect of *Antrodia camphorata* mycelia and culture filtrates. **Journal of Ethnopharmacology**, 120: 196-203, 2008.

LAKSHMANAN, C. M.; GAL-OR, B.; HOELSCHER, H. E. Production of levoglucosan by pyrolysis of carbohydrates. **Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development**, 8 (3): 261-267, 1969.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, 15 (6): 279-289, 2007.

LAMBERT, P. A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positives bacteria and mycobacteria. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, 92: 46-54, 2002.

LANCINI, G.; LORENZETTI, R. **Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites**. New York: Plenum Press, 1993, p. 1-3.

LEE, I., HUANG, R., CHEN, C., CHEN, H., HSU, W. AND LU, M. *Antrodia camphorata* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effect. **FEMS Microbiology Letters**, 209: 63-67, 2002.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine Supplement**, 10 (12): 122-129, 2004.

LINDERBERG, A. M.; MOLIN, G. Effect of temperature and glucose supply on the production of polyunsaturated fatty acids by the fungus *Mortierella alpina* CBS 346.66 in fermentor cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 39: 450-455, 1993.

MARTIN, G. Nature pharmacy: mushroom proponent finds interesting rising; many germ-busting fungi hold promise for medicine. **San Francisco Chronicle**. Nov, 2001. <http://www.sfgate.com/cgi-bin/article.cgi?f=/c/a/2001/11/25/MN14732.DTL>, acessado em 24/04/2010.

MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, 59: 153-163, 1969.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Practical approaches to fast gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1000: 153-180, 2003.

MAU, J. L.; HUANG, P. N.; HUANG, S. J.; CHEN, C.C. Antioxidant properties of methanolic extracts from two kinds of *Antrodia camphorata* mycelia. **Food Chemistry**, 86: 25-31, 2004.

MELO, Z. F. N.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. C. Estudo das alterações do hidroximetilfurfural e da atividade diastásica em méis de abelha em diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 5 (1): 89-99, 2003.

MICHIELIN, E. M. Z.; SALVADOR, A. A.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA Jr., A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, 100 (6615-6623), 2009.

MIGLIORI, G. B.; RICHARDSON, M. D.; SOTGIU, G.; LANGE, C. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in the West. Europe and United States: epidemiology, surveillance, and control. **Clinics in Chest Medicine**, 30 (4): 637 – 665, 2009.

MISHRA, K.; GANJU, L.; SAIRAM, M.; BANERJEE, P. K.; SAWHNEY, R. C. A review of high throughput technology for the screening of natural products. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 62: 94-98, 2008.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=12097&loc=ec_rcs (acessado em 24/07/2010).

NDAGIJIMANA, M.; VALLICELLI, M.; COCCONCELLI, P. S.; CAPPÀ, F.; PATRIGNANI, F.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M. E. Two 2[5H]-Furanones as Possible Signaling Molecules in *Lactobacillus helveticus*. **Applied And Environmental Microbiology**, 72(9): 6053-6061, 2006.

NETO, V. A.; LEVI, G. C.; LOPES, H. V.; MENDONÇA, J. S.; BALDY, J. L. S. **Antibióticos na prática médica**. 4ª Ed. rev. e ampl., São Paulo: Roca, 1994, p. 2-3.

NIST - National Institute of Standards and Technology. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C620020&Mask=80> (acessado em 24/07/2010).

OHARA, M.; TAKAGAKI, A.; NISHIMURA, S.; EBITANI, K. Syntheses of 5-hydroxymethylfurfural and levoglucosan by selective dehydration of glucose using solid acid and base catalysts. **Applied Catalysis A**, 383: 149-155, 2010.

PAN, P. H.; LIN, S. Y.; OU, Y. C.; CHEN, W. Y.; CHUANG, Y. H.; YEN, Y. J.; LIAO, S. L.; RAUNG, S. L.; CHEN, C. J. Stearic acid attenuates cholestasis-induced liver injury. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 391: 1537-1542, 2010.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy-a guide for students of organic chemistry**, 2nd Ed., Washington: Saunders College Publishing, 1996. p. 306-307

PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products – Can history repeat? **Biochemical Pharmacology**, 71: 981-990, 2006.

PONNUSAMY, K.; PAUL, D.; KIM, Y. S.; KWEON, J. H. 2(5H)-furanone: a prospective strategy for biofouling-control in membrane biofilm bacteria by quorum sensing inhibition. **Brazilian Journal of Microbiology**, 41: 227-234, 2010.

POOLE, K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, 92 : 55-64, 2002.

PUTMAN, M.; VAN VEEN, H. W.; KONINGS, W. N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 64 (4): 672-693, 2000.

RAMÍREZ-JIMÉNEZ, A.; GARCIA-VILLANOVA, B.; GUERRA-HERNANDEZ, E. Hydroxymethylfurfural and methylfurfural content

f selected bakery products. **Food Research International**, 33: 833-838, 2000.

RASSER, F.; ANKE, T.; STERNER, O. Secondary metabolites from a *Gloeophyllum* species. **Phytochemistry**, 54: 511-516, 2000.

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **The American Journal of Cardiology**, 101 (10A): S43-S49, 2008.

ROSA, L. H.; MACHADO, K. M. G.; JACOB, C. C.; CAPELARI, M.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Screening of Brazilian Basidiomycetes for antimicrobial activity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 98 (7): 967-974, 2003.

ROSSI, M. J.; SOUZA, J. A. R.; OLIVEIRA, V. L. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 59: 175-181, 2002.

RUSSEL, A. D. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: Introduction. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, 92: 1-3, 2002.

SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hidroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, 10 (5): 315-318, 1988.

SANDES, A. R. R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética. **Biotechnologia**, 13: 28-32, 2000.

SHEN, C., KUO, Y., HUANG, R., LIN, L., DONG, M., CHANG, T. AND CHOU, C. Studies on the bioactive principles of *Antrodia camphorata*. **Journal of Chinese Medicine**, 14: 247-258, 2003.

SHEN, Y. C.; CHOU, C. J.; WNAG, Y. H.; CHEN, C. F.; CHOU, Y. C.; LU, M. K. Anti-inflammatory activity of the extracts from mycelia of *Antrodia albida* cultured with water-soluble fractions from five different *Cinnamomum* species. **FEMS Microbiology Letters**, 231: 137-143, 2004.

SHU, C. H.; LUNG, M. Y. Effect of culture pH on the antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, 39: 1-8, 2008.

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

SILVA, S. J. N.; SCHUCH, P. Z.; VAINSTEINS, M. H.; JABLONSKI, A. Determinação do 5-hidroximetilfurfural em méis utilizando cromatografia electrocinética capilar micelar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 28 (Supl.): 46-50, 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**, 5th Ed., New York: John Wiley and Sons Inc., 1991. p. 7.

SINGH, S. B.; BARRETT, J. F. Empirical antibacterial drug discovery – Foundation in natural products. **Biochemical Pharmacology**, 71: 1006-1015, 2006.

SMÂNIA, A. J.; SMÂNIA, E. F. A.; CRUZ, F. S.; BENCHETRIT, L. C. Growth and production phases of *Pycnoporus sanguineus*. **Revista de Microbiologia**, 26(4): 302-306, 1995b.

SMÂNIA, A. Jr.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, E. F. A.; CUNEO, R. S. Antibacterial activity of steroidal compounds isolated

from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (Aphylophoromycetideae) fruit body. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 1: 325-330, 1999.

SMÂNIA, A. Jr.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, E. F. A.; GIL, M. L.; BENCHETRIT, L. C.; CRUZ, F. S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, 45 (3): 177-181, 1995a.

SMÂNIA, E. F. A.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, A. Jr.; YUNES, R. A.; CUNEO, R. S. Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. **Fitoterapia**, 74: 375-377, 2003.

SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA, A. Jr.; LOGUERCIO-LEITE, C. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. **Revista de Microbiologia**, 29 (4): 317 - 320, 1998.

SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA, A.; LOGUERCIO-LEITE, C.; GIL, M. L. Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. **Journal Of Chemical Technology And Biotechnology**, 70: 57-59, 1997.

SOUZA, S. M; DELLE-MONACHE, F.; SMÂNIA JÚNIOR, A. Antibacterial activity of coumarins. **Zeitschrift für Naturforschung**, 60c: 693-700, 2005.

SPIZEK, J.; TICHY, P. Some aspects of overproduction of secondary metabolites. **Folia Microbiologica**, 40(1): 43-50, 1995.

STADLER, M.; KELLER, N. P. Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research. **Mycological Research**, 112: 127-130, 2008.

STAMETS, P. Can mushrooms help save the world? **Explore**, 2(2): 153-161, 2006.

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

SUAY, I.; ARENAL, F.; ASENSIO, F. J.; BASILIO, A.; CABELLO, M. A.; DÍEZ, M. T.; GARCÍA, J. B.; GONZÁLES DEL VAL, A.; GORROCHATENGUI, J.; HERNÁNDEZ, P.; PELÁEZ, F.; VICENTE, M. F. Screening of Basidiomycetes for antimicrobial activities. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 78 (2): 129-139, 2000.

TAHERZADEH, M. J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN G. Inhibition effects of furfural on aerobic batch cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* growing on ethanoland/or acetic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 90 (4): 374-380, 2000.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**, 2^a Ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2009. p. 7-8.

TEIXIDÓ, E.; SANTOS, F. J.; PUIGNOU, L.; GALCERAN, M. T. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1135: 85–90, 2006.

TSAI, M. C.; SONG, T. Y.; SHIH, P. H.; YEN, G. C. Antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Food Chemistry**, 104: 1115-1122, 2007.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITÄVAARA, M. Biodegradation of Lignin in Compost Environment: a review. **Bioresourse Technology**, 72 (2): 169-183, 2000.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A.; 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological

determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, 41 (1): 1-17, 1995.

VALGAS, C., SOUZA, S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38 (2): 370-380, 2007.

VIEIRA, G. R. T. Otimização das condições de cultivo de *Polyporus tricholoma* Mont. visando a produção de substâncias antibacteriana. 2005. 120 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

WANG, Z. J.; LI, G. M.; NIE, B. M.; LU Y.; YIN, M. Neuroprotective effect of the stearic aci against oxidative stress via phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Chemico-Biological Interactions**, 160: 80-87, 2006.

WORRALL, J. J.; ANAGNOST, S. E.; ZABEL, R. A. Comparision of wood decay among diverse lignicolus fungi. **Mycologia**, 89 (2): 199-219, 1997.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbiology**, 5 (3): 175-186,2007.

YOKOHIRA, M.; HOSOKAWA, K.; YAMAKAWA, K.; SAOO, K.; MATSUDA, Y.; ZENG, Y.; KUNO, T.; IMAIDA, K. Potential inhibitory effects of D-allose, a rare sugar, on liver preneoplastic lesion development in F344 rat medium-term bioassay. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 105 (5): 545-553, 2008.

YUAN, J. P.; CHEN, F. Separation and identification of furanic compounds in fruit juices and drinks by High-Performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46(4): 1286-1291, 1998.

ZÁRATE, M. S.; GALES, A.; JORDÁ-VARGAS, L.; YAHNI, D.; RELLOSO, S.; BONVEHI, P.; MONTEIRO, J.; CAMPOS-PIGNATARI, A.; SMAYEVSKY, J. Contaminación ambiental durante un brote de enterococo resistente a vancomicina en un hospital de Argentina. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, 25 (8): 508 – 512, 2007.