

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

MARIA MARGARIDA SOUSA ATHAYDE

Cirurgiã-Dentista

**CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
EXTRATOS DE DUAS CEPAS DO FUNGO *Pycnoporus
sanguineus* ORIUNDAS DA AMAZÔNIA**

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP para a obtenção de Título de Doutorado em Odontologia na área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo.

Este exemplar corresponde a versão final da tese defendida pela aluna e orientada pelo Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo.

Assinatura do Orientador

PIRACICABA

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
GARDÊNIA BENOSSI – CRB8/8644 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

At38c Athayde, Maria Margarida Sousa, 1966-
Citoxidade e atividade antimicrobiana de extratos de duas
cepas do fungo *Pycnoporus sanguineus* oriundas da Amazônia /
Maria Margarida Sousa Athayde. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Francisco Carlos Groppo.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Fungos. 2. Purificação. 3. Farmacologia. I. Groppo,
Francisco Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Citotoxicity and antimicrobial activity of extracts of two strains of *Pycnoporus sanguineus* fungus from Amazon region

Palavras-chave em Inglês:

Fungi

Purification

Pharmacology

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Doutor em Odontologia

Banca examinadora:

Francisco Carlos Groppo [Orientador]

Juliana Cama Ramacciato

Rogério Heládio Lopes Motta

Gilson César Nobre Franco

Karina Cogo

Data da defesa: 28-07-2011

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 28 de Julho de 2011, considerou a candidata MARIA MARGARIDA SOUSA ATHAYDE aprovada.

Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS GROPPPO

Profa. Dra. JULIANA CAMA RAMACCIATO

Prof. Dr. ROGÉRIO HELÁDIO LOPES MOTTA

Prof. Dr. GILSON CÉSAR NOBRE FRANCO

Profa. Dra. KARINA COGO

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, pela realização deste sonho e de todos os outros sonhos que me tem proporcionado mesmo os mais secretos.

À minha mãe por ter dedicado sua vida em prol dos filhos, pelo seu exemplo irrepreensível de dignidade, trabalho e por suas orações.

Ao meu muito querido pai, que partiu tão cedo deixando uma saudade enorme em meu coração.

Às minhas filhas, pelo tanto que as amo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo**, pela valiosa orientação, amizade, paciência, apoio e confiança em mim depositada, em todos os momentos desta caminhada.

À **Professora Dra. Sandra Zanotto**, pela amizade e apoio incondicional e sua preciosa colaboração e co-orientação deste trabalho.

Muito Obrigada!

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas**, na pessoa de seu Diretor, **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior** e Diretor Associado **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**.

À Coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em odontologia da área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, por compartilharem conosco os seus conhecimentos científicos contribuindo, para nossa formação acadêmica também pela amizade, fundamental para o crescimento pessoal.

Ao **CBPQA Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias da UNICAMP**, em especial ao **Dr. Adilson Sartoratto**, que gentilmente colaborou com as análises químicas deste trabalho.

À **Universidade do Estado do Amazonas**, meus sinceros agradecimentos aos coordenadores **Prof^a. Dra. Tânia Miranda Chicre Alcantara**, **Prof. Dr. Benedito Taveira dos Santos**, **Prof. Dr. Marcelo Diniz Carvalho**, **Prof. Dr. Jonas Alves de Oliveira**.

À **Universidade Federal de Santa Catarina**. Meus sinceros agradecimentos à **Prof^a. Dra. Claudia Oliveira Simões** do Centro de Ciências Farmacêuticas, por sua preciosa colaboração nesta pesquisa.

Aos funcionários da área de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, que com sua eficiência e competência funcional nos ajudavam no dia a dia, transcendendo muitas vezes

suas obrigações funcionais, sendo verdadeiros amigos de todos quantos ali necessitam desenvolver suas atividades.

Às secretárias dos cursos de pós-graduação nas pessoas de **Érica A. Pinho Sinhoreti** e **Raquel Q. Marcondes César Sacchi** pelo respeito, presteza e eficiência.

À amiga-irmã **Dolores Fonseca** por ter sempre uma palavra de otimismo e um espírito incansavelmente ajudador e por sempre dar prova de verdadeira amizade.

Às colegas do programa de pós-graduação em Farmacologia em especial **Luciana Berto, Sonia Fernandes e Andrezza Begnani**, obrigada por toda por ajuda!

Aos colegas do programa de **Mestrado em Biotecnologia, MBT-UEA**, em especial aos colegas **Fernando Mendes de Oliveira e Hiléia dos Santos Barroso**, pelas valiosas colaborações nesta tese.

Ao **Instituto Nacional de Ciência e a Tecnologia - INCT** / Centro de Energia ambiente e biodiversidade – CEAB, ao coordenador **Prof. Dr. José Carlos V. Rodrigues**.

À **FAPEAM** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas) pela bolsa concedida no início do curso de doutorado.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Meus sinceros agradecimentos!

“Aqueles que se enamoram somente da prática, sem cuidar da teoria, ou melhor dizendo, da ciência, são como o piloto que embarca sem timão nem bússola. A prática deve alicerçar-se sobre uma boa teoria, à qual serve de guia a perspectiva; e em não entrando por esta porta, nunca se poderá fazer coisa perfeita nem na pintura, nem em nenhuma outra profissão.”

Leonardo da Vinci 1452-1519

RESUMO

O *Pycnoporus sanguineus* é um fungo do filo basidiomycota pertencente à família Polyporaceae. O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade e a atividade antimicrobiana de extratos de cepas do fungo *P. sanguineus* provenientes de Manaus (MIP-235828) e Parintins-AM (MIP-240018). Oito extratos foram obtidos por duas técnicas diferentes, sendo 5 sintetizados a partir do corpo frutífero da cepa MIP-240018 em água, acetona, acetato de etila, etanol e hexano. Outros três extratos (CB, PIC1 e PIC2) foram obtidos por meio da cultura fúngica das mesmas cepas em caldo de batata e dextrose em pH9.0, incubadas por 21 dias a 28°C em estufa sob demanda bioquímica de oxigênio em presença de luz. Estas amostras foram extraídas com acetona, posteriormente filtradas em coluna de sílica gel C18 e em seguida evaporadas em rota-evaporador e resuspendidas no meio específico para cada ensaio proposto. A citotoxicidade dos extratos foi observada pelo teste de viabilidade celular com o ensaio colorimétrico (sal de trimetiltetrazólio - MTT) para estimar a concentração do extrato que causou redução em 50% da viabilidade celular (CC50) em células VERO mantidas em meio de cultura DMEM (meio essencial mínimo). Os cinco primeiros extratos e CB foram submetidos aos testes de concentrações inibitória (CIM) e bactericida (CBM) mínimas contra cepas de *Streptococcus mutans* UA159 e *Staphylococcus aureus* ATCC33591, resistente a metilina, pelo método de microdiluição. Todos os extratos inibiram a cepa de *S. mutans*. O extrato CB inibiu esta cepa na concentração de 23 µg/mL, sendo capaz de mata-la na concentração média de 187 µg/mL. Os extratos em acetona e acetato de etila inibiram a cepa em concentrações de 30 µg/mL e 70 µg/mL, respectivamente. Os demais extratos inibiram a cepa em concentrações aproximadas de 200 µg/mL, sendo que o extrato aquoso inibiu em concentrações próximas a 1000 µg/mL. De um modo geral, as concentrações necessárias para inibir o *S. aureus* foram maiores do que aquelas que inibiram o *S. mutans*, sendo que os extratos etanólico e aquoso não foram capazes de inibir ou matar a cepa *S. aureus*. Além do extrato CB, os extratos hexânico e acetato de etila também foram capazes de inibir e matar a cepa de *S. aureus*. A CC50 do extrato MIP-235828 foi calculada em 170 µg/mL e a do MIP-240018 foi 730 µg/mL. Concluiu-se que os extratos das cepas fúngicas estudadas apresentam potencial antimicrobiano, exibindo mínima citotoxicidade sobre células VERO.

Palavras-chave: Fungos, Purificação, Farmacologia

ABSTRACT

Pycnoporus sanguineus is a fungus from *basidiomycota* phylum belonging to *Polyporaceae* family. The aim of the present study was to evaluate the cytotoxicity and the antimicrobial activity of extracts from strains of *P. sanguineus* from Manaus (MIP-235828) and Parintís (MIP-240018) Amazon region. Eight extracts were obtained by two techniques, being 5 synthesized from the fungus fruit-body of MIP-240018 strain in water, acetone, ethyl acetate, ethanol, and hexane. Another three extracts (CB, PIC1 and PIC 2) were obtained from the fungi culture from the same fungus strain in potato-dextrose agar in pH 9.0, which were incubated during 21 days under agitation at 28°C and light. These samples were extracted with acetone, filtrated in gel columns C18, evaporated and, re-suspended in the specific medium for each assay. The cytotoxicity of PIC1 and PIC2 extracts was observed by cell viability was evaluated by the colorimetric assay (trimethyltetrazolium salt - MTT) in order to estimate the extract concentration that reduced 50% the cell viability (CC50) in VERO cells maintained in DMEM (minimum essential medium) culture medium. The five first extracts and CB were submitted to the minimum inhibitory (MIC) and bactericidal (MBC) concentration tests against *Streptococcus mutans* UA159 and *Staphylococcus aureus* ATCC33591 by using the microdilution technique. All extracts were able to inhibit the *S. mutans*, being the CB extract able to inhibit this strain at 23 µg/mL and to kill it at 187 µg/mL. The acetone and ethyl acetate extracts were able to inhibit the strain at 30 µg/mL and 70 µg/mL, respectively. The other extracts showed MIC of approximately 200 µg/mL, being that CB inhibited it in concentration of approximately 1000 µg/mL. Generally, the concentrations necessary to inhibit *S. aureus* were higher than the ones necessary to inhibit *S. mutans*, being the ethanolic and aqueous extracts not able to inhibit or kill *S. aureus*. Besides the CB, both hexane and ethyl acetate extracts were able to inhibit and kill *S. aureus*. CC50 of MIP-235828 extract was calculated as 170 µg/mL and the MIP-240018 was 730 µg/mL. We concluded that the extracts presented potential as antimicrobial agents, showing minimum cytotoxicity against the VERO cells.

Keywords: Fungi, Purification, Pharmacology

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
3	PROPOSIÇÃO	11
4	MATERIAL E MÉTODOS	12
5	RESULTADOS	24
6	DISCUSSÃO	30
7	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Embora possam causar doenças no homem, em animais e plantas, os fungos constituem uma possibilidade para obtenção de novas moléculas que podem apresentar atividades biológicas variadas, tais como antibióticos e vitaminas. Estes microrganismos sintetizam em sua estrutura, substâncias que podem ser empregadas na indústria, em especial a farmacêutica. A partir do advento das penicilinas, descobertas por Fleming em 1928, houve uma revolução no tratamento de infecções que muitas vezes eram fatais. Os fungos são utilizados na indústria ainda, para produção de enzimas capazes de degradar diferentes substratos (Esposito & Azevedo, 2004).

O *Pycnoporus sanguineus* é um fungo saprófito que pertence à família *Polyporaceae*, do filo *basidiomycota* (basidiomicetos). É um dos fungos causadores da decomposição (“podridão branca”) em certos tipos de madeira (Nobles & Frew, 1962; Loguercio-Leite, 1985; Smânia *et al.*, 1998), sendo bem reconhecido seu alto potencial lignocelulítico (Uzan *et al.*, 2011).

O gênero *Pycnoporus* é dividido em quatro espécies: *Pycnoporus cinnabarinus*, nativo da zona temperada do hemisfério norte; *Pycnoporus coccineus*, que ocorre em vários países com fronteira nos oceanos Índico e Pacífico; *Pycnoporus sanguineus*, encontrado em regiões tropicais e subtropicais dos hemisférios norte e sul; e *Pycnoporus puniceus*, encontrado na África e na Índia (Uzan *et al.*, 2011).

Do filo basidiomiceto têm sido isolados vários compostos que apresentam atividade antimicrobiana (Anke, 1997; Esposito & Azevedo, 2004). Porém, apesar de seu enorme potencial de biodiversidade em ecossistemas tropicais (Hawksworth, 1997), poucos estudos visando à descoberta de compostos bioativos deste filo foram conduzidos no Brasil. A maioria das investigações foi dirigida aos cogumelos comestíveis (Ishikawa *et al.*, 2001; Paccola *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2002).

A atividade antimicrobiana do *Pycnoporus sanguineus* já é conhecida desde 1946, quando Bose isolou e denominou o *poliporin*, substância ativa

contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, sem toxicidade para os animais experimentais. Na década seguinte, Gripenberg em 1958 e Cavill *et al.* em 1959, isolaram um pigmento vermelho denominado pela primeira vez de cinabarina (Cowan, 1999).

A cinabarina é um exemplo de pigmento produzido pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* e por outros fungos da podridão branca, a qual apresenta ação antibiótica e antiviral. As condições para a purificação desta molécula já foram otimizadas por Smânia (1996) e Smânia *et al.* (1998).

Amostras de *Pycnoporus sanguineus*, isoladas em diferentes regiões do estado de Santa Catarina, apresentaram atividade antimicrobiana sobre vários tipos de bactérias, inclusive sobre *Staphylococcus aureus* e muitos estreptococos, sendo mais eficiente contra bactérias gram-positivas do que contra gram-negativas (Smânia *et al.*, 1995; Smânia *et al.*, 1998; Zjawiony, 2004). Smânia *et al.* (2003) também descreveram a atividade antiviral efetivada cinabarina sobre o vírus da raiva em concentrações entre 0,155 e 0,31 mg/mL.

O uso empírico do *P. sanguineus* na medicina popular é frequentemente citado por historiadores. Como exemplo, a literatura registra o tratamento de diversas doenças usando o fungo macerado, por tribos indígenas das Américas, África e em certas comunidades rurais em Santa Catarina, (Pérez-Silva *et al.*, 1998). Segundo Fidalgo (1965), algumas tribos indígenas brasileiras usavam o fungo inclusive para controlar hemorragias. O relato de Dias *et al.* (2009), aborígenes australianos usavam este fungo para tratar feridas bucais, sendo mascado e sugado para curar pequenas ulcerações na cavidade oral, bem como friccionado na boca de bebês para tratar candidíase oral. Baseado nestas considerações, este trabalho teve como objetivo observar a atividade antimicrobiana de extratos do *P. sanguineus*, além de testar da sua citotoxicidade em culturas de célula VERO.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Os fungos são seres eucariontes, heterotróficos, aclorofilados, aeróbios e microaerófilos, unicelulares ou pluricelulares, com parede celular composta geralmente de quitina e/ou celulose, além de outros carboidratos complexos. Sua nutrição ocorre por absorção, utilizando glicogênio como substância de reserva. Podem viver como sapróbios, parasitas ou simbiotes com outros organismos (Lacaz, 2002; Putzke & Putzke, 2004).

Os fungos pluricelulares têm o corpo formado por um emaranhado de filamentos, denominados hifas e o seu conjunto recebe o nome de micélio. As hifas variam no diâmetro, espessura da parede e localização do pigmento (Putzke & Putzke, 2004). Segundo Esposito & Azevedo (2004), embora os fungos nas diferentes formas possam agrupar-se e justapor-se, nunca formam um tecido verdadeiro.

Embora venham sendo utilizados por milhares de anos em variadas aplicações, são frequentemente associados a efeitos prejudiciais. Algumas espécies podem causar doenças, parasitando animais e também o homem, bem como causando deterioração de alimentos e materiais, infectando plantas (lavouras) e causando prejuízos econômicos. A maioria das espécies, no entanto, é benéfica e responsável pela sobrevivência de outros seres vivos inclusive o homem (Esposito & Azevedo, 2004).

Os alimentos fermentados fazem parte importante da dieta de muitas populações em todo o mundo. As enzimas provenientes de fungos são utilizadas para hidrolisar proteínas e lipídios aumentando a fonte de nitrogênio solúvel (Oner *et al.*, 1986). O processo de fermentação aumenta o valor nutricional dos alimentos e melhora as características organolépticas e digestivas de alguns grãos, como a soja (Omafuvbe *et al.*, 2000).

Os fungos já foram classificados como vegetais e também como protistas. Atualmente são agrupados num reino à parte, denominado Fungi. Este reino é atualmente dividido em quatro filos: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*, sendo esta classificação feita de acordo com o tipo de esporo originado por via sexual. Desta forma, as espécies são

classificadas pela produção de zigotos, zoósporos, ascóporos e basidiosporos, respectivamente (Logercio-Leite, 2004).

Os esporos fúngicos são estruturas que tem como função a produção de novos elementos, a dispersão para um novo local e sobrevivência do organismo em ambientes inóspitos. Os esporos assexuais são produzidos por mitose e os sexuais por meiose (Moore-Landeker, 1996; Loguercio-Leite, 2004).

A variação morfológica do reino fungi é muito grande, existindo espécies macro e microscópicas. Estima-se que o número de espécies de fungos espalhadas pelo mundo é de cerca de 1 milhão e 500 mil, sendo que apenas foram descritas cerca de 70 mil espécies (Hawksworth, 1991; Esposito & Azevedo, 2004).

Os fungos são encontrados praticamente em qualquer local do ambiente, inclusive no ar na forma de esporos, podendo desenvolver novas estruturas quando encontram substrato adequado (Putzke & Putzke, 2004). Podem ser encontrados no solo, nas águas, sobre animais e vegetais, em alimentos naturais e industrializados (Bononi, 1999; Teixeira *et al.*, 2001).

Apresentam seu corpo na forma de duas unidades básicas: a leveduriforme e a hifal (Trabusi & Altherthum, 2005), a Figura 1 mostra estas duas formas. No formato de leveduras, as células são únicas, pequenas e delimitadas apresentando um único núcleo. As hifas são os filamentos que formam o micélio dos fungos, são longas células cilíndricas com vários núcleos ou septadas, onde cada célula pode ter vários núcleos; podem ser simples ou ramificadas (Sieveres, 1999).



Figura 1- Fungos: Filamentosos (pluricelular) e leveduras (unicelular).
Fonte: <http://mundoeducacao.uol.com.br/biologia/caracteristicas-gerais-dos-fungos>

Os fungos filamentosos ou bolores e cogumelos apresentam-se cenocíticos, ou seja, células multinucleadas que se conectam por poros existentes em septos, formando uma massa contígua de protoplasma. Têm formato de tubos prolongados que se estendem continuamente em suas extremidades. O conjunto destas hifas, ramificadas ou não, denomina-se micélio, (Figura 2) o qual pode variar do hialino ao colorido, dependendo da espécie (Markham, 1994).

A coloração do micélio é determinada por diferentes pigmentos que conferem diferentes colorações ao corpo frutífero (Loguercio-Leite *et al.*, 2006).

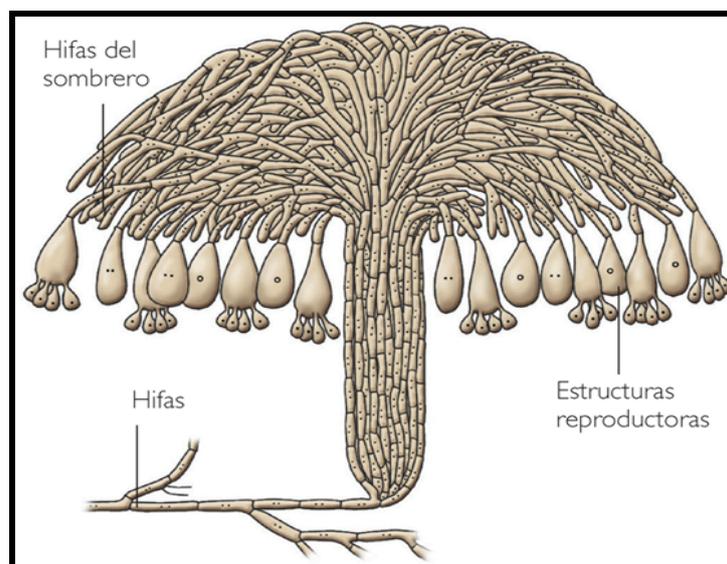


Figura 2 - Hifas, micélio, corpo frutífero e esporos fúngi.
Fonte: adaptado de <http://pt.wikipedia.org/wiki/Hifa>.

A superfície fúngica é constituída de três matrizes intercaladas: a extracelular ou capsular, a parede celular e a membrana plasmática. Apresentam organelas no interior do citoplasma, como todo eucarionte. Sua matriz extracelular é formada por substâncias mucilaginosas que tem a função de adesão em diferentes grupos de fungos, onde são encontradas com diversas enzimas extracelulares (Moore–Landercker, 1996). Apresentam núcleo típico que contem um nucléolo proeminente e os cromossomos são geralmente muito pequenos. No protoplasma são encontrados ribossomos, elementos do retículo endoplasmático, vacúolos, corpos lipídicos, glicogênio, complexo de golgi, lissomos, corpos multivesiculares, microtubulos e microfilamentos, os quais formam o cito esqueleto (Alexopoulos, 1996).

A obtenção de nutrientes pelos fungos ocorre por absorção pela parede celular em contato com uma solução nutritiva. O micélio segrega enzimas especiais que atuam sobre substâncias liquefazendo-as e, no caso dos fungos lignolíticos, ocorre uma despolimerização da lignina. Em outras situações, especialmente no parasitismo de plantas, o micélio emite órgãos chamados apressórios que penetram na célula do hospedeiro e se ramifica na forma de haustórios absorvendo os nutrientes intracelulares (Griffin, 1994).

Os compostos usados para armazenamento de energia e translocação de nutrientes são açúcares, como a glicose e a frutose, na forma de glicogênio e trehalose que atuam como reguladores metabólicos de substâncias de reserva (Deacon, 1997). O glicogênio pode formar agregados de 15 a 30 nm, que podem estar associados à membrana citoplasmática ou apresentarem-se livres no citosol (Moore-Landeker, 1996).

Segundo Furtado (1944), a atividade antimicrobiana de alguns fungos já era conhecida desde a antiguidade. A descoberta da penicilina a partir do experimento de Alexandre Fleming, em 1928, e os estudos posteriores com o *Penicillium notatum* ou com o *Penicillium chrysogenum*, por Houvard Flory e Ernest Chain, em 1945, permitiram descobertas que levaram a uma redução sensível de doenças infecciosas, como a febre reumática nos EUA e de tuberculose em vários países desenvolvidos.

Os antibacterianos são os produtos microbianos tradicionalmente mais pesquisados pela indústria farmacêutica. Contudo, novos compostos têm sido investigados como agentes antitumorais, inibidores enzimáticos e agentes cardiovasculares. A Tabela 1 mostra os produtos antimicrobianos obtidos a partir de diversos fungos (Loguercio-Leite, 2004).

Alguns fungos, dentre eles o *P. sanguineus*, (figuras 3 e 4) têm um sistema complexo de mecanismos e enzimas que lhes permite a utilização de madeira e outros materiais lignocelulósicos como substrato, mesmo que pobres nutricionalmente, desempenhando um papel fundamental na reciclagem de carbono na natureza (Martinez, 2005).

Tabela 1. Fungos produtores de antimicrobianos.

Fungo	Antibiótico
<i>Aspergillus clavatus</i>	Clavalina
<i>Aspergillus flavus</i>	Acido aspergílico
<i>Cephalosporium salmosynne</i>	Cefalosporina N
<i>Chaetomium cochioides</i>	Chaetomina
<i>Chaetomium iodinium</i>	Iodinina
<i>Chaetomium violaceum</i>	Violaceína
<i>Gliocadium</i> sp.	Gliotoxina
<i>Micromonospora</i> sp.	Micromonosporina
<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinina
<i>Penicillium cyclopium</i> e <i>Penicillium puberulum</i>	Ácido penicílico
<i>Penicillium notatum</i>	Penicilina
<i>Penicillium spinulosum</i>	Espinulosina
<i>Proactinomyces albus</i> e <i>P. violaceus</i>	Proactinilomicina, Actinomicetina
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Actinomicina
<i>Streptomyces leventulae</i>	Estreptomicina
<i>Streptomyces griseus</i>	Estreptomicina
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Clortetraciclina
<i>Streptomyces venezuelensis</i>	Cloranfenicol

Fonte: Adaptado de Lacaz(2002).

A exploração e utilização das capacidades metabólicas do gênero *Pycnoporus* é muito promissora para a biotecnologia devido a sua habilidade em produzir corpos frutíferos e linhagens de células monocarióticas em escala laboratorial, permitindo seu melhoramento genético (Alves *et al.*, 2004). Além disso, podem também produzir várias enzimas baseadas em cobre ou ferro (metalo-proteínas enzimáticas) envolvidas na transformação de compostos

aromáticos da parede celular de plantas (Moukha *et al.*, 1999; Halaouli *et al.*, 2005; Uzan *et al.*, 2011).



Figura 3 - *Pycnoporus sanguineus*. Fonte: coleção- Fungi UEA.



Figura 4 - *Pycnoporus sanguineus*, em uma árvore em decomposição - Parintins, AM.

Segundo Rosa *et al.* (2003) que isolou 84 espécies de basidiomicetos, dentre elas o fungo *P. sanguineus*, a ação antimicrobiana contra *Candida krusei* e *Staphylococcus aureus* foi comprovada.

Num estudo realizado por Correa *et al.* (2006), o *P. sanguineus* mostrou uma poderosa atividade leishmanicida, devido a compostos que

envolvem a formação de espécies reativas de oxigênio, causando a ruptura da membrana do parasita.

Os flavonóides constituem uma das maiores classes de metabólitos secundários (polifenóis de baixo peso molecular), derivados da via fenilpropanóide, em praticamente todas as plantas. Estes flavonoides são caracterizados pelo esqueleto de 15 carbonos (C₆-C₃-C₆), constituídos de um anel oxigenado e outros dois aromáticos. O grupo principal destas substâncias inclui as flavonas, os flavonóis, flavononas, antocianinas e chalconas. Estes agentes são antioxidantes naturais, prevenindo danos causados em macromoléculas por espécies de oxigênio reativas. Além disso, podem atuar como anti-inflamatórios, anti-mutagênicos, anti-carcinogênicos e agentes antialérgicos (Es-Safi *et al.*, 2007). A rutina é um dos flavonol-glicosídeos mais comumente encontrados nos fungos, usualmente identificados como vitamina P, quercetina e resperidina. Enzimas dos fungos, particularmente dos *Pycnoporus*, chamadas de lacases, são capazes de sintetizar e polimerizar a rutina e seus derivados. Estas enzimas também são potentes degradantes de lignina e celulose. Em conjunto com a rutina, estas lacases foram capazes de inibir a ciclooxigenase2 (COX-2), além de inibir a metaloproteinase 3 (MMP-3) em 70 a 75% de sua atividade (Uzan *et al.*, 2011).

A cinabarina sintetizada pelo *P. sanguineus* (Figura 5) tem na sua estrutura básica um radical fenoxazin-3-ona, um grupo carbonila no carbono 1, um grupo amina no carbono 2 e um grupo hidroxila no carbono 9. Seu nome químico é 2-Amino-9-(hidroximetil)-3-oxo-3H-fenoxazina-1-ácido carboxílico (C₁₄H₁₀N₂O₅). Para sua produção, a extração *in vitro* é feita no 18º e 20º dias de incubação do fungo, sendo sua síntese aumentada significativamente quando o pH do meio de cultura é ajustado para 9,0 e incubado a 25°C sob luz artificial (Smânia *et al.*, 1998; Zjawiony, 2004).

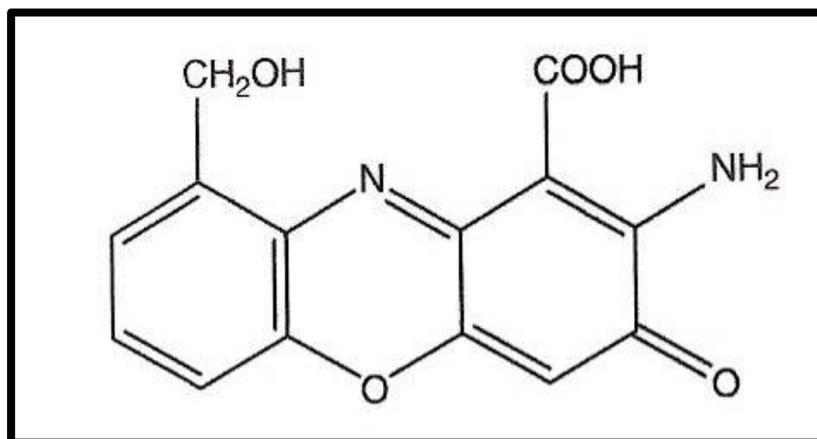


Figura 5 – Estrutura química da cinabarina. Fonte: Smânia *et al.* (2003).

Embora já existam estudos que mostram a atividade antimicrobiana da cinabarina e de outras moléculas do fungo *P. sanguineus*, pouco se sabe sobre a atividade de seus extratos, particularmente contra bactérias e células eucarióticas.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivos Gerais:

Avaliar a citotoxicidade e a atividade antimicrobiana de extratos do fungo *Pycnoporus sanguineus* encontrado na Região Amazônica.

3.2 Objetivos Específicos:

1. Isolar e identificar duas cepas fungo *Pycnoporus sanguineus* da região Amazônica;
2. Produzir extratos de duas cepas do fungo com solventes de diferentes polaridades;
3. Analisar os extratos por cromatografia líquida e gasosa;
4. Avaliar *in vitro* a citotoxicidade de extratos de duas cepas de *P. sanguineus* sobre cultura de células VERO;
5. Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana dos extratos contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas do fungo *Pycnoporus sanguineus*

Foram utilizadas duas cepas do fungo *Pycnoporus sanguineus* colhidos em diferentes regiões do Estado do Amazonas, sendo uma do Município de Manaus (MIP-235828) e outra do Município de Parintins (MIP-240018) a colheita foi respaldada sob o certificado de regularidade para coleta de material biológico com finalidade científica com a autenticação eletrônica ei4z.1nvz.Jqm7.888r (anexo).

Os corpos frutíferos do fungo foram levados ao Laboratório de Biorgânica e Microbiologia da Universidade do Estado do Amazonas-UEA, sendo que estes foram depositados na coleção de fungos da UEA e no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA. A identificação do fungo foi realizada através de taxonomia clássica. O corpo de frutificação do fungo foi analisado macro e microscopicamente, observando suas estruturas de reprodução e utilizando literaturas especializadas, pela curadora da coleção, professora Dolores Fonseca.

Após a colheita foi realizado o isolamento do fungo e pequenos fragmentos do corpo frutífero foram lavados em álcool a 70% por um minuto, com hipoclorito de sódio a 2,5% por um minuto e água destilada esterilizada abundantemente (Figura 6). Inicialmente para o cultivo foi utilizado o meio de cultivo BDA (Batata Dextrose Agar) com antibiótico cloranfenicol a 500 mg/mL, sendo que as amostras foram incubadas em estufa sob demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a 28°C, em presença de luz por 72 horas(Figura 7).

Para obtenção da cultura pura, outra repicagem foi realizada, onde um disco de 0,5 cm de diâmetro do micélio fúngico anteriormente formado foi depositado em placas de Petri contendo o meio BDA e incubadas por 7 dias em estufa BOD a 28°C, em presença de luz (Figura 8).



Figura 6- Assepsia e isolamento do corpo frutifero do *P. Sanguineus*.



Figura 7- Primeira repicagem - cultura em meio BDA.



Figura 8- Cultura pura do *P. sanguineus* em meio BDA.

4.2 Extratos

4.2.1 Extrato CB

Após obtenção da cultura pura em meio BDA das cepas MIP 235828 e MIP 240018 foi feita a inoculação do fungo em caldo de batata para o crescimento micelial, segundo metodologia modificada de Smânia *et al.* (1997; 1998).

Para o preparo do meio líquido foram utilizados 200 g de batata por litro de água. Após o cozimento das batatas (Figuras 9 e 10), o caldo foi filtrado e adicionado 20g de glicose. O pH do meio foi ajustado para 9,0 com uma solução de NaOH a 1M.

Das placas com a cultura pura, foram retirados dois discos de 10 mm de diâmetro do micélio do fungo, os quais foram inoculados em 400 mL de meio de batata em frascos de 1 L e incubados por 21 dias a 28°C sob agitação e em presença de luz (figura 11). Após o período de incubação, a cultura foi agitada vigorosamente e filtrada em papel filtro Whatman N° 01 (figura 12). A cultura foi filtrada em funil com auxílio de bomba a vácuo. O caldo foi filtrado novamente em uma coluna de sílica gel C18(SEP-PAK, Waters Technologies do Brasil LTDA) e os metabólitos secundários extraídos com acetona PA (Figura 13). O solvente foi evaporado em aparelho rota-evaporador, a 80 RPM e 40°C (Figura 14). Os extratos (Figura 15) foram suspensos nos meios específicos de cada teste e para análise por CLAE nos mesmos solventes com o quais foram extraídos.



Figura 9 - Cozimento de batata.



Figura 10 – Caldo de batata esterilizado.

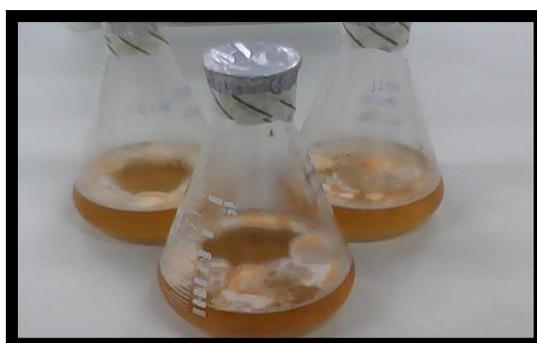


Figura 11 – *P. sanguineus* crescido em caldo de batata.



Figura 12-Filtração em coluna C18.



Figura 13- Extrato CB em acetona PA.



Figura 14- Rotaevaporador



Figura 15 – extrato CB pronto.

4.2.2 Extratos obtidos a partir do corpo frutífero

Para obtenção dos extratos a partir do corpo frutífero foi usada a metodologia proposta por Smânia (2003), com modificações. Os extratos do fungo *P. sanguineus* foram extraídos com cinco solventes de diferentes polaridades: água, etanol, hexano, acetona e acetato de etila. Estes extratos foram obtidos com a trituração dos corpos frutíferos colhidos na cidade de Parintins (MIP-240018) (Figuras 16 e 17).

Uma vez identificados os corpos frutíferos da espécie, estes foram lavados em água corrente e posteriormente com água destilada, secos e acondicionados em sacos plásticos fechados a vácuo e conservados em freezer -18°C até a preparação dos extratos. Previamente à preparação dos extratos, 129,5 g dos corpos frutíferos dos fungos foram submetidos à liofilização por 24h.

O peso seco obtido após a liofilização foi de 121,0 g, sendo a amostra triturada e pesada em cinco partes de 24,0 g cada uma delas (Figuras 18 e 19). Estas amostras foram acondicionadas em frascos com 400 mL de um dos solventes, sendo mantidos por 24 horas para maceração. Cerca de 50% do solvente foi evaporado e o restante recebeu adição de 200 mL do mesmo solvente (Figura 20). Após filtração em papel filtro Whatmamm N^o 01, os extratos com solventes voláteis (acetona, acetato de etila, etanol e hexano) (Figura 21) foram evaporados em rotaevaporador, a 40°C , em 60 rotações por minuto para remoção total do solvente.



Figura 16. Corpo frutífero do *P. sanguineus*.



Figura 17. Liofilização do fungo.



Figura 18. Corpo frutífero do *P. sanguineus*.



Figura 19. Pesagem do fungo.



Figura 20. Corpo frutífero triturado imerso em diferentes solventes.



Figura 21. Perfil dos extratos hexânico, em acetato de etila, etanólico, acetônico, aquoso e em caldo de batata (CB) do *P. sanguineus*.

4.3 Análises Químicas

Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (CG-MS), para determinar sua composição química. Os extratos obtidos foram enviados à Divisão Química Orgânica e Farmacêutica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP, sob a responsabilidade do químico Dr. Adilson Sartoratto, para identificação dos principais constituintes por CG-MS, utilizando a metodologia modificada descrita por Taminato (2007). A análise por CLAE foi realizada no Laboratório de Biorgânica e Microbiologia da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, seguindo o método adaptado de Dias & Urban (2009).

4.3.1 Análise em CG-MS

Após o processo de extração, as amostras dos extratos do fungo *P. sanguineus* foram analisados por cromatografia gasosa conforme metodologia proposta por Taminato (2007), em detector de massas por meio de um cromatógrafo a gás HP 5890 série II, acoplado a um detector seletivo de massas HP5970. Foi utilizada coluna de fase ligada de 25 m a 30 m de comprimento X 0,2 mm de diâmetro X 0,33 µm de espessura da marca HP ultra-2 ou HP-5 e hélio como gás de arraste. As amostras foram dissolvidas em solvente de acordo com a polaridade da amostra. As temperaturas do injetor, da coluna e do detector foram, respectivamente, 250°C, 110°C (5°C/min, 280°C - 26 minutos) e 300°C. O volume injetado foi de 1 µL e a vazão do gás de arraste (He) foi 1,0 mL/min (split de 30 mL/minuto).

4.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC)

Os extratos foram analisados por meio do cromatógrafo líquido constituído por uma bomba ternária Varian 9010, um detector Varian UV-VIS 9050 acoplado ao software integrador Millennium 5.0. Da solução do extrato

fúngico a 1% (diluído no solvente no qual foi preparado), uma alíquota de 1,5 mL foi filtrada em membrana de celulose e acetato 45/25. Em uma coluna C18, utilizando o método de gradiente (0-2 min: 10% CH₃CN/H₂O; 14-24 min: 75% CH₃CN/H₂O; 26-30 min: 100% CH₃CN e; 32-40 min: 10% CH₃CN/H₂O), injetando-se 50µL no injetor.

As quantidades relativas dos compostos foram determinadas com base na área de cada pico em comprimento de onda 435 nm, conforme metodologia descrita por Dias & Urban (2009).

4.4 Atividades em Células VERO

Este ensaio foi realizado no laboratório de virologia aplicada (LVA), do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, sob orientação da Profa. Cláudia Maria Oliveira Simões.

4.4.1 Culturas celulares

Foram utilizadas culturas de células VERO (American Type Culture Collection, ATCC CCL81) que são culturas contínuas de fibroblastos de rim do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), cultivadas a 37°C, em atmosfera úmida de 5% de CO₂.

4.4.2 Meio de cultura e reagentes

O meio de cultura utilizado foi o MEM (Minimal Essential Medium-Cultilab[®]) adicionado de bicarbonato de sódio, a fim de manter o pH entre 7,2 e 7,4 na estufa de CO₂. O meio foi suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB, Gibco[®]), para permitir o crescimento e a manutenção das células. Para os experimentos, o meio foi também suplementado com 1% de PSA (10.000 UI de penicilina, 10µg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B - Cultilab[®]).

Além disso, a enzima proteolítica tripsina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), preparada numa solução de EDTA a 0,05%, foi utilizada como agente dissociante na obtenção de subculturas celulares, tanto para manutenção das células, como para realização dos experimentos em placas de múltiplas cavidades. Após o descolamento das células, o processo de tripsinização foi interrompido, para evitar a citólise, pela adição de SFB com inibidores de protease.

4.5 Avaliação da viabilidade celular através do Ensaio Colorimétrico com sal de Tetrazolium (MTT)

A citotoxicidade é observada pela desorganização do tapete celular, bem como pelo aspecto granuloso e arredondado das células e consequente aparecimento de alterações morfológicas quando as células são expostas a agentes externos (Streissle *et al.*, 1981).

Neste ensaio foi utilizado o método colorimétrico com MTT, conforme proposto por Takeuchi *et al.* (1991), com modificações propostas por Sieuwerts *et al.*(1995).

Uma suspensão de células VERO contendo $2,5 \times 10^5$ células/mL foi distribuída em uma placa de 96 cavidades (100 μ L/cavidade). Após 24 h de incubação, a 37°C, em estufa de CO₂, a cultura celular estava confluenta. Então, o meio de cultura foi substituído por 200 μ L das amostras, em diferentes concentrações (1, 0.50, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 e 0.01563 mg/mL), dissolvidas em meio MEM sem SFB. Nos controles celulares foi adicionado somente meio de cultura. Em seguida, as placas foram incubadas durante 72 h nas mesmas condições descritas acima.

Após este período, os sobrenadantes foram aspirados e adicionou-se 50 μ L da solução de MTT (Sigma) (1 mg/mL em meio MEM), em todas as cavidades. Após 4 horas de incubação a 37°C, a solução de MTT foi aspirada cuidadosamente para não danificar as células e 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO - Nuclear[®]) foram adicionados em cada cavidade.

As placas foram agitadas levemente, em temperatura ambiente, por 5 a 10 min, para que os cristais de formazana fossem solubilizados. A leitura das absorbâncias em cada cavidade foi realizada em espectrofotômetro (Tecan[®], modelo Infinite 200 PRO) com 540 nm de comprimento de onda.

Por meio da seguinte fórmula, as porcentagens de viabilidade (X %) foram calculadas pela relação dos valores de absorbância de cada amostra com a média dos controles celulares, que é considerada como 100 % de viabilidade:

$$X\% = \frac{\text{densidade óptica material em teste}}{\text{densidade óptica controles celulares}} \times 100$$

Os percentuais de viabilidade calculados, referentes às diferentes concentrações das amostras, foram inseridos num gráfico de concentrações *versus* porcentagens de citotoxicidade. Através da análise de regressão, foi possível calcular os valores de CC₅₀, ou seja, a concentração da amostra que causa redução em 50% da viabilidade celular (Sokal & Rohlf, 1995). Os valores de CC₅₀ calculados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

Como controle do experimento, as alterações morfológicas celulares foram acompanhadas no microscópio invertido e registradas após as 72h, antes da adição do corante.

4.6 Atividade Antimicrobiana

4.6.1. Microrganismos

O ensaio para a determinação da CIM dos seis extratos sobre o crescimento bacteriano e a viabilidade das bactérias *Streptococcus mutans* UA159 e *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, esta cepa é também resistente a meticilina (MRSA), foram realizados através do método de microdiluição utilizando microplacas estéreis de cultivo com 96 poços de fundo chato (Eloff, 1998; Castro *et al.*, 2009).

4.6.2 Preparo do inóculo

Os inóculos das suspensões bacterianas de microrganismos indicadores, foram preparados a partir de uma cultura crescida 18 horas a 37°C em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion). Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, foram transferidas culturas para um tubo com 5 mL de soro fisiológico estéril, para obtenção de uma solução com 0,135 de absorbância, mensuradas em espectrofotômetro, no comprimento de onda 660 nm, correspondente a concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (unidade formadora de colônia por mL). A proporção do inóculo para o preparo da suspensão bacteriana foi de 1 µL para cada mL de meio de cultura.

4.6.3 Diluição dos Extratos

Soluções dos extratos nas concentrações de 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL foram filtradas através de membrana filtrante 0,22 µm GV Millex estéril (Millipore-Bedford, MA, USA) e realizadas diluições seriadas destas soluções em caldo BHI para se obter concentrações finais de 125, 250, 375, 500, 750, 875 e 1000 µg/mL (v/v), em um volume final de 200 µL.

4.6.4 Concentração Inibitória Mínima - CIM

Para estes testes foram utilizadas micro placas esterilizadas com 96 poços de fundo chato. Cada poço recebeu inóculo de 190 µL de suspensão bacteriana e 10 µL de cada concentração do extrato, de tal maneira que o volume final em cada poço foi de 200 µL. O caldo BHI foi inoculado com suspensão bacteriana, na proporção 1:1000 de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de 1×10^5 UFC/mL. Em seguida, foi feita a leitura inicial das placas em leitor tipo ELISA, sendo incubadas em estufa a 37°C, 10% de CO₂, por 24 horas. Após a incubação foram adicionados 30 µL de rezazurina (Sigma) em solução aquosa (0,01%), em cada poço preparado. Este sistema

revelador permitiu a observação imediata, sendo que a cor vermelha representava o crescimento e a cor azul à ausência de crescimento.

A CIM foi considerada a menor concentração dos extratos em que não houvesse crescimento bacteriano, ou seja, uma leitura de absorbância menor que 0,05. Como controle positivo foi utilizado o digluconato de clorexidina (0,12%, concentração final) e, como controle negativo, o mesmo veículo e concentração utilizada nas preparações dos extratos.

4.7 Concentração Bactericida Mínima- CBM

A determinação da CBM foi feita baseando-se nos resultados obtidos no teste da CIM, utilizando-se como inóculo as suspensões provenientes dos poços que apresentam um resultado de leitura de absorbância inferior a 0,05 a 660 nm. As placas de Petri contendo meio de cultura BHI ágar com 5% de sangue de carneiro desfibrinado foram semeadas utilizando 20 µL de inóculo sendo incubadas em 10% de CO₂ a 37°C, por 48 h. A CBM foi considerada como a menor concentração dos extratos em que não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado, ou seja, 99.9% de morte bacteriana (Phillips, 1991; Castro *et al.*, 2009). Todos os testes foram feitos em triplica.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização Química

A Tabela 2 mostra os prováveis constituintes obtidos por CG-MS dos extratos em soluções hexânica, etanólica, em acetato de etila, aquosa, acetônica e do extrato oriundo da cultura em caldo de batata (CB). Não foi possível a identificação de nenhum composto nos extratos etílico e CB.

Tabela 2. Constituintes e constituição relativa (%) na amostra dos extratos em função do tempo de retenção (tR).

Frações*	tR (min)	Identificação provável	%
Acetona	16.1 e 27.82	Éster de ácido 1,2-benzenodicarboxílico	8,51
	37.59	5,6-dihidroergosterol	16,81
	8.69 a 37.17; 38.8 a 44.62	n.i.**	72,38
Acetato Deetila	16.1	Éster de ácido 1,2-benzenodicarboxílico (éster metílico do ácido oléico)	2,94
	17.18	Éster metílico do ácido hexadecanóico (éster metílico do ácido palmítico)	41
	20.32	Éster metílico do ácido 9,12-octadecadienóico (éster metílico do ácido linoléico)	21,28
	20.43	Éster metílico do ácido 9-octadecenóico	13,61
	20.89	Éster metílico do ácido octadienóico (éster metílico do ácido esteárico)	2,69
	25.48	Éster bis(2-etilhexil) do ácido hexanodióico	9,9
	27.81	Éster de ácido 1,2-benzenodicarboxílico	8,18
	37.59	5,6-dihidroergosterol	13,27
	31.79 a 34.08; 38.8; 43.52	n.i.	22,71
	Hexano	29.88; 32.6; 34.48	Compostos da vitamina E
25.38; 30.37; 30.82; 33		Compostos do gama-tocoferol	44,24
34.83		Estigmasterol	3,07
36.23; 37.94		Compostos do beta-sitosterol	15,06
26.05; 30.66; 31.86; 34.06; 35.92		n.i.	17
Aquoso	21.51	Éter etílico do ácido 9,12-octadecadienóico	6,18
	37.59	5,6-dihidroergosterol	11,25
	11.07 e 37.37	n.i.	82,57

* - Não foi possível a identificação de nenhum composto nos extratos etílico e CB.

** - n.i. – Não identificado

A Figura 22 mostra o perfil cromatográfico (CLAE) da fração em acetona do extrato do fungo *P. sanguineus*, analisado pelo método descrito previamente por Dias & Urban (2009), com seus prováveis constituintes.

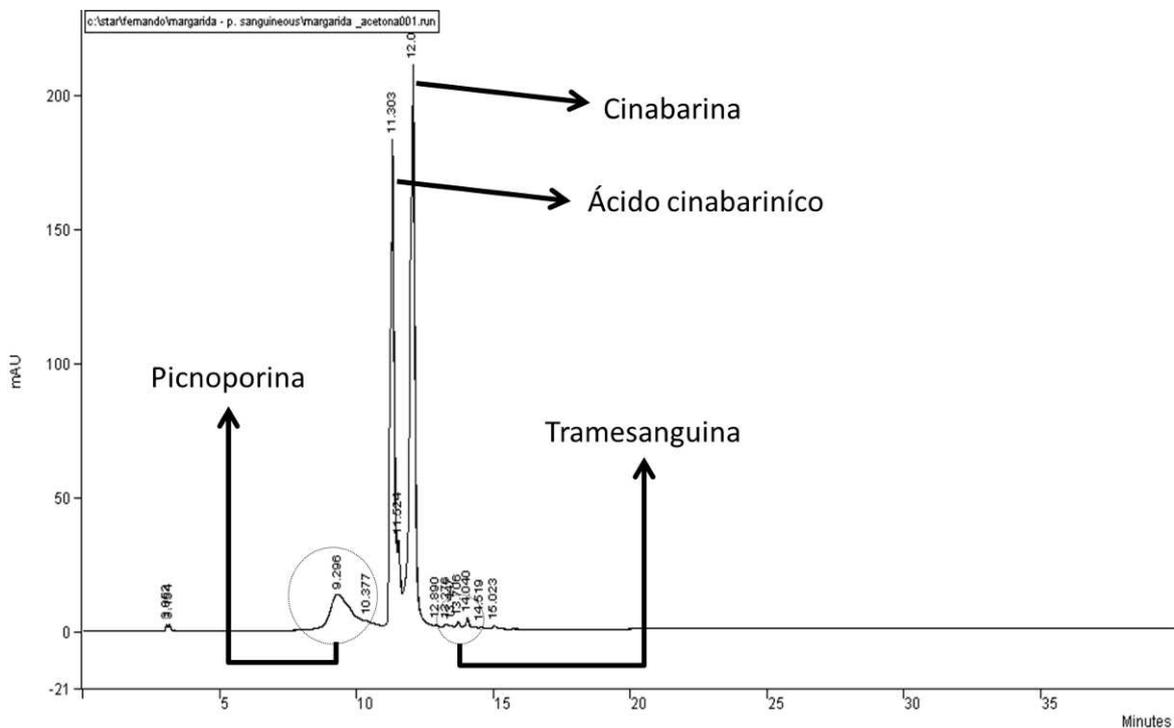


Figura 22. Perfil cromatográfico da fração acetônica do extrato do *P. sanguineus*.

A Figura 22 mostra a presença em maior proporção dos principais constituintes da fração em acetona, a cinabarina e o ácido cinabarinico. Uma proporção inferior de tramesanguina e picnoporina foi observada.

5.2 Citotoxicidade in vitro em cultura de células VERO

A Figura 23 mostra a atividade dos extratos PIC I (MIP-235828) e PIC II (MIP-240018) sobre a viabilidade das culturas de células VERO.

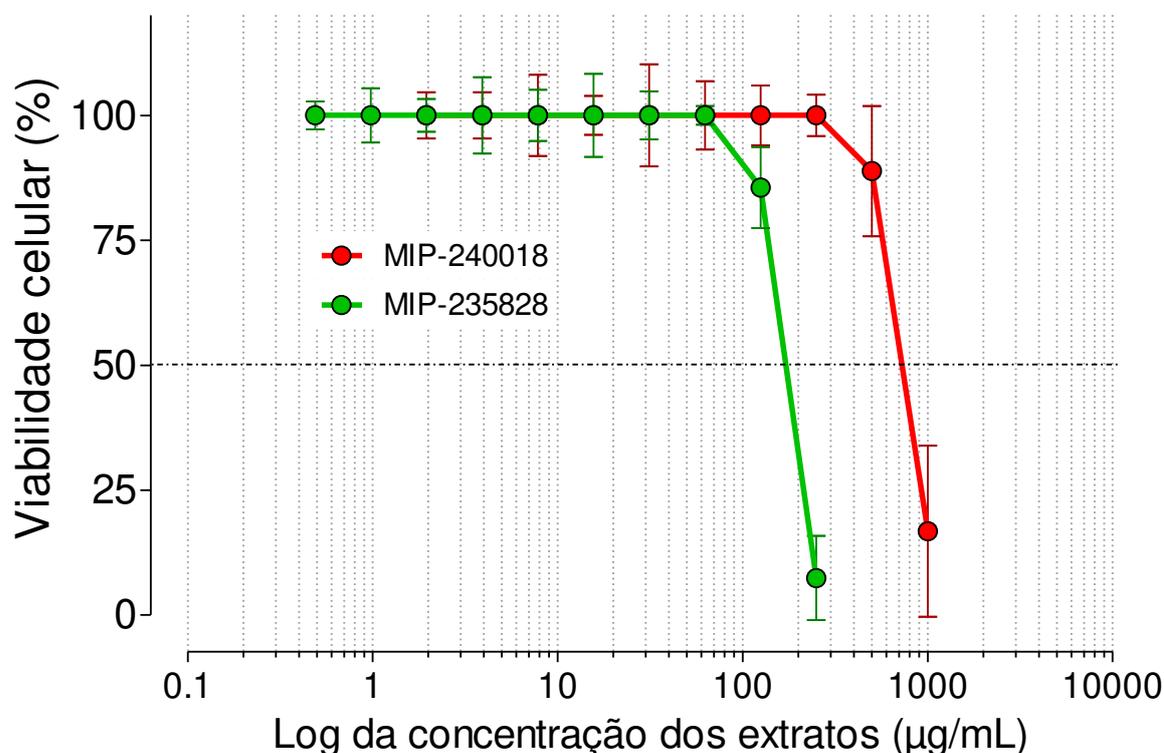


Figura 23. Viabilidade da cultura de células VERO submetidas às diferentes concentrações dos extratos PIC1(MIP-235828) e PIC2(MIP-240018).

A análise de regressão (correlação de Pearson - r_P) evidenciou que houve relação inversa e significativa entre as concentrações dos extratos *de P. sanguineus* ($\mu\text{g/mL}$) com a viabilidade celular, tanto para o MIP-235828 ($r_P = -0,8964$; $p = 0,0004$) quanto para o MIP-240018 ($r_P = -0,8757$; $p = 0,0009$). A CC50 foi calculada como sendo $170,3 \mu\text{g/mL}$ para o MIP-235828 e $730,4 \mu\text{g/mL}$ para o MIP-240018. Embora o primeiro extrato tenha apresentado maior toxicidade quando comparado ao segundo extrato, ambos exibiram baixo perfil de toxicidade.

5.3 Atividade Antimicrobiana in vitro Contra *S. aureus* e *S. mutans*

As Figuras 24 e 25 mostram o perfil de atividade antimicrobiana dos extratos contra *S. mutans* UA156 e *S. aureus* ATCC 33591, respectivamente.

Foi possível observar que todos os extratos inibiram a cepa de *S. mutans*, sendo que o extrato CB mostrou capacidade de inibir esta cepa na concentração de 23 µg/mL, sendo o único dos extratos capaz de matar a cepa em estudo, na concentração média de 187 µg/mL. Isto significa que o extrato foi capaz de matar a cepa em concentrações oito vezes maiores que a CIM.

O extrato em acetona mostrou ser capaz de inibir a cepa em concentrações de aproximadamente 30 µg/mL e em acetato de etila em 70 µg/mL. Os demais extratos inibiram a cepa em concentrações aproximadas de 200 µg/mL. O extrato aquoso promoveu inibição somente em concentrações próximas ao limite testado.

Pela Figura 25 foi possível observar que os extratos afetaram o *S. aureus* de forma diferente daquela observada para a cepa de *S. mutans*. De uma maneira geral, as concentrações necessárias para inibir o *S. aureus* foram maiores do que aquelas que inibiram o *S. mutans*, sendo que as frações etanólica e aquosa não foram capazes de inibir ou matar a cepa *S. aureus*.

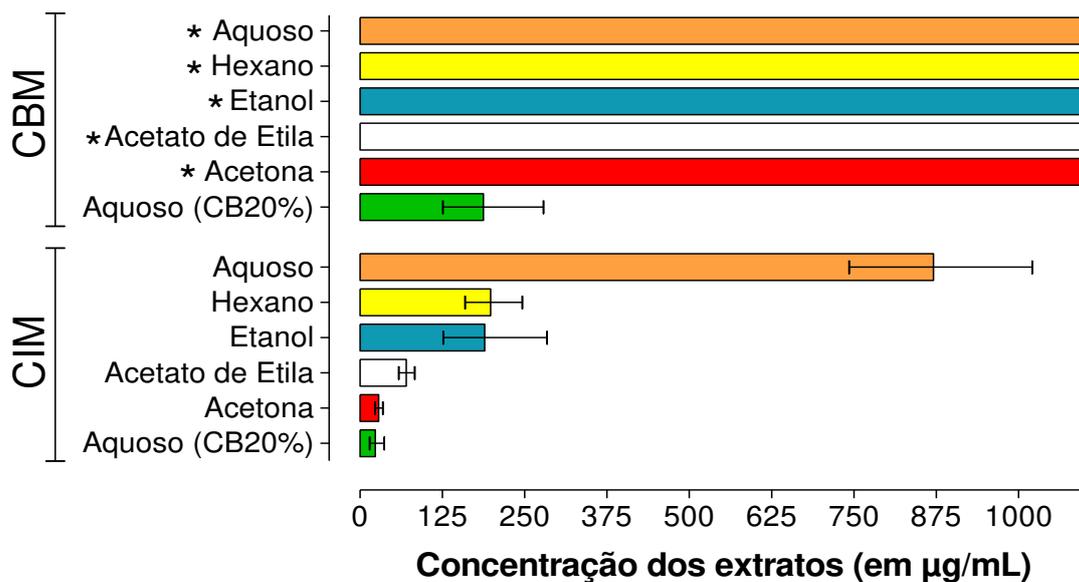


Figura 24. Concentrações (média geométrica \pm IC95%) inibitória (CIM) e bactericida (CBM) mínimas contra *S. mutans* UA159. * - Acima da concentração máxima testada (1000 μ g/mL).

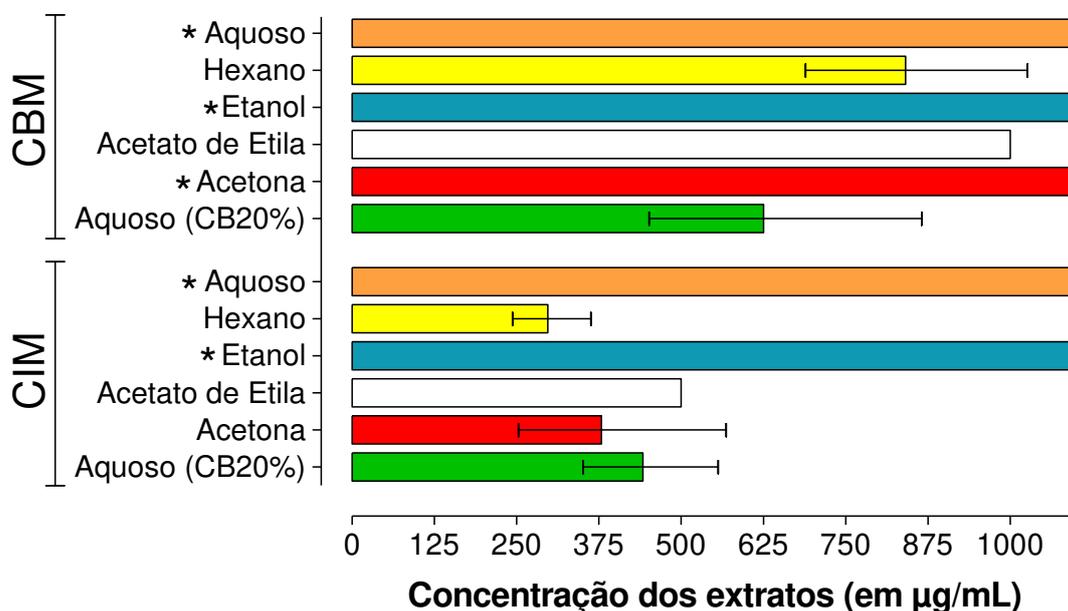


Figura 25. Concentrações (média geométrica \pm IC95%) inibitória (CIM) e bactericida (CBM) mínimas contra *S. aureus* ATCC33591. * - Acima da concentração máxima testada (1000 μ g/mL).

Além do extrato CB, as soluções hexânica e em acetato de etila também foram capazes de inibir e matar a cepa de *S. aureus*. As concentrações

destes extratos, necessárias para matar a cepa, foram entre 1,5 a 2,8 vezes maiores do que aquelas necessárias para inibi-la.

6 DISCUSSÃO

A literatura internacional indexada mostra 37 publicações sobre o fungo *P. sanguineus*, sendo que 16 deles são relacionados ao isolamento de lacase, a qual é uma das principais enzimas relacionadas à degradação da madeira. Sete outros estudos relacionam a atividade descolorante do fungo ou uma de suas mais importantes atividades: a propriedade de absorção de íons metálicos, tais como cobre (Mashitah *et al.*, 1999; Yahaya *et al.*, 2009), cádmio (Mashitah *et al.*, 2008) ou chumbo (Yus Azila *et al.*, 2008).

De forma similar ao presente estudo, relatos de atividade antibacteriana foram efetuados pela primeira vez por Smânia *et al.* (1995), sendo retomado o estudo desta propriedade por Rosa *et al.* em 2003. Propriedades antivirais e o perfil de toxicidade sobre células foram relatadas por Smânia *et al.* (2003), sendo que Correa *et al.* (2006) mostraram a atividade leishmanicida do fungo. A maior parte dos estudos sobre as diversas propriedades antimicrobianas do fungo foram realizados com o extrato acetônico, similar ao utilizado neste estudo, ou com a cinabarina isolada deste extrato.

A opção por utilizar os extratos brutos com diferentes polaridades no presente estudo foi ocasionada pela ausência de dados mais claros na literatura a respeito das propriedades do *P. sanguineus*. Além disso, é notório que os efeitos farmacológicos de compostos fitoterápicos ou naturais são oriundos de mais do que apenas um dos seus constituintes. Grupos farmacológicos distintos, dentro de um composto, são responsáveis pelas diversas atividades farmacológicas verificadas em uma só espécie fúngica ou vegetal. Embora exista a tendência em se preconizar o uso de princípios ativos oriundos de compostos naturais, muitos exemplos mostram que o uso do composto pode ser igualmente ou mais efetivo quando usado *in natura* ou através de extratos de preparação simples (Matos, 1997). Extratos vegetais usualmente também apresentam baixo custo, são mais facilmente aceitos pela população e não envolvem grande investimento inicial para sua produção. Além disso, a Portaria

971 (03 de maio de 2006), a qual aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS, contempla a fitoterapia, entre outras, como prática desejável nas políticas de saúde públicas brasileiras (Diário Oficial da União, 2006). Assim, a opção pelos ensaios com os extratos brutos do fungo permitiu observar a atividade de um possível agente terapêutico seguindo a PNPIC.

Embora os métodos de identificação dos compostos químicos nos diferentes extratos sejam métodos tradicionais e consagrados, o nível de precisão ou certeza sobre a identificação provável não foi maior do que 80%. Além disso, a identificação é dependente da biblioteca de compostos do equipamento CG-MS e, portanto, compostos que não estejam catalogados nesta biblioteca não apareceram na identificação provável. O método por CLAE, por sua vez, depende da injeção de padrões, os quais não estão comercialmente disponíveis. A identificação da cinabarina no presente estudo foi possível graças ao ensaio prévio executado por Dias & Urban (2009). Esta transposição de resultados foi possível graças a utilização das mesmas condições e do mesmo método cromatográfico entre os dois estudos.

Como observado por Correa *et al.* (2006), o extrato acetônico continha ergosterol na sua composição pela identificação por CG-MS, sendo que o método por cromatografia líquida permitiu também observar a cinabarina no mesmo extrato. No presente estudo, os diversos extratos mostraram algumas moléculas em comum, sendo que estes extratos apresentavam diferentes forças polares. Considerando as moléculas diferentes isoladas nestes extratos diversos, foi possível confirmar a presença da cinabarina, a ésteres diversos, ergosteróis, além da vitamina E, e seus derivados. Não existem estudos na literatura indexada sobre a composição química do fungo *P. sanguineus*.

Os resultados observados no presente estudo revelaram que os extratos se comportaram de maneira distinta em relação à sua atividade antimicrobiana. Além disso, o efeito foi dependente da espécie bacteriana. Resultados similares foram observados por Smânia *et al.* (1995). Estes autores observaram que um extrato acetônico do fungo foi capaz de inibir e matar cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Salmonella typhi, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), além de estreptococos dos grupos A, B, C e G, em concentrações variando entre 0,019 a 1,25 mg/mL. O *S. aureus*, em particular, mostrou CIM e CBM de 0,156 mg/mL (156 µg/mL) e os estreptococos mostraram CIM e CBM entre 19 a 78 µg/mL. Os resultados do presente estudo se mostraram similares aos observados naquele estudo. Curiosamente, a cepa de *S. aureus* utilizada Smânia e colaboradores é reconhecidamente uma variante sensível às penicilinas, enquanto que a utilizada no presente estudo é resistente a meticilina (MRSA). Assim, é possível que os extratos do fungo ou algumas de suas frações tenham atividade antibacteriana importante contra esta espécie, independentemente de seu perfil de resistência contra antibióticos comumente isolados.

O *S. aureus*, embora faça parte da microbiota normal humana, é considerado como o mais importante patógeno dentre os estafilococos, e provavelmente dentre todas as bactérias, em seres humanos (Waldvogel, 1990). No ano 2000, mais de 80% dos *S. aureus* isolados de pacientes hospitalizados e cerca de 70% dos isolados de pacientes ambulatoriais apresentavam resistência às penicilinas naturais (Tavares, 2000). Recentemente, esta espécie atingiu praticamente 100% de resistência às penicilinas, sendo que a subespécie preponderante é aquela resistente à meticilina (Gales *et al.*, 2009), similar àquela utilizada no presente estudo. Assim, os resultados de susceptibilidade antimicrobiana obtidos com as frações hexânica e com o CB contra o *S. aureus* merecem estudos posteriores para comprovar sua efetividade em outros modelos.

Embora Smânia *et al.* (1995) tenham observado significativa atividade bactericida contra estreptococos, no presente estudo apenas a fração CB mostrou capacidade em matar a cepa de estreptococo em estudo (187 µg/mL). O perfil do *S. mutans* UA159 utilizado no presente estudo pode ser a causa para a diferença observada. Esta cepa é sabidamente mais resistente a alguns antimicrobianos que outras cepas, além de ter um perfil de virulência mais exacerbado (produz mais ácido, biofilme sendo mais resistente a ácidos), sendo que seu genoma já foi completamente decifrado (Ajdić *et al.*, 2002).

Smânia *et al.* (1995) também relataram que não observaram inibição bacteriana, mesmo em concentrações de 100mg/mL, com extratos obtidos por solventes menos polares, tais como álcool butílico, diclorometano, éter etílico, heptano e hexano. Entretanto, quando utilizaram acetato de etila, acetona e metanol, obtiveram atividade inibitória mesmo em baixas concentrações. Estas observações também estão em acordo com os resultados do presente estudo, considerando a cepa de *S. aureus*. Entretanto, todos os extratos no presente estudo foram capazes em pelo menos inibir a cepa de *S. mutans*. Além disso, a fração hexânica teve atividade considerável sobre ambas as cepas. Provavelmente, estas diferenças ocorreram em função da cepa de fungo ou mesmo das cepas bacterianas utilizada nos estudos.

De forma similar, Vanderlinde & Onofre (2010) mostraram que o extrato aquoso do fungo inibiu uma cepa de *S. aureus* sensível à penicilina e também uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, mas não inibiu cepas de *E. coli*, *S. epidermidis* e *C. albicans*. Entretanto, o extrato obtido com acetato de etila inibiu o crescimento destas cepas, à exceção de *E. coli* e *C. albicans*. Desta forma, mais uma vez a inibição das bactérias se mostrou dependente da cepa bacteriana e da cepa fúngica utilizada.

Outro fato importante é a diferença observada entre as concentrações inibitória e bactericida mínimas considerando ambas as cepas bacterianas. Já está estabelecido na literatura que concentrações sub-inibitórias de vários antimicrobianos são capazes de modificar a arquitetura molecular da superfície externa de bactérias e algumas funções bacterianas, tais como a habilidade em aderir às células do hospedeiro, a energia de superfície bacteriana, a sensibilidade aos mecanismos de defesa do hospedeiro, motilidade, etc., influenciando a virulência bacteriana (Vaisanen *et al.*, 1982; Braga, 1994; Vidya *et al.*, 2005). Assim, é provável que os extratos nas concentrações que provocaram inibição bacteriana tenham interferido com funções metabólicas não vitais, mas de forma suficiente para alterar o perfil de crescimento bacteriano. Somente em concentrações muito elevadas estes extratos foram capazes de inviabilizar totalmente a bactéria.

Um único estudo na literatura mostrou que a citotoxicidade da cinabarina, isolada do fungo, iniciou com a concentração de 0,62 mg/mL, sendo que na concentração de 0,31 mg/mL não houve quaisquer efeitos indesejáveis sobre as células (Smânia *et al.*, 2003). No presente estudo, o extrato obtido do fungo colhido na cidade de Parintins (MIP-240018) mostrou concentração citotóxica da ordem de 0,73 mg/mL, sendo que nenhum efeito significativo sobre as células ocorreu com concentrações até 0,25 mg/mL. Estes resultados são muito similares aos descritos por Smânia *et al.* (2003). Entretanto, o extrato colhido na cidade de Manaus (MIP-235828) apresentou citotoxicidade em concentrações inferiores (entre 0,17 e 0,06 mg/mL). Embora os valores obtidos no presente estudo não sejam relativos à cinabarina ou qualquer outra molécula isolada, as concentrações dos extratos acetônicos utilizadas no ensaio, são particularmente ricos em cinabarina, como pode ser comprovado pela cromatografia.

Smânia *et al.* (2003) também mostraram que a cinabarina, mesmo em concentrações de 1000 mg/mL, não induziu mortalidade e alterações macroscópicas consideráveis nos órgãos vitais e nem outros sinais de toxicidade em ratos. Assim, é possível que atoxicidade *in vivo* dos extratos, embora não tenha sido ensaiada no presente estudo, seja baixa e tolerável. Corrobora para esta possibilidade o fato de que o *P. sanguineus* vem sendo utilizado na medicina popular por tribos indígenas (Pérez-Silva *et al.*, 1998), inclusive para tratar ulcerações na cavidade oral e candidíase oral em bebês (Dias *et al.*, 2009). Desta forma, o presente estudo mostrou que o fungo *P. sanguineus* tem substâncias com atividade biológica, as quais merecem investigação mais aprofundada em modelos *in vivo* e *in vitro*.

8. CONCLUSÃO

Concluiu-se que foi viável o isolamento de cepas fungo *Pycnoporus sanguineus* da região amazônica, sendo possível produzir extratos destas cepas fúngicas com solventes de diferentes polaridades. Estes extratos apresentaram concentrações variadas de ergosteróis, ésteres ácidos e metílicos, vitamina E tocoferóis. A citotoxicidade dos extratos sobre cultura de células VERO foi baixa, sendo dependente da concentração do extrato e do tipo de cepa fúngica. Além disso, os extratos mostraram a atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

REFERÊNCIAS

1. Achenbach H, Blümm E. Investigation of the pigments of *Pycnoporus sanguineus* – pycnosanguin and new phenoxazin-3-ones. Arch Pharm 1991;324:3–6.
2. Ajdić D, McShan WM, McLaughlin RE, Savić G, Chang J, Carson MB, Primeaux C, Tian R, Kenton S, Jia H, Lin S, Qian Y, Li S, Zhu H, Najjar F, Lai H, White J, Roe BA, Ferretti JJ. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99(22):14434-9.
3. Alexopoulos C J, Blackwell M. Introductory mycology. John Wiley Sons, New York, 4 ed. 1996.869 p.
4. Alves A, Record E, Lomascolo A, Scholtmeijer K, Asther M, Wessels J G H, Wosten HAB. Highly efficient production of laccase in the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. Appl Environ Microbiol 2004;70:6379–6384.
5. Anke T. Strobilurins. In:Anke T. Fungal Biotechnology. Chapman& Hall, London, 1997.206-12p.
6. Anke T. Basidiomycetes: a source for new bioactive secondary metabolites. Prog Ind Microbiol 1989;27:51-66.
7. Bononi VR, Capelari M, Maziero R, Trufeem SFB. Cultivo de cogumelos comestíveis. Ícone. São Paulo, 206 p.
8. Bose SR. Antibiotics in a *Polyporus (Polystictus sanguineus)*. Nature 1946:158, 292-296.
9. Braga PC. Effects of sub inhibitory concentrations of seven macrolides and four fluoroquinolones on adhesion of *Staphylococcus aureus* to human mucosal cells. Chemotherapy 1994;40:304-10.
10. Castro ML, Vilela WR, Zauli RC, Ikegaki M, Rehder VL, Foglio MA, de Alencar SM, Rosalen PL. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian propolis from Bahia state. BMC Complement Altern Med 2009;30:9-25.
11. Cavill GWK, Clezy PS, Tetaz JR and Werner RL. The chemistry of mould metabolites—III: Structure of cinnabarin (polystictin). Tetrahedron 1959;5(4), 275-280.
12. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999;12(4):564-82.

13. Correa E, Cardona D, Quiñones W, Torres F, Franco AE, Vélez ID, Robledo S, Echeverri F. Leishmanicidal activity of *Pycnopus sanguineus*. *Phytother Res* 2006;20(6):497-9.
14. Deacon W. *Modern mycology*. Blackwell Science, London. 3. Ed. 1977.303 p.
15. Diário Oficial Da União. Ministério da Saúde. Edição n. 84 de 04/05/2006. Publicação da Portaria n. 971, de 3 de maio de 2006, Aprova A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema único de Saúde.
16. Dias DA, Urban S. HPLC and NMR Studies of phenoxazone alkaloids from *Pycnopus cinnabarinus*. *Natural Product Communications* 2009;4(4):489-98.
17. Dias DA, White MJ, Urban S. *Laurenciafiliformis*: phytomedical profiling by conventional and HPLC - NMR approaches. *Natural Product Communications* 2009;4(4):489-498.
18. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med* 1998;64(8):711-3.
19. Esposito E, Azevedo JL. *Fungo: uma introdução à biotecnologia, bioquímica e biotecnologia*. Ed. Educs, Caxias do Sul. 2004.389 p.
20. Ferreira MVC, Paes VR, Linchtenstein A. Penicilina: oitenta anos. *RevMedSão Paulo* 2008;87(4):272-6.
21. Fidalgo O. Conhecimento micológico dos índios brasileiros. *Rickia* 1965;2:1-6.
22. Furtado AF. Atividade antibacteriana do *Aspargillus flavus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1944;46-57.
23. Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, Zoccoli C, Barth A, Pignatari AC. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). *Braz J Infect Dis* 2009;13(2):90-8.
24. Griffin DH. *Fungal physiology*. 2 ed. Wiley Lised. New York. 1994.
25. Gripenberg J. Fungus pigment. I. Cinnabarin, a colouring matter from *Trametes cinnabarina* Jacq. *Acta Chem Scand* 1958;12:590-5.
26. Halaoui S, Mi A, Kruus K, Guo L, Hamdi M, Sigoillot J-C, Asther M, Lomascolo A. Characterization of a new tyrosinase from *Pycnopus* species with high potential for food technological applications. *J Appl Microbiol* 2005;98:332-43.

27. Es-SafiNE, Ghidouche S, Ducrot PH. Flavonoids: hemisynthesis, reactivity, characterization and free radical scavenging activity. *Molecules* 2007;12:2228–58.
28. Hawksworth DL. Fungi and biodiversity: international incentives. *Microbiologia* 1997;13(2):221-6.
29. Ishikawa NK, Fukushi Y, Yamaji K, Tahara S, Takahashi K. Antimicrobial cuparene-type sesquiterpenes, enokipodins C and D, from a mycelial culture of *Flammulina velutipes*. *J Nat Prod* 2001;64(7):932-4.
30. Lacaz CS. Tratado de micologia médica. 9. ed. Sarvier, São Paulo. 2002.110p.
31. Loguercio-Leite C. Taxonomia dos fungos. In: Elisa Esposito & João Lúcio de Azevedo (Org.). Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul. 2004.v.1, p.47-90.
32. Loguercio-Leite C. Estudos biológicos em culturas de *Panus* Fr. (Basidiomycetes) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Insula* 1985;15:117-140.
33. Loguercio-Leite C, Groposo C, Dreschler-Santos ER, Figueiredo NF, Godinho OS, Abrão RL. A particularidade de ser um fungo –I. Constituintes celulares. *Biotemas* 2006;19(2):17-27.
34. Markham P. Occlusions of septal pores in filamentous fungi. *Mycological Research* 1994;98(10):1089-1106.
35. Martínez M A, Corzo N, Villamiel M. Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci Tech* 2007;18:609-25.
36. Mashitah MD, YusAzila Y, Bhatia S. Biosorption of cadmium (II) ions by immobilized cells of *Pycnoporus sanguineus* from aqueous solution. *Bioresour Technol* 2008;99(11):4742-8.
37. Matos FJA. Living pharmacies. *Ciência e Cultura* 1997;49(5-6):409-12.
38. Moore-Landecker F. Fundamentals of the fungi. 4 ed. Prentice Hall, New Jersey. 1996. 574 p.
39. Moukha SM, Dumonceaux TJ, Record E, Archibald FS. Cloning and analysis of *Pycnoporus cinnabarinus* cellobiosede hydrogenase. *Gene* 1999;234:23–33.
40. Oliveira JM, Jordão BQ, Ribeiro LR, Eira AF, Mantovani MS. Antigenotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazeimurill* lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1775-80.

41. Omafuvbe B O, Shonukan O O, Abiose SH. Microbiological and biochemical changes in the traditional fermentation of soybean forsoy-daddawa – Nig. food condiment. *Food Microbiol* 2000;17:469–474.
42. Oner MD, Erickson LE, Yang S S. Estimation of the true growth yield and maintenance coefficient for yoghurt cultures. *Biotechnol Bioeng* 1986;28(6):919-26.
43. Paccola A S; Maki C S; Nobrega GMA; Paccola-Meirelles L D. Antagonistic effect of edible mushrooms extract on *Candida albicans* growth. *Braz J Microbiol* 2001;32:176-178.
44. Pérez-Silva E, Aguirre-Costa E, Pérez-Amador C. Aspectos sobre el uso y La distribución de *Pycnoporus sanguineus* (Polyporaceae) em Mexico. *Ver MexMic* 1988;4:137–144.
45. Phillips I (ed.) A guide to sensitivity testing. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27(Supplement D):1-50.
46. Putzke J, Putzke MTL. Os Reinos dos Fungos. 2ªed. v.1. Ed. Edunisc, Santa Cruz do Sul,2004. 605p.
47. Rosa LH, Machado KM, Jacob CC, Capelari M, Rosa CA, Zani CL. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *MemInst Oswaldo Cruz* 2003;98(7):967-74.
48. Sievers N, Bertsch E, Fischer R. Isolation of nuclear migration mutants of *Aspergillus nidulans* using GFP expressing strains. *Mycological Research*1999;103(8):961-6.
49. Smânia A Jr, Marques C J, Smânia E F, Zanetti C R, Carobrez S G, Tramonte R, Loguercio-Leite C. Toxicity and antiviral activity of cinnabarin obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Phyther Res* 2003;17(9):1069-72.
50. Smânia A, Monache FD, Smânia EF, Gil ML, Benchetrit LC, Cruz FS. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *J Ethnopharmacol* 1995;45(3):177-81.
51. Smânia EFA. Parâmetros ótimos para a síntese da cinabarina por *Pycnoporus sanguineus* (L.: Fr.) Murr. e sua atividade antimicrobiana em relação a bactérias isoladas de alimentos. 1996. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina.
52. Smânia EFA, Smania Junior A, Loguercio-Leite C. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. *Rev Microbiol São Paulo* 1998;29(4).

53. Taminato RL. Estudo químico do *Alliumtuberosum* rottl. Ex Spreng biomonitorado pela avaliação da atividade anti-*Candida albicans*[dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2007. 58p.
54. Tavares W. Problem gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs. *Ver Soc Bras Med Trop* 2000;33(3):281-301.
55. Teixeira H, Chitarra LG, Arias SMS, Machado JC. Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação in vitro de fungos fitopatogênicos. *Ciência Agrotécnica* 2001;25(6):1314-1320.
56. Trabulsi LR, Altherthum F. *Microbiologia*. 4.ed. Atheneu, São Paulo. 2005. 718p.
57. Uzan E, Portet B, Lubrano C, Milesi S, Favel A, Lesage-Meessen L, Lomascolo A. *Pycnopus* laccase-mediated bioconversion of rutin to oligomers suitable for biotechnology applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;90(1):97-105.
58. Vaisanen V, Lounatma A, Korhonen TK. Effects of sublethal concentrations of antimicrobial agents on the hemagglutination, adhesion and ultrastructure of pyelonephritogenic *Escherichia coli* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;22:120-7.
59. Vanderlinde DG, Onofre SB. Atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos pelo fungo *Pycnopus sanguineus* (Linnaeus: Fries) Murrill. *Revista Saúde e Pesquisa* 2010;3(1):11-16.
60. Vidya KC, Mallya PS, Rao PS. Inhibition of bacterial adhesion by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2005;23(2):102-5.
61. Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and practice of infectious diseases*. 3.ed. New York: Churchill Livingstone; 1990.
62. Yahaya YA, Mat Don M, Bhatia S. Biosorption of copper (II) onto immobilized cells of *Pycnopus sanguineus* from aqueous solution: equilibrium and kinetic studies. *J Hazard Mater* 2009;161(1):189-95.
63. YusAzila Y, Mashitah MD, Bhatia S. Process optimization studies of lead (Pb(II)) biosorption onto immobilized cells of *Pycnopus sanguineus* using response surface methodology. *Bioresour Technol* 2008;99(18):8549-52.
64. Zjawiony JK. Biologically active compounds from *Aphylophorales* (polypore) fungi. *J Nat Prod* 2004;67(2):300-10.