



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

JÉSSICA VARELA CHAVES

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ENZIMÁTICA DO FUNGO *Fomitopsis sp.*

Manaus

2017

JÉSSICA VARELA CHAVES

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ENZIMÁTICA DO FUNGO *Fomitopsis sp.*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio

Manaus

2017

Ficha Catalográfica

C512a Chaves, Jéssica Varela

Atividades antimicrobiana e enzimática do fungo *Formitopsis sp.* . / Jéssica Varela Chaves -- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2017.

Xi, 56 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio

1. Basidiomicetos 2. Bioatividade 3. Compostos antimicrobianos 4. Enzimas hidrolíticas I. Título.

CDU: 604(043)

Ficha catalográfica elaborada por
Maria Eliana N. Silva – CRB- 11/248

JÉSSICA VARELA CHAVES

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ENZIMÁTICA DO FUNGO *Fomitopsis sp.*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Banca Examinadora:

Dra. Suanni Lemos de Andrade
Universidade do Estado do Amazonas

Dra. Patrícia Melchiona Albuquerque
Universidade do Estado do Amazonas

Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio
Universidade do Estado do Amazonas

Data da aprovação: 24 de março de 2017

Manaus

2017

Agradecimentos

À Deus por me guiar nos momentos de dificuldade e colocar as pessoas certas em meu caminho.

Aos meus pais por concederem educação, ensinamentos, apoio emocional, além do incentivo constante e compreensão pela ausência.

À Universidade do Estado do Amazonas e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia pela oportunidade e conhecimentos adquiridos ao longo do curso.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Centro de Biotecnologia do Amazonas por ceder os microrganismos utilizados no projeto.

Ao meu orientador Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio, pela oportunidade, ensinamentos e confiança depositada em mim durante estes dois anos. Agradeço também por sempre atender-me quando precisei e pelo apoio para a execução dos experimentos.

À Dra. Cecilia Verônica Nunez e a sua aluna Kissinara Alessandra Marques pelos reveladores químicos cedidos e pela ajuda valiosa.

Ao Prof. João Paulo Diniz Pimentel, por orientar-me durante o estágio docente.

Ao Emerson Bacellar pelo apoio técnico durante o desenvolvimento deste trabalho.

À todos os amigos do laboratório do MBT, Paola Ortiz, Vanderlei Sabóia, Anderson Nogueira e André Higa pelo incentivo recebido todos os dias em que convivemos, pelas conversas, conselhos, ajuda e valiosos conhecimentos adquiridos.

Muito obrigada!

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta”

Carl Sagan

RESUMO

Os fungos produzem diversas biomoléculas bioativas para sobreviverem na natureza. Algumas dessas substâncias são de interesse econômico, como os antibióticos, enzimas, vitaminas e esteroides. O *Fomitopsis* é um cogumelo com grande importância econômica, principalmente no continente asiático, devido a capacidade em produzir substâncias antimicrobianas e enzimas. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e enzimática do fungo CBA-452. Uma árvore filogenética foi realizada para identificar o isolado fúngico a nível de espécie. A atividade antibacteriana foi avaliada através do método de difusão em disco. As bactérias patogênicas humanas utilizadas foram *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*. Os extratos do isolado foram obtidos através de partição líquido-líquido com solventes de baixa, média e alta polaridade, utilizando hexano, acetato de etila e n-butanol até exaustão, respectivamente. Os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD). Como reveladores foram utilizados vapores de iodo, cloreto de ferro, cloreto de alumínio, KOH 10%, dragendorf, DDPH (Difenil-picril-hidrazil), sulfato cério, bourchardt e luz na região do ultravioleta (254 e 365 nm). Em seguida, um teste de bioautografia foi realizado para selecionar as substâncias bioativas. Para avaliar o potencial enzimático, o fungo foi cultivado em meio amilase e celulase a 28°C, e após sete dias o halo de degradação enzimática formado em volta da colônia foi revelado com iodo e lugol, respectivamente. A sequência do isolado fúngico teve 99,8% de similaridade com a da espécie *Fomitopsis durescens* e seu extrato em acetato de etila apresentou atividade antimicrobiana frente à cepa-padrão *Staphylococcus aerus*. Além disso, demonstrou ser produtor de duas enzimas de interesse biotecnológico, amilase e celulase, com índice enzimático de 0,52 para atividade amilolítica e de 1,02 para atividade celulolítica. Apesar das substâncias bioativas na bioautografia não terem sido identificadas, o estudo mostrou que *Fomitopsis* pode ser uma boa fonte de metabólitos de interesse industrial, sendo necessários mais estudos sobre esse gênero no Brasil.

Palavras-Chave: Basidiomicetos. Bioatividade. Compostos antimicrobianos. Enzimas hidrolíticas.

ABSTRACT

Fungi produce several bioactive bio-molecules to survive in nature. Some species have economic interests, being source of antibiotics, enzymes, vitamins and steroids. *Fomitopsis* is a mushroom of great economic value, mainly in Asian continent, due to its ability to produce antimicrobial substances and enzymes. The present work aims to evaluate antimicrobial and enzymatic activities from CBA-452 fungus. A phylogenetic tree was made for identifying fungal isolate at specie level. Antibacterial activity was evaluated by disc diffusion method. Human pathogenic bacteria used as test were *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Isolated extracts were obtained by liquid-liquid partition with low, medium and high polar solvents using hexane, ethyl acetate and n-butanol until exhaustion, respectively. Extracts were analyzed by thin layer chromatography (CCD). As developers, iodine fume, iron chloride, aluminum chloride, 10% KOH, dragendorf, DPPH (diphenyl-picrylhydrazyl), cerium sulfate, bouchardt and ultraviolet light (254 and 365 nm) were used. Then, a bioautography test was performed for selecting bioactive substances. Enzymatic potential was evaluated cultivating fungus in amylase and cellulase medium at 28°C, and after seven days of enzymatic degradation a halo was formed around the colony, being developed through iodine and lugol solution, respectively. Sequence of fungal isolate had 99.8% of similarity with *Fomitopsis durescens* specie, and its ethyl acetate extract presented antimicrobial activity against the standard strain of *Staphylococcus aureus*. Thus, it also proved to be a producer of two enzymes of biotechnological interest, amylase and cellulase, with enzymatic index 0.52 for amylolytic activity and of 1.02 for cellulolytic activity. Despite there is unidentified bioactive substances in bioautography, this study showed that *Fomitopsis* may be a good source of metabolites with industrial interest, being necessary more studies on this genus in Brazil.

Key-words: Basidiomycetes. Bioactivity. Antimicrobial compounds. Hydrolytic enzymes.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Linhagens do gênero <i>Fomitopsis</i> similares à sequência do fungo CBA-452.....	34
Tabela 2: Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de hexano (HEX), butanol (BUT) e acetato de etila (AC/ET) do fungo <i>Fomitopsis</i> sp.....	37
Tabela 3: Atividade de amilase e celulase do <i>Fomitopsis</i> sp. CBA-452, avaliada através do índice enzimático (IE).....	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sequência de DNA da região ITS do fungo CBA 452.....	34
--	----

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1: Estrutura dos polímeros amilose e amilopectina que constituem o amido.....	17
Figura 2: Estrutura da celulose.....	18
Figura 3: Basidiocarpo de <i>Fomitopsis pinicola</i>	20
Figura 4: Cultura de <i>Fomitopsis feei</i>	20
Figura 5: Forma estrutural dos compostos cumarinas isoladas do <i>Fomitopsis officinalis</i> . (1) 6-cloro-4-fenil-2H-cromen-2-ona; (2) 6-Cloro-2-oxo-4-fenil-2H-cromeno-3-carboxilato de etilo; (3) 7-Cloro-4-fenil-2H-cromen-2-ona; (4) 7-Cloro-2-oxo-4-fenil-2H-cromeno-3-carboxilato de etilo.....	21
Figura 6: Distribuição geográfica das espécies do <i>Fomitopsis</i>	22

CAPÍTULO I

Figura 1: Cultura do fungo <i>Fomitopsis</i> sp. CBA-452 em meio Batata-Dextrose-Agar.....	33
Figura 2: Produto de PCR do <i>Fomitopsis</i> em gel de agarose 1%.....	34
Figura 3: Árvore filogenética da seqüência do <i>Fomitopsis</i> sp. CBA-452.....	35
Figura 4: Atividade antibacteriana do extrato acetato de etila do fungo <i>Fomitopsis</i> sp. frente à <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	36
Figura 5: Cromatoplasmas do extrato fúngico de acetato de etila reveladas com UV 254nm (1) e 365nm (2), anisaldeído (3), sulfato cérico (4), iodo (5), DPPH (6) e cloreto de alumínio (7).....	38
Figura 6: Bioautografia da cromatoplasma do extrato fúngico.....	39
Figura 7: Teste qualitativo de produção de amilase (A) e celulase (B) pelo <i>Fomitopsis</i> sp. CBA-452, após revelação com solução de iodo e lugol, respectivamente.....	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Produção de biomoléculas.....	13
2.1.1 Produção de substâncias antimicrobianas.....	13
2.1.1.1 Resistência aos antibióticos.....	14
2.1.2 Produção de enzimas.....	16
2.1.2.1 Amilases.....	17
2.1.2.2 Celulases.....	18
2.2 <i>Fomitopsis</i> P. Karst.....	19
3. OBJETIVO GERAL.....	24
3.1 Objetivos Específicos.....	24
CAPÍTULO I.....	25
4. REFERÊNCIAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

O surgimento de cepas resistentes aos antibióticos tem aumentado a busca por novos microrganismos produtores de compostos bioativos (COSTELLOE et al., 2010), principalmente na região Amazônica devido à grande diversidade de plantas e nichos exóticos que ainda não foram estudados. Os microrganismos são ótimos produtores de compostos de interesse biotecnológico e de maior demanda na produção industrial por diversos motivos, tais como o fato de serem cultivados em grandes escalas, fácil manipulação e alto rendimento (DEMAIN et al., 2000). A obtenção de produtos microbianos leva uma vantagem em relação às substâncias químicas por serem compostos termoestáveis, específicos e apresentarem estabilidade de pH (AGUIAR et al., 2011; PASTORE et al., 2011; SANTOS et al., 2010).

Os fungos são microrganismos amplamente distribuídos na natureza e apresentam um grande potencial para a produção de metabólitos secundários bioativos, devido a sua necessidade em produzir tais metabólitos para se defender em condições naturais (SPECIAN et al., 2014). O primeiro composto fúngico descrito com propriedades terapêuticas foi a penicilina isolada do *Penicillium chrysogenum* em 1929 (TAKAHASHI e LUCAS, 2008). Consequentemente, a capacidade de diversas espécies fúngicas em produzir compostos que inibem o crescimento de bactérias de interesse médico é frequentemente relatada na literatura (PRINCE et al., 2012; WENZEL et al., 2013; PADHI e TAYUNG, 2015).

Os basidiomicetos, conhecidos como cogumelos, são uma classe de fungos com notável produção de compostos bioativos (RATHEE et al., 2012). O gênero *Fomitopsis* está entre os basidiomicetos populares utilizados na medicina asiática. Possui atividade antioxidante, antitumoral e propriedades anti-inflamatórias (CHOI et al., 2007; LEE et al., 2007). Além de produzir uma gama de enzimas de interesse biotecnológico (PARK et al., 2015).

Atividade antibacteriana é outra especialidade dos extratos de *Fomitopsis* referida na literatura, com atuação contra diversas bactérias patogênicas de seres humanos. Nidadavolu et al., (2011) observaram produção de metabólitos secundários fortemente ativos por *F. feei* contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, causadoras de infecção urinária e dermatites, respectivamente, entre outras doenças graves. Em outro estudo, os compostos produzidos por *F. pinicola* tiveram atividade contra a bactéria causadora da intoxicação intestinal, a *Bacillus cereus* (LIU X-T et al., 2010).

Basidiomicetos, como todos os outros fungos, não são organismos fotossintéticos pela ausência da clorofila, portanto, não podem converter a energia solar para a matéria orgânica como em plantas. Assim, eles produzem um leque de enzimas que degradam materiais lignocelulósicos para o seu crescimento e frutificação na natureza (CHANG e BUSWELL, 1996). As espécies de *Fomitopsis* crescem sobre a madeira e são classificadas como fungos decompositores de madeira. Fungos de decomposição de madeira degradam celulose, hemicelulose e lignina, substratos da parede celular de madeira, secretando celulase, hemicelulase e ligninase (ISENMANN, 2012), enzimas com diversas aplicações tecnológicas.

Estudos observaram produção de enzimas ligninolíticas por *F. pinicola*, como celulases, lacases e manganês-peroxidases (GU e PARK, 2013; KNEŽEVIĆ et al., 2013; PARK e PARK, 2014; PARK et al., 2015). Produção de amilases com consequente purificação de glucoamilase é relatada em *F. palustris* (YOON, 2006).

Dentro do exposto, o *Fomitopsis* pode ser promissor na produção de compostos antimicrobianos e enzimas extracelulares, sendo uma valiosa fonte para a obtenção de biomoléculas com propriedades distintas e variadas. Entretanto, o conhecimento sobre as atividades biológicas do *Fomitopsis* ainda é escasso no Brasil, principalmente na região norte do país, onde são citadas apenas o *F. cupreorosea*, *F. fei* e *F. lilacinogilva* (GUGLIOTTA et al., 2015).

Devido ao aparecimento crescente de cepas resistentes às drogas acessíveis e a busca por novas enzimas mais eficazes, faz-se necessário pesquisas que avaliem a atividade antibacteriana dos metabólitos secundários e atividade enzimática de microrganismos pertencentes à regiões pouco exploradas, a fim de buscar novas fontes produtoras de biomoléculas com potencial para aplicação industrial.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PRODUÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

Os metabólitos primários são moléculas produzidas durante ou ao final do metabolismo intermediário de células vivas. Estas biomoléculas têm a finalidade de gerar energia, desse modo, são essenciais para o crescimento celular. Os metabólitos secundários são compostos sem nenhuma função no crescimento das células e são sintetizados na fase final de crescimento ou na fase estacionária (DEMAIN, 2000).

Na natureza, os metabólitos secundários têm diversas funções para o organismo produtor, como: hormônios, agentes contra bactérias, fungos, parasitas e plantas, efetores de diferenciação e agentes de simbiose (DEMAIN, 1996). Os metabólitos secundários produzidos por microrganismos possuem grande importância na saúde e nutrição humana por apresentarem atividades biológicas variadas, além da sua produção em massa que aumenta o interesse industrial. Os grupos de compostos que se destacam industrialmente são os antibióticos, agentes hipocolesterolêmicos, imunossupressores, anti-helmínticos, agentes antitumorais, estimuladores de crescimento de plantas e bioinseticidas (DEMAIN e FANG, 1995).

2.1.1 Produção de substâncias antimicrobianas

Os antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de bactérias. São classificados como bacteriostáticos, quando inibem o crescimento bacteriano, ou bactericidas, quando causam a morte das bactérias (PAGE, 2004). Em ambiente natural, geralmente, esses compostos promovem uma vantagem competitiva para os microrganismos produtores (SPECIAN et al., 2014).

A demonstração de Alexander Fleming no século XIX que os compostos produzidos por fungos eram capazes de impedir a proliferação microbiana, incentivou a busca de novos antibióticos. A prospecção em culturas de microrganismos ganhou destaque, principalmente em fungos e actinobactérias.

Dentre os fármacos de importância terapêutica para doenças infecciosas, encontra-se a penicilina, isolada do fungo *Penicillium*; e a cefalosporina, produzida por *Cephalosporium acremonium* (MENEZES et al., 2000; PINTO et al., 2002).

Os basidiomicetos são uma classe de fungos utilizada para fins medicinais no continente asiático por vários anos, devido a sua necessidade em produzir compostos antibacterianos e antifúngicos para sobreviver no seu ambiente natural, sendo seus metabólitos secundários foco de bastantes estudos (LINDEQUIST et al., 2005).

A literatura relata atividades antimicrobianas *in vitro* de amplo espectro por basidiomicetos, como observado no extrato etanólico do cogumelo medicinal *Ganoderma applanatum*, onde seus compostos foram capazes de inibir o crescimento tanto de bactérias gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, como de gram-positivas, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus pyogenes*, causadoras de doenças infecciosas em seres humanos (SMANIA et al., 1999).

A produção de compostos antibacterianos é também observada em cogumelos comestíveis, no caso de *Lentinula edodes*, seus metabólitos apresentaram atividade contra o *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* em um estudo realizado por Casaril et al., (2011). Atividades antifúngicas, antivirais e antiprotozoárias são demonstradas também pelos basidiomicetos (SMANIA et al., 2003; MOTHANA et al., 2003; AWADH et al., 2003; BADALYAN et al., 2003).

2.1.1.1 Resistência aos antibióticos

A primeira observação da resistência natural de microrganismos aos antibióticos foi realizada pelo pesquisador Alexander Fleming ao descobrir a penicilina em 1929 (FLEMING, 1980), descrevendo que bactérias do grupo coli-tifóide e a *Pseudomonas aeruginosa* não eram inibidas pelo antibiótico. A causa dessa resistência foi descoberta em 1940 por Abraham e Chain, que demonstraram em extratos de *Escherichia coli* uma enzima capaz de bloquear a ação da penicilina, a qual foi denominada penicilinase (ABRAHAM, 2003), e posteriormente de β -lactamase (BERTONCHELI e HÖRNER, 2008).

O aparecimento da resistência aumentou com o uso clínico disseminado de medicamentos para o tratamento de infecções bacterianas e atualmente é uma grande ameaça para a saúde humana. O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (também conhecido pela sigla MRSA – Methicillin-resistant *S. aureus*) é uma bactéria que se tornou resistente a vários antibióticos, primeiro a Penicilina em 1947, e logo depois à Meticilina. Em 2007, nos

EUA, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) informou que o número de infecções graves causadas por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) estava perto de 100.000 por ano, com quase 19.000 mortes relacionadas. Atualmente está muito propagado, principalmente em ambientes hospitalares, onde devido à resistência crescente, o *S. aureus* (estafilococo dourado) é chamado de super-bactéria (CDC, 2011). A bactéria *S. aureus* é responsável por muitas infecções hospitalares, comunitárias e intoxicações, além de algumas doenças de importância veterinária. Sua virulência deve-se à atuação das exotoxinas, enterotoxinas e enterotoxinas, além da infecção induzir a ativação anormal das células T, e suprimir a resposta imune (GELATTI e BECKER, 2009; MORK et al., 2010), sendo um dos principais patógeno humano.

A resistência adquirida é referida na maioria das espécies de bactérias, logo, os detalhes dos seus mecanismos de aquisição e os mecanismos moleculares de sua manifestação são bem conhecidos atualmente (BRECENÕ et al., 2010; COSTELLOE et al., 2010; SOUZA et al., 2007). Trata-se de fenômeno genético, relacionado a microrganismo com genes capazes de codificar diferentes mecanismos bioquímicos a fim de inibir a ação das drogas. Pode ser originada por mutações que acontecem no microrganismo durante seu processo de replicação, resultante de erros na cópia da sequência de bases nitrogenadas do DNA cromossômico, responsáveis pelo código genético; e por transferência de genes de resistência contidos nesses microrganismos através dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação (AZEVEDO, 2008).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2001), entre os fatores considerados como causadores do aumento da resistência antimicrobiana, está o uso inadequado de antibióticos, a escassez de sistemas vigilantes efetivos em cada país e região, a ausência de legislação que permita o controle no mercado de vendas de medicamentos nas farmácias e o uso prolongado de antibióticos em animais destinados para o consumo humano.

A resistência das diversas espécies de bactérias aos antimicrobianos é extremamente variável entre os países, regiões e a origem das cepas, hospitalar ou comunitária (KADOSAKI et al., 2012). De acordo com uma revisão feita por TAVARES (2000), as bactérias *Staphylococcus*, as enterobactérias, a *Pseudomonas aeruginosa*, o *Acinetobacter baumannii*, os hemófilos, gonococos, enterococos e pneumococos são as que mais se destacam entre os microrganismos que sofreram grandes modificações na sensibilidade aos antimicrobianos ao longo do tempo.

No Brasil, a maioria das cepas isoladas de estafilococos são resistentes à penicilina G, ampicilina e amoxicilina, seja em ambiente hospitalar ou na comunidade, não sendo mais

recomendado a utilização destes antibióticos para o tratamento de infecções estafilocócicas (TAVARES, 2000; SOUZA et al., 2007).

Outra bactéria resistente a penicilina é o *Streptococcus pneumoniae*, conhecido também como pneumococo, o principal agente etiológico da Pneumonia Adquirida na Comunidade (PAC) em crianças de 5 anos. Os β -lactâmicos ainda são usados no tratamento da PAC, porém em alguns países a prevalência de cepas resistentes de *S. pneumoniae* a esses antibióticos mostra-se elevada (MARCH, 2013).

Correia et al., (2007) observou que cepas de *E. coli* e *Klebsiella spp.*, isoladas de pacientes internados com infecção no trato urinário, apresentaram elevada resistência a diversos antibióticos disponíveis, como Amoxicilina, Piperacilina, Cefalotina, Ceftazidima e às Quinolonas.

As espécies *E. coli* e *K. pneumoniae* são frequentemente associadas a infecções hospitalares (GISKE et al., 2008). A primeira é bastante conhecida por causar graves infecções em imunocomprometidos, tendo variados sítios, como o pulmão e vias urinárias (FIGUEIRAL e FARIA, 2015). A *E. coli* comensal é uma bactéria que faz parte da microbiota intestinal humana, mas existem seis categorias de *E. coli* patogênicas que são a principal causa de infecção intestinal (SOUZA et al., 2016) e responsável por mais de 85% dos casos de infecção do trato urinário em comunidade e 50% em hospitais (LOPES et al., 2012).

A busca por novos antibióticos é necessária frente ao aparecimento cada vez maior da resistência bacteriana aos medicamentos empregados, e vem sendo praticada desde o surgimento da resistência, onde vários antibióticos eficazes foram descobertos através de triagens de produtos naturais microbianos ao longo dos anos (GUIMARÃES et al., 2010).

2.1.2 Produção de enzimas

As enzimas são substâncias orgânicas produzidas por células vivas e atuam como catalisadores de reações químicas. As enzimas possuem alta especificidade em relação ao substrato e grande capacidade catalítica, geralmente têm natureza protéica. São ativas, capazes de executar variadas transformações de maneira seletiva e rápida, porém essas substâncias são sensíveis ao seu ambiente, tendo sua eficiência afetada por condições físicas ou químicas, como temperatura, tratamento com álcool ou variações de pH. Portanto, a atividade enzimática é relativamente fácil de ser regulada através da alteração da natureza do meio de reação (PELCZAR Jr. et al., 2012).

As enzimas hidrolíticas são responsáveis por catalisar as reações de hidrólise de diversos substratos e são produzidas em grande variedade pelos fungos, como a protease, hidrolase, carbohidrase, amilase e celulase. Algumas delas são indispensáveis para o crescimento e manutenção do organismo em quaisquer condições. A produção de enzimas hidrolíticas por fungos é bastante explorada, com aplicações nas indústrias de detergentes, laticínios, carnes, cosméticos, couro, papel, farmácia, entre outros. Os trabalhos na produção de enzimas microbianas continuam em destaque, visto que buscam enzimas com maior eficácia e adequadas às condições químicas dos processos (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

2.1.2.1 Amilase

As amilases são enzimas responsáveis pela hidrólise das moléculas de amido para obter variados tipos de produtos e estão amplamente distribuídas na natureza por meio de animais, plantas e microorganismos (WINDISH e MHATRE, 1965). O amido é utilizado como fonte de carbono por organismos procariotos e eucariotos (PEIXOTO et al., 2003) e pode ser encontrado em vegetais, como legumes; Grânulos de cereais, tais como milho, arroz e trigo; Tubérculos; Frutas imaturas ou verdes e; Em raízes, como a batata (DERNADIN e SILVA, 2009). Trata-se de um homopolissacarídeo e sua estrutura é composta por cadeias de amilose e amilopectina. Ambas são formadas por unidades de glicose e as proporções em que aparecem diferem de acordo com a fonte botânica (Figura 1) (ELIASSON, 2004).

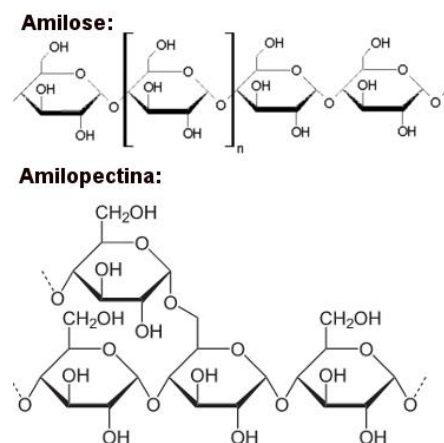


Figura 1: Estrutura dos polímeros amilose e amilopectina que constituem o amido. (Fonte: <http://www.infoescola.com>)

As amilases podem ser divididas em endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam a hidrólise na parte interna do amido, gerando como produto final oligossacarídeos e ramificações com variado tamanho de cadeia. As exoamilases atuam nas extremidades não redutoras que resulta em produtos finais curtos (SUNDARRAM e MURTHY, 2014). Essas enzimas têm uma grande relevância biotecnológica, com diversas aplicabilidades no meio industrial, como nos setores de alimentos, produtos farmacêuticos, panificação, têxtil, detergentes, cervejas, liquefação, etc (GUPTA et al., 2003; SIVARAMAKRISHNAN et al., 2006).

Embora as amilases possam ser derivadas de várias fontes, as enzimas microbianas geralmente satisfazem as exigências industriais, devido aos microrganismos apresentarem uma produção em larga escala e fácil manipulação (HITESHI e GUPTA, 2014), sendo as aplicações nos setores industriais comandadas por enzimas de fontes fúngicas e bacterianas. As amilases fúngicas são limitadas a isolados do solo, que incluem fungos filamentosos, *Aspergillus oryzae* e *Penicillium fellutanum*; basidiomicetos, *Pycnoporus sanguineus*; e leveduras, *Streptomyces rimosus* (SUNDARRAM e MURTHY, 2014).

2.1.2.2 Celulases

A celulose é um biopolímero composto por várias unidades de glicose conectadas entre si por ligações químicas (Figura 2). Trata-se da substância orgânica de renovação mais abundante na natureza e a sua degradação por microrganismo é a maior fonte de carbono para o solo (LYNCH et al., 1981). As celulases são enzimas capazes de hidrolisar a molécula de celulose através do rompimento das ligações glicosídicas de suas microfibrilas. A reação resulta na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose (DILLON, 2004).

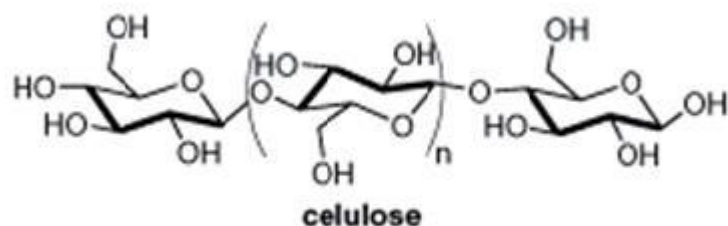


Figura 2: Estrutura da celulose. (Fonte: FERREIRA et al., 2009)

A classificação das celulasas abrange três grupos, denominados de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as endoglucanase, exoglucanase e beta-glucosidase. As endoglucanases atuam na região interna da fibra de celulose e tem como produto final os oligossacarídeos. As exoglucanases agem na região externa da fibra celulósica e liberam unidades livres de glicose ou celobiose. As beta-glucosidases hidrolisam a celobiose e resulta na liberação de glicose (LYND et al., 2002).

As celulasas são de fundamental importância para a eficiente bioconversão de resíduos de plantas, e elas são promissoras pela grande variedade de aplicações biotecnológicas, com utilização nas indústrias de detergente, alimentos, papel, têxtil e polpa de celulose (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004). Além de participar nos processos de reciclagem e principalmente na produção de etanol de segunda geração (MACIEL, 2016).

Fungos filamentosos, especialmente os basidiomicetos, são eficientes degradadores de biopolímeros de paredes de plantas devido à produção de uma bateria de enzimas extracelulares, como celulasas. Portanto, a produção dessa enzima está disseminada entre os fungos e incluem espécies de ascomicetes, como *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e *Penicillium decumbens* (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; ZÚÑIGA et al., 2011; LIU et al., 2011); basidiomicetos, tais como *Lentinula edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Fomitopsis pinicola* (CARVALHO et al., 2011; NUNES et al 2015; PARK et al., 2015); e poucas espécies anaeróbicas, *Orpinomyces* (LI, 2004).

O aproveitamento da biomassa vegetal residual como fonte de energia renovável diminui uma parte da utilização de combustíveis fósseis, que têm contribuído para impactos negativos no meio ambiente. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e derivados, o que torna o processo de produção de etanol mais viável. O etanol já é produzido no país, e o processo é integrado à produção do açúcar, diminuindo assim os custos de ambos os processos, principalmente com o uso de enzimas celulolíticas (CAMARGO, 2007), portanto, é importante descobrir micro-organismos que efetivamente secretem estas enzimas no metabolismo primário.

2.2 *Fomitopsis* P. KARST

O *Fomitopsis* é um gênero proposto por P. Karsten em 1881, pertencente a classe Agaricomycetes (KIRK et al., 2008). Apesar da maioria das suas espécies serem encontradas nas zonas boreais e temperadas, esse macrofungo é considerado cosmopolita. O *Fomitopsis*

causa uma podridão marrom parda, ou cúbica em coníferas vivas ou mortas e folhosas. Além de apresentar basidiocarpos perenes ou raramente anuais, caracterizados pela superfície poros branco a rosado (Figura 3); e basidiospоро subgloboso, cilíndrico, hialino e liso (RYVARDEN e GILBERTSON, 1993).



Figura 3: Basidiocarpo de *Fomitopsis pinicola*. (Fonte: <http://mykoweb.com>)

A cultura do *Fomitopsis* é definida por seu aspecto aveludado ou cotonoso (algodão) e coloração branca, raramente pigmentada (Figura 4), com crescimento por toda a superfície da placa após aproximadamente quatorze dias (VELAZQUEZ, 1985).



Figura 4: Cultura de *Fomitopsis feei*. (Fonte: NIDADAVOLU et al., 2012)

Os compostos produzidos por *Fomitopsis* apresentam diversas propriedades biológicas, que incluem atividades antioxidantes, antitumorais (CHOI et al., 2007), anti-inflamatórias (LEE et al., 2007) e antimicrobianas (GULER et al., 2009).

Nidadavolu et al., (2011) demonstrou a capacidade dos metabólitos secundários produzidos por *F. feei* de inibir várias bactérias patogênicas humanas, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Micrococcus luteus* e *Proteus mirabilis*. Portanto, algumas substâncias bioativas já foram isoladas das espécies de *Fomitopsis*, como os compostos ácido 3 α -acetiloxilano-8,24-dien-21-oico e ácido piloporênico isolados do *F. pinicola*, os quais apresentaram atividade contra *Bacillus subtilis* (KELLER et al., 1996). Posteriormente, foi isolado outros compostos do extrato de *F. rosea* pertencentes a classe triterpenóide que mostraram ser ativos contra a bactéria *S.aureus* (POPOVA et al., 2009).

Hwang et al., (2013) isolou quatro cumarinas cloradas com atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, são: 1. 6-cloro-4-fenil-2H-cromen-2-ona; 2. 6-Cloro-2-oxo-4-fenil-2H-cromeno-3-carboxilato de etilo; 3. 7-Cloro-4-fenil-2H-cromen-2-ona; 4. 7-Cloro-2-oxo-4-fenil-2H-cromeno-3-carboxilato de etilo, todas do fungo *F. officinalis* (Figura 5).

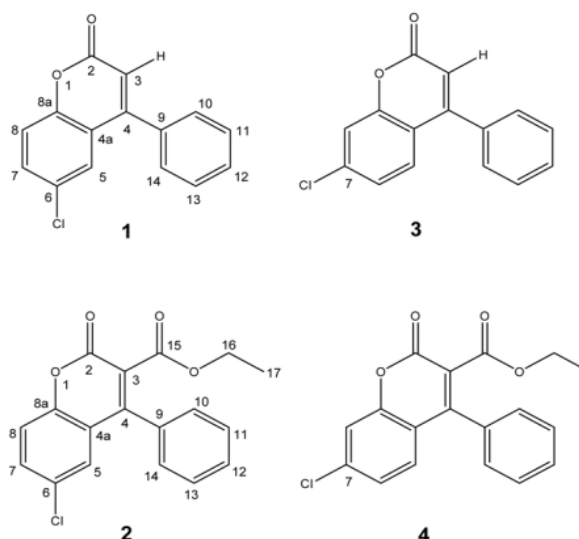


Figura 5: Forma estrutural dos compostos cumarinas isoladas do *Fomitopsis officinalis*. (1) 6-cloro-4-fenil-2H-cromen-2-ona; (2) 6-Cloro-2-oxo-4-fenil-2H-cromeno-3-carboxilato de etilo; (3) 7-Cloro-4-fenil-2H-cromen-2-ona; (4) 7-Cloro-2-oxo-4-fenil-2H-cromeno-3-carboxilato de etilo. (Fonte: HWANG et al., 2013)

Além dos compostos antimicrobianos, o *Fomitopsis* está entre os fungos destacados pela produção de enzimas de interesse industrial (KUHAD e SINGH, 2013). O isolado *Fomitopsis* sp. RCK2010 demonstrou ser um bom produtor de celulases distintas em testes sob fermentação em estado sólido, com produção aumentada de carboximetilcelulase e β -glucosidase quando utilizado farelo de trigo e ureia, como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente (DESWAL et al., 2011). Em contrapartida, a produção de β -glucosidase e

endoglucanase por *F. pinicola* foi observada utilizando como substrato o carboximetilcelulose (CMC) (PARK et al., 2015).

O grupo de Yoon (2006), por meio da engenharia genética, purificaram a glucoamilase, um tipo de amilase, a partir do *F. palustris*. Estes resultados sugerem que o *Fomitopsis* pode produzir uma variedade de enzimas extracelulares, incluindo celulase e amilase.

Estudos sobre os metabólitos produzidos por fungo são necessários para predizer a (s) substância (s) responsável (is) por promover atividades biológicas e, assim, aumentar a possibilidade de encontrar novos produtos para o mercado industrial.

O conhecimento sobre *Fomitopsis* ainda é escasso no Brasil e apenas seis espécies são citadas no país: *F. cupreorosea*, *F. feei*, *F. lilacinogilva*, *F. meliae* (Underw.) Gilb, *F. nivosa* (Berk.) Gilb. & Ryvarden e *F. rosea* (Alb. & Schwein.) P. Karst, como ilustrado na Figura 6 (GUGLIOTTA et al. 2015).

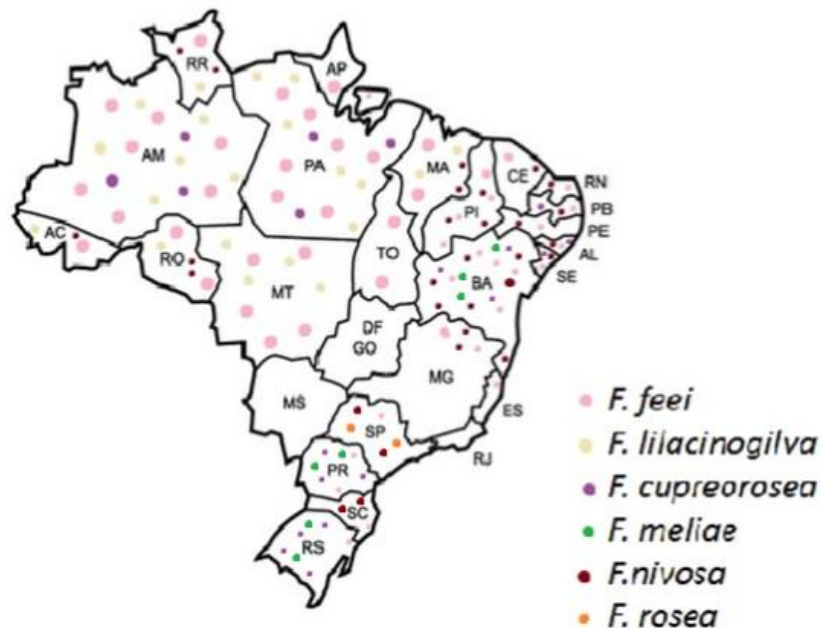


Figura 6: Distribuição geográfica das espécies do *Fomitopsis* no Brasil.

Na Amazônia brasileira são relatadas as espécies *F. lilacinogilva*, *F. feei*, sendo a última também encontrada no estado de Pernambuco e no semi-árido brasileiro. O *F. cupreorosea* foi encontrado nos estados do Amazonas, Pará e Pernambuco, enquanto a espécie *F. nivosa* é encontrada no semi-árido brasileiro, Nordeste do Brasil e o estado do Acre, Rondonia e Roraima (GOMES-SILVA et al. 2015). Dessa maneira, no Brasil existem

poucos estudos sobre as atividades biológicas desse fungo com grande importância biotecnológica em outros países.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos metabólitos produzidos pelo fungo *Fomitopsis* CBA-452 isolado da região amazônica, e o potencial de produção enzimática deste isolado.

3.1 Objetivos Específicos

- Identificar o fungo CBA-452 a partir de sua morfologia e por técnicas moleculares;
- Analisar os extratos dos metabólitos do fungo CBA-452 visando separar as substâncias bioativas;
- Avaliar a atividade enzimática *in vitro* do isolado CBA-452.

CAPÍTULO I

Atividade antimicrobiana e enzimática do fungo *Fomitopsis sp.*

Atividade antimicrobiana e enzimática do fungo *Fomitopsis sp.*

CHAVES, J.V¹; PROCÓPIO, R.E.L¹

(1) Universidade do Estado do Amazonas

Resumo

Devido à potencialidade dos cogumelos como produtores de compostos antimicrobianos e enzimas de interesse biotecnológico, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e enzimática do *Fomitopsis* CBA-452. Uma árvore filogenética foi realizada para identificar o isolado fúngico a nível de espécie. Os extratos do isolado foram obtidos através de partição líquido-líquido com hexano, acetato de etila e n-butanol. Para a avaliação da atividade antibacteriana desses extratos, foi realizado o método de difusão em disco contra as bactérias patogênicas humanas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Os extratos bioativos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) e utilizou-se reveladores químicos para identificar as substâncias presentes nos extratos. Em seguida, um teste de bioautografia foi realizado para selecionar as substâncias bioativas. O potencial enzimático foi avaliado para a produção de amilase e celulase pela formação de halo de degradação de seus respectivos substratos em meio mínimo. A sequência do isolado fúngico teve 99,8% de similaridade com a da espécie *Fomitopsis durescens* e seu extrato em acetato de etila apresentou atividade antimicrobiana frente à cepa-padrão *Staphylococcus aerus*. O fungo estudado também demonstrou ser produtor de amilase e celulase com índice enzimático de 0,52 para produção amilolítica e de 1,02 para produção celulolítica. Apesar das substâncias bioativas na bioautografia não terem sido identificadas, o estudo mostrou que o *Fomitopsis* pode ser uma boa fonte de metabólitos de interesse industrial.

Palavras-Chave: Basidiomicetos. Bioatividade. Compostos antimicrobianos. Enzimas hidrolíticas.

1. INTRODUÇÃO

O surgimento crescente da resistência bacteriana aos medicamentos acessíveis e a busca por enzimas mais eficazes aumentam a necessidade da procura por novas fontes promissoras de biomoléculas na natureza. Os basidiomicetos, conhecidos como cogumelos, produzem compostos antibacterianos e antifúngicos para sobreviver em condições naturais, sendo utilizados por anos na medicina asiática (SHARMA et al., 2014). Além disso, esses macrofungos, como todos os outros fungos, não são organismos fotossintéticos, logo, produzem um leque de enzimas que degradam materiais lignocelulósicos presentes na madeira para o seu crescimento e frutificação (CHANG e BUSWELL, 1996).

O *Fomitopsis* é um basidiomiceto com propriedades antioxidantes, antitumorais, anti-inflamatórias e antimicrobianas (CHOI et al., 2007; LEE et al., 2007; GULER et al., 2009). Suas espécies crescem sobre a madeira e são classificadas como fungos decompositores de madeira. Portanto, degradam substratos da parede celular da madeira para o seu crescimento, com consequente secreção de celulase, hemicelulase e ligninase (ISENMANN, 2012), enzimas de interesse biotecnológico.

Sendo assim, as espécies do *Fomitopsis* têm grande capacidade em produzir substâncias antibacterianas e enzimas extracelulares. Nidadavolu et al., (2011) observou produção de metabólitos secundários fortemente ativos por *F. feei* contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, causadoras de infecção urinária e dermatites, respectivamente, entre outras doenças graves. Em outro estudo, os compostos produzidos por *F. pinicola* tiveram atividade contra a bactéria causadora da intoxicação intestinal, a *Bacillus cereus* (LIU X-T et al., 2010).

Em relação à atividade enzimática, estudos observaram produção de celulases, lacases e maganês-peroxidases (GU e PARK, 2013; KNEŽEVIĆ et al., 2013; PARK e PARK, 2014; PARK et al., 2015) por *F. pinicola*. Produção de amilases com consequente purificação de glucoamilase foi relatada em *F. palustris* (YOON, 2006).

Dentro do exposto, o *Fomitopsis* pode ser promissor como produtor de compostos antimicrobianos e enzimas extracelulares, sendo uma valiosa fonte para a obtenção de biomoléculas com propriedades distintas e variadas. Entretanto, o conhecimento sobre as atividades biológicas do *Fomitopsis* ainda é escasso no Brasil, principalmente na região norte

do país, onde são citadas apenas o *F. cupreorosea*, *F. feei* e *F. lilacinogilva* (GUGLIOTTA et al. 2015).

Pesquisas que avaliem a atividade antibacteriana dos metabólitos secundários e atividade enzimática de microrganismos pertencentes às regiões pouco exploradas são necessárias para encontrar novas fontes produtoras de biomoléculas com potencial para aplicação industrial.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os bioensaios foram realizados na Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas e os testes cromatográficos efetuados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

2.1 Material Biológico

O presente trabalho tem como base experimentos preliminares efetuados no Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), onde foi realizado o isolamento de fungos do solo da cidade de Manaus, Amazonas, e testado a bioatividade dos mesmos. Entre os isolados, o fungo CBA-452 apresentou atividade antimicrobiana e foi identificado previamente como pertencente ao gênero *Fomitopsis*, sendo depositado na Coleção de Culturas do CBA. Este trabalho teve a intenção de realizar novos testes com este fungo e melhorar a sua identificação.

As bactérias utilizadas para os ensaios de antibiose, e que são recomendadas para os testes de susceptibilidade a antibióticos, foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

2.3 Caracterização morfológica e molecular

A caracterização morfológica foi realizada por meio da análise do aspecto, coloração e textura da colônia. Essa observação foi feita com o fungo cultivado no meio Batata- Dextrose-Ágar (200 g L⁻¹ de batata, 20 g L⁻¹ de dextrose e 15 g L⁻¹ ágar) por 10 dias a 28°C (NOBLES, 1948 adaptado).

A caracterização molecular foi realizada com a extração do DNA, seguida pela amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer). Para extração de DNA, o fungo foi crescido em meio líquido Extrato de Malte por agitação durante 7 dias a 28°C a 150 rpm. Em seguida, o micélio foi filtrado com papel filtro e posteriormente macerado e realizada a extração do DNA total, segundo o protocolo do kit NucleoSpin®Tissue (Macherey-Nagel). O DNA foi estocado a -20 °C.

Os fragmentos do gene do DNA foram amplificados a partir do DNA genômico pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando as regiões não codificadoras ITS-1 e ITS-4, bem como a região 5.8S do DNA ribossomal. Os *primers* universais utilizados foram ITS-1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) e ITS-4 (5'- 39 TCCTCCGCTTATTGATATGC) (RISTAINO et al, 1998). Posteriormente, os produtos de PCR obtidos foram purificados com kits PureLink (Invitrogen), em seguida, seqüenciados.

Para o sequenciamento do DNA foi utilizado o kit Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Life Technologies). O volume total das reações foi de 20 µL (4 µL de Ready Reaction Premix 2.5X, 2 µL de BigDye, Sequencing Buffer 5X, 3,2 pmol de primer, 4 ng DNA, e água Milli-Q).

As seqüências obtidas foram analisadas através do programa SeqMan™ II (DNA Star Inc.). Foram utilizadas as seqüências com padrão de qualidade *phred* maior que 20. O arquivo no formato FASTA foi avaliado através de um “*script*” computacional, que separa as sequencias FASTA de melhor qualidade e maior tamanho de pares de bases (pb). Para o agrupamento das sequencias utilizou-se o programa CAP3. As comparações dos arquivos foram realizadas com banco de dados do GenBank (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando o programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1997), configurado na opção “blastn”. Para a construção da filogenia foi utilizado software CLC Sequence Viewer 7 (<http://www.clcbio.com/>).

2.4 Obtenção dos metabólitos secundários do fungo

2.4.1 Preparação do inóculo

O isolado CBA-452 foi semeado em meio BDA e incubado em estufa a 28°C por 14 dias. O conteúdo de toda a placa com o fungo crescido foi adicionado em 150 mL de meio líquido BD (Batata-Dextrose) e incubado por 28 dias a 28°C. Após incubação, o micélio foi

separado do meio líquido por filtração em papel de filtro para a obtenção do extrato aquoso, o qual foi submetido à partição líquido-líquido (CARVALHO, 2011 adaptado).

2.4. 2 Partição Líquido-Líquido

O extrato aquoso foi submetido à partição líquido-líquido com solventes de baixa, média e alta polaridade, utilizando hexano, acetato de etila e n-butanol (1:1), nesta ordem, e então cada produto extraído foi concentrado a um volume mínimo de 50 mL em evaporador rotatório sob pressão reduzida em banho-maria à 50°C durante 10 minutos. Em seguida, o volume obtido foi congelado durante 24h e posteriormente liofilizado por 72h. (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998 adaptado, CARVALHO, 2011 adaptado).

2.5 Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos do fungo

A avaliação da atividade antibacteriana dos extratos em hexano, acetato de etila e n-butanol do isolado CBA-452 foi avaliada através de um ensaio biológico qualitativo, o método de difusão em disco (NCCLS, 2003).

As bactérias utilizadas no método foram cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, as quais são indicadas para testes de antibióticos.

2.5.1 Método de difusão em disco

Para os testes de antibiose, as bactérias indicadoras foram reativadas em placas contendo meio Triptona de Soja Agar (TSA) durante 24 horas. Em seguida, cultivadas em meio líquido TSB e incubadas a 37°C com agitação de 160 rpm por 24 horas. Estes microrganismos foram diluídos com solução salina 0,85 %, conforme padronização com o tubo 0,5 da escala de McFarland (0,05 mL de cloreto de bário a 1,0 % + 9,95 mL de ácido sulfúrico a 1,0 %), equivalendo a 10⁸ UFC/mL.

As bactérias padronizadas foram inoculadas com auxílio de um swab estéril, por toda a placa de petri, contendo o meio Ágar Müeller-Hinton. Os extratos de hexano, acetato de etila e n-butanol foram diluídos com etanol. Discos de papel de 6 mm foram colocados em

microtubos contendo 100 µL do extrato metabólico para melhor absorção, em seguida, posicionados na parte central de cada placa semeada. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para realização da medição do diâmetro dos halos de inibição com régua de precisão (OSTROSKY et al. 2008). A gentamicina foi utilizada como medicamento padrão e como controle negativo o etanol. Os bioensaios foram realizados em duplicata.

2.6 Cromatografia em Camada Delgada e Bioautografia

Os extratos fúngicos que se mostraram bioativos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), com cromatoplasmas de sílica em suporte de alumínio (20 x 20 cm – Marca: Macherey-Nagel). Como reveladores foram utilizados vapores de iodo, anisaldeído, cloreto de ferro, cloreto de alumínio, KOH 10%, dragendorf, DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazila), sulfato cério, bourcharadt e luz na região do ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm (TANANTA et al., 2012). Em seguida, um teste de bioautografia foi realizado para selecionar as substâncias bioativas, onde a cromatoplasma foi inserida em uma placa de petri recoberta com Ágar Müeller-Hinton. As bactérias indicadoras foram inoculadas sobre a superfície do ágar e depois as placas semeadas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para realização da leitura do diâmetro dos halos de inibição através da adição do corante revelador INT (Cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazólio) (SOUZA et al., 2007).

2.7 Avaliação do potencial enzimático do fungo

Para avaliar o potencial enzimático do isolado CBA-452, utilizou-se o método qualitativo que consiste em cultivar o fungo em meios específicos para produção de cada enzima e avaliar o halo produzido (DINGLE et al., 1953).

O fungo foi cultivado em meio BDA por 14 dias a 28°C. Após o crescimento, o fungo foi repicado para o centro das placas contendo os meios específicos para cada enzima. Foram feitas três repetições (por enzima) e as placas foram incubadas a 28°C durante sete dias. Após esse período, as placas cultivadas foram reveladas para a visualização do halo.

2.7.1 Teste enzimático para amilases

O meio de cultura para avaliar a atividade de amilases foi Ágar-amido (10 g L⁻¹ de amido; ágar 18 g L⁻¹; 50 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0). O amido e o ágar foram dissolvidos em 100 mL de água destilada, depois adicionado 50 mL do tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 5,0) na solução e homogeneizado. Em seguida, o meio de cultura foi esterilizado.

A solução de iodo (0,89 g de cristal de iodo e 40 mL de água destilada) foi utilizada para a revelação das placas, após o período de incubação. A atividade amilolítica positiva foi detectada pela formação de um halo claro ao redor do fungo.

2.7.2 Teste enzimático para celulasas

Para avaliar a atividade de celulasas, utilizou-se Ágar-CMC (10 g L⁻¹ de CMC; 18g L⁻¹ de ágar; 50 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH, 5,0). A Carboximetilcelulose (CMC) foi dissolvida em 100 mL de água destilada com 50 mL do tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) e, posteriormente, adicionado o ágar na mistura até sua homegenização. O meio de cultura foi esterilizado.

O lugol foi utilizado como solução reveladora para a verificação da atividade celulolítica. A reação enzimática foi identificada pela formação de um halo translúcido em volta do fungo, após a adição do lugol.

2.6.3 Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática foi efetuada de acordo com a metodologia descrita por HANKIN e ANAGNOSTAKIS (1975), por meio do índice enzimático, o qual foi determinado através da divisão do diâmetro do halo de degradação em mm pelo diâmetro da colônia em mm, formando a seguinte fórmula:

$$IE = \frac{\text{Diâmetro do halo de degradação}}{\text{Diâmetro da colônia}}$$

Sugere-se a produção de enzima de interesse se o índice enzimático for maior do que 1,0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação taxonômica do fungo

As análises das características micro-morfológicas, utilizada para a identificação taxonômica do fungo CBA-452 pelo presente trabalho, foi insuficiente para a identificação do gênero, devido a não esporulação. A colônia do fungo apresentou aspecto cottonoso e coloração branca (Figura 1), com crescimento em toda a superfície do ágar após onze dias da inoculação.

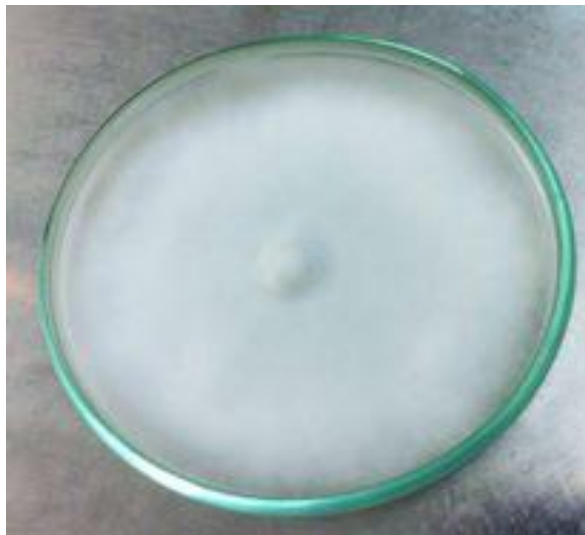


Figura 1: Cultura do fungo CBA-452 em meio Batata-Dextrose-Agar

Outro trabalho realizado pelo Nidadavolu et al., (2012), observou características similares da colônia de *F. feei* cultivado em meio extrato de malte.

Em relação à identificação molecular, a partir do DNA extraído do fungo em estudo, foi possível amplificar (Figura 2) e sequenciar a região ITS do rDNA desse microrganismo de aproximadamente 570pb. A seqüência obtida apresentou boa qualidade, sem a presença de N, como pode ser visto no quadro 1.

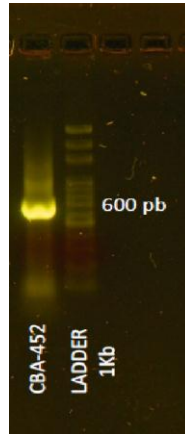


Figura 2: Produto de PCR do fungo CBA-452 em gel de agarose 1%.

Quadro 1: Sequência de DNA da região ETS do fungo CBA 452.

```
GGGCGGCATGTGCACGCCCTGATCACTATCCATCTATACACCTGTGCACACACTGTAGGTTGGCTTGTGATTGGAGCCACGGTCTTCATTGA
CTTTGCTCTGGTTGGAGGCCCTCCTATGTATTATCACAACACTTTCAGTTTAAAGAATGTACTCTTGCGTCTAACGCATTTGAATACAAC
TTCARCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA
TCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGGAGTGCATGGAATTCTCAACTCTATTTGCTTTTGTGAATAG
AGCTTGGATTTGGAGGTTTTATTGCTGGTACTTGTGATCGGCTCCTCTTGAATGCATTARCTCGAACCTTTGCGGATCAGCTATCGGTGTGA
TAATTGCTTACGCCGTTGCAGTGAAGCATATCAATGGGCTCGGCTTCCAATCGTCTTTACTGGACAATGACTTTGACCTTTGACCTCAAAT
CAGGTAGGATACCCGCTGAACTTA
```

A sequência foi alinhada com auxílio da ferramenta BLAST e comparada com outras sequências do GenBank, sendo estas linhagens padrões e descritas na literatura (Tabela 1), onde apresentou similaridade com o gênero *Fomitopsis*.

Tabela 1: Linhagens do gênero *Fomitopsis* similares à sequência do fungo CBA-452

GenBank [®]	Isolados	Referências
KF937293.1	<i>F. durescens</i> 4215	HAN et al., 2014
FJ372684.1	<i>F. ostreiformis</i> BCC23382	RUNGJINDAMAI et al., 2008
AJ608951.1	<i>Fomitopsis</i> sp. FFI 143	SABEV et al., 2006
KC585352.1	<i>F. palustris</i> MS 48	ORTIZ-SANTANA et al., 2013
DQ491404.1	<i>F. palustris</i> CBS 283.65	KIM et al., 2007
EU015881.1	<i>Fomitopsis</i> sp. IMER2	XIONG et al., 2007

A árvore filogenética, apresentada na figura 3, mostrou que o fungo CBA-452 apresenta maior similaridade (99,8%) com o fungo da espécie *Fomitopsis durescens*.

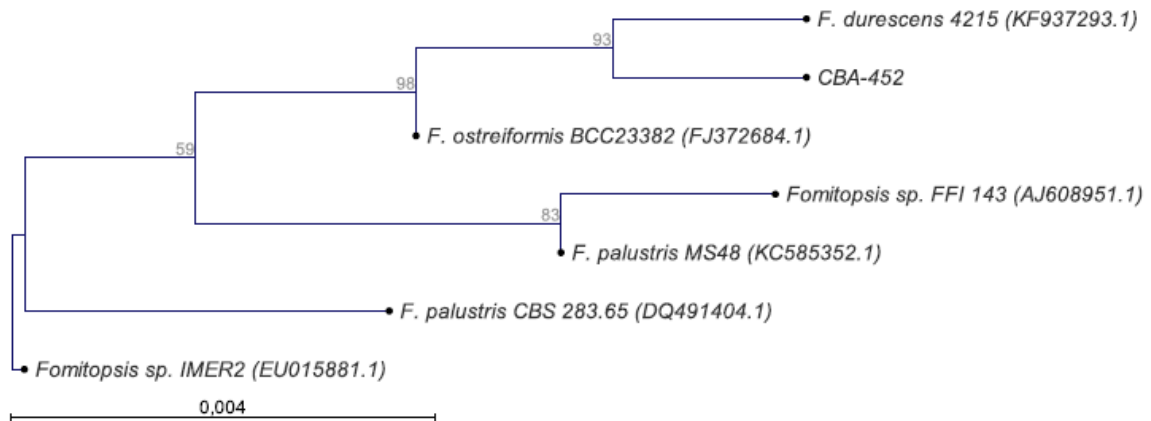


Figura 3: Árvore filogenética da sequência do *Fomitopsis sp.* CBA-452

Nenhum estudo publicado relatou o aparecimento dessa espécie na região amazônica, logo, suas exigências nutricionais são desconhecidas neste ambiente. Essa espécie já foi encontrada em regiões da América do Norte (GRAND e VERNIA, 2006), mas pouco se tem conhecimento sobre suas propriedades biológicas. Outros testes moleculares mais detalhados são necessários para a confirmação da espécie do fungo estudado.

3.2 Determinação da atividade antibacteriana dos extratos do fungo

Observou-se que o isolado *Fomitopsis sp.* CBA-452 apresentou capacidade de inibir o crescimento da bactéria *S. aureus* ATCC 25923. A formação do halo de inibição do extrato fúngico de acetato de etila sugeriu que o isolado tem potencial para ser utilizado como antibiótico (Figura 4). Os basidiomicetos precisam inibir microrganismos que competiriam pelos mesmos nutrientes no ambiente natural, portanto, produzem substâncias antimicrobianas para a sua sobrevivência (LINDEQUIST et al., 2005). Os extratos hexânico e butílico não apresentaram atividade contra nenhuma das bactérias indicadoras testadas.



Figura 4: Atividade antimicrobiana do extrato acetato de etila do fungo *Fomitopsis* sp. frente à *S. aureus* ATCC 25923.

Os dados obtidos condizem com os encontrados por Dresh et al., (2015), que relatou em extratos etanólicos de *F. pinicola*, uma boa bioatividade em gram-positivas com concentração inibitória mínima (CIM) de 31-125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *B. subtilis* e de 31-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *S. aureus*, e nenhuma inibição nas gram-negativas testadas, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Assim como o estudo efetuado por Bala et al., (2012), onde os extratos de *F. lilacinogilva* mostraram-se ativos também apenas contra a gram-positiva *Bacillus cereus*. Esses resultados podem indicar que os compostos bioativos das espécies desse fungo têm mecanismo de ação maior contra bactérias gram-positivas.

Entretanto, apenas o extrato em acetato de etila do isolado estudado mostrou atividade bacteriana entre os extratos testados. Trata-se de um solvente de média polaridade, separando diferentes grupos de metabólitos por meio da sua polaridade. Wenzell et al., (2013) relacionou a atividade de extratos de fungos endofíticos em acetato de etila a certos grupos de compostos fenólicos que são melhores extraídos por esse solvente. Dentre os compostos fenólicos encontram-se estruturas derivadas de cumarina e as que fazem parte de alcalóides, terpenóides e proteínas (PROENÇA DA CUNHA et al., 2003).

O isolamento de triterpenos já foi possível com fracionamento utilizando o acetato de etila em um Basidiomycete conhecido como *Gasteromycete*, que apresentaram ação antimicrobiana (ANTONIOLLI et al., 2013). Contudo, Yoshikawa et al., (2005) isolou triterpenóides lanostane e terpenos glicosídeos do extrato etanólico do corpo frutífero de *F. pinicola*, mas não demonstraram atividade antimicrobiana.

O extrato em acetato de etila do fungo estudado apresentou diâmetro de zona de inibição inferior à encontrada no controle positivo para *S. aureus* (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de hexano (HEX), butanol (BUT) e acetato de etila (AC/ET) do fungo *Fomitopsis* sp.

BACTÉRIAS INDICADORAS	HALO DE INIBIÇÃO (mm)				
	C (-)	C (+)	HEX	AC/ET	BUT
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	24	-	10	-
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	-	20	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	21,5	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	-	16	-	-	-

1. (C) - Controle negativo

2. (C) + Controle positivo

3. (-) indica ausência de halo

4. Os valores dos halos indicados na tabela correspondem à média de três repetições.

A baixa atividade antibiótica do *Fomitopsis* CBA-452 pode ser devido à ausência de estresse encontrado em condições naturais ou fatores que potencializem a produção de biomoléculas bioativas *in vitro*.

Uma comparação entre cepas de *Fomitopsis* isoladas de diferentes coníferas constatou que a produção qualitativa e quantitativa de metabólitos secundários e sua bioatividade diferem entre cepas da mesma linhagem, sugerindo-se que o substrato pode influenciar na produção de metabólitos (DRESH et al., 2015).

Outro influente na bioatividade microbiana são os meios de cultura. RAMOS (2008) observou melhor atividade antimicrobiana em extrato acetato etílico, de um fungo endofítico quando cultivado no meio Czapek, e aumento da atividade ao ser utilizada sacarose como fonte de carbono e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio.

Diferentes autores relatam que a produção de antibióticos esteja não somente relacionada aos constituintes do meio de cultura, como também tempo de incubação, velocidade da agitação, temperatura, pH e nutrientes (FATIMA et al., 2016; BALAKUMARAN et al. 2016; PFEFFERLE et al., 2000; ARORA et al., 2016).

É importante ressaltar que o resultado positivo do medicamento padrão demonstra a eficácia do método e a ausência de positividade do controle negativo, sugere que o etanol não interferiu no teste. Sendo assim, é necessário mais estudos sobre a otimização de condições de cultivo de basidiomicetos isolados na Amazônia, para melhor compreensão das suas

exigências biológicas, e aumentar a similaridade das técnicas *in vitro* com as condições naturais.

3.3 Análise do extrato fúngico bioativo em cromatografia em camada delgada e bioautografia

A análise em CCD do extrato de acetato de etila com os reveladores químicos possibilitou indicar a possível presença de terpenos e esteróides quando reveladas com anisaldeído, apresentando manchas de cor violeta ou lilás e cor cinza quando reveladas com sulfato cérico (JORK et al., 1990). A revelação por vapores de iodo confirmou a presença de compostos insaturados (WALL, 2005). Além disso, o revelador DDPH sugeriu a presença de compostos fenólicos com a mudança de cor de violeta para um amarelo (BANERJEE e DASGUPTA, 2005) e observada à intensificação de algumas manchas quando adicionado o cloreto de alumínio seguido de submissão a UV no comprimento de onda 365nm (Figura 5).

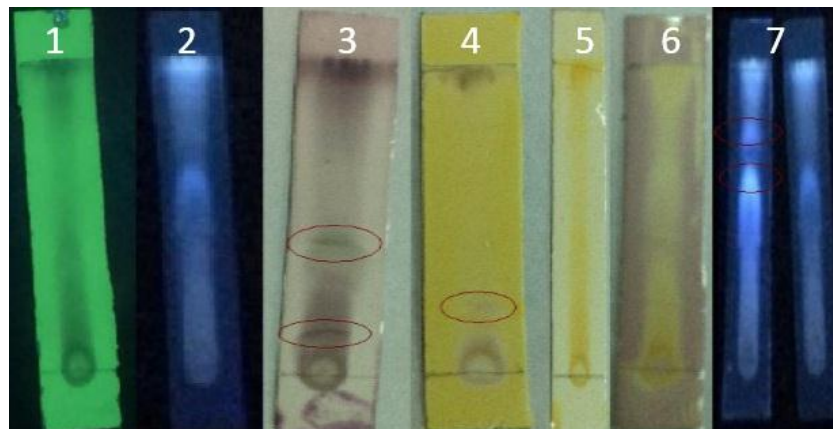


Figura 5: Cromatoplasas do extrato fúngico de acetato de etila reveladas com UV 254nm (1) e 365nm (2), anisaldeído (3), sulfato cérico (4), iodo (5), DPPH (6) e cloreto de alumínio (7).

Os resultados encontrados sugerem vários compostos insaturados presentes no extrato fúngico com acetato de etila e alguns descritos na literatura como sendo bioativos. A classe de terpenos ou terpenóides foi identificada nas espécies de *Fomitopsis* em outros estudos. Liu X-T et al., (2010), demonstrou a bioatividade dos compostos triterpenóides lanostane e esteróides através do método de difusão em disco, ambos isolados do extrato bruto de *F. pinicola* e com capacidade de inibir o crescimento de *Bacillus cereus*. Ademais, diversos tipos de cumarinas já foram isoladas do extrato etanólico de *F. officinalis* e, apesar do espectro de

ação limitado da atividade antibacteriana, tiveram ação contra a *Mycobacterium tuberculosis* (HWANG et al., 2013).

Embora tenha sido demonstrada atividade antimicrobiana contra *S. aureus* pelo método de difusão em ágar, não houve inibição de crescimento bacteriano na região de aplicação do extrato de acetato de etila pela bioautografia (Figura 6), provavelmente devido a concentrações muito baixa da substância ativa.

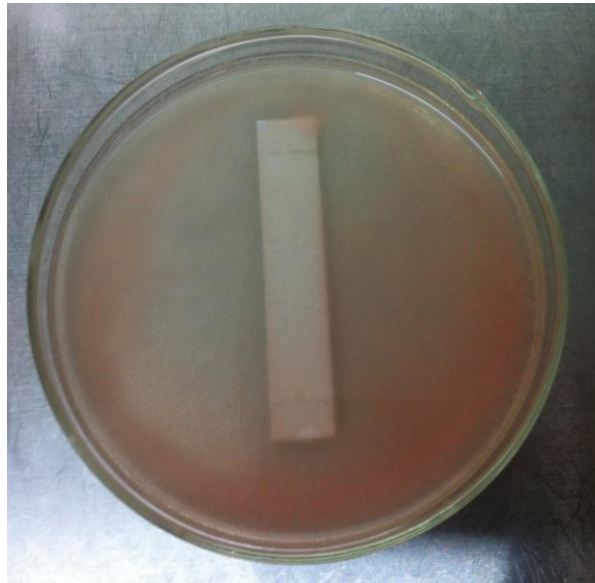


Figura 6: Bioautografia da cromatoplaça do extrato fúngico

SOUZA et al., 2007 obteve resultado semelhante com extratos da casca da árvore “barbatimão” frente a *E.coli*, onde foi possível observar o halo de inibição no método qualitativo, mas nenhuma zona de inibição na bioautografia.

A bioautografia confere a análise de substâncias, ou classes de substâncias que são ativas sobre um determinado microrganismo, através da separação cromatográfica anteriormente realizada à incubação da placa contendo o meio de cultura inoculado (MAGALHÃES et al., 2007). Portanto, não foi possível a identificação das substâncias bioativas extraídas do isolado estudado.

3.4 Determinação da atividade enzimática do fungo

O *Fomitopsis* sp. CBA-452 degradou a celulose e o amido, mostrando ser capaz de produzir celulasas e amilases. O resultado positivo pode ser observado pela formação de halos

claros ao redor da colônia (indicativos da degradação dos substratos), como ilustrado na figura 7^{ab}.

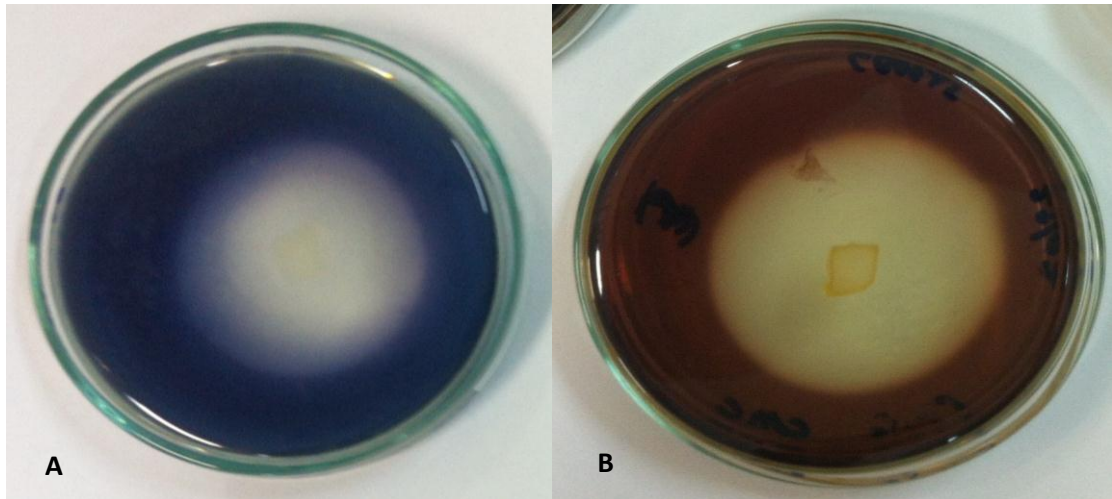


Figura 7: Teste qualitativo de produção de amilase (A) e celulase (B) pelo *Fomitopsis* sp. CBA-452, após revelação com solução de iodo e lugol, respectivamente.

O Índice Enzimático correlaciona diretamente o tamanho do halo e a capacidade degradativa dos isolados microbianos, possibilitando a comparação da produção enzimática de diferentes microrganismos. Índices maiores que 1,0 sugerem a ocorrência de excreção de enzimas (FUNGARO e MACCHERONI, 2002).

O fungo em estudo demonstrou maior produção de celulase com índice enzimático acima de 1,0 (Tabela 3). Esses dados coincidem com os encontrados por Souza et al., (2008), que através de um estudo com linhagens de Basidiomycetes, observou que todos os isolados produziram celulases e 40% produziram amilases, sendo que o maior halo de celulase foi de 21,4 mm e de amilase foi 17,5 mm, porém o índice não foi analisado. Enquanto que neste presente estudo os halos foram maiores em ambas as enzimas, o isolado apresentou halo com diâmetro de 44 mm para celulase e 20,6 mm para amilase.

Tabela 3: Atividade de amilase e celulase do *Fomitopsis* sp. CBA-452, avaliada através do índice enzimático (IE)

	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (mm)		
	Halo de crescimento	Halo de degradação	IE
AMILASE	39	20,6	0,52
CELULASE	43	44	1,02

A maior produção de celulase pode ser explicada pelo fato do *Fomitopsis* ser um fungo decompositor de madeira, logo, em ambiente natural degrada materiais lignocelulósicos para seu crescimento, com eventual produção de enzimas, e a celulose é o componente mais abundante entre os substratos presentes na parede celular da madeira (cerca de 50%) (CHANG; BUSWELL, 1996), podendo ser melhor utilizada como fonte de carbono do que o amido por essa classe de fungos.

Jo et al., (2011), demonstrou produção de diversas enzimas lignocelulíticas pelas espécies de *Ganordema* que crescem sobre a madeira, com produção fraca de amilase, obtendo halos entre 1 a 5 mm. SLAWIŃSKA e KALBARCZYK (2011), observaram também atividade celulolítica maior do que a amilolítica no basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, e relacionou tal resultado com a decomposição do substrato que consistia principalmente de serragem. Enquanto que CÔRTEZ et al., (2008) relatou IE de 1,34 em *Xylaria* e de 1,30 em *Perennipora* e *Flaviporus venetus* para atividade de celulase, com CMC atuando como substrato.

4. CONCLUSÃO

A árvore filogenética do isolado CBA-452 revelou maior similaridade com o *Fomitopsis durescens*, uma espécie ainda não descrita na literatura brasileira. O isolado demonstrou ser produtor de biomoléculas de interesse biotecnológico, com atividade antimicrobiana e produção enzimática. O extrato em acetato de etila do fungo estudado tem diversos compostos insaturados e apresentou atividade antibacteriana entre os extratos testados. Estudos sobre as propriedades biológicas de microrganismos são essenciais para encontrar fontes promissoras para produção de biomoléculas de interesse industrial.

5. REFERÊNCIAS

ANTONIOLLI Z.I., MOREL A.F., ETHUR E.M., MOSTARDEIRO M.A. (2013) Isolamento, determinação estrutural e atividade microbiológica de moléculas bioativas no fungo ectomicorrízico *Scleroderma* UFSMSc1(Persoon) Fries. Universidade Federal de Santa Maria.

ARORA D.S., NIM L., KAUR H. (2016) Antimicrobial Potential of *Callistemon lanceolatus* Seed Extract and its Statistical Optimization. *Appl Biochem Biotechnol*, 180 (2) 289-305.

BANERJEE A., DASGUPTA N. de B. (2005) In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chem*, 90: 727-733.

BALA N., AITKEN E.A., CUSACK A., STEADMAN K.J. (2012) Antimicrobial potential of Australian macrofungi extracts against foodborne and other pathogens. *Phytother Res.*, 26 (3) 465-469.

BALAKUMARAN M.D., RAMACHANDRAN R., BALASHANMUGAM P., MUKESHKUMAR D.J., KALAICHELVAN P.T. (2016) Mycosynthesis of silver and gold nanoparticles: Optimization, characterization and antimicrobial activity against human pathogens. *Microbiol Res.*, 182: 8-20.

CARVALHO P.L.M. (2011) Isolamento e seleção de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos associados às plantas do gênero *Rheedia*. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais.

CECHINEL-FILHO V.R, YUNES A. (1998) Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, 21(1).

CHANG S.T., BUSWELL J.A. (1996) Mushroom nutraceuticals. *World J Microb Biotechnol*, 12: 473-476.

CHOI D., PARK S.S., DING J.L., CHA W.S. (2007) Effects of *Fomitopsis Pinicola* Extracts On Antioxidant And Antitumor Activities. *Biotechnol Bioprocess Eng.*, 12: 516–524.

CÔRTEZ G.L, PINTO F.S, HELM C.V, UMA E.A., WASHINGTON L.E.M. (2010) Screening test para avaliação de basidiomicetos quanto à síntese de celulasas. 5º Congresso nacional de bioenergia, Curitiba,

DINGLE J., REID W. W., SOLOMONS G.L. (1953) The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. II. Application of the “cup-plate” assay to the estimation of enzymes. *Journ Scienc Food and Agricultural*, 4: 149-155.

DRESCH P., D'AGUANNO M.N., ROSAM K., GRIENKE U., ROLLINGE J.M., PEINTNER U. (2015) Fungal strain matters: colony growth and bioactivity of the European medicinal polypores *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola* and *Piptoporus betulinus*. *AMB Express*, 5: 4.

FATIMA N., MUKHTAR U., IHSAN-UL-H.A.Q., AHMED Q.A.Z.I.M., JADOON M., AHMED S. (2016) Biological Evaluation of Endophytic Fungus *Chaetomium* sp. NF15 of *Justicia adhatoda* L.: A Potential Candidate for Drug Discovery. *Jundishapur J Microbiol*, 9 (6).

FUNGARO M.H.P., MACCHERONI Jr W. (2002) Melhoramento genético para produção de enzimas aplicadas a Indústria de Alimentos. In: MELO I.S., VALADARES-INGLIS M.C., NASS L.L., VALOIS A.C.C. ed. Recursos Genéticos e Melhoramento - Microrganismo. Jaguariúna, São Paulo, Brasil: Embrapa Meio Ambiente, pp. 426-453.

GRAND L.F., VERNIA C.S. (2006) Biogeography and hosts of poroid wood decay fungi in North Carolina: species of *Fomes*, *Fomitopsis*, *Fomitella* and *Ganoderma*. *Mycotaxon*, 94 231–234.

GU J-M, PARK S-S. (2013) Optimization of Endoglucanase Production from *Fomitopsis pinicola* mycelia. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 41 (2).

GUGLIOTTA A.M., GIBERTONI T.B., DRECHSLER-SANTOS E.R., SILVEIRA R.M.B., CHIKOWSKI R.S., PIRES R.M., MONTOYA C.A.S., SOUZA J.F., PALACIO M., REZENDE D.H.C. (2015) *Polyporales* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB92402>>. Acesso em 08 dez. 2015.

HAN M-L., SONG J., CUI B-K. (2014) Morphology and molecular phylogeny for two new species of *Fomitopsis* (Basidiomycota) from South China. *Mycol Progress*, 13: 905–914.

HANKIN L., ANAGNOSTAKIS S.G., (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycology*, 67: 597-607.

ISENMANN A.F. (2012) Química a partir de recursos renováveis. 1 ed., Timóteo, Minas Gerais.

JO W-S., PARK H-N., CHO D-H., YOO Y-B., PARK S-C. (2011) Detection of Extracellular Enzyme Activities in *Ganoderma neo-japonicum*. *Mycobiology*, 39 (2) 118-120.

JORK H., FUNK W., FISCHER W.R, WIMMER H. (1990) Thin-Layer Chromatography– Reagents and Detection Methods. Weinheim: Vch Verlagsgesellschaft Mbh, vol. 1.

KIM K.M, LEE J.S, JUNG H.S. (2007) *Fomitopsis incarnatus* sp. nov. based on generic evaluation of *Fomitopsis* and *Rhodofomes*. *Mycologia*, 99 (6) 833–841.

KNEŽEVIĆ A., MILOVANOVIĆ I., STAJIĆ M., LONČAR N., BRČESKI I., VUKOJEVIĆ J., ČILERDŽIĆ J. (2013) Lignin degradation by selected fungal species. *Bioresource Technology*, 138: 117–123.

LEE S.I., OH S.H., KIM S.D., LEE H.G. (2007) Extract With High Antioxidant Ability From *Fomitopsis Pinicola* And Its Application. KR Patent 2007078911.

LIU X-T, WINKLER A.L., SCHWAN W.R, VOLK T.J., ROTT M., MONTE A. (2010) Antibacterial Compounds From Mush- Rooms II: Lanostane Triterpenoids And An Ergostane Steroid With Activity Against *Bacillus Cereus* Isolated From *Fomitopsis Pinicola*. *Planta Med*, 76: 464–466.

MAGALHÃES A.F, TOZZI A.M.G.A, MAGALHÃES E.G, SANNOMIYA M, SORIANO M.D.P.C.S, PEREZ M.A.F. (2007) Flavonoids of *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo and biological activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 79 (3) 351–367.

MORK T., KVITILE B., MATHISEN T., JORGENSEN H.J. (2010) Bacteriological and molecular investigations of *Staphylococcus aureus* in dairy goats. *Veterinary Microbiology*, 141: 134-141.

NCCLS. (2003) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. NCCLS document M2-A8, 23 (1).

NIDADAVOLU S. V. S. S. L. H. B, BOLLA K., METUKU R.P., BURRA S., PABBA S.K, MARINGANTI S.C. (2011) Enzymatic And Biological Activities Of *Fomitopsis feei* In Broth Media Supplemented With Agricultural Wastes. *Journal of Recent Advances in Applied Sciences*, 26: 19-26.

NIDADAVOLU S. V. S. S. L. H. B, BOLLA K., SRIDEVI B., CHARYA M.A.S. (2012) Evaluation of in vitro antagonist activity of *Trichoderma viridae* against *Fomitopsis feei*. Journal of Endocytobiosis and Cell Research, 22: 14-18.

NOBLES M.K. (1948) Identification of cultures of wood-rotting fungi. Canadian Journal of Research, 26 (3) 281-431.

ORTIZ-SANTANA B., LINDNER D.L., MIETTINEN O., JUSTO A., HIBBETT D.S. (2013) A phylogenetic overview of the antrodia clade (Basidiomycota, Polyporales). Mycologia, 105 (6) 1391–1411.

PARK N., PARK S-S. (2014) Purification and characterization of a novel laccase from *Fomitopsis pinicola* mycelia. International Journal of Biological Macromolecules, 70: 583-589.

PARK A.R., PARK J-H., AHN H-J., JANG J.Y., YU B.J, YOON B-Y.U, YOON J-J. (2015) Enhancement of β -Glucosidase Activity from a Brown Rot Fungus *Fomitopsis pinicola* KCTC 6208 by Medium Optimization. Mycobiology, 43 (1) 57-62.

PFEFFERLE C, THEOBALD U, GURTLER H, FIEDER H.P. (2000) Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. J biotechnol, 80: 135-142.

PROENÇA DA CUNHA A., SILVA A., ROQUE O. (2003) Marmeleiro. In: Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. Fundação Calouste Gulbenkian.

RAMOS H.P. (2008) Otimização de condições de cultivo do fungo endofítico *Arthrimum* state of *Apiospora montagnei* Sacc. para produção de metabólitos secundários com atividade biológicas. 60f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

RUNGJINDAMAI N., PINRUAN U., CHOYKLIN R., HATTORI T.; JONES E.B.G. (2008) Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*, in Thailand. Fungal Diversity, 33: 139-161.

SABEV H.A., HANDLEY P.S., ROBSON G.D. (2006) Fungal colonization of soil-buried plasticized polyvinyl chloride (pPVC) and the impact of incorporated biocides. *Microbiology*, 152: 1731–1739.

SHARMA A.K., JANA A.M., SRIVASTAV A., GUPTA M., SHARMA S., GILL S.S. (2014) Antimicrobial properties of some edible mushrooms: A review. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 3: 1009-1023.

SŁAWIŃSKA A., KALBARCZYK J. (2011) Evaluation of enzymatic activity of *Pleurotus ostreatus* regarding stages of mycelium development. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, 10 (2) 195-202.

SOUZA T.M., SEVERI J.A., SILVA V.Y.A., SANTOS E., PIETRO R.C.L.R. (2007) Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, 28 (2) 221-226.

SOUZA H.Q., OLIVEIRA L.A., ANDRADE J.S. (2008) Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 28: 116-124.

SPECIAN V., ORLANDELLIA R.C., FELBERA A.C., AZEVEDO J.L., PAMPHILE J.A. (2014) Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. *Unopar Cient Ciênc Biol Saúde*, 16 (4) 345-351.

TANANTA F.V., PEDROZA L.S., MARTINS D., NUNEZ C.V. (2012) Estudo fitoquímico de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). I Congresso de Iniciação Científica PIBIC/CNPq.

XIONG Z., ZHANG X., WANG H., LI W. (2007) Application of Brown-Rot Basidiomycete *Fomitopsis* sp. IMER2 for Biological Treatment of Black Liquor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104 (6) 446-50

YOON J-J., IGARASHI K., KAJISA T., SAMEJIMA M. (2006) Purification, identification and molecular cloning of glycoside hydrolase family 15-glucoamylase from the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *FEMS Microbiol Lett*, 259: 288–294.

WALL P.E. (2005) *Thin-layer Chromatography: A modern practical approach*. Cambridge, Royal Society of Chemistry.

WENZEL J.B., MORESCO A.A.A., BOAS E.V, BURIN F.A.G., SOUZA R.O.
(2015) Atividade enzimática e antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de soja. Ciências Biológicas e da Saúde, 9 (3) 1-15.

4. REFERÊNCIAS

ABRAHAM D.J. (2003) Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery. Chemotherapeutic Agents.

AGUIAR C.M., LUCE S.L. (2011) Produção de celulases por *Aspergillus Niger* e cinética da desativação celulásica. Acta Scientiarum. Technology Maringá, 33 (4) 385-391.

AWADH A.A.N., MOTHANA R.A.A., LESNAU A., PILGRIM H., LINDEQUIST U. (2003) Antiviral activity of extracts and compounds from *Inonotus hispidus*. Fitoterapia, 74: 483–485.

AZEVEDO J.L. (2008) Genética de Microrganismos. Editora UFG, 2ª ed.

BADALYAN S.M. (2003) Antiprotozoal Activity And Mitogenic Effect Of Mycelium Of Culinary-Medicinal Shiitake Mushroom *Lentinus Edodes* (Berk.) Singer (Agaricomycetidae). Int J Med Mushrooms, 6: 131–8.

BERTONCHELI C.M., HÖRNER R. (2008) Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. Rev. Bras. Cienc. Farm, 44 (4).

BRICEÑO D.F., Grupo de Resistência Bacteriana Nosocomial de Colômbia. (2010) Actualización De La Resistencia A Antimicrobianos De Bacilos Gram Negativos Aislados En Hospitales De Nivel III De Colombia: Años 2006, 2007 Y 2008. Biomédica, 30 (3) 371-381.

CAMARGO P.D. (2007) Força verde: Um novo campo para a indústria química. Revista Brasileira de Engenharia Química, pp. 18-21.

CARVALHO M.A. (2011) Atividade de ligninases e celulases de linhagens de *Lentinula edodes* (berk.) Pegler em diferentes meios de cultivo. Universidade Federal de Lavras.

CASARIL K.B.P.B, KASUYA M.C.M, VANETTI M.C.D. (2011) Antimicrobial Activity and Mineral Composition of Shiitake Mushrooms Cultivated on Agricultural Waste. Braz. Arch. Biol. Technol, 54 (5) 991-1002.

CDC Centers for Disease Control and Prevention. (2016) Definition of MRSA, Online Source. Disponível em: <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em 03 mar. 2016.

CHANG S.T., BUSWELL J.A. (1996) Mushroom nutraceuticals. *World J Microb Biotechnol*, 12: 473-6.

CHOI D., PARK S.S., DING J.L., CHA W.S. (2007) Effects of *Fomitopsis Pinicola* Extracts On Antioxidant And Antitumor Activities. *Biotechnol Bioprocess Eng.*, 12: 516–524.

CORREIA C., COSTA E., PERES A., ALVES M., POMBO G., ESTEVINHO L. (2007) Etiologia das infecções do trato urinário e sua susceptibilidade aos antimicrobianos. *Acta Med Port*, 20: 543-549.

COSTELLOE C., METCALFE C., LOVERING A., MANT D.D., HAY A. (2010) Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: Systematic Review and Meta-Analysis. *BMJ*. 340: C2096.

CUZZI C., LINK S., VILANI A., ONOFRE S.B. (2011) Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis Dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). *Global Science and Technology*, 4 (2) 47–57.

CZARNIK A.W. (1996) Guest Editorial. *Acc. Chem. Res*, 29: 112-113.

DEMAIN, A.L. (2000) Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnology Advances*, 18: 499–514.

DEMAIN A.L. (1996) Fungal secondary metabolism: regulation and functions. In SUTTON B, editor. *A century of mycology*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 233–254.

DEMAIN A.L., FANG A. (1995) Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes. *Actinomycetologia*, 9: 98–117.

DENARDIN C.C., SILVA, L.P. (2009) Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. *Ciência Rural*, 39 (3) 945-954.

DILLON A. Celulases. In: Said S., Pietro R.C.L. (2004) *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto, Legis Summa, pp. 243-270.

ELIASSON A.C. (2004) Starch in food – Structure, function and applications. New York: Boca Raton, CRC, pp. 605.

ESPOSITO E., AZEVEDO J.L. (2004) Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Educs, pp. 510.

FIGUEIRAL A.C.D., FARIA M.G.I. (2015) *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase: Um problema sem solução? Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research, 9 (1) 45-48.

FLEMING, A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. British Journal of Experimental Pathology, 10: 226-236 (reimpressão Review of Infectious Diseases (1980) 2: 129-139).

GELATTI L.C, BONAMIGO R.R, BECKER A.P, D'AZEVEDO P.A. (2009) *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. An Bras Dermatol, 84 (5) 501-506.

GISKE C.G, MONNET D.L., CARS O., CARMELI Y. (2008) Clinical Economic Impact Common Multidrug-Resistant Gram Negative Bacilli. Antimicrobial Agents Chemother, 52 (3) 813-821.

GOMES-SILVA, A.C.; NOGUEIRA-MELO, G.S.; BALTAZAR, JM.; DRECHSLER-SANTOS, E.R.; LIRA, C.R.S; MEDEIROS, P.S.; RYVARDEN, H.M.P.S.; CAVALCANTI, M.A.Q.; GIBERTONI, T.B. Notes On *Fomitopsis* (Polyporales, Agaricomycetes) From North And Northeast Brazil. The Journal of The Torrey Botanical Society, v.142, n. 2, p.179-185, 2015.

GU J-M, PARK S-S. (2013) Optimization of Endoglucanase Production from *Fomitopsis pinicola* mycelia. Korean Journal of Microbiology and Biotechnology, 41 (2).

GUGLIOTTA A.M., GIBERTONI T.B., DRECHSLER-SANTOS E.R., SILVEIRA R.M.B., CHIKOWSKI R.S., PIRES R.M., MONTOYA C.A.S., SOUZA J.F., PALACIO M., REZENDE D.H.C. (2015) *Polyporales* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB92402>>. Acesso em 08 dez. 2015.

GUIMARÃES O.D., MOMESSO L.S., PUPO T.M. (2010) Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quím. Nova*, 33 (3) 667-679.

GULER P., AKATA I., KUTLUER F. (2009) Antifungal activities of *Fomitopsis pinicola* (Sw.:Fr) Karst and *Lactarius vellereus* (Pers.) Fr. *African Journal of Biotechnology*, 8 (16) 3811-3813.

GUPTA R., GIGRAS P., MOHAPATRA H., GOSWAMI V.K, CHAUHAN B. (2003) Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38 (11) 1599-1616.

HWANG C.H., JAKI B.U., KLEIN L.L., LANKIN D.C., MCALPINE J.B., NAPOLITANO J.G., FRYLING N.A., FRANZBLAU S.G., CHO S.H., STAMETS P.E., WANG Y., PAULI G.F. (2013) Chlorinated coumarins from the polypore mushroom *Fomitopsis officinalis* and their activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Nad Prod*, 76 (10) 1916-22.

ISENMANN A.F. (2012) *Química a partir de recursos renováveis*. 1 ed. Timóteo, Minas Gerais.

JO W.S., PARK H.N., CHO D.H., YOO Y.B., PARK S.C. (2011) Detection of Extracellular Enzyme Activities in *Ganoderma neo-japonicum*. *Mycobiology*, 39 (2) 118-120.

KADOSAKI L.L., SOUSA S.F, BORGES J.C.M. (2012) Análise do uso e da resistência bacteriana aos antimicrobianos em nível hospitalar. *Rev. Bras. Farm.* 93 (2) 128-135.

KELLER A.C., MAILLARD M.P., HOSTETTMANN K. (1996) Antimicrobial Steroids from The Fungus *Fomitopsis Pinicola*. *Phytochemistry*, 41: 1041-1046.

KIRK P.M., CANNON P. F., MINTER D.W., STALPERS J.A. (2008) *Dictionary of the Fungi*. 10^o ed, CABI Publishing, Reino Unido, pp. 771.

KNEŽEVIĆ A., MILOVANOVIĆ I., STAJIĆ M., LONČAR N., BRČESKI I., VUKOJEVIĆ J., ČILERDŽIĆ J. (2013) Lignin degradation by selected fungal species. *Bioresource Technology*, 138: 117–123.

KO H.G., PARK S.H., KIM S.H., PARK H.G., PARK W.M. (2005) Detection and recovery of hydrolytic enzymes from spent compost of four mushroom species. *Folia Microbiol (Praha)*, 50 (2) 103-106.

KUBICEK C.P., MESSNER R., GRUBER F., MACH R.L., KUBICEK-PRANZ E.M. (1993) The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, 15: 90-99.

KUHAD R.C, SINGH A. (2013) *Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery*. Book.

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

LEE S.I.; OH SH, KIM, S.D., LEE H.G. (2007) EXTRACT WITH HIGH ANTIOXIDANT ABILITY FROM *FOMITOPSIS PINICOLA* AND ITS APPLICATION. KR PATENT 2007078911.

LI X-L., LJUNGDAHL L.G., XIMENES E.A., CHEN, H., FELIX C.R., COTTA M.A., DIEN B.S. (2004) Properties of a recombinant β -glucosidase from polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* PC-2 and its application for cellulose hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113: 233–250.

LINDEQUIST U., NIEDERMEYER T.H.J., JÜLICH W-D. (2005) The Pharmacological Potential of Mushrooms. *eCAM*, 2 (3) 285–299.

LIU Y.T., LUO Z.Y., LONG C.N., WANG H.D., LONG M.N., HU Z. (2011) Cellulase production in a new mutant strain of *Penicillium decumbens* ML-017 by solid state fermentation with rice bran. *New Biotechnol*, 28: 733-737.

LIU X-T, WINKLER A.L., SCHWAN W.R, VOLK T.J., ROTT M., MONTE A. (2010) Antibacterial Compounds From Mush- Rooms II: Lanostane Triterpenoids And An Ergostane Steroid With Activity Against *Bacillus Cereus* Isolated From *Fomitopsis Pinicola*. *Planta Med*, 76: 464–466.

LOPES P.M, QUEIROZ T.F.F, RODRIGUES F.C, CASTRO A.S.B. (2012) *Escherichia coli* como agente etiológico de infecções do trato urinário em acidentes do município de Viçosa-MG. *Rev. Bras. Farm*, 93 (1) 43-47.

LYNCH J.M., SLATER J.H., BENNETT J.A., HARPER S.H.T. (1981) Cellulase activities of some aerobic microorganisms isolated from soil. *J.of General Microbiology*, 127: 231-236.

LYND L.R., WEIMER P.J., VAN ZYL W.H., PRETORIUS I.S. (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and molecular biology reviews. American Society for Microbiology, 66 (3) 506-577.

MACIEL M.J.M., SILVA A.C., RIBEIRO H.C.T. (2010) Industrial and biotechnological applications of lignolytic enzymes of the Basidiomycetes. Electronic Journal of Biotechnology, 13 (6) 1-13.

MENEZES J.C., ALVES T.P., CARDOSO J.P. (2000) Biotecnologia Microbiana: A produção de Penicilina. In: Lima N., Mota M. Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações. DIFEL, pp.78-95.

MOTHANA R.A.A., AWADH N.A.A., JANSEN R., WEGNER U., MENDEL R., LINDEQUIST U. (2003) Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi* BRES. Fitoterapia, 74: 177–80.

NIDADAVOLU S. V. S. S. L. H. B, BOLLA K., METUKU R.P., BURRA S., PABBA S.K, MARINGANTI S.C. (2011) Enzymatic And Biological Activities Of *Fomitopsis feei* In Broth Media Supplemented With Agricultural Wastes. Journal of Recent Advances in Applied Sciences, 26: 19-26.

NIGAM P., SINGH D. (1995) Enzymes and microbial systems involved in starch Processing. Enzyme and Microbial Technology, 17: 770–778.

NUNES H.C.A., CHICATTO J.A., GANZER E., HELM C.V., TAVARES L.B.B. (2015) Obtenção de celulases por fungos cultivados em sistema submerso com resíduo de pupunha. REA – Revista de *estudos ambientais*, 17 (1) 16-26.

OSTROSKY E., MIZUMOTO M.K., LIMA M.E.L., KANEKO T.M., NISHIKAWA S.O., FREITAS B.R. (2008) Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. Rev. bras. Farmacogn, 18 (2) 301-307.

PADHI S., TAYUNG K. (2015) *In vitro* antimicrobial potentials of endolichenic fungi isolated from thalli of *Parmelia* lichen against some human pathogens. Beni-suef university journal of basic and applied sciences.

PAGE C. (2004) Farmacologia interna. 2ed. São Paulo: Manole.

PARK N., PARK S-S. (2014) Purification and characterization of a novel laccase from *Fomitopsis pinicola* mycelia. International Journal of Biological Macromolecules, 70: 583-589.

PARK A.R., PARK J-H., AHN H-J., JANG J.Y., YU B.J, YOON B-Y.U, YOON J-J. (2015) Enhancement of β -Glucosidase Activity from a Brown Rot Fungus *Fomitopsis pinicola* KCTC 6208 by Medium Optimization. Mycobiology, 43 (1) 57-62.

PASTORE N.S., HASAN S.M., ZEMPULSKI D. (2011) Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose. Engevista, 13 (3) 149-159.

PEIXOTO S.C., JORGE J.A., TERENCE H.F., POLIZELI M.L.T.M. (2003) *Rhizopus microsporus* var. rhizopodiformes: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. International Microbiology. 6: 269-273.

PELCZAR JR., CHAN E.C.S., KRIEG N.R. (2012) Microbiologia: Aplicações e conceitos. Makron Books, 2 ed.

PINTO A.C., SILVA D.H.S., BOLZANI V.S., LOPES N.P., PIFÂNIO R.S. (2002) Produtos Naturais: Atualidades, desafios e perspectivas. Química Nova, 25: 45-51.

POPOVA M., TRUSHEVA B., GYOSHEVA M., TSVETKOVA I., BANKOVA V. (2009) Antibacterial triterpenes from the threatened wood-decay fungus *Fomitopsis rosea*. Fitoterapia, 80: 263–266.

PRINCE K.A.P., SORDI R., PAVAN F.R., SANTOS A.C.B., ARAUJO A.R., LEITE S.R.A., CLARICE Q.F.L. Anti-*Mycobacterium Tuberculosis* Activity Of Fungus *Phomopsis Stipata*. Brazilian Journal of Microbiology. p. 224-229, 2012

RATHEE S., RATHEE D., RATHEE D., KUMAR V., RATHEE P. (2012) Mushrooms as therapeutic agents. Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy, 22 (2) 459-474.

RISTAINO J.B., MADRITCH M., TROUT C.L., PARRA G. (1998) PCR Amplification of Ribosomal DNA for Species Identification in the Plant Pathogen Genus *Phytophthora*. Appl Environ Microbiol, 64 (3) 948–954.

RYVARDEN L., GILBERTSON R.L. (1993) European Polypores Part 1. *Synopsis Fungorum*, 6: 1-387.

SANTOS J.R.A., GUSMÃO N.B., GOUVEIA E.R. (2010) Seleção De Linhagem Industrial De *Saccharomyces Cerevisiae* Com Potencial Desempenho Para A Produção De Etanol Em Condições Adversas De Temperatura E De Agitação. *Revista Brasileira De Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, 12 (1) 75-80.

SIVARAMAKRISHNAN S., GANGADHARAN D., NAMPOOTHIRI K.M., SOCCOL C.R., PANDEY A. (2006) α -Amylases from microbial Sources. *Food Technol. Biotechnol*, 44 (2) 173–184.

SMANIA E.F.A., DELLE F.M., SMANIA JR A., YUNES R.A. CUNEO R.S. (2003) Antifungal Activity Of Sterols And Triterpenes Isolated From *Ganoderma Annulare*. *Fitoterapia*, 74: 375–7.

SMANIA JR A., DELLE F.M., SMANIA E.F.A, CUNEO R.S. (1999) Antibacterial Activity Of Steroidal Compounds Isolated From *Ganoderma Applanatum* (Pers.) Pat. (Aphyllorphomycetideae) Fruit Body. *Int J Med Mushrooms*, 1: 325–30.

SOUZA C.O., MELO T.R.B., MELO C.S.B., Menezes E.M., Carvalho A.C., Monteiro L.C.R. (2016) *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. *Rev Pan-Amaz Saude*, 7 (2) 79-91.

SOUZA M.V., REIS C., PIMENTA F.C. (2007) Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. *Revista de Patologia Tropical*, 34 (1) 27-36.

SUNDARRAM A., MURTHY T.P.K. (2014) α -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2 (4) 166-175.

TAKAHASHI J.A., LUCAS E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. *Quim Nova*, v.31, n.7, p. 1807-13, 2008.

TAVARES W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, n.3, p. 281-301, 2000.

TAYLOR P.W. (2013) Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents . *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42 (3) 195 - 201.

WINDISH W.W., MHATRE N.S. Microbial amylases, in: W.U. Wayne (Ed.), *Advances in applied microbiology*, Academic Press, New York, p. 273–304, 1965.

WISNIEWSKI A.C, ALMEIDA M.A.L., PALMA M.B., TAVARES L.B.B. (2010) Produção de enzimas amilolíticas por *Macrocybe titans* em resíduo do processamento de cerveja. *R. bras. Bioci.*, 8 (3) 285-293.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2001) Global strategy for containment of antimicrobial resistance. Geneva: WHO.

YOSHIKAWA K., INOUE M., MATSUMOTO Y., SAKAKIBARA C., MIYATAKA H., MATSUMOTO H, ARIHARA S. (2005) Lanostane triterpenoids and triterpene glycosides from the fruit body of *Fomitopsis pinicola* and their inhibitory activity against COX-1 and COX-2. 68 (1) 69-73.

YOON J-J., CHA C-J., KIM Y-S., KIM W. (2008) Degradation of cellulose by the major endoglucanase produced from the brown-rot fungus *Fomitopsis pinicola*. *Biotechnol Lett*, 30: 1373–1378.

YOON J-J., IGARASHI K., KAJISA T., SAMEJIMA M. (2006) Purification, identification and molecular cloning of glycoside hydrolase family 15-glucoamylase from the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *FEMS Microbiol Lett*, 259: 288–294.

ZHAO Z-Z., CHEN H-P., HUANG Y., LI Z-H., ZHANG L., FENG T., LIU J-K. (2016) Lanostane Triterpenoids from Fruiting Bodies of *Ganoderma leucocontextum*. *Nat. Prod. Bioprospect*, 6: 103-109.

ZÚÑIGA U.F.R., FARINAS C.S., BERTUCCI NETO V., COURI S., CRESTANA S. (2011) Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. *Pesq. agropec. bras.*, 46 (8) 912-919.