

CURVA DE CRESCIMENTO MICELIAL E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS DO COGUMELO COMESTÍVEL *PANUS STRIGELLUS*

Tales Alves Júnior¹
Cáritas Farias Loureiro^{1,2}
Daniele Rodrigues Silva^{1,2}
Ruby Vargas-Isla²
Noemia Kazue Ishikawa³

¹Bolsista, PIBIC/CNPq, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA);
² Colaborador(a), Coordenação de Biodiversidade (COBIO)/INPA;
³Orientadora, COBIO/INPA.

Financiamento da bolsa: PIBIC/CNPq.

INTRODUÇÃO

Antimicrobianos são compostos que podem impedir ou inibir o crescimento de microorganismos, tendo efeito determinado de acordo com o seu tipo de atividade e o tipo de microorganismo alvo (Magalhães, 2015).

Quando Alexander Fleming, um médico do St. Mary's Hospital de Londres, observou em uma placa de Petri em seu laboratório, na qual se cultivava uma cepa de *Staphylococcus aureus* (Rosenbach), um halo de inibição ao redor de uma contaminação causada ascomiceto do gênero *Penicilium*, ele determinou que essa inibição se dava por uma substância produzida pelo fungo, nomeada por ele de Penicilina. Ela foi o primeiro antimicrobiano de utilidade clínica, por ser não-tóxico a animais e ser filtrável (Fleming 1929; Tavares 2001; Tortora *et al.* 2012).

Os fungos desenvolveram inúmeras estratégias de sobrevivência na natureza, pois estão sujeitos a ataque de predadores e parasitas, assim como sempre competindo por substratos e condições adequadas para a sua reprodução. Uma destas estratégias é a produção de metabólitos de defesa, como os metabólitos antimicrobianos. Algumas dessas substâncias são de interesse farmacológico (Abraham 2001; Karaman *et al.* 2012).

Milhares de espécies de macrofungos são encontrados na floresta amazônica, sendo um deles *Panus strigellus* (Berk.) Overh. Esta espécie apresenta característica termófila, ou seja, cresce em temperaturas entre 35 a 40 °C, consideradas altas para basidiomicetos (Vargas-Isla e Ishikawa 2008). O consumo desta espécie pelos povos indígenas Yanomami foi relatado por Sanuma *et al.* (2016).

Panus strigellus produz metabólitos secundários com potencial clínico, como a hipnofilina, substância da classe dos sesquiterpenos, que apresenta potencial antimicrobiano contra *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, *Staphylococcus aureus* Rosenbach; Atividade antifúngica contra *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link. (Ishikawa *et al.* 2009; Ishikawa *et al.* 2012). Este mesmo composto também já foi isolado de outras espécies e apresentou atividade antiprotozoária contra *Trypanosoma cruzi* Chagas. e *Leishmania amazonensis* Lainson & Shaw (Souza-Fagundes *et al.* 2010). Outros compostos extraídos de *P. strigellus* apresentaram atividade contra *Enterococcus faecalis* (Andrewes & Horder) Schleifer & Kilpper e *Pseudomonas aeruginosa* (Schröter) Migula (Vásquez *et al.* 2018).

Trabalhos realizados por esta equipe demonstraram que culturas de *P. strigellus*, isolados na Amazônia, apresentaram produção de compostos com propriedades antibacterianas, porém, se faz necessário saber quando se dá esta produção, e em quais temperaturas. Essa pesquisa, portanto, tem como objetivo avaliar a produção de metabólitos antimicrobianos de *P. strigellus* nas temperaturas de 20-35° C, em intervalos de 5 dias, durante 45 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo: Foram utilizados dois isolados de *P. strigellus* (Tabela 1) que se encontram armazenados na coleção do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA. Para o teste antimicrobiano, utilizou-se como micro-organismo teste *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn.

Tabela 1. Isolados de *Panus strigellus* coletados na Amazônia utilizados nos experimentos

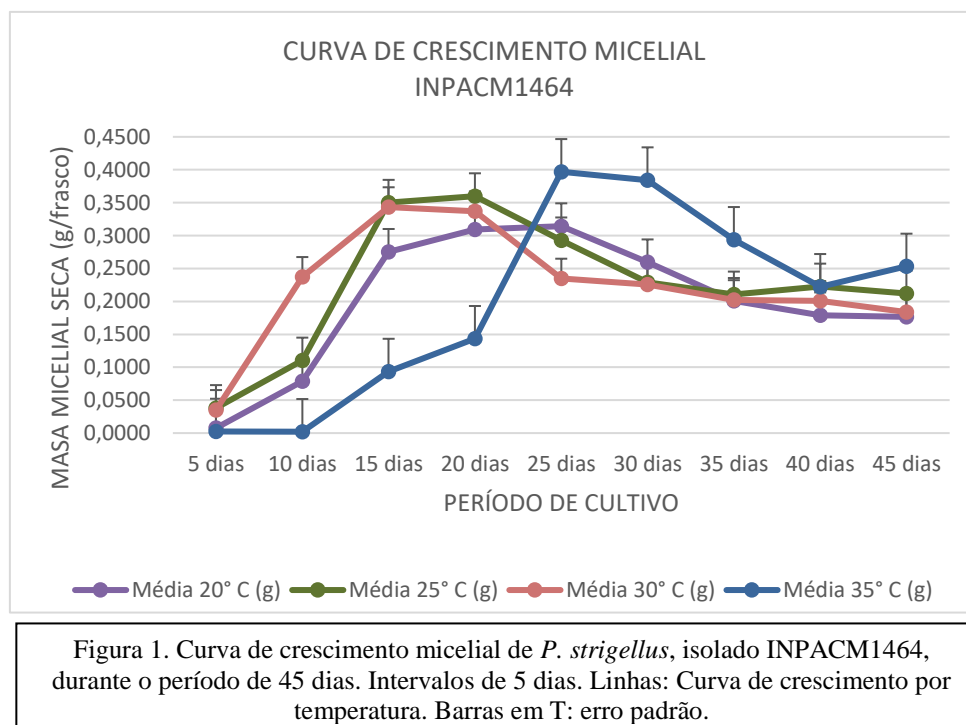
Nº	Isolado	Herbário	Data de coleta	Local de coleta
1	INPACM1464	INPA222827	31/07/2006	INPA-Campus III, Manaus, Amazonas, Brasil
2	INPACM1531	INPA243940	23/02/2011	Ramal da Escola, Puraquequara, Manaus, Amazonas, Brasil

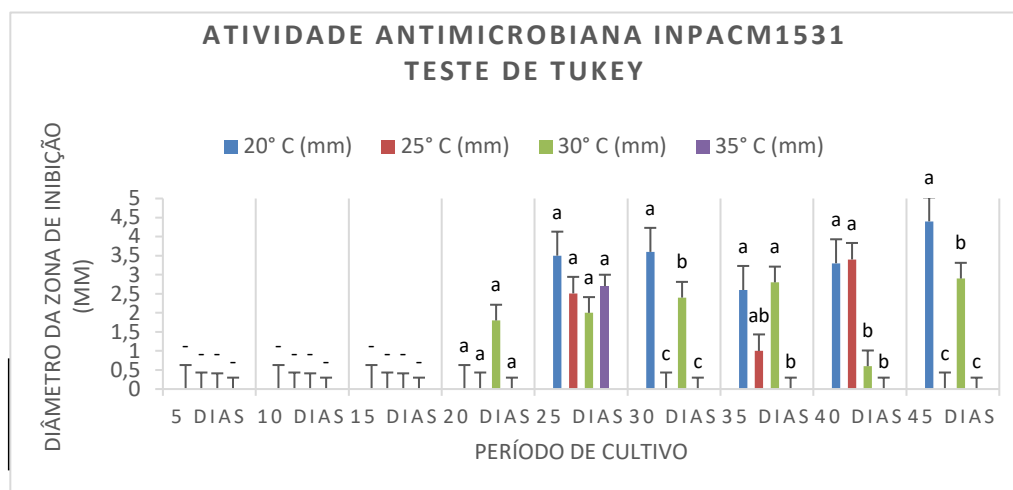
Obtenção do inóculo: Um fragmento da cultura micelial foi transferido para placas de Petri contendo 15 mL de meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), e estes fragmentos foram incubados em estufa de Demanda Biológica de Oxigênio (BOD) a 25 °C, na ausência de luz durante dez dias.

Filtrado e biomassa, Avaliação antimicrobiana: Após obtenção do inóculo, três fragmentos serão transferidos para frascos de Erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mL de meio Extrato de Malte e Peptona – EMP (30 g de Extrato de Malte e 3 g de Peptona de soja por litro). Foi feita a separação de filtrado e biomassa de 5 em 5 dias, em um período total de 45 dias. Para a avaliação antimicrobiana, será usado o método de difusão em ágar (técnica do pocinho) contra *B. subtilis* será utilizado. O experimento será inteiramente casualizado, com três repetições para o crescimento micelial e nove para a atividade antimicrobiana. Os dados do crescimento micelial e da atividade antimicrobiana serão submetidos à ANOVA e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 1% de significância. Essa etapa é baseada nos métodos descritos em Ishikawa *et al.* (2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Curva de crescimento micelial



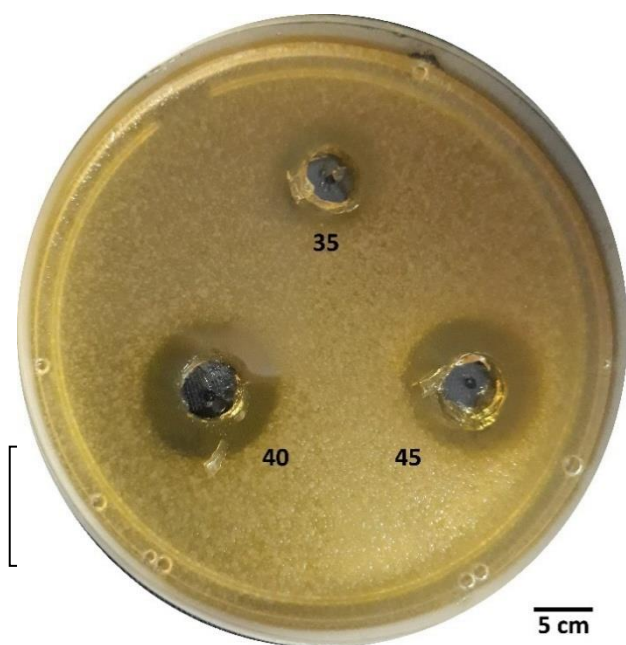
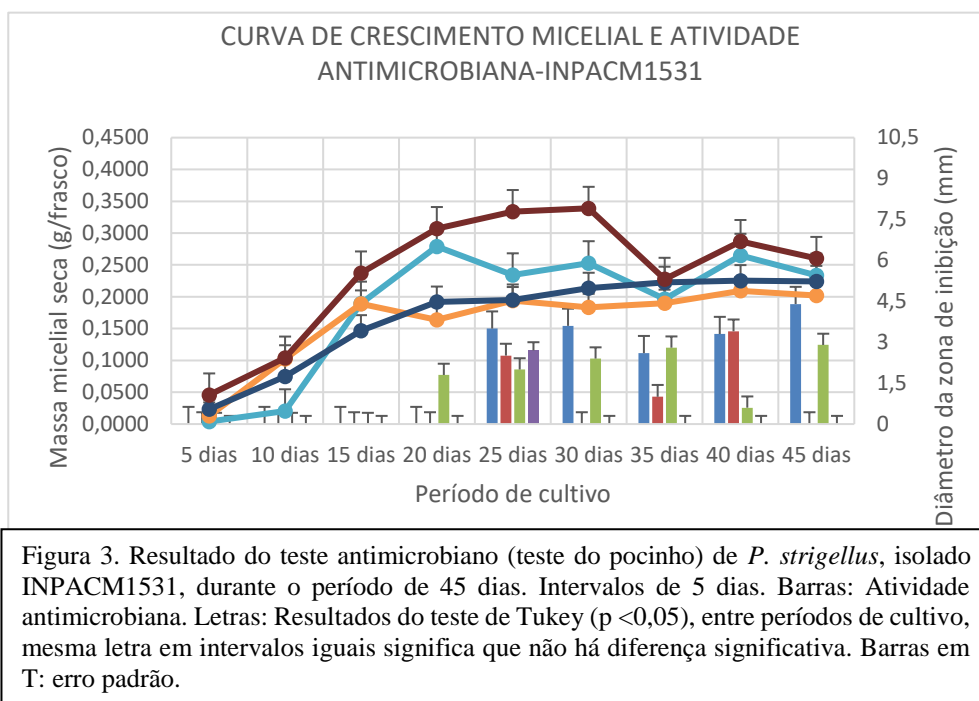


Os dados obtidos (Figura 1, Figura 2) mostram que o crescimento micelial, em ambos os isolados, foi maior na temperatura de 35° C, caracterizando *P. strigellus* como um fungo termófilo, e, portanto, assim corroborando o que fora descrito por Vargas-Isla e Ishikawa (2008). Ambos demonstraram se encaixar no modelo de crescimento exponencial (curva em forma de J), alcançando pico de crescimento para ambos os isolados se deram durante o período de 25-30 dias, e nivelando-se a capacidade ótima de crescimento a partir do 35° dia. (Odum e Barrett, 2007). Quando observamos este aspecto, o isolado que apresentou melhores resultados de crescimento foi o isolado INPACM1464.

Atividade antimicrobiana

Em relação ao teste de atividade antimicrobiana, não se realizou o teste com o isolado INPACM1464, e por conta disto, apenas trataremos dos dados obtidos do teste antimicrobiano do isolado INPACM1531.

O isolado começou a apresentar atividade antimicrobiana ao vigésimo dia de cultivo (Figura 2 e 3), na temperatura de 30° C, porém, ao vigésimo quinto dia, apresentou halo de inibição em todas as temperaturas. Os melhores resultados, ou seja, a melhor faixa de produção no quesito temperatura, se deu aos 20° C. Esta temperatura difere da temperatura de melhor temperatura de crescimento observada (35° C). Isto pode se dar por uma diversidade de fatores, como por exemplo, o fato de que o fungo em temperaturas inferiores pode se encontrar sob estresse, e por conta disto, estimulando a produção de compostos antimicrobianos para autodefesa. Observa-se também o fato de que o fungo começa a produzir metabólitos secundários com propriedade antimicrobiana entre o final de sua fase “log” e o início de sua fase estacionária.



CONCLUSÃO

A produção de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas por *P. strigellus* pode ser fruto da pressão evolutiva sofrida pelo organismo, tendo em vista que há constante competição entre organismos pela sobrevivência na natureza, seja por substrato, seja para não ser consumido por outro organismo. O resultado aponta que não há uma relação direta entre crescimento micelial e produção de compostos antimicrobiana, tendo em vista que é na temperatura de 20° C na qual o isolado testado produz melhor atividade antimicrobiana, porém o crescimento se dá de melhor forma à 35° C.

REFERÊNCIAS

- Abraham, W.R. 2001. Bioactive Sesquiterpenes Produced by Fungi: are they Useful for Humans as well? *Current Medicinal Chemistry*. 8: 583-606.
- Fleming, A. 1929. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. Influenzæ*. *British Journal of Experimental Pathology*. 10(3): 226-236.

- Ishikawa, N.K. *et al.* 2005. Production of enokipodins A, B, C, and D: a new group of antimicrobial metabolites from mycelial culture of *Flammulina velutipes*. *Mycoscience*. 46(1): 39-45.
- Ishikawa, N.K.; Vargas-Isla, R.; Macedo Jr., F.C.; Capelari, M.; Faria, T.J. 2009. Hipnofilina, sesquiterpeno antimicrobiano isolado de *Lentinus strigellus*, um cogumelo comestível da Amazônia. *Anais/Resumos da 61ª Reunião Anual da SBPC*. Manaus, Amazonas.
- Ishikawa, N.K.; Vargas-Isla, R.; Chaves, R.S.; Cabral, T.S. 2012. Macrofungos da Amazônia: importância e potencialidades. *Ciência & Ambiente*. 44: 129-139.
- Karaman, M.; Matavulj, M.; Janjic, L. 2012. Antibacterial Agents from Lignicolous Macrofungi. *INTECH Open Access Publisher*. 361-386.
- Magalhães, A.P.S.A. 2015. *Atividade antimicrobiana em têxteis*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto, Porto. 93p.
- Sanuma, O.I. *et al.* 2016. *Enciclopédia dos alimentos Yanomami (sanöma): cogumelos*. Instituto Socioambiental, São Paulo, Brasil. 108 p.
- Tavares, W. 2001. *Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos*. Ateneu, São Paulo, Brasil. 793p.
- Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. 2012. *Microbiologia*. 10ª ed. Artmed, Porto Alegre, Brasil. 934p.
- Souza-Fagundes, E.M. *et al.* 2010. *In vitro* activity of hypnophilin from *Lentinus strigosus*: a potential prototype for Chagas disease and leishmaniasis chemotherapy. *Brazilian Journal of Medical And Biological Research*. 43(11): 1054-1061.
- Vargas-Isla, R.; Ishikawa, N.K. 2008. Optimal conditions of *in vitro* mycelial growth of *Lentinus strigosus*, an edible mushroom isolated in the Brazilian Amazon. *Mycoscience*. 49: 215 - 219.
- Vásquez, R.; Rios, N.; Solano, G.; Cubilla-Rios, L. 2018. Lentinoids A–D, New Natural Products Isolated from *Lentinus strigellus*. *Molecules*. 23(4): 773