

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE ANTIMICROBIANOS POR *Lentinus strigellus* e *Lentinula raphanica*.

Janaina da Costa NOGUEIRA¹; Mariko FUNASAKI ²; Noemia Kazue ISHIKAWA³.

1. Bolsista PIBIC/CNPq; 2. Orientadora INPA/DPIN; 3. Colaboradora INPA/CPTA.

1. Introdução

Nas últimas décadas, várias pesquisas têm buscado identificar substâncias de importância terapêutica produzidas por fungos basidiomicetos. Neste trabalho as espécies de basidiomicetos utilizados foram *Lentinus strigellus* Berk e *Lentinula raphanica* Berk & Mont. *L. strigellus* é um cogumelo comestível e de ocorrência na Amazônia (Vargas-Isla *et al*, 2008). De acordo com Ishikawa e colaboradores 2009 o fungo *Lentinus strigellus* quando cultivado em meio Extrato de Malte e Peptona, no período de trinta dias, produz um composto denominado como sesquiterpeno hipnofilina que apresentou atividade antimicrobiana contra *Cladosporium herbarium* e *Staphylococcus aureus*, sabe-se que o mesmo composto possui significativa atividade inibitória contra *Trypanosoma cruzi* (Cota *et al*, 2008). *Lentinula raphanica* que também é um fungo comestível, cresce em regiões subtropicais e tropicais. É um fungo que apresenta crescimento entre 20 e 25 °C, pouco estudado e não há relatos de estudos que se conheçam profundamente as características fisiológicas desse organismo. Sabe-se que o *L. boryana* apresenta atividade contra as bactérias gram-positivas *Bacillus cereus* Frankland & Frankland e *Staphylococcus aureus*, quando cultivados por 28 dias em meio Batata Dextrose Agar e Sabouraud Dextrose Agar (Carvalho *et al*, 2007). Os dois fungos quando estudados em outros trabalhos foram cultivados ou em um único meio de cultura ou em meio de cultura sólido. Assim este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos fungos *Lentinula raphanica* e *Lentinus strigellus*, em diferentes meios de cultura líquido.

2. Material e Métodos

Os fungos foram cultivados nos meios de Batata Dextrose, Meio Completo de Pontecorvo, Meio Mínimo e meio Extrato de Malte e peptona, na temperatura de incubação de 25 °C sem agitação e na ausência de luz. Para tanto, cinco discos (8 mm de diâmetro.) de micélio foram transferidos para 14 frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio cada, estes foram mantidos nas condições acima citados. No período de 30 dias, três frascos foram retirados de cada tratamento. A biomassa fúngica foi separada do meio de cultura por filtração. A massa micelial seca foi obtida por desidratação da colônia em estufa de circulação de ar inicialmente a 65 °C seguida por 105 °C, até obter peso constante. O volume do filtrado foi medido com o auxílio de uma proveta. Os filtrados obtidos do cultivo dos fungos foram testados contra a bactéria *Bacillus subtilis*. A atividade antimicrobiana foi realizada utilizando-se o método de difusão em Agar – técnica dos pocinhos com incubação a 37°C por 24 horas. Após teste os meios que apresentaram atividade foram extraídos três vezes com acetato de etila e o solvente foi evaporado, utilizando um rotaevaporador para que houvesse a separação das substâncias ativas.

3. Resultados e discussão

A escolha para que a obtenção do filtrado da cultura micelial ocorreu após 30 dias de incubação, foi baseada conforme os dados apresentados por Ishikawa *et al*. (2009).

Neste trabalho após o período total de cultivo foram obtidos em média 509,25 mL de filtrado da cultura micelial de *L. strigellus*, os filtrados de um segundo cultivo foram testados contra *Bacillus subtilis* e obteve-se resultado positivo para os meios de Batata Dextrose e Meio Extrato de Malte e peptona. Quando testado o meio de Batata Dextrose foram obtidos três halos com 2.63, 4.26 e 2.54 mm de diâmetro respectivamente. O meio Extrato de Malte e peptona apresentou atividade contra *Bacillus subtilis* apresentando três halos de 1.43, 1.44 e 1.41 mm de diâmetro. Os demais meios de cultura Meio completo de Pontecorvo e Meio mínimo não apresentaram atividade contra a bactéria testada (Figura 1).

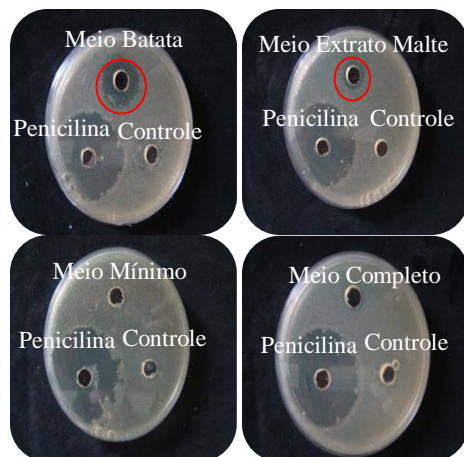


Figura 1. Determinação da atividade antimicrobiana da cultura micelial de *Lentinus strigellus* pelo método de difusão em ágar com base na técnica do poço.

O total de filtrado obtido no cultivo de *L. raphanica* foi de 500,75 mL, os filtrados foram testados contra *Bacillus subtilis* e o resultado foi positivo somente para o meio Mínimo, os halos apresentaram diâmetro de 2.32, 2.12 e 1.51. A penicilina foi utilizada como controle positivo e a concentração usada foi de 0, 001 g para 2 mL de água destilada, como controle negativo foi usado o próprio meio de cultura sem que houvesse o crescimento do fungo (Figura 2).

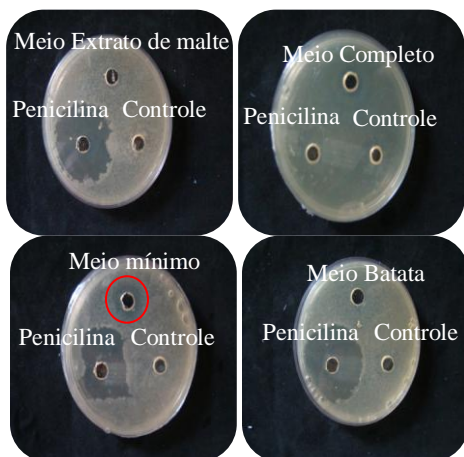


Figura 2. Determinação da atividade antimicrobiana da cultura micelial de *Lentinula raphanica* pelo método de difusão em ágar com base na técnica do poço.

O total de filtrado obtido no cultivo de *L. raphanica* foi de 500,75 mL, os filtrados foram testados contra *Bacillus subtilis* e o resultado foi positivo somente para o meio Mínimo, os halos apresentaram diâmetro de 2.32, 2.12 e 1.51. A penicilina foi utilizada como controle positivo e a concentração usada foi de 0, 001 g para 2 mL de água destilada, como controle negativo foi usado o próprio meio de cultura sem que houvesse o crescimento do fungo.

Quanto ao isolamento das substâncias ativas dos meios de cultura que apresentaram atividade, os mesmos foram extraídos por três vezes com acetato de etila, após a extração as quantidades obtidas de substâncias através de um retoevaporador foram de 0,4217 g para o meio de Extrato de Malte de peptona e 0,5133 g para o meio de Batata Dextrose do cultivo de *Lentinus strigellus*, obteve-se do cultivo no meio Mínimo de *Lentinula raphanica* a quantidade de substância ativa de 0,011 g.

Quantidades pequenas do extrato bruto foram aplicadas em cromatografia delgada (CDD) utilizando como solvente o clorofórmio e metanol com concentração de 9,6: 0,4 ml. O resultado da cromatografia foi o isolamento das substâncias ativas, que posteriormente serão submetidas ao teste em placas de sílica gel para o isolamento das substâncias majoritárias (Figura 3).

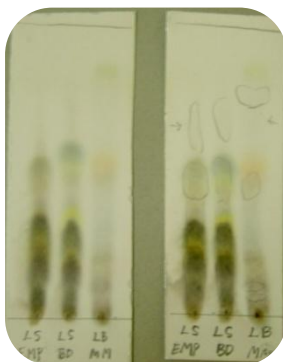


Figura 3. Teste em cromatografia delgada.

4. Referências Bibliográficas

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(3): 215-219 p.

Ishikawa, N.K.; Vargas-Isla, R.; Macedo Junior, F.C.; Capelari, M.; Faria, T.J. 2009. Hipnofilina, sesquiterpeno antimicrobiano isolado de Lentinus strigellus, um cogumelo comestível da Amazônia. *Resumo de Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência* (Manaus). *In press*

Cota, B.B.; Rosa, L.H.; Fagundes, E.M.S.; Martins, O. S.; Oliveira, R.C.; Ramanha, A.J.; Rosa, C.A.; Zani, C.L. 2008. A potent trypanocidal component from the Lentinus strigosus inhibits trypanothione reductase and modulates PBMC proliferation. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(3): 263-270.

De Carvalho, M.P.; Van Der Sand, S.T.; Rosa, E.A.R.; Germani, J.C.; Ishikawa, N.K. 2007. Investigation of the antibacterial activity of Basidiomycetes. *Biociências*, 15(2): 173-179.