

O EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICELIAL E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Panus cf. strigellus*

Raquel Sousa CHAVES¹; Ruby VARGAS-ISLA²; Juliana Magalhães de ARAÚJO³; Noemia Kazue ISHIKAWA⁴;

¹Bolsista PIBIC/FAPEM/INPA; ²Colaboradora/Doutoranda do curso de Botânica/CNPq/INPA;

³Colaboradora/ Bolsista PIBIC/ CNPq/INPA; ⁴Orientadora CPTA/INPA

1. Introdução

Panus cf. strigellus é um basidiomiceto (cogumelo) comestível de ocorrência natural na Amazônia. Os basidiomicetos apresentam potencial de estudos por produzir uma ampla gama de produtos naturais. Desde compostos químicos com ação antitumoral, citostáticos, anticoagulante, enzimas reguladoras, compostos imunologicamente ativos, assim como, metabólitos com ação antimicrobiana (Przybyłowicz e Donoghue 1988).

Os antimicrobianos ganharam destaque, quando em 1928, Alexander Fleming estudando culturas de *Staphylococcus aureus* Rosenbach observou que uma colônia fúngica havia se desenvolvido no recipiente onde a bactéria era cultivada, inibindo-as. Fleming resolveu estudar o fenômeno e descobriu que o fungo pertencia ao gênero *Penicillium*, o qual produzia uma substância que se difundia no meio de cultura e exercia efeito antimicrobiano sobre a bactéria ali presente. Fleming chamou esta substância de Penicilina (Tavares 2001). Com base nesta descoberta, o uso de antibiótico difundiu-se mundialmente na segunda metade do século passado, salvando muitas vidas. Por outro lado, nas últimas décadas o aumento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos tornou-se um problema de saúde pública.

Panus cf. strigellus apresentou atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* Cohn, *S. aureus* e *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link (Ishikawa *et al.* 2009), estudos mostram que este fungo apresenta temperatura de crescimento micelial entre 35 a 40 °C (Vargas-Isla e Ishikawa, 2008), não entre 25 e 28 °C, como indicada para a maioria dos fungos. Deste modo o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura de incubação no crescimento micelial e na atividade antimicrobiana de *P. cf. strigellus*, incubados a 25 e 35 °C.

2. Material e Métodos

Inóculo: O basidioma de *P. cf. strigellus*, foi depositado no Herbário do INPA, sob o número INPA 222827. A cultura micelial se encontra na Coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural – INPA, sob o número INPACM 1464. Para a obtenção de inóculo, um fragmento da cultura micelial estoque foi transferido para placas de Petri contendo 20 mL de meio sólido Extrato de Malte e Peptona de Soja [EMPA: extrato de malte (Acumedia); 30 g/L peptona de soja (BIOBRÁS S.A.) 3 g/L, ágar (Difco) 15 g/L] e incubado em Câmara de Demanda Biológica de Oxigênio (BOD) a 25 °C, na ausência de luz por cinco dias.

Obtenção de filtrado: Foram retirados cinco fragmentos ($\pm 3 \times 3$ mm) da cultura micelial e colocados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido Extrato de Malte e Peptona de soja (EMP) com pH = 5. A incubação foi realizada em duas temperaturas: 25 e 35 °C, por 30 dias. Após este período, o micélio foi separado do meio de cultura por filtração. O volume final do meio foi mensurado em proveta. O pH final do meio de cultura foi verificado com fitas de indicativas de pH entre 0 a 14 (Macheney-Nagel). A colônia micelial foi utilizada para avaliar a produção de biomassa. O filtrado foi utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana. O experimento foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos e sete repetições.

Avaliação da produção de biomassa: A colônia do fungo foi desidratada em estufa com circulação e renovação de ar a 65 °C por 24 horas, seguida por 105 °C, até obter massa constante. A massa micelial seca foi mensurada com auxílio de balança analítica. Os dados foram submetidos a ANOVA e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, a 1% de significância.

Avaliação de atividade antimicrobiana: Foi utilizado o método de difusão em ágar - técnica de pocinho. O microrganismo teste foi a bactéria Gram-Positiva *B. subtilis*, cuja cultura é mantida em meio sólido Infusão de Cérebro Coração [BHIA: infusão de cérebro e coração (Becton, Dickinson e Companhia); ágar (Difco)] em tubo inclinado a 4 °C. Uma pequena porção da colônia de bactéria foi retirada com *Swab* e repassada para tubos de ensaio com 10 mL de meio líquido BHI e incubado a 37 °C por 18±1 h. Meio BHIA (20 mL) liquefeito (±40 °C) com *B. subtilis* em concentração final de 10⁴ ou 10⁵ UFC/mL foi transferido para placas de Petri. Após a solidificação foram confeccionados orifícios (pocinhos) com 9 mm de diâmetro, onde foi transferido 0,1 mL do filtrado dos diferentes tratamentos. As placas foram mantidas a 4 °C, *overnight*, depois transferido para estufa bacteriológica a 37 °C, por 18 h. Após esse período a formação de halo de inibição foi avaliada visualmente e a distância entre a borda do pocinho e a borda do halo foi medida com auxílio de régua milimetrada.

3. Resultados e Discussão

Produção de biomassa

A produção de biomassa de *P. cf. strigellus* em meio líquido EMP foi maior a 35 °C (Figura 1). O resultado corrobora com Vargas-Isla e Ishikawa (2008) que observaram a mesma temperatura ótima de crescimento micelial em meio Batata Dextrose Ágar (BDA).

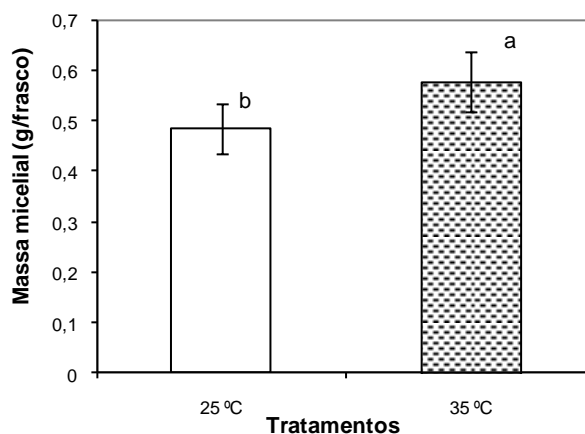


Figura 1 – Biomassa de *Panus cf. strigellus* cultivado em temperaturas de 25 e 35 °C.

Meio de cultivo = Extrato de Malte e Peptona de Soja. Volume = 100 mL por frasco. Período = 30 dias. Médias com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,01$), ($M = 7$).

Atividade antimicrobiana

Tanto na diluição com 10⁴ quanto a 10⁵ UFC/mL de *B. subtilis*, observou-se clara formação de halo de inibição por 0,1 mL de filtrado da cultura micelial cultivado em ambiente com temperatura de 25 °C (Figura 2). Embora a produção de biomassa tenha sido superior no cultivo a 35 °C, não foi observado inibição da bactéria pelo filtrado deste tratamento uma vez que o experimento foi realizado apenas com 30 dias, pretende-se realizar outro experimento ampliando-se o período de cultivo entre cinco a 45 dias de incubação, para verificar se o resultado negativo se mantém a 35 °C em outros períodos (Tabela 1).

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana do filtrado da cultura micelial de *Panus* cf. *strigellus*, cultivado em ambiente com temperaturas de 25 e 35 °C, por 30 dias, contra *Bacillus subtilis*

Temperatura	Tratamentos			
	25 °C		35 °C	
Diluição	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁵ UFC/mL	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁵ UFC/mL
Halo de inibição (cm)	0,55* (±0,025)	0,45 (±0,035)	0,00	0,00

* Média de três frascos. UFC=Unidade formadora de colônias

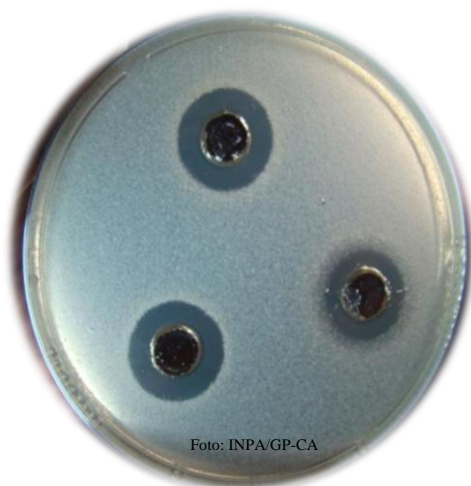


Figura 2 - Atividade antimicrobiana de 0,1 mL do filtrado da cultura micelial de *Panus* cf. *strigellus* cultivado em ambiente com temperatura de 25 °C por 30 dias contra bactéria Gram-Positiva *Bacillus subtilis*.

Em trabalhos que antecedem a este o sesquiterpeno hipnofilina, foi isolado do filtrado micelial de *Panus* cf. *strigellus* cultivado em ambiente com temperatura de 25 °C (Ishikawa *et al.* 2009). Este composto foi isolado pela primeira vez, por Kupka *et al.* em 1981, do cogumelo *Crepidotus epibryus* (Fr.) Quél. (= *Pleurotellus hypnophilus* (Pers.) Fayod). Estes autores observaram a atividade antimicrobiana de hipnofilina contra bactérias Gram-Positiva, Gram-Negativa e fungos basidiomicetos e ascomicetos. Rukachaisirikul *et al.* (2005) observaram atividade contra *Plasmodium falciparum* Welch de hipnofilina isolado de *Lentinus connatus* Berk. Recentemente, Souza-Fagundes *et al.* (2010) relataram que o mesmo composto foi isolado de *Panus lecomtei* (Fr.) Corner (= *Lentinus strigosus* (Schwein.) Fr.) e apresentou atividade inibitória de *Trypanosoma cruzi* Chagas e *Leishmania amazonensis*.

4. Conclusão

A biomassa micelial de *Panus* cf. *strigellus* é maior a 35 °C, confirmando dados publicados anteriormente. Entretanto, em cultivo micelial de 30 dias, a produção de metabólitos antimicrobianos é observada apenas quando o fungo desenvolve-se em temperatura de 25 °C.

5. Referências

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. In: 61ª Reunião Anual - Sociedade Brasileira para o progresso da ciência, Manaus-AM.

Kupka, J.; Anke, T.; Gianetti.B.M.; Stglich, W. 1981. Antibiotics from basidiomycetes. *Archives of Microbiology*, 130: 223-227.

Przybylowicz, P.; Donoghue, J. 1988. *Shiitake Growers Handbook: The art and science of mushroom cultivation*, Kendall/Hunt Publishing Company, Iowa, USA. 217 pp.

Rukachaisirikul, V.; Tansakuk, C.; Saithong, S.; Pakawatchai, C.; Suvannakad, R. 2005. Hirsutane sesquiterpenes from the fungus *Lentinus connatus* BCC 8996. *Journal of Natural Products*, 68: 1674-1676.

Souza-Fagundes, E.M.; Cota, B.B.; Rosa, L.H.; Romanha, A.J.; Corrêa-Oliveira, R.; Rosa, C.A.; Zani, C.L.; Teixeira-Carvalho, A.; Martins-Filho, O.A. 2010. In vitro activity of hypnophilin from *Lentinus strigosus*: a potential prototype for Chagas disease and Leishmaniasis chemotherapy. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, 43: 1054-1061.

Tavares, W. 2001. *Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos*. Atheneu, São Paulo, Brasil. 1216 pp.

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.