TRIAGEM DE MACROFUNGOS DE OCORRÊNCIA NA AMAZÔNIA PRODUTORES DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS

Raquel Sousa CHAVES[1]; Ruby VARGAS-ISLA[2]; Alessandra Martins Meira ARAÚJO[3]; Jéssica Caroline Nascimento TAVARES[4]; Noemia Kazue ISHIKAWA[5]
[1]Bolsista PIBIC/CNPq-INPA; [2]Colaboradora CBIO/INPA; [3]Colaboradora/Mestranda INPA/CAPES; [4]Colaboradora PAIC/FAPEAM-INPA; [5]Orientadora CBIO/INPA

1. Introdução

Os antibióticos são compostos com capacidade de inibir o crescimento ou ocasionar a morte de micro-organismos. Nas últimas décadas houve a introdução no mercado de vários grupos de antibióticos, como, por exemplo, os β-lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclinas, lincosaminas, glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos, rifamicinas e estreptograminas (Guimarães *et al*. 2010). O uso indiscriminado e a disponibilidade de tais substâncias no meio ambiente são fatores que contribuem para o aumento dos micro-organismos resistentes. Os micro-organismos multiresistentes às drogas disponíveis, tem colaborado significativamente com o número de mortes de animais e vegetais (World Health Organization - WHO 2012). Esse é um dos fatores que tem motivado a busca por novas fontes de antibióticos. Os fungos são uma fonte com potencial de novos produtos naturais ainda pouco explorada (Shu 1998). Estudos têm mostrado que os basidiomicetos produzem uma ampla gama de substâncias químicas com ação imunomoduladores, antitumoral, antiviral, antialérgica, anti-inflamatória, citotóxica, assim como, metabólitos com ação antimicrobiana (Brizuela *et al*. 1998; Wasser 2002; Lindequist *et al*. 2005; Rosa *et al*. 2009; Alves *et al*. 2012). A triagem de basidiomicetos com potencial antimicrobiano tem sido realizada em vários países. Suay *et al.* (2000) testaram o extrato de 317 isolados de 204 espécies de basidiomicetos, coletadas na Espanha, contra diversos micro-organismos patogênicos, obtiveram resultado positivo com 109 das espécies testadas contra pelo menos um dos micro-organismos testados. Rosa *et al.* (2003), avaliaram 203 espécies coletadas no Brasil, e verificaram atividade antimicrobiana de 15 dessas espécies. Aqueveque *et al*. (2010), avaliaram 148 isolados de basidiomicetos de ocorrência no Chile e relatam a atividade de 12 isolados. Na Amazônia, encontra-se uma diversidade de macrofungos, no entanto, a distância entre a expectativa e a verdadeira possibilidade do potencial de uso desses organismos, continua sendo uma das lacunas do conhecimento para essa região. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de macrofungos coletados na região de Manaus, Amazonas.

2. Material e Métodos

Coleta de macrofungos

Foram realizadas coletas nas seguintes áreas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA: Campus I, Campus III, Estação Experimental de Hortaliças - EEH, Reserva Biológica de Campina - RBC; Reserva Florestal Adopho Ducke – RFAD, Estação Experimental de Silvicultura Tropical – EEST e Reserva Biológica do Cuieras, Ramal ZF2, Km 34. O corpo de frutificação dos fungos foi fotografado e posteriormente retirado do substrato com auxílio de faca e transportado em saco de papel ou recipiente plástico para laboratório de Microbiologia de Alimentos do INPA, onde foi realizado o isolamento das culturas miceliais e a confecção de exsicatas.

Confecção de exsicata

Os espécimes foram desidratados em estufa a 40 ºC por 24 horas. As exsicatas foram depositadas no herbário do INPA e enviadas para os taxonomistas dos respectivos grupos para identificação morfológica e/ou molecular.

Obtenção da cultura micelial

Foram utilizadas três técnicas de isolamento de macrofungo: **1)** fragmentos do contexto do corpo de frutificação foram retirados e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar – BDA; **2)** fragmentos da lamela do fungo foram aderidos em vaselina sólida à parte interna da tampa da placa de Petri, após liberação de esporos sobre o meio de cultura BDA solidificado na parte inferior da placa, o meio de cultura contendo os esporos foi transferido para outra placa com o mesmo meio de cultura; **3)** a estirpe do basidioma foi fragmentada e submersa em solução de água destilada estéril + hipoclorito de sódio (4:1) por 30 segundos, posteriormente os fragmentos foram lavados em água destilada estéril e transferidos para placa de Petri contendo meio de cultura BDA. As condições de cultivo para a obtenção das colônias miceliais foram às mesmas, para as três técnicas, incubação em estufa do tipo Demanda Biológica de Oxigênio - BOD a 25 ºC, na ausência de luz. Realizou-se repiques das colônias miceliais até a obtenção das culturas puras.

Obtenção de inóculo
Um fragmento da cultura micelial foi transferido para placas de Petri contendo 15 mL de meio BDA e mantidos em BOD a 25 ºC, na ausência de luz, por 12 dias. Fragmentos de 2 x 2 mm retirados da borda das colônias foram utilizados como inóculos dos experimentos.

Obtenção de filtrado
Três inóculos foram transferidos para frascos do tipo Erlenmeyer (100 mL) contendo 50 mL de meio Extrato de Malte e Peptona (30 g/L extrato de malte, 3 g/L peptona). A incubação foi realizada em estufa tipo BOD com temperatura de 25 ºC, por 30 dias. Após este período o micélio foi separado do meio de cultura por filtração. A massa micelial foi usada para avaliar a produção de biomassa e o filtrado para avaliação da atividade antimicrobiana. Em uma segunda etapa, ampliou-se o período de incubação, para o isolado de *Gloeoporus* sp., de 30 a 70 dias (obtendo o filtrado de três amostras a cada dez dias), afim de verificar se o aumento do período de incubação favorece a produção dos metabólitos antibacterianos.

Avaliação da produção de biomassa
A colônia fúngica foi desidratada em estufa com circulação de ar a 65 ºC por 24 h, seguida por 105 ºC até obter massa constante. As amostras foram mensuradas com auxílio de balança analítica.

Avaliação antimicrobiana
Utilizou-se o método de difusão em ágar - técnica do pocinho, tendo como micro-organismo teste a bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis* Cohn. Uma alíquota da colônia bacteriana foi transferida para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio Infusão de Cérebro e Coração – ICC e incubada a 37 ºC por 18±1 h. Após esse período, a cultura bacteriana foi diluída em Água peptonada [cloreto de sódio (8,5 g/L), peptona (1g/L)] e posteriormente em meio Infusão de Cérebro e Coração Ágar (ICCA) em concentração aproximada de 10^5 UFC/mL. Foi transferido para placas de Petri (9 cm diâmetro) 20 mL do meio com a bactéria. Após solidificação do meio confeccionou-se três orifícios (9 mm de diâmetro) em cada placa, para onde transferiu-se 0,1 mL de filtrado do cultivo micelial dos macrofungos. O filtrado do cultivo micelial do basidiomiceto, *Panus strigellus* (Berk.) Overh., foi utilizado como controle positivo. As placas foram armazenadas em geladeira a 4 ºC *overnight* e posteriormente mantidas a 37 ºC em estufa bacteriológica de 12 a 18 h. Após este período, foi observado se houve ou não formação de zona de inibição da bactéria ao redor dos pocinhos. As zonas de inibição foram classificadas em: zona de inibição difusa (±) e clara zona de inibição (+), que foram mensuradas com auxílio de régua a distância entre a borda do pocinho a borda do halo.

Delineamento experimental
O experimento foi inteiramente casualisado, com três repetições para avaliar a produção de biomassa e nove na avaliação da atividade antimicrobiana.

3. Resultados e Discussão

Coleta e isolamento de macrofungos
Foram coletados 97 espécimes pertencentes a 13 famílias e 07 ordens, sendo que as famílias mais coletadas foram: Polyporaceae (35%), Hymenochaetaceae (22%) e Meripilaceae (10%). Obteve-se um total de 19 culturas miceliais: dois isolados de *Auricularia delicata* (Mont.) Henn., três de *Dacryopinax* spp., um de *Echinochaete* sp., dois de *Geastrum* spp., um de *Gloeoporus* sp., um de *Lentinula raphanica* (Murrill) Mata & R.H. Petersen, um de *Lentinus* sp., três de *Marasmius* spp., um *Oudemansiella* sp., um de *Phallus* sp., um de *Pleurotus* sp., um de *Tetrapyrgos* sp. e um de *Trametes* sp., os isolados representaram 20% do total de amostras coletadas.

Crescimento micelial e atividade antimicrobiana dos isolados obtidos
Constatou-se variação na produção de biomassa micelial entre os isolados cultivados, mesmo entre isolados do mesmo gênero (Figura 1). Os isolados de *A. delicata* (1), *Tetrapyrgos* sp. e *Trametes* sp., foram mais favorecidos pelas condições de cultivo utilizados neste experimento, quanto à produção de biomassa micelial. Enquanto que os isolados de *Geastrum* sp. (2), *Marasmius* sp. (1) e *Phallus* sp., foram menos favorecidos em relação a produção de massa micelial. A atividade antimicrobiana contra *B. subtilis* foi observada pelos filtrados das culturas miceliais do isolado de *Dacryopinax* sp. (1) e de *Gloeoporus* sp., além do controle, *P. strigellus* com atividade já conhecida (Figura 1). A atividade antibacteriana do isolado de *Gloeoporus* sp., contra *B. sutilis* (Figura 2), foi favorecida pelo aumento do período de incubação, havendo diferença significativa entre os períodos de incubação avaliados (p<0,01)
Knight *et al*. (2003) discutem que as condições para produção de metabólitos secundários não são necessariamente iguais às condições ótimas para o crescimento dos micro-organismos. Por outro lado, autores como Tortora *et al.* (2000) e Teixeira *et al.* (2011) afirmam que os micro-organismos produzem seus metabólitos secundários quando atingem a fase estacionária do seu ciclo biológico. Neste trabalho observou-se as duas situações. Corroborando com resultados de Chaves *et al.* (2012) com *P. strigellus*, utilizado como controle, apresentou produção de compostos antimicrobianos na temperatura de 25 °C. Sendo que, a temperatura ótima de crescimento micelial deste isolado é de 35 °C (Vargas-Isla e Ishikawa, 2008). Por outro lado, ao cultivar *Gloeoporus* sp. por 30 dias seu filtrado apresentou uma fraca zona de inibição. No entanto, ampliando-se o tempo de incubação avançando-se o cultivo para a fase estacionária

do fungo (Figura 2), a clareza e o tamanho da zona de inibição foi proporcionalmente maior. Vale ressaltar que os resultados negativos para a atividade antibacteriana obtidos nas condições de cultivo deste experimento não significa que os isolados não produzam compostos antimicrobianos. É importante se desenvolver outros estudos Rosa *et al.* (2003), relatam a atividade antibacteriana de *Gloeoporus thelephoroides* (Hook.) G. Cunn., contra *Bacillus cereus* Frankland. A literatura relata também a atividade citotóxica e anti-protozoário do gênero *Gloeoporus* sp. (Rosa *et al*. 2009). Para o gênero *Dacryopinax* sp., não foram encontradas atividades biológicas relatadas em literatura até o momento. As pesquisas seguem em busca da identificação dos princípios ativos referentes à atividade antibacteriana dos isolados utilizados neste trabalho.

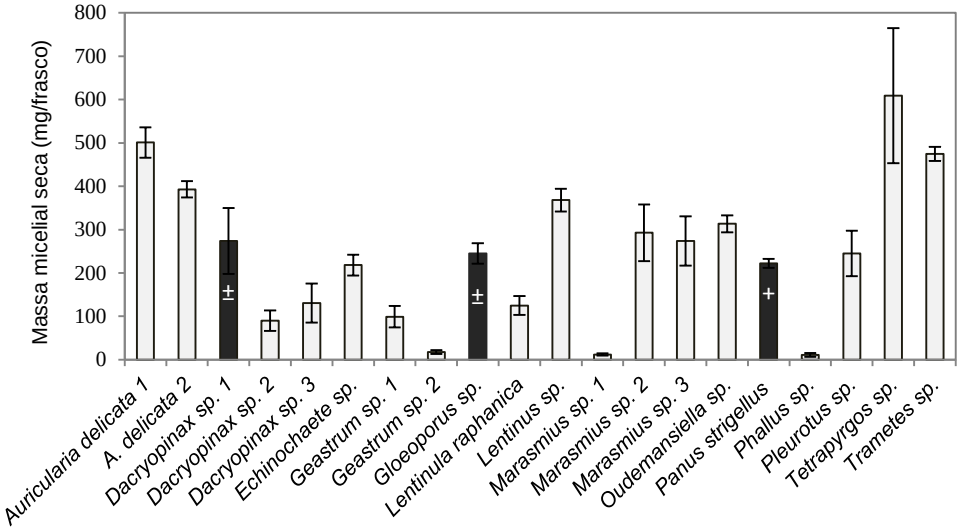

Figura 1 – Crescimento micelial e atividade antibacteriana de macrofungos, cultivados em meio de cultura Extrato de Malte e Peptona (Frascos de 100 mL, 50 mL de meio), a 25 °C por 30 dias, em condição estática e no escuro. Colunas = massa seca. Barras = desvio padrão. O teste antibacteriano foi contra *Bacillus subtilis*. Colunas claras = resultado negativo. Colunas escuras = resultado positivo. Sinais de (+) = clara zona de inibição; (±) = zona de inibição difusa. n = 4 (massa micelial) e n = 9 (atividade antimicrobiana).

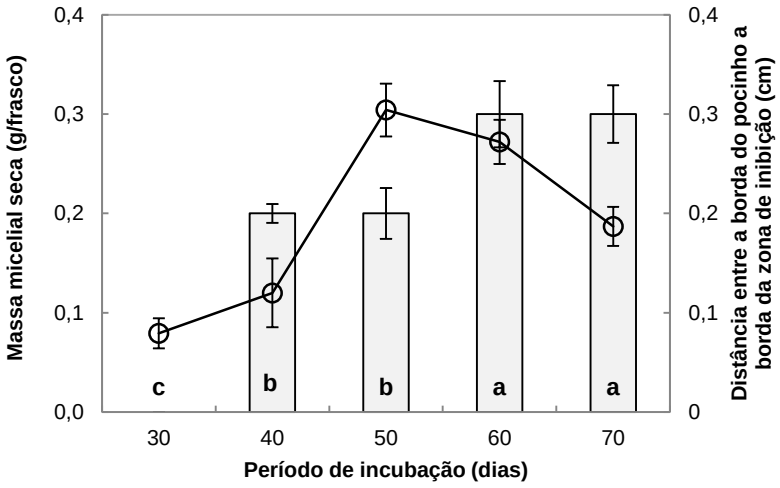

Figura 2 – Crescimento micelial e atividade antibacteriana de *Gloeoporus* sp., cultivado em meio de cultura Extrato de Malte e Peptona (Frascos de 100 mL, 50 mL de meio), a 25 °C, em condição estática e no escuro. Linhas = massa seca. Colunas = Atividade antibacteriana. Barras = desvio padrão. O teste antibacteriano foi contra *Bacillus subtilis*. Médias (atividade antibacteriana) com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,01) [n = 3 (massa micelial) e n = 9 (atividade antimicrobiana)].

4. Conclusão

Dois isolados de macrofungos coletados na região de Manaus, Amazonas, *Dacryopinax* sp. e *Gloeoporus* sp., produzem metabólitos antibacterianos contra *B. subtilis*.

5. Referências Bibliográficas

Alves, M.J.; Ferreira, I.C.F.R.; Dias, J.; Teixeira, V.; Martins, A.; Pintado, M. 2012. A review on antimicrobial activity of mushroom (basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Medica*, 78: 1707–1718.

Aqueveque, P.; Anke, T.; Saéz, K.; Silva, M.; Becerra, J. 2010. Antimicrobial activity of submerged cultures of Chilean basidiomycetes. *Planta Medica*, 76: 1787–1791.

Brizuela, M.A.; García, L.; Pérez, L.; Mansur, M. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabólitos secundários. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 15: 69-74.

Chaves, R.S.; Vargas-Isla, R.; Araujo, A.M.M.; Ishikawa, N.K. 2012. Curva de crescimento micelial e atividade antimicrobiana de *Panus strigellus*, um cogumelo comestível. *I Congresso de iniciação científica PIBIC INPA – CNPq/FAPEAM*. Manaus, AM.

Guimarães, D.O; Momesso, L.S; Pupo, M.T. 2010. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33: 667-679.

Knight, V.; Sanglier, J.J.; DiTulio, D.; Braccili, S.; Bonner, P.; Waters, J.; Hughes, D.; Zhang, L. 2003. Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62: 446-458.

Lindequist, U.; Niedermeyer, T.H.J.; Julich, W. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative - eCAM*, 2: 285-299.

Rosa, L.H.; Machado, K.M.G.; Jacob, C.C.; Capelari, M.; Rosa; C.A. Zani, C.L. 2003. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial active. *Memórias do Instituto Osvaldo Cruz*, 98: 967-974.

Rosa, L.H.; Machado, K.M.G.; Rabello, A.L.T.; Souza-Fagundes, E.M.; Correa-Oliveira, R.; Rosa, C.A.; Zani, C.L. 2009. Cytotoxic, immunosuppressive, trypanocidal and antileishmanial activities of Basidiomycota fungi present in Atlantic Rainforest in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 95: 227–237.

Shu, Y. 1998. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*, 61: 1053-1071.

Suay, I.; Arenal, F.; Asensio, F.J.; Basilio, A.; Cabello, M.A.; Díez, M.T.; García, J.B.; Val, A.G.; Gorrochategui, J.; Hernández, P.; Peláez, F.; Vicente, M.F. 2000. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 129–139.

Texeira, M.F.S.; Silva, T.A.; Palheta, R.A.; Carneiro, A.L.B.; Atayde, H.M. 2011. *Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada*. Edua, Manaus, Brasil. 255pp.

Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. 2000. *Microbilogia*. Artmed, Porto Alegre, Brasil. 827 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.

Wasser, S.P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 258–274.

World health organization - WHO, 2012. The evolving of antimicrobial resistence: options for action, 120: 1-125 (http://whqlibdoc.who.int/publications). Acesso em 31/01/2013.