

## INFLUÊNCIA DE LUZ COM DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA NO CRESCIMENTO MICELIAL E NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Panus strigellus*

Filipe de Souza MENDES<sup>1</sup>  
Hudson Freires de ANDRADE<sup>1</sup>  
Raquel Sousa CHAVES<sup>2</sup>  
Ruby VARGAS-ISLA<sup>3</sup>  
João Vitor Camargo SOARES<sup>4</sup>  
Noemia Kazue ISHIKAWA<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/FAPEAM; <sup>2</sup>Mestranda-Botânica/INPA/CNPq; <sup>3</sup>Pós-Doutorado Junior/CNPq/CENBAM/INPA; <sup>4</sup>Colaborador DSER/INPA; <sup>5</sup>Orientadora CBIO/INPA

### INTRODUÇÃO

*Panus strigellus* (Berk.) Overh. é um fungo comestível de ocorrência na Amazônia, decompositor de madeira e produtor de diferentes classes de metabólitos secundários biologicamente ativos, dentre eles o terpenoide hipnofilina (Ishikawa *et al.* 2009). O composto foi isolado pela primeira vez por Kupka *et al.* (1981) do fungo *Crepidotus epibryus* (Fr.) Quél. (= *Pleurotellus hypnophilus* (Pers.) Fayod). A hipnofilina apresenta atividade antimicrobiana contra uma gama de micro-organismos tais como *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link, *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Trypanosoma cruzi* Chagas, *Leishmania amazonensis* Lainson & Shawe até contra vírus e carcinomas (Kupka *et al.* 1981; Ishikawa *et al.* 2009; Souza-Fagundes *et al.* 2010; Pinto *et al.* 2013). A produção de metabólitos secundários de *P. strigellus* mostrou-se dependente do meio de cultura empregado (Barros-Filho 2009), sugerindo que este fungo pode sofrer influências de fatores ambientais na produção de seus compostos antimicrobianos.

Dentre os fatores ambientais que podem influenciar os organismos, podemos citar a luz, em plantas os comprimentos de onda de 440 e 500 nm excitam a clorofila ativando a fotossíntese (Nelson e Cox 2011). Em bactérias pode ser citado como exemplo a *Propionibacterium acne* (Gilchrist) Douglas & Guntera principal causadora da acne, a luz azul (415 nm) e vermelha (660 nm) é eficiente na inibição do seu crescimento (Papageorgiou *et al.* 2000).

Em fungos a luz azul tem importante papel na ativação de genes para controlar seu desenvolvimento, morfogênese, fototropismo, a indução de estruturas carotenogênicas, reprodutivas e reposição do ritmo circadiano (Flores *et al.* 2004; Romero *et al.* 2004). A luz também pode influenciar no metabolismo secundário dos fungos como sugerido no trabalho de Kim *et al.* (2013) onde o fungo *Fusarium graminearum* Schwabe produziu diferentes metabólitos secundários quando incubado na ausência e na presença de luz.

Visto que os fatores ambientais podem influenciar na produção de compostos antimicrobianos de *P. strigellus* e que a luz é um fator ambiental que pode afetar em vários aspectos o desenvolvimento dos fungos, o presente trabalho objetivou avaliar a influência de diferentes comprimentos de onda na produção de biomassa e na produção de compostos antimicrobianos pelo fungo.

### MATERIAL E MÉTODOS

**Micro-organismos.** A cultura micelial de *P. strigellus* utilizada neste trabalho esta depositada na Coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA, sob o número INPACM 1464

**Obtenção de inóculo.** Fragmentos da cultura micelial estoque de *P. strigellus* foi transferido para placas de Petri contendo aproximadamente 15 mL de meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e mantidos em estufa a 25 °C, na ausência de luz, por sete dias. Três fragmentos de 2 x 2 mm retirados da borda da colônia foram utilizados como inóculos do experimento.

**Tratamentos com luz de diferentes comprimentos de onda:** Foram utilizadas cinco caixas com 23,5 cm de comprimento, com 18 cm de largura e 14 cm de altura, em um dos lados das caixas foram acomodadas 90 lâmpadas do tipo Light Emissor Diode (LED) de cores específicas para cada caixa, as cores usadas foram azul, branco, verde, vermelho. Como controle utilizou-se o tratamento sem luz.

**Distribuição dos inóculos:** Foram preparados 750 mL de meio de cultura caldo de Batata Dextrose (BD) e distribuídos em 15 frascos de Erlenmeyer (100 mL) e em cada frasco foi inoculado três fragmentos de 2 x 2 mm do micélio do fungo *P. strigellus*. Foram usados três frascos em cada tratamento e os mesmos foram colocados dentro das caixas e incubados em estufa a 25 °C por 35 dias.

**Filtrado e biomassa:** A massa micelial foi separada do filtrado por filtração, com o auxílio de um funil de Büchner, papel-filtro, Kitasato e uma bomba a vácuo. Os filtrados obtidos foram esterilizados por filtração com filtros Millipore 25 µm, guardados em tubos Falcon e armazenados a -4 °C e utilizados no teste antimicrobiano. A massa micelial foi

desidratada em estufa com circulação de ar a 65 °C durante 24 h, seguida a 105 °C até obter massa constante. As amostras foram mensuradas com auxílio de balança analítica.

**Avaliação antimicrobiana:** Foi utilizado método do pocinho, utilizando como micro-organismo teste a bactéria *Bacillus subtilis* Cohn. Com o auxílio de uma alça a bactéria foi inoculada em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio Brain Heart Infusion (BHI), e incubadas a 37 °C por 18±1 h. Após esse período, a cultura bacteriana foi diluída 1 mL em 9 mL de solução salina (NaCl 0,85%) e posteriormente 1 mL desta solução em 99 mL de meio Brain Heart Infusion Agar (BHIA) em concentração final aproximada de 10<sup>4</sup> UFC/mL, 20 mL do meio com a bactéria foi transferido para placas de Petri (diâmetro 9 cm). Após solidificação do meio foi feito três orifícios de 9 mm de diâmetro em cada placa, para onde transferiu-se 0,1 mL de filtrado dos diferentes tratamentos. As placas foram armazenadas em geladeira a 4 °C *overnight* e posteriormente mantidas a 37 °C em estufa bacteriológica de 12 a 18 h. Após este período, foi mensurado o tamanho do halo, mediu-se com auxílio de um paquímetro a distância entre a borda do orifício e a borda do halo.

**Avaliação estatística** Para avaliação estatística os dados do tamanho dos halos e as massas miceliais foram submetidos a análises de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores das médias das massas secas de *P. strigellus* cultivados no escuro ou sob exposição de luz LED de cores branca, azul, verde e vermelho não apresentaram diferença significativa pelo Teste de Tukey (Figura 1). Entretanto, a cor da luz LED influenciou a atividade antimicrobiana do filtrado da cultura (Figura 2). As luzes branca, verde e vermelha mantiveram o mesmo nível de atividade antimicrobiana do controle no escuro, por outro lado, a luz LED azul reduziu significativamente a ação antimicrobiana do filtrado da cultura micelial de *P. strigellus*.

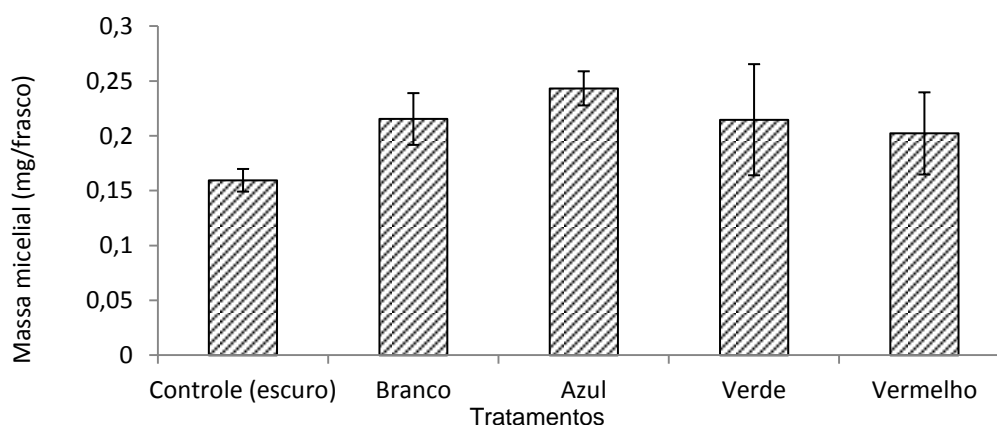


Figura 1. Crescimento micelial de *Panus strigellus* cultivados em meio de cultura Caldo da Batata Dextrose (Frascos de 100 mL, 50 mL de meio), a 25 °C por 35 dias, em condição estática, no escuro e na presença de luz LED de diferentes comprimentos de onda. Colunas = massa seca. Barras = desvio padrão. n = 3. As médias não apresentaram diferenças pelo teste de Tukey com 5% de significância.

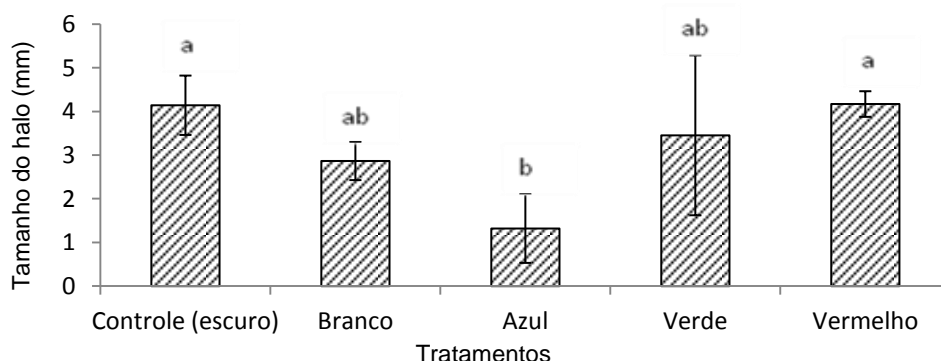


Figura 2. Atividade antibacteriana de *Panus strigellus* cultivado em meio de cultura Caldo de Batata Dextrose (Frascos de 100 mL, 50 mL de meio), a 25 °C, em condição estática e no escuro na presença de luz LED de diferentes comprimentos de onda. Colunas = Atividade antibacteriana. Barras = desvio padrão. O teste antibacteriano foi contra *Bacillus subtilis*. Médias (atividade antibacteriana) com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,01$ ), n = 9. Médias com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey com 5% de significância.

Apesar da massa micelial não diferir nas luzes azul e branca estimularam a formação de primórdios (Figura 3). Este resultado corrobora com literaturas como nos trabalhos de Kamada *et al.* (2010) e Dong *et al.* (2013) mostram a dependência da luz principalmente da luz azul na formação dos corpos de frutificação de basidiomicetos.

Os resultados experimentais demonstraram que a luz azul influenciou positivamente a formação de primórdios de *P. strigellus* e negativamente a atividade antibacteriana contra *B. subtilis*. Trabalhos complementares são necessários para avaliar se a luz azul inibe a produção dos metabólitos antimicrobianos ou degrada os mesmos. Trabalhos de Kim *et al.* (2013) indica que a luz interfere na produção de metabólitos secundários de *F. graminearum*. A luz azul por ser mais energética do que os outros comprimentos de onda atua na degradação de alguns compostos químicos por fotodegradação (Allinger *et al.* 2011).

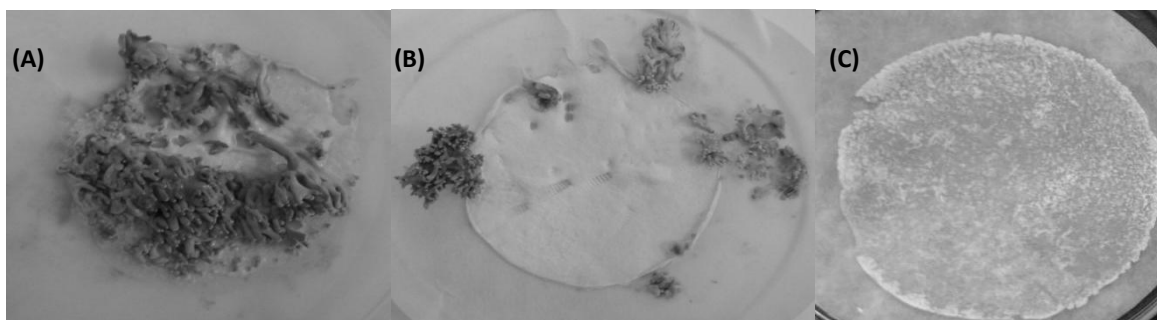


Figura 3. Colônia do fungo *Panus strigellus* exposto ao tratamento com luz LED azul (A) e branca (B) apresentando primórdios de frutificação. Colônia de *P. strigellus* mantida no escuro (C) e sem apresentar formação de primórdios.

## CONCLUSÃO

A luz não influencia na formação de biomassa de *P. strigellus*, mas a luz azul influencia na formação dos primórdios de frutificação. Para a atividade antibacteriana contra *B. subtilis*, os tratamentos no escuro e com luz vermelha apresentam maior atividade e o tratamento com luz azul a menor atividade antibacteriana.

## REFERÊNCIAS

- Allinger, N.L.; Cava M.P.; Jongh D.C.; Johnson C.R.; Lebel A.; Stevens C.R. 2011. *Química Orgânica*. LTC, Rio de Janeiro, 984p.
- Barros-Filho, B.A. 2009. Estudo Químico do Basidiomiceto *Lentinus strigellus*. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará. 222p.
- Dong, J.Z.; Lei, C.; Zheng, X.J.; Al, X.R.; Wang, Y.; Wang Q. 2013. Light wavelengths regulate growth and active components of *Cordyceps militaris* fruit bodies. *Journal of Food Biochemistry*, 37: 578-584.
- Flores, S.C.; Momberg, M.R.; Bibbins, M.; Noyola, P.P.; Estrella, A.H. 2004. BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology*, 150: 3561-3569.
- 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.
- Kamada, T.; Sano, H.; Nakazawa, T.; Nakahori, K. 2010. Regulation of fruiting body photomorphogenesis in *Coprinopsis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology*, 47: 917-921.
- Kim, H.; Son, H.; Lee, Y.W. 2013. Effects of light on secondary metabolism and fungal development of *Fusarium graminearum*. *Journal of Applied Microbiology*, 116: 380-389.
- Kupka, J.; Anke, T.; Gianetti, B.M.; Stglich, W. 1981. Antibiotics from basidiomycetes. *Archives of Microbiology*, 130: 223-227.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. 2011. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Sarvier Grupo A, São Paulo, 1304p.
- Papageorgiou, P.; Katsambas, A.; Chu, A. 2000. Phototherapy with blue (415 nm) and red (660 nm) light in the treatment of *Acne vulgaris*. *British Journal of Dermatology*, 142: 973-978.
- Pinto, M.C.X.; Cota, B.B.; Rodrigues, M.A.; Leite, M.F.; Souza-Fagundes, E.M. 2013. The Cytotoxic and Proapoptotic Activities of Hypnofilina are associated with calcium signaling in UACC-62 Cells. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*, 27: 479-485.
- Romero, J.R.; Corrochano, L.M. 2004. The gene for heat-shock protein HSP100 is induced by blue light and heat-shock in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Current Genetics*, 46: 295-303.

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.