

Prospecção de substâncias antimicrobianas em cogumelos da região sudoeste do Paraná

Screening of antimicrobial substances in mushrooms from the southwestern region of Paraná

RESUMO

Kelli Cristina Bacchi
kellibacchi@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Federal do Paraná,
Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Eduardo Felimberti Cezar
eduardocezarc@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Federal do Paraná,
Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Francisco Menino Destéfani
Vitola
franciscovitola@utfpr.edu.br
Universidade Federal do Paraná,
Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Mofos apresentam facilidade em produzir esporos que se dissipam pelo ar. No entanto, o excesso de esporos no ambiente pode afetar a saúde humana, causando doenças respiratórias e infecções. O intuito do presente experimento foi analisar a atividade antifúngica do caldo de cultivo micelial de sete linhagens de cogumelos frente a duas linhagens de mofos isolados do ambiente. Os cultivos submersos de micélios de cogumelos foram conduzidos entre 25°C e 30°C, em incubadora com agitação orbital, por 21 dias. Foram preparadas soluções de esporos das duas linhagens de mofos, para os métodos de análise com discos de difusão e poços em placas de Petri. Estas análises foram realizadas com o objetivo de avaliar a atividade antifúngica dos fermentados sobre a germinação de esporos, produzindo halos de inibição. Nistatina foi utilizada como controle positivo. Nenhuma das amostras dos fermentados apresentou eficácia. Contudo, o método mostrou boa sensibilidade, dada a clara visualização de áreas de inibição nas placas contendo nistatina. Os mesmos métodos serão aplicados futuramente para testar cogumelos nativos, além de outras formas de cultivo e de extração.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade Antifúngica. Esporos. Cogumelos.

ABSTRACT

Molds present the ability to produce spores that diffuse through the air. However, the excess of spores in the environment can affect human health, causing respiratory diseases and infections. The purpose of the present experiment was to analyse the antifungal activity of the cultivation broth from seven mushroom strains over two mold strains isolated from the environment. The submerged cultivations of mushroom mycelium were performed in between 25°C and 30°C, in a shaker incubator, for 21 days. Spore solutions of the two mold species were prepared for the disc-diffusion and well, Petri dish methods. These analyses were performed in order to evaluate the antifungal activity of the fermented broths over the germination of spores, producing inhibition halos. Nistatin was used as a positive control. None of the fermented broths showed efficacy. Nevertheless, the method showed good sensitivity, given the sharp visualization of inhibition areas in the Petri dishes which contained nistatin. The same methods will be applied for the evaluation of native mushrooms, besides other cultivation and extraction forms.

KEYWORDS: Antifungal activity. Spores. Mushrooms.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

O presente estudo decorre de uma preocupação com fungos esporulados que estão presentes em diversos lugares devido à sua fácil disseminação pelo ar. Esses mofo contribuem para a decomposição de muitos materiais; são denominados como indicadores biológicos de qualidade do ar. Os esporos dos mofo são estruturas uni ou multicelulares, que se dispersam pelo ar e germinam, afetados diretamente com os nutrientes, a temperatura, umidade e pH do local em que se encontram (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; PUTZKE PUTZKE, J.; LOPES PUTZKE, M. T., 2002).

Algumas espécies de mofo são usadas comercialmente para a produção de queijos, fármacos e aditivos alimentares. No entanto, pessoas que convivem em lugares com grande geminação desses esporos, podem acabar desenvolvendo problemas de saúde, muitas vezes respiratórios, ou mais graves, como penicilose, uma doença pulmonar que pode se espalhar na corrente sanguínea afetando os rins e outras regiões do corpo, podendo ser fatal. Estudos relatam a dificuldade nos ambientes hospitalares em se controlar essa disseminação de esporos, podendo agravar quadro de seus pacientes (SOUZA, 2011; PUTZKE PUTZKE, J.; LOPES PUTZKE, M. T., 2002; SOUZA, 2014).

A indústria alimentícia também é muito afetada pelos mofo. Já são utilizados comercialmente produtos que atrasam o desenvolvimento de fungos, alguns sendo usados misturados ao alimento, ou ainda produtos aplicados superficialmente como o biofilme depois do alimento finalizado, que ajudam na conservação do material orgânico (CECHIM, 2014).

MATERIAL E MÉTODOS

Com o uso de um *swab* foram coletadas amostras em móveis de madeira das residências e tocos de árvores apodrecidos. Para o crescimento dos microrganismos foi preparado o meio de cultivo BDA (Ágar Dextrose Batata) em placas de Petri. Após a incubação de 48 horas (para certificar a esterilização do meio), houve a transferência do material coletado para as placas, e incubação a 25°C em estufa microbiológica (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; SOUSA, 2011).

Para a identificação do *Penicillium* foram realizadas análises macromorfológicas (coloração, diâmetro e coloração reversa da colônia) e micromorfológicas (presença de conídios, fiálides, ramificações, conidióforos, cleistotécios e escleródios), observadas com a utilização de um microscópio. Para o preparo das lâminas, utilizou-se um pedaço de fita adesiva transparente, que foi pressionado levemente na placa com o fungo com 5 dias de incubação e transferido para a lâmina, outro método foi o de retirar uma pequena região do micélio para a lâmina, utilizando alça microbiológica. Em ambas as técnicas, foi utilizada uma gota de azul de metileno, para melhor observação (SANTOS, 2015; SOUSA, 2011).

O método de suspensão de esporos foi adaptado de CAMPANINI, E. B.; DAVOLOS, C. C.; ALVES, C. C.; LEMOS, M. V. F. (2012). Depois da incubação de 4 dias dos fungos mitospóricos MTS e MMS (códigos internos) em placas contendo BDA, utilizou-se água destilada autoclavada como solução de coleta. Em um fluxo laminar, a água despejada nos meios foi coletada com o auxílio de uma

micropipeta, para microtubos de 2 mL. As suspensões de esporos foram levadas ao congelador para conservação.

Inóculos comerciais de cogumelos comestíveis foram adquiridos das empresas Funghi & Flora e Brasmicel. O reisolamento foi realizado em placas Petri com meio BDA, na câmara de fluxo laminar. Foram utilizadas duas técnicas de isolamento: a passagem de fragmentos de micélio de placa para placa; e a partir da frutificação do cogumelo, utilizando um bisturi e pinça estéreis para a retirada de um pedaço isento de contato com o ambiente externo (URBEN, 2017). Os fungos isolados foram: *P. citrinopileatus* (PC), *P. djamor* (PI3), *P. pulmonarius* (PSC), *Ganoderma lucidum* (GD), *Pleurotus ostreatus* linhagem preta (SP), *Pleurotus ostreatus* linhagem branca (PO2) e *Pleurotus ostreatus* linhagem cinza (POP2).

Para preparo do meio de cultivo líquido, foram utilizados os seguintes reagentes: Glicose, 10g/L; Extrato de levedura, 4g/L; MgSO₄, 0,3 g/L; KH₂PO₄, 0,3 g/L e autoclavado por 20 minutos. Depois de 48 horas os meios foram inoculados com os fungos industriais isolados nas placas de BDA e elevados ao *shaker* com agitação de 120 rpm por três semanas com a temperatura entre 25°C a 30°C, até a formação dos micélios, como na figura 1. Depois da fermentação, os caldos foram transferidos para microtubos de 2 mL em câmara de fluxo, com a utilização da micropipeta e armazenadas em *freezer*.

Figura 1 – Fermentação



Fonte: Autora (2020).

Foram preparadas dezesseis placas com meio BDA para os discos de difusão e poços. No fluxo laminar, com a utilização da alça de Drigalski foram espalhados, em oito placas, 20µL de solução de esporos da linhagem MTS; as outras placas foram preparadas com a linhagem MMS. Depois, com a utilização de ponteiros de 1000µL autoclavadas, foram feitos os poços em uma metade da placa e adicionados 20µL dos 7 fermentados, cada um em uma placa; na última placa foi utilizado como controle um antifúngico conhecido, Nistatina (PÉREZ, A. L. A. L.; CARDOSO, A. M. R.; CAVALCANTI, Y. W., 2011).

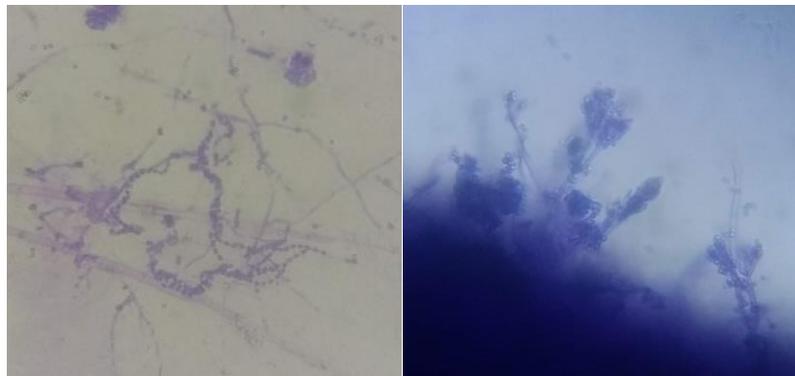
Os discos foram preparados com filtro de café da marca Melitta, usando um furador de papel para patronizar uma dimensão de 6mm de diâmetro e autoclavados dentro de microtubos de 2 mL. Com a utilização de uma pinça foi possível mergulhar os discos nos microtubos contendo amostras dos fermentados e transferir para suas respectivas placas. Cada placa recebeu um disco contendo extrato igual ao já adicionado aos poços, na outra metade da placa (OWAID, M. N.; AL-SAEED, S. S. S.; AL-ASSAFFII, I. A., 2017). O processo se repetiu para os dois

fungos esporulados, que foram observados por 5 dias consecutivos para a análise de interação do crescimento do fungo com os caldos.

RESULTADOS

Conforme a análise no microscópio, observou-se que os conídios, as estruturas características de reprodução dos fungos apresentam arthroconídios, que seriam esporos formados pela segmentação das suas hifas, e também conidiósporos, com a morfologia condizente com fungos do gênero *Penicillium*, podendo ser melhor observados na figura 2. Além da observação das suas características macromorfológicas, possuindo a coloração esverdeada e textura pulverulenta, comum nesses fungos (SOUSA, 2011).

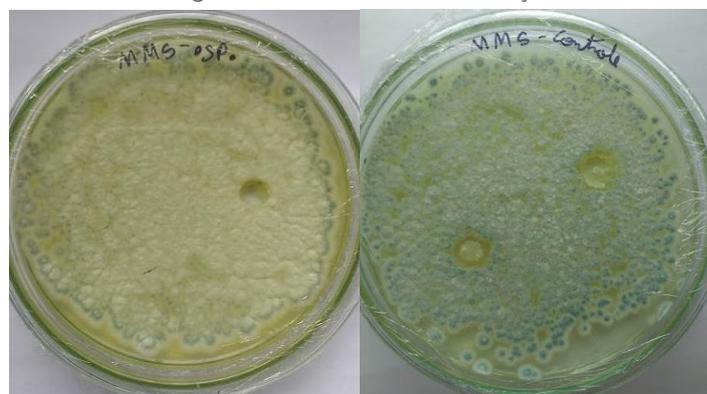
Figura 2 – Identificação do *Penicillium*



Fonte: Autora (2020).

As placas que possuíam os caldos de fermentação nos poços e discos não apresentaram nenhuma atividade de inibição em relação aos esporos MTS e MMS, sendo que todas ficaram com um aspecto muito parecido, com o crescimento de micélio e produção de novos esporos por cima dos discos e dentro dos poços, o que pode ser observado na Figura 3, na imagem à esquerda. Já com as duas placas do controle foi possível observar uma inibição resultante do antifúngico conhecido. Em ambos, a inibição ficou mais evidente nos quatro primeiros dias.

Figura 3 – Teste dos Discos e Poços



Fonte: Autora (2020).

DISCUSSÃO

Com os resultados é possível observar que não houve atividade antifúngica nos caldos de fermentação dos fungos industriais em relação aos mofos isolados. Por crescerem por cima dos discos e dentro dos poços, é possível inferir que os caldos contêm nutrientes para as linhagens testadas (MTS e MMS) contribuindo para seu crescimento.

CONCLUSÃO

A pesquisa realizada com caldos de fermentação dos cogumelos permite afirmar que não houve êxito na atividade antifúngica em relação ao *Penicillium*. No entanto os métodos de discos de difusão e poços apresentaram boa sensibilidade, podendo no futuro ser utilizados para testar outros caldos de fermentação de cogumelos industriais ou nativos, além de outras variedades de substâncias, com outros métodos de extração. Se alguma substância tiver eficácia, pode-se usar a técnica do MIC (concentração inibitória mínima) para saber a melhor concentração inibitória. Os estudos deverão ter continuidade, com o objetivo de desenvolver novos antimicrobianos eficazes para novas opções de produtos para diferentes aplicações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço o incentivo da Universidade, em especial ao orientador Francisco Menino Destéfani Vítola e aos colegas Patricia de França Marins, Eduardo Felimberti Cezar e Juliane Mayara Casarim Machado por contribuírem para o andamento do meu projeto. Agradeço também à minha família pelo apoio.

REFERÊNCIAS

CAMPANINI, E. B.; DAVOLOS, C. C.; ALVES, C. C.; LEMOS, M. V. F. Caracterização de novos isolados de bacillus thuringiensis para o controle de importante inseto-praga de agricultura. *Bragantia*, Campinas, v. 71, n. 3, 2012. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0006-87052012000300007&script=sci_arttext&tlng=pt. Acessado em: 02 set. 2020.

CECHIM, F. E. *Quitossana na indução de resistência e controle in vitro de mofo cinzento, podridão parda e podridão amargo*. 2014. Tese (Pós-Graduada em Agronomia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014. Disponível em: http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/1214/1/PB_PPGAG_D_Cechim%2c%20Fl%2c%20a1vio%20Endrigo%202014.pdf. Acessado em: 02 set. 2020.

ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e iotecnologia*. 2 ed. Rio Grande do Sul: EDUCS, 2010.

OWAID, M. N.; AL-SAEED, S. S. S.; AL-ASSAFFII, I. A. Antifungal activity of cultivated oyster mushrooms on various agro-wastes. *Summa Phytopathologia*,

Botucatu, v. 43, n. 1, Jan./Mar. 2017. Disponível em:
https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052017000100009. Acessado em: 02 set. 2020.

PÉREZ, A. L. A. L.; CARDOSO, A. M. R.; CAVALCANTI, Y. W. Revista Brasileira de Ciência da Saúde. **Atividade antifúngica de Antissépticos Bucais sobre candida spp**: Paraíba, v. 15, n.1, p. 69-74, 2011. Disponível em:
https://www.researchgate.net/profile/Andreia_Cardoso3/publication/275099371_Atividade_Antifungica_de_Antissepticos_Bucais_sobre_candida_spp/links/5532a76f0cf27acb0ded9e83.pdf. Acessado em: 02 set. 2020.

PUTZKE, J.; LOPES PUTZKE, M. T. **Os Reinos dos Fungos**. V. 2. Rio grande do Sul: UNISC, 2002.

SANTOS, S. S. **Laminário de Botânica para as aulas Práticas de Botânica I e Botânica II**. São Roque, São Paulo: Edição do autor, 2015. Disponível em:
http://www.fernandosantiago.com.br/laminario_botanica_final.pdf. Acessado em: 02 set. 2020.

SOUSA, P. P. R. **Avaliação Antifúngica do Óleo Essencial de Cinnamomum zaylanicum Blume como promotor do controle do Gênero Penicillium do ar ambiental em sistema industrial alimentar**. 2011. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011. Disponível em:
<https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/tede/6703/1/arquivototal.pdf> . Acesso em: 02 set. 2020.

SOUZA, W. B. **Ocorrência de fungos em paredes de alvenarias no ambiente hospitalar: estudo de caso**. PPGEC, Curitiba, 2014. Disponível em:
http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/1365/1/CT_PPGEC_M_Souza%20c%20Washington%20Batista%20de_2014.pdf Acesso em: 02 set. 2020.

URBEN, A. F. **Produção de Cogumelos por meio da tecnologia modificada: Biotecnologia e aplicações na agricultura e na saúde**. Brasília: Técnica, 2017.