



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



**PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA DE *Lentinus citrinus* PARA
FUTURA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES
FÚNGICAS E BACTERIANAS.**

Bolsista: Erika Kiyomi Yuyama, CNPq

MANAUS

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



RELATÓRIO PARCIAL
PIB-B/0042/2008
PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA DE *Lentinus citrinus* PARA FUTURA
APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES FÚNGICAS E
BACTERIANAS.

Bolsista: Erika Kiyomi Yuyama, CNPq
Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Francisca Simas Teixeira
Colaborador: Prof^o Antônio Batista da Silva

MANAUS
2009

RESUMO

Lentinus citrinus, cogumelo comestível, vem sendo investigado em relação as suas propriedades biológicas, ou seja, que atuam de modo a fornecer proteção adjuvante ao organismo, a fim de evitar infecções e outros processos lesivos. Tais propriedades têm sido comprovadas em trabalhos utilizando cogumelos comestíveis do mesmo gênero. Devido à biodisponibilidade desse cogumelo em regiões tropicais e a necessidade de pesquisas que visem determinar o potencial biológico, este trabalho teve como objetivo detectar a propriedade antimicrobiana de *Lentinus citrinus* cultivado em resíduo agroflorestal amazônico frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans*. Da biomassa desidratada de *L. citrinus*, os compostos bioativos foram extraídos em metanol/acetona 2:1 (v/v) e acetato de etila (10 mL) por sete dias. O extrato metanol/acetona e acetato de etila ao término do processo de maceração foram filtrados em papel de filtro, após concentração foram analisados por cromatografia de camada delgada (CCD). Posterior a esse procedimento, o extrato metanol/acetona foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica. Para as análises bioautográficas, os microrganismos-teste foram cultivados em meios seletivos e nesses cultivos foi preparada suspensão celular semelhante à coluna de MacFarland nº 1. De cada suspensão foi retirado 500 µL para ser homogeneizado em ágar Müeller-Hinton (bactérias) ou ágar Sabouraud (leveduras), juntamente com o revelador TCC-cloreto de trifeniltetrazoliun 1% (p/v). Essa mistura foi adicionada no cromatograma, que foi mantido em câmara úmida, a 37 °C por 24 horas (bactérias) e 72 horas (levedura). Os resultados mostraram que da biomassa de *Lentinus citrinus* foram observados sete biocompostos, dentre os quais, os *R_f*s de dois corresponderam a 0,37 - 0,69 e dos demais 0,38 - 0,50 - 0,60 - 0,65 - 0,75. Destes, os compostos de *R_f* 0,38 e 0,60 formaram halo de inibição frente a *Mycobacterium smegmatis* e os de *R_f* 0,38 e 0,65 frente a *Staphylococcus aureus*. Este estudo demonstra a presença de compostos com atividade antimicrobiana na biomassa de *L. citrinus* produzido em resíduos da Amazônia.

Palavras-chave: *Lentinus citrinus*, atividade antimicrobiana, bioautografia.

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	4
2. OBJETIVOS.....	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
4.1. Material biológico	9
4.2. Processamento da biomassa e extração dos biocompostos de <i>L. citrinus</i>	9
4.2.1. Cromatografia em coluna.....	9
4.3. Análise bioautográfica.....	9
4.3.1. Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	9
4.3.2. Determinação da atividade antimicrobiana por Bioautografia.....	10
4.3.2.1. Cultivo dos microrganismos- teste.....	10
4.3.2.2 Inoculação da suspensão de esporos em ágar Müller- Hinton ou em ágar Sabouraud.....	11
4.3.2.3 Exposição das placas cromatográficas ao ágar Müller- Hinton ou ao ágar Sabouraud adicionado da suspensão de esporos.....	11
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
6. CONCLUSÃO.....	14
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
8. ANEXOS.....	17

1. INTRODUÇÃO

Os cogumelos comestíveis representam um dos maiores recursos inexplorados como novas fontes de biocompostos para a promoção da saúde do homem, por isso são considerados alimentos nutracêuticos ou funcionais fisiológicos. Diversos estudos citam que a biomassa e/ou princípio ativo oriundo de espécies de cogumelos tem atividade antitumoral, anticarcinogênico, antiviral, antiinflamatório, hipoglicemiante, hipocolesterolêmico, hipotensivo, entre outros (BARROS et al., 2007; FURLANI; GODOY, 2005; FORTES; NOVAES, 2006).

Furlani e Godoy (2005) citam que shiitake (*Lentinus edodes*) fortifica e restaura o organismo, por isso vem sendo indicado para o tratamento de enfermidades que envolvam o enfraquecimento do sistema imune. Outra espécie de importância medicinal e terapêutica, o *Agaricus blazei*, descoberta no Brasil está sendo utilizado na forma de cápsulas, chás e também como alimento para prevenção de câncer, doenças do aparelho circulatório, digestivo e urinário, dentre outros.

Ainda com relação à importância medicinal, ensaios clínicos têm comprovado a ação benéfica dos cogumelos na terapia adjuvante dos pacientes com câncer. Ruwei et al. (2001), citado por Taveira e Novais (2007), demonstrou que uma mistura de seis extratos de cogumelos, contendo diferentes subtipos de β - glucanos, foram capazes de promover a secreção de imunoglobulina A (IgA), além de aumentar a atividade de monócitos e das células natural *killer* em pacientes com câncer que estavam sob tratamento com quimioterapia e/ou radioterapia.

Somado aos efeitos terapêuticos da biomassa de cogumelos, várias substâncias já foram identificadas, como a lentinana (polissacarídeo), potencializador do sistema imune; lentionina, composto sulfurado, com ação antibacteriana e antifúngica e o dimetilsulfonil, metildissulfito (derivado de lentionina) que têm forte ação inibitória contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (HATVANI, 2001). Suay et al. (2000) descreve também a atividade pleuromutilina no tratamento de patologia causada por micoplasma em gatos.

L. citrinus Walley & Rammeloo é outra espécie que está atraindo a atenção para estudos científicos devido as suas propriedades medicinais e por tratar-se de cogumelo comestível, inclusive, tem ocorrência em região de clima tropical e subtropical e já foi identificado na

Região do Nordeste brasileiro e está sendo produzido em resíduo agro-florestal em Manaus, no Estado do Amazonas.

A importância dos cogumelos comestíveis e a disponibilidade da biomassa de *Lentinus citrinus* justificam a realização deste estudo com a finalidade de se detectar compostos com atividade antimicrobiana frente a *Candida albicans* DPUA 1340, *Staphylococcus aureus* CCT 1352, *Escherichia coli* CCT 0547 e *Mycobacterium smegmatis* PDUFPE- 71.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a atividade antimicrobiana dos basidiomas de *Lentinus citrinus* DPUA 1535 contra bactérias e *Candida albicans*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a atividade antimicrobiana do extrato bruto dos basidiomas de *Lentinus citrinus* por bioautografia contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Mycobacterium smegmatis*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão visa abordar aspectos relacionados ao cogumelo comestível *Lentinus citrinus* e sua atividade antimicrobiana, com ênfase nos estudos referentes à identificação de compostos bioativos por técnica de Bioautografia.

De acordo com Orijel et al. (2009), mais de 3000 espécies de cogumelos são consumidos mundialmente e destas mais de 100 revelaram ter efeito benéficos no tratamento do câncer e de outras doenças crônicas. Além disso, Barros et al. (2007) faz referência à importância medicinal dos cogumelos devido ao potencial antimicrobiano, citando que *Lentinus edodes* foi capaz de induzir uma melhor resposta imune frente a infecções bacterianas e virais, e que, *Laetiporus sulphureus* apresentou importante atividade antioxidante e antimicrobiana devido à presença de flavonóides e compostos fenólicos em sua constituição. Esse potencial terapêutico pode explicar o crescente estudo na busca de substâncias capazes de inibir o crescimento microbiano.

Barros et al. (2007) destaca também a importância dos basidiomicetos como fonte de metabólitos secundários, a exemplo dos sesquiterpenóides, flavonóides e fenóis que possuem propriedades antibiótica e antifúngica. Shittu et al. (2005) relata também que os nucleosídeos são destacados como compostos com alto grau de atividade frente a *Mycobacterium smegmatis*, além dos poliacetilenos, estes, por sua vez, mais amplamente caracterizados por apresentar mais de 50 compostos insaturados com atividade antimicrobiana isolada a partir de espécies de *Cortinellus*, *Daedalea*, *Marasmius*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Russula* entre outros.

Em outros estudos, Barros et al. (2007) cita que o extrato obtido do micélio de *Leucopaxillus giganteus*, cogumelo encontrado no noroeste de Portugal demonstrou atividade frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, apresentando atividade seletiva frente a amostras de bactérias Gram-positivas, sendo o *Staphylococcus aureus*, o microrganismo mais suscetível entre elas.

Além disso, Suay et al. (2000), ressalta que entre 204 cogumelos analisados, mais de 109 espécies apresentaram atividade antimicrobiana frente a patógenos humanos, com predomínio da atividade antibacteriana sobre a antifúngica.

Com relação aos cogumelos do gênero *Lentinus* convém destacar espécies como *Lentinus edodes*, o shiitake, um alimento funcional, o qual, recentemente, está sendo ferramenta de

pesquisas extensivas a cerca de compostos com atividade farmacoterapêutica, ou seja, com atividade antitumoral, anti-carcinogênica, antiviral, hipotensora e hipocolesterolêmica (ISHIKAWA et al., 2001). De *Lentinus crinitis* isolaram dois tipos de sesquiterpenóides com atividade antimicrobiana. Enquanto, no mesmo trabalho foi relatado o isolamento de três agentes antifúngicos obtidos de *Trametes pubesceris* e *Ganoderma lucidum*. (SHITTU et al., 2006).

Consta na literatura que diversas técnicas são utilizadas para a detecção de atividade antimicrobiana e/ou a localização dos constituintes bioativos, como difusão em ágar, em disco de papel e bioautografia, respectivamente (ISHIKAWA et al., 2000; SHITTU et al., 2006; YALTIRAK et al., 2009). Shittu et al. (2006) descreve que a técnica de bioautografia combina cromatografia com bioensaio *in situ* a qual permite obter, diferente das demais técnicas qualitativas, a localização do constituinte ativo através da determinação do *R_f* (*Retention factor*).

Cromatografia em Camada Delgada (CCD), um método de adsorção sólido- líquido, no qual a fase móvel é geralmente um sistema de solventes e a fase estacionária, um adsorvente sólido como a sílica gel. A solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazolium (TCC) quando utilizado em bioautografia tem a finalidade de evidenciar o halo de inibição, permitindo detectar a atividade antimicrobiana frente aos microrganismos-teste (SHITTU et al., 2006).

Segundo Moraes et al. (2002) e Peres (2002), a cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação de padrões pré existentes, para a purificação de compostos, separando-se os componentes indesejáveis e para a separação de componentes de uma mistura. Além disso, no trabalho de Shittu et al. (2006), a utilização da técnica bioautográfica mostrou-se comprovadamente eficaz ao determinar a presença de substâncias com atividade antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, utilizando os extratos de dois cogumelos selvagens, *Pycnoporus cinnabarinus* e *Russula sp.*, apresentando como sistemas extrativos, frações de metanol/acetona 1:2 (v/v) e acetato de etila em volume equivalente (30 mL).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material biológico

Neste estudo, o material biológico analisado foi a biomassa de *Lentinus citrinus* DPUA 1535, cogumelo comestível que está constituindo o acervo da Coleção de Cultura DPUA, da Universidade Federal do Amazonas- UFAM.

4.2. Processamento da biomassa e extração dos biocompostos de *L. citrinus*

A biomassa de *L. citrinus* (1,0 g) foi desidratada, triturada e acondicionada em recipiente de vidro para obtenção dos extratos orgânicos. Para obtenção dos extratos, a biomassa desidratada foi adicionada em acetato de etila P.A. (10 mL) ou metanol/acetona 1:2 (v/v), em frascos de vidro por sete dias, a 25 °C. Ao término da maceração, os extratos foram submetidos à filtração e à evaporação sob baixa pressão para posterior utilização nas análises bioautográficas (STADLER; STERNER, 1998, SOUSA et al., 2004). O extrato bruto metanol/acetona e acetato de etila, após concentração foram analisados por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) para determinação do perfil cromatográfico.

4.2.1 Cromatografia em coluna

A cromatografia em coluna foi realizada com objetivo de separar o maior número de biocompostos de biomassa desidratada (7,84g) extraída em metanol/acetona 1:2 (v/v). Desse extrato bruto o isolamento das substâncias foi realizado em coluna medindo 1.0 cm de diâmetro por 20,5 cm de comprimento utilizando-se sílica gel 60 para cromatografia em coluna Merck® como fase estacionária. Nesta coluna, a eluição foi feita com solventes de polaridade crescente: hexano (5 amostras de 50mL), acetato de etila (5 amostras de 50 mL) e metanol (5 amostras de 50mL). As frações hexânicas e metanólicas foram descartadas. A fração de acetato de etila foi submetida aos testes de bioautografia.

4.3. Análise bioautográfica

4.3.1. Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Para os testes de bioautografia foi utilizada cromatoplaça de camada delgada (CCD), em sílica gel 60, com indicador de fluorescência F₂₅₄, suporte em alumínio, com espessura de 0,2 mm, medindo 5 x 10 cm, marca MACHEREY-NAGEL, ALUGRAM® SIL G. Em uma

das extremidades das CCD, foi traçada uma linha a um centímetro com lápis grafite, determinando-se o ponto de partida das amostras (extratos e padrão). Na extremidade oposta, marcou-se outra linha registrando-se o limite máximo da eluição da fase móvel. As placas foram tratadas previamente com metanol P.A, em cuba cromatográfica e, para manter a saturação no recipiente, foi colocado papel de filtro medindo 15 x 15 cm.

Os extratos orgânicos foram diluídos em acetato de etila (100 µL), metanol acetona 1:2 (v/v) (item 4.2), ou somente em acetato de etila (item 4.2.1). Com um capilar de vidro, uma alíquota de cada extrato foi aplicada a uma distância de um centímetro, em cada cromatoplaça. Como padrão foi utilizada solução de Rifampicina (0,005 mg/mL, para bactérias) e Itraconazol (0,005 mg/mL, para as leveduras). O teor extrativo (TE) foi calculado segundo a fórmula abaixo.

$$\%TE = \frac{\text{Peso do extrato bruto}}{\text{Volume inicial de biomassa}} \times 100$$

Posteriormente, as CCDs foram submetidas à eluição em éter de petróleo/acetato de etila 6:4 (v/v) e hexano/acetato de etila 6:4 (v/v), de forma a se obter o maior fracionamento dos biocompostos. Seguida a eluição, a secagem das cromatoplaças foi realizada a 25 °C. As substâncias foram observadas em UV de 254 nm e 365 nm, determinando-se os respectivos *R_f* (*retention factor*) de cada banda visualizada (SHITTU et al., 2006; SILVA et al., 2008).

$$R_f = \frac{\text{Distância de migração da substância}}{\text{Distância de migração do solvente}}$$

4.3.2. Determinação da atividade antimicrobiana por Bioautografia

4.3.2.1. Cultivo dos microrganismos-teste

Para avaliação da atividade antimicrobiana por bioautografia, os microrganismos-teste foram cultivadas em Ágar Sabouraud, a 37 °C por 48 horas (*Candida albicans* DPUA 1340) e, em Ágar Müeller-Hinton, a 37 °C por 24 horas (*Staphylococcus aureus* CCT 1352, *Escherichia coli* CCT 0547 e *Mycobacterium smegmatis* PDUFPE-71). Os testes de bioautografia foram realizados seguindo-se a metodologia citada por Stadler e Sterner (1998) e Shittu et al. (2006).

4.3.2.2 Inoculação da suspensão de esporos em ágar Müller-Hinton ou em ágar Sabouraud

Nos cultivos dos microrganismos-teste (item 4.3.2.1) foi preparada uma suspensão de esporos com água destilada esterilizada com turbidez semelhante à escala de Mc Farland nº 1. De cada suspensão e da substância reveladora, [TCC-cloreto de trifeniltetrazolium 1% (p/v)] (MERCK) a 1,0 % foi retirado 500 µL para ser adicionado em 20 mL de ágar Müller-Hinton ou ágar Sabouraud a 40 °C.

4.3.2.3 Exposição das placas cromatográficas ao ágar Müller-Hinton ou ao ágar Sabouraud adicionado da suspensão de esporos

As cromatoplasmas, após a eluição foram colocadas em placa de Petri medindo 2 x 14 cm e sobre elas foi vertido ágar Müller-Hinton ou ágar Sabouraud contendo a suspensão de esporos dos microrganismos e o revelador (TCC) (item 4.3.2.2). Em seguida as placas devidamente fechadas foram incubadas a 37 °C, em duplicata por 24 horas (bactérias) e 72 horas (leveduras). Como controle positivo foi utilizado solução de Rifampicina (0,005 mg/mL) em etanol e solução de Itraconazol (0,005 mg/mL) em dimetilsulfóxido (DMSO). A atividade antimicrobiana foi determinada visualizando-se um halo de inibição em volta da biomolécula (SILVA et al., 2008).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que uma grama e 7,84 g de basidioma desidratado submetido à maceração em metanol/acetona e acetato de etila, renderam em cada sistema de extração 0,65% e 5,1%, respectivamente. Além disso, verificou-se que entre os sistemas de eluição, a separação das substâncias foi realizada mais eficientemente no sistema éter de petróleo/acetato de etila 6:4 (v/v).

Observou-se que em relação à separação e o quantitativo dos biocompostos de diferentes *Rf*s, a melhor definição das bandas nos cromatogramas foi proporcionada pelos sistemas de eluição citados na Tabela 1, ao utilizar-se o extrato metanol/acetona, o que não ocorreu com oriundo da extração em acetato de etila. Esses resultados mostraram um rendimento de extrato bruto superior aos obtidos por Shittu et al. (2006), 1,4 mg e 1,9 mg de extrato bruto de acetato de etila, da biomassa de *Russula* sp. e *Pycnoporus cinnabarinus*, respectivamente.

Tabela 1- Biocompostos do extrato bruto metanol/acetona da biomassa desidratada de *L. citrinus* e os respectivos valores de *Rf*.

Sistemas de Eluição	<i>Rf</i>
Hexano/acetato de etila 6: 4 (v/v)	0,37 - 0,69
Éter de petróleo/acetato de etila 6:4 (v/v)	0,38 - 0,50 – 0,60 - 0,65 - 0,75

Quando se realizou os testes de bioautografia, o resultado obtido revelou atividade antimicrobiana dos compostos de *Rf* 0,38 e 0,60 frente a *Mycobacterium smegmatis* PDUFPE 71 e *Rf* 0,38 e 0,65 frente a *Staphylococcus aureus* CCT 1352. (Figura 1). Nenhum dos compostos inibiu o crescimento de *Escherichia coli* CCT 0547 e *Candida albicans* DPUA 1340. Yaltirak et al. (2009) relata antibiose do extrato etanólico de *Russula delica* Fr, frente a três espécies Gram-positivas e seis Gram-negativas, patógenos humanos, incluindo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* O157:H7, destacando a eficácia do extrato etanol contra *Shigella sonnei* RSKK 8177 e uma fraca atividade contra as demais bactérias pelo Método de Difusão em ágar.

Ishikawa et al. (2000), no trabalho realizado com *Flamulina velutipes* Fv-4, um isolado do Japão, demonstraram a presença de compostos com *Rf* 0,35 e 0,68, no extrato bruto acetato de etila, os quais expressaram atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* pelo teste do disco de papel.

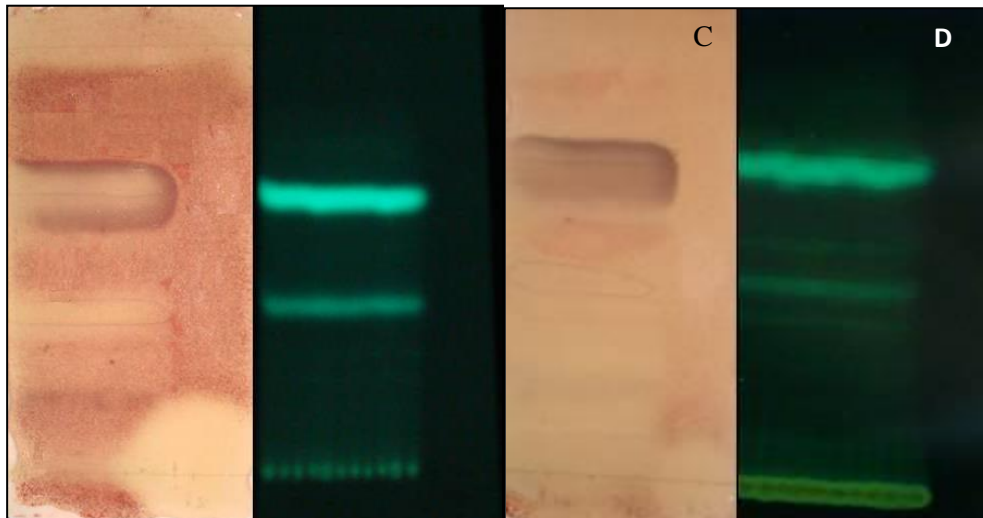


Figura 1 – (A) Bioautografia: atividade antimicrobiana dos constituintes do extrato bruto Metanol/Acetona de *L. citrinus* frente a *S. aureus*. (B) Cromatograma de referência dos compostos de *R_f* 0,38 e 0,65. (C) Bioautografia: atividade antimicrobiana dos constituintes do extrato bruto Metanol/Acetona de *L. citrinus* frente a *M. smegmatis*. (D). Cromatograma de referência dos compostos de *R_f* de 0,38 e 0,60.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados desta pesquisa, conclui-se que *L. citrinus* representa uma nova fonte de biocompostos com atividade antimicrobiana e que, pelo método bioautográfico pode-se detectar compostos com atividade antagônica frente a *Mycobacterium smegmatis* e *Staphylococcus aureus*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; VAZ, J. A.; FERREIRA, I. C. F. R.; BASTISTA, P.; ESTEVINHO, P. **Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts.** Eur Food Res Technol, v. 22, p. 151-156, 2007.

BARROS, L.; BAPTISTA, P.; ESTEVINHO, L. M.; FERREIRA, I. C. F. R. **Bioactive properties of the medicinal mushroom *Leucopaxillus giganteus* mycelium obtained in the presence of different nitrogen sources.** Food Chemistry, v. 105, p.179- 186, 2007.

FORTES, R. C.; NOVAES, M. R. C. G. **Efeitos da suplementação dietética com cogumelos *Agaricales* e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer.** Revista Brasileira de Cancerologia, v. 52, n. 4, p. 363- 367, 2006.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. **Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão.** Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 64, n. 2, p. 149- 154, 2005.

HATVANI, N. **Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture.** International Journal of Antimicrobial Agents, v. 17, p. 71-74, 2001.

ISHIKAWA, N. K.; YAMAJI, K.; TAHARA, S.; FUKUSHI, Y.; TAKAHASHI, K. **Highly oxidized cuparene- type sesquiterpenes from a mycelia culture of *Flammulina velutipes*.** Phytochemistry, v. 54, p. 777- 782, 2000.

ISHIKAWA, N. K.; KASUYA, M. C. M.; VANETTI, M. C. D. **Antibacterial activity of *Lentinus edodes* grown in liquid medium.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 32, p. 206-210, 2001.

MORAES, S. L.; REZENDE, M. O. O.; NAKAGAWA, L. E.; LUCHINI, L. C. **Análise de resíduos de pesticidas em tomates por cromatografia em camada delgada.** Química Nova, v. 25, n. 2, p. 196- 202, 2002.

ORIJEL, R. G.; CÓRDOVA, J.; CIFUENTES, J.; VALENZUELA, R.; TORRES, A. E.; KONG, A. **Integrating wild mushrooms use into a model of sustainable management for indigenous community forests.** Forest ecology and management, v. 258, p. 122-131, 2009.

PERES, T. B. **Noções básicas de cromatografia.** Biológico, São Paulo, v.64, n.2, p. 227-229, jul./dez. 2002.

SHITTU, O.B.; ALOFE, F. V.; ONAWUNMI, G. O.; TIWALADE, T. A. **Mycelial growth and antibacterial metabolite production by wild mushrooms.** African Journal of Biomedical Research, v. 8, p. 157- 162, 2005.

SHITTU, O. B.; ALOFE, F. V.; ONAWUNMI, G. O.; OGUNDAINI, A. O.; TIWALADE, T.A. **Bioautographic evaluation of antibacterial metabolite production by wild mushrooms.** African Journal of Biomedical Research, v. 9, p. 57- 62, 2006.

- SILVA, J. C.; ORMEZINDA, C.C. F.; TEIXEIRA, M. F. S. **Atividade antagônica de espécies de *Penicillium* mantidas sobre duas condições de preservação.** 2008. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) - Curso de Pós-graduação em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- SOUSA, H. C. A.; BARBOSA, W. L. R.; VIEIRA, J. M. **Investigação fitoquímica e isolamento da substância antibacteriana de *Ananas erectifolius* (curauá).** Revista científica da UFPa, v. 4, p. 1-9, 2004.
- STADLER, M.; STERNER, O. **Production of bioactive secondary metabolites in the fruit of bodies of macrofungi as a response to injury.** Phytochemistry, v. 49, p. 1013- 1019, 1998.
- SUAY, I.; ARENAL, F.; ASENSIO, F. J.; BASILIO, A.; CABELLO, M. A.; DÍEZ, M.T.; GARCÍA, J. B.; DEL VAL, A. G.; GORROCHATEGUI, J.; HERNÁNDEZ, P.; PELÁEZ, F.; VICENTE, M. F. **Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities.** Antonie von Leeuwenhoek, v.78, p. 129- 139, 2000.
- TAVEIRA, V. C.; NOVAES, M. R. C. G. **Consumo de cogumelos na nutrição humana: uma revisão de literatura.** Com. Ciências da Saúde, v. 18, n. 4, p. 315- 322, 2007.
- YALTIRAK, T.; ASLIM, B.; OZTURK, S.; ALLI, H. **Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr.** Food and Chemical Toxicology, doi: 10.1016/j.fct.2009.05.029, 2009.

8. ANEXOS

8.1. Resumo expandido submetido ao SINAFERM 2009



Propriedade Antimicrobiana de *Lentinus citrinus* para Futura Aplicação no Tratamento de Infecções Fúngicas e Bacterianas.

RESUMO

Lentinus citrinus, uma espécie de cogumelo comestível da família *Lentinaceae*, vêm sendo investigado em relação as suas propriedades biológicas, ou seja, que atuam de modo a fornecer uma proteção adjuvante ao organismo. Em vista disso, este trabalho tem como objetivo detectar as propriedades antimicrobianas de *Lentinus citrinus* DPUA 1535 frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans*. Para o presente estudo, foi escolhido o método bioautográfico para a detecção de compostos bioativos presentes no cogumelo comestível. A bioautografia é uma técnica que combina cromatografia com o extrato da biomassa *in situ*, que por sua vez, permite a localização do constituinte bioativo através da determinação do fator de retenção (*R_f*). Como resultados, pode-se determinar que *Lentinus citrinus* apresentou compostos com atividade antimicrobiana frente a *Mycobacterium smegmatis* (*R_f* 0,38 e 0,60) e *Staphylococcus aureus* (*R_f* 0,38 e 0,65).

Palavras-chave: *Lentinus citrinus*, atividade antimicrobiana, bioautografia.

INTRODUÇÃO

Os cogumelos comestíveis representam um dos maiores recursos inexplorados como novas fontes de biocompostos para a promoção da saúde do homem, por isso são considerados como alimentos nutracêuticos ou funcionais fisiológicos. Diversos estudos citam que a biomassa e/ou princípio ativo oriundo de espécies de cogumelos como *Lentinus edodes* (shiitake) e *Agaricus blazei* (cogumelo do sol) têm atividade antitumoral, anticarcinogênico, antiviral, antiinflamatório, hipoglicemiante, hipocolesterolêmico, hipotensivo, entre outros (BRIZUELA et al., 1998; FURLANI; GODOY, 2005; FORTES; NOVAES, 2006).

L. citrinus Walley & Rammeloo é uma espécie que está atraindo a atenção para estudos científicos devido as suas propriedades medicinais e por tratar-se de cogumelo comestível que tem ocorrência em região de clima tropical e subtropical, já foi identificado na Região do

Nordeste brasileiro e está sendo produzido em resíduo agro-florestal em Manaus-Amazonas (informações submetidas para publicação).

A importância medicinal dos cogumelos comestíveis e a disponibilidade da biomassa de *Lentinus citrinus* justificam a realização deste estudo com a finalidade de se detectar compostos com atividade antimicrobiana frente a *Candida albicans* DPUA 1340, *Staphylococcus aureus* CCT 1352, *Escherichia coli* CCT 0547 e *Mycobacterium smegmatis* PDUFPE- 71.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos extratos: os extratos orgânicos foram obtidos a partir de um grama de biomassa, desidratada e triturada de *Lentinus citrinus* DPUA 1535. Em cada amostra foi adicionado acetato de etila (10 mL) ou metanol/acetona 1:2 (v/v), mantendo-as por sete dias, a 25° C. Após filtração, as frações dos extratos foram submetidas à evaporação sob baixa pressão (STADLER; STERNER, 1998, SOUZA et al., 2004). Os extratos desidratados foram reconstituídos em 500 µL dos respectivos solventes extrativos para uso nos testes bioautográficos.

Microrganismos-teste: *Candida albicans* DPUA 1340, *Staphylococcus aureus* CCT 1352, *Escherichia coli* CCT 0547 e *Mycobacterium smegmatis* PDUFPE-71. Durante os experimentos, a cultura estoque da levedura foi preservada sob refrigeração em ágar Sabouraud e as bactérias em ágar Müeller-Hinton.

Preparação das placas cromatográficas: nos testes de bioautografia, em cada cromatoplaça de camada delgada (CCD), marca MACHEREY- NAGEL, ALUGRAM® SIL G, medindo 5 x 10 cm foi traçada uma linha a um centímetro com lápis grafite, determinando-se o ponto de partida das amostras (extratos e padrão). Na extremidade oposta, marcou-se outra linha registrando o limite máximo da eluição da fase móvel.

O extrato selecionado (metanol/acetona) foi reconstituído e aplicado com tubo capilar na placa cromatográfica e submetido à eluição em éter de petróleo/acetato de etila 6:4 (v/v) ou hexano/acetato de etila 6:4 (v/v). Ao término desse procedimento e secagem temperatura ambiente (25°C), os cromatogramas foram observadas sob UV (254 nm e 365 nm), seguindo-se a determinação dos respectivos *R_f*s, como citado a seguir (SHITTU et al., 2006; SILVA et al., 2008).

$$R_f = \frac{\text{distância de migração da substância}}{\text{distância de migração do solvente}}$$

Preparação da suspensão celular para as análises antimicrobianas: Em cada cultura dos microrganismos-teste foi preparada uma suspensão celular de concentração semelhante a escala de MacFarland nº 1. Da suspensão e da substância reveladora [TCC-cloreto de trifeniltetrazolium 1% (p/v)] foram retirados 500 µL para serem adicionados a 20 mL de ágar Müeller-Hinton ou ágar Sabouraud a 40 °C.

Exposição das placas cromatográficas ao meio sólido adicionado de suspensão de esporos: Nos cromatogramas, acondicionados em placa de Petri esterilizada, foi vertido ágar Müeller Hinton ou ágar Sabouraud contendo a suspensão de esporos dos microrganismos e o revelador (TCC). Seguido a solidificação do meio, as placas foram devidamente fechadas e incubadas a 37 °C, mantendo-se as bactérias e a levedura por 24 e 72 horas, respectivamente. Como padrão foi utilizado Rifampicina (0,005 mg/mL) e Itraconazol (0,005 mg/mL) (SHITTU et al., 2006).

Determinação da atividade antimicrobiana por bioautografia: A atividade antimicrobiana foi determinada visualizando-se um halo em volta da biomolécula (SILVA et al., 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas condições experimentais, do quantitativo de biomassa de *L. citrinus* submetido à extração em metanol/acetona e acetato de etila, de ambas as amostras, o rendimento de extrato bruto foi equivalente a 60mg. Observou-se que em relação à separação e o quantitativo dos biocompostos de diferentes *Rf*, a melhor definição das bandas nos cromatogramas foi proporcionada pelos sistemas de solventes citados na tabela 1, ao utilizar-se o extrato metanol/acetona, o que não ocorreu com oriundo da extração com acetato de etila. Esses resultados mostraram um rendimento de extrato bruto superior aos obtidos por Shittu et al. (2006), 1,4 mg e 1,9 mg de extrato bruto de acetato de etila, da biomassa de *Russula* sp. e *Pycnoporus cinnabarinus*, respectivamente.

Tabela 1- Sistemas de solventes que proporcionaram melhor definição das bandas nas cromatoplas e os respectivos valores de *Rf* dos compostos do extrato bruto metanol/acetona do basidiomas de *L. citrinus*.

Sistemas de Solventes	<i>Rf</i>
Hexano/acetato de etila 6:4 (v/v)	0,37 - 0,69
Éter de petróleo/acetato de etila 6:4 (v/v)	0,38 - 0,50 – 0,60 - 0,65 - 0,75

Quando se realizou os testes de bioautografia, o resultado obtido revelou atividade antimicrobiana dos compostos de *Rf* 0,38 e 0,60 frente a *Mycobacterium smegmatis* PDUFPE 71 e *Rf* 0,38 e 0,65 frente a *Staphylococcus aureus* CCT 1352. (Figura 1). Nenhum dos compostos inibiu o crescimento de *Escherichia coli* CCT 0547 e *Candida albicans* DPUA 1340. Yaltirak et al. (2009) relata antibiose do extrato etanólico de *Russula delica* Fr, frente a três espécies Gram-positivo e seis Gram-negativa, patógenos humanos, incluindo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* O157:H7, destacando a eficácia do extrato etanol contra *Shigella sonnei* RSKK 8177 e uma fraca atividade contra as demais bactérias pelo Método de Difusão em ágar.

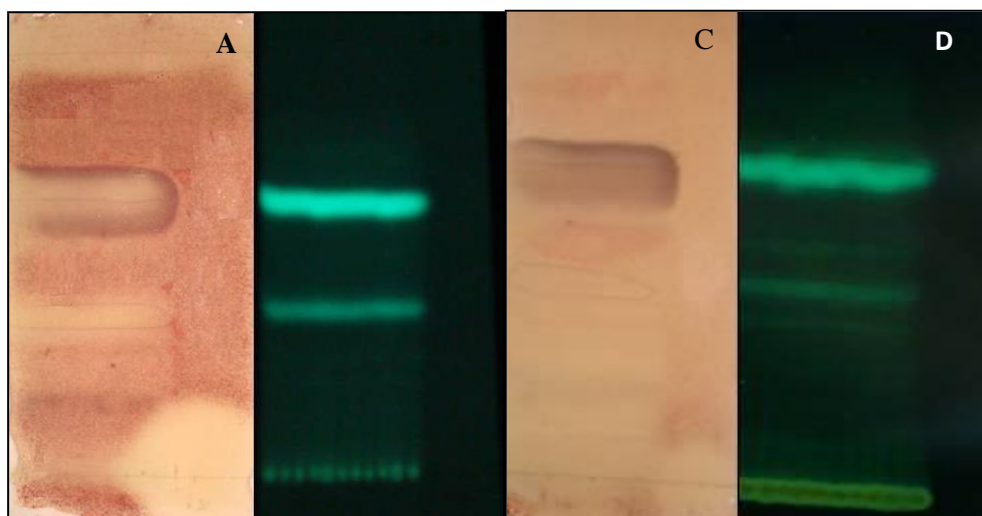


Figura 1 – (A) Bioautografia: atividade antimicrobiana dos constituintes do extrato bruto Metanol/Acetona de *L. citrinus* frente a *S. aureus*. (B) Cromatograma de referência dos compostos de *Rf* 0,38 e 0,65. (C) Bioautografia: atividade antimicrobiana dos constituintes do extrato bruto Metanol/Acetona de *L. citrinus* frente a *M. smegmatis*. (D). Cromatograma de referência dos compostos de *Rf* de 0,38 e 0,60.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados desta pesquisa, conclui-se que *L. citrinus* representa uma nova fonte de biocompostos com atividade antimicrobiana e que, pelo método bioautográfico pode-se detectar compostos com atividade antagônica frente a *Mycobacterium smegmatis* e *Staphylococcus aureus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brizuela, M. A.; García, L.; Pérez, L. e Mansur, M. (1998), *Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios*, Revista Iberoam. Micologia, v. 15, p. 69-74.
- Degani, A.L.G.; Cass, Q.B. e Vieira, P. C. (1998), *Cromatografia: Um breve ensaio.*, Química Nova Escola, n.7.
- Fortes, R. C. e Novaes, M. R. C. G. (2006), *Efeitos da suplementação dietética com cogumelos Agaricales e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer*, Revista Brasileira de Cancerologia, v. 52, n. 4, p. 363- 367.
- Furlani, R. P. Z. e Godoy, H. T. (2005), *Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão*, Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 64, n. 2, p. 149- 154.
- Shittu, O.B.; Alofe, F. V.; Onawunmi, G. O. e Tiwalade, T. A. (2005), *Mycelial growth and antibacterial metabolite production by wild mushroom*, African Journal of Biomedical Research, v. 8, p. 157- 162.
- Shittu, O. B.; Alofe, F. V.; Onawunmi, G. O.; Ogundaini, A. O. e Tiwalade, T.A. (2006), *Bioautographic evaluation of antibacterial metabolite production by wild mushroom*, African Journal of Biomedical Research, v. 9, p. 57- 62.
- Silva, J. C.; Ormezinda, C.C. F. e Teixeira, M. F. S. (2008), *Atividade antagônica de espécies de Penicillium mantidas sobre duas condições de preservação*. Dissertação Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil.
- Stadler, M. e Sterner, O. (1988), *Production of bioactive secondary metabolites in the fruit of bodies of macrofungi as a response to injury*, Phytochemistry, v. 49, p. 1013- 1019.
- Souza, H. C. A.; Barbosa, W. L. R.; Vieira, J. M. (2004), *Investigação fitoquímica e isolamento antimicrobiano presentes em espécie de Ananas eretifolius (curauá)*, Revista Científica da UFPA, v. 4, p.1- 9.
- Yaltirak, T. Aslim, B. ; Ozturk, S. e Alli, H. (2009), *Antimicrobial and antioxidant activities of Russula delica Fr*, Food and Chemical Toxicology, doi: 10.1016/j.fct.2009.05.029.

8.2. MEIOS DE CULTURA

8.2.2 . Ágar Sabouraud (preparo de 1 L)

Formulação:

- Ágar.....15g;
- Dextrose.....20g;
- Peptona.....10g;
- Água destilada.....1L

pH= 6,8 a 7

Preparação:

- a) Dissolver o ágar em 1L de água, aquecendo- o em banho-maria;
- b) Adicionar dextrose e peptona;
- c) Autoclavar a 120° C por 15 minutos;
- d) Guardar em geladeira a 4° C.

8.2.3. Ágar Mueller- Hinton (preparo de 1 L)

Formulação:

- Ágar bacteriológico.....15g;
- Caldo Mueller- Hinton.....21g
- Água destilada.....1L

pH= 6,8 a 7

Preparação:

- a) Dissolver o ágar em 1L de água, aquecendo-o em banho-maria;
- b) Adicionar o caldo Mueller- Hinton;
- c) Autoclavar a 120° C por 15 minutos;
- d) Guardar em geladeira a 40° C.

8.3. Antibióticos, antifúngicos e reveladores

8.3.1. Preparo de Rifampicina 0,005mg/mL (p/v) para bactérias:

- a) Pesar 0, 015 mg de rifampicina, dissolver em 100 mL de etanol (álcool etílico) e homogeneizar;
- b) Retirar 1 mL desta solução e adicionar a 2 mL de etanol (solução 0,005 mg/mL).

9.3.2. Preparo de Itraconazol 0,005 mg/mL (p/v) para leveduras:

- a) Pesar 0,015 mg de Itraconazol, dissolver em 100 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e homogeneizar;
- b) Retirar 1 mL desta solução e adicionar a 2 mL de DMSO (solução 0,005mg/ mL).

8.3.3. Preparo da substância reveladora: Tetracloreto de trifeniltetrazoliun (TCC) a 1% (p/v) (10mL):

- a) Adicionar 0,1g da substância reveladora em 10 ml de água esterilizada e homogeneizar.