

EFEITO DA EXCLUSÃO DE VITAMINAS DO MEIO COMPLETO DE PONTECORVO (MC) NO CRESCIMENTO MICELIAL E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ANTIMICROBIANOS POR *Flammulina velutipes*

Élida Glória Pinto CRUZ¹; Ruby VARGAS-ISLA²; Noemia Kazue ISHIKAWA³

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Doutoranda CPBA/ INPA; ³Orientadora CPTA/ INPA.

1. Introdução

A primeira grande investigação do potencial de fungos do filo Basidiomycota como agentes produtores de antimicrobianos foi realizada na década de 40, e observam a atividade antimicrobiana de extratos de basidiomas e culturas de micélios de aproximadamente 2000 espécies desse filo (Rosa *et al.*, 2003). A espécie *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, produz diversos compostos com propriedades medicinais (Badalyan *et al.*, 2006). Em 2000 e 2001, Ishikawa e colaboradores isolaram e elucidaram a estrutura química de quatro compostos antimicrobianos acumulados na cultura micelial de *F. velutipes*, descobrindo assim um novo grupo de antimicrobianos, chamados Enokipodins A, B, C e D. Em 2005 Ishikawa *et al.* observaram a produção destes compostos a partir de 30 dias de incubação utilizando o meio Caldo de Malte e Peptona. Enokipodins A, B, C e D apresentam interessante configuração química que levou vários grupos a sintetizá-los (Kuwahara & Saito, 2004; Srikrishna & Rao, 2004; Secci *et al.*, 2007). Por outro lado em pesquisas de biossíntese relata-se a influência da composição do meio, condições ambientais e variabilidade genética (Ishikawa *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2009). Em experimento anterior, Melo *et al.* (2009), observaram o aumento da produção de metabólitos antimicrobianos por *F. velutipes* no Meio Completo de Pontecorvo (Pontecorvo *et al.*, 1953), embora a produção de biomassa tenha sido inferior neste meio quando comparado ao obtido em outros meios de cultura. Este resultado gerou questionamentos quanto ao papel de cada componente deste meio de cultura. Sabe-se que a presença de vitaminas é requerida em pequenas quantidades e são fundamentais para o desenvolvimento e regulação da síntese de metabólitos secundários. Deste modo este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da exclusão de vitaminas do Meio Completo de Pontecorvo (MC) na biossíntese dos metabólitos antimicrobianos produzidos pela cultura micelial de *F. velutipes*.

2. Material e métodos

O micélio da cultura estoque de *F. velutipes* foi cultivado a 25 °C em placa de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA), após 7 dias foram retirados discos de micélio (9 mm de diâmetro) e usados como inóculo dos experimentos. O MC foi utilizado como controle.

Tabela 1. Meio Completo de Pontecorvo *et al.* (1953).

Reagentes	Quantidade
NaNO ₃	6 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	10 g
Ágar	15 g
Água destilada	1000 mL
Peptona	2 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Extrato de levedura	0,5 g
Solução de vitaminas*	1 mL
*Solução de vitaminas	
Ác. nitotínico	100 mg
Ác. P-aminobenzoico	10 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50 mg
Riboflavina	100 mg
Tiamina	50 mg
H ₂ O destilada	100 mL
esterilizada	

** A solução de vitaminas esterilizada por filtração com membranas com poros de 0,22 μm foi acrescentado no momento do uso.

Os tratamentos foram MC com exclusão das vitaminas. Os respectivos tratamentos foram distribuídos em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL cada. Em seguida foram colocados três discos de inóculo de *F. velutipes* nos frascos. As condições de incubação foram a 25 °C, sem luz, por 15 dias, sem agitação. Após este período, separou-se a biomassa fúngica do meio de cultura por filtração. A massa micelial foi desidratada a 65 °C e depois a 105 °C até peso constante. Os filtrados adquiridos foram submetidos à avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em Ágar, com base na técnica do pocinho, contra *Bacillus subtilis*. A atividade antibacteriana do filtrado da cultura micelial foi determinada pela formação da zona de inibição do crescimento bacteriano, utilizando uma classificação de três níveis.

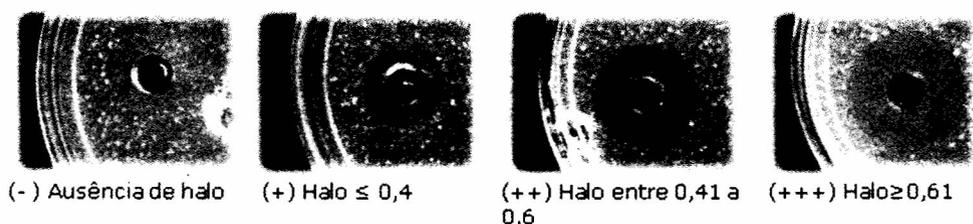


Figura 1. Classificação da zona de inibição obtida pelo teste de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em Ágar com base na técnica do poço.

3. Resultados e discussão

A produção de biomassa micelial obtida no controle (MC) foi semelhante ao resultado de estudos anteriores (0,15 g/frasco). Houve crescimento micelial em todos os tratamentos, indicando que a exclusão das vitaminas não interferiu no desenvolvimento micelial de *F. velutipes*.

Tabela 2. Efeito da exclusão de vitaminas do Meio completo de Pontecorvo (MC) no crescimento micelial e produção de metabólitos antimicrobianos por *Flammulina velutipes*.

Tratamentos	Massa micelial (g/frasco)	Formação de zona de inibição*
MC	0, 16050 \pm 0,03 a	+
MC sem Biotina	0, 14053 \pm 0,07 a	+
MC sem Ác. p-aminobenzóico	0, 14783 \pm 0,03 a	++
MC sem Ácido nicotínico	0, 15837 \pm 0,04 a	++
MC sem Tiamina	0, 16030 \pm 0,08 a	+++
MC sem Riboflavina	0, 12020 \pm 0,03 a	+++
MC sem Piridoxina	0, 14007 \pm 0,05 a	-

* (+) média da zona de inibição ≤ 1 mm; (++) média da zona de inibição > 1 mm. (média de 3 repetições)

Os filtrados obtidos dos tratamentos com exclusão de Tiamina, Riboflavina, Ác. P-aminobenzóico e Ác. Nicotínico apresentaram maior atividade antimicrobiana contra *B. subtilis* em relação ao controle. Por outro lado, o filtrado do tratamento com a exclusão de Piridoxina apresentou resultado negativo no teste de atividade antimicrobiana e a exclusão de Biotina apresentou resultado similar ao obtido no controle. Estes resultados sugerem que a presença das diferentes vitaminas pode estar atuando como o inibidor ou ativador da via biossintética de compostos antimicrobianos como os enokipodins A-D.

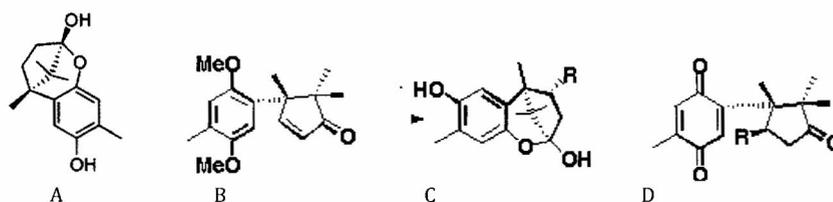


Figura 2. Enokipodins A, B, C e D.

Os resultados obtidos foram comparados aos de Ishikawa *et al.* (2005), que avaliaram o tempo de crescimento micelial e a atividade antibacteriana durante 70 dias de cultivo e verificaram o início da atividade de *F. velutipes* a partir de 30 dias em Meio Caldo de Malte e Peptona. Em estudos posteriores Melo *et al.* (2009), detectaram a produção destes metabólitos a partir de 20 dias de incubação em Meio Completo de Pontecorvo(MC). Os dados obtidos neste trabalho apresentam o início da atividade antimicrobiana por *F. velutipes* a partir de 15 dias.

4. Conclusão

A biossíntese dos metabólitos antimicrobianos por *Flammulina velutipes* é influenciada pela presença ou ausência de vitaminas no Meio Completo de Pontecorvo, embora a produção de biomassa não é afetada significativamente.

5. Referências

- Badalyan, S.M.; Hughes, K.W.; Sakeyan, C.Z.; Helmbrecht, E. 2006. Morphology, growth characteristics, and genetic variability of the edible medicinal mushroom *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr) Singer collections. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 8: 263-278.
- Ishikawa, N.K.; Yamaji, K.; Tahara, S.; Fukushi, Y.; Takahashi, K. 2000 Highly oxidized cuparene-type sesquiterpenes from mycelial culture of *Flammulina velutipes*. *Phytochemistry*, 54: 777-782.
- Ishikawa, N.K.; Fukushi, Y.; Yamaji, K.; Tahara, S.; Takahashi, K. 2001. Antimicrobial cuparene-type sesquiterpenes, Enokipodins C and D, from a mycelial culture of *Flammulina velutipes*. *Journal of Natural Products*, 64: 932-934.
- Ishikawa, N.K.; Yamaji, K.; Ishimoto, H.; Miura, K.; Fukushi, Y.; Takahashi, K.; Tahara, S. 2005. Production of enokipodins A, B, C and D: a new group of antimicrobial metabolites from mycelial culture of *Flammulina velutipes*. *Mycoscience*, 46: 39-45.
- Kuwahara, S.; Saito, M. 2004. Enantioselective total synthesis of enokipodins A-D. *Tetrahedron Lett.*, 45:5047-5049.
- Melo, M.R.; Meirelles, L.D.P.; Faria, T.J.; Ishikawa, N.K. 2009. Influence of *Flammulina velutipes* mycelia culture conditions on antimicrobial metabolite production. *Mycoscience*, 50: 78-81.
- Pontecorvo, G.; Roper, J.A.; Hemons, L.M.; McDonald, K.D.; Bufton, A.W.J. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet*, 5:141-238.
- Rosa, L.H.; Machado, K.M.G.; Jacob, C.C. Campelari, M.; Rosa, C.A.; Zani, C.L. 2003. Screening of Brazilian Basidiomycetes for Antimicrobial Activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7): 967-974.
- Srikrishna, A.A.; Rao, M.S. 2004. The first synthesis of the antimicrobial sesquiterpenes (±)-enokipodins A and B. *Synlett*, 2:374-376.
- Secci, F.; Frongia, A.; Olliver, J.; Piras, P.P. 2007. Convenient formal synthesis of (±)-enokipodins A and B, and (±)-cuparene-1, 4-quinone. *Synthesis*, 7:999-1002.