

**PRODUÇÃO DE EXTRATO E AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE
SCLERODERMA SP PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR E
CONFRONTAÇÃO DIRETA**

Leyza Paloschi de Oliveira¹
Talize Foppa²

Universidade Alto Vale do Rio do Peixe (UNIARP)
Departamento de Farmácia
Caçador, SC

Recebido em: 15 abr. 2014
Aprovado em: 30 abr. 2014

INTRODUÇÃO

A busca de princípios que possam ser eficazes no controle microbiano tem sido alvo de linhas de pesquisa, da mesma forma que produtos naturais têm sido isolados e identificados e sendo atualmente uma das áreas de maior crescimento da química orgânica (BRIZUELA et al., 1998). Os fungos produzem metabólitos secundários que consistem num mecanismo de defesa contra competidores naturais, e desde a descoberta da penicilina tem sido amplamente estudados com o fim de produzir antibióticos (TAKAHASCHI; LUCAS, 2008). Da produção de extratos destes fungos é possível obter uma variada gama de produtos. Os fungos basidiomicetos se incluem neste grupo de micro-organismos de interesse da farmacognosia. Eles vivem em ambientes diversos e interagem com diferentes espécies, em ambientes competitivos.

O método tradicional que os antimicrobianos são descobertos consiste na varredura de isolados obtidos em cultura pura, produtores de substâncias potencialmente ativas, tal como concebido por Flemming no teste pioneiro com a penicilina, com um método de semeadura cruzada, onde ocorre a confrontação dos isolados testes (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

¹ Mestre em Biotecnologia pela UFSC e Docente da UNIARP. E-mail: leyza@uniarp.edu.br

² Mestre em Farmacia pela UFSC e Coordenadora do Curso de Farmacia da UNIARP. E-mail: talizefoppa@yahoo.com.br

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi produzir extrato de basidioma e micélio de isolado *Scleroderma* sp e testar a ação antibacteriana dos extratos em relação as bactérias *E. coli* (Beta Lac) (ATCC 35218) e *S. aureus* (ATCC 25923) pelo método de difusão em ágar e ação antifúngica de isolado de *Scleroderma* sp em confronto a dois fungos, *Alternaria* sp e *Fusarium oxysporum*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem: Basidiomas de *Scleroderma* sp foram colhidos em 2012, em plantação de *Pinus taeda* (Caçador – SC) e desidratados em temperatura de $50\pm 1^{\circ}\text{C}$, no Laboratório de Microbiologia da Uniarp. Basidiomas *in natura* de *Scleroderma* sp foram utilizados para isolamento e depositados no Herbario FLOR, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o código FLOR0050691-05-12PB.

Isolamento de *Scleroderma* sp: Procedeu-se o isolamento a partir do basidioma, em condições assépticas, retirando pequenas porções da parte interna e transferindo para placas de Petri com meio de cultivo Batata Dextrose Agar (BDA) e cultivadas em estufa a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante quinze dias, na ausência de luz. Após o crescimento, o fungo foi repicado para placas de Petri contendo o meio de cultivo MNM (Merlin-Norkans Modificado - MNM).

Cultivo de *Scleroderma* sp em meio líquido: Após o isolamento do fungo ectomicorrízico em meio BDA, foram retiradas discos de 7 mm de diâmetro do micélio das bordas das colônias e inoculado em placas de Petri com meio MNM e incubados em BOD a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ na ausência de luz, durante 15 a 20 dias. Depois, discos de micélio foram utilizados individualmente em 25 mL de meio MNM líquido em frascos de erlenmeyers de 250 mL e aguardado a formação de um tapete de micélio em torno de 2,5 cm, após 25 a 30 dias de crescimento.

Produção de extratos: Os basidiomas *Scleroderma* sp desidratados a $60\pm 1^{\circ}\text{C}$ e moídos, sem esporos, foram utilizados para extração com éter de petróleo em aparelho de soxhlet. As amostras de 10g de massa seca com 90 ml de éter foram submetidas a extração em torno de três horas e 30 minutos. Vinte e cinco tapetes de micélio de *Scleroderma* sp produzidos em meio de cultivo líquido foram desidratados a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ e submetidos a extração com éter de petróleo,

seguida de extração em metanol, em aparelho de soxhlet. As extrações foram realizadas em período de oito horas.

Organismos: Foram utilizados isolados de *E. coli* (Beta Lac) (ATCC 35218) e *S. aureus* (ATCC 25923) como bactéria indicadoras para teste da atividade antimicrobiana. Foram utilizadas cepas de *F. oxysporum* e *Alternaria* sp, provenientes da coleção da Estação Experimental de Caçador, pertencente a EPAGRI S.A.

Teste de difusão em ágar: Swabs de algodão carregados com suspensão de *E. coli* e *S. aureus* (10^7 UFC cm^{-3}) foram inoculadas em placas com meio Muller-Hinton e perfurada assepticamente cinco poços de 7 mm de diâmetro. Os poços foram preenchidos com 50 μl (3,0 mg) de cada extrato, que foram diluídos em 0,1N NH_4OH e polissorbato 80 a 0,1%. Discos de ampicilina + ácido clavulânico, oxalilina e 50 μl de 0,1N NH_4OH e polissorbato 80 a 0,1% foram utilizados como controle. As placas foram incubadas a 36°C por 18 horas e examinado o halo de inibição do crescimento da bactéria indicadora. Um resultado positivo foi definido com uma zona de inibição de 9 mm (SMÂNIA JUNIOR et al., 1995) ou mais no diâmetro do halo da bactéria.

Teste de confrontação: O fungo ectomicorrízico *Scleroderma* sp foi cultivado em meio de cultura MNM sólido e os fungos fitopatogênicos dos gêneros *Alternaria* sp e *F. oxysporium* em meio Ágar Dextrose e incubados a $25\pm 1^\circ\text{C}$, durante 20 dias. Foram preparados discos de 7 mm destas culturas para serem utilizados na confrontação. Dois discos foram montados em placas com meio de cultura MNM sólido, de modo que ficassem separados em torno de 60 mm de distância na superfície da placa, num extremo o disco de *Scleroderma* sp e no outro o fungo fitopatogênico teste. O fungo ectomicorrízico foi colocado oito dias antes do fungo fitopatogênico. No tratamento testemunha, ao invés do disco contendo micélio do fungo ectomicorrízico, foi colocado somente um disco de meio estéril. Essas culturas foram incubadas a $25\pm 1^\circ\text{C}$, em incubadora BOD, durante 21 dias. Após esse período, mediu-se a distância de crescimento do fitopatógeno na posição frontal em relação à área de crescimento do fungo ectomicorrízico ou do disco estéril. A diferença entre o crescimento do fungo teste e o disco estéril e do fungo teste em relação ao *Scleroderma* sp foram expressos em termos de halo de inibição. Após, foi realizado a determinação do pH da área de confronto dos fungos, utilizando 1g de meio de cultura retirado da borda do crescimento micelial de *Scleroderma* sp ou do disco de ágar (controle negativo) e diluído em 9 mL de água destilada, e a leitura efetuada em

pHgâmetro.

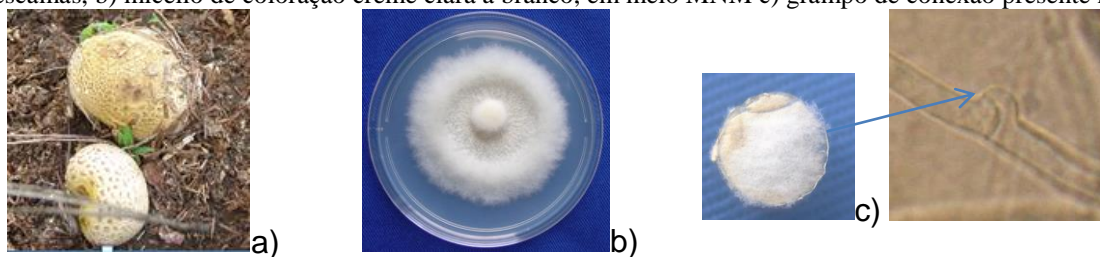
Análise estatística: O delineamento do teste foi inteiramente casualizado e foram usadas quatro placas para cada amostra ensaiada no método de difusão em ágar e três placas no teste de confrontação direta. Para avaliação do pH do meio de cultivo foram utilizadas duas repetições dos controles negativos e duas de cada fungo testado.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Isolamento e cultivo de *Scleroderma* sp

O isolado *Scleroderma* sp a partir dos basidiomas apresentou micélio de coloração creme clara a branco, e formação do grampo de conexão em meio MNM, característico dos basidiomicetos (Figura 1) e deste gênero de fungo ectomicorrízico (JEFFRIES, 1999).

Figura 1. *Scleroderma* sp. a) basidiomas com perídio relativamente rígido, com projeções de hifas semelhantes a escamas, b) micélio de coloração creme clara a branco, em meio MNM c) grampo de conexão presente nas hifas.



O cultivo de *Scleroderma* sp em meio líquido MNM permitiu a obtenção de micélio, matéria prima para extração. O crescimento do tapete *Scleroderma* sp (em torno de 2,5cm), foi obtido em torno de 20 dias (Figura 02).

Figura 2. Cultivo de *Sclerodermasp.* em meio líquido MNM: a) discos micelianos de 7 mm em meio MNM, b) tapete miceliano depois de 20 dias de cultivo, b') detalhe do tapete miceliano.



Obtenção de Extratos

O produto final da extração do basidioma desidratado e moído, com éter de petróleo foram lâminas finas, de coloração branca, que foram reduzidas a pó por maceração. Quando o

mesmo solvente foi utilizado para a extração dos tapetes micelianos desidratados e moídos, não houve formação de produto. No entanto, o resultado foi positivo quando foi utilizado metanol como extrator para os tapetes micelianos e fração obtida era de coloração escura e viscosa.

A atividade antimicrobiana em relação às bactérias indicadoras, foi nula quando os extratos foram testados (Tabela 1) na concentração única de 3 mg/mL, com o método de difusão em ágar. Semelhante resultado foi observado por Nascimento (2010) quando avaliou o efeito dos polissacarídeos do basidioma do fungo *S. nitidum* nas concentrações de 15, 30 e 60 mg/mL, em relação a *S. aureus* e *E. coli*, utilizando 20 µL de polissacarídeos embebidos em discos para difusão em ágar.

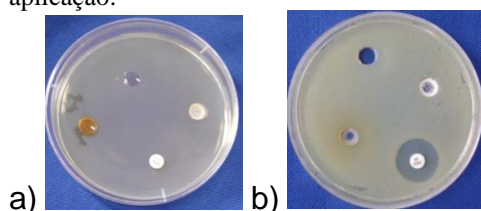
Tabela 1: Atividade antibacteriana de extrato de basidioma de *Scleroderma* sp, produzido com éter de petróleo, e de micélio, cultivado em meio líquido, por período de 20 dias a 25±1°C, e extraído com metanol.

Material teste	BACTÉRIAS	
	<i>E. coli</i> (ATCC 35218)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)
	Zona de inibição (mm) ¹	
Basidoma/éter de petróleo	AN ²	NA
Micélio/metanol	AN	NA
Amoxicilina + Ácido clavulânico ³	20	35,5
Oxacilina ³	-	23,5
0,1N NH ₄ OH + 0,1% polissorbato 80 ⁴	AN	NA

Obs. ¹valor médio de quatro repetições, ²atividade nula; ³controle positivo, ⁴controle negativo.

Na figura 4 pode-se observar que nos poços onde foram aplicados os extratos, do lado esquerdo da placa o proveniente do tapete micelial e o da direita do basidioma, houve a precipitação de resíduos, sendo que o da esquerda era mais hidrossolúvel e a difusão foi melhor que o da direita. Segundo Bandeira et al. (1998) a dificuldade de difusão do extrato pode estar relacionada a hidrossolubidade e massa molecular dos produtos naturais.

Figura 4: Produtos da extração de *Scleroderma* sp aplicados no meio sólido Muller-Hinton para difusão. Posições dos poços: controle positivo na posição inferior, controle negativo no alto, extrato do micélio com diluente à esquerda e extrato do basidioma com diluente à direita. a) logo após a aplicação, b) 18 horas após a aplicação.



Teste de confrontação

O teste de confrontação de microorganismos é um teste clássico de antibiose e no presente caso, pode-se observar que o crescimento do fungo fitopatogenico foi inferior na presença do

isolado de *Scleroderma* sp, enquanto o de *Alternaria* sp foi semelhante ao controle negativo (Tabela 2). VAIDYA; SHRESTHA; WALLANDER (2005) observaram alta atividade de antibiose de *Scleroderma* sp em confrontação direta com fungos fitopatogenicos como *Pythium* sp, *Rhizoctonia* sp, *F. oxysporum* e moderada atividade contra *F. udum* e baixa em relação a *Geotrichum* sp.

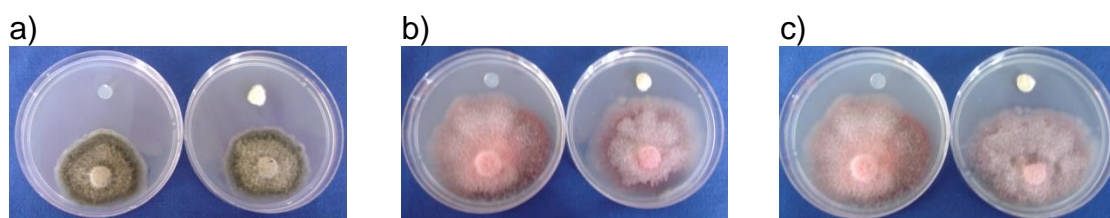
Tabela 2: Atividade antifúngica de *Scleroderma* sp em relação a fungos fitopatogenicos, em confrontação direta, no período de 7 dias, em cultivo de *in vitro*, a 25±1°C.

Micro-organismos	<i>Alternaria</i> sp (mm)	<i>F. oxysporium</i>
Disco de agar ²	1,3	2,93
<i>Scleroderma</i> sp	1,3	2,66
Halo de inibição	0	0,27

Obs. ¹valor médio de tres repetições, ² controle negativo

Sugere-se que *Scleroderma* sp pode produzir produtos de antibiose em relação a *F. oxysporium*, conforme pode ser observado na Figura 5. O fungo *Alternaria* sp apresentou um crescimento mais lento que o *F. oxysporium*.

Figura 5: Ação de *Scleroderma* sp frente a fitopatógenos, em cultivo *in vitro*, 25± 1°C.a) *Alternaria* X ágar e *Alternaria* sp X *Scleroderma* sp, b e c) *F. oxysporium* X ágar (controle negativo) e *F. oxysporium* X *Scleroderma*).



No presente trabalho, comparou-se o pH do meio cultivo após os confrontos de *Scleroderma* sp com *Alternaria* sp e com *F. oxysporium*, em relação aos controles negativos e observou-se que não houve diminuição do pH do meio onde foi realizado o teste com *F. oxysporium*, pois os valores foram muito próximos, enquanto para a *Alternaria* sp, não houve inibição, mas o pH do meio foi mais baixo (Tabela 3).

Tabela 3: Avaliação do pH do meio MNM após crescimento do isolado de *Scleroderma* sp e fungos patogênicos, a 25±1°C.

Confronto	Controle negativo	<i>Alternaria</i> sp	Controle negativo	<i>F. oxysporium</i>
pH	4,5	4,1	4,1	4,1
	4,3	3,8	3,9	4,2
Média	4,4	3,95	4,0	4,15
Desvio padrão	0,14	0,21	0,14	0,07

Os fungos ectomicorrizicos apresentam potencial de produção de metabólitos secundários que podem ser utilizados para a produção de antimicrobianos, e o gênero

Scleroderma sp, mostrou efeito em relação ao fungo *F. oxysporum*.

CONCLUSÕES

A partir do basidioma de *Scleroderma* sp, utilizando como extrator de éter de petróleo foi produzido um pó branco, que apresentou características apolares e não houve inibição do crescimento de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 35218), nas condições testadas.

Não obteve-se produto quando utilizou-se éter de petróleo para a extração a partir dos tapetes de micélio do isolado de *Scleroderma* sp, no entanto, com metanol, foi possível obter uma porção viscosa e escura, com características polares, mas não apresentou ação antimicrobiana frente a bactéria Gram positiva e Gram negativa testada.

Na confrontação do isolado de *Scleroderma* sp com os fungos *Alternaria* sp e *F. oxysporum* observou-se o potencial de inibição deste fungo ectomicorrízico em relação a *F. oxysporum*.

Com perspectivas de estudos futuros, sugere-se a continuidade de testes com extratores polares e apolares, mas observando as características dos produtos formados de modo que a escolha do diluente permita a adequada difusão da fração obtida, nos meios de cultura.

Palavras-chave: Antimicrobianos, *Scleroderma*, antibiose, extração, ectomicorriza.

REFERÊNCIAS

- BANDEIRA, M.F.C.L. Estudo preliminar da atividade antibacteriana do óleo essencial da resina da *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba) associados ao óxido zinco e ao hidróxido de cálcio. **Jornal Brasileiro de Clínica e Estética em Odontologia**, v. 3: 46-52. 1998.
- BRIZUELA, M.A., PÉREZ, LG., L., MANSUR, M. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundários. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.15, p.69-74. 1998.
- JEFFRIES, P. *Scleroderma*. In: CAIRNEY, J.W.G.; CHAMBERS, S.M. (Eds). **Ectomycorrhizal Fungi: key genera in profile**. Berlin: Springer-Verlag, 1999.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Prentice Hall, 2004.
- NASCIMENTO, M.S. **Avaliação das propriedades farmacológicas de polissacarídeos do fungo *Scleroderma nitidum***. 2010.132f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Bioquímica) - Centro de Biociencias. UFRN, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

SMANIA JUNIOR, A.; MONACHE, F.D.; SMANIA, E.F.A.; BENCHETRIT, L.C.; CRUZ, F.S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr.. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p. 177-181, 1995.

TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fungicos com atividade antibiótica. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813. 2008.

VAIDYA, G.S.; SHRESTHA, K.; WALLANDER, H. Antagonistic study of ectomycorrhizal fungi isolated from Baluwa forest (Central Nepal) against with pathogenic fungi and bacteria. **Scientific World**, v. 3, n. 3, p. 49-52. 2005.