

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ANTIMICROBIANO DO COGUMELO *Pleurotus sajor-caju*

C. R. CONTESSA^{1*}, N. B. SOUZA², L. ALMEIDA³, A. P. MANERA⁴, C. C. MORAES⁵

¹ Universidade Federal do Pampa, curso de Engenharia de Alimentos

² Universidade Federal do Pampa, curso de Engenharia de Alimentos

³ Universidade Federal do Pampa, curso de Engenharia de Alimentos

⁴ Universidade Federal do Pampa, curso de Engenharia de Alimentos

⁵ Universidade Federal do Pampa, curso de Engenharia de Alimentos

*E-mail para contato: camilaramao@hotmail.com

RESUMO - Fungos são divididos em três classes principais, dentre elas os Basidiomycotas, que tem como principal representante fungos macroscópicos, os cogumelos, estes dividem-se em espécies tóxicas, alucinógenas e comestíveis. Dentre os comestíveis apresenta-se o *Pleurotus sajor-caju* de origem asiática, que possui alto valor nutricional e propriedade antimicrobiana. Para extração do agente antimicrobiano utilizou-se o micélio do fungo já desenvolvido, o qual foi submetido à análise antimicrobiana e ao processo de purificação por cromatografia de permeação em gel, em que foram coletadas 11 frações, as quais foram analisadas posteriormente quanto ao seu potencial antimicrobiano através do método de microplacas. Pode-se observar nos resultados que a amostra bruta não obteve ação antimicrobiana, porém, grande parte das frações purificadas apresentaram potencial de inibição, resultando em 84% de inibição sob o *Staphylococcus aureus* na fração 7 e de 31% de inibição sob *Escherichia coli* na fração 11. Pode-se observar que a técnica de purificação utilizada foi eficiente, pois obteve-se um aumento significativo na porcentagem de inibição da microbiota testada, evidenciando que provavelmente o composto mais eficaz contra micro-organismos gram-positivos difere em sua composição química do composto inibidor de gram-negativo.

Palavras chaves: cogumelos comestíveis, antimicrobiano e purificação.

1. INTRODUÇÃO

Fungos são seres eucariontes, podendo ser encontrados na forma unicelular, como as leveduras e apresentando-se também como fungos filamentosos, formados pelo conjunto de hifas, podendo ser septadas ou não, estas células são protegidas por uma estrutura denominada de parede celular (FUKUDA *et al.*, 2009). A classe dos Basidiomycotas é caracterizada pela presença de basídios, estrutura onde ocorre a formação de esporos, que tem por seu representante fungos macroscópicos, os cogumelos (CARVALHO, 2007). Estes para obtenção de energia e sua manutenção, necessitam da absorção de compostos orgânicos, através da liberação de algumas enzimas responsáveis por sua degradação (MARINO *et al.*, 2008).

Cogumelos dividem-se em espécies tóxicas, alucinógenas e comestíveis (NOVAES & FORTES, 2005). Por apresentar-se macroscopicamente, são facilmente encontrados no meio ambiente, podendo ser confundidos entre si, pois diferenciam-se apenas por sua morfologia, devendo ser analisado minuciosamente antes do consumo. Cogumelos comestíveis veem sendo adicionados regularmente na dieta da população, por apresentarem várias características nutricionais como, por exemplo, a excelência em fontes de aminoácidos essenciais, proteínas, vitaminas, minerais, carboidratos, fibras, sendo pobres em gorduras saturadas, trans e colesterol além de possuir sabor agradável (DIAS *et al.*, 2003).

O consumo destas espécies comestíveis vem aumentando em grande parte do mundo, porém, no Brasil ainda é baixo, como também sua produção, (DIAS *et al.*, 2003) apesar de estudos demonstrarem seu valor nutricional (ZDRADEK, 2001), além deste, destacam-se também pela capacidade terapêutica (BERNARDI *et al.*, 2010), antioxidante (OYETAYO, 2009), e antimicrobiana (KITZBERGER, 2005). De acordo com Madigan *et al.* (2004), agentes antimicrobianos são compostos naturais e/ou químicos que podem matar ou inibir o desenvolvimento de micro-organismos, podendo ocasionar a morte destes quando bacteriocidas, fungicidas e virocidas, ou inibi-los quando bacteriostáticos, fungistáticos e viristáticos.

A capacidade de desenvolvimento do fungo está associada às condições de cultivo, como meio de cultura, acidez e temperatura, sendo que a temperatura considerada ótima para o desenvolvimento do micélio é de aproximadamente 25°C. Através do seu metabolismo o cogumelo secreta compostos os quais muitas vezes são bioativos, podendo, apresentar ação antimicrobiana frente a micro-organismos patogênicos (AKINYELE, 2005).

O gênero *Pleurotus* pertence à ordem Agaricales e à família Agaricaceae, *Pleurotus sajor-caju*, é um cogumelo comestível de origem asiática, de sabor suave, rico em vitaminas e aminoácidos e que apresenta propriedades terapêuticas (DIAS *et al.*, 2003) e atividade antimicrobiana contra organismos patogênicos gram-positivos e gram-negativos (CONTESSA *et al.*, 2014, a). Segundo Mizuno & Zhuang (1995), alguns dos polissacarídeos pertencentes a este cogumelo, apresentam propriedade antitumoral contra o sarcoma 180 em camundongos, demonstrando sua aplicação na área farmacêutica. Conforme Carbonero *et al.* (2003) alguns polissacarídeos presentes nos cogumelos, e em específico as β -glucanas, a qual se faz presente neste cogumelo tem a capacidade de atuar como imunomoduladores e antimutagênicos nos sistemas biológicos.

Segundo Contessa *et al.* (2014, b) a produção de agente antimicrobiano presente no cogumelo *Pleurotus sajor-caju* depende de condições de estresse, como o impedimento do desenvolvimento do micélio, pois ao sentir-se ameaçado produz o composto como defesa. Com isto, utiliza-se de técnicas de purificação a fim de concentrar compostos, estas baseiam-se na separação dos constituintes presentes na amostra, através da solubilidade, afinidade com a água, carga elétrica, tamanho molecular, dentre outras, permitindo o enriquecimento do composto de interesse (BRAGA, 2013). Na cromatografia de permeação em gel o analito é eluído através de solvente adequado sob a coluna composta de material poroso inerte, permitindo a separação das moléculas com base no tamanho hidrodinâmico das mesmas (MOHAMMAD & REINEKE, 2012).

O presente trabalho teve por objetivo a extração, purificação e análise da atividade antimicrobiana do extrato do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas a partir do micélio do fungo comestível *Pleurotus sajor-caju*, cultivado por fermentação em estado sólido, a temperatura de 25°C com circulação de ar conforme Contessa *et al.* (2014, a). O desenvolvimento do micélio se deu a partir do fungo inoculado em placa de Petri contendo Ágar Batata Dextrose, o repicado contendo 1cm² foi adicionado no centro da placa para um desenvolvimento radial uniforme.

Para a obtenção do extrato utilizou-se de água mais Tween p.s. 80, para raspagem e desprendimento do micélio do Ágar, o extrato acondicionado em frasco âmbar, foi submetido à agitação em mesa agitadora com temperatura ambiente, em torno de 25°C e então filtrado com membrana de 0,45µm, obtendo-se o extrato bruto.

O extrato bruto foi submetido ao processo de purificação empregando a técnica de cromatografia de permeação em gel, com coluna C10/20 a qual foi recheada de sílica gel Sephacry (40–20.000 KDa) e esterilizada com álcool 70%, como eluente utilizou-se tampão fosfato de sódio pH 6,5. Com o auxílio de bomba peristáltica, 1mL da amostra percorreu sob a coluna, com vazão de 0,1mL/min e recolheu-se 11 frações do extrato.

As análises antimicrobianas foram realizadas pelo método de microplacas, conforme descrito na norma NCCLS (2003). Utilizou-se microplacas de 96 poços, cada um com capacidade de 400µL, onde foram adicionados 145µL de caldo Mueller Hinton, 135µL de extrato filtrado do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* e 20µL de cultura microbiana Gram-positivo ou Gram-negativo, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente. Baseando-se no fato que o desenvolvimento microbiano ocasiona a turvação do meio fez-se leitura de absorbância após a inoculação e passados 16h, com a utilização de leitora de Elisa, em um comprimento e onda de 630nm.

Para avaliação dos resultados foi considerada a diferença da leitura inicial com a realizada após 16h, da amostra controle e das que continham o extrato (bruto e purificado), onde que os poços com menor variação de leitura indicaram possível ação antimicrobiana do extrato sob os micro-organismos, a diferença destes chamou-se de porcentagem de inibição.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar através da Figura 1, os resultados da porcentagem de inibição das frações coletadas pelo processo de purificação, bem como a porcentagem de inibição do extrato não purificado, representado pela fração 1. Pode-se analisar que a fração não purificada não apresentou potencial inibitório, conforme Contessa *et al.* (2014, b), a porcentagem do agente inibidor presente no extrato depende das condições que o micélio do fungo se encontra durante a extração.

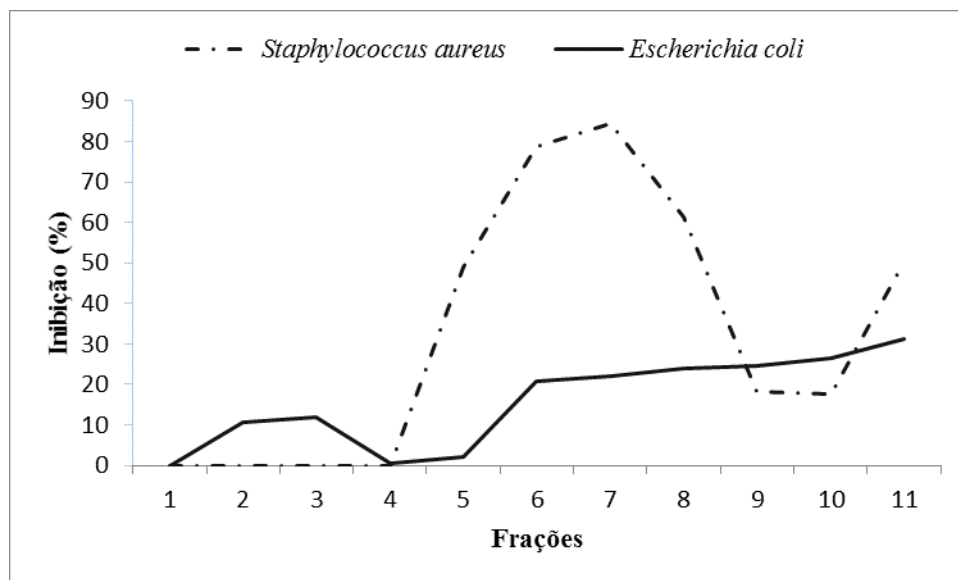


Figura 1: Porcentagem de inibição do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes frações de purificação, sob *Staphylococcus aureus* representado pela linha pontilhada e *Escherichia coli* representado pela linha sólida.

Pode-se analisar que o composto esteve presente na maior parte das frações coletadas, atingindo 84% de inibição do micro-organismo gram-positivo *Staphylococcus aureus* na fração 7, e de 31% na fração 11 sob o micro-organismo gram-negativo *Escherichia coli*, indicando que provavelmente o composto mais eficaz contra o micro-organismo gram-positivo difere em sua composição do composto inibidor de gram-negativo. Estes resultados estão de acordo aos encontrados por Souza *et al.* (2014) que ao testar atividade antimicrobiana de extratos de *Pleurotus sajor-caju* atingiu 17,5% de inibição sobre *Staphylococcus aureus* e 74,3% sobre *Escherichia coli*. Já Braga (2013), ao analisar extrato de *Lentinula edodes* na forma desidratada, atingiu em média 91,64% de inibição sobre *Staphylococcus aureus* e 79,07% sobre *Escherichia coli* demonstrando que as condições de cultivo do cogumelo interferem também na concentração do(s) composto(s) com ação antimicrobiana.

A cromatografia por permeação em gel permite a separação dos compostos da amostra através do seu tamanho molecular, pois a matriz utilizada para tal é composta por poros de (40–20.000 KDa), onde que moléculas com maior tamanho molecular, são coletadas nas primeiras frações, pois não conseguem permear os poros da matriz, já as moléculas menores são coletadas nas últimas frações, pois estas percorrem um caminho maior, permeando todos os poros da matriz, as de tamanho intermediário são coletadas entre ambas pois percorrem apenas os poros de maior tamanho (ZUÑIGA *et al.*, 2003).

Nada se pode afirmar quanto ao tamanho da molécula do antimicrobiano, pois obteve-se inibição na maior parte das frações coletadas, o que foi possível nos estudos realizados por Souza *et al.* (2015) que através da purificação por ultrafiltração pode constatar o tamanho da molécula do composto bioativo presente no extrato de *Agaricus blazei*.

As frações 7 e 11, apresentaram maior eficiência do composto quando testados sob micro-organismos de diferentes estruturas, sendo assim, pode-se perceber que foram coletados dois agentes antimicrobianos, onde um mostrou-se mais eficaz contra micro-organismos gram-positivos e outro contra gram-negativos, levando a estimar que o extrato possui mais de um agente inibidor em sua composição e que estes diferem entre si, direcionando os próximos estudos a evidenciar que compostos estão presentes no extrato de *Pleurotus sajor-caju*.

5. CONCLUSÃO

Pode-se a partir dos resultados obtidos concluir que a técnica de purificação se mostrou eficaz, aumentando a porcentagem de inibição do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* sob os patógenos testados (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), resultando em 84% de inibição do *Staphylococcus aureus* e 31% sob *Escherichia coli*. Verificou-se também que o agente inibidor eficaz contra micro-organismos gram-positivos difere em sua composição do agente inibidor contra gram-negativos.

6. AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos (LMTA) da UNIPAMPA-BAGÉ pelo espaço físico, FAPERGS (Fundação de amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo incentivo financeiro à pesquisa e Fundação Universidade Regional de Blumenau - FURB pela oportunidade.

7. REFERÊNCIAS

AKINYELE, B.J.; ADETUYI, F.C. Effect of agrowastes, pH and temperature variation on the growth of *Volva-riella volvacea*. African Journal of Biotechnology, v.4, n.12, p.1390-1395, 2005.

BRAGA, L. T. Obtenção e purificação de extratos antimicrobianos de *Lentinula edodes* (Shiitake). Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade federal do Pampa, Bagé, 2013.

BERNARDI, E.; PINTO, D. M.; COSTA, E. L. G.; NASCIMENTO, J. S. Entomofauna associada ao cultivo de *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer (Agaricales: acaricacea) no município do Capão do Leão, RS, Brasil. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v. 77, n.3, p. 465-469, jul. /Set., 2010.

CARVALHO, M. P. de Avaliação da atividade antimicrobiana dos basidiomicetos *Lentinula edodes*, *Lentinus crinitus*, *Amauriderma sp* e *Pycnoporus sanguineus*. 2007. 102p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

CONTESSA, C. R.; SOUZA, N. B.; ALMEIDA, L. MANERA, A. P.; MORAES, C. C.; Avaliação da atividade antimicrobiana do cogumelo comestível *Pleurotus sajor-caju* em diferentes temperaturas. XXVI Congresso Regional de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia - CRICTE, 2014, a.

CONTESSA, C. R.; SOUZA, N. B.; ALMEIDA, L. MANERA, A. P.; MORAES, C. C.; *Pleurotus sajor-caju*: avaliação da atividade antimicrobiana associada ao desenvolvimento do micélio do cogumelo. VI Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão (SIEPE), 2014, b.

CARBONERO, E. R.; SILVA, E. V.; KOMURA, D. L.; RUTHES, A. C.; GORIN, P. A. J.; LACOMINI, M.; Análise química da β -glucana (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) isolada do corpo de frutificação do cogumelo comestível *Pleurotus sajor-caju*. 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2003.

DIAS, E. S., SILVA, R., CHWN, R. F., KOSHIKUMO, E. M., DIAS, E. S., Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agroindustriais. 2003 Ciênc. agrotec., Lavrs.V27, n6, p.1363-1369, nov./dez, 2003.

FUKUDA, E. K.; VASCONSELOS, A. F. D.; MATIAS, A. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, M. L. C. da; Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 30, n^o1, p. 117-134, jan. /mar. 2009.

KITZBERGER, C. S. G. Obtenção de extrato de cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) com CO₂ a alta pressão. Dissertação de Mestrado. 2005. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

MADIGAN, M. T.; Microbiologia de Brock. Prentice hall, 2004.

MARINO, R. H.; ABREU, L. D.; MESQUITA, J. B.; RIBEIRO, G. T. Crescimento e cultivo de diferentes isolados de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer em serragem da casca de coco. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v. 75, n.1, p.28-36, jan./mar., 2008.

MIZUNO, T.; ZHUANG, C. Houbitake, *Pleurotus sajor-caju*: antitumor activity and utilization. Food Review International, New York, v. 11, n. 1, p. 185-187, 1995.

MOHAMMAD, A. K.; REINEKE, J.; Quantitative Nanoparticle Organ Disposition by Gel Permeation Chromatography – Methods in Molecular Biology, v. 926, pp 361-367, 2012.

NCCLS. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição; v. 23, n^o. 2, 2003.

NOVAES, M.R.C.G., FORTES R.C. Efeitos antitumorais de cogumelos comestíveis da família agaricaceae. Nutr Bras 2005;4(4):207-17.

OYETAYO, V.O. Free radical scavenging and antimicrobial properties of extracts of wild. *Brazilian Journal of Microbiology* (2009) 40: 380-386.

SOUZA, N. B.; CONTESSA, C. R.; ALMEIDA, L. MANERA, A. P.; MORAES, C. C.; Extração e purificação por ultrafiltração de compostos bioativos de *Agaricus blazei*. 14^a Mostra de Produção Universitária, MICE 2015.

SOUZA, N. B.; CONTESSA, C. R.; ALMEIDA, L. MANERA, A. P.; MORAES, C. C.; Obtenção de compostos antimicrobianos a partir de diferentes espécies de cogumelos comestíveis. XXVI Congresso Regional de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia - CRICTE, 2014.

ZDRADEK, C. P. Otimização do crescimento dos fungos comestíveis *P. ostreatus* e *P. sajor caju* utilizando resíduos agroindustriais. 2001. 139p. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2001.

ZUÑIGA, A. D. G; PEREIRA, J. A. M; COIMBRA, J. S. R; MINIM, L. A; ROJAS, E. E. G. Revisão: Técnicas usadas no processo de purificação de Biomoléculas. *Revista B. CEPPA*, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 61-82, Paraná, 2003.