

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS DE *Pleurotus* SPP

Luiza dos Santos BARBOSA¹
Ceci SALES-CAMPOS²
Felipe Barbosa PESSOA³
Jean Charles PEIXOTO⁴

¹Bolsista IC INPA-PAIC/FAPEAM;
²Orientadora INPA; ³Doutorando UFAM; ⁴Pesquisador UFAM.
E-mail: aziul_chan@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Substâncias antimicrobianas ou antibióticas são produzidas por microrganismos, podem matar agentes microbianos ou inibir seu crescimento. Juntamente com os quimioterápicos, compostos químicos sintéticos, são empregadas no tratamento ou prevenção de doenças causadas por agentes infecciosos formando a classe dos antimicrobianos (Moreira 2004). A resistência de alguns microrganismos a alguns antibióticos comumente usados passou a ser um problema cada vez mais preocupante (Low e Scheld 1998), tornando o tratamento de certas patologias complexo, levando a busca por novos compostos bioativos.

Sabe-se que a maior parte dos fungos desempenha um papel de grande relevância para a natureza. Além de decomporem matéria orgânica, estes microrganismos são relatados como produtores de metabólitos que apresentam atividade biológica como antimicrobiano, antifúngico e antiviral (Brizuela *et al.* 1998; Stadler e Keller 2008).

Pleurotus produzem um heteropolissacarídeo com atividade anti-neoplásica e antimicrobiana (Telles 2010), além de outros estudos mostrarem que este fungo possui a capacidade de modular o sistema imunológico, possuindo atividade hipoglicêmica e antitrombótica, diminuindo a pressão arterial e o colesterol sanguíneo, e possuindo ação antitumoral, anti-inflamatória e antimicrobiana (Gunde-Cimerman 1999). *Pleurotus ostreatus* produz uma série de metabólitos de interesse farmacêutico e medicinal, como antioxidantes, antitumorais, imunoestimulante e antimicrobiano (Wisbeck *et al.* 2009). O presente trabalho tem como objetivo investigar a atividade antimicrobiana *in vitro* de 04 isolados do fungo comestível *Pleurotus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais fúngicos

As linhagens *Pleurotus ostreatus* 1467 (nativo B), *Pleurotus ostreatus* 09/100- (POS 09/100), *Pleurotus ostreatusroseus* AM, *Pleurotus ostreatusroseus* SP usados neste estudo foram acessadas da coleção de interesse agrossilvicultura do INPA, da micoteca da UNESP e do laboratório de cultivo de fungos comestíveis do INPA.

Obtenção dos filtrados de cultura (extrato bruto)

Os isolados de *Pleurotus* spp. foram cultivados em Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio BD (batata dextrose) e agitados em aparelho shaker a 120 rpm, com ausência de luz e a temperatura de 25 °C. O tempo de cultivo foi de 30 dias. Os filtrados de cultura (extrato extracelular fúngico) foram coletados nos 15^o e 30^o dias (Maki 1999).

Os filtrados das culturas foram obtidos realizando-se a separação da biomassa dos fungos pelos métodos: de filtração a vácuo e em membranas millipor de 0,22 µm, sendo armazenados em tubos de ensaio e submetidos posteriormente à avaliações antimicrobianas.

Testes microbianos com extrato bruto

Linhagens patogênicas [*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27583) e *Staphylococcus aureus* (ATCC29213)], e a levedura *Candida albicans* (ATCC 10.231)] foram utilizadas no estudo antibacteriano destas frente aos filtrados de *Pleurotus* spp.

Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto

Foram usados testes antimicrobianos através do método de disco- difusão (Collins e Lyne's 2004; Ozturk *et al.* 2011) usando 20 mL de meio de cultura sólido contendo 100µL de micro-organismo. Para cultivar as bactérias e testá-las quanto a atividade antimicrobiana, foi utilizado o meio de cultura ágar Triptona de soja (TSA), e para o cultivo fúngico de cândida o meio de cultura ágar Sabouroud.

Discos de 6 mm de papel filtro estéril foram então impregnados com os filtrados de cultura de *Pleurotus ostreatus* Nat B e *Pleurotus ostreatus* 09/100 e inseridos em placas de Petri semeadas anteriormente. Em seguida as placas foram incubadas a 35 °C por 24 h em estufa bacteriológica para as cepas bacterianas e 48h para *Candida albicans*. Foi verificado se havia formação de halo inibitório, caso positivo, os halos foram medidos. Os experimentos foram realizados em triplicada.

Obtenção dos extratos fúngicos com solventes orgânicos

Os isolados de *Pleurotus* spp. foram cultivados em Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio BD (batata dextrose), agitados em aparelho shaker a 120 rpm, com ausência de luz e a temperatura de 25 °C. O tempo de cultivo foi no total de 30 dias (Maki 1999). A separação da biomassa das linhagens fúngicas, se deu por filtração a vácuo. Em seguida, foram adicionados 200 mL de solvente orgânico a biomassa e deixados em repouso por uma semana. Após o término da extração com o primeiro solvente, o extrato foi transferido para um recipiente previamente pesado e identificado, deixando-o secar em estufa de circulação forçada a 50°C, em seguida, o mesmo foi pesado em balança analítica. Este procedimento foi repetido para os outros solventes extratores: hexano, acetato de etila, metanol e etanol (Cotta *et al.* 2009).

Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos com solventes orgânicos

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos foi feita pelo método disco-difusão, os extratos secos diluídos em DMSO (dimetilsulfóxido) (Ozturk *et al.* 2011). Discos de 6 mm de papel filtro estéril foram então impregnados com 25 µL de extratos e inoculados em placas de Petri com os microrganismos semeados anteriormente. Em seguida as placas foram incubadas a 35 °C por 24 h em estufa bacteriológica para as cepas bacterianas e contendo *Candida albicans* por 48h. No final dos períodos de incubação, foi verificado se havia formação da zona de inibição o halo de inibição foi medido em mm. Discos com DMSO foi usado como controle. Os experimentos foram realizados em triplicada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extrato bruto

Os filtrados de isolados de *Pleurotus* spp. (extrato bruto) não apresentaram atividade antimicrobiana em relação às linhagens de patógeno padrão (Figura 1) (Low D. 1998). Provavelmente a concentração de antimicrobianos nos disco de papel filtro não foi suficiente para uma atividade antimicrobiana.



Figura 1. Teste antimicrobiano com os filtrados de cultura. Ausência de halos de inibição, sendo 1- controle; 2- POS 09/100; 3- P. Nat B.; 4- POS *Roseus* SP; 5- POS *Roseus* AM.

Extratos com solventes orgânicos

Os extratos com solventes orgânicos fúngicos de *Pleurotus* spp. apresentaram halos de inibição (Figura 1) somente para *Pleurotus ostreatus* 09/100 e *Pleurotus ostreatus* 1467 (nativo B).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, observa-se que a atividade antimicrobiana, utilizando-se o método de difusão com discos, foi positiva somente com os extratos fúngicos retirados de etanol, metanol e acetato de etila e os extratos com hexano não apresentaram resultados, enquanto que os extratos obtidos de *Pleurotus ostreatus* 09/100 apresentaram atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* com formação de halo de inibição com aproximadamente 5 mm de diâmetro. No caso dos extratos derivados do P. Nat B o halo de inibição máximo foi de 4 mm.



Figura 2. Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de POS 09/100 (2) e controle (1).

Os dados dos halos inibitórios foram analisados estatisticamente por meio empregando o teste ANOVA um fator, com teste Turkey. Para *E. coli* nenhum extrato apresentou atividade satisfatória (0,0 mm). Os extratos hexânicos e acetato de etila obtidos de *Pleurotus* não apresentaram qualquer atividade inibitória contra *P. aeruginosa*. Todavia, os extratos metanólicos (halo=1,5 mm) e etanólicos (halo=2,5 mm) apresentaram atividade positiva contra o mesmo patógeno. No entanto, não diferiram estatisticamente. Em relação ao *S. aureus*, os extratos etanólicos (halo=1,0 mm), acetato de etila (halo=1,5 mm) e metanólicos (halo=2,5 mm) apresentam halo de inibição, sendo as médias estaticamente iguais. O extrato hexânico não apresentou qualquer atividade inibitória (halo=0,0 mm) para *E. coli* (Tabela 1).

Tabela 1. Halos de inibição de diferentes extratos orgânicos das espécies de Pos 09/100 e Pos 1467.

Extrato	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	Média do Halo
MeOH	2,5 A a	1,5 A ab	0,0 A b	1,3 A
Etanol	1,0 A a	2,5 AB ab	0,0 A b	1,1 A
Acetato	1,5 AB a	0 B a	0,0 A a	0,5 AB
Hex	0 B a	0 B a	0,0 A a	0 B
Média de inibição	1,2 a	1,0 a	0,0 b	

Legenda: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, (nas colunas com letras maiúsculas extratos e nas linhas letras minúsculas entre micro-organismos) pelo teste Turkey ao nível de 5% de probabilidade.

Ozturk *et al.* (2011) estudaram o efeito antimicrobiano do extrato de metanol de espécies Agaricus contra seis espécies de bactérias Gram-positivas, sete espécies de bactérias Gram-negativas e duas espécies de leveduras. As bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis aos extratos dos *Pleurotus* do que as bactérias Gram-negativas. Os resultados dos extratos metanólicos, etanólicos e acetatos de etila de fungos, neste caso *P. ostreatus* 09/100 e *P. ostreatus* 1467, mostraram melhor atividade antibacteriana contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* corroborando com os resultados relatados por Ozturk *et al.* (2011).

Shang *et al.* (2013) pesquisou a atividade antimicrobiana do corpo de frutificação de cogumelos comestíveis e medicinais contra *Helicobacter pylori*, *S. aureus* e *E. coli*. Dentre os cogumelos pesquisados, o extrato com solvente orgânico etanol de *Pleurotus ostreatus* apresentou atividade antimicrobiana contra duas linhagens da bactéria *H. pylori in vitro* com a concentração mínima inibitória de $\leq 3,0$ mg/mL. Assim também como, apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli* com concentração mínima inibitória >10 mg/mL. É interessante notar que extratos com solventes orgânicos, dos macrofungos, são recomendados para futuras pesquisas na busca de moléculas bioativas.

CONCLUSÃO

A atividade antimicrobiana de *Pleurotus ostreatus* 09/100 e *Pleurotus ostreatus* 1467 (nativo B) testados foi positiva, mostrando que tais fungos podem ser fontes alimentícias nutritivas, como também servir como alimentos protetores contra agentes patogênicos. Os extratos poderão servir provavelmente para o desenvolvimento de produtos alimentares seguros. No entanto, mais estudos, especialmente testes *in vivo*, da atividade dos extratos fúngicos e constituintes químicos isolados dos mesmos são necessários.

REFERÊNCIAS

- Akyuz, M.; Kirbag, S. 2009. Antimicrobial activity of *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* grown on various agro-wastes. *Eur Asia J BioSci*, 3: 58-63.
- Brizuela, M.A.; García, L.; Pérez, L.; Mansur, M. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundários. *Rev. Iberoam. Micol.*, 15: 69-74.
- Collins C.H.; Lyne, P.M. 2004. *Microbiological Methods*. 8 ed. Oxford University Press Inc., New York.
- Cotta, J.A.O.; Rezende, M.O.O.; Landgraf, M.D. 2009. Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. *Química Nova*, 32(8): 2026-2033.
- De Andrade, M.C.N. et al. 2010. Crescimento micelial in vitro de cinco linhagens de *Agaricus bisporus* submetidas a diferentes condições de temperatura. *Maringá*, 32(1): 69-72.
- Gunde-Cimerman, N. 1999. Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (*agaricales s.l.*, Basidiomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms*, 1: 69-80.
- Low, D.; Scheld, W.M. 1998. Strategies for stemming the tide of antimicrobial resistance. *Jama*, 279: 394-395.
- Maki, C.S. 1999. Respostas fungistáticas de *Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler sobre *Candida albicans* (Robin) Berkhout e análise da variabilidade intraespecífica. 110 pp.
- Moreira, L.B. 2004. Princípios para uso racional de antibióticos: simpósio de atualização em antibióticos. *Revista AMRIGS*, 48: 118-120.
- Öztürk, M.; Duru, M.E.; Kivrak, S.; Mercan-Doğan, N.; Türkoglu, A.; Özler, M.A. 2011. In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: a comparative study on the three most edible mushrooms. *Food Chem Toxicol*, 49(6): 1353-1360.
- Rampinelli, J.R.; Garcia, M.C. 2008. Estudo da produção em cultivo sólido de *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001. Caxias do Sul, RS.
- Shang, X.; Tan, Q.; Liu, R.; Yu, K.; Li, P.; Zhao, G.P. 2013. In vitro anti-Helicobacter pylori effects of medicinal mushroom extracts, with special emphasis on the Lion's Mane mushroom, *Hericium erinaceus* (higher Basidiomycetes). *Int J Med Mushrooms*, 15: 165-174.
- Sánchez, C. 2010. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85: 1321-1337.
- Stadler, M.; Keller, N.P. 2008. Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research. *Mycological Research.*, 112: 127-130.
- Telles, C.S. 2010. Análises estruturais biológicas de exopolissacarídeo extraído do fungo comestível *Pleurotus sajor-caju* e de seu derivado sulfatado quimicamente. - Natal, RN.
- Vamanu, E. 2012. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of ethanolic extract of lyophilized mycelium of *Pleurotus ostreatus*. *Molecules*, 17: 3653-3671.
- Wisbeck, E.; Robert, A.P.; Furlan, S.A. 2002. Avaliação da produção de agentes antimicrobianos por fungos do gênero *Pleurotus*. *Rev. Saúde Amb.*, 3(2): 7-10.