

POTENCIAL ANTIBACTERIANO DO COGUMELO COMESTÍVEL *Pleurotus ostreatus* FRENTE À *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 E *Escherichia coli* ATCC 25922

Silvio Alencar Cândido Sobrinho¹, Marcia Rocha Torres², Eduardo Augusto Torres Silva Filho², Fábio Roger Vasconcelos¹, Maria Izabel Florindo Guedes¹, Daniele Rodrigues de Lima², Maria Gleiziane Araújo Franca², Luiz Francisco Wemmenson Gonçalves Moura², Messias Vidal de Oliveira², Francisco Lucas Alves Batista², Francisco Ernani Alves Magalhães^{2*}

Resumo

Este trabalho reporta o potencial antibacteriano do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus*. Extratos orgânicos, bem como β -glucânico e quitosânico, ambos nas concentrações de 100, 300 e 500 ppm, foram submetidos a ensaios de disco-difusão contra quatro bactérias padrões: duas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e duas Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Os extratos que apresentaram halo de inibição (HI) do crescimento bacteriano iguais a 8 mm foram classificados como ativos. Dos extratos testados, o extrato β -glucânico se mostrou ativo, em ambas concentrações, contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e na concentração de 500 ppm contra as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922. O extrato quitosânico apresentou atividade somente contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 na concentração de 500 ppm. Estes resultados são considerados promissores, pois apontam o extrato β -glucânico com potencial contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. Futuros estudos bioguiados sob a ação antibacteriana desse extrato devem ser realizados para produção, purificação e caracterização físico-química do constituinte bioativo de interesse farmacológico.

Palavras-chave: Bioprospecção. Atividade Antibacteriana. *Pleurotus ostreatus*.

Extrato β -glucânico.

POTENTIAL ANTIBACTERIAL EDIBLE MUSHROOM *Pleurotus ostreatus* IN RELATION TO *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 E *Escherichia coli* ATCC 25922

Abstract

This work reports the antibacterial potential of edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. Organic extracts, and β -glucan and chitosan, both at concentrations of 100, 300 and 500 ppm, underwent disc-diffusion tests against four bacteria patterns: two Gram positives (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) and two Gram negatives (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). The extracts showed inhibition zone (IZ) the equal to 8 mm bacterial growth were classified as assets. Of the extracts tested, the β -glucan extract proved to be active in both concentrations, against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and concentration of 500 ppm against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922. The chitosan extract showed activity only against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 at a concentration of 500 ppm. These results are considered promising because the point β -glucan extract with potential against Gram positive and Gram negative bacteria. Future studies bioguided on the antibacterial action of this extract should be made for the production, purification and physicochemical characterization of bioactive constituent of pharmacological interest .

Keywords: Bioprospecting. Antibacterial activity. *Pleurotus ostreatus*. β -glucan extract.

¹Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular (LBBM), Universidade Estadual do Ceará, Campus do Itaperi, Fortaleza, Ceará, Brasil;

²Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB), Universidade Estadual do Ceará, Campus CECITEC, Tauá, Ceará, Brasil.

Autor Correspondente: ernani.magalhaes@uece.br

Introdução

Os fungos do gênero *Pleurotus* apresentam características nutricionais com elevados teores de proteínas, aminoácidos essenciais, ácidos graxos insaturados, vitaminas e minerais. Além dessas características, vários trabalhos demonstram que esse gênero possui um vasto potencial para uso na medicina, devido à existência de vários compostos com propriedades terapêuticas, como o caso do β -Glucano, produzido pela espécie *P. ostreatus*, que possui ação antitumoral e estimula o sistema imunológico (RAJARATHNAM; BANO, 1989; ZHANG et al., 1994).

Conhece-se ainda sua ação antimicrobiana pela produção de antibióticos como, por exemplo, a pleurotina, produzida por *P. griséus* (GUNDE-CIMERMAN; CIMERMAN, 1999; ROBBINS; KAVANAGH; HERVEY, 1947).

Estudos científicos apontam a capacidade de várias espécies do gênero *Pleurotus* de produzir agentes antimicrobianos (WISBECK; ROBERT; FURLAN, 2002), tais como: *Pleurotus japonicus*, que produz o antibiótico 6-deoxyilludin M, com atividade contra *Bacillus subtilis* (HARA et al., 1987), *P. griseus*, *P. palmatus* e *P. sapidus*, que têm atividade antibiótica especialmente sobre *Staphylococcus aureus* (GUNDE-CIMERMAN e CIMERMAN, 1999) e *P. ostreatus*, com ação antimicrobiana principalmente contra *B. subtilis* (GARCIA; CISNEROS; SEDRÉS, 1998; BELTRAN-GARCIA; ESTARRON-ESPINOSA; OGURA, 1997; BIANCO COLETTI, 1981).

Esta espécie trata-se de um cogumelo comestível, considerado um grande decompositor de inúmeros resíduos, com produção de basidiomas de boa qualidade organoléptica. Baseada nessas características, e na capacidade de produzir substâncias com propriedades terapêuticas, esta é considerada uma espécie de grande interesse biotecnológico (RAJARATHNAM; BANO, 1987).

Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo a bioprospecção de atividade antimicrobiana do cogumelo *Pleurotus ostreatus* como um recurso de novos compostos antimicrobianos.

Material e Métodos

Preparação de meios de culturas

Cultivo do cogumelo

O cultivo do cogumelo foi desenvolvido segundo a metodologia propostas por Dias et. al., (2003), com adaptações. Para a manutenção do fungo em laboratório, foi utilizado o meio BDA e Cad. Cult. Ciênc.

para o preparo do inoculante, foi utilizado o painço. O painço foi cozido por 30 minutos, acondicionado em frascos de vidro e autoclavado a 121°C por 1 hora. Após o resfriamento, cada frasco recebeu o micélio do fungo crescido em BDA e incubado a 25 °C, até a completa colonização dos grãos (20 a 30 dias). O resíduo utilizado neste trabalho foi a palha de côco. O resíduo foi deixado de molho por um período mínimo de 2 horas e escorrido por pelo menos 4 horas antes de ser acondicionado. O substrato assim obtido, foi acondicionado em sacos de polipropileno com capacidade para 1 Kg e em seguida, foi autoclavado por 2 horas a 121 °C. Cada saco com substrato recebeu 20 g de inoculante (2%), o qual foi bastante misturado antes de ser colocado neles. Os sacos foram incubados em uma sala com luz difusa a uma temperatura média 22 °C, até a completa colonização do substrato. Após a completa colonização, os sacos foram abertos apenas na parte superior e distribuídos aleatoriamente em uma sala cuja umidade relativa do ar era de 70% e a temperatura, de 24 °C, em média. Após a primeira colheita, os sacos foram fechados novamente e incubados por 2 semanas. Quando novos primórdios foram formados, os sacos foram abertos antes desse período. Para o segundo fluxo de colheita, os sacos foram abertos completamente e depois foram eliminados. Os cogumelos colhidos foram secos em estufa a 50 °C, depois foram triturados (farinha do cogumelo) e pesados.

Germinação e crescimento vegetativo das bactérias

O meio de cultura para germinação e o crescimento vegetativo das bactérias foi desenvolvido segundo as normas do CLSI (NCCLS, 2003). O meio foi composto por 40 g de Agar TSA em 1 L de água destilada e esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121 °C e 1 atm. Posteriormente, em capela de fluxo laminar, placas de Petri (100 x 15 cm), esterilizadas, foram vertidas com 15 mL de meio, resfriadas até solidificação e estocadas em geladeira.

Meio de cultura para atividade antimicrobiana

A composição do meio de cultura utilizado para os testes contra as bactérias foi composto por 38 g de Agar Mueller-Hilton em 1 L de água destilada. O meio foi esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121 °C e 1 atm.

Bactérias empregadas nos testes antimicrobianos

Foram utilizadas cepas bacterianas padrões, sendo duas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e duas Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853)

Preparação de extratos

Extratos orgânicos

A preparação dos extratos de metabólitos especiais do cogumelo foi realizada baseando-se em metodologias propostas por Kasetrathat et al. (2008), com modificações. Inicialmente, 105 g do micélio do cogumelo, seco em estufa bacteriológica à 60°C, foram triturados e submetidos a extrações por solventes orgânicos a frio, por 24h, em *erlenmeyers* de 1000 mL. Nessas extrações, foram adicionados 1 L de cada solvente orgânico, separadamente, a saber: hexano PA, diclorometano PA, acetato de etila PA e metanol PA. Em seguida foram realizadas filtrações simples e os extratos orgânicos foram destilados para redução do volume sob vácuo em rotaevaporador, acondicionados em frascos ampolas a temperatura ambiente (30 °C) e identificados com os códigos dos extratos: E1-extrato hexânico, E2-extrato diclorometano, E3-extrato acetato de etila, E4-extrato metanólico.

Extratos bioquímicos (β -glucana e quitosana)

A preparação dos extratos bioquímicos, β -glucana e da quitosana do cogumelo foi realizada baseando-se em metodologias propostas por Mizuno et al. (1986, 1990) e por Moura et. al. (2006). Para a extração da β -glucana, utilizou-se 65 g de farinha de *P. ostreatus* e adicionou-se 180 ml de álcool etílico. Essa mistura foi levada ao agitador por 20 minutos. Logo em seguida, foi retirado o sobrenadante e, à parte sólida, foi adicionado mais 350 ml de álcool etílico, sendo aquecida à temperatura de 100 °C por 3 horas, em banho-maria. Após esse período, foi retirada do banho-maria e resfriada até 18±2 °C. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi novamente submetido às lavagens com álcool etílico por mais 3 vezes. Após as lavagens, o sobrenadante foi filtrado e, após a secagem, foi reidratado com 350 mL de água e aquecido a 100 °C/3h (sendo realizado 3 vezes). Após o resfriamento a temperatura ambiente, foi adicionado ao sobrenadante,

Cad. Cult. Ciênc.

400 mL de álcool etílico por 24 h. O precipitado (β -glucana) foi filtrado e colocado em placas de Petri para ser seco em estufa a 60 °C até peso constante. Essa fração foi, então, designada de E5. Para a extração da quitosana foi adicionado solução de hidróxido de sódio (10%) à farinha de cogumelo e em seguida, submetida a extração sob agitação durante 30 min. Após sucessivas lavagens até a calibração do pH 7, foi repetido o mesmo processo anterior, mas com solução de ácido clorídrico 6%. Novamente foram realizadas sucessivas lavagens com água destilada até a neutralização e, em seguida, foi adicionada solução de hidróxido de sódio (30%) sob agitação e aquecimento (120 °C) por 3 hs. Posteriormente, procedeu-se a filtração da quitosana e a parte líquida (sobrenadante) foi descartada. Finalmente o precipitado (quitosana) foi submetido à secagem em estufa a 80 °C e depois foi triturada e pesada. Essa fase foi, então, designada de E6.

Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos extratos orgânicos e bioquímicos do cogumelo contra as bactérias foi realizada através do teste disco-difusão descrita na norma do CLSI (NCCLS, 2003). Nesses ensaios foi inicialmente realizado a preparação dos discos. Os mesmos foram preparados nas concentrações de 100, 300 e 500 mg de cada extrato por disco, de 6 mm de diâmetro, da marca LABORCLIN, deixando-os em repouso por 10 min para absorção dos extratos. Após esse período, os discos foram secos em estufa a 80°C até estabilização do peso. Discos com eluentes de diluição foram feitos como controle negativo (DMSO e Ácido Acético). Para controle positivo foi utilizado Amoxicilina (AMO) e Tetraciclina (TET).

Previamente ao teste foi feito um cultivo de 18h das cepas bacterianas em Agar TSA. Para os ensaios foram selecionadas de 3 a 5 colônias de cada cepa retiradas da placa de Agar TSA. Essas colônias foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina (0,85%) para formar uma suspensão bacteriana. Ajustou-se a turbidez óptica dessa suspensão bacteriana em 0,5, de acordo com a escala de McFarland, de modo que a suspensão obtivesse aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Em seguida mergulhou-se um *swab* de algodão estéril na suspensão bacteriana, por um período de até 15 minutos após ajuste da turbidez. O *swab* foi girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido para retirada de qualquer excesso de inóculo no *swab*. Em seguida foi semeada a superfície da placa de Agar Mueller-Hinton passando-se o *swab* em toda a superfície estéril do Agar. Repetiu-se o procedimento esfregando outras três vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, passou-se um *swab* na margem da placa de Agar. A tampa

foi deixada entreaberta por até três minutos, de maneira a permitir que qualquer excesso de umidade fosse absorvido antes de se aplicar os discos impregnados com os extratos. Em seguida os discos foram colocados na superfície do Agar de maneira a assegurar o contato completo do disco sobre a superfície do Agar. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por período de 24 h. A atividade antimicrobiana foi caracterizada através de formação de halos de inibição de crescimento celular das cepas. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos em milímetros, usando um paquímetro (Marca MITYTOYO), medindo sempre pela parte de trás da placa de Petri. Os resultados foram expressos em: sem atividade antibacteriana, (-), halo de inibição (HI) igual a 0 mm e atividade antibacteriana positiva, (+), HI \geq 8 mm.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos nos experimentos de atividade antibacteriana, utilizando os extratos oriundos do metabolismo primário e secundário do cogumelo *P. ostreatus* para avaliar os halos de inibição (HI) do crescimento celular de cepas bacterianas, estão representados na Tabela 2.

Dos seis extratos do fungo *Pleurotus ostreatus* empregados nesse ensaio, apenas os extratos bioquímicos se mostraram promissores frente às cepas bacterianas testadas, formando-se halos de inibição iguais a 8 mm. O extrato β -glucana (E5) exibiu atividade antibiose frente às cepas *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 25923. O mesmo se mostrou ativo contra *P. aeruginosa* ATCC 27853 nas três concentrações empregadas e contra as cepas *E. coli* ATCC 25922, e *S. aureus* ATCC 25923 somente em contração de 500 ppm. O extrato quitosana (E6) apresentou atividade antibiose apenas contra a cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853, na concentração de 500 ppm (Tabela 2).

Tabela 2: Atividade antibacteriana de extratos de *Pleurotus ostreatus*.

Extrato	Eluente	<i>E. coli</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. aureus</i>			<i>E. feacalis</i>		
		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
E1	DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E2	DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E3	DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E4	DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E5	DMSO	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	(+)	-	-	-
E6	Ác. Acét.	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-

E1 – extrato hexânico; E2 – extrato diclorometano; E3 – extrato acetato de etila; E4 – extrato metanólico; E5 - β -glucana; E6 – quitosana; C1 – concentração do disco em 100 ppm; C2 – concentração do disco em 300 ppm; C3 – concentração do disco em 500 ppm; “-” sem atividade antibacteriana (Halo de Inibição, HI, igual a 0 mm); “+” atividade antibacteriana positiva (HI= a 8 mm);

Os resultados apresentados corroboram com pesquisas descritas por Garcia et al. (1998), os quais avaliaram a atividade antimicrobiana do micélio de *P. ostreatus* e detectaram essa atividade frente aos microrganismos *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Além desses microrganismos, esses autores ainda detectaram a atividade antimicrobiana frente a outros microrganismos, como o *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *B. subtilis*. Beltran-Garcia et al. (1997) identificaram também a presença de compostos antimicrobianos nos corpos frutíferos de *P. ostreatus*.

Rampinelli et al. (2006) estudando uma linhagem de *P. ostreatus* (DSM 1833) identificou uma atividade antimicrobiana frente a bactéria *E. coli* a partir do caldo de cultivo. Estes autores sugeriram que o efeito antimicrobiano pode estar associada à presença de ácido benzóico, álcool benzílico, anisaldeído e terpenos, produzidos pelo fungo. Entretanto os extratos polissacarídeos do micélio apresentaram pouco efeito inibitório sobre a *E. coli*, sugerindo que os compostos antimicrobianos presentes no caldo de cultivo tenham outra natureza química que não carboidratos. Os autores encontraram um efeito mais significativo dos polissacarídeos extraídos do micélio quando testado contra a bactéria *B. subtilis* e contra o fungo *C. albicans*.

Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram que as β -glucanas obtidas do fungo comestível *Pleurotus ostreatus* apresentaram ação antibiose contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, sendo assim, sugestivo para estudos futuros bio guiados sob a ação antibacteriana desse extrato e posterior produção, purificação e caracterização físico-química do constituinte bioativo de interesse farmacológico.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Estadual do Ceará, bem como a FUNCAP e CNPq pelo apoio e suporte financeiro.

Referências

BELTRAN-GARCIA, M, J.; ESTARRON-ESPINOSA, M.; OGURA, T.; Volatile compounds secreted by Oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) and their antibacterial activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p, 4049-4052, 1997.

BIANCO COLETTI, M. A.; Basidiomiceti in relazione all'antibiosi nota II. Attivita' antibiotica dei miceli e dei liquid di coltura. **Giornale di Batteriologia, Virologia ed Immunologia**, v. 74, p. 267-274, 1981.

DIAS, E. S.; KOSHIKUMO, É. M. S.; SCHWAN, R.; DA SILVA, R. Cultivo do cogumelo *pleurotus sajour-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciência e Agrotecnologia** v. 27, n. 6, p. 1363-1369, 2003.

GARCIA; I.; CISNEROS, F.; SEDRÉS, J. M. Estudio de La actividad antimicrobiana em el cultivo de *Pleurotus ostreatus* BH 184. **Alimentaria**, n. 292, p.63-65. 1998.

GUNDE-CIMERMAN, N.; CIMERMAN, A.; *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-Lovastatin. **Experimental Mycology**, v. 19, p. 1-6, 1999.

HARA, M.; YOCHIDA, M.; MORIMOTO, M.; NAKANO, H.; 6-deoxylludin M, a new antitumor antibiotic: fermentation, isolation and structural identificacion. **The Journal Antibiotics**, v. XL, n. 11, p. 1643-1646, 1987.

KASETTRATHAT, C.; NGAMROJANAVANICH, N.; WIYAKRUTTA, S.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTAKOOP, P.; Cytotoxic and antiplasmodial substances from marine-derived fungi. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2621-2626, 2008.

MIZUNO, T.; OHSAWA, K.; HAGIWARA, N.; KUBOYAMA, R. Fractionation of antitumor polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 50, p. 1679-1688, 1986.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 2889-2896, 1990.

MOURA, C.; MUSZINSKI, P.; SCHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO, L. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. **Vetor**, v. 16, n. 1/2, p. 37-45, 2006.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eight Edition**. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

RAJARATHNAM, S.; BANO, Z.; *Pleurotus mushrooms*. Part 1 A: Morphology, Life cycle, Taxonomy, Breeding and Cultivation. **Critical Reviews in Food Science**, v. 26, p. 157-223, 1987.

RAJARATHNAM, S.; BANO, Z.; *Pleurotus mushrooms*. Part III. Biotransformations of natural lignocellulosic wastes: commercial applications and implications. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 28, m. 1, p. 31-113, 1989.

RAMPINELLI, J. R.; GERN, R. M. M.; FURLAN, S. A.; WISBECK, E.; **Avaliação da atividade antimicrobiana do caldo de cultivo e de extratos obtidos do micélio de *Pleurotus ostreatus* DSM 1883**. Editora Univille, Joinville, 2006.

ROBBINS, W. J.; KAVANAGH, F.; HERVEY, A.; Antibiotic substances from basidiomycetes I. *Pleurotus griseus*. In: ROBBINS, W. J.; KAVANAGH, F.; HERVEY, A., (ed). **Botany. National Academic of Science**, p. 171-176, 1947.

WISBECK, E.; ROBERT, A. P.; FURLAN, S. A.; Avaliação da produção de agentes antimicrobianos pro fungos do gênero *Pleurotus*. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 3, n. 2, p. 7-10, 2002.

ZHANG, J.; WANG, G.; LI, H.; ZHUANG, C.; MIZUNO, T.; ITO, H.; SUZUKI, C.; OKAMOTO, H.; LI, J.; Antitumor polysaccharides from a Chinese mushroom, “Yuhuangmo”, the fruiting body of *Pleurotus citrinopileatus*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, p. 1195-1201, 1994.

Recebido: 10/04/2016

Aceito: 20/01/2017