

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Auricularia auricula* EM BACTÉRIAS OPORTUNISTAS

ELIZABETH MOREIRA RODRIGUES¹; LUÍZE GARCIA DE MELO²; EDUARDO BERNARDI³; LISIANE MARTINS VOLÇÃO⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – b3th.mr@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – luizegarmel@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – edu.bernardi@hotmail.com

⁴Universidade Federal do Rio Grande – lisivolcao@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Estima-se hoje que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, e desse número são conhecidas pelos micologistas somente cerca de 69.000 espécies (SILVA & COELHO, 2006). Dentre as espécies conhecidas, 12.000 são consideradas cogumelos, destas pelo menos 2.000 são comestíveis. Aproximadamente 35 espécies são cultivadas comercialmente e 20 são cultivadas em escala industrial. O cogumelo mais cultivado no mundo é o *Agaricus bisporus* (champignon), seguido do *Lentinus edodes* (shiitake), *Pleurotus* sp. (cogumelo ostra), *Auricularia auricula* (cogumelo orelha de pau) e *Volvariella volvacea* (cogumelo palha) (SILVA, 2011). Os cogumelos possuem vários compostos biologicamente ativos como polissacarídeos, glicoproteínas e propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Por isso, além de serem apreciados por suas características sensoriais, os cogumelos também são usados como fontes medicinais (SILVA, 2011).

Bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Burkholderia cepacia* são um problema de saúde pública, principalmente em pacientes hospitalizados, que normalmente estão imunocomprometidos, apresentando comorbidades e capacidade limitada para combater uma possível infecção (Huwaitat et al. 2016). *Acinetobacter baumannii* é uma bactéria gram-negativa, com distribuição cosmopolita no solo e frequentemente isolada em humanos, apresenta elevada patogenicidade, com estirpes resistentes à maioria dos antibióticos. Pode causar infecções oportunistas, afetando mais frequentemente as vias respiratórias e infecções do trato urinário (ITU), podendo ainda, causar pneumonias severas e ITU de difícil controle (Labarca et al. 2016).

Em países desenvolvidos e em desenvolvimento, 55% dos isolados de *A. baumannii* são resistentes aos carbapenemas e para tratamento, tem se recorrido a antimicrobianos como fosfomicina e polimixina B, o que também tem favorecido o aparecimento de isolados resistentes (Labarca et al. 2016; Menegucci et al. 2016). No Brasil já foi reportada a presença da metalo-beta-lactamase SPM-1 em *A. baumannii* (Jácome et al. 2016). Essa mesma espécie é capaz de lançar vesículas contendo DNA, e nessas vesículas já foram encontrados plasmídeos contendo genes para carbapenemases (Amábile-Cuevas, 2012).

A espécie bacteriana gram-negativa, *Burkholderia cepacia*, é também encontrada no solo e água, pode provocar infecções no sistema respiratório, conhecidas como Síndrome cepacia, causando fibrose cística. Apresenta baixa virulência e por isso seu aparecimento ocorre em pacientes que já estão hospitalizados (HORSLEY, 2012). As espécies do complexo *B. cepacia* são intrinsicamente resistentes a uma variedade de antimicrobianos; entre eles,

destacam-se as polimixinas, os aminoglicosídeos e a maioria dos beta-lactâmicos. Além disso, as bactérias deste gênero possuem habilidade de desenvolver resistência a outras classes de antibióticos durante o tratamento (CORREA FEHLBERG, 2013).

O estudo teve como objetivo avaliar a atividade inibitória e bactericida do extrato aquoso e etanólico de *Auricularia auricula* em bactérias causadoras de infecções oportunistas.

2. METODOLOGIA

Para o estudo, foram coletadas amostras do cogumelo *A. auricula* na região Sul do Estado do Rio do Sul, no segundo trimestre de 2016. A região localiza-se no Campus Capão do Leão da Universidade Federal de Pelotas – UFPel/RS, mais especificamente no Horto Botânico Irmão Teodoro Luis (31°81'41"S, 52°43'20"O), local pertencente ao bioma pampa, rodeado por áreas úmidas, de pastagens e floresta Semidecidual (WOLF et al., 2008).

Após o período de secagem dos corpos de frutificação, o material foi triturado e mantido em recipiente hermeticamente fechado até a produção dos extratos. Para a produção do extrato aquoso, o pó do cogumelo foi diluído em água miliQ, na concentração de 100mg/mL. Para o extrato etanólico, o material triturado foi adicionado a etanol 95% em uma concentração de 250mg/mL. Ambas as soluções foram incubadas em ultrassom a uma temperatura de 40°C por 120 minutos. Após este período, o extrato foi filtrado em papel filtro Whatman® nº 1, sendo armazenadas à 4°C sob ausência de luz. Logo, os extratos foram submetidos ao processo de liofilização, para determinação de concentrações exatas para os testes de atividade antimicrobiana.

Para a avaliação da atividade antibacteriana dos extratos aquosos e etanólicos, foram utilizadas cepas padrão de *Acinetobacter baumannii* e *Burkholderia cepacia*, com determinação da concentração mínima inibitória o extrato capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos (CMI) através do Teste de Microdiluição em Caldo (CLSI M07-A9, 2012). Foram utilizadas placas de microtitulação com meio de cultura Muller Hinton e concentrações seriadas de 2500µg/mL até 312µg/mL, assim como controle positivo para crescimento bacteriano, controles de esterilidade do meio de cultivo e dos extratos. Após os resultados de CIM, a atividade bactericida dos extratos foi determinada de acordo com metodologia descrita em SALINAS et al. (2006). Para ambos os ensaios, a leitura foi realizada utilizando resazurina a 0,02%, conforme o *Resazurin Microtiter Assay* (REMA) (PALOMINO et al., 2002). Todos os testes foram realizados em três réplicas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que o extrato etanólico avaliado na atividade bacteriostática em *A. baumannii* apresentou uma melhor atividade antibacteriana em relação ao extrato aquoso, enquanto que em *Burkholderia cepacia* ambos os extratos obtiveram CIM menor do que a utilizada no estudo. Em relação a atividade bactericida, não foi possível estabelecer concentrações, exceto para *A. baumannii* quando exposta ao extrato etanólico (CBM = 2500 µg/ml) (tabela 1).

Tabela 1- Atividade antibacteriana dos extratos aquoso e etanólico de *Auricularia auricula* contra *Acinetobacter baumannii* e *Burkholderia cepacia*.

Extrato	<i>Acinetobacter baumannii</i>		<i>Burkholderia cepacia</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM
Aquoso	625 µg/ml	> 2500 µg/ml	≤ 312 µg/ml	> 2500 µg/ml
Etanólico	≤ 312 µg/ml	2500 µg/ml	≤ 312 µg/ml	> 2500 µg/ml

Legenda: CIM= Concentração Inibitória Mínima; CBM= Concentração Bactericida Mínima.

Em um estudo com extratos de basidiocarpos foi possível analisar atividade antimicrobiana a uma concentração de 500 µg/disco, onde *Auricularia auricula* inibiu *Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris* e *Pseudomonas aeruginosa* (GIRI et al, 2012).

Muitos antibióticos empregados clinicamente são ativos a uma concentração de 10 µg/mL. Se uma substância pura não é ativa a 100 µg/mL, ela poderá não ser clinicamente útil. Extratos vegetais que são ativos a 100 µg/mL possuem uma boa potência, de modo que a sua determinação dos componentes ativos é recomendada (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988). O resultado encontrado do extrato etanólico de *A. baumannii* teve uma atividade inibitória menor que a concentração utilizada no estudo. Dessa forma, se forem utilizadas concentrações menores, há a possibilidade de este extrato apresentar resultados promissores.

4. CONCLUSÕES

O extrato aquoso obteve uma atividade antibacteriana de 625µg/ml frente a bactéria *Acinetobacter baumannii* e de ≤ 312 µg/ml frente a bactéria *Burkholderia cepacia*. Entretanto não foi possível verificar atividade bactericida em *A. baumannii* utilizando extrato etanólico de *Auricularia auricula*. Enquanto que os extratos aquoso e etanólico apresentaram atividade bactericida de > 2500 µg/ml em ambas as bactérias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M7-A9, 2012.
- CORREA FEHLBERG, L. C.; SALES ANDRADE, L. H.; ASSIS, D. M.; VICENTE PEREIRA, R. H.; GALES, A. C.; MARQUES, E. A. Performance of MALDI-ToF MS for species identification of *Burkholderia cepacia* complex clinical isolates. **DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE**, v. 77, n. 2, p. 126-128, OCT 2013. Citações Web of Science: 15.
- GIRI, S.; BISWAS, Gunjan; RADHAN, Prakash P.; MANDAL, Subhash C.; ACHARYA, Krishnendu. Antimicrobial Activities Of Basidiocarps Of Wild Edible Mushrooms Of West Bengal, India. **International Journal of PharmTech Research**. CODEN (USA): IJPRIF ISSN: 0974-4304 Vol.4, No.4, pp 1554-1560, Oct-Dec 2012
- JÁCOME, P. R. L. A.; ALVES, L. R.; JÁCOME-JÚNIOR, A.T. et al. Detection of bla SPM-1, bla KPC, bla TEM and bla CTX-M genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. **J Med Microbiol**. 2016; 65: 658-665.
- HORSLEY, Alex; JONES, Andrew M. Antibiotic treatment for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2012, Issue 10. Art. No.: CD009529. DOI: 10.1002/14651858.CD009529.pub2.
- HUWAITAT, R.; MCCLOSKEY, A.P.; GILMORE, B.F.; LAVERTY, G. Potential strategies for the eradication of multi-drug resistant Gram-negative bacterial infections. **Future Microbiol**. 2016; 10.2217/fmb-2016-0035.
- LABARCA, J.A.; SALLES, M.J.C.; SEAS, C. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. **Crit Rev Microbiol**. 2016; 42(2):276-92.
- MENEGUCCI, T.C.; ALBIERO, J; MIGLIORINI L.B. et al. Strategies for the treatment of polymyxin B-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **Int J Antimicrob Agents**. 2016; 47(5):380-5.
- PALOMINO, J-C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.
- RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening Methods for Natural Products With Antimicrobial Activity: A Review of the Literature. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 23, n. 2-3, p. 127-149, 1988.
- Salinas, G. M. M.; Montes, P. B.; Fernandez, S. S. **Caracterización de la actividad anti-TB como bactericida o bacteriostática - Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)**. In.: Manual de Técnicas de Bioevaluación de Nuevos Agentes Anti-teberculosis. CYTED, Spain - 2006. 221p.
- SILVA, A. C.; JORGE, N. Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.13, n.Esp, p.375-384, 2011.
- SILVA, R. R. da; COELHO, G. D. **Fungos Principais Grupos e Aplicações Biotecnológicas**. Instituto de Botânico, São Paulo, out. 2006. Acessado em 03 de Out. 2017. Online. Disponível em: http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos_Ricardo_Silva_e_Glaciene_Coelho.pdf