

ATIVIDADES ANTIFÚNGICA E ANTIENZIMÁTICA DE EXTRATOS DE COGUMELOS FILTRADOS DE *Lentinula edodes*, *Pleurotus pulmonarius* E *Pleurotus sajor-caju* CONTRA *Candida albicans*

MORGANA LÜDTKE AZEVEDO¹; PATRÍCIA DA SILVA NASCENTE²; RAFAEL GUERRA LUND^{1,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, CCQFA, UFPel - morganaludtke@gmail.com

² Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Microbiologia, UFPel

³ Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, UFPel – rafael.lund@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A procura por compostos biológicos naturais capazes de contribuir para o tratamento de infecções encontra-se em constante avanço. O motivo é o aumento do número de casos de resistência antimicrobiana desencadeada pelo uso descontrolado de agentes antimicrobianos, o que gera custos médicos elevados devido à hospitalização prolongada, além do aumento da mortalidade. Já é relatado na literatura casos de resistência de *Candida spp.* frente a alguns antifúngicos (WHALEY et al., 2017). Na sua patogenia, essas leveduras utilizam diversos mecanismos de patogenicidade para colonizar as células epiteliais, multiplicar-se, causar a doença e manifestar-se clinicamente na forma de candidíase oral. E dentre esses mecanismos ou fatores de virulência, destaca-se a produção de enzimas extracelulares, como as proteinases e fosfolipases (BACH et al., 2017).

Cogumelos medicinais, especialmente os pertencentes a basidiomicetos superiores, como carvalho (*Lentinula edodes*) e cogumelos ostra (espécies de *Pleurotus*), destacam-se como importantes reservatórios de compostos bioativos com múltiplas propriedades terapêuticas (AL-BAHRANI et al., 2017).

Diante do exposto, percebe-se o quanto necessária é a investigação das propriedades farmacológicas de produtos naturais, incluindo os cogumelos disponíveis nos biomas brasileiros, para possível uso como terapia complementar aos medicamentos alopáticos. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antifúngica e a inibição da produção de exoenzimas (proteinase e fosfolipase) por *Candida spp* após exposição aos extratos aquosos de *Lentinula edodes* (SHI), *Pleurotus pulmonarius* (PUL) e *Pleurotus sajor-caju* (PSC).

2. METODOLOGIA

2.1 Condições de cultura dos cogumelos e preparo dos extratos filtrados

Os cogumelos foram cultivados no Laboratório de Micologia (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, IB, UFPel). Após serem coletados para extração, os basidiomicetos foram lavados e então levados à estufa, onde permaneceram por 15 dias a 35 °C para desidratação dos basidiomas para posterior extração.

Após secos, os cogumelos foram moídos por um minuto (50 g de cogumelos / 1 L de água destilada). A mistura resultante foi refrigerada a 4 °C por 24 h, filtrada e centrifugada a 5000 g a 4 °C por 1 h. O sobrenadante foi filtrado com papel filtro Whatman nº 1 e membranas de acetato de celulose de 0.45 e 0.25 micrômetros em condições assépticas. Após filtrados, os extratos aquosos foram

testados nas microdiluições 1:1, 1:2 e 1:4 em meio Sabouraud Desxtrose Agar (SDA).

2.2 Exposição das amostras de *Candida* aos extratos filtrados

Foram coletadas, com swabs estéreis, amostras de *Candida* spp. do palato de indivíduos com estomatite protética para avaliar a atividade antimicrobiana e de inibição da produção extracelular das enzimas fosfolipase e proteinase pelos extratos aquosos *Lentinula edodes* (SHI), *Pleurotus pulmonarius* (PUL) e *Pleurotus sajor-caju* (PSC). As 81 amostras foram coletadas e semeadas em meio SDA com 0.2 mg / mL de cloranfenicol e incubadas a 37 °C por 48 h.

Após o isolamento das leveduras, a identificação foi realizada através da seguinte sequência: análise macromorfológica das colônias e análise micromorfológica após fixação das colônias e coloração de Gram, em microscópio de lux (100x). Após, foi realizado um teste microcultivo em ágar de fubá, que também permite o estudo micromorfológico, através da visualização de cladioconídeos, hifas e pseudohifas. Por último, foi concuída a identificação presuntiva das amostras de *Candida* spp. por meio de crescimento em CHROMagar *Candida* (PROBAC DO BRASIL Produtos bacteriológicos Ltda., São Paulo, Brasil).

Adaptando à metodologia M27 A3 do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), os extratos aquosos das espécies de cogumelos foram previamente testados puros e diluídos (50%) através da técnica de microdiluição em caldo, onde foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) desses extratos. O antifugígrafo foi realizado com os extratos nas diluições 1:2 e 1:4 contra *C. sake*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. globosa*. Para esse teste, foram utilizadas apenas 11 amostras representativas das diferentes espécies de levedura coletadas do ambiente bucal.

2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana e de inibição da produção de exoenzimas por *Candida* spp.

A atividade antimicrobiana foi determinada pela suscetibilidade dos isolados aos três extratos aquosos, expressa pela concentração inibitória mínima (CIM) definida como a menor concentração capaz de inibir em 50% o crescimento fúngico, através do teste de microdiluição em caldo adaptado da metodologia M27 A2 do CLSI. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços de fundo chato, e as diluições seriadas dos extratos aquosos foram preparadas em intervalos de 0,0625-32 e 0,125-64.

Para avaliar a atividade de ambas enzimas (fosfolipase e proteinase) em meio ágar, as amostras de *C. albicans* foram testadas em triplicata. O meio utilizado para o ensaio da proteinase foi o SDA contendo 57.3 g de cloreto de cálcio e 100 mL de gema de ovo enriquecida e estéril por litro de água destilada. O meio utilizado para o ensaio da fosfolipase foi o Ágar BSA (albumina sérica bovina), contendo 5 g de BSA, 1.45 g de YNB (base de nitrogênio de levedura), 20 g de glicose e 20 g de Ágar-Ágar por litro de água destilada.

Todas as amostras de leveduras foram cultivadas em SDA 4% por 24 h. Em seguida, foram diluídas em água destilada e ajustadas à turbidez correspondente a da escala 0.5 de McFarland. 20 µL da suspensão de cada amostra de levedura foram aplicados nos meios ágar para os ensaios. As placas foram incubadas a 37 °C por 72h. A atividade enzimática foi determinada pela formação de um halo ao redor da colônia de leveduras (Zp), que é mensurado e calculado pela razão do diâmetro da colônia pelo diâmetro da colônia + zona de precipitação, de acordo com o método descrito por Price et al. (1982). Logo, os valores obtidos

determinaram o grau de atividade enzimática de *C. albicans* após exposição às diferentes diluições dos extratos das espécies testadas, conforme segue: alta atividade (valores inferiores a 0.63), baixa atividade (valores entre 0.99 a 0.64) e nenhuma atividade (valores iguais a 1.00)

2.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados por meio do teste t de Student e ANOVA, utilizando, para ambos, o software estatístico SigmaStat 3.5 e um valor de $p < 0,05$ para interpretar as diferenças estatísticas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a leitura dos resultados, foi observado que houve atividade antimicrobiana referente à cepa *C. parapsilosis*, já que esta mostrou-se sensível aos extratos de SHI na diluição 1:2, e para PUL, PSC e SHI na diluição 1:4. Assim como a cepa *C. globosa*, que foi sensível ao SHI nas diluições 1:2 e 1:4 e ao PUL na diluição 1:2. Outro espécime de *C. globosa* foi sensível apenas ao PSC na diluição 1:2. Já *C. sake* e *C. albicans* não mostraram sensibilidade a nenhum dos três extratos em qualquer diluição.

De um total de 81 cepas isoladas das coletas microbiológicas, a maioria foi identificada como *C. albicans* ($n=70$). Todas as amostras de *C. albicans* apresentaram altos níveis de produção de proteinase, com valores de Zp entre 0.167 e 0.581. Enquanto isso, a produção de fosfolipase foi observada em 55 cepas de *C. albicans*, com valores de Zp entre 0.422 e 0.905. As 11 cepas não-albicans também mostraram altos níveis de produção de proteinase, com valores de Zp entre 0.271 e 0.391. A produção de fosfolipase foi observada em apenas 4 cepas não-albicans (2 *parapsilosis*, 1 *lipolytica* e 1 *tropicalis*). Os valores médios de produção de fosfolipase e proteinase, de acordo com as espécies, são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores médios de produção de proteinase e fosfolipase (Zp) (média±DP).

Espécies	Produção de proteinase (Zp) (média±DP)	Produção de fosfolipase (Zp) (média±DP)
<i>C. albicans</i> ($n=70$)	0,327±0,083	0,663±0,118
<i>C. parapsilosis</i> ($n=5$)	0,272±0,037	0,756±0,036
<i>C. lipolytica</i> ($n=2$)	0,325±0,065	0,743±0,050
<i>C. guilliermondii</i> ($n=2$)	0,331±0,039	-
<i>C. glabrata</i> ($n=1$)	0,342±0,016	-
<i>C. tropicalis</i> ($n=1$)	0,246±0,025	0,663±0,015

A busca por antimicrobianos naturais vem crescendo significativamente. Um estudo demonstrou a sensibilidade de espécies *Bacillus subtilis* quando expostas ao meio de fermentação do micélio de *P. ostreatus* (AL-BAHRANI et al., 2017). Ainda, um outro estudo realizado na Nigéria mostrou que as leveduras *C. albicans* e *C. neoformans* foram sensíveis aos extratos dos cogumelos *L. subnidus* e *Lenzites* sp. mesmo quando expostas às concentrações mais baixas

(MUSZYŃSKA et al., 2017). A ação antimicrobiana é devida à produção, por algumas espécies de cogumelos, de alguns antibioticos, como a pleurotina (BACH et al., 2017).

Ainda que atividade antimicrobiana evidenciada nos resultados demonstrados, mostra-se promissora no combate à resistência a antibióticos, podem haver limitações devem ser evidenciadas: baixa disponibilidade e alto custo dos cogumelos em decorrência de sua baixa produção. Por isso, a aplicação desses compostos no combate às infecções, requer, ainda, maiores estudos envolvendo a identificação, caracterização, seleção, síntese de tais compostos, bem como seu mecanismo de ação, para que sejam utilizados em aplicação clínica.

4. CONCLUSÕES

Com base nas metodologias empregadas, conclui-se que os extratos aquosos dos cogumelos testados apresentaram atividade antimicrobiana apenas frente às cepas de *Candida* não-albicans, com exceção de *C. sake* (não-albicans). Além disso, a breve exposição das amostras de *Candida* spp. aos extratos não foi capaz de inibir a produção de proteinases pelas leveduras. No entanto, observa-se a inibição da produção de fosfolipase em algumas espécies de *Candida* não-albicans.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-BAHRANI, R., RAMAN, J., LAKSHMANAN, H., HASSAN, A. A., SABARATNAM, V. Green synthesis of silver nanoparticles using tree oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* and its inhibitory activity against pathogenic bacteria. **Materials Letters**, Iraque, v. 186, n. 1, p. 21-25, 2017.

BACH, F., HELM, C. V., BELLETTINI, M. B., MACIEL, G. M., HAMINIUK, C. W. I. Edible mushrooms: a potential source of essential amino acids, glucans and minerals. **International Journal of Food Science & Technology**, Brasil, v. 52, n. 11, p.2382-2392, 2017.

DELAVY, M., CERUTTI, L., CROXATTO, A., PROD'HOM, G., SANGLARD, D., GREUB, G., COSTE, A. T. Machine learning approach for candida albicans fluconazole resistance detection using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Frontiers in Microbiology**, Suíça, v. 10, n. 1, p. 3000, 2020.

DODDS, D. R. Antibiotic resistance: A current epilogue. **Biochemical pharmacology**, EUA, v. 134, n. 1, p. 139-146, 2017.

PRICE, M. F., WILKINSON, I. D., GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, EUA, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.

WHALEY, S. G., BERKOW, E. L., RYBAK, J. M., NISHIMOTO, A. T., BARKER, K. S., ROGERS, P. D. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* species. **Frontiers in microbiology**, EUA v. 7, n. 1, 2p. 173, 2017.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antibacterial agents in preclinical development: an open access database. **World Health Organization**, Suíça, v. 1, n.1, p. 10-12, 2019.