

BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS DE MACROFUNGOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A *PAENIBACILLUS LARVAE*, BACTÉRIA CAUSADORA DA CRIA PÚTRIDA AMERICANA (CPA)

LUÍZE GARCIA DE MELO¹; GABRIEL CHAVIEL LHULLIER²; CLEITON JESUS ANDRADE PEREIRA²; MATHEUS PEREIRA DE ALBUQUERQUE²; JANICE LUEHRING GIONGO²; RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER³

¹Universidade Federal de Pelotas – luizegarmel@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - gabriellhullier@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - andradec556@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – matheuslbuquerque813@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – janicegiongo@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – rodvaucher@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Cria Pútrida Americana (CPA) é uma doença altamente contagiosa e letal em larvas de *Apis mellifera*, causada pela bactéria *Paenibacillus larvae*, resultando em prejuízos significativos na produção de mel (ÅGREN; SCHÄFER; FORSGREN, 2017; BEIMS et al., 2020; PAPIĆ; DIRICKS; KUŠAR, 2021; ZEID et al., 2022; OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2009). Os métodos convencionais de controle incluem a incineração de colônias doentes e o tratamento com antibióticos, mas ambos têm limitações, como a resistência antibiótica e a persistência de esporos bacterianos no ambiente da colmeia (KOCHANSKY et al., 2001; LINDSTRÖM; KORPELA; FRIES, 2008; STEPHAN et al., 2019). Como alternativa, compostos biológicos ativos extraídos de produtos naturais, incluindo extratos de macrofungos, não apenas demonstraram eficácia antimicrobiana (KOKOSKA et al., 2019), mas também oferecem uma nova abordagem à prevenção e tratamento da CPA, possuindo uma série de propriedades terapêuticas (GEBREYOHANNES et al., 2019; GLAVINIC et al., 2021; STAMETS et al., 2018; VOLCÃO et al., 2021a).

O presente estudo teve como objetivo avaliar pela primeira vez a atividade antimicrobiana de extratos de diferentes espécies de macrofungos contra *P. larvae*. Além disso, também busca realizar uma triagem inicial sobre cepas bacterianas de importância médica. Esses extratos são ricos em diversos compostos bioativos com propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias, sugerindo seu potencial promissor como alternativa aos métodos convencionais de controle da CPA.

2. METODOLOGIA

A bioprospecção dos macrofungos abrangeu a realização da coleta *in situ*, onde realizou-se um caminhamento perimétrico - percorreu-se o perímetro da área de interesse, efetuando as coletas. As áreas vegetativas dos municípios de Capão do Leão e Pelotas eram caracterizadas por bosque de coníferas e árvores de pequeno porte, com predominância de espécies de *Pinus* spp. Já no Horto Botânico Irmão Teodoro Luís a área é descrita por tipos fisionômicos de vegetação de restinga, como mata arenosa e turfosa (PRADO, 2018).

Após a coleta, foi realizada a identificação morfológica macroscópica com auxílio de guias de identificação e subsequente limpeza e armazenamento em envelopes para desidratação em estufa a temperatura de 45°C por até 96 horas

(VOLCÃO et al., 2021a). Posteriormente, o armazenamento em recipientes hermeticamente fechados, protegidos da luz e umidade até a produção dos extratos. Para realização dos extratos, os macrofungos foram triturados até as menores partículas possíveis, com lâminas ou moinho de bolas a depender da espécie. Foram realizadas duas formas de extração, banho de ultrassom (SB-5200 DTDN Ultrasonic Cleaner) a 40°C por 120 minutos ou maceração dinâmica com aquecimento (40°C) por 120 minutos e subsequente filtração à vácuo (Papel filtro - Whatman ® nº1) (ROESLER et al., 2007; SIMÕES et al., 2007). Os solventes utilizados foram água destilada esterilizada, hidroalcoólico 50% e clorofórmio, na proporção de 1:10 (10%). Por fim, os extratos foram liofilizados ou rotaevaporados e depois armazenados em geladeira até os ensaios *in vitro*.

Nos ensaios de disco difusão foram utilizados os extratos aquosos (AQ) de *Russula xerampelina*, *Gymnopilus junonius*, *Pycnoporus sanguineus*, *Ganoderma* sp. 1 e *Xylaria polymorpha*, também extratos de Clorofórmio (CHCL) de *Ganoderma* sp. 1 e *G. aplanatum* e Hidroalcoólico (HAL) para *P. sanguineus*. O método de disco difusão seguiu os protocolos de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocolo M2-A11 (2012). Os isolados utilizados pertenciam à Bacterioteca do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos (LaPeBBioM/UFPEL). Foram utilizadas as seguintes cepas de bactérias: *S. pneumoniae* (isolado clínico), *E. coli* (ATCC 35218), *S. agalactiae* (isolado clínico), *S. aureus* (ATCC 29213), *S. epidermidis* (14990), *C. albicans* (ATCC 14053), *K. pneumoniae* (ATCC 700603) e *P. larvae* (ATCC 9545) e como controle foi utilizado o composto Oxitetraciclina, de nome comercial Tormicina. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados expressos em mm pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formados ao redor dos discos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir encontram-se os resultados dos dados brutos da atividade antimicrobiana dos extratos nas Tabelas 1 e 2 para as cepas bacterianas e fúngicas testadas. Os resultados mostram que os extratos possuem atividade antimicrobiana. Porém, os halos inibitórios dos extratos para *P. larvae* em comparação ao controle Oxitetraciclina mostraram ser inferiores ao mesmo. Os outros extratos de *R. xerampelina* AQ, *G. junonius* AQ, *P. sanguineus* AQ e *P. sanguineus* HAL não apresentaram halos na concentração testada de 100 mg/mL para *P. larvae*. A atividade antimicrobiana ainda precisa ser melhor investigada através de mais testes *in vitro*. Até o momento o extrato *G. aplanatum* CHCL apresentou melhor atividade anti-*P. larvae* na concentração de 200 mg/mL. Já na Tabela 2, o extrato hidroalcoólico de *P. sanguineus* apresentou o maior halo inibitório para *S. agalactiae*, assim como os extratos *P. sanguineus* AQ e *G. junonius* AQ tiveram atividade para um espectro maior de bactérias.

Em comparação a atividade antimicrobiana de estudos anteriores, Gebreyohannes et al., (2019) relataram a ação antimicrobiana de extratos (clorofórmio, etanol 70% e água quente) de *Trametes* spp. e *Microporus* spp. frente à *S. aureus* metilicina resistentes, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Em outro estudo, os extratos aquosos de *Auricularia auricula*, *Lactarius deliciosus* e *Laccaria laccata* tiveram ação antimicrobiana *in vitro* sobre *Acinetobacter baumannii*, sem apresentar citotoxicidade em macrófagos e fibroblastos de linhagem VERO (VOLCÃO et al., 2021a). Posteriormente, Volcão et al., (2021b) demonstraram que os extratos alcoólicos de *R. xerampelina* e *S. granulatus* também apresentavam ação inibitória sobre cepa de *P. aeruginosa*.

A composição química dos extratos de macrofungos e o conteúdo de substâncias bioativas podem ser influenciados por vários fatores, incluindo o tipo de solvente, a temperatura utilizada para extração (ELBATRAWY et al., 2015), a quantidade de macrofungos, estruturas do basidiocarpo como o píleo e estipe (CHEN et al., 2010), maturidade do cogumelo (BARROS; BAPTISTA; FERREIRA, 2007) e localização geográfica do espécime de cogumelo coletado (BÁRBARA RIBEIRO et al., 2006). Estes fatores podem determinar diretamente a classe de metabólitos secundários que serão extraídos, e consequentemente a ação antimicrobiana do composto desejado. Além disso, os extratos podem apresentar uma atividade antimicrobiana mais ampla devido ao sinergismo dos constituintes majoritários e metabólitos secundários que compõem os macrofungos e que podem ser extraídos a partir de solventes orgânicos.

Tabela 1. Diâmetro de inibição (halo) da atividade antimicrobiana dos extratos contra a cepa *P. larvae* (ATCC 9545) na concentração de 200mg/mL.

Extratos	<i>X.hypoxylon</i> AQ	<i>G. aplanatum</i> CHCL	<i>Ganoderma</i> sp. 1 CHCL	<i>Ganoderma</i> sp. 1 AQ	Oxitetraciclina
Halo inibitório	mm	mm	mm	mm	mm
<i>P. larvae</i> (9545)	11.00 ± 1	16.00 ± 1	10.00 ± 1	7.00 ± 1	30.00

Tabela 2. Diâmetro de inibição (halo) da atividade antimicrobiana dos extratos contra as cepas bacterianas *S. pneumonie*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. agalactie*, *S. aureus* e contra a cepa fúngica *C. albicans* na concentração de 100mg/mL.

Cepas	<i>S.</i> <i>pneumonie</i>	<i>E. coli</i>	<i>S.</i> <i>agalactie</i>	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>S.</i> <i>epidermidis</i>	<i>C.</i> <i>albicans</i>	<i>K. pneumonie</i>
Halo inibitório de extratos	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm
<i>R. xerampelina</i> AQ	-	-	-	-	10.00 ± 1	6.00 ± 1	10.00 ± 1
<i>G. junonius</i> AQ	10.00 ± 1	-	-	7.00 ± 1	8.00 ± 1	-	7.00 ± 1
<i>P. sanguineus</i> AQ	8.00 ± 1	7.00 ± 1	10.00 ± 1	7.00 ± 1	-	-	-
<i>P. sanguineus</i> HAL	-	-	13.00 ± 1	-	-	-	-

(-) não apresentou halo inibitório ou não foi testado.

4. CONCLUSÕES

O presente trabalho é pioneiro ao investigar a atividade antimicrobiana de extratos de macrofungos para o agente causador da CPA em *A. mellifera*, *P. larvae*. Até o momento foram constatados a partir dos dados moderada atividade antimicrobiana nas cepas testadas. Os estudos para atividade antimicrobiana são preliminares, necessitando da continuidade de investigações *in vitro*, que serão realizadas, como a concentração inibitória mínima, testes de citotoxicidade, caracterização dos extratos e teste *in vivo* para avaliar a toxicidade dos extratos sobre *A. mellifera*.

REFERÊNCIAS

- ÅGREN, J.; SCHÄFER, M. O.; FORSGREN, E. Using whole genome sequencing to study American foulbrood epidemiology in honeybees. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187924, 15 nov. 2017.
- BÁRBARA RIBEIRO, † et al. **Contents of Carboxylic Acids and Two Phenolics and Antioxidant Activity of Dried Portuguese Wild Edible Mushrooms**. research-article. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf061890q>>. Acesso em: 4 abr. 2022.
- BARROS, L.; BAPTISTA, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1731–1737, 1 set. 2007.
- BEIMS, H. et al. Discovery of *Paenibacillus* larvae ERIC V: Phenotypic and genomic comparison to genotypes ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American Foulbrood. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 310, n. 2, p. 151394, 1 fev. 2020.
- CHEN, X.-H. et al. Chemical Composition and Antioxidant Activities of *Russula griseocarnosa* sp. nov. **ACS Publications**, v. 58, n. 11, p. 6966–6971, 29 abr. 2010.
- ELBATRAWY, E. N. et al. Medicinal Mushroom Extracts Possess Differential Antioxidant Activity and Cytotoxicity to Cancer Cells. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 17, n. 5, 2015.
- GEBREYOHANNES, G. et al. Determination of Antimicrobial Activity of Extracts of Indigenous Wild Mushrooms against Pathogenic Organisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, p. e6212673, 18 fev. 2019.
- GLAVINIC, U. et al. Potential of Fumagillin and *Agaricus blazei* Mushroom Extract to Reduce *Nosema ceranae* in Honey Bees. **Insects**, v. 12, n. 4, p. 282, 25 mar. 2021.
- KOCHANSKY, J. et al. Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and -resistant *Paenibacillus* larvae. **Apidologie**, v. 32, n. 3, p. 215–222, 2001.
- KOKOSKA, L. et al. Plant-Derived Products as Antibacterial and Antifungal Agents in Human Health Care. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 29, p. 5501–5541, 2019.
- LINDSTRÖM, A.; KORPELA, S.; FRIES, I. Horizontal transmission of *Paenibacillus* larvae spores between honey bee (*Apis mellifera*) colonies through robbing. **Apidologie**, v. 39, n. 5, p. 515–522, 2008.
- Office International des Epizooties (OIE) (2009) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Newcastle Disease. OIE Standard Commission Publication, Office International Epizooties, 2009 Version, Part 2, Section 2.1, Chapter 2.3.14, 576-589.
- PAPIĆ, B.; DIRICKS, M.; KUŠAR, D. Analysis of the Global Population Structure of *Paenibacillus* larvae and Outbreak Investigation of American Foulbrood Using a Stable wgMLST Scheme. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 2021.
- ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Food Science and Technology**, v. 27, p. 53–60, mar. 2007.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia Da Planta Ao Medicamento**. 6. ed. [s.l.] UFSC e UFRGS, 2007.
- STAMETS, P. E. et al. Extracts of Polypore Mushroom Mycelia Reduce Viruses in Honey Bees. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 13936, 4 out. 2018.
- STEPHAN, J. G. et al. Honeybee-Specific Lactic Acid Bacterium Supplements Have No Effect on American Foulbrood-Infected Honeybee Colonies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 13, p. e00606-19, 17 jun. 2019.
- VOLCÃO, L. M. et al. Biological activity of aqueous extracts of Southern Brazilian mushrooms. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 31, n. 2, p. 148–159, 17 fev. 2021a. VOLCÃO, L. M. et al. Bioactive extracts of *Russula xerampelina* and *Suillus granulatus* in the in vitro control of *Pseudomonas aeruginosa* phytopathogenic. **South African Journal of Botany**, v. 140, p. 218–225, ago. 2021b.
- ZEID, A. A. A. et al. Detection Bioactive Metabolites of *Fructobacillus fructosus* Strain HI-1 Isolated from Honey Bee's Digestive Tract Against *Paenibacillus* larvae. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 14, n. 3, p. 476–485, jun. 2022.