

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Laboratório de Fisiologia dos Micro-organismos

Potencial antibacteriano de cogumelos das espécies *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus* e *Agaricus blazei* com enfoque no *Helicobacter pylori*



VICTOR ARTEMIO ALMEIDA DE LUCENA

Araraquara - SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Laboratório de Fisiologia dos Micro-organismos

“Potencial antibacteriano de cogumelos das espécies *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus* e *Agaricus blazei* com enfoque no *Helicobacter pylori*”.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista para a obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Victor Artemio Almeida de Lucena
Graduando

Dra. Kamila Maria Silveira Negri
Co-orientadora

Profa. Dra. Taís Maria Bauab
Orientadora

Araraquara - SP

2015

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me apoiarem em todos os momentos dessa trajetória, acreditarem nos meus sonhos e na minha capacidade.

Ao meu irmão, por ser a primeira pessoa a quem recorro em todos os momentos de dificuldade e está sempre ao meu lado.

À Prof. Dr. Taís Maria Maria Bauab, minha orientadora, pela confiança e oportunidade de poder me desenvolver não só profissionalmente, como também como ser humano. Agradeço pela orientação, ensinamentos, carinho e atenção durante o desenvolvimento do projeto.

À doutoranda Kamila Maria Silveira Negri, minha co-orientadora, pela amizade, todo o apoio, confiança e dedicação durante o projeto.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Matheus Ramos, Bruna Vidal Bonifácio e Patrícia Bento, por todos os ensinamentos, conversas e risadas. Sem vocês o projeto teria dado o dobro de trabalho e eu teria dado só metade das risadas. Obrigado pela amizade.

Aos alunos do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos: Aymê, Isadora, Thaís, Erina, Malu e Raquel pelo auxílio nos experimentos e companheirismo no laboratório.

À Maria Julia, minha companheira, pelo amor, respeito, amizade, confiança e paciência, e por estar sempre comigo.

À Profª. Erna Bach pelo fornecimento das amostras dos cogumelos.

À todos do Departamento de Ciências Biológicas que contribuíram com o meu trabalho.

À FAPESP, pela bolsa de iniciação científica concedida.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara.

À todos que participaram na realização deste trabalho, MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Cogumelos <i>in natura</i>	15
3.1.1 Obtenção e procedência.....	15
3.2 Preparo dos extratos fúngicos	15
3.2.1 Obtenção dos extratos	15
3.2.2 Infusão	17
3.2.3 Ultrassom	18
3.2.4 Maceração	18
3.3 Preparo das amostras bacterianas	20
3.3.1 Amostras bacterianas.....	20
3.3.2 Estocagem e manutenção das cepas.....	20
3.3.3 Padronização das suspensões microbianas.....	20
3.4 Preparação das soluções extrativas e da solução de β-glucana ...	21
3.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	21
3.6 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	22
3.7 Leitura dos resultados	23
3.7.1 Leitura espectrofotométrica	23
3.7.2 Leitura com revelador.....	24
4. RESULTADOS	26
4.1 Obtenção dos extratos	26
4.2 Rendimento dos extratos	26
4.3 Determinação da atividade antibacteriana	27
4.3.1 Atividade antibacteriana do <i>Lentinus edodes</i>	27
4.3.2 Atividade antibacteriana do <i>Agaricus bisporus</i>	30
4.3.3 Atividade antibacteriana do <i>Agaricus blazei</i>	32
4.4.4 Atividade antibacteriana da substância β -glucana.....	35
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÃO	47
7. REFERÊNCIAS	48

RESUMO

A busca por novos agentes antimicrobianos é muito importante, uma vez que as bactérias possuem um alto potencial de recombinação genética, levando a um aumento de cepas resistentes aos fármacos antimicrobianos já existentes. Nesse contexto, os cogumelos podem ser uma alternativa, uma vez que extratos e constituintes químicos destes apresentam atividade frente a diversos isolados patogênicos e utilizados na medicina popular. Dentre as espécies de maior interesse estão o *Agaricus blazei* (cogumelo do sol), *Agaricus bisporus* (champignon de Paris) e *Lentinus edodes* (shitake). O *Helicobacter pylori* é responsável por doenças gastrointestinais de extrema importância para a saúde pública, como úlceras, gastrites até tumores malignos. O tratamento mais utilizado nos controles deste micro-organismo não é eficaz. Os cogumelos aparecem como alternativa para novas pesquisas neste ramo podendo vir a ser utilizados no desenvolvimento de novo fitoterápico ou mesmo como adjuvante deste tratamento. Existem diversos métodos para determinar a atividade antimicrobiana, entre eles a microdiluição. Esta técnica vem sendo muito utilizada principalmente devido à sua sensibilidade e pequena quantidade de reagentes e amostras, o que possibilita um maior número de réplicas, aumentando a confiabilidade dos resultados. Em continuidade ao estudo do nosso grupo de pesquisa este trabalho objetiva determinar o potencial anti-*H. pylori* de espécies de cogumelos comestíveis instigados pela possibilidade de encontrar uma alternativa para o tratamento desse micro-organismos dada a importância do mesmo na saúde pública. A atividade antibacteriana dos diferentes extratos de *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus*, obtidos por infusão, ultrassom e maceração e de extratos purificados de *Agaricus blazei* e da substância isolada β -glucana foi determinada pela técnica de microdiluição a fim de obter a concentração inibitória mínima (CIM) frente às bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Helicobacter pylori*. Os resultados obtidos mostraram a potencialidade da extração realizada através do ultrassom, uma vez que foram observados padrões inibitórios superiores quando comparados aos extratos de infusão e maceração. Quando avaliados com a resazurina nenhum dos extratos apresentou atividade bacteriostática ou bactericida. Já os dados obtidos pelos gráficos de inibição de crescimento, mostraram que todos os extratos possuem uma moderada atividade frente ao *S. aureus*, com inibições superiores a 50%, sendo a maior delas apresentada pela β -glucana com valores de inibição chegando a 80%. Nenhum dos extratos apresentou significativa inibição frente a *E. coli* e ao *H. pylori*. Considerando os resultados obtidos neste estudo, notou-se uma possível seletividade de ação contra as bactérias Gram positivas, uma vez que apresentaram uma atividade moderada contra as cepas de *S. aureus* e nenhuma atividade frente a *E. coli* e *H. pylori*.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, cogumelos, atividade antimicrobiana, microdiluição, *Lentinus edodes*, *Agaricus blazei*, *Agaricus bisporus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Lentinus edodes</i> in natura.....	16
Figura 2. <i>Agaricus bisporus</i> in natura.....	16
Figura 3. Extratos do <i>Lentinus edodes</i>	17
Figura 4. Extratos do <i>Agaricus bisporus</i>	17
Figura 5. Extrato purificado do <i>Agaricus blazei</i> e isolado de β -glucana	17
Figura 6. Fluxograma das metodologias de extração utilizadas.....	19
Figura 7. Representação esquemática da microplaca na determinação da atividade antibacteriana e da CIM.....	22
Figura 8. Representação esquemática do teste para determinar a CBM.....	23
Figura 9. Reação de redução da resazurina.....	24
Figura 10. Ensaio de microdiluição revelado com resazurina.....	25
Figura 11. Porcentagem de inibição de crescimento referente aos extratos do <i>L. edodes</i> frente a <i>E. coli</i>	28
Figura 12. Porcentagem de inibição de crescimento referente aos extratos do <i>L. edodes</i> frente a <i>S. aureus</i>	29
Figura 13. Porcentagem de inibição de crescimento referente aos extratos do <i>L. edodes</i> frente a <i>H. pylori</i>	29
Figura 14. Porcentagem de inibição de crescimento referente aos extratos do <i>A. bisporus</i> frente a <i>E. coli</i>	31
Figura 15. Porcentagem de inibição de crescimento referente aos extratos do <i>A. bisporus</i> frente a <i>S. aureus</i>	31
Figura 16. Porcentagem de inibição de crescimento referente aos extratos do <i>A. bisporus</i> frente ao <i>H. pylori</i>	32
Figura 17. Porcentagem de inibição de crescimento referente aos extratos do <i>A. blazei</i> frente ao <i>E. coli</i>	33
Figura 18. Porcentagem de inibição de crescimento referente aos extratos do <i>A. blazei</i> frente ao <i>S. aureus</i>	34
Figura 19. Porcentagem de inibição de crescimento referente aos extratos do <i>A. blazei</i> frente ao <i>H. pylori</i>	35

Figura 20. Porcentagem de inibição de crescimento referente a β -glucana frente ao <i>E. coli</i>	36
Figura 21. Porcentagem de inibição de crescimento referente a β -glucana frente ao <i>S. aureus</i>	37
Figura 22. Porcentagem de inibição de crescimento referente a β -glucana frente ao <i>H. pylori</i>	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento da extração dos cogumelos por infusão.....	26
Tabela 2. Rendimento da extração dos cogumelos por ultrassom.....	26
Tabela 3. Rendimento da extração dos cogumelos por maceração.	26
Tabela 4. Determinação da CIM do <i>L. edodes</i> utilizando a resazurina como revelador....	27
Tabela 5. Determinação da CIM do <i>A. bisporus</i> utilizando a resazurina como revelador.	30
Tabela 6. Determinação da CIM do <i>A. blazei</i> utilizando a resazurina como revelador.....	33
Tabela 7. Determinação da CIM da β -glucana utilizando a resazurina como revelador....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS - Absorbância

AMH - Ágar Muller Hinton

ATCC - *American Type Culture Collection*

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMH - Caldo Muller Hinton

DMSO – Dimetilsufóxido

SFB - Soro Fetal Bovino

UFC - Unidade Formadora de Colônia

1. INTRODUÇÃO

Desde o início da civilização humana, os produtos naturais com propriedades terapêuticas são vistos como importante fonte de substâncias ativas. Por um longo período, o homem utilizou minerais, produtos vegetais e animais visando a melhoria nas condições de sua alimentação e na cura de suas enfermidades (ARAÚJO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2012). Dessa forma, o homem aprofundou seus conhecimentos nessa área, na qual está a utilização de produtos naturais como substâncias com atividade antimicrobiana.

Apesar da grande variedade de substâncias com atividade antibacteriana, a resistência das bactérias aos antibióticos de primeira escolha vem crescendo rapidamente. Além disso, a associação entre micro-organismos multirresistentes e o crescente número de infecções hospitalares agravam ainda mais o problema e incentivam a busca urgente por novas fontes antimicrobianas (COWAN, 1999; CRAGG e NEWMAN, 2013).

Isolados de *Candida ssp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Escherichia coli*, entre outros, estão cada vez mais resistentes a múltiplas drogas, o que estimula o estudo de substâncias com novos mecanismos de ação (ROSA et al., 2003; BONIFÁCIO et al., 2014).

Nesse contexto, os cogumelos podem ser uma alternativa, uma vez que autores apontam que extratos e constituintes químicos destes apresentam atividade frente a diversos isolados patogênicos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. (HEARST et al., 2009; LARGETEAU et al., 2011; ALVES et al., 2012; LIU et al, 2015).

Os cogumelos vêm sendo utilizados não só como medicamentos desde o princípio das civilizações, mas também como fonte de alimento (RAI et al., 2005). O cultivo de cogumelos é muito tradicional nos países do oeste da Ásia, especialmente na China,

iniciando-se em 600 a.C., onde eruditos com base em seus conhecimentos puderam classificar diversas espécies, relatando suas propriedades terapêuticas. Entretanto, o uso medicinal dos cogumelos ainda merece ser avaliado, podendo aumentar o número de drogas capazes de combater micro-organismos multirresistentes (AIDA et al., 2009; LARGETEAU et al., 2011; LIU et al., 2015). Visto a variedade de componentes químicos presente nos cogumelos eles podem ser considerados uma fonte promissora de substâncias com potencial para novos produtos farmacêuticos. Muitas substâncias farmacêuticas únicas e com alto potencial terapêutico já foram extraídas de cogumelos e são utilizadas na medicina (RAI et al., 2005; LARGETEAU et al., 2011; LIU et al., 2015).

O *Agaricus blazei* Murrill é um exemplo disso e atualmente é um dos cogumelos mais estudados. No Brasil é conhecido como cogumelo do sol, no Japão como *himematsutake* e nos Estados Unidos *Royal Sun Agaricus*. Descoberto no Brasil em 1960 na cidade de Piedade - SP pelo Sr. Furumoto, o *Agaricus blazei* é fonte de vários compostos já caracterizados com interesse medicinal (LARGETEAU et al., 2011; ALVES et al., 2012; VAL et al., 2015).

Em destaque estão os polissacarídeos, como as β -glucanas, que são responsáveis pela atividade antitumoral do *A. blazei* (ANGELI et al., 2009). Atividade mutagênica também foi comprovada em chás preparados com mistura de linhagens do *A. blazei*, sendo o ácido linoléico caracterizado como a principal substância com atividade mutagênica em *Salmonella typhimurium* (DELMANTO et al., 2001; MENOLI et al., 2001).

Osaki et al. (1994) isolaram o ácido octadecadienólico (ácido linoléico) de extratos clorofórmios e metanólicos de *A. blazei*, substância que apresentou atividade contra *Salmonella typhimurium*.

O ergosterol, um purificado da fração lipídica do cogumelo, é um esteroide com característica semelhante ao colesterol e apresenta atividade antitumoral e inibição direta

da angiogênese. Estudo de Takaku et al. (2001), demonstrou que o esterol interfere na estabilidade das paredes das membranas dos vasos que alimentam o tumor.

O *Agaricus blazei* é o cogumelo mais estudado nos dias de hoje, entretanto, outras espécies podem ser exploradas. Uma grande quantidade de cogumelos é utilizada diariamente na dieta do ser humano e é possível que estes cogumelos possuam substâncias bioativas que possam auxiliar no combate aos micro-organismos, o que faz com que o estudo de espécies de cogumelos consumidas pelo homem seja mais interessante (OHNO et al., 2001; ZHU et al., 2015).

A espécie *Agaricus bisporus*, conhecida no Brasil por *champignon*, é frequentemente utilizada na dieta dos brasileiros. O cultivo desse cogumelo teve início no século XVII na Europa, sendo considerado o fungo de maior importância entre os cogumelos comestíveis do mundo todo (DIAS et al., 2004; SANCHEZ et al., 2008).

Essa espécie de cogumelo pode ser consumida na forma *in natura* ou em conserva. Comumente utilizado no preparo do estrogonofe, o *A. bisporus in natura* é também utilizado no preparo de saladas e de diversos molhos e massas (NEGRI, 2012). Além de ser considerado muito saboroso, o cogumelo da espécie *A. bisporus* apresenta alto valor nutritivo, pois possui alto teor de proteínas e fibras alimentares, além de possuir baixo teor de lipídeos (FURLANI e GODOY, 2007).

Outra espécie de cogumelo muito consumida por todos os povos do mundo é o *Lentinus edodes*, conhecido no Japão e no Brasil como *shiitake*. Este cogumelo é o segundo mais produzido e consumido no mundo, só precedido pelo *A. bisporus*, devido ao seu sabor peculiar e alto valor nutritivo (SOUZA-PACOLLA et al., 2003; AIDA et al., 2009).

O *shiitake* contém alto teor de minerais, vitaminas, proteínas, carboidratos e substâncias como fibras e ergosterol (AIDA et al., 2009). Além do seu poder nutritivo, ele também possui substâncias bioativas com ação terapêutica tais como a lentinana, que

apresenta atividade antitumoral; a eritadenina, que diminui o colesterol sanguíneo e a lectina que tem ação imunomodulatória e antiproliferativa contra células tumorais (WANG et al., 2003). Muitos estudos apontam atividade antifúngica e antibacteriana relacionada ao *Lentinus edodes* em que é comprovada a ação antibacteriana contra Gram positivas e Gram negativas (AIDA et al., 2009; ALVES et al., 2012 e SHANG, 2013). Hatvani (2001) sugere que a atividade antibacteriana do cogumelo se deva à substância lentionina.

A atividade do extrato etanólico de *L. edodes* anti-*S. aureus*, *E. coli* e *B. subtilis* foi determinada em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, mostrando uma CIM = 15,6 µg/mL e CIM = 3,9 µg/mL frente *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente (NEGRI, 2012). Outros autores, como Simas et al. (2004), apontam que extratos obtidos através de fontes naturais apresentam atividade superior ao de substâncias isoladas, que é uma vantagem, uma vez que esses cogumelos são consumidos *in natura*.

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria espiralada, Gram-negativa e flagelada, responsável por doenças gastrointestinais de extrema importância para a saúde pública, como úlceras, gastrites até tumores malignos. Hoje em dia o número de pessoas que sofrem com doenças relacionadas ao *H. pylori* é muito grande, portanto a erradicação dessa bactéria seria o melhor plano de ação (WU et al., 2012). Esta bactéria é um dos micro-organismos infecciosos mais comuns do mundo (cerca de 50% da população mundial), atingindo principalmente os países em desenvolvimento (HOJSAK et al., 2012).

O maior desafio em relação ao *H. pylori* é o seu tratamento, pois para seu controle é necessária a terapia tripla, composta pelo omeprazol, amoxicilina e claritromicina ou até mesmo a quádrupla com a adição do bismuto, entretanto isso é muito difícil, pois a bactéria se aloja nas regiões gastrointestinais e a maioria dos antibióticos é degradada antes de atingir o local infectado. Um bom exemplo disso é a claritromicina, um dos mais

potentes antibióticos contra o *H. pylori*, que é degradado no lúmen pela ação de ácidos e da pepsina presente no organismo humano (WU et al., 2012) Além da baixa eficiência das terapias presentes nos dias de hoje, elas ainda apresentam alguns efeitos colaterais como diarreia, náuseas e dores abdominais, o que faz com que a adesão ao tratamento seja diminuída (FRANCESCHI et al., 2007; CINDORUK et al., 2007)

Tendo em vista o grande poder infeccioso dessa bactéria, sua alta resistência, além da dificuldade de se encontrar antibióticos que sejam eficientes e ao mesmo tempo não sejam degradados em nosso organismo, a busca por novas substâncias que apresentem atividade anti-*H. pylori* é muito importante. Os cogumelos aparecem como alternativa para novas pesquisas neste ramo podendo vir a ser utilizados no desenvolvimento de novo fitoterápico ou mesmo como adjuvante do tratamento.

O conhecimento dos constituintes fitoquímicos dos cogumelos é importante para definir seu potencial biológico. Dentre as diversas etapas, a determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* é importante na determinação do potencial biológico de produtos naturais. Para isso são utilizados diversos métodos para avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Dentre eles estão os métodos de difusão em ágar, macrodiluição e microdiluição. O método da microdiluição, desenvolvido por Eloff em 1998, é indicado para a determinação da CIM, principalmente devido à pequena quantidade de reagentes e amostras utilizadas, o que possibilita um maior número de réplicas, aumentando a confiabilidade dos resultados (OSTROSKY et al., 2008).

Em continuidade ao estudo de Negri (2012), nosso grupo de pesquisa se volta à determinação do potencial anti-*H. pylori* de espécies de cogumelos comestíveis instigados pela possibilidade de encontrar uma alternativa no tratamento desse micro-organismo dada a importância do mesmo para a saúde pública.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Considerando o crescente uso dos cogumelos tanto para fins alimentares quanto para fins terapêuticos e resultados promissores alcançados com o uso de alimentos e produtos naturais, o objetivo deste trabalho é determinar a atividade antibacteriana de cogumelos das espécies *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus* e *Agaricus blazei* assim como da substância isolada β -glucana frente a cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Helicobacter pylori*.

2.2 Objetivos específicos

- Obter os extratos aquosos e hidroetanólicos das espécies *L. edodes* e *A. bisporus* por infusão, ultrassom e maceração.
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos obtidos frente as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Helicobacter pylori*.
- Comparar a atividade dos extratos levando em consideração as três diferentes formas de extração.
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos de *A. blazei* e da β -glucana, cedidos ao nosso laboratório, frente as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Helicobacter pylori*.
- Comparar a atividade antibacteriana dos extratos e das substâncias isoladas de duas diferentes procedências, a marca Valemar e a marca Vitali.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cogumelos *in natura*

3.1.1 Obtenção e procedência

As diferentes espécies de cogumelos foram adquiridas de cultivos frescos, disponíveis para a população. Foram plantados e coletados no Sítio Recanto da Mata - São Carlos - SP.

O extrato purificado do *Agaricus blazei* (6,29 g de β -glucanas; 3,43 mg de proteína e 0,78mg de fenol) e a β -glucana purificada foram obtidos e cedidos pela Profa. Dra. Erna Elisabeth Bach e são de duas procedências, do Rio Grande do Sul, marca Vitali e outra de São Paulo, da marca Valemar. As amostras de cogumelos foram trituradas e armazenadas no freezer a -80°C até o momento da preparação dos extratos.

3.2 Preparo dos extratos fúngicos

Foram utilizadas três metodologias extrativas, utilizando dois solventes, a água e o etanol 70%.

Os processos de rotaevaporação e liofilização foram realizados no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Química Orgânica no Instituto de Química sob supervisão da Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos.

3.2.1 Obtenção dos extratos

Os cogumelos foram triturados em um processador e colocados em uma placa de Petri, adequadamente vedados e congelados a -80°C . As Figuras 1 e 2 apresentam as espécies *L. edodes* e *A. bisporus in natura*.

Figura 1. *Lentinus edodes* in natura.



Fonte: Autor

Figura 2. *Agaricus bisporus* in natura.



Fonte: Autor

O projeto inicial propunha a obtenção das amostras dos cogumelos solubilizados em água. Com a possibilidade de um decorrente erro com a opção de apenas um tipo de extrato, uma vez que diferentes constituintes químicos são extraídos com diferentes solventes, optamos por dedicar um período maior na obtenção dos extratos dos cogumelos adicionando ao projeto a extração com etanol.

Acredita-se que dessa forma aumenta-se a diversidade de constituintes químicos (metabólitos) extraídos dos cogumelos e conseqüentemente a possibilidade de extrair componentes com atividade antibacteriana será maior.

Foram realizados dois tipos de extração com água, inserindo-o no contexto alimentar e uso caseiro dos cogumelos e a extração com etanol.

Foram obtidos 3 extratos partindo-se da infusão (Extrato I), ultrassom (Extrato U) e maceração (Extrato M).

A Figura 3 apresenta os extratos obtidos com o *L. edodes* pelos 3 métodos extrativos e com os quais foram feitos os testes de atividade antibacteriana. A Figura 4 apresenta os extratos obtidos a partir do *A. bisporus*. A Figura 5 apresenta o material cedido pela Professora Dra. Erna Bach, sendo o extrato purificado do *A. blazei* e a substância isolada β -glucana, ambos de duas procedências, VA representando Valemar e VI a marcar Vitali.

Figura 3. Extratos do *Lentinus edodes*.



Fonte: Autor

Figura 4. Extratos do *Agaricus bisporus*.



Fonte: Autor

Figura 5. Extrato purificado do *Agaricus blazei* e isolados de β -glucana



Fonte: Autor

3.2.2 Infusão

Foram pesados 100 g dos cogumelos previamente triturados e transferidos para um béquer. Em seguida adicionou-se 1 L de água fervente e o béquer foi coberto durante

15 minutos. Ao final deste tempo, realizou-se uma filtração simples do extrato e posteriormente foi realizada a reextração e filtração dos cogumelos por mais duas vezes com 250 mL de água fervente. Os filtrados obtidos foram agrupados totalizando 1,5 L. O volume foi reduzido até 500 mL em um rotaevaporador. Transferiu-se o volume para um balão que foi congelado e em seguida liofilizado, obtendo-se o extrato de cada um dos cogumelos.

3.2.3 Ultrassom

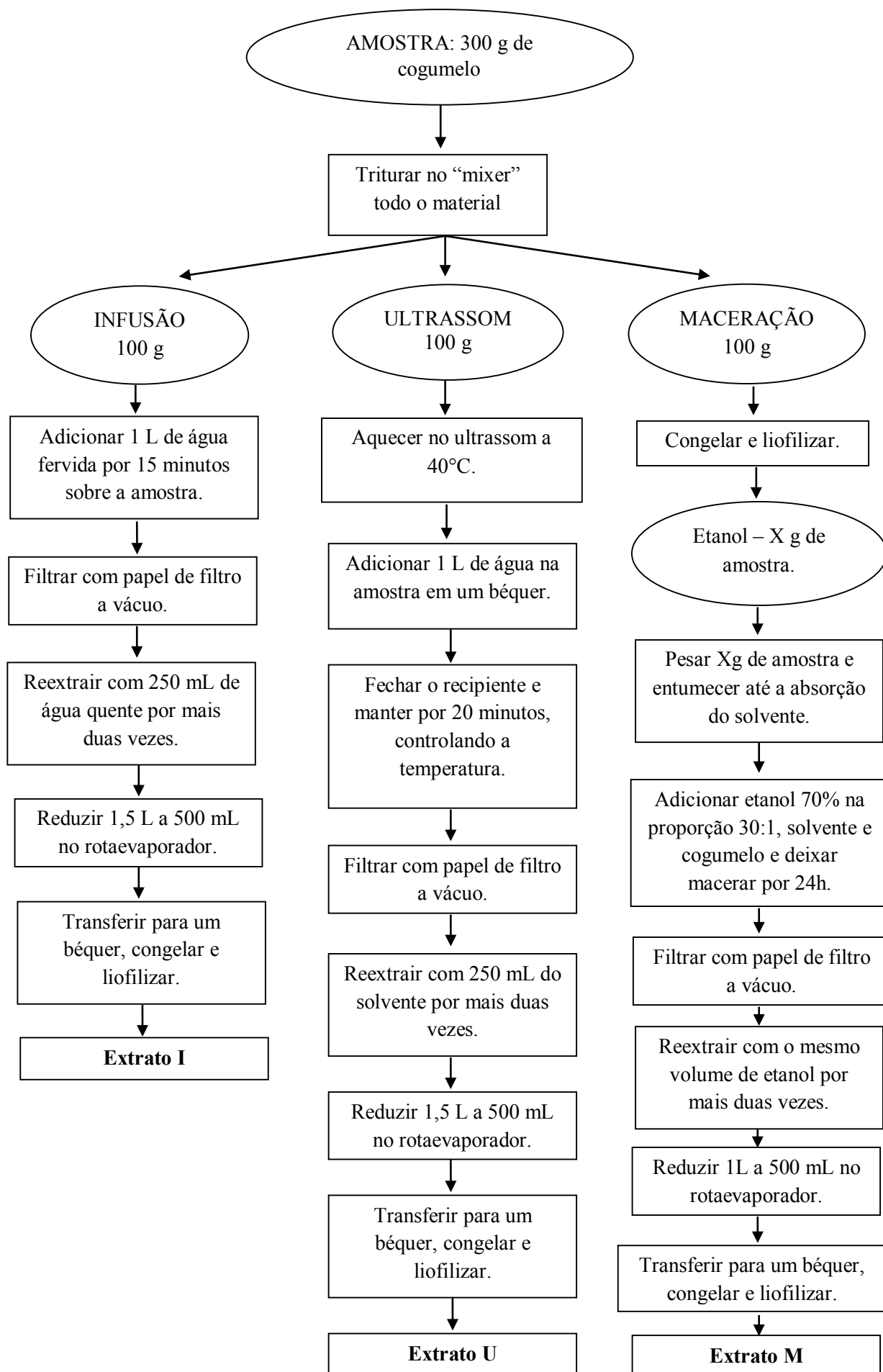
Foram pesados 100 g dos cogumelos previamente triturados e transferidos para um béquer. Em seguida adicionou-se 1 L de água à 40°C e o béquer foi levado para o banho de água no ultrassom (sonicador) termostatizado (40°C) e mantido por 20 minutos. Ao final deste tempo, realizou-se uma filtração simples do extrato e posteriormente uma reextração seguida de filtração com 250 mL de água a 40°C, por mais duas vezes. Os filtrados foram agrupados totalizando 1,5 L. O volume foi reduzido até 500 mL em um rotaevaporador. Transferiu-se o volume para um balão que foi congelado e em seguida liofilizado, obtendo-se o extrato de cada um dos cogumelos.

3.2.4 Maceração

Transferiu-se 100 g dos cogumelos para uma placa de Petri que foi congelada e posteriormente liofilizada. A porção liofilizada foi pesada, transferida para um frasco, em seguida foi entumecida com 60 mL de etanol 70% até total absorção do solvente. Posteriormente adicionou-se 150 mL de etanol. A mistura foi macerada por 24 horas, sendo agitada vigorosamente durante um minuto por três vezes e posteriormente filtrada. Foram realizadas reextrações com 150 mL de etanol utilizando a maceração com intervalo de dois dias e com três agitações vigorosas de 1 minuto/dia.

O volume final foi reduzido no rotaevaporador, transferido para um balão e seguido de liofilização.

Figura 6. Fluxograma das metodologias de extração utilizadas.



3.3 Preparo das amostras bacterianas

3.3.1 Amostras bacterianas

Foram utilizadas as bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positiva), *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Helicobacter pylori* ATCC 43504 (Gram-negativa).

3.3.2 Estocagem e manutenção das cepas

As cepas de *E. coli* e *S. aureus* foram mantidas em caldo Muller-Hinton (CMH) acrescido de 20% de glicerol e mantidas a -20 °C. Para o uso, foram repicadas em CHM, incubando-se por 24 horas a 37 °C, as quais foram utilizadas para a padronização do inóculo.

A cepa de *H. pylori* foi mantida em CMH contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) acrescido de 20% de glicerol e mantido a -20 °C. Para o uso, o *H. pylori* foi repicado em Ágar Muller Hinton (AMH) acrescido de 5% de sangue de carneiro e incubado a 36°C por 72 horas em 10% de CO₂ e umidade.

3.3.3 Padronização das suspensões microbianas

As suspensões bacterianas de *E. coli* e *S. aureus* foram padronizadas adicionando-se uma cultura de 24 horas em um tubo contendo CMH estéril até atingir uma turvação igual à suspensão de 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ céls/mL). A concentração foi confirmada com a leitura espectrofotométrica a 620nm (0,10 a 0,15). Para realização dos ensaios de diluição em microplacas foi realizada uma diluição 1/10, obtendo-se uma suspensão de $1,5 \times 10^7$ céls/mL (CLSI, 2006) e (CLSI 2006a).

Já as suspensões bacterianas de *H. pylori* foram padronizadas adicionando-se uma cultura de 72 horas em um tubo contendo CMH estéril até atingir uma turvação igual à escala 2 de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ céls/mL). A concentração foi confirmada com a leitura espectrofotométrica a 570nm (0,23). Para realização dos ensaios de diluição em microplacas foi realizada uma diluição 1/10, obtendo-se uma suspensão de $1,5 \times 10^7$ céls/mL (CLSI, 2006) e (CLSI 2006a).

3.4 Preparação das soluções extrativas e da solução de β -glucana

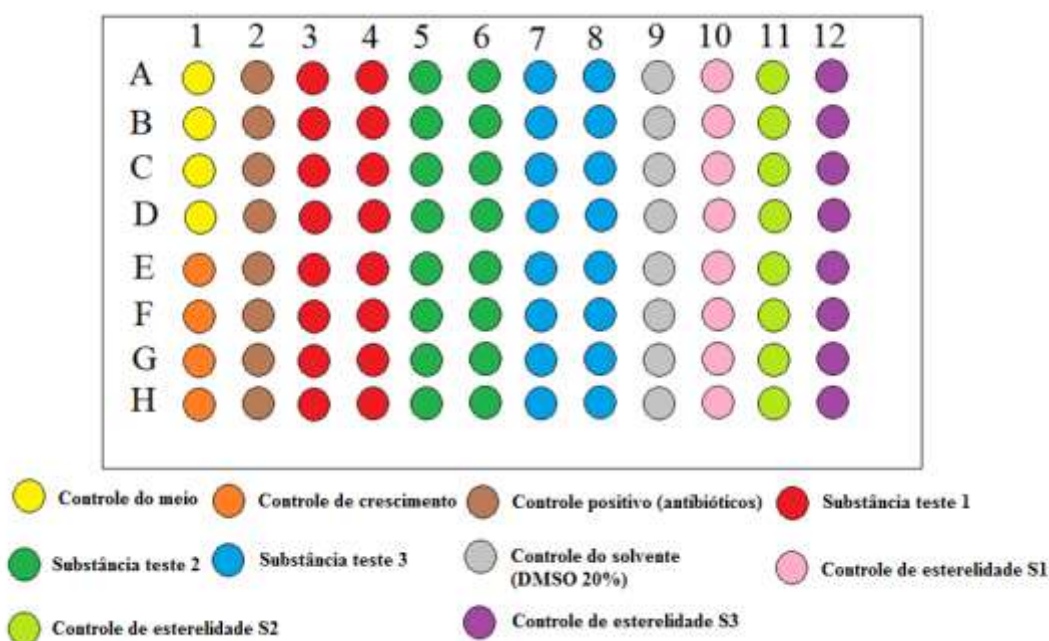
Todos os extratos e a β -glucana foram preparados na concentração de 2000 $\mu\text{g/mL}$ em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 20%. Todos foram submetidos a banho ultrassônico até a solubilização completa e não excedendo o tempo de 30 minutos. Depois de solubilizados, as soluções foram submetidas à filtração por membrana (0,22 μm) para retirar quaisquer contaminantes existentes. As soluções dos extratos foram mantidas à temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C}$ como solução-estoque até o início dos experimentos.

3.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do CLSI (2006) para as bactérias aeróbicas, e adaptada para as fastidiosas segundo o suplemento M100-S16 (CLSI, 2006a), com modificações. Os orifícios das microplacas foram preenchidos com 80 μL de CMH para *E. coli*, *S. aureus*, e 80 μL de CMH acrescido de 50% de SFB para *H. pylori*. Em seguida foram acrescentados 100 μL das soluções dos extratos fúngicos e realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8 $\mu\text{g/mL}$. Adicionalmente foram distribuídos 20 μL das suspensões dos micro-organismos em cada orifício das microplacas com exceção dos orifícios referente aos controles de esterilidade. Como

controles positivos foram utilizados amoxicilina (100 µg/mL) para *H. pylori* e a ampicilina (50 µg/mL) para as demais bactérias. Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano, o controle dos extratos vegetais e o controle negativo (solvente). A Figura 7 apresenta a disposição das microplacas utilizadas no estudo. As microplacas contendo *S. aureus* e *E. coli* foram incubados a 37°C por 24h e as com *H. pylori* na mesma temperatura com 10% de CO₂ por 72h. Os testes foram realizados em triplicata.

Figura 7. Representação esquemática da microplaca na determinação da atividade antibacteriana e da CIM.

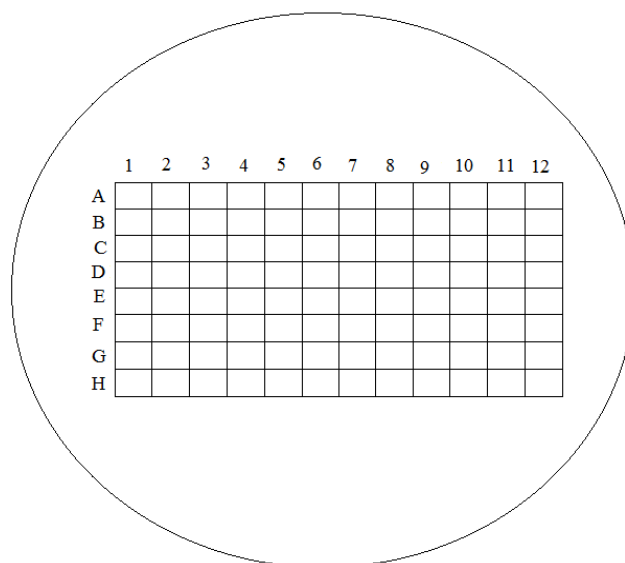


3.6 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Após o período de incubação com auxílio de palitos de madeira estéreis, a mistura de cada poço da microplaca foi repicada em placa de Ágar Muller Hinton (AMH) acrescido de 5% de sangue de carneiro para o *H. pylori* e AMH para as demais bactérias (Figura 8). As placas foram incubadas a 37 °C por 72 horas com 10% de CO₂, para o *H.*

pylori e a 37 °C por 24h para as demais bactérias. Após a incubação foram observadas a ocorrência ou não de crescimento bacteriano nas placas.

Figura 8. Representação esquemática do teste para determinar a CBM.



3.7 Leitura dos resultados

3.7.1 Leitura espectrofotométrica

As microplacas foram avaliadas em espectrofotômetro a 595 nm (leitor de microplacas) a partir dos quais foram confeccionados os gráficos expressando a porcentagem de viabilidade dos micro-organismos. A equação abaixo mostra a fórmula utilizada para o cálculo das porcentagens de inibição de crescimento bacteriano. Abs T representa a absorbância do teste (poço do teste), Abs ST a absorbância da substância teste (poço do controle de extrato) e Abs Cb a absorbância do crescimento bacteriano (poço do controle de crescimento) (GUDIÑA et al., 2010).

$$\% \text{ inibição} = \frac{[1 - (Abs T - Abs ST)] \times 100}{Abs Cb}$$

A inibição do crescimento foi evidenciada pela ausência de crescimento em cada poço, sendo considerada a CIM a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas (HORNER et al.,2008).

3.7.2 Leitura com revelador

Adicionou-se 30 µL de solução de resazurina preparada a 0,01% em cada orifício das microplacas. No decorrer de até 2 horas foi observada a cor de cada poço da microplaca. A presença de cor azul representa ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002).

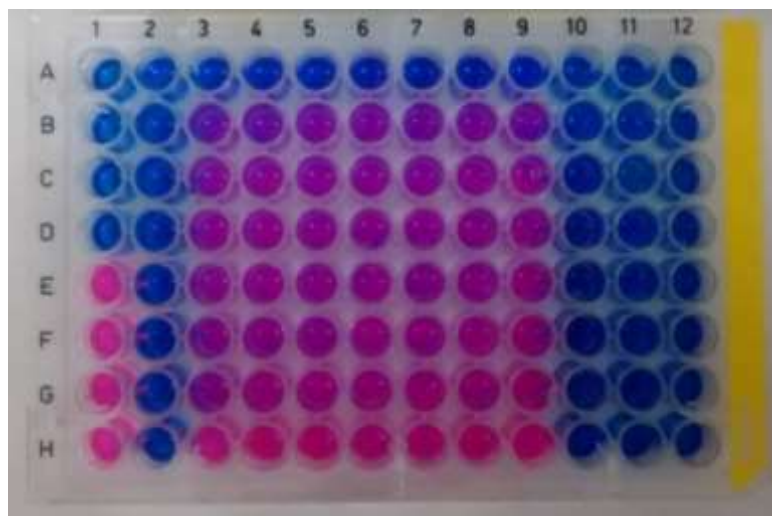
A inibição do crescimento microbiano foi evidenciada pela ausência de crescimento no meio, sendo considerada CIM a menor concentração das amostras capaz de inibir o crescimento das cepas bacterianas, evidenciado pela coloração dos poços.

A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA et al., 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor azul) em resarufina (cor rósea), apresentado na Figura 9. A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos.

Figura 9. Reação de redução da resazurina.



A Figura 10 apresenta um ensaio de microdiluição utilizando o revelador resazurina.



Fonte: Autor

Figura 10. Ensaio de microdiluição revelado com resazurina

4. RESULTADOS

4.1 Obtenção dos extratos

Foram obtidos os extratos de *Lentinus edodes* e *Agaricus bisporus* pelos métodos de infusão, ultrassom e maceração.

4.2 Rendimento dos extratos

As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam os rendimentos obtidos com a preparação dos extratos obtidos pelos métodos de infusão, ultrassom e maceração, respectivamente. As massas obtidas mostraram-se estáveis e com quantidade suficiente para realização das análises biológicas.

Tabela 1. Rendimento da extração dos cogumelos por infusão.

Amostras	Peso inicial	Extrato Liofilizado	Rendimento
<i>L. edodes</i>	100 g	3,471 g	3,4 %
<i>A. bisporus</i>	100 g	4,252 g	4,3 %

Tabela 2. Rendimento da extração dos cogumelos por ultrassom.

Amostras	Peso inicial	Extrato Liofilizado	Rendimento
<i>L. edodes</i>	100 g	3,924 g	3,9 %
<i>A. bisporus</i>	100 g	4,392 g	4,4 %

Tabela 3. Rendimento da extração dos cogumelos por maceração.

Amostras	Peso inicial	Extrato Liofilizado	Rendimento
<i>L. edodes</i>	100 g	3,107 g	3,1 %
<i>A. bisporus</i>	100 g	4,534 g	4,5 %

Em relação à massa dos extratos, não se observou significativa diferença no rendimento quando as diferentes metodologias foram aplicadas, o que sugere que todos os métodos se mostraram equivalentes quando comparados a obtenção de massa.

4.3 Determinação da atividade antibacteriana

4.3.1 Atividade antibacteriana do *Lentinus edodes*

Os resultados da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos do *Lentinus edodes* são apresentados na Tabela 4. Em todos os experimentos os controles positivos, do meio, do crescimento microbiano e dos solventes com e sem inóculo apresentaram resultados adequados.

Observou-se que, para o *H. pylori* e *E. coli*, no controle do solvente nos poços contendo 10% de DMSO as bactérias não cresceram o que demonstra a atividade inibitória do próprio. De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que os extratos do *L. edodes* não apresentaram atividade bactericida ou bacteriostática frente as cepas testadas.

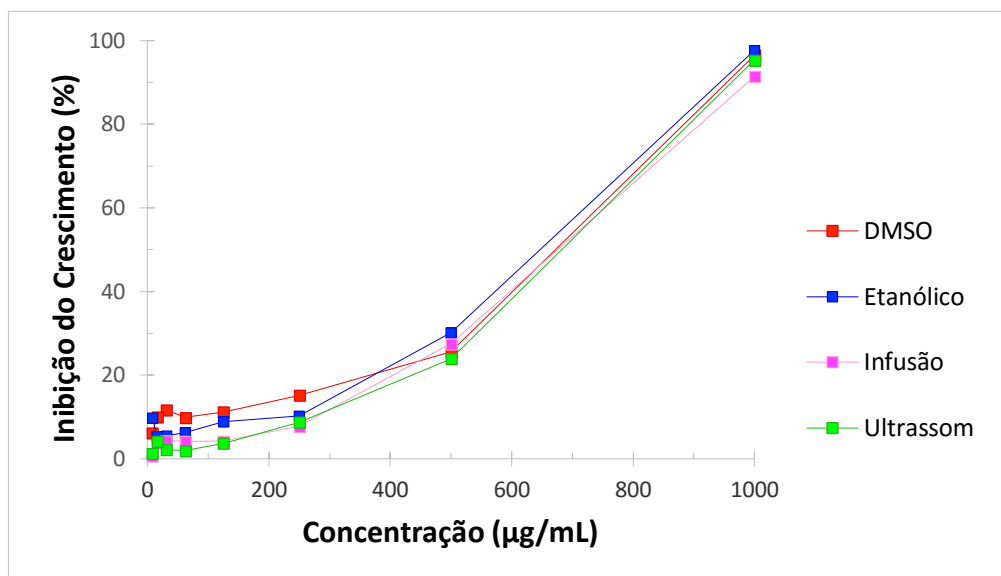
Tabela 4. Determinação da CIM do *L. edodes* utilizando a resazurina como revelador.

Bactérias	Extratos			Controle Positivo		Solvente
	Infusão	Ultrassom	Maceração	Ampicilina	Amoxicilina	DMSO
<i>E. coli</i>	1000	1000	1000	1,56	-	10%
<i>S. aureus</i>	> 1000	> 1000	> 1000	0,39	-	-
<i>H. pylori</i>	1000	1000	1000	-	31,2	10%

*valores em µg/mL; (-) sem inibição

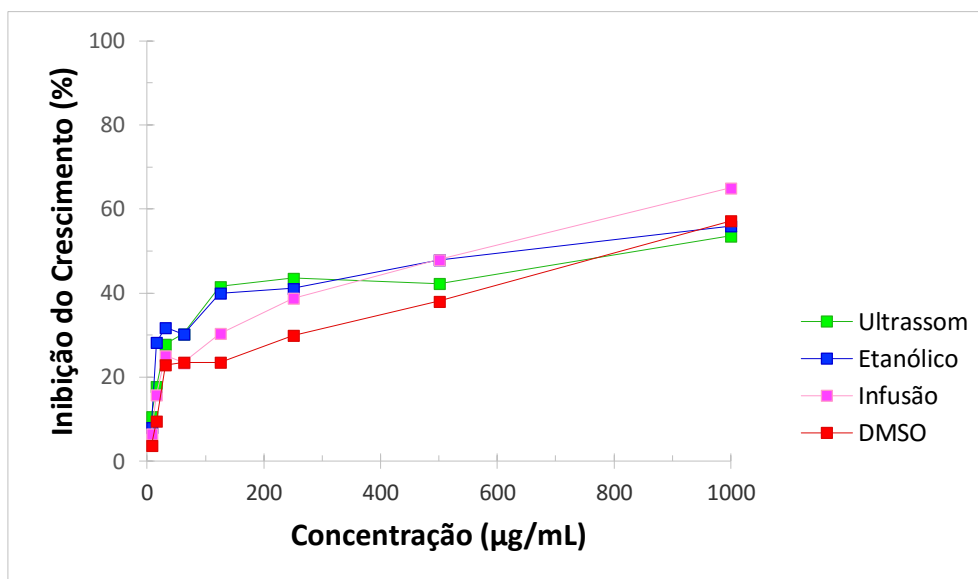
Após leitura no espectrofotômetro foram confeccionados gráficos com as porcentagens de inibição encontradas. As Figuras 11, 12 e 13 apresentam as porcentagens de inibição para *E. coli*, *S. aureus* e *H. pylori* respectivamente.

Figura 11. Porcentagem de inibição de crescimento referente aos extratos do *L. edodes* frente a *E. coli*.



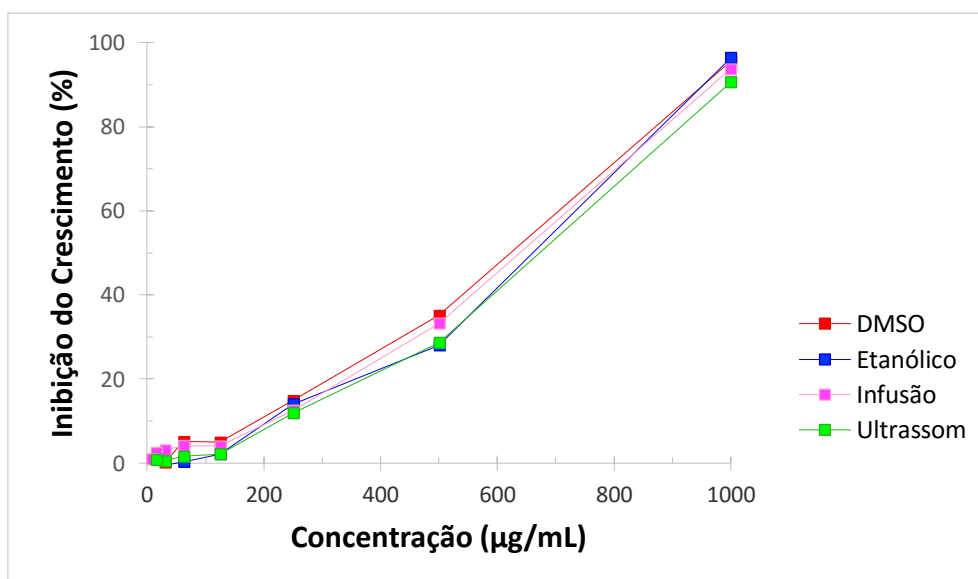
Os resultados apresentados pelos gráficos possibilitam concluir que os extratos obtidos através dos métodos de infusão, ultrassom e maceração apresentaram curvas muito semelhantes e com pouca inibição de crescimento, inibindo aproximadamente 30% do crescimento da *E. coli* na concentração de 500 µg/mL. Além disso, quando comparadas com a curva do solvente (DMSO), vimos que esta inibição pode ser atribuída ao solvente e não as propriedades dos extratos, uma vez que curva do solvente mostra o mesmo percentual de inibição. O DMSO, utilizado para solubilização dos extratos ainda apresentou 100% de inibição do crescimento bacteriano na concentração de 1000 µg/mL, o que explica o alto valor de inibição encontrado nos extratos nessa mesma concentração.

Figura 12. Porcentagem de inibição de crescimento referente aos extratos do *L. edodes* frente a *S. aureus*.



Os resultados dos gráficos indicam que a maior inibição do *L. edodes* frente ao *S. aureus* é encontrada com os extratos provenientes da maceração e ultrassom, na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ com cerca de 40% de inibição do crescimento. No caso do *S. aureus* o DMSO não foi capaz de inibir 100% do crescimento na concentração 1000 $\mu\text{g/mL}$, inibindo apenas 70%, corroborando com os resultados apresentados na microplaca.

Figura 13. Porcentagem de inibição de crescimento referente aos extratos do *L. edodes* frente a *H. pylori*.



Os gráficos apresentam curvas muito semelhantes, com inibição de aproximadamente 30% na concentração de 500 µg/mL, incluindo a curva do DMSO, indicando uma provável inibição do solvente e não das substâncias extraídas.

4.3.2 Atividade antibacteriana do *Agaricus bisporus*

Os resultados da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos do *Agaricus bisporus* são apresentados na Tabela 5. Em todos os experimentos os controles positivos, do meio, do crescimento microbiano e dos solventes com e sem inóculo apresentaram resultados adequados.

Observou-se que, para o *H. pylori* e *E. coli*, no controle do solvente nos poços contendo 10% de DMSO as bactérias não cresceram o que demonstra a atividade inibitória do próprio solvente. De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que os extratos do *A. bisporus* não apresentaram atividade bactericida ou bacteriostática frente as cepas testadas.

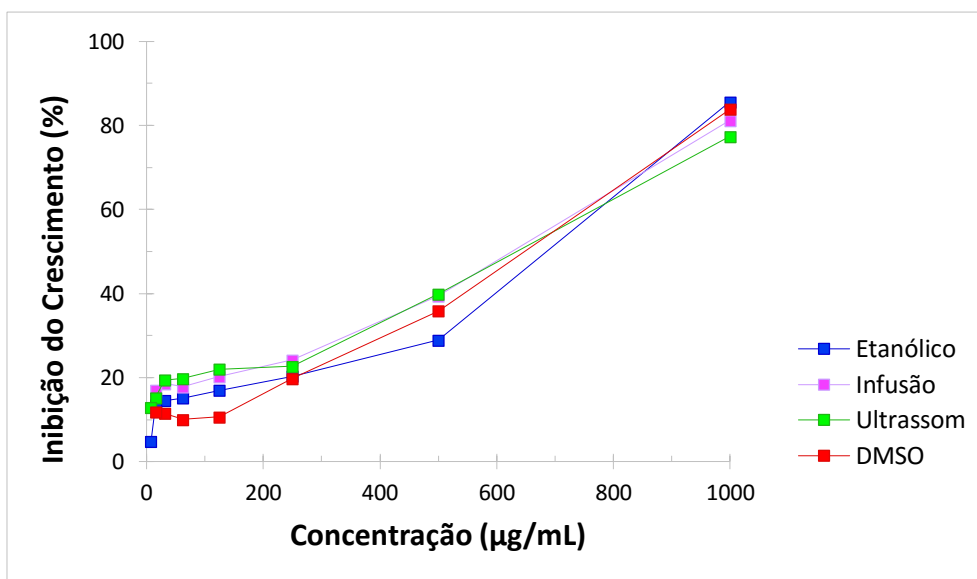
Tabela 5. Determinação da CIM do *A. bisporus* utilizando a resazurina como revelador.

Bactérias	Extratos			Controle Positivo		Solvente
	Infusão	Ultrassom	Maceração	Ampicilina	Amoxicilina	DMSO
<i>E. coli</i>	1000	1000	1000	1,56	-	10%
<i>S. aureus</i>	> 1000	> 1000	> 1000	0,39	-	-
<i>H. pylori</i>	1000	1000	1000	-	31,2	10%

*valores em µg/mL; (-) sem inibição

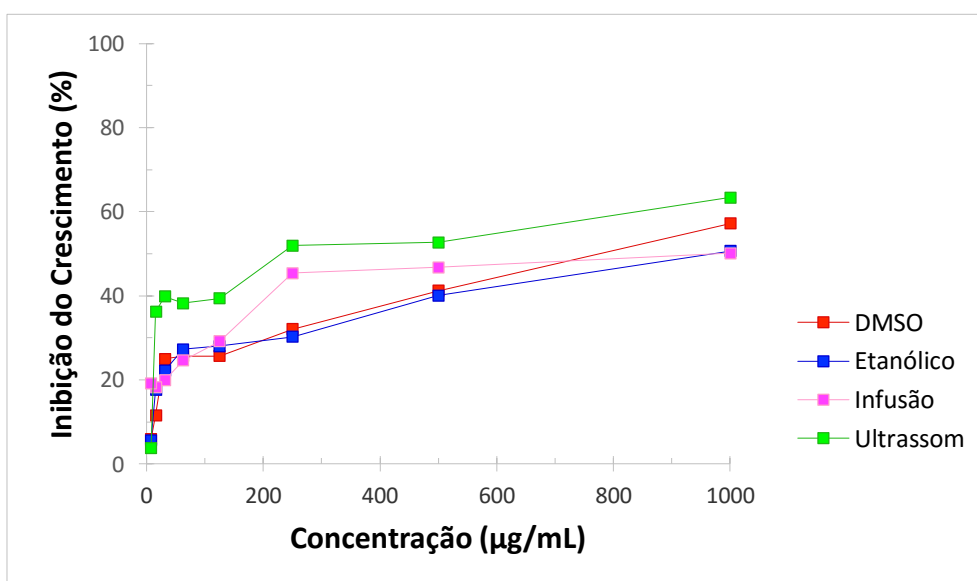
Após leitura no espectrofotômetro foram confeccionados gráficos com as porcentagens de inibição encontradas. As Figuras 14, 15 e 16 apresentam as porcentagens de inibição para *E. coli*, *S. aureus* e *H. pylori* respectivamente.

Figura 14. Porcentagem de inibição de crescimento referente aos extratos do *A. bisporus* frente a *E. coli*.



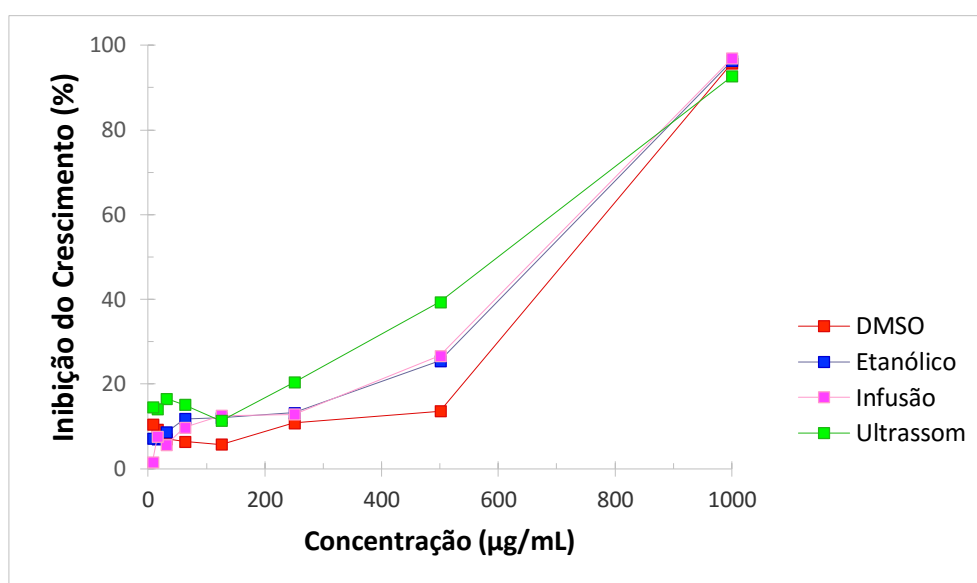
A análise dos gráficos possibilitou concluir que os extratos provenientes da ultrassom e infusão foram capazes de inibir aproximadamente 40% do crescimento a uma concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. A curva do solvente também se mostra muito próxima a curva dos extratos, sugerindo uma provável atividade do solvente.

Figura 15. Porcentagem de inibição de crescimento referente aos extratos do *A. bisporus* frente a *S. aureus*.



Observa-se que a maior inibição dos extratos de *A. bisporus* frente ao *S. aureus* ocorre com o extrato proveniente do ultrassom, inibindo 50% do crescimento, seguido do extrato de infusão com 45% de inibição, ambos na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$. Mais uma vez o solvente não foi capaz de inibir 100% do crescimento do *S. aureus* na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ o que está de acordo com os resultados apresentados nas microplacas.

Figura 16. Porcentagem de inibição de crescimento referente aos extratos do *A. bisporus* frente ao *H. pylori*.



Observa-se que a maior inibição do *A. bisporus* frente ao *H. pylori* é proveniente da extração com o ultrassom com aproximadamente 40% de inibição do crescimento a 500 $\mu\text{g/mL}$, seguida pelos extratos da maceração e infusão, inibindo aproximadamente 30% do crescimento também a 500 $\mu\text{g/mL}$. A atividade dos extratos a 1000 $\mu\text{g/mL}$ se mostra decorrente de uma possível atividade do solvente que também apresenta 100% de inibição nesta concentração.

4.3.3 Atividade antibacteriana do *Agaricus blazei*

Os resultados da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos do *Agaricus blazei* são apresentados na Tabela 6. Em todos os experimentos os

controles positivos, do meio, do crescimento microbiano e dos solventes com e sem inóculo apresentaram resultados adequados.

Observou-se que, para o *H. pylori*, o controle do solvente nos poços contendo 10% de DMSO as bactérias não cresceram o que demonstra a atividade inibitória do próprio solvente. De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que os extratos do *A. blazei* não apresentaram atividade bactericida ou bacteriostática frente as cepas testadas.

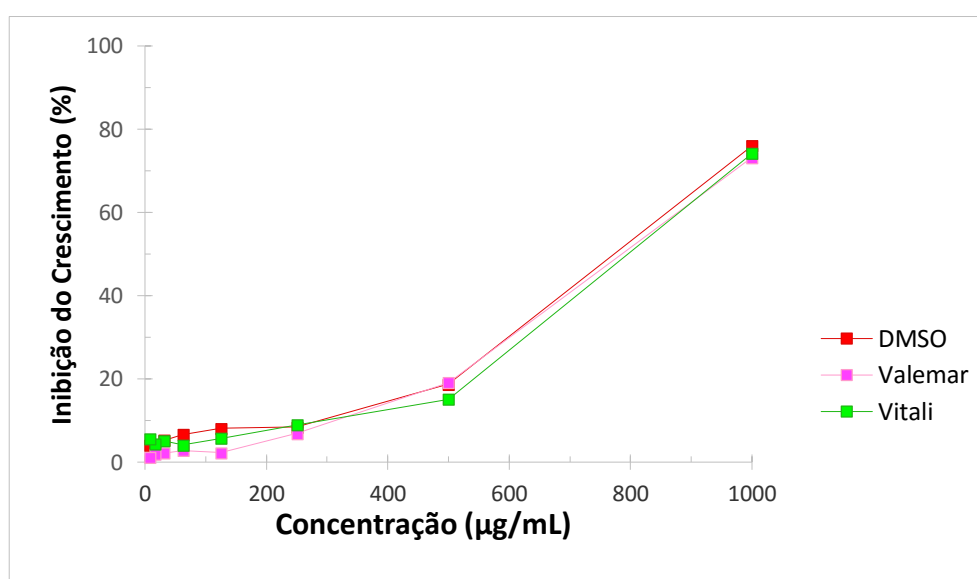
Tabela 6. Determinação da CIM do *A. blazei* utilizando a resazurina como revelador.

Bactérias	Extratos		Controle Positivo		Solvente
	Vitali	Valemar	Ampicilina	Amoxicilina	DMSO
<i>E. coli</i>	>1000	> 1000	1,56	-	-
<i>S. aureus</i>	> 1000	> 1000	0,39	-	-
<i>H. pylori</i>	1000	1000	-	31,2	10%

*valores em µg/mL; (-) sem inibição

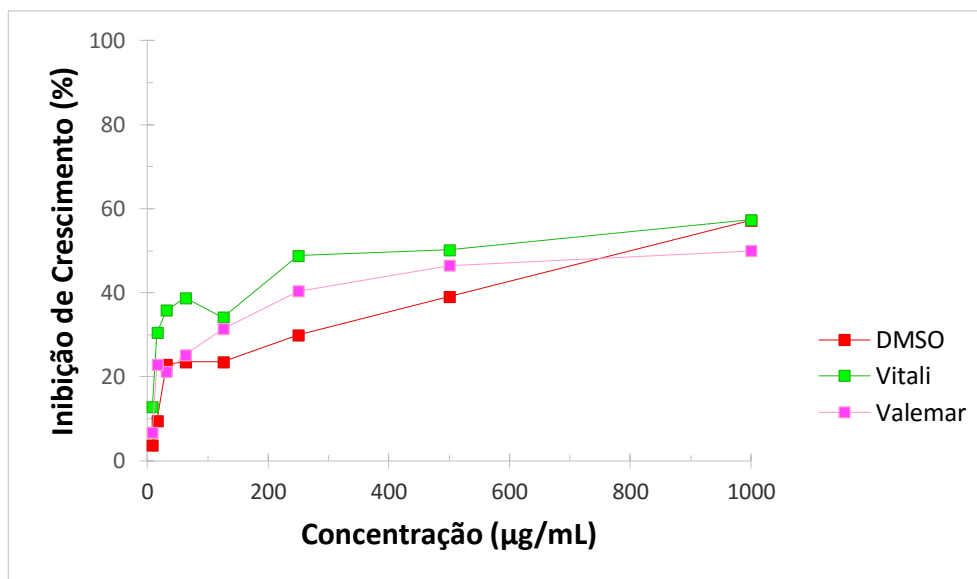
Após leitura no espectrofotômetro foram confeccionados gráficos com as porcentagens de inibição encontradas. As Figuras 17, 18 e 19 apresentam as porcentagens de inibição para *E. coli*, *S. aureus* e *H. pylori* respectivamente.

Figura 17. Porcentagem de inibição de crescimento referente aos extratos do *A. blazei* frente ao *E. coli*.



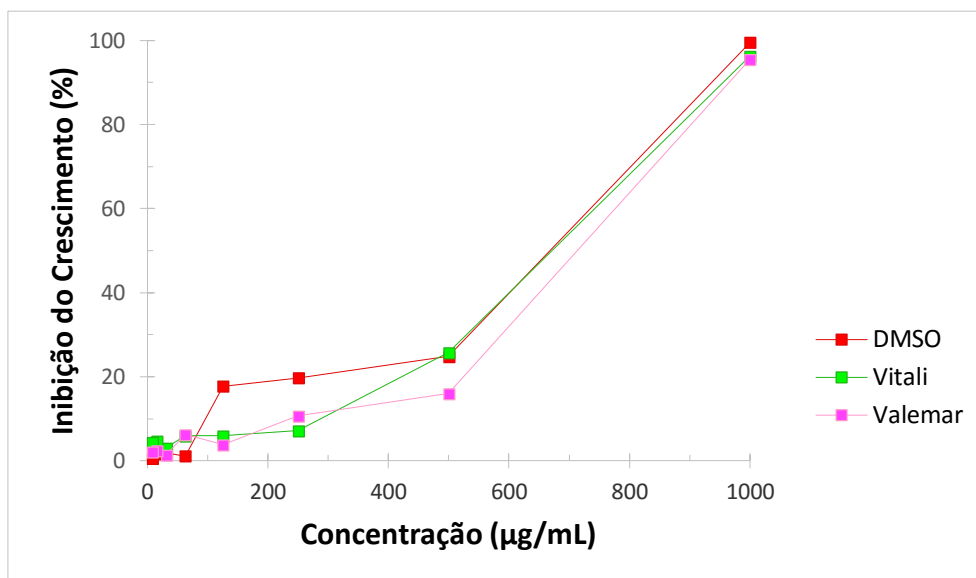
Pelos gráficos pode-se observar curvas muito semelhantes indicando a inibição de aproximadamente 20% do crescimento a 500 $\mu\text{g/mL}$ para as duas marcas, Vitali e Valemar. Entretanto, a curva do DMSO também se assemelha a curva dos extratos o que sugere a atividade do próprio solvente e não dos extratos.

Figura 18. Porcentagem de inibição de crescimento referente aos extratos do *A. blazei* frente ao *S. aureus*.



Analisando os resultados apresentados pode-se concluir que o extrato do *A. blazei* da marca Vitali apresentou a maior porcentagem de inibição frente ao *S. aureus*, com 50% de inibição de crescimento, seguido da marca Valemar com 40%, ambos na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$. Nessa mesma concentração observa-se que o DMSO foi capaz de inibir apenas cerca de 20% do crescimento, indicando uma possível atividade ou efeito aditivo dos extratos.

Figura 19. Porcentagem de inibição de crescimento referente aos extratos do *A. blazei* frente ao *H. pylori*.



O gráfico mostra que o extrato da marca Vitali apresentou 25% de inibição na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, porém a curva do DMSO mostra a mesma porcentagem de inibição na mesma concentração, o que sugere uma atividade do próprio solvente.

4.4.4 Atividade antibacteriana da substância β -glucana

Os resultados da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da substância isolada β -glucana são apresentados na Tabela 7. Em todos os experimentos os controles positivos, do meio, do crescimento microbiano e dos solventes com e sem inóculo apresentaram resultados adequados.

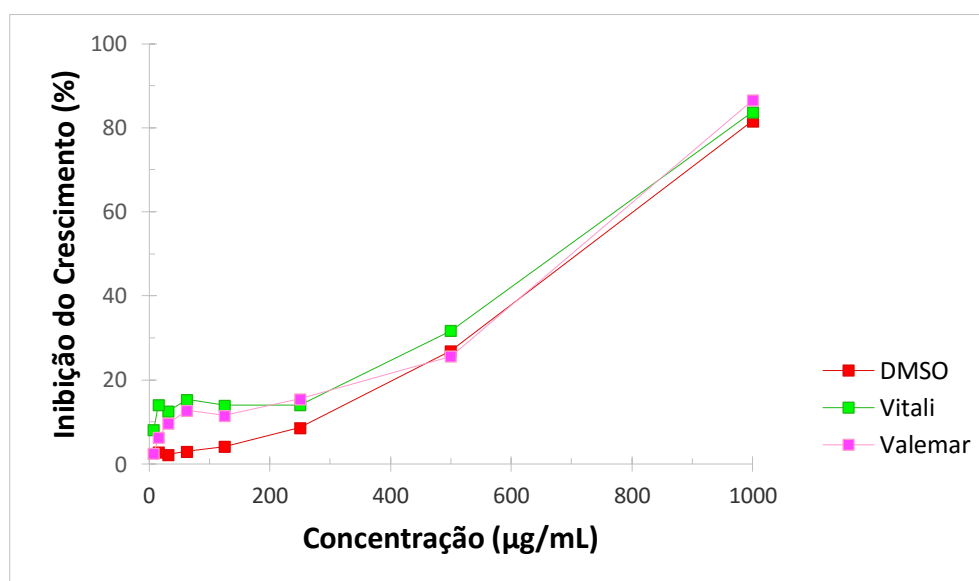
Observou-se que, para o *H. pylori*, o controle do solvente nos poços contendo 10% de DMSO as bactérias não cresceram o que demonstra a atividade inibitória do próprio solvente. De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que a substância isolada β -glucana não apresentou atividade bactericida ou bacteriostática frente as cepas testadas.

Tabela 7. Determinação da CIM da β -glucana utilizando a resazurina como revelador.

Bactérias	Extratos		Controle Positivo		Solvente
	Vitali	Valemar	Ampicilina	Amoxicilina	DMSO
<i>E. coli</i>	> 1000	> 1000	1,56	-	-
<i>S. aureus</i>	> 1000	> 1000	0,39	-	-
<i>H. pylori</i>	1000	1000	-	31,2	10%

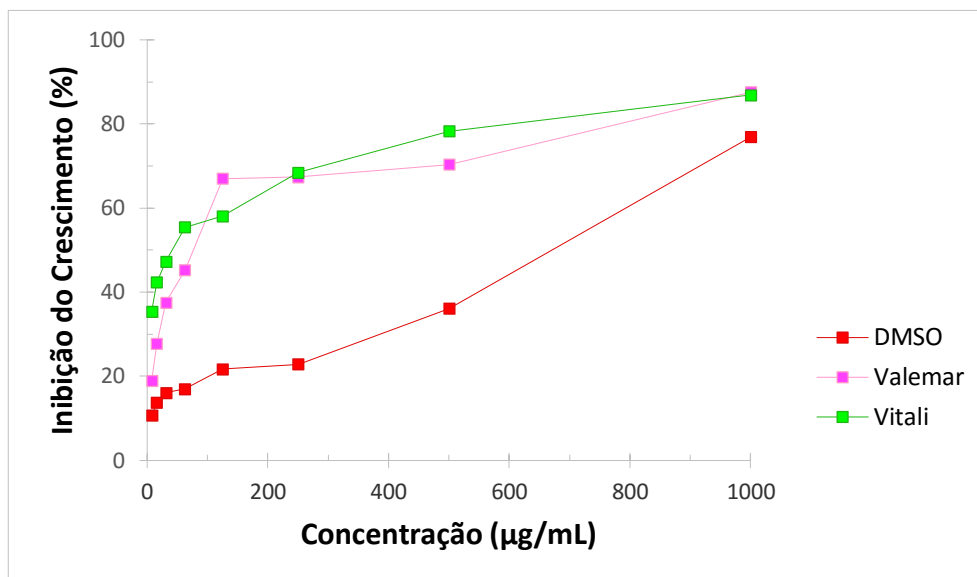
*valores em $\mu\text{g/mL}$; (-) sem inibição

Após leitura no espectrofotômetro foram confeccionados gráficos com as porcentagens de inibição encontradas. As Figuras 20, 21 e 22 apresentam as porcentagens de inibição para *E. coli*, *S. aureus* e *H. pylori* respectivamente.

Figura 20. Porcentagem de inibição de crescimento referente a β -glucana frente ao *E. coli*.

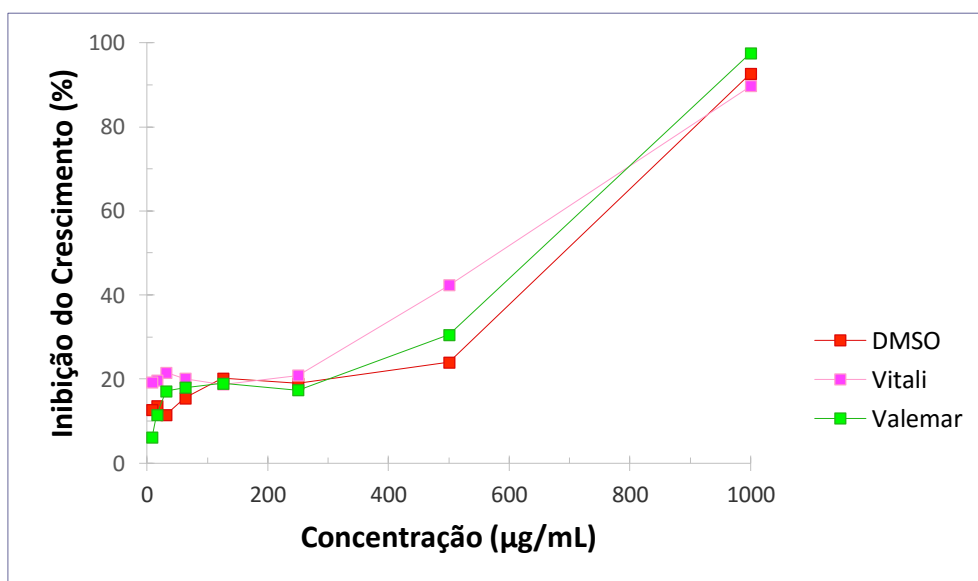
Pelo gráfico observa-se que as três curvas são muito semelhantes, com inibição de aproximadamente 30% na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, sugerindo uma atividade do solvente e não dos extratos.

Figura 21. Porcentagem de inibição de crescimento referente a β -glucana frente ao *S. aureus*.



Pela análise dos gráficos observou-se que a β -glucana da marca Vitali apresentou uma inibição de 80% do crescimento, seguido pela marca Valemar com aproximadamente 70%, ambos na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. Nesta mesma concentração o DMSO foi capaz de inibir apenas 40% do crescimento o que pode sugerir uma atividade ou efeito aditivo dos extratos frente ao *S. aureus*.

Figura 22. Porcentagem de inibição de crescimento referente a β -glucana frente ao *H. pylori*.



O gráfico acima indica que a maior inibição foi do extrato proveniente da marca Valemar, apresentando 40% de inibição na concentração de 500 µg/mL. O DMSO nessa concentração foi capaz de inibir apenas 20% do crescimento sugerindo uma possível atividade do extrato.

5. DISCUSSÃO

A utilização de produtos naturais para o alívio e cura de doenças está presente na humanidade desde o início das civilizações (BARREIRO et al., 2009). A natureza apresenta um grande número de espécies que produzem biomoléculas com diferentes propriedades químicas, o que incentiva a busca e investigação de novas substâncias com potencial terapêutico até os dias de hoje (CRAGG e NEWMAN, 2013; ATANSOV et al., 2015).

Neste contexto, os cogumelos aparecem como uma oportunidade a ser investigada. Diversos estudos mostram que cogumelos contêm uma grande variedade de biomoléculas com propriedades nutricionais e medicinais (LINDEQUIST et al., 2005; POUCHERET et al., 2006 e KALAC, 2009). Por possuírem essas propriedades os cogumelos estão sendo reconhecidos como uma grande fonte natural de substâncias ativas para o desenvolvimento de medicamentos e nutracêuticos (ALVES et al., 2012).

No presente estudo, além da investigação da atividade antibacteriana de três espécies de cogumelos, também foram investigadas diferentes formas de extração, afim de extrair diferentes compostos e aumentar a possibilidade de serem encontradas substâncias com propriedades ativas.

A metodologia de infusão, baseada na extração com água quente, foi proposta a fim de ser utilizada uma técnica simples e caseira, podendo assim ser relacionada com o uso dos cogumelos na preparação dos alimentos. A infusão é aplicável a partes vegetais moles, cortadas ou pulverizadas, o que facilita penetração e extração das substâncias pela água (SIMÕES, 2003). A ultrassom foi utilizada para de promover a fragmentação das estruturas e membradas, através da utilização de uma alta corrente, e assim facilitar a liberação dos compostos presentes (TIWARI, 2015). Já a maceração, em que foi utilizado

o etanol como solvente, teve como objetivo extrair diferentes tipos de compostos, por possuir uma polaridade diferente a da água (NAIMA et al., 2015).

Quando analisados os resultados da extração em relação massa obtida, observou-se que os três métodos apresentaram um rendimento parecido, o que sugere que as três metodologias tem mesma capacidade de extração. Entretanto, os resultados apresentados a partir da leitura espectrofotométrica, com as porcentagens de inibição, mostraram que os extratos obtidos a partir do ultrassom foram mais ativos do que os extratos provenientes da maceração e infusão. Este fato pode ter ocorrido devido ao processo de ultrassom promover o desgaste das membranas celulares, aumentando a degradação das células e promovendo uma maior penetração do solvente, o que pode ter aumentado a extração de substâncias potencialmente ativas (TIWARI, 2015).

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos compostos, entre eles, os mais conhecidos são o método de difusão em ágar e a microdiluição. Para determinar a CIM de extratos vegetais o método mais utilizado é a microdiluição, principalmente devido à sua sensibilidade e quantidade mínima de reagentes, o que possibilita um maior número de réplicas, aumentando a confiabilidade dos resultados (OSTROSKY et al., 2008). O método de microdiluição foi utilizado por Araújo et al. (2012) para determinar a CIM de extratos etanólicos e metanólicos de folha de *Leiothris spirallis* frente a 10 cepas de micro-organismos, entre fungos e bactérias. Os testes foram revelados com resasurina e os resultados foram promissores contra *Candida* sp. e bactérias Gram positivas. Yessoufou et al. (2015) determinaram a atividade antifúngica e antibacteriana de isolado dos extratos de *Ficus dupacea* frente a 15 cepas de micro-organismos, entre fungos e bactérias, pela técnica de microdiluição. Os resultados mostram a atividade dos isolados frente a todas as cepas, exceto para *Candida albicans*. Rashed et al. (2014) também utilizaram a técnica de microdiluição para determinar a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos

metanólicos e compostos fenólicos dos frutos de *Diospyros virginiana* L. frente a 16 cepas. Assim como no presente estudo foram realizadas leituras espectrofotométricas para determinar a porcentagem de inibição dos extratos. Todos os compostos e extratos testados apresentaram atividades inibitórias frente as cepas testadas. Estudos publicados por Ren et al. (2014) compararam a atividade antibacteriana de 8 espécies de extratos aquosos de cogumelo pela determinação da CIM, por duas técnicas diferentes. A CIM foi determinada pelo método de difusão em ágar, em que a leitura dos resultados é feita através do diâmetro dos halos de inibição e pela técnica de microdiluição, em que os resultados foram obtidos pelas leituras espectrofotométricas e assim determinadas as porcentagens de inibição de crescimento. Concluiu-se que o método de microdiluição foi mais efetivo e que os extratos inibiram maior número de bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas.

A técnica de microdiluição ainda permite a utilização de diversos controles que nos auxiliam na interpretação dos resultados, evitando que erros sejam cometidos durante as análises. Os controles de esterilidade do meio e dos extratos auxiliaram na identificação de possíveis contaminações. Os controles positivos feitos com os antibióticos permitiram a comparação da atividade dos extratos com medicamentos padrões em que a CIM já é determinada. O controle de crescimento bacteriano foi feito para verificar se o meio e as bactérias eram viáveis e possuam um crescimento adequado. Neste experimento o controle do solvente utilizado (DMSO) foi de extrema importância, pois através dele foi possível identificar que em alguns casos a atividade observada na placa era decorrente do solvente e não da ação dos extratos, fato também observado nos gráficos de inibição de crescimento. Com este controle foi possível evitar resultados falso-positivos que indicariam uma atividade que o extrato não possui.

Os resultados obtidos neste estudo foram discordantes quando comparadas as formas de leitura empregadas. Quando analisada a CIM utilizando a resazurina como revelador, não foi observada atividade bactericida ou bacteriostática de nenhum dos extratos, uma vez que a partir da concentração mais alta analisada observou-se a presença da coloração rósea, indicativo de crescimento bacteriano. Entretanto, de acordo com as leituras espectrofotométricas, pode-se notar que alguns extratos promoveram inibição do crescimento em um menor percentual de inibição (<90%). Essa discordância de resultados acontece devido à sensibilidade e/ou ponto de viragem da resazurina. A resazurina apesar de usual, possui a limitação inerente a concentração de crescimento bacteriano, que detecta somente quando ocorre uma porcentagem de inibição maior que 90% (HORNER et al., 2008; STOPPA et al., 2009 e GUDIÑA et al., 2010).

A importância da leitura espectrofotométrica está na possibilidade de se identificar diferentes porcentagens de inibição de crescimento bacteriano, que variam de 0 a 100%, demonstrando uma maior sensibilidade. Além disso os dados espectrofotométricos são facilmente observados com a apresentação em forma de gráficos.

Na literatura são encontrados estudos que determinam a atividade antimicrobiana dos cogumelos aqui estudados, entretanto, nestes estudos são empregadas diferentes metodologias de extração e de determinação da atividade bacteriana, assim como apontam resultados frente a diferentes micro-organismos. Na literatura atual não existem muitos estudos que investigam a atividade antimicrobiana de cogumelos utilizando a técnica de microdiluição, o que destaca o ineditismo dos resultados obtidos nesse estudo.

Além disso é importante salientar que os resultados apresentados aqui são provenientes de extratos fúngicos e referem-se atividade antibacteriana dos metabólicos secundários produzidos por esses macrofungos. Esses metabólitos podem sofrer variações de concentração em decorrência de fatores ambientais, como temperatura e condições

hídricas, assim como época de colheita e modo de cultivo, o que pode justificar possíveis divergências nos resultados encontrados aqui descritos (SILVA et al., 2010).

Bisen et al. (2009) demonstraram a atividade antibacteriana de extratos dos frutos secos do *L. edodes* extraídos com clorofórmio, acetato de etila e água. Esses extratos apresentaram uma maior atividade contra bactérias Gram positivas do que Gram negativas, com destaque para o *B. subtilis* e *S. aureus*. Os autores ainda apontam a lentionina como a principal substância responsável pela atividade antibacteriana dos extratos, que por sua vez pode não ter sido extraída com os solventes utilizados neste trabalho ou apresentar-se em pequenas concentrações, justificando o menor potencial de inibição encontrado frente ao *S. aureus* aqui reportado. Os melhores resultados de atividade do *L. edodes* apresentados por Bisen et al. (2009) foram com os extratos clorofórmicos.

Hearst et al. (2009) demonstraram a atividade de extratos aquosos de *L. edodes* frente a 39 micro-organismos, entre eles o *S. aureus* e *E. coli*, pela técnica de difusão em ágar, com um halo de inibição de 12 e 9 mm respectivamente. Mais uma vez os extratos de *L. edodes* foram mais ativos frente as bactérias Gram positivas. Nossos resultados não apresentaram atividade do *L. edodes* frente a *E. coli*, possivelmente porque a metodologia empregada foi diferente. Estudo realizado por Alves et. al. (2012) comparando os métodos de difusão em ágar e microdiluição indicam que apesar da difusão em ágar apresentar maiores valores de inibição, a técnica de microdiluição é mais sensível para determinar a atividade antimicrobiana, o que exalta os resultados apresentados nesse trabalho. Os dois trabalhos citados acima estão de acordo com os resultados reportados por nós que indicam uma relativa atividade dos extratos de *L. edodes* frente ao *S. aureus*.

Negri (2012) determinou a atividade de extratos aquosos e etanólicos do *L. edodes*, porém seus resultados foram discordantes dos resultados apresentado no presente

trabalho. Seus estudos mostraram uma significativa atividade dos extratos aquosos frente a *E. coli* e *S. aureus* (CIM = 31,2 µg/mL) e (CIM = 15,6 µg/mL) respectivamente. E ainda resultados mais expressivos para os extratos etanólicos, com CIM = 3,9 µg/mL frente ao *S. aureus* e CIM = 15,6 µg/mL frente a *E. coli*. Os resultados aqui reportados mostram que os extratos de *L. edodes* possuem uma maior atividade contra o *S. aureus*, assim como foi mostrado nos estudos de Negri (2012), porém no presente estudo não foi possível observar a CIM utilizando a rezasurina como revelador. Estes resultados podem ser divergentes, possivelmente, pelo estudo de Negri (2012) ter utilizado uma diferente forma de preparação da amostra. O teste foi realizado com toda a solução extrativa, diferente do presente estudo em que o extrato foi completamente seco e depois suspenso em outro solvente. As substâncias responsáveis pela atividade podem ter evaporado na secagem do solvente e podem justificar a diferença entre os resultados apresentados.

A atividade antimicrobiana do *Agaricus bisporus* foi publicada por Öztürk et al. (2011), que descreveu os efeitos dos extratos metanólicos contra seis espécies de bactérias Gram positivas e sete Gram negativas, entre elas o *S. aureus* e a *E. coli* e duas espécies fúngicas. Os resultados demonstraram que as bactérias Gram positivas foram mais sensíveis que as Gram negativas, corroborando com os resultados apresentados nesse estudo em que o *S. aureus* foi mais sensível aos extratos de *A. bisporus* do que as demais bactérias. Além disso os resultados apresentados por esses autores mostram uma inibição mais expressiva do *A. bisporus*, o que não ocorreu no presente estudo. Essa divergência pode ter ocorrido pois foi utilizado a difusão em ágar para a determinação da atividade antibacteriana e a extração dos cogumelos foi feita com metanol. Stojkovic et al. (2014) compararam a atividade do extrato metanólico e etanólico do *A. bisporus*, mostrando que o extrato metanólico apresenta uma maior atividade frente ao *S. aureus*.

Atualmente, algumas espécies de cogumelos vêm sendo utilizados na medicina tradicional em diversos países, como China, Coréia, Japão e outros países asiáticos, para

o tratamento de diversas doenças, incluindo úlceras orais, distúrbios gastrintestinais, doenças linfáticas e vários tipos de cânceres. Em particular, o polissacarídeo, β -glucana, tem chamado muito atenção, por ser o componente majoritário responsável pela atividade biológica dos cogumelos (ZHU et al., 2015). Um dos cogumelos que possui uma grande quantidade de β -glucana é o *Agaricus blazei* e por isso é atualmente um dos cogumelos mais estudados (GONZAGA et al., 2013).

Estudos de Angeli et al. (2009) mostraram o potencial anti-inflamatório e antitumoral da β -glucana. Chan et al. (2009), explicaram a ação dessa substância no sistema imune humano e como ela age nas células cancerígenas. Muito se estuda sobre essas substâncias com o foco antitumoral, anti-inflamatório e imunológica, mas há uma escassez na literatura de estudos sobre a atividade antimicrobiana desses compostos, o que exalta importância e o ineditismo do presente trabalho.

A β -glucana se mostra como um componente eficaz e ideal para ser utilizado como princípio ativo de medicamentos. Entretanto, a sua extração e purificação é um trabalho difícil o que faz aumentar a necessidade estudos que buscam otimizar os procedimentos de extração e purificação deste componente (ZHU et al., 2015). Além disso, o mecanismo da atividade biológica de isolados de β -glucana a partir de cogumelos comestíveis e medicinais ainda não está completamente elucidado e tem chamado muito a atenção dos pesquisadores (ÖZTÜRK et al., 2015).

Desta maneira os resultados apresentados nesse estudo mostrando que a β -glucana possui uma atividade moderada contra o *S. aureus* são de grande valia e dão continuidade a investigação e ao entendimento desse composto tão estudado dentro da comunidade científica.

Os resultados apresentados nesse trabalho são relevantes, uma vez que foi demonstrada a inibição moderada de crescimento bacteriano promovida pelas espécies estudadas frente ao *Staphylococcus aureus*, direcionando estudos futuros que podem

demonstrar a capacidade sinérgica da ação dos extratos de cogumelos com fármacos já empregados na clínica, promovendo a diminuição da dose terapêutica e consequentemente a redução dos efeitos tóxicos e/ou cumulativos. Além disso, o estudo também contribuiu para a investigação de medidas profiláticas e terapêuticas promovidas pelo consumo das espécies estudadas, uma vez que são amplamente consumidas pela população e podem atuar como adjuvantes no tratamento de infecções de origem gástrica.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados nos possibilitam concluir que:

- O método extrativo de ultrassom foi mais eficaz na obtenção de extratos com componentes ativos com propriedades antimicrobianas do que os extratos de infusão e maceração.
- Os extratos de *Lentinus edodes* e *Agaricus bisporus* obtidos por ultrassom, infusão e maceração apresentaram relativa atividade frente ao *Staphylococcus aureus*, mas não demonstraram atividade frente a *Escherichia coli* e ao *Helicobacter pylori*.
- Os extratos da marca Vitali se mostraram mais eficazes em sua atividade antimicrobiana quando comparados aos extratos da marca Valemar.
- Os extratos do *Agaricus blazei* mostraram uma relativa atividade frente ao *Staphylococcus aureus*, mas não demonstraram atividade frente a *Escherichia coli* e ao *Helicobacter pylori*.
- Os extratos com isolados de β -glucana apresentaram uma moderada atividade frente ao *Staphylococcus aureus*, mas não demonstraram atividade frente a *Escherichia coli* e ao *Helicobacter pylori*.

7. REFERÊNCIAS

- AIDA, F. M. N. A.; SHUHAIMI, M.; YAZID, M.; MAARUF, A. G. Mushrooms as a potential source of prebiotics: a review. **Trends in food science e technology**, v. 20, p. 567-575, 2009.
- ALVES, J. M.; FERREIRA, I. C. F. R.; DIAS, J.; TEIXEIRA, V., MARTINS, A.; PINTADO, M. A review on Antimicrobial Activity of Mushroom (Basidiomycetes) Extracts and Isolated Compounds. **Planta Médica**, v. 78, p. 1707-1718, 2012.
- ANGELI, J. P. F.; RIBEIRO, L. R.; CAMELINI, C. M.; MENDOÇA, M. M. de; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the antigenotoxicity of polysaccharides and β -glucanas from *Agaricus blazei*, a model study with single cell gel electrophoresis/Hep G2 assay. **Journal of Food Cosmopolition and Analysis**, v. 22, p. 699-703, 2009.
- ARAÚJO, M. G. F.; HILÁRIO, F.; NOGUEIRA, L. G.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; BAUAB, T. M. Chemical constituents of the methanolic extract of leaves of *Leiothrix spiralis* Ruhland and their antimicrobial activity. **Molecules**, v. 16, p. 10479-10490, 2011.
- ARAÚJO, M. G. F.; HILÁRIO, F.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; BRUNETTI, I. L.; SOTOMAYOR, C. E.; BAUAB, T. M. Correlation among antioxidant, antimicrobial, hemolytic and antiproliferative properties of *Leiothrix spiralis* Ruhland leaves extract. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 9270-9277, 2012.
- ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.; LINDER, T.; WAWROSC, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; SCHWAIGER, S.; HEISS, F. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R. DIRCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S.; Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química nova**, v. 32, n.3, p. 679-688, 2009.
- BONIFÁCIO, B. V.; RAMOS, M. A. S.; SILVA, P. B.; BAUAB, T. M. Antimicrobial activity of natural products against *Helicobacter pylori*: a review. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v. 13, n. 54, p. 1-10, 2014.
- BISEN, P. S.; BAGHEL, R. K.; SANODIYA, B. S.; THAKUR, G. S.; PRASAD, G. B. K. S. *Lentinus edodes*: A macrofungus with pharmaceutical activities. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2419-2430, 2010.
- CHAN, G. C.; CHAN, W. K., SZE, M. D. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. **Journal of Hematology and Oncology**. v. 2, n. 25, 2009.

CINDORUK, M.; ERKAN, G.; KARAKAN, T.; DURSUN, A.; UNAL, S.; Efficacy and safety of *Saccharomyces boulardii* in 14-day triple anti-*Helicobacter pylori* therapy: a prospective randomized placebo-controlled double-blind study. **Helicobacter**, v. 13, p. 309-316, 2007.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility for bacterial that grow aerobically; approved standards – 6th ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility for bacterial that grow aerobically; approved standards – 6th ed. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement M100-S16 (tab 2J). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006a.

COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-582, 1999.

CRAGG, G. M. E NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p.670–3695, 2013.

DELMANTO, R.; LIMA, P.; SUGUI, M.; EIRA, A.; SALVADORI, D.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murril mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamid, **Mutation Research**, v. 496, p.15-21, 2001.

DIAS, E. S.; ABE, C.; SCHAWN, R. F. Truths and myths about the mushroom *Agaricus blazei*. **ScientiaAgricola**, v. 61, n. 5, p. 545-549, 2004.

ELOFF, J.N. A Sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. *Planta Medica*, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

FRANCHESCHI, F.; CAZZATO, A. NISTA, E.; SCARPELLINI, E.; ROCCARINA, D.; GIGANTE, G. Role of probiotics in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, v. 12, p. 59-63, 2007.

FUKUSHIMA, R.S.; WEIMER, P.J.; KUNZ, D.A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, n. 1, p. 22-26, 2003.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T.; Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência de alimentos comestíveis**, v. 27, n.1, p. 154-157, 2007.

GONZAGA, M. L. C.; MENEZES, T. F.; DE SOUZA, J. R. R.; RICARDO, N. M. P. S.; SOARES, S. A. Structural characterization of β glucans isolated from *Agaricus blazei* Murill using NMR and FTIR spectroscopy. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 2, n. 2, p. 152–156, 2013.

GUDIÑA, E. J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Antimicrobial and antiadhesive properties of biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. Paracasei A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n 4, p. 419-424, 2010.

HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 71-74, 2001.

HEARST, R.; NELSON D.; McCOLLUM, G.; MILLAR, B. C; MAEDA, Y.; GOLDSMITH, C. E.; ROONEY, P. J.; LOUGHREY, A.; RAO J. R.; MOORE, J. E. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of shiitake (*Lentinus edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 15, p. 5 -7, 2009.

HOJSAK, I.; KOS, T.; DUMANEIE, J.; MISAK, Z.; JADRESIN, O.; KEKEZ, A. J.; GRILIE, A. G.; KOLAEK, S. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in pediatric - 10 years' experience. **European Journal of Pediatrics**, v. 171, p. 1325-1330, 2012.

HORNER, M.; GIGLIO, V.F.; SANTOS, A.J.R.W.A.; WESTPHALEN, A.B.; INGLESIAS, B.A.; MARTINS, P.R.; AMARAL, C.H.; MICHELOT, T.M.; REETZ, L.G.B.; BERTONCHELI, C.M.; PARAGINSKI, G.L.; HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.

KALAC, P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: a review. **Food Chemistry**, v.113, p. 9–16, 2009.

LARGETEAU, M. L.; LLARENA-HERNÁNDEZ, R. C.; RENAULT-ROGER, C.; SAVOIE, J. The medicinal *Agaricus* mushroom cultivated in Brazil: biology, cultivation and non-medicinal valorization. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 92, p. 897-907, 2011.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T. H. J.; JÜLICH, W. D. The pharmacological potential of mushrooms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 285–299, 2005.

LIU, J. H.; LI, L.; SHANG, X.; ZHANG, J., TAN, Q. Anti-*Helicobacter pylori* activity of bioactive componentes isolated from *Hericium erinaceus*. **Journal of Ethnopharmacology**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.004>, 2015.

MENOLI, R. C. R. N.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L. R.; SPEIT, G.; JORDÃO, B. Q. Antimutagenic effects of mushroom *Agaricus blazei* Murril extracts on V79 cells. **Mutation Research**, v. 496, p. 5-13, 2001.

NAIMA, R.; OUMAM, M.; HANNACHE, H.; SESBOU, A.; CHARRIER, B.; PIZZI, A.; Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan *Acacia mollissima* barks. **Industrial crops and Products**, v. 70, p. 245-252, 2015.

NEGRI, K. M. S.; **Estudo comparativo de diferentes cogumelos comestíveis comercializado no Brasil: ação contra radicais livres, espécies reativas e atividade antibacteriana**. 2012. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista de Mesquita Filho, Araraquara, 2012.

OHNO, N.; FURUKAWA, M.; MIURA, N. N.; ADACHI, Y. MORROR, M.; YADOMAE. Antitumor β -glucan from cultures fruit body of *Agaricus blazei*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 24, n. 7, p. 820-828, 2001.

OSAKI, Y.; KATO, T.; YAMAMOTO, K.; OKUBO, J.; MIYAZAKI, T. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a basidiomycet e *Agaricus blazei*. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 114, n. 5, p. 342-350, 1994.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKI, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008.

ÖZTÜRK, M.; TEL-CAYAN, G.; MUHAMMAD, A.; TERZIOĞLU, P.; DURU, M. E. Chapter 10 – Mushrooms: A Source of Exciting Bioactive Compounds. **Studies in Natural Products Chemistry**. v. 45, p. 263-456, 2015.

ÖZTÜRK, M.; DURU, M. E.; KIVRAK, S.; MERCAN-DOGAN, N.; TURKOGLU, A.; OZLER, M.; A. 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 Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1353-1360, 2011.

PALOMINO, J. C.; MARIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTELS, F. Resazurin microtier 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.

POUCHERET, P.; FONS, F.; RAPIOR, S. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-Year retrospective analysis. **Cryptogamie Mycologie**, v. 27, p. 311–33, 2006.

RAI, M.; TIDKE, G.; WASSER, S. P. Therapeutic potential of mushrooms. **Natural Product Radiance**, v. 4, p. 246-257, 2005

RASHED, K.; CIRIC, A.; GLAMOCLIIJA, J.; SOKOVIC, M. Antibacterial and antifungal activities of methanol extract and phenolic compounds from *Diospyros virginiana* L. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 2010-2015, 2014.

REN, L.; HEMAR, Y.; PERERA, C. O.; LEWIS, G.; KRISANSSEN, G. W.; BUCHANAN, P. K. Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms, **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 3, p. 41-51, 2014.

ROSA, L. M.; MACHADO, K. M. G.; JACOB, C. C.; CAPELARI, M.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 908, n 7, p. 967-974, 2003.

SANCHEZ, J. E.; MEIJA, L.; ROYSE, D. J. Pandora grass colinze with scytalidium thermophilum for production of *Agaricus bisporus*, **Bioresoruce of Technology**, v. 99, p. 655-662, 2008.

SHANG, X.; TAN, Q.; LIU, R. YU, K.; LI, P.; ZHAO, G. In Vitro Anti-*Helicobacter pylori* Effects of Medicinal Mushroom Extracts, with Special Emphasis on the Lion's Mane Mushroom, *Hericium erinaceus* (Higher Basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 15, p.165-174, 2013.

SILVA, R. M. G.; SARAIVA, T. S.; SILVA, R. B.; GOLÇALVES, L. A.; SILVA, L. P. Potencial alelopático de extrato etanólico de *Anadenantheramacrocarpae Astronium graveolens*. **BioscienceJournal**, v. 26, n. 4, p. 632-637, 2010.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; COMCEIÇÃO, S. R.; KUSTER, R. M.; OLIVEIRA FILHO, A. M.; LAGE, C. L. S. Natural products for dengue transmission control-larvicidal activity of Myroxylonbalsamim and of terpenoid and phenylpropanoids. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 46-49, 2004.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5. ed, 2003.

SOUZA-PACCOLA, E. A.; BOMFETI, C. A.; FAVARO, L. C. L.; FONSECA, I. C. B.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Antimutagenic action of *Lentinula edodes* and a *Agaricus blazei* and *Aspergillus nidulans* conidia. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 311-315, 2003.

STOJKOVIC, D.; REIS, F. S; GLAMOCLIIJA, J.; ORIC, A., BARROS, L.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D.; FERRIERA, I. C. F. R.; SOLOVIC, M. Cultivated strains of *Agaricus bisporus* and *A. brasiliensis*: chemical characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial properties for the final healthy product - naturalpreservatives in yoghurt. **Food and Function**, v. 5, p. 1602-1612, 2014.

STOPPA, M. A.; CASEMIRO, L. A.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; MARTINS, C. H. G.; FURTADO, N. A. J. C. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Quim. Nova**, v. 32, n. 2, p. 498-502, 2009.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y. OKUDA, H.; Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murril and its mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 5, p. 1409-1413, 2001.

TIWARI, B. K.; Ultrasound: A clean, green extraction technology. **Trends in Analytical Chemistry**, 2015.

VAL, C. H.; BRANT, F.; MIRANDA, A. S.; RODRIGUES, F. G.; OLIVEIRA, B. C. L.; SANTOS, E. A.; ASSIS, D. R. R., ESPER, L.; RACHID, M. A., TANOWITZ, H. B.; TEIXEIRA, A. L.; TEIXEIRA, M. M.; RÉGIS, W. C. B.; MACHADO, F. S. Effect of mushroom *Agaricus blazei* on immune responses and development of experimental cerebral malaria. **Malaria Journal**, v. 14, p. 311-324, 2015.

WANG, H. X.; NG, T. B.; LIU, Q. A novel lectin from the wild mushroom *Polyporus adusta*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, p. 535-539, 2003.

WU, W; YANG, Y; SUN, G. Recent insights into antibiotics in *Helicobacter pylori* eradication. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 17, n. 30, p. 3971-3975, 2012.

YESSOUFOU, K; HOSAM, O. E.; MAHMOUD, E. A. SKALICKA-WOŹNIAK, K. Antifungal, antibacterial and anticancer activities of *Ficus drupacea* L. stem bark extract and biologically active isolated compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 752–758, 2015.

ZHU, F.; DU, B.; BIAN, Z.; XU, B. Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities. **Journal of Food Composition and Analysis**, v 41, p. 165–173, 2015.

Araraquara, 29 de janeiro de 2016.

De acordo,

Aluno: Victor Artemio Almeida de Lucena

Orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab