



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Potencial antibacteriano de cogumelos das espécies *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus ostreatoroseus* com enfoque em *Helicobacter pylori*

Thaís Araújo Jovenazzo

Aluna

Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Orientadora

Araraquara – SP
2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Ciências Biológicas
Laboratório de Fisiologia do Microrganismo

Potencial antibacteriano de cogumelos das espécies *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus ostreatoroseus* com enfoque em *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 Farmacêutica-Bioquímica.

Thaís Araújo Jovenazzo

Aluna

Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Orientadora

Araraquara - SP
2016

Agradecimentos

Aos meus pais que batalharam para que eu tivesse as melhores oportunidades, sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram;

A orientadora Prof. Dra. Tais Maria Bauab por ter me acolhido no laboratório, pela oportunidade de trabalhar em um lugar com pessoas tão boas, por ter confiado em mim e me ensinado sempre com muita atenção;

Ao Doutorando Matheus Ramos por toda força, ajuda e dedicação durante o projeto. Sem você não teria dado certo;

As minhas irmãs da República Askerozas por toda ajuda, conselhos, risadas e pelos melhores anos da minha vida. Tornaram-se minha segunda família sendo essenciais nessa jornada. Não teria sido tão bom se não fosse com vocês!

A minha parte morena, Smurf, por estar presente nos momentos bons e ruins, por ter aguentado e compartilhado das crises de ansiedade pelos desafios que estavam por vir. Obrigada por ter sido tão companheira em todos esses anos;

Aos meus companheiros em sala de aula, Farra Farma, que deixaram tudo mais divertido;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq/PIBIC, pelo auxílio concedido;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma das metodologias de extração.....	25
Figura 2. Disposição da microplaca	29
Figura 3. Reação de redução da resazurina	30
Figura 4. Ensaio de microdiluição revelado com resazurina (100 ug/mL)	31
Figura 5. Aspectos morfológicos e dos extratos de <i>P. eryngii</i>	32
Figura 6. Aspectos morfológicos e dos extratos de <i>P. ostreatus</i>	33
Figura 7. Aspectos morfológicos e dos extratos de <i>P. ostreatoroseus</i>	33
Figura 8. Porcentagem de inibição do crescimento referente aos extratos de <i>P. eryngii</i> frente a <i>E. coli</i>	36
Figura 9. Porcentagem de inibição do crescimento referente aos extratos de <i>P. eryngii</i> frente a <i>S. aureus</i>	37
Figura 10. Porcentagem de inibição do crescimento referente aos extratos de <i>P. eryngii</i> frente a <i>H. pylori</i>	38
Figura 11. Porcentagem de inibição do crescimento referente aos extratos de <i>P. ostreatus</i> frente a <i>E. coli</i>	39
Figura 12. Porcentagem de inibição do crescimento referente aos extratos de <i>P. ostreatus</i> frente a <i>S. aureus</i>	40
Figura 13. Porcentagem de inibição do crescimento referente aos extratos de <i>P. ostreatus</i> frente a <i>H. pylori</i>	41
Figura 14. Porcentagem de inibição do crescimento referente aos extratos de <i>P. ostreatoroseus</i> frente a <i>E. coli</i>	42
Figura 15. Porcentagem de inibição do crescimento referente aos extratos de <i>P. ostreatoroseus</i> frente a <i>S. aureus</i>	43
Figura 16. Porcentagem de inibição do crescimento referente aos extratos de <i>P. ostreatoroseus</i> frente a <i>H. pylori</i>	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da extração dos cogumelos por infusão	34
Tabela 2. Resultados da extração dos cogumelos por infusão	34
Tabela 3. Resultados da extração dos cogumelos por maceração	35
Tabela 4. Resultados da determinação da CIM de <i>P. eryngii</i>	35
Tabela 5. Resultados da determinação da CIM de <i>P. ostreatus</i>	39
Tabela 6. Resultados da determinação da CIM de <i>P. ostreatoroseus</i>	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs – Absorbância

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHT – Butilhidroxitolueno

CagA – Citotoxinas associadas ao gene A

Cag T4SS – Citotoxina associada ao gene de sistema de secreção tipo 4

CMH – Caldo Mueller Hinton

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

HMG-CoA-redutase – 3-hidroxi-3-metil-glutaril-Coenzima A redutase

SFB – Soro Fetal Bovino

TNF α – Fator de Necrose Tumoral α

UFC – Unidade Formadora de Colônia

VacA – Citotoxina Vacuolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	Objetivo.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1	Obtenção e procedência dos cogumelos.....	24
3.1.1	Preparo dos extratos vegetais.....	24
3.2	Avaliação da atividade antibacteriana.....	27
3.2.1	Preparação das soluções dos extrativos vegetais.....	27
3.2.2	Padronização das suspensões bacterianas.....	28
3.2.3	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	28
3.2.4	Leitura com revelador.....	30
3.2.5	Leitura Espectrofotométrica.....	31
4	RESULTADOS.....	32
4.1	Obtenção dos extratos vegetais.....	32
4.1.1	Extratos obtidos por infusão.....	34
4.1.2	Extratos obtidos por ultrassom.....	34
4.1.3	Extratos obtidos por maceração.....	34
4.2	Determinação da atividade antibacteriana.....	35
4.2.1	Atividade antibacteriana de <i>Pleurotus eryngii</i>	35
4.2.2	Atividade antibacteriana de <i>Pleurotus ostreatus</i>	38
4.2.3	Atividade antibacteriana de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	41
5	Discussão.....	45
6	Conclusão.....	55
7	Contextualização.....	56
8	REFERÊNCIAS.....	58

RESUMO

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria associada a processos patológicos gastrointestinais, como úlceras, gastrite e tumores gástricos que atingem a população em geral. A terapia disponível na prática clínica como a tripla e até mesmo a quádrupla com associação de bismuto apresentam limitações como altos índices de efeitos tóxicos, ineficiência em casos de infecções por cepas multirresistentes e incapacidade de atingir regiões gastrointestinais sem ser degradado no lúmen pela ação dos ácidos e pepsinas presentes no ambiente estomacal. O uso de produtos naturais emerge na triagem de novos agentes antimicrobianos com aplicabilidade anti-*H. pylori*, apresentando produtos que visam erradicar ou ser utilizado como adjuvante profilático na alimentação. Neste caso, os cogumelos podem ser uma alternativa para o combate do patógeno em questão, uma vez que a literatura aponta considerável atividade antibacteriana de extratos fúngicos frente a vários isolados patogênicos podendo vir a ser utilizados no desenvolvimento de novos medicamentos ou mesmo como adjuvantes no tratamento das infecções, como exemplo, destaca-se os cogumelos do gênero *Pleurotus* spp., um dos mais estudados e comercializados em todo o mundo. O método de microdiluição é um dos mais utilizados para determinar atividade antimicrobiana, pela sua sensibilidade, pequena quantidade de reagentes, amostras e reprodutibilidade, neste sentido, mostra-se como uma importante ferramenta na avaliação de novos compostos com propriedade antimicrobiana. Em continuidade ao estudo do nosso grupo de pesquisa este trabalho objetivou determinar o potencial antibacteriano de espécies de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* spp. instigados pela possibilidade de encontrar uma alternativa para a erradicação e/ou controle de bactérias patogênicas com ênfase no *H. pylori*. A atividade antibacteriana dos diferentes extratos de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus ostreatoroseus* obtidos por infusão, ultrassom e maceração, 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 dos métodos extrativos de infusão e maceração na obtenção de componentes ativos dos cogumelos, uma vez que foram observados padrões inibitórios superiores em relação àqueles obtidos por ultrassom. Os dados obtidos com a cepa de *E. coli*, mostraram que os extratos obtidos por infusão e maceração apresentaram inibição do crescimento bacteriano superiores a 70% já naqueles obtidos por ultrassom a inibição foi em torno de 20%. Os extratos não apresentaram atividade contra *S. aureus*. Em relação à atividade anti-*H. pylori*, grande enfoque deste trabalho, observou-se que todos os extratos conseguiram inibir o crescimento bacteriano em torno de 80%, mostrando-se como o resultado mais promissor. Considerando os resultados obtidos neste estudo, notou-se uma possível seletividade de ação contra as bactérias Gram negativas, uma vez que apresentaram uma atividade moderada contra as cepas de *E. coli* e *H. pylori* e nenhuma atividade para *S. aureus* foi observada. Em suma, o consumo de cogumelos do gênero *Pleurotus* spp. pode ser um grande aliado no combate a doenças de origem bacteriana, uma vez que ao serem consumidos na alimentação podem comportar-se como agentes profiláticos, prevenindo o desenvolvimento de infecções futuras, o que se mostra de grande interesse se tratando de infecções causadas pelo patógeno *H. pylori*.

Palavras-chave: *Pleurotus* spp.; Atividade antibacteriana; *Helicobacter pylori*; Microdiluição; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*.

1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais com atividade biológica são utilizados desde o início da civilização humana, seja como fonte alimentícia ou como forma de curar uma enfermidade. Dessa forma, o homem, aprofundou seus conhecimentos nessa área e vêm utilizando produtos naturais com atividade antimicrobiana. Na atualidade, o uso destes produtos vem ganhando destaque na área científica que visa a descoberta de novos princípios bioativos com aplicabilidade na terapêutica de doenças infecciosas oriundas de contaminações por vírus, fungos e bactérias, sejam estes de caráter oportunista e/ou patogênico (CRAGG e NEWMAN, 2013). Os produtos naturais vêm se mostrando atrativos no desenvolvimento de pesquisas clínico-farmacológicas com o objetivo de controlar e até mesmo erradicar formas microbianas associadas com o desenvolvimento de infecções (SALEEM, 2010). Neste sentido, as plantas medicinais são o principal foco de investigação na área antimicrobiana, justificado pela variedade de componentes ativos e principalmente à abrangência da aplicabilidade sob vários tipos de doenças infecciosas, sendo esta capacidade atribuída principalmente à presença de metabólitos secundários (SIMÕES et al., 2017).

Metabólitos secundários são considerados compostos presentes nas plantas, não se encontram envolvidos diretamente com os processos de crescimento, reprodução e desenvolvimento dos vegetais, mas desempenham um papel importante nas defesas vegetais contra a herbivoria e outras defesas relacionadas ao meio de desenvolvimento e sobrevivência. (NEWMAN, DJ & CRAGG, GM, 2016). Estes compostos possuem atividade antimicrobiana, antioxidante, antiproliferativo de células tumorais além de serem amplamente empregados na indústria de cosméticos. Os principais grupos destes compostos que são responsáveis pela

atividade antimicrobiana de produtos de origem natural incluem compostos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonóides, taninos, fenazinas, cumarinas, lignanas, neolignanas, terpenóides e principalmente os alcalóides (HAYEK et al., 2013).

Os antimicrobianos são agentes terapêuticos, produzidos e obtidos, na maioria das vezes, a partir de organismos vivos. Embora o avanço técnico e científico da síntese de novos medicamentos seja observado nos últimos anos, a medicina moderna encontra-se em expressiva busca por novos fármacos capazes de atuarem efetivamente no controle de doenças causadas por micro-organismos de caráter patogênico e oportunista. Ultimamente observa-se que a procura por novas abordagens medicamentosas frente a diversos tipos de doenças oriundas de processos infecciosos encontra-se em declínio e desatualização (CRAGG e NEWMAN, 2013). Na última década, apenas sete novos fármacos foram aprovados para a terapia do tratamento de infecções bacterianas. O número de aprovações de novos medicamentos utilizados neste tipo de terapêutica caiu substancialmente em relação ao observado em meados de 1980, onde, em média quatro novas drogas eram introduzidas no mercado a cada ano (BROWN et al., 2014).

As doenças infecciosas classificam-se como um importante problema de saúde pública, uma vez que coloca em risco toda a população além de serem responsáveis por grande parcela dos gastos com a saúde e ao óbito dos pacientes acometidos. Casos infecciosos como o desenvolvimento de meningites, infecções no trato respiratório e gástrico enquadra-se como as principais doenças que afetam a população (BONIFÁCIO et al., 2014). Doenças infecciosas que eram facilmente tratadas estão se tornando sérios problemas devido à resistência dos antimicrobianos, em 2010, a Organização Mundial da Saúde (OMS) aconselhou a todos os países a implementação de medidas de controle contra a propagação de

bactérias multirresistentes, salientando os riscos, preconizando o uso racional de antibióticos, treinamento dos profissionais da saúde, reforço das legislações que proíbem a venda sem prescrição e apontando terapias alternativas contra esses micro-organismos, medidas estas que visam o controle da multirresistência (WHO, 2010).

Isolados de *Candida ssp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus ssp.*, *Escherichia coli*, entre outros, estão cada vez mais resistentes a múltiplas drogas, o que estimula ainda mais o estudo de substâncias com novos mecanismos de ação (ROSA et al., 2003). De maneira geral, os micro-organismos são os seres com maior adaptabilidade a mudanças que visem garantir sua sobrevivência e o uso desenfreado de antibióticos levou ao surgimento de linhagens de bactérias com mecanismos que as fizessem resistir à utilização desses medicamentos (ALVEZ et al., 2012; RODRÍGUES-ROJAS et al., 2013). Esse fato justifica, apesar da grande variabilidade de antibióticos disponíveis em prática clínica, a pesquisa por alternativas no tratamento das infecções associadas à micro-organismos.

Classificar os micro-organismos de acordo com seus respectivos padrões de virulência torna-se indispensável para o sucesso da terapia medicamentosa empregada, sendo assim, diversos tipos de patologias humanas estão associados à presença de micro-organismos patogênicos ou oportunistas, como aqueles pertencentes ao gênero *Staphylococcus* sendo estes cocos Gram positivos, não esporulados, imóveis com diâmetro de 1µm. Dentre as espécies pertencentes ao gênero em questão destaca-se o *Staphylococcus aureus*, sendo diretamente relacionado a infecções humanas a nível comunitário e hospitalar. Embora se trate de uma espécie relativamente sensível aos antibacterianos empregados em prática

clínica, já existem relatos na literatura científica demonstrando cepas com perfil multirresistente (BASTOS et al., 2013). A principal habilidade exercida por *S. aureus* é a capacidade de colonização em indivíduos saudáveis, podendo manifestar-se maleficamente em situações de comprometimento imunológico ou em portadores de doenças base, como o diabetes. Trata-se de um micro-organismo com capacidade invasiva em diversos tipos de tecidos do corpo humano, sendo assim, é dotado de inúmeras capacidades de diversos tipos de desencadeamentos patológicos. Cerca de 25% a 35% dos seres humanos possuem esta bactéria na superfície da pele e em mucosas, o que classifica-se como um fator de risco para o estabelecimento de infecções, visto que a partir de um simples trauma ocorrido, intervenções clínico-cirúrgicas, bem como infecções virais, há o favorecimento da invasão microbiana em tecidos e órgãos levando o hospedeiro em graves situações de risco a homeostasia do corpo humano, sendo que os mecanismos de virulência exercidos pelo agente invasor estão diretamente relacionados as suas características patogênicas e ao sistema imunológico do hospedeiro (CHAMBERS e DELEO, 2009; GRUNDMANN et al., 2010).

Durante muitos anos têm-se estudado inúmeras formas de controle e erradicação de doenças causadas por *Staphylococcus aureus* através de diversos tipos triagens antimicrobianas, amplamente variadas em seus mecanismos de ações, aplicações e eficácia, porém a ocorrência de resistência a drogas vem ocorrendo devido ao uso indiscriminado de agentes terapêuticos nos tratamentos de doenças que acometem o homem e os animais. De um modo geral, a versatilidade desta bactéria no desenvolvimento de resistência a diferentes agentes antimicrobianos elevam as contribuições para a sobrevivência e incontroláveis disseminações em ambientes hospitalares, com a disseminação de, por exemplo, *S.*

aureus resistente às penicilinas e cefalosporinas e também aos aminoglicosídeos, tetraciclinas entre outros. Mais recentemente foram descobertas estirpes com perfil resistente à vancomicina, sendo este o medicamento empregado em casos clínicos de infecções severas pelo micro-organismo em questão. Outro importante fator negativo observado em estirpes desta espécie além da vasta resistência aos mais diversos antibióticos é o fato deste tipo de bactéria apresentar resistência a íons metálicos, como mercúrio, e a biocinas, tais como cloreto de benzalcônio e clorexidina. Estes agentes são considerados poluentes urbanos ou industriais, ou ainda através do uso hospitalar como anti-séptico, o que dificulta ainda mais a desinfecção em ambientes considerados altamente contaminantes e prejudiciais à saúde do homem, levando a um maior índice de seletividade no que diz respeito a manutenção da esterilidade em ambientes com alto rigor de assepsia (MAIA et al., 2008).

Escherichia coli classifica-se como um grupo grande e diverso de bactérias, sendo habitantes comensais de urina e fezes dos seres humanos. Morfologicamente, apresenta-se como um bacilo Gram-negativo, anaeróbio, fermentador de glicose e de outros açúcares (GUO et al., 2013). Embora a maioria das variedades de *E. coli* sejam inofensivas tanto em humanos quanto em animais, outras podem promover o desencadeamento de patologias. Alguns tipos destes micro-organismos podem ocasionar casos clínicos severos como doenças de cunho respiratório, intestinal e principalmente urinário (TENAILLON et al., 2010). A contaminação por *E. coli* atinge todas as faixas etárias, sendo mais frequente em idosos e crianças, o que aumenta o risco do desencadeamento de síndromes hemolíticas-urêmicas, além de outros tipos de patologias que se apresentam intensamente ativas e sintomáticas. Embora as políticas de controle de

contaminação por este tipo de bactéria sejam rigorosas, ainda há uma grande incidência de casos emergentes de infecção, o que leva ao estabelecimento de patologias distintas ocasionadas pelo mesmo micro-organismo. Os sintomas de infecção podem variar mas geralmente incluem cólicas estomacais, diarreia e vômito. Diversos fatores de risco estão associados ao contágio e propagação das doenças causadas por *E. coli*, e estes variam desde a imunossupressão em que o hospedeiro se encontra, até mesmo ao consumo de alimentos contaminados. Dentre os sinais clínicos apresentados por pacientes que foram contaminados pelo patógeno uropatogênico encontram-se as infecções do trato urinário, sendo esta uma das formas mais comum de infecção bacteriana humana. De modo geral, todos os seres humanos são susceptíveis a esta infecção, porém, a prevalência da infecção difere com a idade, sexo, sendo mais frequente em mulheres devido a anatomia que seu sistema reprodutor e urinário apresenta, além de outros fatores predisponentes. Os fatores de virulência deste tipo de micro-organismo incluem adesinas, sideróforos, toxinas, antígenos polissacarídicos e capsulares, os quais tornam a bactéria capaz de se ligar e lesar as células e os tecidos do hospedeiro fora do trato intestinal, evitando ou subvertendo os mecanismos de defesa nestes sítios, estimulando uma resposta inflamatória no hospedeiro e ocasionando a doença extra intestinal (DERING et al., 2012; LUJAN et al., 2012).

Helicobacter pylori é uma bactéria Gram negativa, microaerofila, espiralada com habilidade de colonizar a mucosa gástrica associada ao processo de doenças gastrointestinais, como úlceras, gastrite e alguns tumores malignos como o adenocarcinoma gástrico (WU et al., 2012). Pode ser transmitida pelo contato de pessoa com pessoa, através da saliva, vomito, ou contato fecal (GURNEY et al, 2014). A prevalência varia entre mais de 80% em países em desenvolvimento e

entre 6% a 25% em países desenvolvidos, com maior número de casos em idosos, locais com superpopulação e em crianças desprovidas de higiene adequada (OPPONG et al, 2015). Este patógeno vem mostrando-se como um grande problema de Saúde Pública, sendo um dos micro-organismos infecciosos mais comuns do mundo (HOJSAK et al., 2012), assim, a busca pela erradicação dessa bactéria é de grande interesse. (BONIFÁCIO et al., 2014).

As principais queixas de pacientes acometidos com o patógeno em questão são dadas pela presença de ulcerações, gastrite e em casos mais graves, o desenvolvimento de tumores gástricos. A úlcera gástrica é uma violação na mucosa duodenal ou gástrica que vai até a submucosa, as menores são chamadas de erosões, que podem não ser notadas até crescerem e se tornarem úlceras, sendo a causa mais comuns, além da infecção por *H. pylori*, o uso prolongado de antiinflamatórios não esteroidais, como a aspirina. Normalmente, o sintoma mais comum relacionado à úlcera leve é a dor epigástrica e menos usualmente, náuseas, vômitos e perda de peso, enquanto que a úlcera causada por antiinflamatórios são quase sempre assintomáticas. No caso da úlcera duodenal, o sintoma mais comum relatado é sensação de queimação geralmente após as refeições. A gastrite é a inflamação da mucosa gástrica, geralmente apresenta-se como assintomática, mas se não tratada resulta na complicação do quadro clínico do paciente, como o desenvolvimento de úlceras, adenocarcinoma e linfoma gástrico, outro motivo pela qual a infecção por *H. pylori* é preocupante (BONIFÁCIO et al., 2014).

O *H. pylori* possui sofisticados fatores e mecanismos de virulência que possibilitam sua sobrevivência e multiplicação, desencadeando assim, os problemas no trato gastrointestinal. As adesinas ou enzimas secretadas são de extrema importância já que realizam contato direto com os tecidos, mediando as interações

ente o patógeno e o hospedeiro. Também possui proteínas expostas na superfície e moléculas efetoras translocadas, apresentando uma série de proteínas e genes que oferecem potencial de colonização da mucosa gástrica. Normalmente, a mucosa gástrica apresenta proteção contra micro-organismos, entretanto, o patógeno em questão possui flagelos polares, enzimas e outros fatores que permitem sua multiplicação favorecendo a entrada no muco e adesão nas células epiteliais, além disso, promove evasão da resposta imune do hospedeiro, o que favorece sua colonização e transmissão. Os mecanismos de virulência mais elucidados do *H. pylori* compreendem-se em citotoxinas associadas ao antígeno A (CagA) e citotoxina vacuolar (VacA). A VacA possui várias funções nas células epiteliais, como por exemplo a indução de apoptose, disjunção das células, formação de canais de uréia e alteração da atividade imunomodulatória do hospedeiro, pois inibe o processo que liga o peptídeo antigênico nos linfócitos B e a apresentação para os linfócitos T CD4+, e também pode inibir a proliferação de linfócitos T, sendo um possível mecanismo pela qual a bactéria estabelece sua infecção crônica. Outra forma de virulência é o Cag T4SS que faz a mediação da translocação da CagA, fazendo com que ocorra a fosforilação, resultando em um feedback negativo que resulta na desfosforilação de outras proteínas da célula hospedeira (RIEDER et al., 2005). Além desses mecanismos de virulência, sabe-se que o *H. pylori* pode formar biofilmes na mucosa gástrica, dificultando ainda mais o tratamento. Além disso, estudos apontaram que biofilmes de *H. pylori* foram encontrados em superfícies de sistemas que distribuem água, contribuindo ainda mais para a disseminação em países em desenvolvimento (YONEZAWA, et al., 2015).

O diagnóstico é feito a partir de combinações de exames, invasivos e não invasivos, já que não existem testes com aceitáveis níveis de sensibilidade e

especificidade (BELDA et al., 2012). Atualmente existem várias formas de diagnóstico, como por exemplo: cultura bacteriana, teste de urease, teste de respiração de urease, exame histológico, PCR, sorologia, teste de antígeno e métodos como endoscopia, biópsia, obtenção de suco gástrico através de tubos nasogástricos, entre outros (LO et al., 2001; MÉGRAUD et al., 2007).

O tratamento para *H. pylori* é baseado em combinações entre agentes supressores de ácidos e diversos antibióticos e mesmo assim apresenta muitas limitações. Muitos fatores são responsáveis pela dificuldade de curar a infecção, como a resistência da cepa bacteriana e ineficiência do sistema imunológico do hospedeiro (MOLINA-INFANTE et al., 2015). Logo, pela alta prevalência da bactéria nas populações mais pobres e devido ao fator de risco da infecção, é necessário encontrar um tratamento com o menor custo-benefício e eficácia disponível. A primeira linha de tratamento é conhecida como terapia tripla. Consiste em claritromicina, amoxicilina ou metronidazol duas vezes ao dia e um inibidor da bomba de prótons como o omeprazol, também ingerido duas vezes ao dia por duas semanas. Entretanto, existem regiões na qual a resistência à claritromicina está crescendo, logo, a forma de tratamento mais eficaz a ser escolhida deve ser baseada neste fator. Se a primeira linha de tratamento falhar, pode-se utilizar combinações de levofloxacino uma vez ao dia, amoxicilina duas vezes ao dia e um inibidor de bomba de prótons duas vezes ao dia, totalizando 10 dias de tratamento, formando assim, a segunda linha de tratamento contra *H. pylori*. Outra forma de tratamento é a terapia quádrupla, que inclui tetraciclina e metronidazol três vezes ao dia, subsalicilato de bismuto 4 vezes ao dia e um inibidor de bomba de prótons duas vezes ao dia, por duas semanas, sendo esta mais uma alternativa para a segunda linha de tratamento (GURNEY et al., 2014; OPPONG et al., 2015).

Outro ponto que pode ser destacado é a incidência de pacientes com alergia a medicamentos à base de penicilina, se tornando mais um desafio principalmente em pacientes cujo primeiro tratamento não foi eficaz (GISBERT et al, 2010). Os maiores efeitos adversos do tratamento contra *H. pylori* são irritações no trato gastrointestinal e diarreia, sendo assim, para contornar esse problema, a utilização de cepas probióticas para diminuir os efeitos adversos provenientes do tratamento torna-se uma alternativa muito recomendada, além de aumentar a adesão ao tratamento por parte do paciente resultando na erradicação da bactéria. (PATEL et al., 2014). Logo, a dificuldade de encontrar-se um medicamento eficaz que seja capaz de atingir as regiões gastrointestinais (local onde a bactéria está alojada) sem ser degradado no lúmen pela ação dos ácidos e pepsinas presentes no organismo somado ao problema de resistência aos antibióticos, faz com que o tratamento de escolha no controle desta infecção não seja efetivo, sendo assim, os produtos naturais emergem na abordagem terapêutica deste tipo de infecções apresentando propriedades importantes no tratamento e/ou controle das afecções (WU et al., 2012).

O uso de cogumelos na busca por novos compostos antimicrobianos pode ser uma alternativa eficaz e favorável (ZEPEDA-BASTIDA et al., 2016), uma vez que a literatura aponta a atividade antibacteriana de extratos fúngicos frente a vários isolados patogênicos (HEARST et al., 2009; LARGETEAU, 2011; LIU et al., 2013), podendo vir a ser utilizados no desenvolvimento de novos medicamentos ou mesmo como adjuvantes no tratamento das infecções microbianas. Cogumelos são utilizados por milênios (WASSER, 2002), não só como medicamentos, mas principalmente como fonte de alimentos (RAI et al., 2005).

Além da grande variedade de sabores, cogumelos também se tornaram atrativos como alimentos funcionais e nutracêuticos (KHATUN et al., 2015). Possuem proteínas digestíveis, carboidratos, fibras, vitaminas, minerais, baixo teor calórico e lipídeos (NOWACKA et al., 2014; HAN et al., 2015). O consumo de cogumelos na alimentação pode reduzir danos oxidativos nas células causados por radicais livres, que causam oxidação de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios e, assim, possivelmente diminuir o envelhecimento e doenças (KLAUS et al., 2015).

A utilização e o cultivo de cogumelos são muito comuns em países do oeste da Ásia e na China, na qual povos antigos utilizavam extratos de cogumelos para curar enfermidades (RAI et al., 2005; AIDA et al., 2009). Eles são classificados como uma das maiores fontes de substâncias com utilidade farmacêutica (RAI et al., 2005). Sendo conhecidas aproximadamente 15.000 espécies, e dessas, cerca de 650 possuem propriedades medicinais (WASSER, 2002; RAI et al., 2005; MINATO, 2010;). Além de seu alto valor nutricional, os cogumelos são ricos em metabólitos como lectinas, polissacarídeos, fenóis e polifenóis, terpenos, ergosteróis e componentes orgânicos voláteis (KALAČ, 2013). São relatadas as propriedades antineoplásicas, antibacterianas e antioxidantes de extratos de diferentes espécies (KALYONCU et al., 2010; NEGRI, 2012; LIU et al., 2013), neste sentido, a pesquisa destes compostos voltados à sua atividade antimicrobiana principalmente contra o patógeno *H. pylori* mostra-se de grande importância.

Cogumelos do gênero *Pleurotus spp* são um dos mais estudados e comercializados, ocupando a terceira posição na produção de cogumelos do mundo (CARDOSO et al., 2013), principalmente no sudeste asiático, Índia, Europa e África, sendo utilizados pelo seu alto valor nutricional, propriedades medicinais entre outros benefícios (ZHANG et al., 2014).

Pleurotus ostreatus, conhecido como Shimeji ou Cogumelo Ostra possui propriedades antioxidantes, imunomoduladora, anti-inflamatória e analgésica proporcionadas pela presença de β -glucanas (SYNYTSYA et al., 2009) e apresenta maior concentração de cistina, metionina e ácido aspártico quando comparado com outros cogumelos. Extratos etanólicos de *Pleurotus ostreatus* apresentaram um grande potencial antioxidante inibindo a peroxidação lipídica, retirando radicais superóxidos e hidroxilas, diminuindo a quelação de íons ferrosos comparado com outros antioxidantes conhecidos como EDTA, ácido ascórbico e BHT. Além disso, em sua composição contém ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno e compostos flavonóides, sendo estas substâncias antioxidantes conhecidas (JAYAKUMAR et al., 2009). Seu corpo de frutificação possui lectinas com alta atividade antitumoral visto que seu efeito resultou na diminuição de sarcomas e hepatomas em ratos após a administração intraperitoneal da substância (WANG et al., 2000). Também apresenta atividade anti-inflamatória, pois inibe a produção de TNF- α (GUNAWARDENA et al., 2014). A dieta com alto consumo de Shimeji é benéfica por diversos fatores, entre eles a prevenção da acumulação de colesterol no sangue e fígado e da produção de lipídeos endógenos, graças ao alto valor nutritivo contendo fibras, esteróis, proteínas e poucos carboidratos (BOBEK et al., 1994).

Pleurotus eryngii, conhecido como Cogumelo Rei também possui substâncias com atividades terapêuticas importantes. Estudos indicaram que uma dieta balanceada com o cogumelo ajudou na redução de peso de ratos, além de melhorar o perfil lipídico de animais com hipercolesterolemia, fato justificado à presença de mevilonina, um composto hipocolesterolêmico que pode estar envolvido na diminuição de HMG-CoA redutase, enzima responsável pela formação do colesterol (ALAM et al., 2011). Apresenta polissacarídeos capazes de diminuir células

cancerígenas graças a sua atividade antitumoral (MA et al., 2014; YANG et al., 2013), e assim como a maioria dos cogumelos, *P. eryngii* também se destaca por sua atividade antioxidante (ZHANG et al., 2014).

Outra espécie desse gênero é o *Pleurotus ostreatoroseus*, cogumelo utilizado na alimentação e conhecido pela sua coloração rosa, cujas pesquisas são muito recentes e ainda não há muitos dados elucidados na literatura científica sobre sua composição química e bioatividade, porém, sabe-se que o extrato etanólico deste cogumelo apresenta propriedades antioxidantes, diminuição da atividade de DPPH, inibição do branqueamento de β -caroteno, inibição da peroxidação de lipídeos, atividade antiinflamatória e antimicrobiana frente à cepas bacterianas. (CORREA et al., 2015).

O conhecimento dos constituintes químicos dos cogumelos e seu potencial biológico são importantes nos estudos com expectativas de desenvolver novos fármacos ou mesmo na sua utilização como coadjuvantes nos tratamentos de infecções. A determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* é uma etapa essencial na determinação do potencial biológico de produtos naturais. Diversas metodologias podem ser utilizadas para a determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos naturais, sendo aplicado em estudos de triagens de novas substâncias ativas. Dentre estes, o método de diluição em microplacas ou também conhecido como microdiluição, desenvolvido por Eloff em 1998, é por sua vez o que há de mais viável na triagem de novos fármacos antimicrobianos com a vantagem de se trabalhar com pequenas quantidades de compostos, como os extratos vegetais. Com ela é possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM), sendo esta denominada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano

que representa a concentração em que o composto ativo precisa estar para que desempenhe a ação terapêutica (OSTROSKY et al., 2008; DAS et al., 2010).

Como parte desse estudo e pela crescente importância de doenças infecciosas de origem bacteriana principalmente pelo *Helicobacter pylori* na microbiologia médica, associada à patogênese de doenças gástricas, é justificado o estudo de cogumelos das espécies mais consumidas pelo homem (*Pleurotus sp*) como potencial antibacteriano que possa vir a ser utilizado como adjuvante no controle destes micro-organismos.

2 OBJETIVO

Determinar a atividade antibacteriana das espécies *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus ostreatoroseus* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e com enfoque no *Helicobacter pylori*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e procedência dos cogumelos

Os diferentes tipos de cogumelos foram obtidos em cultivos disponíveis para a população os quais são cultivados, coletados e posteriormente disponibilizados comercialmente. As espécies *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus ostratoroseus* foram obtidos no Sítio Recanto da Mata – São Carlos – SP. Assim que obtidos, os cogumelos foram submetidos aos processos de extração.

3.1.1 Preparo dos extratos vegetais

Para obtenção dos extratos, foram utilizadas três metodologias de extração: infusão, ultrassom e maceração, nos dois primeiros métodos, o solvente utilizado foi a água, enquanto que no último foi etanol 70%. A Figura 1 apresenta um esquema representativo das metodologias de preparação dos extratos

Após o processo de extração, os extratos foram rotaevaporados e liofilizados.

Figura 1. Fluxograma das metologias de extração



Fonte: Autora

3.1.1.1 Extração por infusão

Os cogumelos foram triturados em um mixer e pesou-se 100 g em um béquer para realizar a infusão. Adicionou-se 500 mL de água fervente procedendo-se em repouso por 15 minutos. Após este período, realizou-se a filtração a vácuo obtendo-se assim o filtrado. Esta etapa foi procedida com a reextração das amostras por mais

duas vezes, desta vez com 250 mL de água fervente. Todos os filtrados foram agrupados totalizando um volume final de 1L.

O filtrado foi submetido ao processo de rotaevaporação - que consiste na diminuição do solvente para concentrar a amostra – reduzindo o volume para 500 mL. O volume foi transferido para um balão que foi congelado e liofilizado para retirar o máximo de umidade da amostra, obtendo então o extrato de cada um dos cogumelos.

3.1.1.2 Extração por ultrassom

Em um béquer pesou-se 100 g dos cogumelos previamente triturados para realizar a extração através de banho ultrassônico, processo que utiliza energia de ondas sonoras que criam vibração para realizar a extração;

Em seguida, adicionou-se 500 mL de água a 40°C e o recipiente foi levado para o ultrassom termostatizado também a 40°C por 20 minutos. Ao final desse tempo, realizou-se filtração a vácuo do conteúdo no béquer, separou-se o filtrado e novamente ocorreu a reextração com 250 mL de água (40°C) por mais duas vezes. Os filtrados foram agrupados totalizando 1L.

O filtrado foi levado para o rotaevaporador e o volume reduzido a 500 mL. Foi transferido para um balão que foi congelado e liofilizado, obtendo então o extrato de cada um dos cogumelos.

3.1.1.3 Extração por maceração

A amostra de 100 g dos cogumelos triturados foi congelada em um béquer e posteriormente liofilizada. Após isso, foi adicionado 60 mL de etanol 70% até completa absorção do solvente pela amostra. Depois de entumecida, acrescentou-se mais 150 mL de etanol e realizou-se a maceração por 24 horas, durante esse

período, ocorreram três agitações de um minuto cada, para otimizar o processo. A amostra então foi filtrada e submetida a duas reextrações com mais 150 mL de solvente cada. O volume final foi transferido para um balão na qual foi submetido ao processo de rotaevaporação para concentrar a amostra e retirar o solvente orgânico, e posteriormente, liofilização.

3.2 Avaliação da atividade antibacteriana

3.2.1 Preparação das soluções dos extrativos vegetais

Todos os extratos foram diluídos na concentração de 2000 µg/mL diferindo apenas no solvente utilizado. Os extratos de *P. eryngii*, *P. ostreatus* e *P. ostreatoroseus* obtidos por ultrassom, infusão e maceração foram solubilizados em 20% de dimetilsulfóxido (DMSO), sendo este um solvente polar. A escolha na utilização do solvente se baseou naquele que melhor solubilizou o extrato. Todos foram submetidos a banho ultrassônico para solubilização não excedendo o tempo de 30 minutos. Depois de solubilizados, os extratos foram submetidos à filtração por membrana (0.22 µM) para retirar quaisquer contaminantes existentes. As soluções dos extratos foram mantidas à temperatura de -20 °C como solução-estoque até o início dos experimentos.

3.2.1.1 Espectro de absorção

Os extratos vegetais adequadamente dissolvidos foram submetidos à leitura em espectrofotômetro (absorvância - Abs) num intervalo de leitura de 400 a 700 nm, para a determinação do comprimento de onda de absorção dos mesmos.

A partir dessas análises, foi possível avaliar o comprimento de onda máximo de absorção dos extratos vegetais e verificar a possível interferência da coloração

nas leituras de absorvância para determinar o comprimento de onda na determinação das CIM dos extratos.

3.2.2 Padronização das suspensões bacterianas

As suspensões bacterianas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas, em Caldo Mueller Hinton (CMH) até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620 nm para confirmação da concentração de micro-organismos. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10 em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

No caso do *Helicobacter pylori*, a padronização ocorreu a partir de uma cultura de 72 horas em Ágar sangue, padronizada em escala 2 de MacFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL), preparada em Caldo Mueller Hinton acrescido de soro fetal bovino (SFB) na proporção de 1:1. A suspensão foi analisada por espectrofotometria à 570 nm para verificar a concentração de bactéria no meio. Após isso confirmação, foi realizado uma diluição 1:10 em CMH + SFB também na proporção de 1:1, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

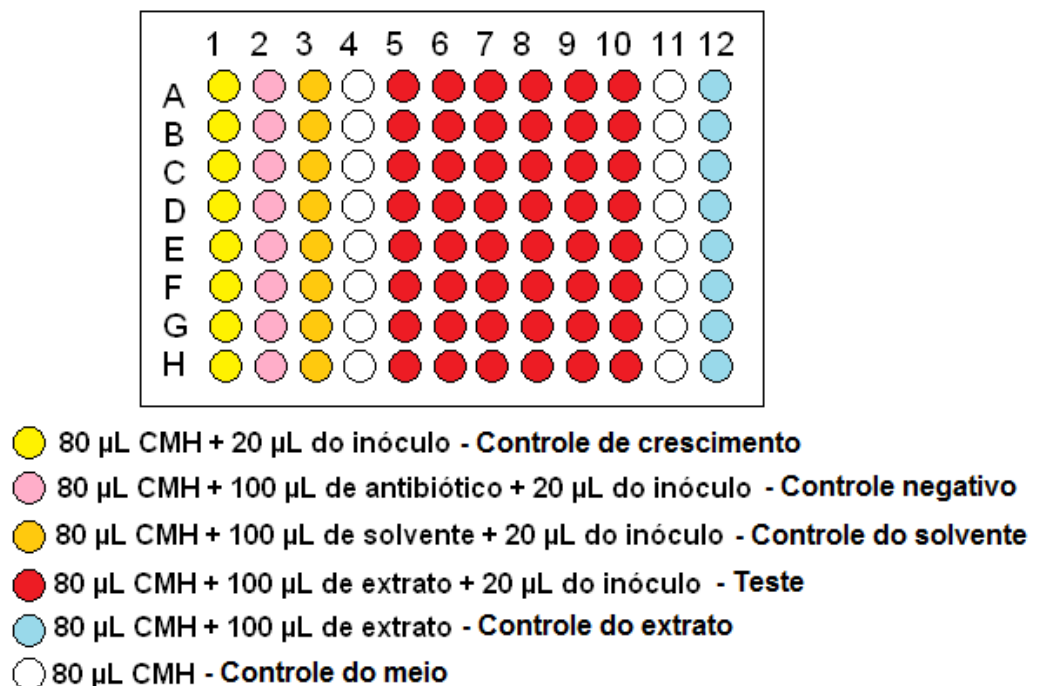
3.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006a) para as bactérias aeróbicas (*E. coli*

e *S. aureus*) e adaptado para as fastidiosas (*H. pylori*) seguindo suplemento M100-S16 do CLSI (2006b).

Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 μ L de CMH para *E. coli*, *S. aureus*, e 80 μ L de CMH acrescido de 50% de SFB para *H. pylori*. Em seguida foram acrescentados 100 μ L das soluções dos extratos vegetais e realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8 μ g/mL. Adicionalmente foram distribuídos 20 μ L das suspensões dos micro-organismos em cada orifício das microplacas. Como controles positivos foram utilizados a amoxicilina (100 μ g/mL) para *H. pylori* e a ampicilina (50 μ g/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 (solventes). A Figura 2 apresenta a disposição das microplacas utilizadas no estudo.

Figura 2. Disposição da microplaca



Fonte: Autora

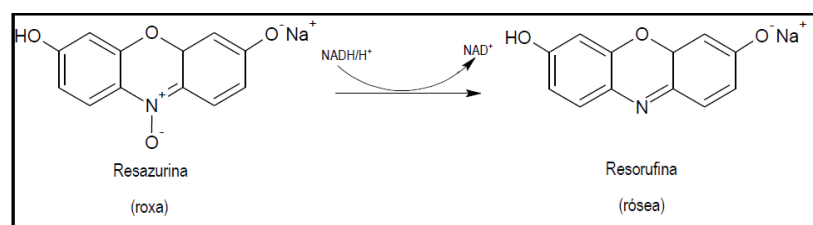
As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas nos testes com *S. aureus* e *E. coli*. Nos realizados com o *H. pylori* as microplacas foram incubadas à 37°C em estufa com 10% de CO₂ por 72 horas. Estes ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.4 Leitura com revelador

Após o período de incubação foram realizadas leituras com o revelador resazurina (100 µg/mL) indicativo de reação de oxirredução, do qual 30 µL foram adicionados em cada orifício das microplacas. No decorrer de 2 horas a presença de cor azul representa ausência de crescimento bacteriano e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (BONIFÁCIO et al., 2014).

A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é considerada o indicador utilizado em condições de redução em meios de cultura. O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resorufina (cor rósea) (Figura 3). A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (BONIFÁCIO et al., 2014). A Figura 3 esquematiza a redução da resazurina (púrpura) em resorufina (rósea).

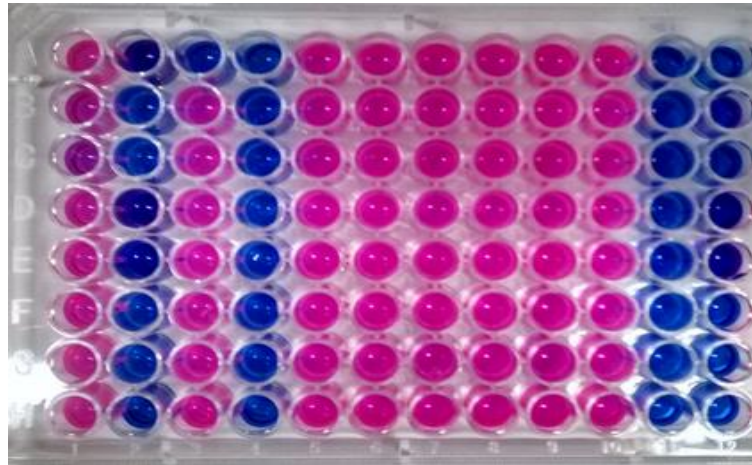
Figura 3. Reação de redução da resazurina



Fonte: BONIFÁCIO, 2014.

A Figura 4 apresenta um ensaio de microdiluição desenvolvido utilizando o revelador resazurina.

Figura 4. Ensaio de microdiluição revelado com resazurina (100 ug/mL)



Fonte: Autora

3.2.5 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 1 representa o cálculo de inibição empregado.

Equação 1.

$$\% \text{ Inibição do crescimento microbiano} = [1 - (A_c/A_0)] \times 100$$

Onde: A_c representa a média das absorvâncias por concentração de substância testada e já subtraída do valor da absorvância obtida para cada concentração de substância sem a adição do inóculo e A_0 a média das absorvâncias do controle de crescimento microbiano (sem a substância testada) (GUDIÑA et al., 2010). O resultado final representa a porcentagem de células microbianas que a substância testada foi capaz de inibir.

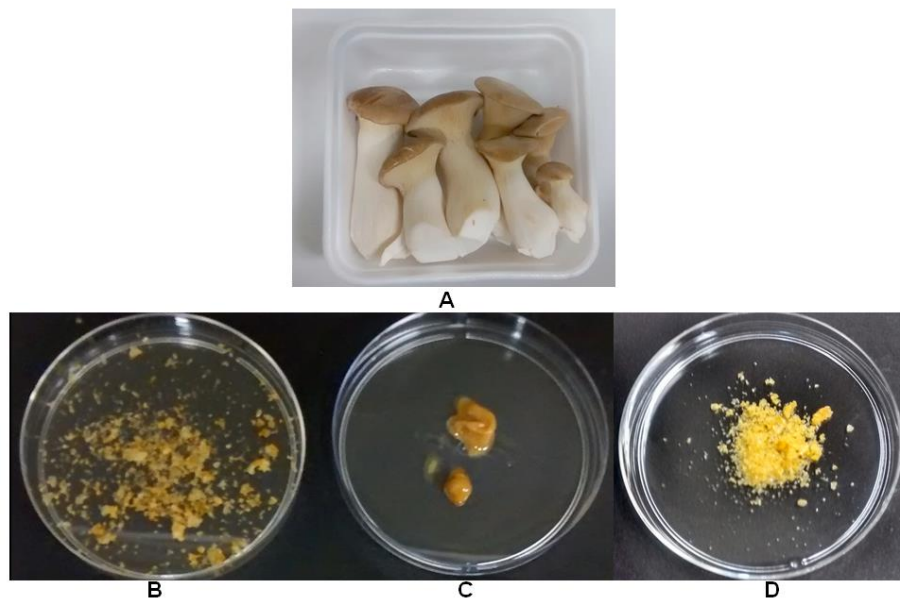
4 RESULTADOS

4.1 Obtenção dos extratos vegetais

Foram obtidos os extratos de *P.ostreatus*, *P. eryngii* e *P. ostreatoroseus* através dos métodos de infusão, ultrassom e maceração.

As Figuras 5, 6 e 7 apresentam os cogumelos *in natura* e seus respectivos extratos.

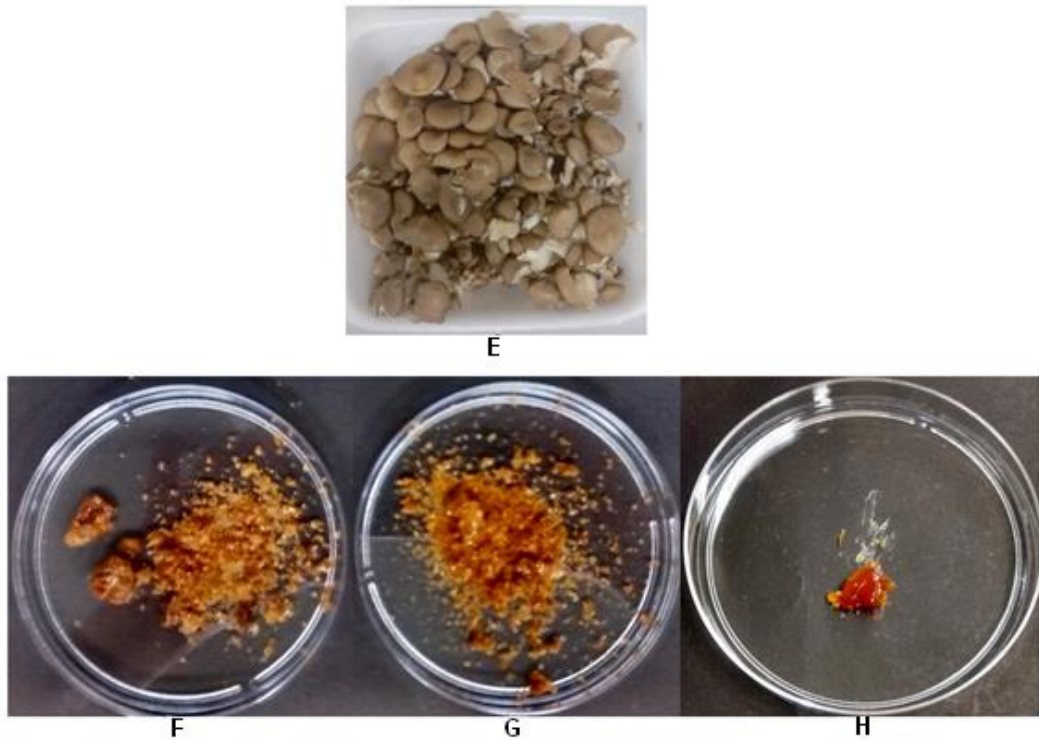
Figura 5. Aspectos morfológicos e dos extratos de *P. eryngii*



Fonte: Autora

A= *P. eryngii* in natura; B= extrato obtido por infusão; C= extrato obtido por ultrassom; D= extrato obtido por maceração.

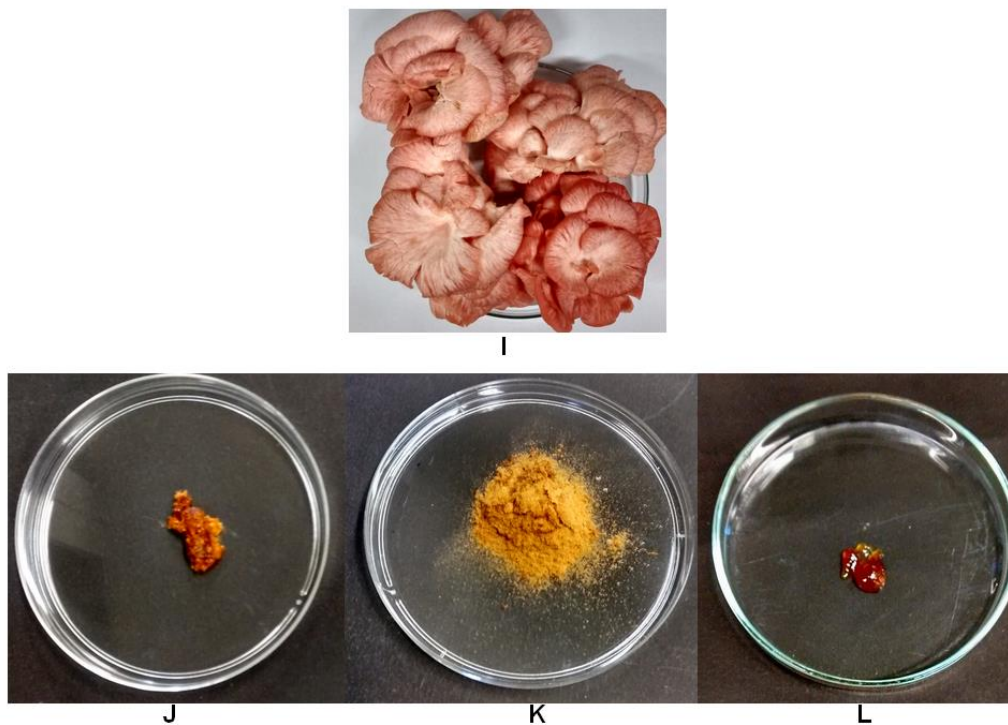
Figura 6. Aspectos morfológicos e dos extratos de *P. ostreatus*



Fonte: Autora

E= *P. ostreatus* in natura; F= extrato obtido por infusão; G= extrato obtido por ultrassom; H= extrato obtido por maceração.

Figura 7. Aspectos morfológicos e dos extratos de *P. ostreatoroseus*



Fonte: Autora

I= *P. ostreatoroseus* in natura; J= extrato obtido por infusão; K= extrato obtido por ultrassom; L= extrato obtido por maceração.

4.1.1 Extratos obtidos por infusão

A Tabela 1 apresenta as considerações relacionadas com a preparação dos extratos pelo método de infusão. As massas obtidas mostraram-se estáveis e com quantidade suficiente para realização das análises biológicas.

Tabela 1. Resultados da extração dos cogumelos por infusão

Amostras	Peso inicial	Extrato liofilizado	Rendimento
<i>P.ostreatus</i>	100g	4,4947g	4,5%
<i>P. eryngii</i>	100g	3,6201g	3,6%
<i>P. ostreatoroseus</i>	100g	1,1767g	1,2%

4.1.2 Extratos obtidos por ultrassom

A Tabela 2 apresenta as considerações relacionadas com a preparação dos extratos pelo método de ultrassom. As massas obtidas mostraram-se estáveis e com quantidade suficiente para realização das análises biológicas.

Tabela 2. Resultados da extração dos cogumelos por infusão

Amostras	Peso inicial	Extrato liofilizado	Rendimento
<i>P.ostreatus</i>	100g	6,4895g	6,5%
<i>P. eryngii</i>	100g	3,1254g	3,1%
<i>P. ostreatoroseus</i>	100g	2,9905g	3%

4.1.3 Extratos obtidos por maceração

A Tabela 3 apresenta as considerações relacionadas com a preparação dos extratos pelo método de maceração. As massas obtidas também se apresentaram estáveis e com quantidade suficiente para realização das análises biológicas.

Tabela 3. Resultados da extração dos cogumelos por maceração

Amostras	Peso inicial	Extrato liofilizado	Rendimento
<i>P.ostreatus</i>	100g	3,7783g	3,8%
<i>P. eryngii</i>	100g	2,7801g	2,8%
<i>P. ostreatoroseus</i>	100g	1,9856g	1,9%

Em relação à massa dos extratos obtidos observou-se que a metodologia de extração por ultrassom resultou em maior quantidade final de amostra em relação ao método de infusão e maceração, o que sugere que este é um método mais eficaz e vantajoso para a obtenção dos extratos, relacionado à obtenção de massa.

4.2 Determinação da atividade antibacteriana

4.2.1 Atividade antibacteriana de *Pleurotus eryngii*

A Tabela 4 apresenta os resultados encontrados através dos testes de microdiluição realizados utilizando os extratos de *P. eryngii*. De acordo com os dados obtidos com o revelador resazurina pode-se observar que os extratos de *Pleurotus eryngii* não possuem atividade contra nenhuma das cepas testadas.

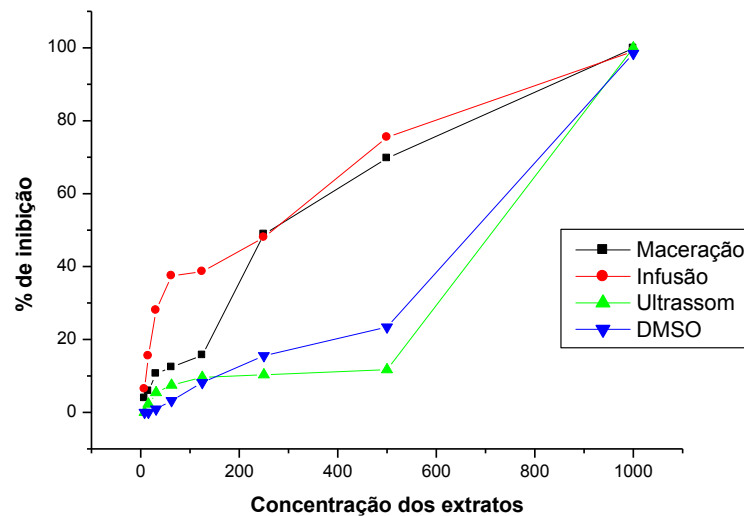
Tabela 4. Resultados da determinação da CIM de *P. eryngii*.

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		10%
<i>H. pylori</i>	> 1000	> 1000	> 1000	-	31,2	10%

*valores em ug/mL; (-) sem inibição

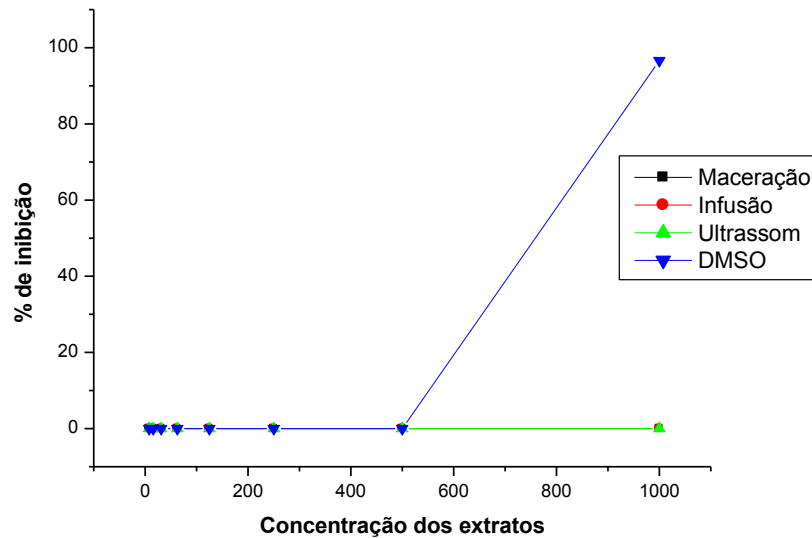
Já com a leitura espectrofotométrica foram confeccionados gráficos com as porcentagens de inibição encontradas. As Figuras 8, 9 e 10 apresentam os gráficos com as porcentagens de inibição para *E. coli*, *S. aureus* e *H. pylori* respectivamente.

Figura 8. Porcentagem de inibição do crescimento referente aos extratos de *P. eryngii* frente a *E. coli*



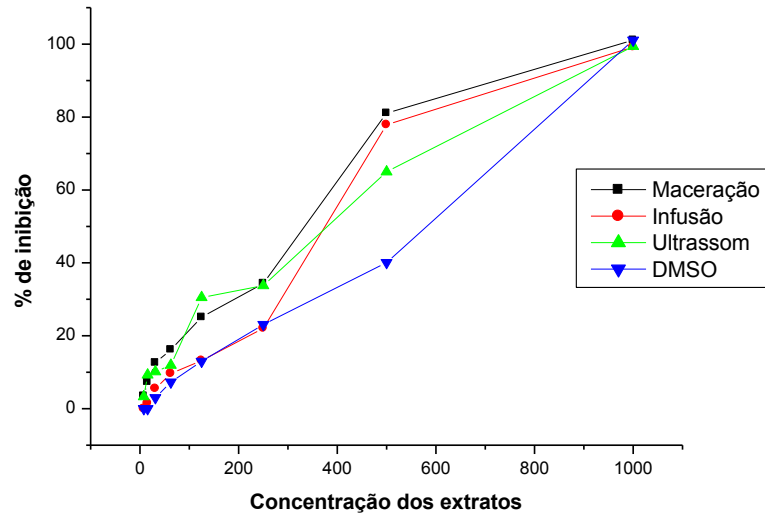
Através do gráfico pode-se concluir que os extratos provenientes dos métodos de infusão e maceração inibiram aproximadamente 70% do crescimento de *E. coli* na concentração de 500 ug/mL, já o extrato obtido por ultrassom, apresentou apenas 15% de inibição na mesma concentração. O solvente utilizado para solubilização dos extratos (DMSO) apresentou 100% de inibição do crescimento bacteriano na concentração de 1000 ug/mL, o que explica o alto valor de inibição encontrado nos extratos nessa mesma concentração.

Figura 9. Porcentagem de inibição do crescimento referente aos extratos de *P. eryngii* frente a *S. aureus*



De acordo com os dados apresentados no gráfico pode-se concluir que nenhum dos extratos de *P. eryngii* conseguiu inibir a cepa de *S. aureus*. Pode-se notar que o solvente utilizado para a solubilização dos extratos, neste caso, não promoveu interferência na atividade antimicrobiana, pois mesmo na maior concentração, nenhum dos extratos conseguiu inibir o crescimento bacteriano.

Figura 10. Porcentagem de inibição do crescimento referente aos extratos de *P. eryngii* frente a *H. pylori*.



Observando o gráfico, pode-se concluir que os extratos provenientes da maceração e infusão inibiram 80% do crescimento de *H. pylori*, enquanto que o método de ultrassom inibiu 60%, ambos na concentração de 500 ug/mL. Novamente, conclui-se que o solvente utilizado para solubilização dos extratos influenciou na inibição bacteriana na concentração de 1000 ug/mL, onde quase todos foram capazes de inibir 100% do crescimento.

4.2.2 Atividade antibacteriana de *Pleurotus ostreatus*

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos através do revelador resazurina. Pode-se observar que os extratos de *Pleurotus ostreatus* não possuem atividade antimicrobiana desejável contra nenhuma das cepas testadas.

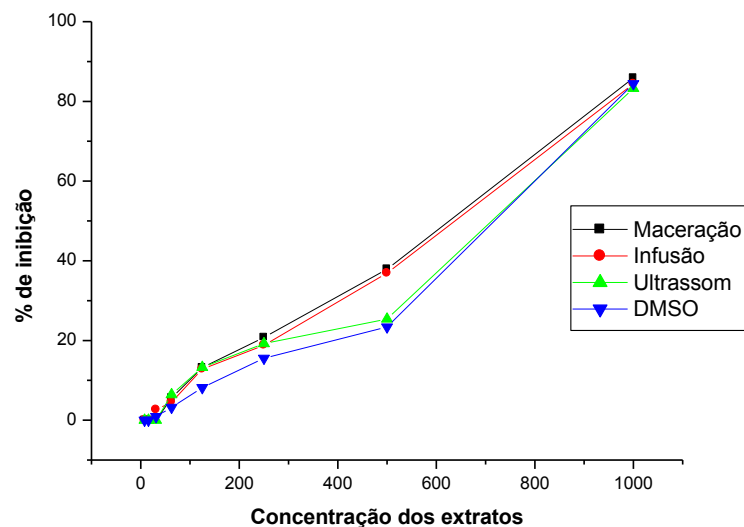
Tabela 5. Resultados da determinação da CIM de *P. ostreatus*.

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		10%
<i>H. pylori</i>	> 1000	> 1000	> 1000	-	31,2	10%

*valores em ug/mL; (-) sem inibição

As Figuras 11, 12 e 13 apresentam os gráficos com as porcentagens de inibição para *E. coli*, *S. aureus* e *H. pylori* respectivamente.

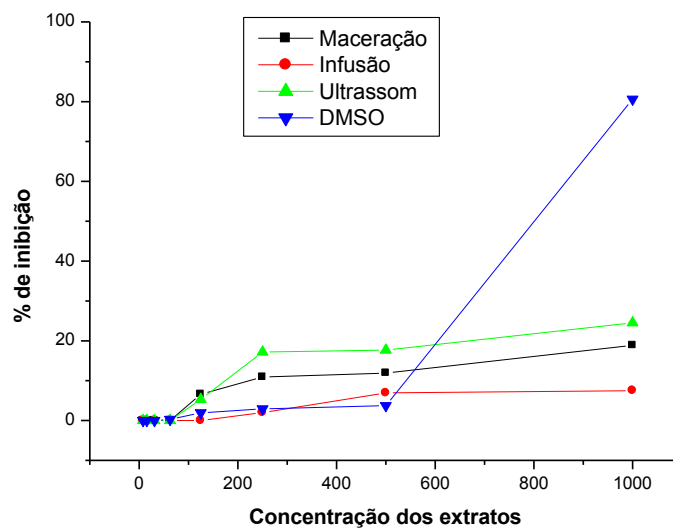
Figura 11. Porcentagem de inibição do crescimento referente aos extratos de *P. ostreatus* frente a *E. coli*



Através do gráfico pode-se concluir que os extratos provenientes dos métodos de infusão e maceração inibiram o crescimento bacteriano em 35%, enquanto que o de ultrassom inibiu 20% na concentração de 500 ug/mL. Ao analisar a maior concentração (1000 ug/mL) conclui-se que infusão e ultrassom obtiveram os melhores resultados, apresentando 80% de inibição do crescimento, enquanto que

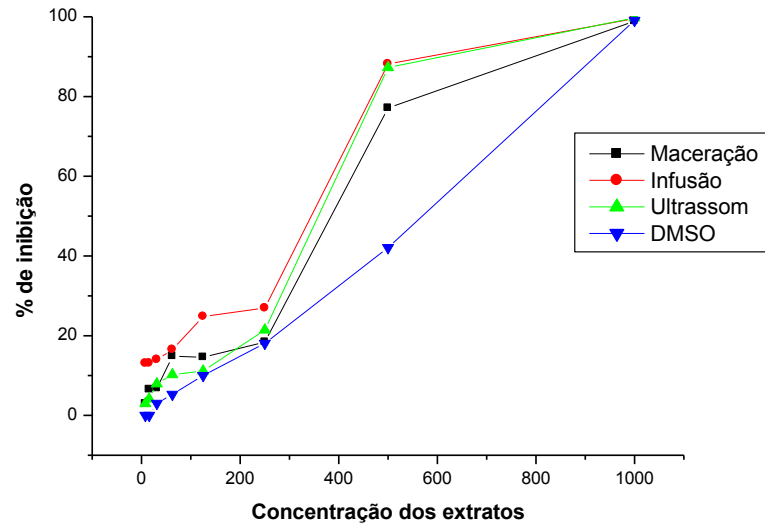
por maceração inibiu 60%, entretanto, esse resultado foi influenciado pela presença do solvente DMSO, que inibiu 90% do crescimento bacteriano na concentração de 10%.

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



O gráfico acima indica que a maior inibição foi do extrato proveniente do método de ultrassom, apresentando 20% de inibição na concentração de 500 ug/mL. Os valores de inibição da concentração de 1000 ug/mL são oriundos da concentração de 10% de DMSO utilizado para solubilizar as amostras. Diferentemente dos resultados de *E. coli* os extratos obtidos por maceração e ultrassom foram mais eficientes na atividade antibacteriana.

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



Com os dados apresentados no gráfico podemos concluir que o extrato obtido pelo método de maceração inibiu 75% do crescimento da cepa de *H. pylori* na concentração de 500 ug/mL, todavia, os extratos que foram obtidos pelos métodos de infusão e ultrassom inibiram aproximadamente 80%, sobressaindo-se em relação ao método anterior. Os valores de inibição da concentração de 1000 ug/mL foram provenientes da atividade exercida pela concentração de 10% de DMSO.

4.2.3 Atividade antibacteriana de *Pleurotus ostreatoroseus*

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos através do revelador resazurina. Pode-se observar que os extratos de *Pleurotus ostreatoroseus* não possuem atividade antimicrobiana desejável contra nenhuma das cepas testadas.

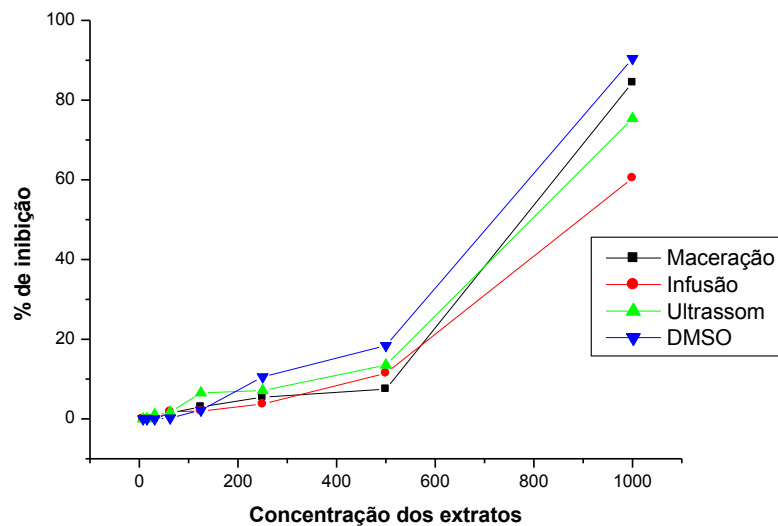
Tabela 6. Resultados da determinação da CIM de *P. ostreatoroseus*.

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		10%
<i>H. pylori</i>	> 1000	> 1000	> 1000	-	31,2	10%

*valores em ug/mL; (-) sem inibição

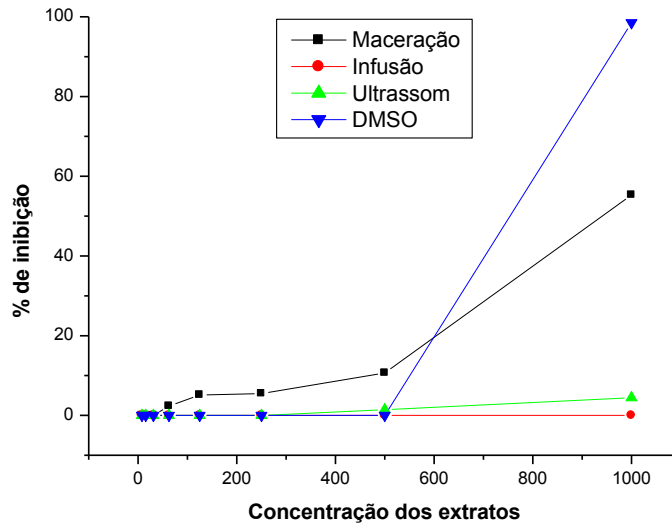
As Figuras 14, 15 e 16 apresentam os gráficos com as porcentagens de inibição para *E. coli*, *S. aureus* e *H. pylori*.

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



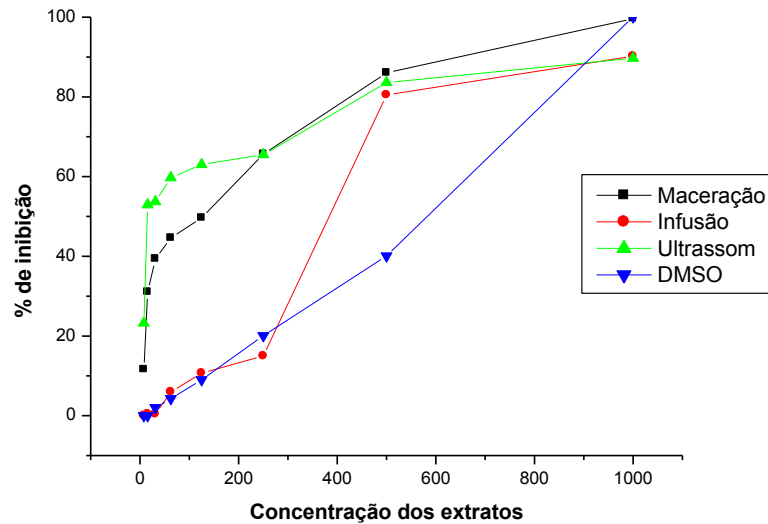
Através do gráfico pode-se concluir que os extratos provenientes dos métodos de infusão, ultrassom e maceração inibiram 15% do crescimento de *Escherichia coli* presente no teste na concentração de 500 ug/mL. Os valores de inibição provenientes da concentração de 1000 ug/mL sofreram interferência da atividade do solvente utilizado, DMSO na concentração de 10%.

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



Observa-se que a maior atividade foi do extrato macerado, que apresentou 15% de inibição do crescimento bacteriano na concentração de 500 µg/mL, enquanto que os extratos de infusão e ultrassom não apresentaram atividade. Os valores de inibição provenientes da concentração de 1000 µg/mL são resultados da atividade do DMSO, solvente utilizado na solubilização.

Figura 16. Porcentagem de inibição do crescimento referente aos extratos de *P. ostreatoroseus* frente a *H. pylori*



O gráfico acima indica que todos os extratos apresentaram atividade com cerca de 80% de inibição do crescimento da cepa de *H. pylori* na concentração de 500 µg/mL, se diferenciando dos outros gráficos, pois neste todos os extratos apresentaram atividade semelhante. Os valores de inibição provenientes da concentração de 1000 µg/mL são resultantes da ação do solvente utilizado (DMSO) na concentração de 10%.

5 DISCUSSÃO

A utilização de produtos naturais cresce cada dia mais em todas as áreas de comercialização, desde alimentação, cosméticos até medicamentos, como por exemplo, os fitoterápicos. No ramo da saúde, a realização de pesquisas relacionadas a produtos naturais tem um importante papel na descoberta de novos princípios ativos capazes de oferecer novas alternativas de tratamento para diversas doenças, uma vez que diversos medicamentos possuem como princípio ativo, compostos extraídos de produtos naturais (BARREIRO et al., 2009; VIEGO et al., 2006)

Dentro do contexto da procura por produtos naturais se encontra a utilização de cogumelos. No Brasil, o consumo de cogumelos não era muito notável, entretanto este cenário está mudando graças à divulgação do seu alto valor nutricional e propriedades medicinais, podendo prevenir diversas doenças e também pela diminuição dos preços, tornando o produto mais acessível (GOMES, 2013), além disso, na indústria de alimentos a procura por ingredientes a partir de fontes naturais que apresentem componentes bioativos para produção de alimentos funcionais está cada vez maior o que também incentivou os estudos com cogumelos e dos seus componentes químicos (LI, et al.; 2014).

Nesse estudo foram utilizados três métodos de extração com o objetivo de extrair diferentes compostos a partir de cada técnica. A infusão com água se baseou no princípio de que cogumelos por terem consistência mole, facilmente penetrantes e assim conseguiria facilmente penetrar e retirar possíveis substâncias ativas do fungo (SIMÕES et al., 2017). A utilização do ultrassom teve como principal função utilizar correntes de alta frequência para promover fragmentação de estruturas e membranas afim liberar mais facilmente os compostos presentes (TIWARI, 2015). O

etanol utilizado na técnica de maceração teve como objetivo extrair outros tipos de compostos, como por exemplo, flavonóides e ácidos fenólicos livres, já que esse solvente possui polaridade maior do que a água, (NAIMA, et al., 2015).

Analisando os dados relacionados à extração e quantidade de massa, pode-se observar que o método de ultrassom foi o que resultou em maior quantidade de extrato, possivelmente graças a utilização do aparelho que facilitou extração dos compostos, uma vez que causa desgastes nas membranas celulares e desagregação das células, resultando no aumento da penetração de solvente na amostra, aumentando assim a massa extraída (TIWARI, 2015).

Através dos gráficos de inibição realizados a partir da leitura espectrofotométrica, é possível também apontar que os métodos extrativos por infusão e maceração foram mais eficientes na extração de compostos ativos do que o método de ultrassom. Apesar do método de ultrassom ser capaz de extrair mais compostos e possibilitar maior obtenção de massa, no caso dos extratos de *P. ostreatus* e *P. eryngii*, as técnicas de infusão e maceração foram as que extraíram maior número de possíveis compostos polares ativos.

Existem diversos métodos para determinar atividade antimicrobiana de compostos. Um dos mais utilizados é por microdiluição em caldo com auxílio de microplacas de 96 poços. BONIFÁCIO e RAMOS et al. (2015) utilizaram sistemas lipídicos nanoestruturados como estratégia para melhorar a atividade anti-*Candida albicans* dos extratos de *Astronium* sp. Nos experimentos, a técnica de microdiluição foi utilizada, e como resultado, concluíram que os sistemas ajudaram a otimizar a atividade antifúngica dos extratos. Rashed et al. (2014) determinaram a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos metanólicos e compostos fenólicos dos frutos de *Diospyros virginiana* L. onde 16 cepas foram submetidas ao teste de

microdiluição para determinar a CIM e assim como neste 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, inclusive, alguns compostos fenólicos testados atingiram valores de CIM menores quando comparados com os controles positivos com antimicrobianos empregados como controle positivo. Ren et al. (2014) determinaram a atividade antibacteriana e antioxidante de extratos aquosos de oito cogumelos empregando dois métodos, difusão em ágar e microdiluição para determinar a CIM, onde no primeiro a forma de leitura empregada foi análise do diâmetro do halo de inibição, e no segundo a utilização de um leitor espectrofotométrico de microplacas para verificar a porcentagem de inibição. 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. Guendouze-Bouchefa et al. (2015) realizaram estudos sobre as propriedades medicinais de três plantas da família Ericaceae. No ensaio antimicrobiano também foi empregado a técnica de microdiluição onde extratos hexânicos e metanólicos foram diluídos em DMSO, semelhante ao que foi feito neste trabalho. Os resultados indicaram que os extratos apresentaram atividade antibacteriana, provavelmente devido aos polifenóis, taninos e flavonoides presentes na amostra das plantas. Jiao-Yang et al. (2014) buscaram determinar a atividade anti-*Staphylococcus aureus* de rizomas da espécie *Coptis chinensis* também empregando a técnica de microdiluição, e assim como realizado neste estudo, empregaram leituras espectrofotométricas e com a utilização do revelador resazurina. Através da leitura, foi observado que os rizomas possuem atividade antibacteriana frente a cepa de *S. aureus*.

Os controles utilizados nos testes foram de grande importância, uma vez que através deles conseguiu-se evitar erros na interpretação dos resultados. Nesse estudo, a utilização do controle do solvente foi essencial, pois através desse, percebeu-se que o solvente utilizado (DMSO) possui atividade e consegue também inibir o crescimento bacteriano. Assim, a partir deste dado, foi possível evitar resultados falso-positivos que levariam a conclusões errôneas sobre os extratos.

Os padrões inibitórios desempenhados por todos os extratos empregados contra todas as cepas testadas mostraram-se insatisfatórios de acordo com a revelação empregando a resazurina, 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, onde a precisão é maior, pode-se notar que os extratos promoveram inibição do crescimento em um menor percentual de inibição (>90%), o qual explica a imprecisão dos resultados obtidos com o revelador. Isso decorre da sensibilidade do agente revelador resazurina (cor azul), que é reduzida na presença de células viáveis formando a resorufina, substância de coloração rósea. No entanto, as nuances de cores entre o azul e o róseo podem ocasionar dúvidas na determinação da CIM (STOPPA et al., 2009), detectada nesse caso somente quando ocorre uma porcentagem de inibição do crescimento microbiano igual ou maior que 90% (HÖRNER et al., 2008; GUDIÑA et al., 2010). Já a leitura espectrofotométrica fornece leituras (de turvação) que variam de 0 a 100 % de inibição de crescimento, demonstrando, portanto, maior sensibilidade. Adicionalmente, as leituras visuais realizadas em cada poço das microplacas foram condizentes com o que foi observado nas absorvâncias encontradas no espectrofotômetro.

Estudos apresentados na literatura científica evidenciando a atividade antimicrobiana dos cogumelos empregados neste estudo mostram a capacidade inibitória de extrativos contra diferentes micro-organismos, todavia com métodos diferentes do que foi empregado neste trabalho. A literatura mostra escassez de trabalhos que investigaram a atividade antimicrobiana de cogumelos empregando a técnica de microdiluição, o que destaca o ineditismo dos resultados aqui reportados.

HEARST et al. (2009), realizaram testes com extratos de *P. ostreatos* frente a 39 micro-organismos, dentre eles 29 bactérias – incluindo *E. coli* e *S. aureus* - e 10 fungos. A atividade antibacteriana foi determinada através da técnica de difusão em Agar, na qual foi verificado que *P. ostreatus* apresentou atividade frente a 3 micro-organismos, sendo eles *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*. O resultado diverge do presente estudo, pois além da forma de extração ter sido diferente, já que os cogumelos foram submetidos a secagem antes da extração, o método de difusão em ágar não é tão sensível quanto a microdiluição, pois na última consegue-se verificar a atividade do extrato em diversas concentrações, e a leitura espectrofotométrica fornece resultados mais exatos.

KALYONCU et. al. (2010) determinaram a atividade antibacteriana de 10 espécies de diferentes de cogumelos, entre eles *P. ostreatus* e *P. eryngii*. Foram empregados extratos etanólicos, os quais foram submetidos a testes de difusão em Agar. *P. ostreatus* destacou-se como uma das espécies que apresentaram maior atividade contra as bactérias, apresentando diâmetro de inibição contra *Sarcina lutea* de 30mm e contra o *S. aureus* de 24mm. Os controles positivos com antibióticos apresentaram inibições de 28mm e 32mm, respectivamente, o que indica grande atividade antimicrobiana do cogumelo em função do teste realizado. Em relação ao *P. eryngii*, não houve inibição significativa contra nenhuma das

bactérias. O estudo apresentou resultado semelhante ao encontrado neste trabalho referente ao poder antibacteriano do extrato etanólico de *S. aureus*, ainda que a metodologia empregada tenha sido diferente, o que pode ter causado divergências no resultado com *P. eryngii*.

Li et al. (2014) determinaram a atividade antibacteriana de *Pleurotus eryngii* através de polissacarídeos extraídos com etanol os quais foram posteriormente sulfonados. As amostras em diversas concentrações (10 mg/ml, 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml e 0.625 mg/ml) foram testadas frente a cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* também através do método de difusão em ágar para determinar a zona de inibição. Os polissacarídeos sulfatados tiveram maior atividade frente as cepas de *E. coli* e *S. aureus* do que os não sulfatados, com zonas de inibição de 11,7 mm e 31,8mm, respectivamente, concluindo que a sulfonação pode ser uma boa alternativa para aumentar a atividade antibacteriana dos polissacarídeos provenientes de *P. eryngii*. Também se concluiu que os polissacarídeos apresentaram maior atividade contra *S. aureus*.

CHOWDHURY et. al. 2015 também realizaram a determinação da atividade antibacteriana de *Pleurotus ostreatus* com uma técnica de extração bem semelhante a que foi realizada nesse trabalho, deferindo apenas o solvente utilizado, no caso o metanol. O método empregado para avaliar a atividade antimicrobiana novamente foi difusão em ágar, entretanto, os extratos foram testados em diversas concentrações (0,39 mg/mL até 29 mg/mL) para verificar a CIM. A leitura foi realizada a partir do halo de inibição apresentado, sendo valores acima de 10mm considerados satisfatórios. Foram empregados oito micro-organismos diferentes, entre eles *E. coli* e *S. aureus*. O extrato de *P. ostreatus* apresentou atividade satisfatória em 6 dos 8 micro-organismos testados, com destaque ao

Saccharomyces cerevisiae (15mm) e *Bacillus subtilis* (14mm), *E. coli* (11mm) e *S. aureus* (13,5mm) mas não tão satisfatórios quando comparados a outros cogumelos, como *Lentinula edodes*, que apresentou maiores valores de CIM com todos os cogumelos testados.

PARIHAR et al. (2015) utilizaram dois extratos de *P. ostreatus*, utilizando metanol e água como solventes, ambos extraídos sob refluxo. Novamente, o ensaio foi realizado em ágar difusão e a leitura através do diâmetro de inibição, no controle positivo foi utilizado estreptomicina. O maior halo de inibição foi contra *Staphylococcus typhi* com 15mm (aquoso) e *S. aureus* (metanólico) com 17mm. Além disso, foi concluído que os extratos possuem maior atividade contra gram positivas. Da mesma forma, ROY et al. (2016) avaliou a atividade antimicrobiana de *P. ostreatus* com o método de difusão, nesse caso utilizando acetato de etila como solvente. O teste foi realizado contra 3 fungos e 10 bactérias, entre elas *E. coli*, e o controle positivo realizado com canamicina e nistatina. O extrato apresentou atividade antimicrobiana moderada contra todas as bactérias, entretanto não apresentou atividade antifúngica.

Existem diversos tipos de métodos para determinar a atividade antibacteriana de compostos naturais que divergem na metodologia empregada, desde os mais simples que demandam pouco tempo de trabalho e materiais economicamente viáveis, até os mais complexos e caros que muitas vezes não podem ser realizados em laboratórios de pesquisa acadêmica. KLANCNIK, et al. (2010) realizaram um estudo comprando alguns métodos para avaliar atividade antimicrobiana de extratos de plantas, os métodos estudados foram difusão em disco, diluição com plaqueamento em ágar e diluição em caldo. Concluiu-se de que os métodos de difusão em disco e diluição em ágar testam a habilidade da bactéria de produzir um

crescimento visível quando adicionados as amostras. Os métodos de diluição em caldo e com plaqueamento em ágar apresentaram resultados comparáveis, entretanto, a diluição em microplacas é mais sensível que os outros métodos testados e conseqüentemente mais apropriado para uma rápida determinação quantitativa da atividade antibacteriana dos extratos avaliados (DAS et al., 2010). E apesar dos resultados de microdiluição serem semelhantes à de outros métodos que envolvam diluição, seu uso é preferível, pois é o mais rápido, economicamente viável e permite o uso de diversas bactérias e extratos no mesmo teste. Além disso, no caso da difusão em disco, as zonas de inibição podem sofrer efeito de algumas variantes como por exemplo, volatilização da amostra, tamanho do disco, quantidade de compostos adicionados no disco, absorção pelo disco, diferentes composições dos meios de cultura empregados, facilidade e/ou dificuldade que algumas substâncias apresentam de se difundirem no disco (SCORZONI et al., 2007). Alves et. al. (2012) também realizaram comparações entre os métodos de difusão em ágar e microdiluição para avaliar atividade antibacteriana de extratos vegetais e concluíram de que apesar da difusão em ágar ter apresentado maior inibição das bactérias, a técnica de microdiluição em caldo é melhor opção para determinar a atividade antimicrobiana. Então, a partir desses estudos, pode-se concluir que os resultados apresentados nos seis trabalhos citados acima foram diferentes do presente estudo devido a metodologia empregada, já que apresentam menor sensibilidade do que a microdiluição em caldo.

Apesar de pouco estudado, *Pleurotus ostreatoroseus* apresentou boa atividade antibacteriana segundo o estudo desenvolvido por CORRÊA et al. 2015, no qual foi empregada a técnica de microdiluição empregando dois extratos etanólicos do cogumelo (micélio e corpo de frutificação) contra diferentes cepas de

bactérias e fungos. Os extratos do corpo de frutificação foram mais eficientes na inibição das bactérias, apresentando atividade antibacteriana superior à desse trabalho, frente às cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Este fato pode estar relacionado com a diferença das origens das cepas empregadas assim como a procedência e obtenção dos extratos empregados. Todavia, o extrato desta espécie foi o mais promissor na atividade anti-*H. pylori* desenvolvido neste estudo.

Deve-se salientar que os resultados obtidos neste estudo se referem ao potencial antimicrobiano de extratos fungicos, que por sua vez relaciona-se diretamente com a presença de metabólitos secundários produzidos pelas espécies fungicas empregadas, os quais são produzidos com a função de proteção ou defesa contra-ataque de micro-organismos e insetos (BONIFÁCIO et al., 2014). Tais metabólitos podem sofrer variações quanto às concentrações nas espécies em decorrência de fatores ambientais como temperatura e condições hídricas o que implica diretamente nos resultados encontrados em todas as investigações descritas (SILVA et al., 2010).

Os resultados obtidos neste estudo mostram-se de grande relevância, uma vez que a inibição do crescimento bacteriano desempenhado pelas espécies de cogumelos analisadas pode exercer função direta no controle de doenças de origem bacteriana, com ênfase às de origem gástrica, fato justificado ao fato de que ao serem consumidos podem atuar como agentes terapêuticos e ou profiláticos, outrossim, estudos futuros podem demonstrar a capacidade sinérgica de ação de seus extratos vegetais com os fármacos empregados em prática clínica, favorecendo a diminuição da dose terapêutica e consequentemente a redução dos efeitos tóxicos e/ou cumulativos.

O consumo alimentício de cogumelos das espécies utilizadas neste estudo pode ser considerado como um possível adjuvante no combate a infecções bacterianas por *E. coli*, *S. aureus* e *H. pylori*.

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir-se que:

- ✓ Os métodos extrativos, infusão e maceração, foram os mais eficazes na obtenção de extratos vegetais com componentes com propriedade antimicrobiana.
- ✓ Os extratos de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus ostreatoroseus* obtidos por infusão e maceração apresentam atividade moderada contra *Escherichia coli*, já os obtidos por ultrassom mostraram-se menos ativos.
- ✓ Os extratos de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus ostreatoroseus* obtidos por infusão, maceração e ultrassom apresentam baixa ou nenhuma atividade contra *Staphylococcus aureus*.
- ✓ Os extratos de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* e obtidos por infusão, maceração e ultrassom apresentam atividade moderada contra *Helicobacter pylori*.
- ✓ Os extratos de *Pleurotus ostreatoroseus* foram os mais ativos contra *H. pylori*.

7 CONTEXTUALIZAÇÃO

O estudo sobre a atividade antibacteriana de três tipos de cogumelos para realização do Trabalho de Conclusão de Curso foi muito importante, pois abrangeu vários aspectos anteriormente abordados no curso.

As propriedades nutricionais de produtos naturais como os cogumelos foram abordadas em muitas aulas, como nutrição e farmacognosia, trazendo informações sobre os benefícios causados pelos metabólitos e outras substâncias produzidas por esses fungos. Ao me aprofundar sobre o assunto pude entender com mais detalhes como o consumo desses alimentos pode ser rico e benéfico para saúde. Além disso, a oportunidade de poder verificar se o Shimeji, um cogumelo que se tornou tão popular, possui alguma propriedade antibacteriana foi muito rica, visto que a procura por medicamentos à base de produtos naturais está cada vez maior.

As bactérias utilizadas no projeto – *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Helicobacter pylori* – foram abordadas nas disciplinas de Microbiologia, Microbiologia Aplicada, entre outras, onde aprendemos as características, patogenicidade e tratamentos de cada uma. Também foi ensinado que a descoberta de antibióticos e seu uso desenfreado tanto na população quanto em animais fez com que surgissem cepas com mutações capazes de sobreviver aos medicamentos. Logo, foi observado o crescimento exponencial de bactérias resistentes a antibióticos, um fato tão grave que está se tornando um grande problema de saúde pública. Com isso, a necessidade para achar alternativas ao tratamento é cada vez maior. Pude observar esse fato na prática realizando experimentos com bactérias que muitas vezes sobreviviam as doses utilizadas de antibiótico para realizar o controle positivo dos testes.

A procura de produtos naturais com atividade antimicrobiana, uso irracional de antibióticos e os benefícios dos cogumelos estão sendo cada vez mais abordados, a população também está ganhando mais conhecimento sobre o assunto e ter aprofundado meus conhecimentos foi de grande importância para poder no futuro orientar a população de maneira correta, visando o bem-estar e a segurança do paciente. Além disso, com esse estudo espero ter contribuído com a análise dos extratos de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus ostreatoroseus*, que apresentaram sinais de atividade contra as bactérias testadas.

8 REFERÊNCIAS

- AIDA, F.M.N.A.; SHUHAIMI, M.; YAZID, M.; MAARUF, A.G; Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v 20, p. 567-575, 2009.
- ALAM, N.; YOON, N. K.; LEE, S. J.; CHO, J. H.; SHIM, J. M.; LEE, S. T. Dietary effect of *Pleurotus eryngii* on biochemical function and histology in hypercholesterolemic rats. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v 18, p. 403-409, 2011.
- 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.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S.; Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química nova**, v. 32, n.3, p. 679-688, 2009.
- BASTOS, V. M. P.; NORBERG, A. N.; OLIVEIRA, J. T. M.; SANCHES, F. G.; BARRETO JUNIOR, O. S.; SERRA-FREIRE, N. M. Comparação da incidência, da prevalência da colonização, e da resistência de *Staphylococcus aureus* em diferentes populações humanas. **Revista UNIABEU**. v. 6, n. 13, p. 28-40, 2013.
- BELDA, S.; SAEZ, J.; SANTIBANEZ, M.; RODRIGUEZ, J. C.; GALIANA, A.; SOLA-VERA, J.; RUIZ-GARCIA, M.; BROTONS, A.; LOPEX-GIRONA, E.; GIRONA, E.; SILLERO, C.; ROYO, G. Quantification of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa by real time polymerase chain reaction: comparison with traditional diagnostic methods. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 74, issue 3, p. 248-252, 2012.
- BOBEK, P.; ONDREICKA, R.; KLAVANOVÁ, J.; OZDIN, L. Oyster mushroom (*PLEUROTUS OSTREATUS*) decreases serum and liver cholesterol and increases cholesterol 7 α -hydroxylase activity and fecal excretion of neutral sterols and bile acids in hypercholesterolemic rats. **Nutritional Research**, v. 14, issue 11, p. 1683-1688, 1994.
- BROWN, D. G.; LISTER, T.; MAY-DRACKA, T. L. New natural products as new leads for antibacterial drug discovery. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 24, p. 413-418, 2014.
- 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.
- BONIFÁCIO, B. V.; RAMOS, M. A. S.; SILVA, P. B.; NEGRI, K. M. S.; LOPES, E. O.; SOUZA, L. P.; VILEGAS, W.; PAVAN, F. R.; CHORILLI, M. BAUAB, T. M. Nanostructured lipid system as a strategy to improve the anti-*Candida albicans* activity of *Astronium* sp. **Dove Medical Press**, p. 5081-5092, 2015.
- BONIFÁCIO, B. V. **Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados**. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências

Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2014.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**. v. 7, p. 629-641, 2009.

CHOWDHURY, M. M. H.; KUBRA, K.; AHMED, S. R.; Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in Bangladesh. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 2015.

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.

CARDOSO, J. C. P., DEMENJOUR, P. L. M. M., PAZ, M. F. Cultivo do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* em bagaço de bociuva e de cana-de-açúcar pela técnica jun-caó. **Evidência**, v.13, 31–40, 2013.

CORREA, R. C. G.; SOUZA, A. H. P.; CALHELHA, R. C.; BARROS, L.; GLAMOCLIJA, J.; SOKOVIC, M.; PERALTA, R. M.; BRACHT, A.; FERREIRA, I. C. F. R.; Bioactive formulations prepared from fruiting bodies and submerged culture mycelia of the Brazilian edible mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. **Food & Function**, 2015.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1830, p. 3670–3695, 2013.

DAS, K.; TIWARI, R. K. S.; SHRIVASTAVA, D. K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. **J. Med. Plants Res.**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.

DEERING, A. J.; MAUER, L. J.; PRUITT, R. E. Internalization of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in plants: A review. **Food Research International**. v. 45, p. 567-575, 2012.

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.

GISBERT, J. P.; PÉREZ-AISA, A.; CASTRO-FERNANDEZ, M.; BARRIO, J.; RODRIGO, L.; COSME, A.; GISBERT, J. L.; MARCOS, S.; MORENO-OTERO, R. *Helicobacter pylori* first-line treatment and rescue option containing levofloxacin in patients allergic to penicillin. **Digestive and Liver Disease**, v.42, p. 287-290, 2010.

GRUNDMANN, H.; AANENSEN, D. M.; WIJINGAARD, C. C. V. D. SPRATT, B. G.; HARMSSEN, D.; FRIEDRICH, A. W. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: A molecular-epidemiological analysis. **Plos One Medicine**. v. 7. p. 1-15, 2010.

GOMES, D. Informações sobre cogumelos comestíveis. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 10, n. 2, 2013.

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

GUENDOUZE-BOUCHEFA, N.; MADANI, K.; CHIBANE, M.; BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L.; HAUCHARD, D.; KIENDREBEOGO, M.; STEVIGNY, C.; OKUSA, P. N.; DUEZ, P. Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of three Ericaceae from Algeria. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 459-466, 2015. ~

GUNAWARDENA, D.; BENNET, L.; SHANMUGAM, K.; KING, KERRY N.; WILLIAMS, R.; ZABARAS, D.; HEAD, R.; OOI, L.; GYENGESI, E.; MUNCH, G. Anti-Inflammatory Effects Of Five Commercially Available Mushroom Species Determined In Lipopolysaccharide And Interferon- γ Activated Murine Macrophages. **Food Chemistry**, V. 148, P. 92-96, 2014.

GUO, A. C.; JEWISON, T.; WILSON, M.; LIU, Y.; KNOX, C.; DJOUMBOU, Y.; LO, P.; MANDAL, R.; KRISHNAMURTHY, R.; WISHART, D. S.; ECMDB: The *E. coli* Metabolome Database. **Nucleic Acids Research**, v.41, 2013.

GURNEY, S.; CARVALHO, L.; GONZALES, C.; GALAVIZ, E.; SONSTEIN, F. An Efficacious and Cost-Effective Pharmacologic Treatment for *Helicobacter pylori*. **The Journal for Nurse Practitioners**, v. 10, Issue 1, p. 2-29, 2014.

HAYEK, S. A.; GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Antimicrobial Natural Products. **FORMATEX**, v. 1, p. 910-921, 2013.

HAN, S.; KIM, K.; LIM, K.; OH, T. Biological Activity Analysis of Different Solvent Extracts from *Pleurotus ostreatus*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 8(26), 2015.

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.

HÖRNER, 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.

JAYAKUMAR, T.; THOMAS, P. A.; GERALDINE, P. In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, Issue 2, p. 228-234, 2009.

JIAO-YANG, L.; DAN, Y.; MEI-HUA, Y. Study of the anti-MRSA activity of *Rhizoma coptidis* by chemical fingerprinting and broth microdilution methods. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, p. 393-400, 2014.

KALAC, P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms, **J Sci Food Agric**, v 93, p. 209-218, 2013.

KALYONCU, F.; OSKAY, M.; SAGLAM, H.; ERDOGAN, F. T.; TAMER, U. A. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Mycelia of 10 Wild Mushroom Species. **Journal of Medicinal Food**, v 13 n 6, p. 415-149, 2010.

KHATUN, S.; ISLAM, A.; CAKILCIOGLU, U.; GULER, P.; CHATTERJEE, N. C. Nutritional qualities and antioxidant activity of three edible oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*), **NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences**, p. 1-5, 2015.

KLANCNIK, A.; JERSEK, B.; MOZINA, S. S.; Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, 2010.

KLAUS, A.; KOZARSKI, M.; VUNDUK, J.; TODOROVIC, N.; JAKOVLJEVIC, D.; ZIZAK, Z.; PAVLOVIC, V.; LEVIC, S.; NIKSIC, M.; GRIENSVEN, L. J. L. D. V.; Biological potential of extracts of the wild edible Basidiomycete mushroom *Grifola frondosa*. **Food Research International**, v. 67, p. 272-283, 2015

LARGETAU, 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.

LAKHDAR, M.; MERIEM, H. K.; LARBI, B.; AMINA, R.; AICHA, S. Phytochemical Analysis and Antifungal Activity of *Anvillea Radiata*. **World Applied Sciences Journal**, v. 26, n. 2, p. 165-171, 2013.

LI, S.; SHAH, N. P.; Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. **Food Chemistry**, v. 165, p. 262- 270, 2014.

LI, S.; SHAH, N. O.; Effects of *Pleurotus eryngii* polysaccharides on bacterial growth, texture properties, proteolytic capacity and angiotensin-I-converting enzyme–inhibitory activities of fermented milk. **American Dairy Science Association**, v. 98, p. 2949-2961, 2015.

LIU, K.; WANG, J.; ZHAO, L.; WANG, Q. Anticancer, antioxidant and antibiotic activities of mushroom *Ramaria flava*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 375–380, 2013.

LO, C.C.; HSU, P.I.; LO, G.H.; LAI, K.H.; CHENG, J.S.; TSENG, H.H.; LIN, C.K.; CHAN, H.H.; WANG, Y.Y.; KU, M.K.; LIN, C.P.; PENG, N.J.; CHIEN, E.J.; Comparison of clinical, serological and histological findings between non-ulcer dyspepsia patients with and without *Helicobacter pylori* infection. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.16, Issue 3, p. 276–281, 2001.

LUJÁN, D. A.; LUJÁN, L. M.; MAMANI, E. Resistência a antibióticos de cepas *Escherichia coli* isoladas de infecções do trato urinário adquiridas na comunidade - Cidade de Lima, Peru. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 14, n. 1, p. 17-20, 2012.

MA, G.; YANG, W.; MARIGA, A.; FANG, Y.; MA, N.; PEI, F.; HU, Q. Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* residue. **Carbohydrate polymers**, v. 114, p. 297-305, 2014.

MAIA, R. R.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. P.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; ALBUQUERQUE, A. C. L.; PEREIRA, L. F.; MACEDO-COSTA, M. R.; PEREIRA, A. V. Efeito antimicrobiano do extrato de *momordicacharantia* Linn. isolado e em associação com antibióticos sobre *Staphylococcus aureus* multirresistentes. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**. v. 12, p. 12-17, 2008

MÉGRAUD, F.; LEHOURS, P. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v.2, p. 280-322, 2007.

MOLINA-INFANTE, J.; SHIOTANI, A. Practical Aspects in Choosing a *Helicobacter pylori* therapy. **Gastroenterology Clinics of North America**, 2015.

MINATO, K. Mushrooms: Immunomodulating Activity and Role in Health Promotion. **Dietary Components and Immune Function**, p. 529-539, 2010.

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.

NEWMAN, D. J. and CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79(3), p. 629-661, 2016.

NOWACKA, N.; NOWAK, R.; DROZD, M.; OLECH, M.; LOS, R.; MALM, A. Analysis of phenolic constituents, antiradical and antimicrobial activity of edible mushrooms growing wild in Poland. **LWT - Food Science and Technology**. v. 59, p. 689 – 694, 2014

OPPONG, P.; MAJUMDAR, D.; ATHERTON, J.; BEBB, J. *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcers. **Gastroenterology**, v. 43, Issue 4, p. 215-222, 2015.

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.

PARIHAR, S.; VIRANI, K. D.; PITHAWALA, E. A.; SHUKLA, M. D.; LAHIRI, S. K.; JAIN, N. K.; MODI, H. A.; Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in Bangladesh. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 6, 2015.

PATEL, A.; SHAH, N.; PRAJAPATI, J. B. Clinical application of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* infection - A brief review. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.47, p. 429-437, 2014.

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.

RIEDER, G.; FISCHER, W.; HAAS, R. Interaction of *Helicobacter pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, Issue 1, p. 67-73, 2005.

RODRÍGUEZ-ROJAS, A.; RODRÍGUEZ-BELTRÁN, J.; COUCE, A.; BLÁZQUEZ, J. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution, **International Journal of Medical Microbiology**, v 303, p. 293-297, 2013.

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

ROY, D. A.; AZAD, A. K.; SULTANA, F.; ANISUZZAMAN, A. S. M. In-vitro antimicrobial activity of ethyl acetate extract of two common edible mushrooms. **The Journal of Phytopharmacology**, v. 5(2), p. 79-82, 2016.

SALEEM, M.; NAZIR, M.; ALI, M. S.; HUSSAIN, H.; LEE, Y. S.; RIAZ, N., JABBAR, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Nat. Prod. Rep.**, v. 27, p. 238-254, 2010.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 25-34, 2007

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

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Do produto natural ao medicamento**, 6. ed, 2017.

SMOLSKAITÈ, L.; VENSKUTONIS, P. R.; TALOU, T.; Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. **LWT – Food Science and Technology**, v. 60, p. 462-471, 2015

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.

SYNYTSYA, A.; MICKOVÁ, K.; SYNYTSYA, A.; JABLONSKÝ, I.; SPEVACEK, J.; ERBAN, V.; KOVÁRIKOVÁ, E.; COPÍKOVÁ, J. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: structure and potential prebiotic activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 548-556, 2009.

TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of comensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. v. 8, p. 207-217, 2010.

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

VIEGAS, C.; BOLZANI, S. V.; BARREIRO, E. J. Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

ZHANG, A.; LI, X.; XING, C.; YANG, J.; SUN, P. Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus eryngii* using response surface methodology, **International Journal of Biological Macromolecules**, v 65, p. 28-32, 2014.

ZEPEDA-BASTIDA, A.; OJEDA-RAMÍREZ, D.; SOTO-SIMENTAL, S.; RIVERO-PEREZ, N.; AYALA-MARTÍNEZ, M. Comparison of Antibacterial Activity of the Spent Substrate of *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*, **Journal of Agricultural Science**, v. 8, n. 4, 2016.

WANG, H.; GAO, J.; NG, T. B. A New Lectin with Highly Potent Antihepatoma and Antisarcoma Activities from the Oyster Mushroom *Pleurotus Ostreatus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, Issue 3, p. 810-816, 2000.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Microbiol Biotechnol**, v 60, p. 258–274, 2002.

WHO. World Health Organization report. **Antimicrobial resistance (AMR)**. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/amr_20100820/en/index.html>. Acesso em 20 de maio, 2015

WU, W; YANG, Y; SUN, G. Recent Insights into antibiotics in *Helicobacter pylori* eradication. **World journal of gastroenterology**, v. 17 n 30 p. 3971-3975, 2012.

YANG, Z.; XU, J.; FU, Q.; FU, X.; SHU, T.; BI, Y.; BI, S.; Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal cancer. **Carbohydrate Polymers**, v 95, p. 615-620, 2013.

YONEZAWA, H.; OSAKI, T.; KAMIYA, S.; Biofilm Formation by *Helicobacter pylori* and Its Involvement for Antibiotic Resistance. **BioMed Research International**, 2015.