

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA  
BACHARELADO EM QUÍMICA

FERNANDA GHENOV

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA  
DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE CHÁ PRETO (*Camellia sinensis*) E  
DOS COGUMELOS SHIITAKE (*Pleurotus ostreatus*) E SHIMEJI (*Lentinula  
edodes*)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA  
2014

FERNANDA GHENOV

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE CHÁ PRETO (*Camellia sinensis*) E DOS COGUMELOS SHIITAKE (*Pleurotus ostreatus*) E SHIMEJI (*Lentinula edodes*)**

Trabalho apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II do Curso de Graduação em Química, do Departamento de Química e Biologia – DAQBI - da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

Orientadora: Profa. Dra. Giselle Maria Maciel

CURITIBA

2014

## RESUMO

GHENOV, Fernanda. Avaliação *in vitro* das atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de chá preto (*Camellia sinensis*) e das espécies de cogumelos SHIITAKE (*Pleurotus ostreatus*) e SHIMEJI (*Lentinula edodes*). 2014. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Bacharel em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

Em tempos recentes, as doenças causadas por microrganismos em seres humanos estão se tornando cada vez mais sérias, uma vez que a maioria das bactérias patogênicas e fungos são resistentes a agentes antimicrobianos. Devido ao aumento da procura de tratamentos alternativos, o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos a partir de substâncias naturais e inorgânicas são indispensáveis. Muitos produtos naturais apresentam também potencial antioxidante, o qual ajuda no combate a radicais livres. Nesse contexto, o trabalho consistiu no estudo de extratos hidroalcoólicos de chá preto e de duas espécies de cogumelos comestíveis, *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*. Esses extratos foram avaliados *in vitro* frente a quantificação de compostos fenólicos, com posterior avaliação da atividade antioxidante pelo teste DPPH, obtendo-se correlação entre eles; e frente a atividade antimicrobiana, com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, através do método de difusão em ágar com perfuração de poços e a determinação da concentração inibitória mínima em caldo. Em ambos os teste foi encontrado significativo potencial antimicrobiano

Palavras-chave: Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana. *Camellia sinensis*. *Pleurotus ostreatus*. *Lentinula edodes*.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>5</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>7</b>
<b>3 OBJETIVO</b> .....	<b>8</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	8
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	8
<b>4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>9</b>
4.1 COGUMELOS .....	9
4.1.1 <i>Lentinula edodes</i> .....	10
4.1.2 <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	11
4.2 CHÁ PRETO .....	12
4.3 COMPOSTOS BIOATIVOS COM PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES .....	13
4.3.1 compostos Fenólicos .....	15
4.4 COMPOSTOS BIOATIVOS COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS .....	17
4.5 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS .....	18
<b>5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	<b>20</b>
5.1 AMOSTRAS .....	20
5.2 BACTÉRIAS .....	20
5.3 ANTIBIÓTICOS .....	20
5.3.1 Preparo da solução de Cefalexina (Medley) .....	21
5.3.2 Preparo da solução de Amoxicilina+Clavulanato de potássio (Novamox®, Ache).....	21
5.4 EXTRAÇÃO CONVENCIONAL DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	21
5.4.1 Quantificação de compostos fenólicos totais.....	22
5.4.1.2 Preparo dos padrões de Ácido Gálico.....	23
5.4.1.3 Método de Folin-Ciocalteu .....	23
5.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE .....	24
5.5.1 Atividade antioxidante pelo Teste DPPH• .....	24
5.5.2 Solução DPPH 60µM.....	24
5.5.3 Determinação da atividade antioxidante total .....	25
5.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO .....	25
5.6.1 Teste de difusão em ágar com perfuração de poços .....	25
5.6.1.1 Preparo das placas de Petri para o teste de difusão em ágar com perfuração de poços .....	26
5.6.1.2 Padronização do inóculo .....	27
5.6.1.3 Inoculação .....	28
5.6.1.4 Aplicação das amostras nos ensaios de difusão em ágar com perfuração de poços .....	28
5.6.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC) .....	29
5.6.3 Análise estatística.....	31
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>32</b>
6.1 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS .....	32
6.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH ..	36
6.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO .....	41
6.3.1 Método de difusão em ágar com perfuração de poços .....	41
6.3.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC) .....	52
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>8 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cada dia que passa cresce a preocupação das pessoas em relação à alimentação e a saúde. Novas propostas de cura de doenças surgem com tratamentos alternativos, principalmente à base de produtos naturais. O alvo deste estudo se concentrará nas propriedades em comum de três produtos naturais: *Camellia sinensis* (chá preto), *Pleurotus ostreatus* (cogumelo Shiitake) e *Lentinula edodes* (cogumelo Shimeji).

Esses produtos são amplamente consumidos e apreciados no mundo todo. A composição química permite que apresentem propriedades importantes que causam grandes benefícios para a saúde dos seres humanos quando ingeridos (FURLANI e GODOY, 2007; REIS et al., 2012; SOUSA et al., 2004).

A rica diversidade de diferentes espécies de fungos oferece uma fonte potencial de novos antibióticos e antimicrobianos no geral. Essa atividade está relacionada com a capacidade de inibição do crescimento de um microrganismo e pode ser avaliada de forma direta pelo método de diluição, ou de forma indireta, pelo método de difusão em placa (MORAES et al.; REIS et al., 2012).

O tratamento medicamentoso de doenças infecciosas pode apresentar problemas, como relatado em muitos estudos, uma vez que mostram um aumento significativo na incidência de resistência bacteriana a muitos dos antibióticos. Essa resistência foi desenvolvida devido ao uso indiscriminado e/ou incorreto de antimicrobianos comerciais normalmente utilizadas no tratamento de doenças infecciosas (ÖZTÜRK et al., 2011). O desenvolvimento dessa resistência por um patógeno frente aos antibióticos comumente utilizados fornece um impulso para novas tentativas de busca de outros agentes antimicrobianos.

Outra propriedade importante comum aos cogumelos e ao chá preto é a atividade antioxidante. Antioxidantes são definidos como compostos que possuem a capacidade de proteger os sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente nocivos de processos ou de reações que podem causar excessiva oxidação. O chá possui em grande quantidade a presença de compostos fenólicos e os fungos produzem polissacarídeos, fenólicos, e vários metabolitos que representam fontes potenciais de novos antioxidantes naturais (REN et al., 2014).

É importante estudar fontes de antioxidantes naturais, uma vez que os sintéticos, como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), podem causar efeitos cancerígenos após a ingestão em longo prazo e em altas concentrações. Portanto, identificação, modificação e aplicação de antioxidantes naturais são de grande importância (ZHANG et al., 2012).

Segundo informações publicadas na FIB (2009), uma fonte de compostos com propriedade antioxidantes são os compostos fenólicos, que funcionam como sequestradores de radicais e, em algumas vezes, como quelantes de metais (SILVA et al., 2010).

Fundamentando-se na importância das atividades antioxidantes e antimicrobianas é que se desenvolveu este trabalho, a fim de encontrar novas fontes naturais de compostos que contenham essas propriedades, por meios que sejam financeiramente e ecologicamente viáveis, e por tecnologias limpas.

## 2 JUSTIFICATIVA

A resistência aos antimicrobianos em medicina e agricultura é hoje reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), juntamente com outras autoridades nacionais, como um grande problema emergente de importância para a saúde pública, a qual representa um desafio significativo de dimensões globais para a medicina humana e veterinária. A fim de minimizar o potencial de desenvolvimento de mais resistência antimicrobiana foi publicado "As recomendações de Copenhague: Relatório da Conferência da UE sobre a ameaça microbiológica", (<http://www.im.dk/publikationer/micro98/index.htm>), o qual delineou a necessidade do desenvolvimento de princípios inovadores para tratamento ou prevenção de infecções em seres humanos e animais. A avaliação das propriedades antimicrobianas de cogumelos e do chá preto como novas fontes de antimicrobianos, possibilitará limitar a utilização de antibióticos, minimizando, assim, o desenvolvimento da resistência bacteriana e as possíveis reações secundárias.

Nos últimos anos, muita atenção tem sido dada aos efeitos fisiológicos provocados pelos alimentos. *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* são duas espécies de cogumelos que se encontram entre os mais consumidos da categoria, além do chá preto ser uma bebida amplamente consumida. Estudando-se mais profundamente os efeitos que esses alimentos possuem na saúde humana, de forma pura e em associação, pode-se explorar de maneira mais eficiente os benefícios que apresentam.

Realizando os estudos, há grande possibilidade de obter resultados positivos, confirmando uma fonte alternativa, natural e viável de antimicrobianos, preferencialmente por métodos ecologicamente corretos e financeiramente viáveis, ampliando a gama de utilização desses alimentos e posteriormente também, o seu cultivo.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* as atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos obtidos do chá preto (*Camellia sinensis*) e das espécies de cogumelos *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Liofilizar os basidiomas dos cogumelos e obter extratos hidroalcoólicos das duas espécies selecionadas para este trabalho;
- Obter extratos hidroalcoólicos do chá preto;
- Avaliar a presença de compostos fenólicos nos extratos e sua relação com a atividade antioxidante;
- Avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* dos extratos puros e de misturas ternárias dos extratos obtidas pela associação de diferentes proporções do chá preto e das duas espécies de cogumelos pelo método de difusão em placas;
- Avaliar a concentração inibitória mínima dos extratos com os melhores resultados no teste antimicrobiano de difusão em placas;
- Aprofundar o conhecimento sobre as propriedades do chá preto e dos cogumelos Shiitake e Shimeji.



## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 COGUMELOS

Cogumelos pertencem ao Reino Fungi, são macrofungos, e representam as frutificações de grupos pertencentes às divisões Ascomycota e Basidiomycota. Não é conhecido o número total de espécies ao certo, mas estima-se que possam existir mais de 140.000 cogumelos diferentes. Entre essas espécies encontram-se cogumelos comestíveis como o *Lentinula edodes* e o *Pleurotus ostreatus*, que são largamente cultivados com aplicação de cuidados monitorados; outros que são tóxicos, podendo levar até a morte em alguns casos; e outros que possuem propriedades alucinógenas, utilizados tradicionalmente por diversos povos ao redor do mundo (REIS et al., 2012).

Os cogumelos comestíveis são os mais cultivados no mundo e fazem parte da dieta humana há milhares de anos, sendo que nos últimos tempos as quantidades consumidas aumentaram significativamente. Considerados como alimentos valiosos, apresentam as seguintes características: pobres em calorias, gorduras e ácidos graxos essenciais; e ricos em proteínas, vitaminas e minerais. Há relatos também de propriedades, tais como atividade antimicrobiana; ação como agentes anti-tumorais e efeitos imunomoduladores, capacidade de inibição da agregação plaquetária, de redução das concentrações de colesterol no sangue, de prevenção ou alívio de doenças cardíacas e de redução dos níveis de glicose no sangue. Algumas das propriedades mencionadas são atribuídas aos produtos bioativos com atividade antioxidante como os compostos fenólicos (REIS et al., 2012).

A rica diversidade de diferentes espécies de fungos oferece uma fonte potencial de novos antibióticos e antimicrobianos no geral. Numerosos agentes antimicrobianos, incluindo a penicilina e griseofulvina, foram isolados a partir de fungos. Cogumelos que possuem as estruturas reprodutivas macroscópicas de uma gama diversificada de fungos basidiomicetos têm sido utilizados para fins curativos e medicinais desde os tempos pré-históricos. Os cogumelos podem ser considerados como um verdadeiro tesouro de bioativos que exibem propriedades antimicrobianas,

antitumorgênica, hipolipemiantes e hipoglicemiantes. Dois grandes grupos de bioativos de cogumelos são os triterpenos e polissacarídeos, os quais são responsáveis pela rigidez e propriedades morfológicas da parede celular dos fungos. Esses fungos ainda, produzem polissacarídeos, fenólicos, e vários metabolitos que representam as fontes potenciais de novos antioxidantes naturais (REN et al., 2014).

#### 4.1.1 *Lentinula edodes*

*Lentinula edodes*, um cogumelo popularmente conhecido como Shiitake (Figura 1), é uma iguaria culinária e tem sido tradicionalmente usado como medicamento na Ásia a mais de 2000 anos. Ele é o segundo cogumelo comestível mais cultivado no mundo, responsável por cerca de 25% da produção mundial, sendo que a sua produção tem aumentado mais rapidamente do que de qualquer outra espécie de cogumelo (RAO et al., 2009).

O cogumelo Shiitake é altamente nutritivo; com baixas calorias; quantidades elevadas de vitaminas, proteínas e minerais; contém alguns elementos essenciais para a nutrição humana, como cálcio, cobre, fósforo, manganês, magnésio e zinco; e pode interferir diretamente em processos bioquímicos e enzimáticos que causam desnutrição e reverter o caso (MOLZ et al., 2014). Essa espécie contém proteínas, lipídeos (ácido linoléico), principalmente carboidratos, fibras, minerais, vitaminas B1, B2 e C, e ergosterol, a pró-vitamina D (RAO et al., 2009).

Entre as características encontradas nos cogumelos Shiitake encontram-se: propriedades antitumorais e antivirais, que podem ser atribuídas a um polissacarídeo solúvel em água, denominado lentinano; potencial antimicrobiano; ações hipocolesterolémico e hipoglicemiantes, atribuídas ao composto conhecido como lentinacin ou lentysine (HEARST et al., 2009).

Até o momento a espécie não mostrou evidências de ser altamente tóxico, nem de ter efeitos colaterais graves (HEARST et al., 2009).



**Figura 1. Morfologia do cogumelo *Lentinula edodes***  
Fonte: *Medical Mushrooms*

#### 4.1.2 *Pleurotus ostreatus*

*Pleurotus ostreatus*, também conhecido como Shimeji (Figura 2), ou ainda mais popularmente como cogumelo ostra, devido ao seu formato, é um cogumelo comestível comum, cultivado no mundo todo e possui duas variações, o Shimeji branco e o Shimeji preto. É um saprófita que atua como um decompositor primário de madeira e é utilizado industrialmente na mico-remediação, processo que consiste em técnicas e métodos pelos quais são restaurados solos ou cursos de água poluídos através do uso de fungos (HEARST et al., 2009).

Cultivados nos países da América do Norte, Europa e Ásia, o consumo de cogumelos no Brasil tem sido geralmente restrito a pequenas comunidades étnicas ou para grupos de status econômico e cultural, entretanto, recentemente tem havido um maior interesse no consumo, devido à consciência de suas propriedades medicinais. Estudos têm demonstrado que o consumo regular de cogumelos é benéfico para a saúde, podendo ser considerados como alimentos funcionais (STEFANELLO et al., 2012).

Entre as propriedades encontradas no cogumelo Shimeji estão a capacidade de modular o sistema imunológico; diminuir a pressão arterial e o colesterol sanguíneo; possuir atividade hipoglicêmica e antitrombótica, ação antitumoral, anti-inflamatória, analgésica, antiviral, antioxidante e antimicrobiana (STEFANELLO et al., 2012).



**Figura 2. Morfologia do cogumelo *Pleurotus ostreatus***  
**Fonte: *Mushroom Collecting***

## 4.2 CHÁ PRETO

O chá preto é uma das bebidas mais consumidas e mais antigas do mundo, sendo proveniente das folhas processadas da planta *Camellia sinensis*. Durante esse processamento as catequinas presentes nas folhas sofrem oxidação, o que é importante para o desenvolvimento da cor e sabor da bebida (LIMA et al., 2004).

É considerado como uma das bebidas mais antigas produzidas por via biotecnológica e praticada pelo ser humano. Os primeiros relatos de seu uso datam do século 27 a.C (LIMA et al., 2004).

Na composição química do chá preto encontram-se vitaminas do complexo B e C; ácidos fenolcarboxílicos; taninos antioxidantes (galato de epigalocatequina); catequinas (epicatequina, epigalocatequina, galato-3-epicatequina e galato-3-epigalocatequina), bases púricas (cafeína, teofilina, teobromina). Essa composição faz com que o chá seja alvo de estudos em diferentes lugares. Entre os benefícios do chá preto estão facilitar a digestão; ajudar a hidratar o organismo; diminuir o apetite, especialmente quando bebido quente ou morno porque dá maior sensação de conforto no estômago; acelerar o metabolismo; manter o cérebro alerta, uma vez

que a cafeína estimula o sistema nervoso central; e principalmente, devido a presença de antioxidantes naturais que combatem os radicais livres, proteger as células do organismo, atrasando o envelhecimento (SOUSA et al., 2004).

#### 4.3 COMPOSTOS BIOATIVOS COM PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES

Segundo um dossiê de antioxidantes feito pela Revista *Food Ingredients Brasil* em 2009, um antioxidante é qualquer substância capaz de retardar ou impedir danos devidos à oxidação, estando presente em pequenas concentrações, quando em comparação com o agente oxidante. As substâncias antioxidantes podem apresentar diferentes propriedades protetivas e agir em diversas etapas do processo oxidativo, funcionando por diferentes mecanismos.

Segundo o mesmo dossiê, os compostos antioxidantes devem apresentar algumas propriedades como: eficácia em baixas concentrações (0,001% a 0,01%); estabilidade nas condições de processo e armazenamento, o composto e seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos. O antioxidante, para ser empregado em alimentos, além de ser efetivo em baixa concentração, deve atender aos seguintes requisitos: ser compatível com o substrato; não conferir odor ou sabor estranho ao produto; ser efetivo durante o período de estocagem do produto alimentício; ser estável ao processo de aquecimento e ser facilmente incorporado ao alimento. Segundo a classificação, dividem-se em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos. Os antioxidantes primários são os composto fenólicos, eles serão abordados no tópico 4.3.1. Sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que podem aumentar a atividade de antioxidantes primários, quando usados em combinação adequada; os removedores de oxigênio são compostos que atuam capturando espécies reativas de oxigênio presente no meio através de reações químicas, tornando-os, conseqüentemente, indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação, como exemplo dessa classe tem-se o ácido ascórbico, seus isômeros e derivados. Antioxidantes biológicos são substâncias que podem remover espécie reativa de oxigênio ou composto altamente reativo de um

sistema, esta classe inclui várias enzimas, como glucose-oxidase e catalases. Os agentes quelantes sequestram íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica, os mais comuns dessa classe são ácido cítrico e seus sais e os fosfatos. Os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos, entre eles estão flavonóides, proteínas hidrolisadas, entre outros.

Os compostos antioxidantes podem ser classificados ainda em sintéticos ou naturais (substâncias bioativas). Como exemplos de sintéticos pode-se citar o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG), que são bastante utilizados na indústria de alimentos; deve-se controlar seu uso, uma vez que após a ingestão em longo prazo e em alta dosagem podem causar efeitos cancerígenos. Para evitar risco patogênico de antioxidantes sintéticos e devido a várias vantagens que os antioxidantes naturais apresentam, é de grande importância estudos com foco na extração, identificação, modificação e aplicação de antioxidantes naturais. Entre as vantagens apresentadas por esses compostos naturais encontram-se a sua disponibilidade em recursos agrícolas ou marinhos, biocompatibilidade, biodegradabilidade, que são características que levam à segurança ambiental e à possibilidade de preparar uma variedade de derivados modificados quimicamente ou enzimaticamente, para usos finais específicos (PRASHANTH, 2007).

Os produtos naturais que contém compostos bioativos podem ser usados para ajudar a reduzir os danos oxidativos para o corpo humano, mantendo equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes, e assim garantindo uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo. Esses suplementos antioxidantes são importantes pois, apesar de quase todos os organismos estarem equipados com sistemas de defesa e reparação antioxidantes que evoluíram para protegê-los contra danos oxidativos, estes sistemas são muitas vezes insuficientes para evitar completamente os danos induzidos por estresse oxidativo (REIS et al., 2012; KITZBERGER et al., 2007).

Os cogumelos apresentam atividade antioxidante e são utilizados para auxiliar o sistema de proteção endógena. Devido a essa propriedade e a ação antitumoral que apresentam, vários subprodutos dos cogumelos estão sendo usados contra patógenos humanos para ativação do sistema imunológico e para melhorar a saúde humana (REIS et al., 2012; KITZBERGER et al., 2007).

Em estudos realizados com extratos com solventes orgânicos de cogumelo e em estudos realizados com chá preto, uma correlação direta entre a atividade antioxidante e teor de fenólicos totais foi encontrada (KITZBERGER et al., 2007).

#### 4.3.1. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na natureza, sendo parte dos constituintes de uma variedade de vegetais, frutas, microrganismos e produtos industrializados.

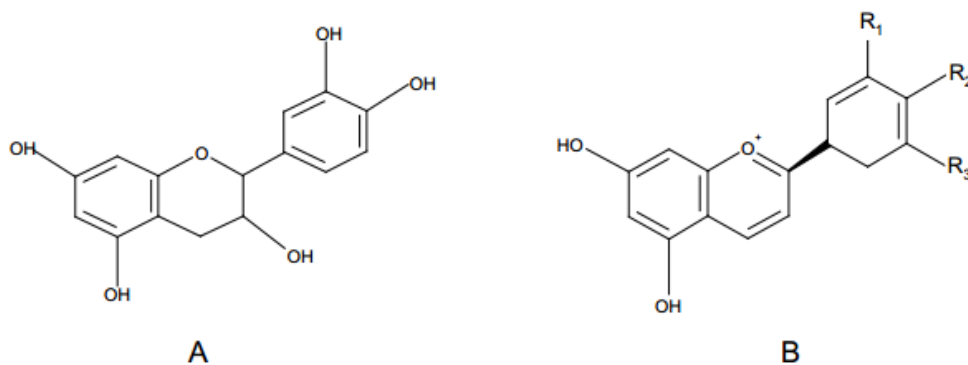
Estudos realizados com os compostos fenólicos demonstram que estes possuem capacidade antioxidante, e possível efeito na prevenção de diversas enfermidades cardiovasculares, cancerígenas e neurológicas, sendo que além da atividade antioxidante, possuem atividade antiinflamatória e atividade que impede, não só a aglomeração das plaquetas sanguíneas, mas também a ação de radicais livres no organismo, protegendo moléculas como o DNA e proporcionando ação benéfica na saúde humana (SILVA et al., 2010).

Segundo dossiê de antioxidantes da Revista *Food Ingredients Brasil* em 2009, os compostos fenólicos são considerados como antioxidantes primários, uma vez que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia. O átomo ativo do antioxidante é abstraído pelos radicais livres  $R\cdot$  e  $ROO\cdot$  com maior facilidade do que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas, formando espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte procedente do antioxidante. Este radical estabiliza-se por ressonância, não tendo a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas.

Os compostos fenólicos apresentam em sua estrutura vários grupos benzênicos característicos, tendo como substituintes grupamentos hidroxilas. Eles são amplamente distribuídos e podem ser classificados de acordo com o tipo de esqueleto que constituirá o anel benzênico e com a cadeia substituinte, e com relação à ocorrência no reino vegetal (DORÊS, 2007). Dividem-se em flavonóides

(polifenóis) e não-flavonóides (fenóis simples ou ácidos). Os flavonóides compreendem um grupo de compostos fenólicos bem frequentes nas frutas e nos vegetais, apresentando-se sob muitas variações como flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas (Figura 3A), antocianinas (Figura 3B), isoflavonas e chalconas. Suas principais fontes são: café, cebola, maçã, uva, cerveja, vinho tinto e, especialmente, chá, que contém, sobretudo catequinas em sua composição. Na classe dos não-flavonóides estão os derivados dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico (Figura 4) (SILVA, 2010). Sua atividade antioxidante está relacionado com a possibilidade de reagirem com radicais livres, devido à facilidade com que o átomo de hidrogênio do grupo hidroxila pode ser abstraído por um radical livre, resultando em uma estrutura quinóide que suporta a presença de um elétron desemparelhado (PANNALA, 2001)

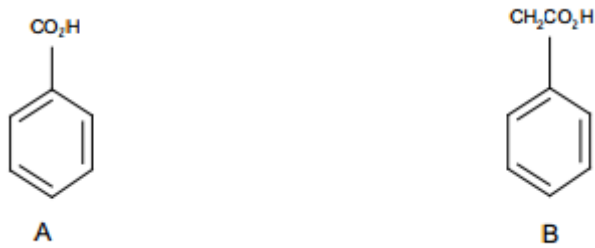
Os principais compostos fenólicos não-flavonóides derivados dos ácidos hidroxicinâmicos são os ésteres dos ácidos caféico, cumárico e felúrico, que estão presentes em alimentos como maçã, pêra, cereja e damasco. Quanto aos derivados dos ácidos hidroxibenzóicos, podem-se destacar os ácidos salicílico, gálico, elágico, protocatéico e vanílico, que são encontrados em morango, uva e limão (SILVA, 2010).



**Figura 3. Exemplo de flavonóides mais comumente encontrados. A: catequinas e B: antocianinas.**

**Fonte: Silva (2010, P. 673)**





**Figura 4. Moléculas dos ácidos hidrocínâmico (A) e do hidrobenzóico (B).**  
**Fonte: Silva (2010, P. 673)**

#### 4.4 COMPOSTOS BIOATIVOS COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

A atividade antimicrobiana está relacionada com a capacidade que um composto possui de reduzir a quantidade ou eliminar ou impedir a multiplicação de microrganismos. Essa capacidade pode ser influenciada por fatores ambientais (fatores extrínsecos), como temperatura, umidade relativa, pH; massa molecular, uma vez que essas variáveis podem modificar a estrutura química de um composto (GOMES, 2007). A atividade antimicrobiana de um composto pode ser avaliada com base na determinação da concentração mínima capaz de inibir o crescimento de um dado microrganismo, um valor chamado MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) (MORAES et al.). Essa concentração pode ser feita de forma direta, feita pelo método de diluição, no qual concentrações variadas do antibiótico, obtidas pela diluição em caldo ou ágar, são inoculadas com o microrganismo, e a concentração mais baixa do antibiótico que evita o crescimento após a incubação de 12 a 24 horas é a concentração inibitória mínima; ou de forma indireta pelo método de difusão em placa, depende da difusão do produto em análise através de um cilindro apropriado ou discos de papel ou em orifícios feitos na camada de ágar semeado e solidificado numa placa de Petri, a leitura é feita nas zonas de inibição de crescimento, a qual depende da difusão externa do antibiótico e do crescimento da bactéria que tende a cobrir a superfície nutritiva (MADIGAN et al., 2010).

Os compostos que apresentam atividade antimicrobiana podem ser naturais ou sintéticos, sendo que o uso indiscriminado e prolongado de drogas antimicrobianas sintéticas não é aconselhado, uma vez que tem levado à seleção de microrganismos patogênicos cada vez mais resistentes, com perfis de

multirresistência, a qual é uma consequência do aparecimento de mutações no genoma de bactérias e genes que ajudam a sobrevivência bacteriana. Este problema é intensificado em países como o Brasil, onde a população tem por hábito a automedicação, utilizando de maneira indevida os antibióticos, tanto em dosagens, como em posologia. Embora seja impossível evitar a evolução bacteriana, é importante escolher o antibiótico mais adequado e usá-lo de forma adequada para minimizar o desenvolvimento de cepas resistentes. Em consideração à crescente importância clínica, laboratorial e terapêutica dispensada às infecções fúngicas e bacterianas, inúmeras pesquisas vem sendo desenvolvidas no sentido de obter novos fármacos naturais, que sejam menos tóxicos e apresentem atividade contra cepas de microrganismos resistentes (REN et al., 2014).

Entre as fontes naturais que possuem atividade antimicrobiana pode-se encontrar algumas espécies de cogumelos, como Shiitake e o Shimeji. Estudos recentes de Shiitake têm demonstrado que o resultado do uso de seus extratos apresentam efeito antitumoral, propriedades antimicrobianas, melhoria da função do fígado e uma redução de viremia em pacientes com hepatite B crônica, e uma inibição da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana *in vitro* (HIRASAWA et al., 1999).

Em estudos realizados com o cogumelo Shimeji, foi constatado que este apresenta atividade antimicrobiana principalmente contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans* (STEFANELLO et al., 2012).

#### 4.5 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

A análise de compostos bioativos, no geral, é influenciada pela natureza do composto, método de extração empregado, tamanho da amostra, tempo e condições de estocagem e presença de interferentes. A solubilidade deles varia com os substituintes das cadeias carbonadas cíclicas, o grau de polimerização e suas interações com outros constituintes dos tecidos onde se encontram (SUTIVISEDSAK et al., 2010).

Na literatura há diversos métodos de extração de compostos bioativos, que variam de acordo com o indicador de oxidação escolhido e com o método usado para a sua detecção e quantificação. Nesses métodos de extração os solventes mais utilizados são: metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações (NACZK e SHAHIDI, 2004), sendo que a extração de compostos bioativos de diversas matrizes em soluções aquosas com diferentes concentrações de etanol demonstra ser frequentemente mais eficiente do que a extração somente em etanol ou água (SUTIVISEDSEK et al., 2010).

## 5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 5.1 AMOSTRAS

Chá preto, da espécie *Camellia sinensis*, e os cogumelos Shiitake e Shimeji preto das espécies *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*, respectivamente, foram adquiridos no Mercado Municipal de Curitiba. O Chá já se apresentava na forma de pó, enquanto que os cogumelos foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e imediatamente liofilizados. As amostras resultantes foram finamente moídas em gral com auxílio de um pistilo, embaladas em saco plástico, colocadas em isopor com sílica, lacradas e mantidas a  $4^{\circ}\text{C}$  até o preparo dos extratos hidroalcoólicos.

### 5.2 BACTÉRIAS

Duas espécies de bactérias foram avaliadas quanto à sensibilidade e inibição do crescimento pelos extratos hidroalcoólicos e por dois antibióticos: a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Estas bactérias foram obtidas no Laboratório de Microbiologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Campus Curitiba, onde foram cultivadas em meio BHI (infusão cérebro coração) em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24-48h e mantidas em geladeira a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 5.3 ANTIBIÓTICOS

Dois antibióticos foram utilizados para avaliar a inibição de crescimento das bactérias: a Cefalexina (Medley), e Amoxicilina+Clavulanato de potássio (Novamox®, Ache). Foram preparadas soluções de Cefalexina e de Amoxicilina+Clavulanato de potássio, como descritas nos itens seguintes.

### 5.3.1 Preparo da solução de Cefalexina (Medley)

Para preparo desta solução dissolveu-se 30 mg do comprimido Cefalexina (Medley) em 100 mL de água destilada, obtendo-se uma solução final de 300 mg/L.

### 5.3.2 Preparo da solução de Amoxicilina+Clavulanato de potássio (Novamox®, Ache)

Primeiramente para o preparo desta solução preparou-se uma solução tampão de fosfato de potássio. Para tal, em um balão volumétrico de 1 L, adicionou-se 94 mL de uma solução de 1 M de  $K_2HPO_4$  em 6 mL de solução 1M de  $KH_2PO_4$ . Por fim completou-se o volume para 1 L com água destilada.

O comprimido foi moído em almofariz de porcelana e suspenso em 100 mL da solução tampão de fosfato de potássio pH 8,0. Para chegar a concentração final desejada (20  $\mu$ g) pipetou-se 1,14 mL da suspensão anterior em um balão volumétrico de 50 mL e em seguida completou-se o volume com solução tampão. Essa solução final foi filtrada com filtro de seringa em PVDF, diâmetro do filtro 13 mm, poro 0,45  $\mu$ m.

## 5.4 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

Os compostos bioativos foram extraídos das amostras de cogumelos e de chá preto com etanol 40% (v/v) (HAMINIUK et al., 2012). Misturas ternárias de diferentes proporções entre as amostras foram obtidas através da metodologia de superfície de resposta (MSR) utilizando um delineamento experimental simplex-centróide expandido de 10 tratamentos, com o objetivo de avaliar um possível efeito sinérgico antioxidante e antimicrobiano. Na Tabela 1 pode-se observar o delineamento estatístico utilizado para a formulação das misturas ternárias.

Em Enlermeyers de 125 mL foram colocados 1 g de cada amostra (segundo a Tabela 1) e adicionados 20 mL da solução alcoólica. Os frascos foram colocados para agitação em shaker a 130 rpm por 3 horas. Após este período, o conteúdo dos frascos foi colocado em tubos, os quais foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos, para obtenção do sobrenadante (extrato bruto). Por fim, as amostras foram filtradas com filtro de seringa em PVDF, diâmetro do filtro 13 mm, poro 0,45  $\mu\text{m}$  e armazenadas em frascos estéreis. Até o momento da realização das análises as amostras foram armazenadas em congelador a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

**Tabela 1. Proporção de cada componente das misturas para formação das amostras avaliadas.**

Amostra	Shiitaki	Shimeji preto	Chá preto
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1\2	1\2	0
5	1\2	0	1\2
6	0	1\2	1\2
7	1\3	1\3	1\3
8	2\3	1\6	1\6
9	1\6	2\3	1\6
10	1\6	1\6	2\3

#### 5.4.1 Quantificação de Compostos Fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram estimados no extrato bruto, em triplicata pelo método de análise colorimétrica, através da metodologia de Singleton e Rossi (1965) a 765 nm, utilizando o método de Folin-Ciocalteau e o ácido gálico como padrão. Os resultados obtidos foram expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) (VASCO et al., 2008).

#### 5.4.1.2 Preparo dos padrões de Ácido Gálico

Para preparo da curva padrão de ácido gálico foram dissolvidos 0,5 g em 10 mL de etanol P.A., e em seguida, foi acrescentado 100 mL de água destilada para obtenção de uma solução com a concentração de 5g\L. Dessa solução foram retirados volumes de: 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 5 mL e 10 mL. A todos os volumes foram acrescentados 100 mL de água deionizada, resultando em padrões de 25 mg\L, 50 mg\L, 100 mg\L, 250 mg\L e 500 mg\L respectivamente (SINGLETON e ROSSI, 1965). O experimento foi realizado em triplicata.

#### 5.4.1.3 Método de Folin-Ciocalteau

Para essa metodologia primeiramente foi preparada uma solução de carbonato de sódio 75 g\L da seguinte forma: pesou-se 75 g de carbonato de sódio anidro e transferiu-se para um béquer de 1L contendo 400 mL de água deionizada; em seguida o béquer foi colocado no forno micro-ondas e aquecido até fervura; nesse momento o micro-ondas foi pausado por 30 segundos e então continuou-se o aquecimento por mais 20 segundos, esse ciclo foi repetido cinco vezes, até que todo o carbonato de sódio fosse solubilizado; o béquer foi retirado do micro-ondas e deixado para resfriar a temperatura ambiente e em banho de água por duas horas, até que o equilíbrio térmico fosse atingido (temperatura ambiente); ao término, a solução foi transferida para um balão de 1 L, o seu volume completado com água destilada e a solução foi estocada em geladeira por no mínimo 15 horas; por fim a solução foi filtrada usando papel filtro qualitativo, seu filtrado recolhido e guardado em temperatura ambiente (VASCO et al.,2008).

Para preparo da curva padrão foram pipetados para balões volumétricos de 25 mL, 12,5 mL de água destilada; 0,25 mL de ácido gálico; e 1,25 mL do reagente de Folin. Deixou-se repousar a solução por 3 minutos, acrescentou-se o volume de solução de carbonato de sódio, 5 mL e por fim completou-se o volume restante do balão com água destilada. Ao término, os balões foram colocados em local escuro

imediatamente e deixados reagir por 2 horas. Ao fim do período as soluções foram medidas em espectrofotômetro a 765 nm (VASCO et al., 2008).

Para a determinar a quantificação de compostos fenólicos totais, foram pipetados para balões volumétricos de 25 mL, 12,5 mL de água destilada; 0,25 mL do volume de amostra diluída; e 1,25 mL do reagente de Folin. Deixou-se repousar a solução por 3 minutos, acrescentou-se o volume de solução de carbonato de sódio, 5 mL e por fim completou-se o volume restante do balão com água destilada. Ao término, os balões foram colocados em local escuro imediatamente e deixados reagir por 2 horas. Ao fim do período as soluções foram medidas em espectrofotômetro a 765 nm (VASCO et al., 2008).

## 5.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

### 5.5.1 Atividade antioxidante pelo teste DPPH•

Este teste avalia a habilidade que uma substância tem de sequestrar o radical livre estável DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e está baseado na descoloração de uma solução composta pelo radical estável, de cor violeta, quando há adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio. A atividade antioxidante pelo método DPPH• foi realizada em triplicata de acordo com a metodologia de Brand-Willians et al. (1995) e Mensor et al. (2001).

### 5.5.2 Solução DPPH 60µM

Para preparo dessa solução foram dissolvidos 2,4 mg de DPPH em álcool metílico, o volume foi completado para 100 mL com o álcool e a solução foi transferida para um frasco âmbar.



### 5.5.3 Determinação da atividade antioxidante total

A partir do extrato bruto foram preparadas quatro diluições em triplicata. Para preparo das soluções para determinação da atividade antioxidante total, em ambiente escuro, transferiu-se um alíquota de 0,1 mL de cada diluição preparada do extrato para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH (60 $\mu$ M) e uma alíquota de 0,1 mL da solução controle para um tubo de ensaio também com 3,9 mL do radical DPPH. As soluções foram homogenizadas em agitador de tubos e após 30 minutos do preparo das soluções elas foram medidas em espectrofotômetro a 515 nm (BRAND-WILIANS et al., 1995).

A atividade anti-radical foi determinada na forma de atividade antioxidante (AA) pela Equação 1 de Mensor et al. (2001), descrita abaixo:

$$\%AA = 100 - [(Aa - Ab) \times 100] / Ac \quad (1)$$

Onde:

Aa = Absorbância da amostra, Ab = Absorbância do branco, Ac = Absorbância do controle negativo. O controle negativo foi feito substituindo-se o volume do extrato por igual volume do solvente utilizado na extração. O branco foi preparado substituindo o volume da solução de DPPH por igual volume de solvente (MENSOR et al., 2001).

## 5.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO

### 5.6.1 Teste de difusão em ágar com perfuração de poços

A atividade antimicrobiana das amostras foi realizada pelo método da difusão em ágar com perfuração de poços, de acordo com a recomendação da *National Committee for Clinical Laboratory Standard* (NCCLS, 2003). A atividade foi avaliada utilizando-se cepas das bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 e

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, provenientes do Laboratório de Microbiologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Campus Curitiba.

A realização dos testes foi feita com todos os extratos e apenas com uma cepa por vez, minimizando os riscos de contaminação.

Os microrganismos foram ativados em caldo BHI, 48 horas antes da realização dos respectivos ensaios. Após a incubação em caldo, as culturas foram inoculadas em ágar nutriente e incubadas por 24 horas, para que o preparo do inóculo pudesse ser feito por suspensão de colônias em solução salina estéril (0,85% p/v).

#### 5.6.1.1 Preparo das placas de Petri para o teste de difusão em ágar com perfuração de poços

Nos ensaios de difusão em ágar com perfuração de poços foi necessário adaptar um papel de filtro à tampa da Placa de Petri, para tal foi utilizado papel de filtro comum, com gramatura de 80 g/m<sup>2</sup> e diâmetro de 1,5 cm superior ao diâmetro da placa, de modo a fornecer sustentação ao papel, que permanece dobrado sobre as laterais da tampa. Os papéis de filtro foram colocados nas tampas antes da esterilização das placas para evitar maiores riscos de contaminação.

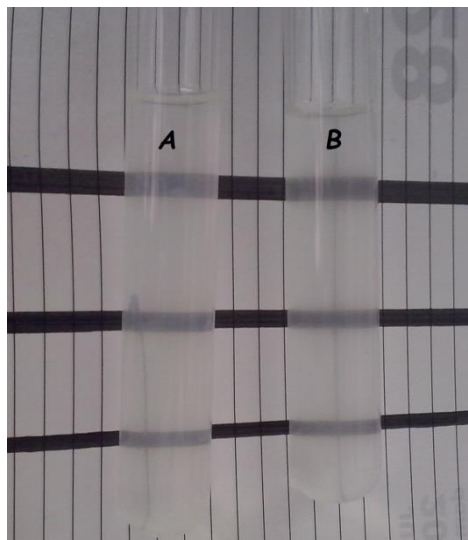
Após esterilização das placas foi preparado quantidade de meio de cultura ágar Mueller-Hinton suficiente para volume de 40 mL de meio por placa. O procedimento seguinte foi realizado em duas etapas, o primeiro passo consistiu na adição de 20 mL de ágar Mueller-Hinton às placas de Petri, para formação de uma camada basal, aguardou-se então algum tempo até que o meio estivesse bem solidificado. Para segunda etapa esterilizou-se cilindros de aço inoxidável de diâmetro de 8 mm para confecção dos poços. Os cilindros foram esterilizados em autoclave e foram levados para cabine de fluxo laminar. Após os cilindros atingirem a temperatura ambiente eles foram dispostos nas placas, 4 cilindros por cada placa, adicionou-se então mais 20 mL do meio ágar Mueller-Hinton. Após o resfriamento dessa segunda camada os poços foram retirados com o auxílio de uma pinça estéril.

Nessa técnica é de grande importância tomar cuidado para que a perfuração dos poços não atinja o fundo da placa, pois a amostra poderá fluir sob o meio e causar um resultado errôneo.

#### 5.6.1.2 Padronização do inóculo

Os inóculos foram padronizados através da escala de McFarland, no momento da realização dos ensaios, utilizando-se o padrão correspondente ao valor de 0,5 da escala McFarland, o qual corresponde a 0,5 mL da solução de  $\text{BaCl}_2$  0,048 mol/L e 99,5 mL da solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1% (v/v), resultando em uma suspensão contendo aproximadamente  $1$  a  $2 \times 10^8$  células/mL de bactéria (NCCLS, 2003).

Para preparo do inóculo por suspensão de colônias em solução salina estéril (0,85% p/v) adicionou-se com uma alça de platina estéril colônias de bactérias em um tubo de ensaio contendo solução de NaCl e agitou-se a solução em agitador do tipo vórtex. Para igualar a densidade óptica da suspensão de células do inóculo à da suspensão de McFarland foi utilizado o método de comparação visual, em iluminação ambiente adequada, utilizando tubo de ensaios de mesmo diâmetro que o usado para suspensão padrão e com auxílio de um cartão branco com linhas contrastantes pretas ao fundo (Figura 5).



**Figura 5. Comparação da densidade óptica da suspensão de células do inóculo (A) à da suspensão de McFarland (B).**

### 5.6.1.3 Inoculação

Dentro de no máximo quinze minutos após o ajuste começou-se a semeadura introduzindo um swab estéril na suspensão bacteriana ajustada a 0,5 da escala McFarland, comprimiu-o contra a parede interna do tubo para retirar o excesso do inóculo e passou-se o swab em toda superfície do ágar com estrias bem próximas. Esse passo foi repetido mais duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez que era semeada. Ao final passou-se o swab em toda margem da placa e na margem de cada poço.

### 5.6.1.4 Aplicação das amostras nos ensaios de difusão em ágar com perfuração de poços

Para os ensaios da avaliação da atividade antimicrobiana foram realizadas duas diluições do extrato bruto e uma mistura do extrato bruto (100%) com o antibiótico Cefalexina, obtendo-se assim uma solução de extrato 100%, 75%, 25% e uma mistura com 50% de extrato (100%) e 50% do antibiótico Cefalexina. Essas diluições e misturas foram realizadas com os 10 extratos diferentes. Para controle negativo foi utilizado o solvente etanol 40% e para controles positivos, os antibióticos Novamox (20 µg) e Cefalexina (300 mg).

Em ambiente estéril e com as placa entreabertas, usou-se uma micropipeta com ponteiros estéreis para dispensar 100 µL de cada solução previamente preparada e as soluções controles nos poços. As placas foram incubadas por 16-18 horas no sentido normal (com o ágar voltado para baixo), uma vez que as amostras são líquidas. Após esse período foi realizada a avaliação dos halos de inibição do crescimento microbiano. As zonas de inibição foram medidas em milímetros com o auxílio de uma régua. Para cada extrato os ensaios foram realizados em duplicata (n=2).

### 5.6.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A determinação da concentração inibitória mínima das amostras foi realizada pelo método da macrodiluição em caldo, de acordo com a recomendação da *Nature Protocols*, segundo o artigo “*Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances*” (WIEGAND et al., 2008).

Esse teste foi realizado com o extrato 1, contendo apenas Shiitake; com o extrato 3, contendo apenas chá preto; com o antibiótico Cefalexina; e com a mistura desses dois extratos com o antibiótico Cefalexina. A cepa escolhida para esse teste foi a *Escherichia coli* ATCC 25922.

Antes de começar o teste, culturas de *Escherichia coli* foram inoculadas em ágar nutriente e incubadas por 24 horas, para que o preparo do inóculo pudesse ser feito por suspensão de colônias em solução salina estéril (0,85% p/v).

O inóculo foi preparado e padronizado segundo procedimento descrito no item 5.6.1.2 desse trabalho. Após obtenção da suspensão bacteriana correspondente a 0,5 da escala de McFarland, ela foi diluída 1:100 em solução salina para a obtenção de suspensões com cerca de  $10^5$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC/ml) e foi adicionada às diluições previamente preparadas das amostras.

A partir de soluções iniciais dos extratos (50 g/L) foram preparadas diluições de 10 g/L, 2 g/L, 0,4 g/L e 0,08 g/L para os extratos 1 e 3, e diluições de 1280 mg/L, 128 mg/L, 16 mg/L, 2 mg/L e 0,25 mg/L para o antibiótico. Para o preparo das misturas dos extratos e antibiótico foram utilizados 0,5 mL de cada diluição dos extratos e adicionou-se 0,5 mL de cada diluição do antibiótico em tubos de ensaio, segundo a Tabela 2.

**Tabela 2. Quantidades de extrato e antibiótico misturados para realizar o teste MIC.**

<b>Concentrações iniciais de extrato e antibiótico</b>	<b>Volume de extrato + antibiótico</b>
10 g/L e 128 mg/L	0,5 mL + 0,5 mL
2 g/L e 16 mg/L	0,5 mL + 0,5 mL
0,4 g/L e 2 mg/L	0,5 mL + 0,5 mL
0,08 g/L e 0,25 mg/L	0,5 mL + 0,5 mL

Diferentes concentrações dos extratos e do antibiótico foram obtidas pela mistura de 1 mL das amostras pré-diluídas com volumes variáveis de caldo nutriente (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 3. Diluições dos extratos em caldo e concentração antimicrobiana final utilizada no teste MIC.**

Concentrações extratos (g/L)	Volume de caldo nutriente (mL)	Concentração antimicrobiana obtida (g/L)	Concentração final no teste (g/L)*
50	1	25	12,5
50	3	12,5	6,25
10	1	5	2,5
10	3	2,5	1,25
10	7	1,25	0,625
2	1	1	0,50
2	3	0,5	0,25
2	7	0,25	0,25
0,4	1	0,2	0,10
0,4	3	0,1	0,05
0,4	7	0,05	0,025
0,08	1	0,04	0,02
0,08	3	0,02	0,01

\*Concentração final obtida após a adição de 1 mL da suspensão bacteriana em um tubo contendo 1 mL de cada extrato diluído.

A concentração antimicrobiana final utilizada para o teste foi obtida pela adição de 1 mL de cada amostra diluída em caldo em um tubo de ensaio e pela adição da suspensão bacteriana. Após esta etapa, seguiu-se a incubação dos tubos em estufa à 37 °C por 16-20h, para avaliação da ação antimicrobiana dos extratos, do antibiótico e das misturas entre extratos e antibiótico, pela redução visual da turbidez. A concentração inibitória mínima dos extratos, antibiótico e misturas foi determinada como a concentração de amostra que inibiu o crescimento bacteriano.

**Tabela 4. Quantidade de caldo nutriente adicionado às soluções pré-diluídas de antibiótico e as concentrações finais utilizadas no teste MIC.**

Concentrações antibiótico (mg/L)	Volume de caldo nutriente (mL)	Concentração antimicrobiana obtida (mg/L)	Concentração final no teste (mg/L)*
1280	9	128	64
128	1	64	32
128	3	32	16
128	7	16	8
16	1	8	4
16	3	4	2
16	7	2	1
2	1	1	0,5
2	3	0,5	0,25
2	7	0,25	0,125
0,25	1	0,125	0,0625
0,25	3	0,0625	0,03125

\*Concentração final obtida após a adição de 1 mL da suspensão bacteriana em um tubo contendo 1 mL de cada extrato diluído.

Para controle positivo foi utilizado 1 mL de caldo nutriente com 1 mL de suspensão bacteriana ajustada, e para controle negativo de cada amostra, utilizou-se 1 mL de caldo nutriente com 1 mL da solução de extrato na maior concentração.

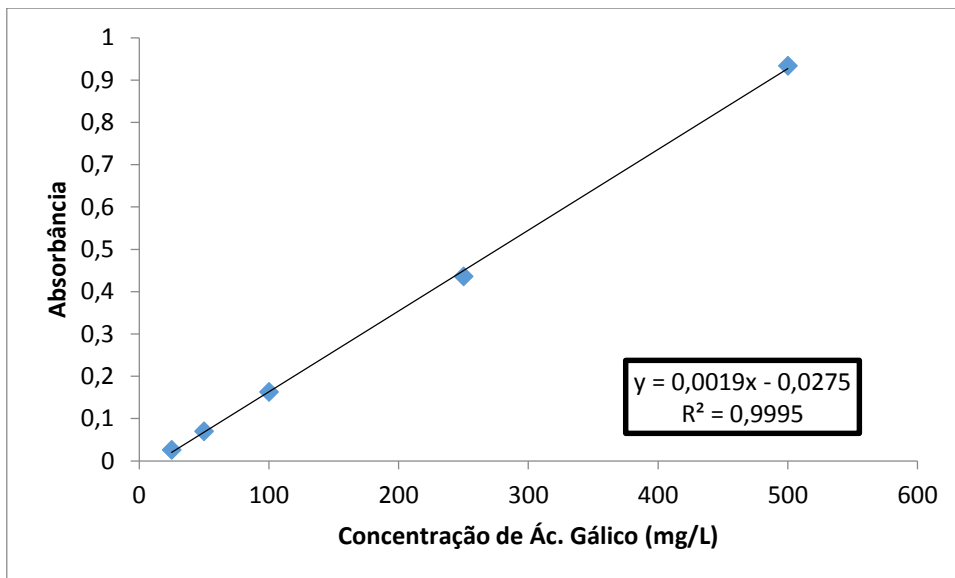
### 5.6.3 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados (análise de variância, teste de Pareto nível de significância de 95% ( $p \leq 0,05$ )) e a obtenção dos gráficos relacionados ao delineamento estatístico experimental foi realizada no *software* Statistica 7.1 (Statsoft, Tulsa, USA).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Para a realização da quantificação dos compostos fenólicos totais presentes nos extratos hidroalcoólicos de Shiitake, Shimeji, chá preto e misturas ternárias, fez-se a curva padrão de ácido gálico, obtendo-se o Gráfico 1 (n=3).



**Gráfico 1. Curva padrão de ácido gálico.**

Com o ajuste linear dos dados de absorbância e concentração de ácido gálico obteve-se a equação da reta  $y = 0,0019x - 0,0275$  e um valor de  $R^2$  igual a 0,9995, o que indicou que a equação obtida poderia ser utilizada para a quantificação de fenólicos nas amostras dos extratos hidroalcoólicos.

Algumas amostras apresentaram coloração bem escura após a reação com o reagente de Folin, conforme Figura 6, e, portanto, foram feitas diluições de acordo com a necessidade.





**Figura 6. Amostras após reação com reagente de Folin: A) antes das diluições e B) após diluições.**

Após duas horas de reação as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 765 nm. Os resultados obtidos foram expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE) por grama de amostra seca.

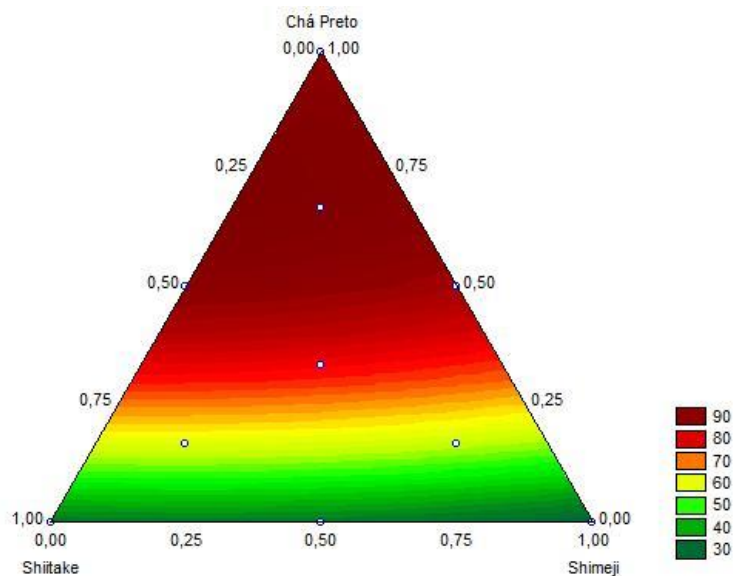
A quantidade de fenólicos totais nas amostras variou de 6,02 mg GAE/g a 230,79 mg GAE/g, como pode-se observar na Tabela 5.

**Tabela 5. Proporções de Shiitake, Shimeji preto e chá preto utilizadas nas misturas ternárias determinadas pelo delineamento experimental simplex-centróide e quantidade de fenólicos totais obtidos nos extratos hidroalcoólicos das amostras.**

Amostras	Shiitake	Shimeji preto	Chá preto	Fenólicos totais (mg GAE/g)
1	1	0	0	6,02
2	0	1	0	17,58
3	0	0	1	230,79
4	1\2	1\2	0	14,05
5	1\2	0	1\2	148,42
6	0	1\2	1\2	109,21
7	1\3	1\3	1\3	75,72
8	2\3	1\6	1\6	46,21
9	1\6	2\3	1\6	56,10
10	1\6	1\6	2\3	179,21

O extrato 3, o qual apresentou a maior quantidade de fenólicos totais, representa a amostra com apenas chá preto, com o valor de 230,70 mg GAE/g. Em geral, as maiores concentrações de compostos fenólicos foram encontradas nos extratos que possuíam o chá preto como componente, como: o extrato 10, amostra de Shiitake, Shimeji preto e chá preto, com maior quantidade desse último; o extrato 5, contendo Shiitake e chá preto, em quantidades iguais; e o extrato 6, contendo Shimeji preto e chá preto, também em quantidades iguais.

A influência de cada componente das misturas ternárias com relação à quantidade de fenólicos totais nos extratos pode ser observada na Figura 7. A superfície de resposta obtida pelo uso do delineamento estatístico experimental demonstrou que quanto maior a quantidade de chá preto presente na amostra, maior a quantidade de compostos fenólicos. O modelo quadrático representou bem os dados experimentais obtidos pela quantificação dos compostos fenólicos das misturas com alto valor de  $R^2$  (0,98).



**Figura 7. Diagrama ternário para os compostos fenólicos, ajustado pelo modelo quadrático.**

O chá preto apresentou uma quantidade de compostos fenólicos 13 vezes maior que o Shimeji preto e 38 vezes maior que o Shiitake. O resultado encontrado já era esperado, uma vez que os chás pretos possuem em sua constituição uma quantidade diversa de compostos fenólicos, como foi apresentada na revisão

bibliográfica deste trabalho. Em sua composição química pode-se encontrar ácidos fenolcarboxílicos, taninos antioxidantes - galato de epigallocatequina, catequinas (epicatequina, epigallocatequina, galato-3-epicatequina e galato-3-epigallocatequina), e bases púricas (cafeína, teofilina, teobromina) (SOUSA et al., 2004).

As interações binárias entre os componentes das misturas não foram significativas ( $p > 0,05$ ), e, portanto, pode-se concluir ainda que não houve efeito sinérgico ou interação entre os componentes individuais dos extratos (Figura 8).

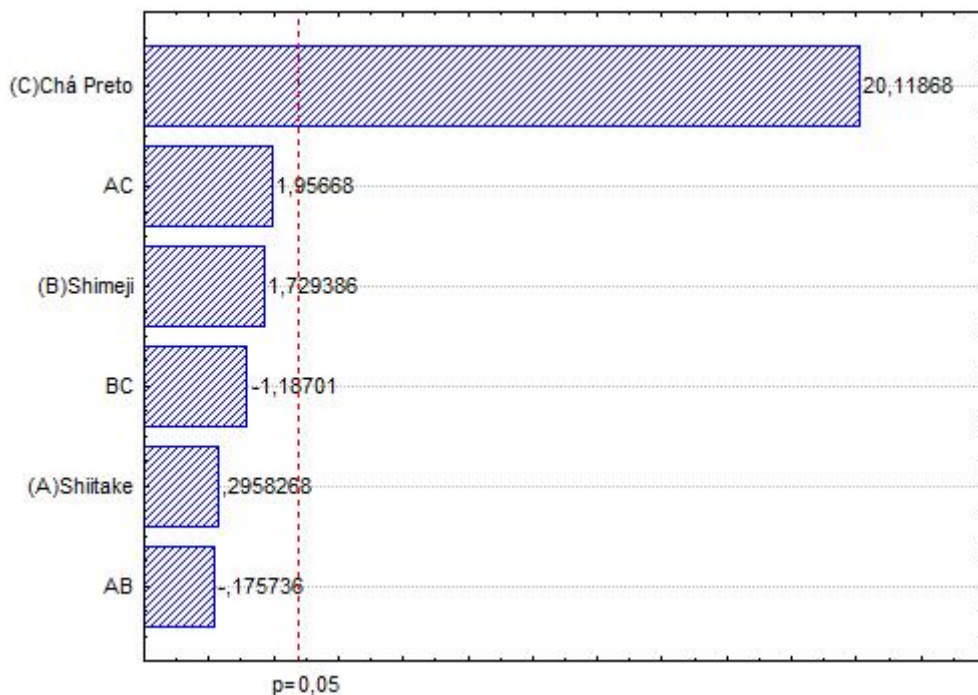


Figura 8. Gráfico de Pareto para os compostos fenólicos do Shiitake (A), Shimeji (B), Chá preto (C) e interações (AC, BC e AB) entre os componentes das misturas.

Na Tabela 6 pode-se comparar os valores obtidos com dados da literatura relacionados à quantidade de compostos fenólicos totais encontrados em amostras de cogumelos e de chá preto. De um modo geral, valores maiores desses compostos são apresentados para amostras de chá preto. A variação encontrada na composição fenólica interespecífica e intraespecíficas pode ocorrer por diferentes fatores, como pelas diferentes condições de extração, concentração e solvente utilizado, temperatura e tempo; no caso dos cogumelos, pelas condições de cultivo; no caso do chá, pelas condições de fabricação utilizadas pela indústria e pelas diferenças na composição do vegetal (proporções de folhas), diferenças nas

condições ambientais e climáticas de plantio e condições fisiopatológicas da planta (SPIGNO et al., 2007; ZIELINSKI et al., 2014).

**Tabela 6. Compostos fenólicos totais (mg de GAE/g) em amostras de cogumelos e chá preto.**

Amostras	Condições de extração	Fenólicos totais (mg/g)	Referências
<b>Shiitake</b>	Extração a frio com etanol 70%	12,54	REIS et al. (2012)
	Extração com etanol 80%	4,27	DUBOST et al. (2007)
	<b>Extração a frio com etanol 40%</b>	<b>6,02</b>	<b>Neste trabalho</b>
<b>Shimeji</b>	Extração a frio com etanol 70%	8,84	REIS et al. (2012)
	Extração com etanol 80%	4,32	DUBOST et al. (2007)
	<b>Extração a frio com etanol 40%</b>	<b>17,58</b>	<b>Neste trabalho</b>
<b>Chá preto</b>	Extração com etanol 90%	89,86	OH et al. (2013)
	Infusão em água a 100° C	144,3	RAMALHO et al. (2013)
	<b>Extração a frio com etanol 40%</b>	<b>230,79</b>	<b>Neste trabalho</b>

## 6.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH

O teste do DPPH• é um dos métodos mais usados para verificar a capacidade antioxidante *in vitro*, uma vez que é rápido, sensível, não exige equipamentos e reagentes difíceis de serem obtidos, não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação e também evita reações colaterais, tais como agentes quelantes de íons metálicos e inibição enzimática. O método avalia a atividade antioxidante pela captação do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), medindo a eficiência do sequestrador de radicais livres, que é determinada não apenas pela reatividade do antioxidante com o radical livre, mas também pela sua concentração.

O radical livre disponível comercialmente DPPH• é solúvel em metanol e apresenta coloração violeta; quando um antioxidante é misturado à solução metanólica de DPPH•, o radical livre é reduzido, formando o 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H) de coloração amarela. A mudança é determinada em espectrofotômetro a 515 nm, indicando a eficiência do antioxidante adicionado em remover o radical. Portanto, o efeito dos antioxidantes sobre o sequestro do radical DPPH• é atribuído à habilidade desses compostos de doar hidrogênio (KOLEVA et al., 2006; OSMAN, 2011; PAPICH, 2013).

A atividade antioxidante total dos extratos hidroalcoólicos do Shiitake, Shimeji preto, Chá preto e suas misturas foi determinada na concentração de 6,25 g/L e o ácido gálico na concentração de 100 ppm foi utilizado como padrão para comparação (atividade antioxidante 100%).

Os resultados de atividade antioxidante total podem ser observados no Gráfico 3. O extrato 10, que corresponde à mistura de 16,6% de Shiitake, 16,6% de Shimeji e 66,6% de Chá preto, apresentou a atividade antioxidante máxima, de 100%, na concentração avaliada.

O chá preto influenciou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) a atividade antioxidante dos extratos, o que pode ser observado no Diagrama de pareto na Figura 9. No entanto, as interações entre os componentes das misturas não foram significativas ( $p > 0,05$ ).

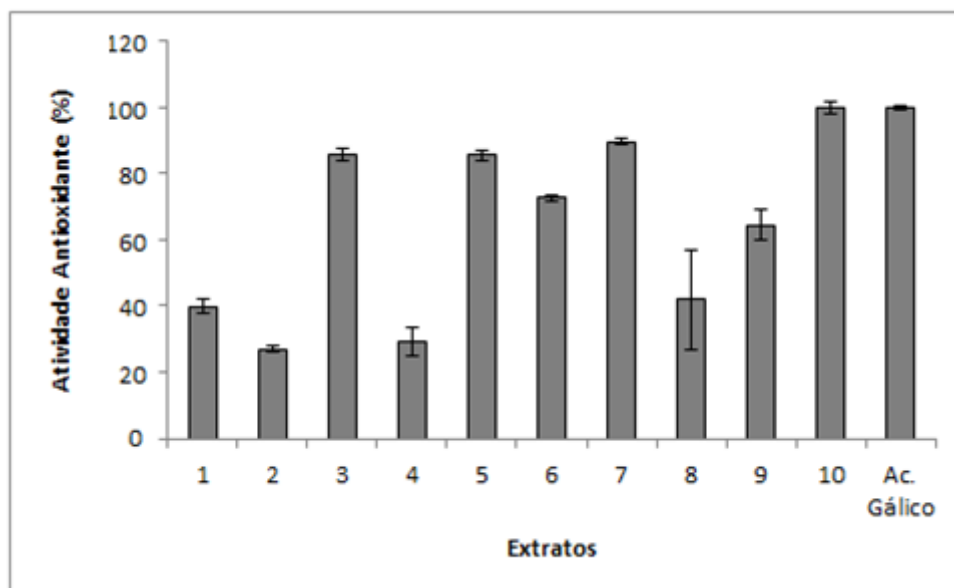
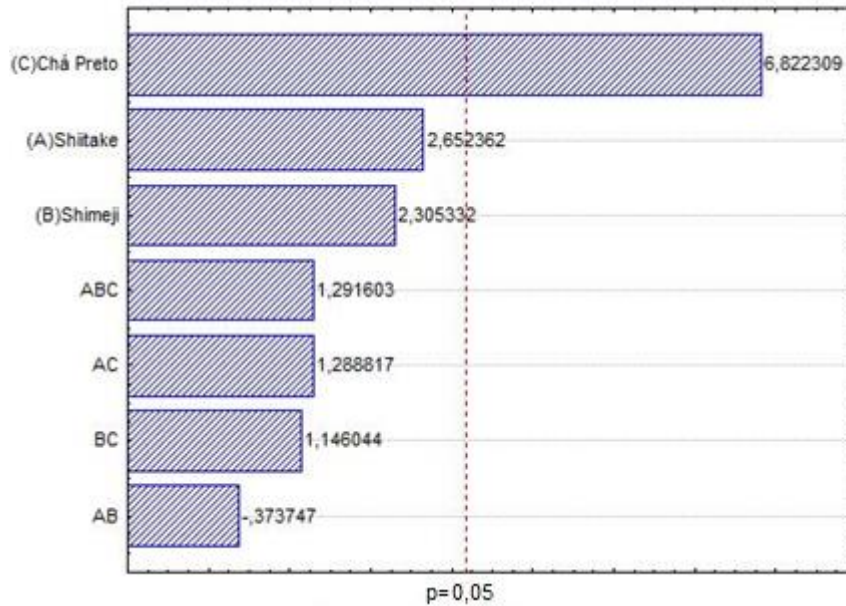


Gráfico 2. Atividade antioxidante total dos extratos hidroalcoólicos pelo método DPPH•.

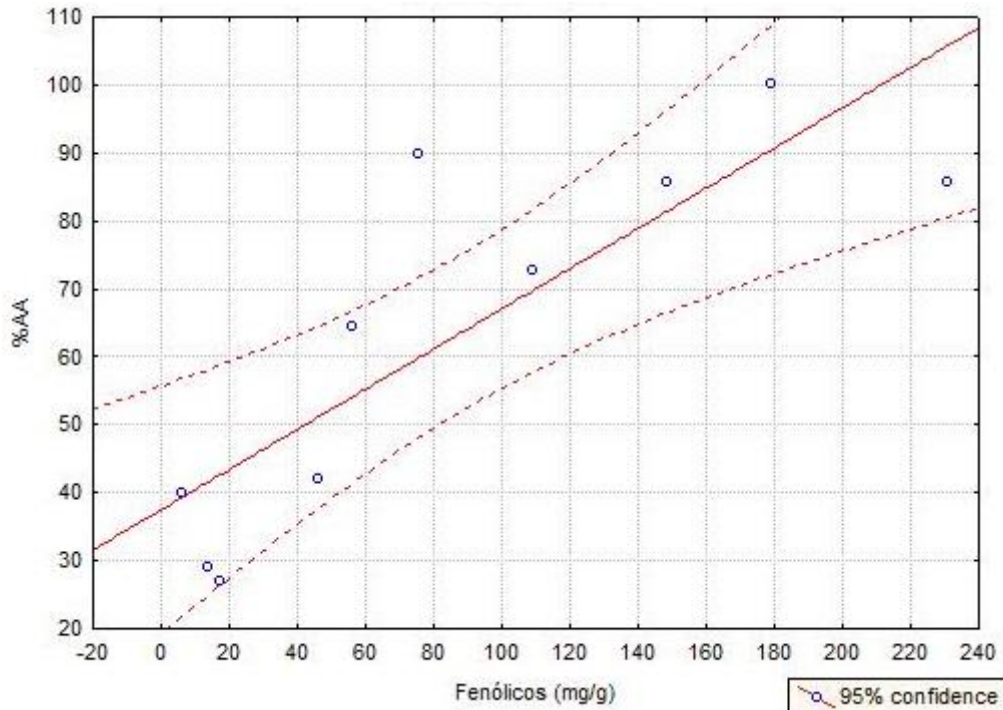


**Figura 9. Diagrama de Pareto para a atividade antioxidante total dos extratos hidroalcoólicos.**

O modelo cúbico representou bem os dados experimentais obtidos pela quantificação da atividade antioxidante das misturas com alto valor de  $R^2$  de 0,92.

Os valores preditos pelo modelo para a obtenção da atividade antioxidante ótima (100%) de uma mistura ternária foram de 25% de Shiitake, 19% de Shimeji preto e 56% de Chá preto.

Pode-se observar na Figura 10 que houve boa correlação ( $r=0,83$ ) entre a quantidade de fenólicos presentes nas amostras com a atividade antioxidante. As amostras que apresentaram a maior atividade antioxidante total foram a 10, 3, 7, 5 e 6, que por sua vez foram as 5 amostras que apresentaram a maior quantidade de compostos fenólicos. Apesar da boa correlação entre essas amostras, os extratos individuais de Shiitake e Shimeji não apresentaram relação entre o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante (Figura 10 e Gráfico 2).



**Figura 10. Gráfico de correlação entre fenólicos totais (mg/g) e atividade antioxidante (%) dos extratos hidroalcoólicos.**

Essa relação de compostos fenólicos com a atividade já foi citada em estudos anteriores, tanto em cogumelos (KITZBERGER et al., 2007), como em chá preto (ZIELINSKI et al., 2014), e sendo estas dependentes do teor e do tipo de compostos fenólicos presentes em cada uma das espécies.

A atividade antioxidante é definida como uma inibição da oxidação de lipídios, proteínas, DNA ou outras moléculas, que ocorre através do bloqueio da etapa de propagação em reações oxidativas em cadeia. Sendo assim, o consumo de antioxidantes se faz necessário para manutenção da saúde celular e correto funcionamento do organismo, uma vez que são capazes de estabilizar, ou desativar os radicais livres antes das células sofrerem danos, reduzindo portanto a ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em dano tecidual. O corpo humano produz antioxidantes naturalmente, como as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione, porém não em quantidade suficientes, e quando a disponibilidade de antioxidantes é limitada, pode ocorrer estresse oxidativo, que é o desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e os sistemas de defesa antioxidantes no organismo, causando o desenvolvimento e progressão de muitas doenças. Os antioxidantes primários eliminam diretamente radicais livres, enquanto

que antioxidantes secundários indiretamente previnem a formação de radicais livres por meio de reação de Fenton (ATOUI et al., 2005; GOLLÜCKE et al., 2014; KITZBERGER et al., 2007; OH et al., 2013).

Os cogumelos apresentam polissacarídeos, triterpenos, fenólicos e vários metabólitos que apresentam fontes potenciais de novos antioxidantes naturais. As características estruturais desses compostos, tais como peso molecular, configuração, tipos de ligação afetam a intensidade da atividade antioxidante (REN et al., 2014). Já foi encontrada correlação direta entre a atividade antioxidante e teor de fenólicos totais nos cogumelos, como já citado, embora a ação antioxidante tenha sido levantada por outras substâncias, como tocoferóis e  $\beta$ -caroteno (KITZBERGER et al., 2007).

A atividade antioxidante do chá preto está relacionada a presença de polifenóis, mais especificamente a presença de ácidos fenólicos e flavonóides (grupo a que pertencem as catequinas e seus derivados), sendo que a atividade destes é maior que daqueles. Há estudos ainda que relatam que a cafeína apresenta boa capacidade de eliminação de radicais hidroxila. O mecanismo antioxidante dos polifenóis é atribuído a: sua capacidade na retenção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de azoto, que incluem radicais livres, tais como superóxido, hidroxilo e óxido nítrico, bem como espécies de radicais não-livre, como peróxido de hidrogênio e ácido nitroso; um mecanismo de redox que permite que os componentes ajam como agentes doadores de hidrogênio, desativadores de oxigênio singlete e sequestrantes de íons metálicos, que através da reação Fenton poderiam gerar radicais. A estrutura química de flavonóides determina a relativa facilidade de oxidação e atividade de eliminação de radicais livres. Embora a presença de grupos galoil, o número e a posição dos grupos hidroxila (com base no potencial redox) sejam reconhecidos por aumentar a atividade antioxidante, a metoxilação e a glicosilação da posição 3, aparentemente, diminui a capacidade de redução. Esses polifenóis podem ainda funcionar como antioxidantes indiretamente, através dos seus efeitos sobre fatores de transcrição e atividades enzimáticas (CHAN et al., 2007; OH, 2013; OSMAN, 2011; TURUMTAY et al., 2014; ZIELINSKI et al., 2014).

Vale ressaltar ainda que o método DPPH· Não revela a capacidade antioxidante total de um composto, visto que a variedade de compostos



antioxidantes podem funcionar através de mecanismos diferentes do que o proposto por esse método (OH et al., 2013; REN et al., 2014).

### 6.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO

#### 6.3.1 Método de difusão em ágar com perfuração de poços

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de difusão em ágar com perfuração de poços, usou-se dois antibióticos como controle positivo e etanol 40% como controle negativo, em duas bactérias, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os resultados dos diâmetro obtidos para os halos de inibição dos antibióticos selecionados como controle positivo e controle negativo para cada espécie bacteriana, em ensaios de difusão em ágar com perfuração de poços estão apresentados na Tabela 7 e na Figura 11.

**Tabela 7. Valores dos diâmetros (mm) obtidos para os halos de inibição dos antibióticos selecionados como controle positivo e controle negativo para cada espécie bacteriana, em ensaios de difusão em ágar com perfuração de poços (n=2).**

Bactérias	Novamox (20 µg)	Cefalexina (300 mg)	Etanol 40%
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	15,25 ± 1,06	10,00 ± 0,7	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10,50 ± 1,41	14,33 ± 1,53	0

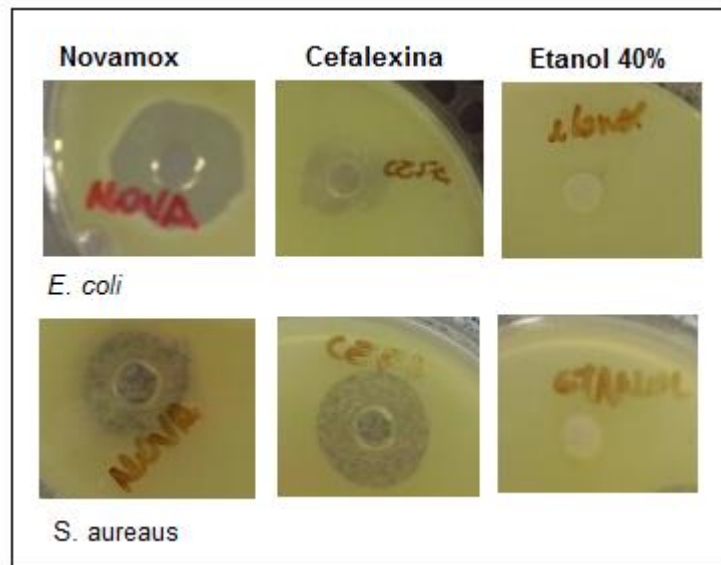


Figura 11. Halos de inibição dos antibióticos selecionados como controle positivo e controle negativo para cada espécie bacteriana, em ensaios de difusão em ágar com perfuração de poços.

As amostras foram testadas com extrato 100%, 75%, 25% e em sinergismo com o antibiótico na concentração final de 150 mg/L. Dentre as dez misturas dos extratos hidroalcoólicos testados quanto à atividade antimicrobiana contra os dois microorganismos utilizados, observou-se inibição do crescimento em apenas três extratos, o 1, contendo apenas Shiitake; o 3, contendo apenas chá preto; e o 4, contendo quantidade iguais de Shiitake e Shimeji preto, e em potencial significativo apenas para a *Escherichia coli*, conforme apresentado na Tabela 8 e nas Figuras 12-21.

Tabela 8. Diâmetros (mm) dos halos de inibição nos teste antimicrobianos de difusão em ágar com perfuração de poços (n=2).

(Continua)

CEPA: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922										
Concentração do extrato	Ext. 1	Ext. 2	Ext. 3	Ext. 4	Ext. 5	Ext. 6	Ext. 7	Ext. 8	Ext. 9	Ext. 10
100%	11	-	4,5	4,5	-	-	-	-	-	-
75%	2	-	5	6	-	-	-	-	-	-
50%	2	-	4	-	-	-	-	-	-	-
M: Extrato (50 g/L) + Cefalexina (150 mg/L)	14	10,5	9,5	8	8,5	10,5	9,5	9	5,5	2,5

Tabela 8. Diâmetros (mm) dos halos de inibição nos teste antimicrobianos de difusão em ágar com perfuração de poços (n=2).

(Conclusão)										
CEPA: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923										
Concentração do extrato	Ext. 1	Ext. 2	Ext. 3	Ext. 4	Ext. 5	Ext. 6	Ext. 7	Ext. 8	Ext. 9	Ext. 10
100%	-	-	2,5	-	-	-	-	-	-	-
75%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M: Extrato (50 g/L) + Cefalexina (150 mg/L)	10,5	8	8,5	8	14	10,5	8,5	10,5	11	7

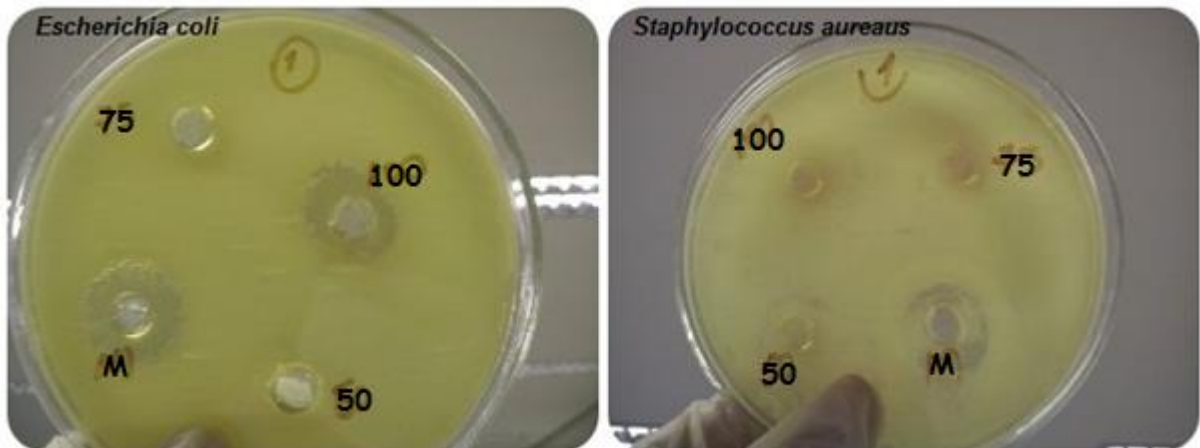


Figura 12. Teste antimicrobianos de difusão em ágar com perfuração de poços no Extrato 1.

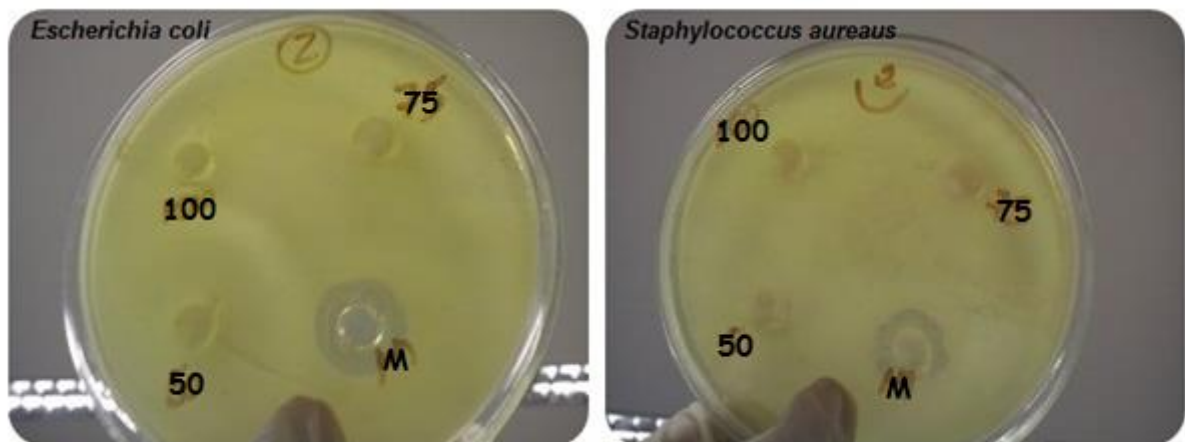


Figura 13. Teste antimicrobianos de difusão em ágar com perfuração de poços no Extrato 2.

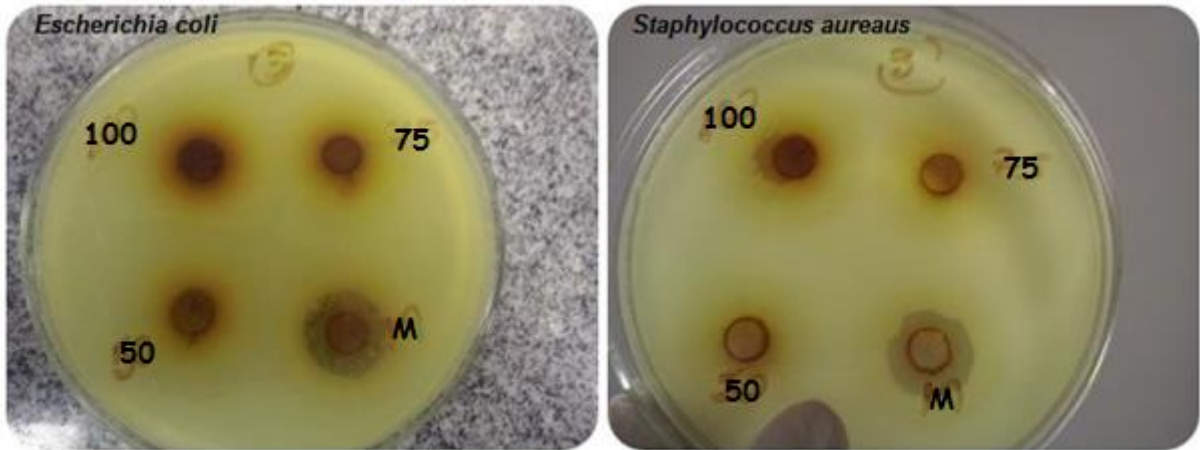


Figura 14. Teste antimicrobianos de difusão em ágar com perfuração de poços no Extrato 3.

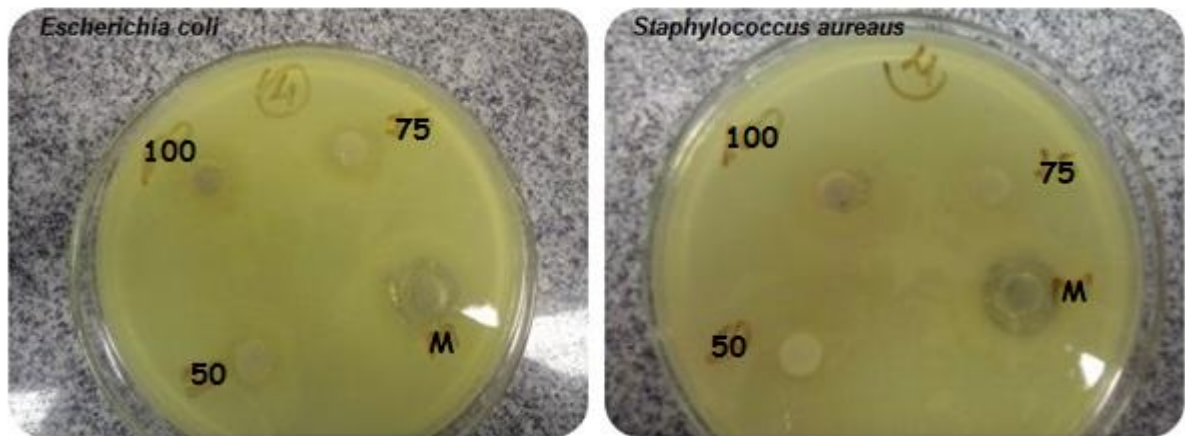


Figura 15. Teste antimicrobianos de difusão em ágar com perfuração de poços no Extrato 4.

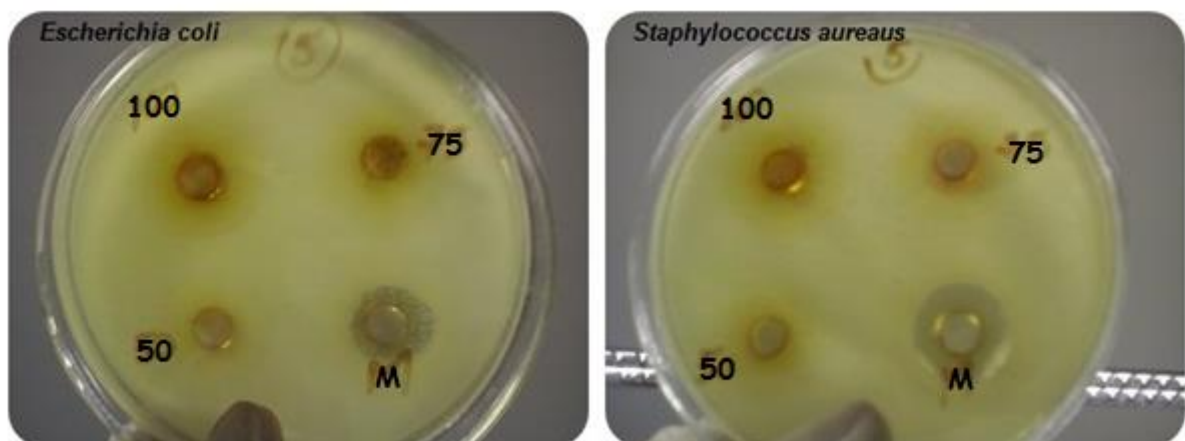


Figura 16. Teste antimicrobianos de difusão em ágar com perfuração de poços no Extrato 5.

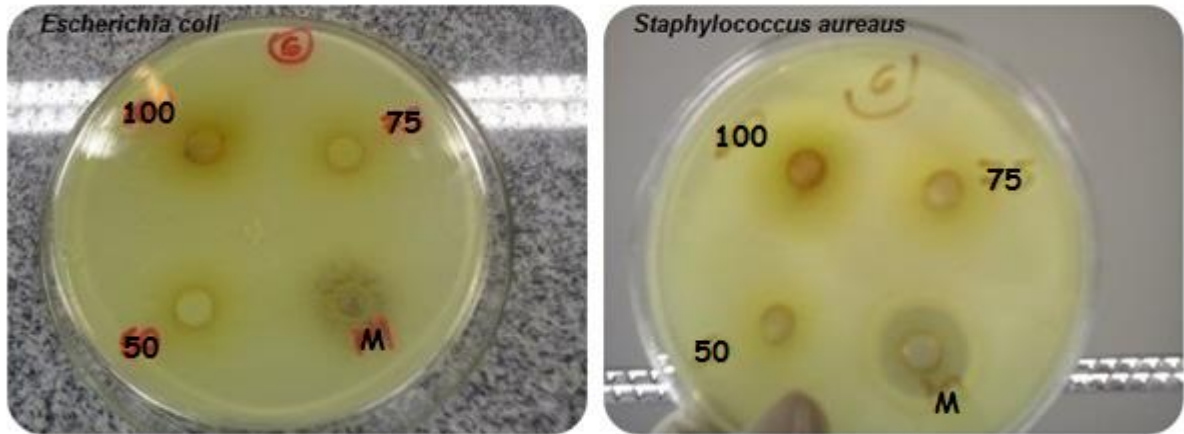


Figura 17. Teste antimicrobianos de difusão em ágar com perfuração de poços no Extrato 6.

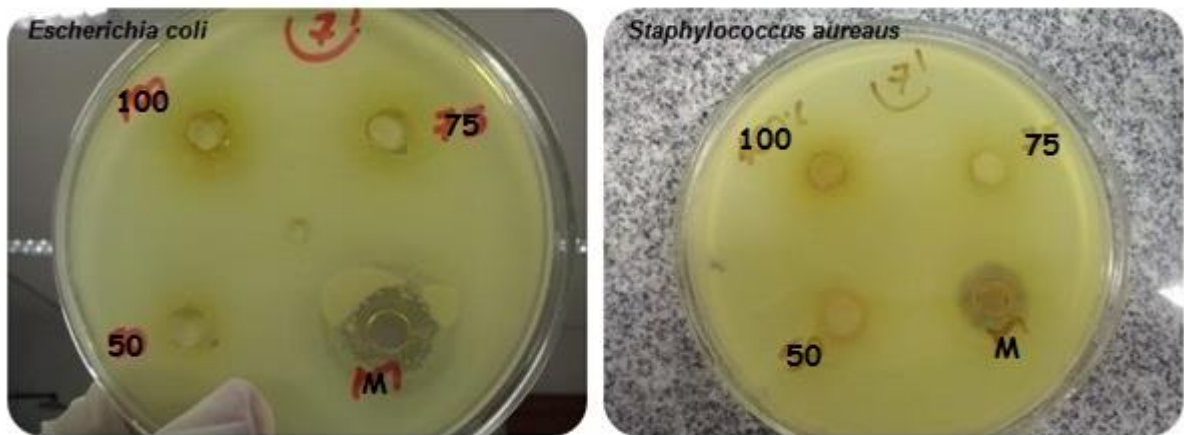


Figura 18. Teste antimicrobianos de difusão em ágar com perfuração de poços no Extrato 7.

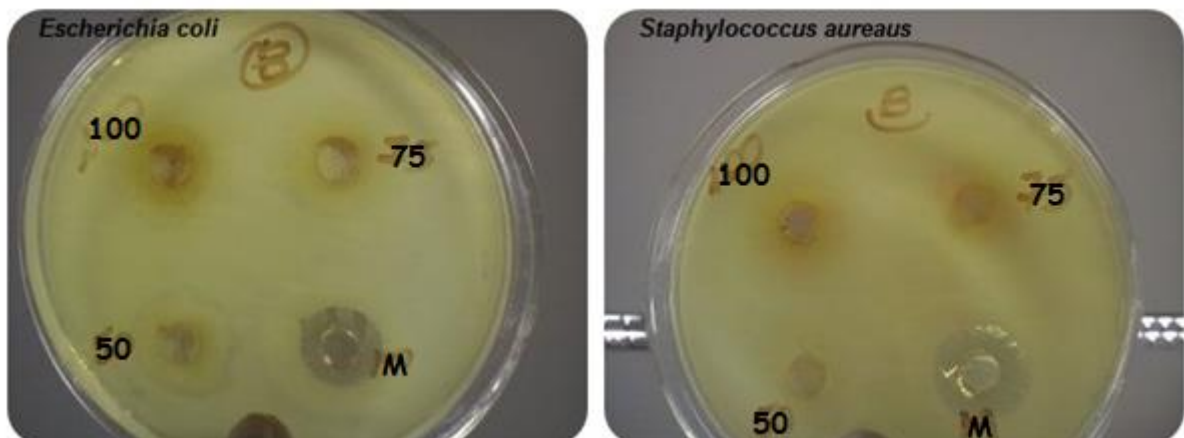


Figura 19. Teste antimicrobianos de difusão em ágar com perfuração de poços no Extrato 8.

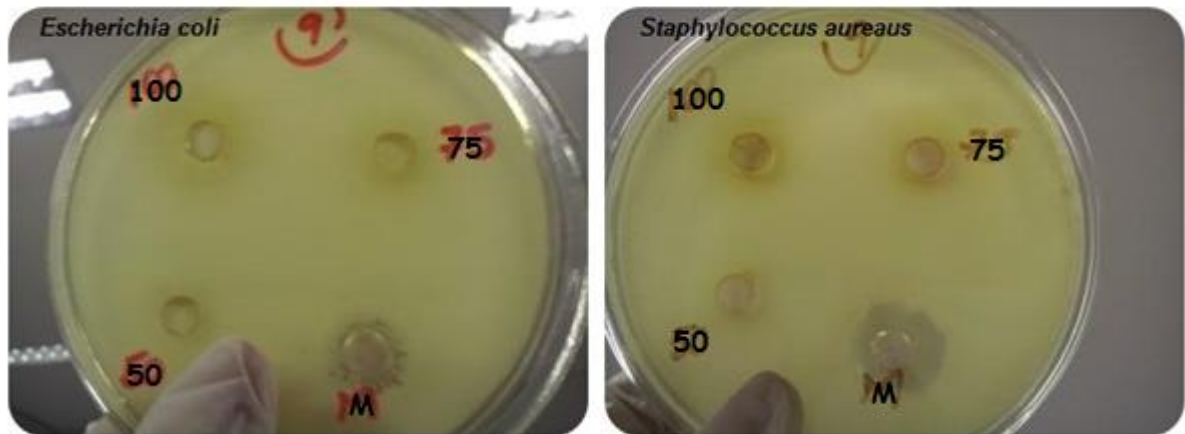


Figura 20. Teste antimicrobianos de difusão em ágar com perfuração de poços no Extrato 9.

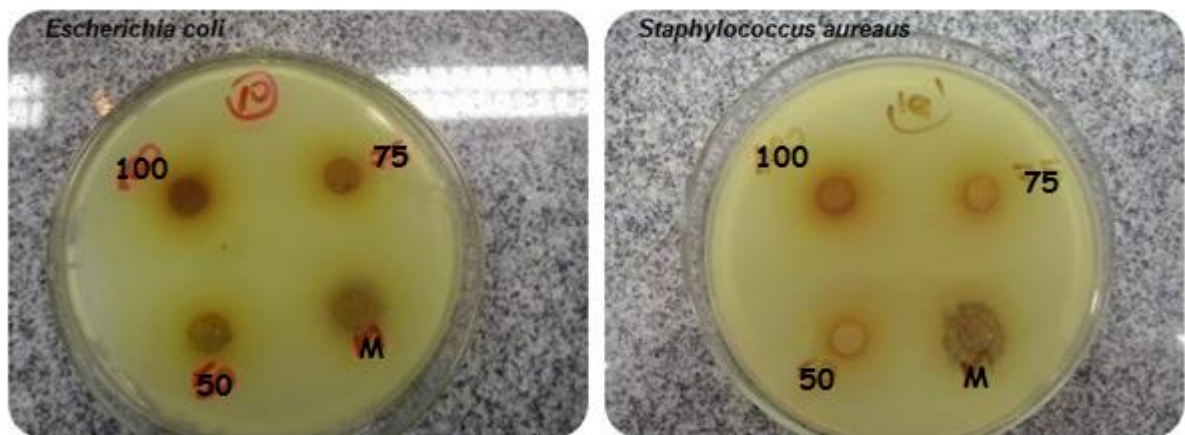


Figura 21. Teste antimicrobianos de difusão em ágar com perfuração de poços no Extrato 10.

A interação entre o extrato 1 e a cefalexina (em concentração menor do que a utilizada no controle), com halo de 14 mm, resultou em efeito positivo na inibição do crescimento de *Escherichia coli*, o que pode ser observado pelo aumento do diâmetro de inibição em comparação com o extrato bruto (11 mm) e com o antibiótico avaliado individualmente (10 mm) (Tabelas 7 e 8).

Essa interação positiva que intensificou a potência de um produto bioativo pode ser chamada de potenciação. Os efeitos aditivos e sinérgicos são subconjuntos de potenciação e estão presentes quando este efeito é experimentalmente caracterizado e quantificado (VIKSVEEN, 2003).

Pelos resultados pode-se perceber que o sinergismo de antibiótico com os produtos naturais escolhidos são significativos, uma vez que a mistura de antibiótico 150 mg/L e extrato tem praticamente o mesmo halo de inibição do que o antibiótico

puro com o dobro da concentração (300 mg\L), sendo assim pode-se diminuir a concentração necessária de antibióticos obtendo-se ainda um resultado eficaz. Essa diminuição é benéfica pois os antibióticos não matam só as bactérias, mas podem também prejudicar o organismo humano, por intoxicação ou causando reações adversas; além de que nem todas as bactérias que estão no corpo são prejudiciais, algumas são necessárias para o funcionamento correto do corpo e os antibióticos matam também essas bactérias, logo o uso em uma concentração menor poderia diminuir esse impacto de recebimento do antibiótico no organismo do paciente (VIKSVEEN, 2003).

Como pode-se ver nos resultados, os extratos mais promissores são o 1, contendo apenas Shiitake e o 3, contendo apenas chá preto. O melhor extrato frente à *Escherichia coli* é o extrato 1, o qual possui halo de inibição maior frente a bactéria; e o melhor extrato frente a *Staphylococcus aureus* é o extrato 3 (extrato bruto, 100%), o qual é capaz de inibir sozinho a bactéria.

A atividade antimicrobiana dos cogumelos pode ser atribuída à presença de vários metabolitos bioativos secundários, compostos voláteis, alguns fenóis, ácidos gálico, ácidos graxos livres e seus derivados. A sensibilidade de algumas bactérias para extratos de cogumelos pode ser explicada pela estrutura hidrofílica que elas possuem em seu espaço periplasmático (espaço fluido entre a membrana plasmática e a membrana externa de bactérias gram-negativas), o que faz com que a parede celular seja mais permeável e conseqüentemente, essas bactérias ficam mais vulneráveis ao ataque por cogumelos. Assim, cogumelos que possuem em sua constituição compostos bioativos poderiam suportar aplicações na indústria como fontes acessíveis de compostos antimicrobianos (GYAWALI e IBRAHIM, 2014).

O Shiitake é um cogumelo que possui em sua composição química proteínas, lipídeos (ácido linoléico), carboidratos, fibras, minerais, vitaminas B1, B2 e C e ergosterol, a pró-vitamina D. Um dos principais compostos isolados do Shiitake que possui propriedades antimicrobianas e antitumorais é o lentinano. Pode-se destacar também a atividade presente em mais compostos do Shiitake, como no ácido gálico, que demonstrou em outros estudos ter propriedades anti-bacterianas e também exercer uma atividade anticarcinogênica em células cancerosas em animais e de um precursor de tanino que fornece a base para epiafzelequina e bostricoidina, uma substância antibiótica que demonstrou ser ativa *in vitro* contra *M. tuberculosis*.

Em um estudo que tentava identificar os componentes químicos do Shiitake a partir de extratos, identificaram-se 34 compostos, os quais apresentavam uma série de novos metabólitos antimicrobianos não identificados anteriormente na espécie, como cicloheximida, alcalóides anticancerígenos, ácido ciclopiazônico e dissulfuretos (HIRASAWA et al., 1999; RAO et al., 2009).

No caso do chá preto a presença de compostos polifenólicos é responsável pelos seus benefícios para a saúde. Esses compostos fenólicos são os metabólitos secundários de plantas e têm um grande potencial como uma fonte alternativa de tratamento de doenças crônicas, com propriedades antimutagênica, antiviral, antiinflamatórias em vários sistemas biológicos. A influência desses compostos no crescimento bacteriano e metabolismo depende da estrutura do polifenol, da dosagem ensaiada e da cepa do microrganismo devido a diferenças encontradas na composição da parede celular microbiana.

Os polifenóis podem ligar-se a membranas de células bacterianas de uma forma dependente da dose, perturbando assim a função da membrana e ocasionando a inibição do crescimento das células. O conteúdo de polifenóis de chá é atribuído principalmente à flavonóides, mais especificamente ao grupo das catequinas (Figura 22): epicatequina (EC), epigalocatequina (ECG), epigalocatequina (EGC), e (-)-epigalocatequina-3-galato (EGCG); e entre estes, o composto mais abundante e ativo é o EGCG. As catequinas, dependendo da sua estrutura e condição agregada, atuam em diferentes espécies de bactérias (*E. coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella choleraes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) através da geração de peróxido de hidrogênio, ligações de hidrogênio de seus grupos hidroxila com bicamadas lipídicas das membranas celulares e alteração da permeabilidade da membrana microbiana (CARDONA et al., 2013; JAIN et al., 2013).



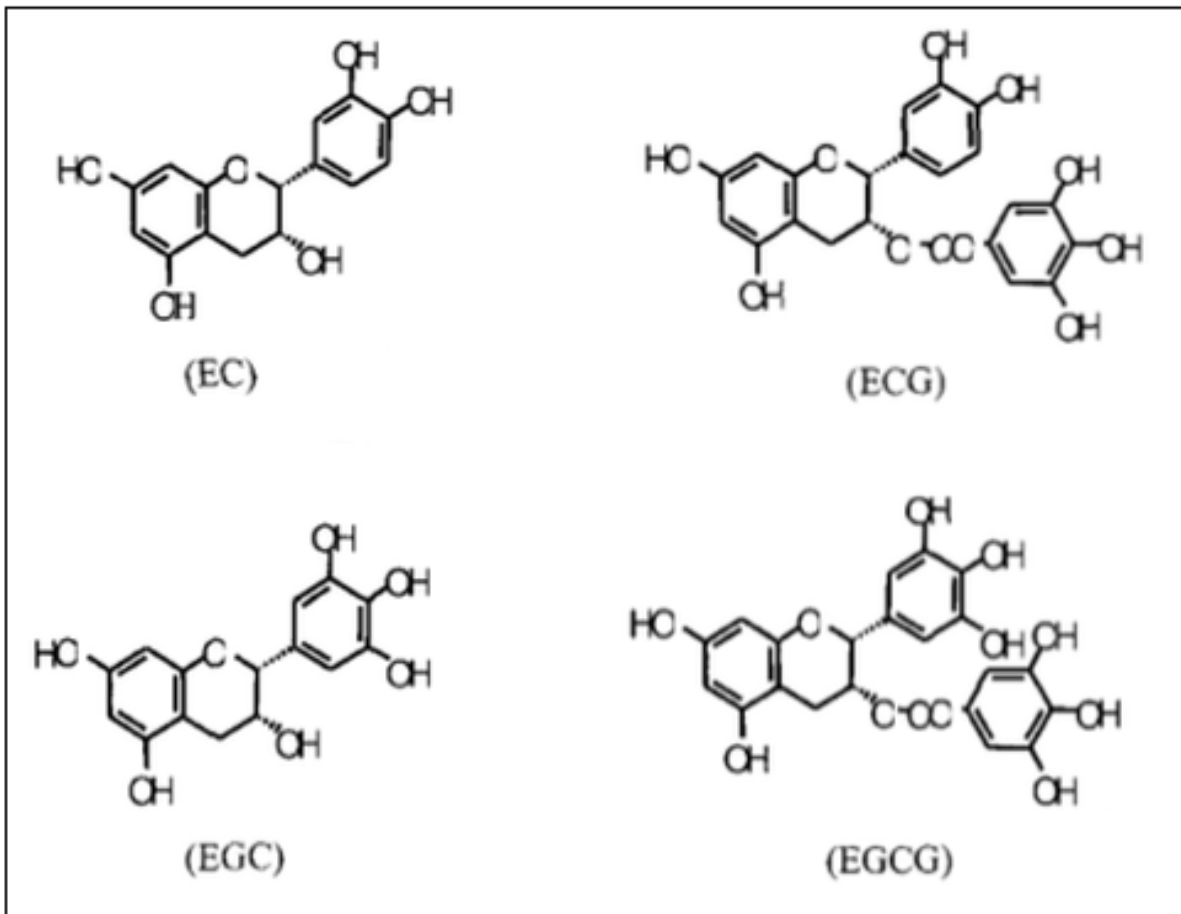


Figura 22. Estrutura química das catequinas presentes no Chá preto.  
Fonte: Lamarão e Fialho (2009).

Como o antibiótico Cefalexina utilizado para controle positivo foi na concentração de 300 mg/L, realizou-se sinergismo dos extratos com a Cefalexina nessa concentração final. O resultado está apresentado na Tabela 9 e na Figura 23.

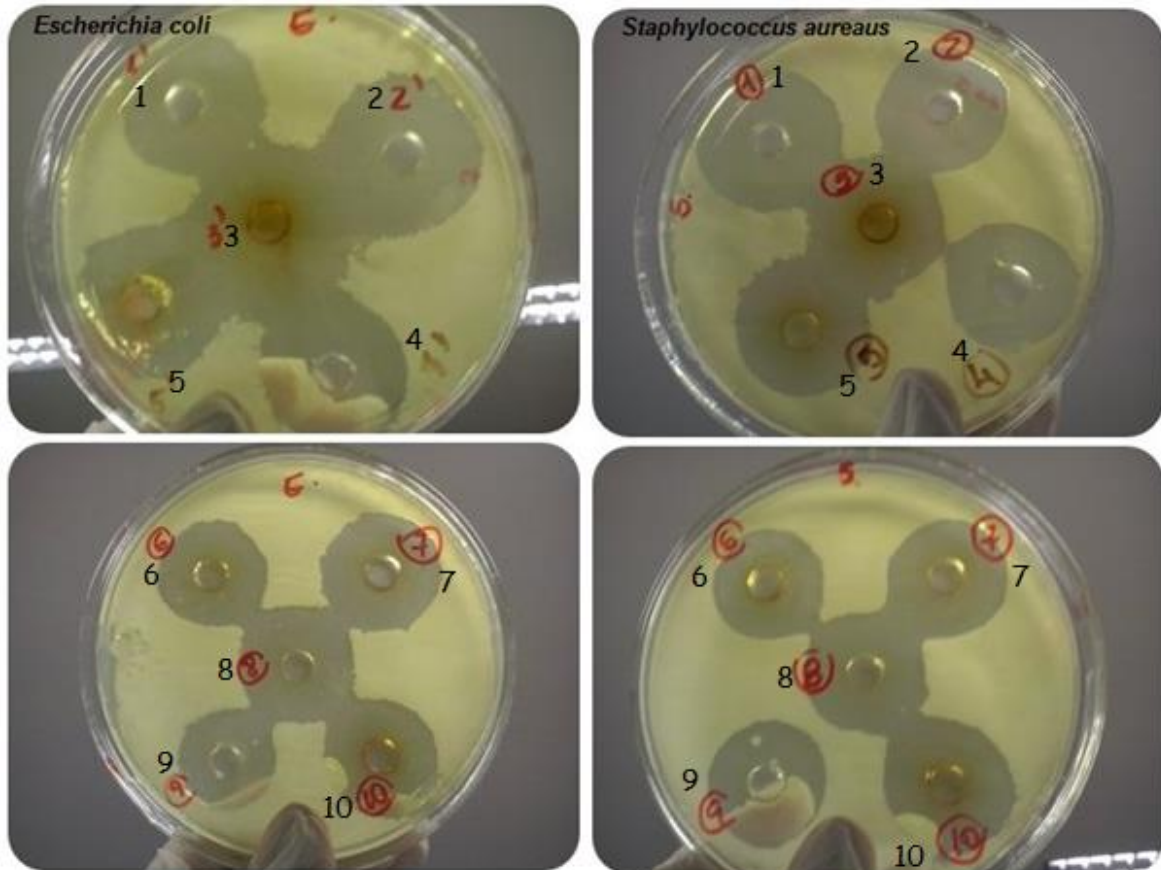


Figura 23. Resultado do sinergismo de antibiótico e extrato nos teste antimicrobianos de difusão em ágar com perfuração de poços.

Tabela 9. Diâmetros em mm dos halos de inibição do sinergismo de antibiótico e extrato nos teste antimicrobianos de difusão em ágar com perfuração de poços.

CEPA: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922										
Amostras	Ext. 1	Ext. 2	Ext. 3	Ext. 4	Ext. 5	Ext. 6	Ext. 7	Ext. 8	Ext. 9	Ext. 10
Extrato+Cefalexina 300 mg/L	21	23	27	22	22,5	18	18,8	19,5	17,8	19

O antibiótico com concentração de 300 mg/L quando misturado com o extrato possui um efeito de inibição consideravelmente maior do que ele sozinho nessa concentração, resultado que permite afirmar que houve potenciação. A associação de um composto bioativo com antibióticos existentes pode apresentar grandes benefícios que são justificados por vários autores, a nova solução pode apresentar melhores resultados de solubilidade, absorção, segurança, estabilidade, entre outros, fazendo com que o sinergismo, além do efeito da potenciação, possa reduzir os possíveis efeitos secundários adversos; o novo potencial pode exibir uma

sinergia ao bloquear um ou mais dos outros alvos no caminho metabólico. Essa associação pode reduzir efeitos secundários indesejáveis dos antibióticos sobre a saúde humana e animal pela substituição de, pelo menos em parte, das substâncias sintéticas, por compostos antimicrobianos altamente específicos e não tóxicos. (ABREU et al., 2014; HEMAISWARYA et al., 2008).

Sabe-se que as bactérias possuem mecanismos de defesas contra os antibióticos (intrínsecos ou adquiridos), como inativação do antibiótico pela destruição ou modificação deste por enzimas produzidas pelo organismo; prevenção de acesso ao alvo; e alteração do sítio de ligação do antibiótico, esses mecanismos fazem com que o uso indiscriminado ou inadequado de antibióticos gerem cepas resistentes, que conseqüentemente causam aumento da morbidade, mortalidade e custos dos cuidados de saúde. Como o sistema biológico é menos capaz de compensar a ação de duas ou mais drogas simultaneamente, o desenvolvimento de compostos ativos em conjugação com os antibióticos existentes provavelmente poderiam evitar a emergência de variantes resistentes que poderiam surgir durante o tratamento, aprimorando a biodisponibilidade do princípio e causando um efeito de modificação da resistência (ABREU et al., 2014; MANDRAGÓN et al., 2014 e VIKSVEEN, 2003).

A combinação de antibiótico com chá preto é promissora, uma vez que o EGCG, o principal constituinte do chá, demonstrou um comportamento sinérgico com antibióticos em outros estudos, destruindo a atividade  $\beta$ -lactamase, e atuando também nos peptidoglicanos da parede celular. A elevada biodisponibilidade do EGCG, uma vez que ele é absorvido através do trato digestivo e distribuído para vários órgãos dos animais e seres humanos, poderia aumentar a atividade do antibiótico sob condições *in vivo*. Como o chá já é consumido por milhares de anos, tem-se a indicação de que sua toxicidade é baixa (HEMAISWARYA et al., 2008).

A busca dessas associações sinérgicas se faz necessária, além dos fatores já citados, pelo fato de que a indústria farmacêutica, as grandes instituições acadêmicas ou o governo não estão investindo os recursos necessários para produzir a próxima geração de medicamentos antimicrobianos eficazes e seguros, em muitos casos por questões financeiras; o custo de desenvolvimento de um novo antimicrobiano é maior em relação ao custo de encontrar uma combinação entre os conhecidos; o crescente aumento na resistência aos antibióticos entre as

bactérias patogênicas fez com que os novos tipos de antibióticos criados nos últimos tempos fossem ineficientes para tratar a doença; novos antibióticos demandam tempo, devem ser utilizados judiciosamente por causa dos efeitos secundários e não são susceptíveis de melhorar os problemas de resistência (ABREU et al., 2014; ALANIS, 2005; VIKSVEEN, 2003).

### 6.3.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A concentração inibitória mínima é a concentração mais baixa que inibe o crescimento bacteriano visível. Frequentemente é expresso como MIC<sub>50</sub>, que é o MIC que inibe 50% das bactérias. A MIC não é uma medida de eficácia, é uma medida *in vitro* da atividade do medicamento e susceptibilidade bacteriana. Quanto mais baixo o valor de MIC, mais susceptível o microrganismo é à droga (PAPICH, 2013).

Os valores de MIC foram determinados apenas para os principais extratos que apresentaram atividade antibacteriana positiva através da técnica de difusão em ágar com perfuração de poços, ou seja, com o extrato 1, contendo apenas Shiitake; e com o extrato 3, contendo apenas chá preto. O teste foi realizado para apenas uma cepa, a *E.coli*, uma vez que foi a que se mostrou mais suscetível aos extratos. Para determinar a MIC do sinergismo da mistura de antibiótico com extrato, foi determinado o MIC do antibiótico Cefalexina e o MIC deste com a mistura com o extrato 1 e o extrato 3.

O resultado da concentração inibitória mínima que inibe o crescimento bacteriano pode ser encontrado nas Tabelas 10 e 11.

**Tabela 10. Concentração inibitória mínima dos extratos e antibiótico analisados frente a *E. coli* ATCC 25922 (n=2).**

(Continua)

Amostras	MIC (mg/L)
Extrato 1	1250
Extrato 3	1250
Cefalexina	8

**Tabela 11. Concentração inibitória mínima das misturas entre os extratos e a cefalexina analisadas frente a *E. coli* ATCC 25922 (n=2).**

<b>Amostras</b>	<b>Concentração do Extrato (mg/L)</b>	<b>Concentração do Antibiótico (mg/L)</b>	<b>MIC (mg/L)</b>
Extrato 1 + Cefalexina	312,5	4	316,5
Extrato 3 + Cefalexina	312,5	4	316,5

O controle de atividade antibacteriana feito com a cepa padrão *E. coli* ATCC 25922 frente a Cefalexina apresentou MIC de 8 mg/L, o mesmo valor estabelecido por Andrews (2001).

A partir do valor do MIC pode-se classificar os inibidores em: fortes, MIC até 500 mg/L; moderados, MIC entre 600 e 1500 mg/L; e fracos, MIC acima de 1600 mg/L (ALIGIANNIS et al., 2001). De acordo com essa classificação a Cefalexina foi considerada um inibidor forte, juntamente com as misturas dos extratos com a Cefalexina; e os dois extratos foram determinados como inibidores moderados.

Com esse teste pode-se visualizar o potencial antimicrobiano da mistura do antibiótico com os extratos testados, uma vez que foram classificados como inibidores fortes. Além disso, a mistura entre os extratos e a cefalexina possibilitou a inibição do crescimento da *E. coli* com concentrações menores do extrato (4 vezes menor) e do antibiótico (2 vezes menor), em comparação com os valores de MIC obtidos na avaliação individual de cada amostra (Tabela 10).

## 7 CONCLUSÃO

Este estudo em pequena escala apresentou resultados que comprovam a presença de compostos fenólicos nas amostras, os valores encontrados variaram de 6,02 a 230,70 mg GAE\g, sendo que quanto maior a quantidade de chá preto presente na amostra, maior a quantidade de compostos fenólicos. Pelos resultados obtidos pode-se relacionar a atividade antioxidante com a presença de fenólicos, uma vez que as amostras que apresentaram maior atividade antioxidante total foram as cinco amostras que apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos. O efeito sinérgico não foi encontrado nesse caso.

Os resultados nos teste antimicrobianos detectaram a inibição das cepas *Escherichia coli* ATTC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por alguns extratos e pela interação entre os extratos e a cefalexina.

Em relação às outras amostras, é importante considerar que os extratos são compostos por uma mistura de substâncias e que a substância ativa pode estar em quantidades pequenas. Portanto, a ausência de atividade antimicrobiana em extratos brutos não deve ser considerada como um resultado negativo absoluto.

Ao término da pesquisa foi vista a importância da busca de novos potenciais bioativos, frente as propriedades que apresentam como citadas na literatura, e também como a associação de medicamentos e compostos bioativos naturais podem potencializar as ações benéficas que já apresentam, permitindo assim uma contribuição significativa com esse trabalho para o desenvolvimento de novas pesquisas nesse caminho.

## **8 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS**

Para futuros trabalhos, sugere-se o desenvolvimento de estudos para isolar e identificar os compostos ativos responsáveis pelas atividades antioxidante e antimicrobiana, a fim de que os órgãos responsáveis pelo desenvolvimento de novos medicamentos e pelos testes destes possam preparar extratos concentrados contendo os compostos ativos, para permitir desenvolvimento de medicamentos em uma melhor forma, ao invés da ingestão da matéria-prima bruta, de forma que a sua ingestão possa ser controlada e ainda mais eficaz.

## REFERÊNCIAS

ABREU, Ana Critina et al. Evaluation of the best method to assess antibiotic potentiation by phytochemicals against *Staphylococcus aureus*. *Journal Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Portugal, v.79, ed. 2, p. 125-134, jun. 2014.

ALANIS, Alfonso J. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research*, ed. 6, v. 36, p. 697-705, nov.-dez. 2005.

ALIGIANNIS N; KALPOTZAKIS E; MITAKU S, CHINOUBI 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, p. 4168-4170, 2001.

ANDREWS, Jennifer M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Reino Unido, v. 48, compl. S1, p. 5-16, 2001.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. *Association of Official Analytical Chemists*, Washington, 2000.

AOAC. Official methods of analysis. *Association of Official Analytical Chemists*, 1995.

ATOUI, Ali K. et al. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Journal of Food Chemistry*, ed. 1, v. 89, p. 27-36, jan. 2005.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, Campina Grande, v.2.3, p. 27-34, 2007. Disponível em:  
<<http://www.dema.ufcg.edu.br/revista/index.php/REMAP/article/viewFile/46/81>>. Acesso em: 30 jul. 2013.

BARONI, Érico de Godois et al. Extração de óleo essencial de *Lippia alba* utilizando hidrodestilação e extração assistida por micro-ondas: um estudo comparativo. In: ENCONTRO DE JOVENS PESQUISADORES, 19, 2011. Universidade de Caxias do Sul. Disponível em:  
<[http://www.ucs.br/site/midia/arquivos/%C3%89rico\\_de\\_Godois\\_Baroni.pdf](http://www.ucs.br/site/midia/arquivos/%C3%89rico_de_Godois_Baroni.pdf)>. Acesso em: 29 set. 2013.



BRAND-WILLIAMS, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Journal of Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, v. 28, p. 25–30, 1995.

CARDONA, Fernando et al. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, ed. 8, v. 24, p. 1415-1422, ago. 2013

CASAZZA, Alessandro A. et al. Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. *Journal of Food Engineering*, Itália, v.100, p. 50–55, mar. 2010.

CHAN, E. W. C. et al. Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. *Journal of Food Chemistry*, Malásia, ed. 4, v. 102, p. 1214-1222, 2007.

DORÊS, Rosana Gonçalves Rodrigues. *Determinação dos teores de compostos fenólicos em *Dimorphandra mollis* Benth.* 2007. 21 f. Dissertação (Pós-Graduação em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

EMMONS, K. M., Marcus, B. H., Linnan, L. A., Rossi, J. S. and Abrams, D. B. Mechanisms in multiple risk factor interventions: Smoking, physical activity, and dietary fat intake among manufacturing workers. *Preventive Medicine*, v. 23, p. 481-489, 1999.

FIB. DOSSIÊ de antioxidantes. *Revista Food Ingredientes Brasil*, São Paulo, n. 6, 2009. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/83.pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2013.

FURLANI, Regina Prado Zanes; GODOY, Helena Teixeira. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. *Campinas*, v. 27, n.1, p. 154-157, jan.-mar. 2007.

GOLLÜCKE, Andréa Pittelli Boiago et al. *Polyphenols in Human Health and Disease - Chapter 7: Polyphenols as Supplements in Foods and Beverages: Recent Methods, Benefits and Risks.* São Paulo, v. 1, p. 71-77, jan. 2014.

GOMES, Rafaela Vasconcelos. *Imobilização de esporos de *Bacillus subtilis* em esfera de quitosana obtida de quitina de camarão para uso na biodegradação de hidrocarbonetos.* 2007. 48 f. Dissertação (Pós-Graduação de Ciência Marinha Tropicais) - Instituto de Ciência do Mar da Universidade Federal do Ceará, 2007.

GONÇALVES, A.L. Filho; MENEZES, A. Alves. Estudo comparativo de atividade antimicrobiana de extrato de algumas árvores nativas. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.72, n.3, p.353-358, jul./set., 2005. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V72\\_3/goncalves.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V72_3/goncalves.pdf)>. Acesso em: 26 ago. 2013.

GOOSEN, M. E. A. Applications of chitin and chitosan. *Technomic Publishing Company*, Lancaster, 1996.

GYAWALI, Rabin et al. Natural products as antimicrobial agentes. *Journal of Food Control*, v. 46, p. 412-429, dez. 2014

HAMINIUK, C. W. I.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; GUEDES, A. R.; STAFUSSA, A. P.; BONA, E.; CARPES, S. T. Chemical antioxidante and antibacterial study of Brazilian fruits. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 46, p. 1529-1537, 2011

HEARST, Rachel et al. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. V. 15, n. 1, p. 5-7, feb. 2009.

HEMAISWARYA, Shanmugam et al. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Journal of Phytomedicine*, ed. 8, v. 15, p. 639-652, ago. 2008.

HIRASAWA, Masatomo et al. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). *International Journal of Antimicrobial Agents*. V. 11, n. 2, p. 151-157, feb. 1999.

JAIN, Aditi et al. Tea and human health: The dark shadows. *Journal of Toxicology Letters*, ed. 1, v. 220. P. 82-97, jun. 2013.

KITZBERGER, Cíntia Sorane Good et al. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*. V. 80, n. 2, p. 631-638, mai. 2007.

KOLEVA, I.I.; VAN BEEK, T.A.; LINSSEN, J.P.H.; de GROOT, A.; EVSTATIEVA, L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, v. 13, n.1, p. 8-17, 2006.

LAMARÃO, Renata da Costa e FIALHO, Eliane. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. *Revista de Nutrição*, Campinas, mar./abr. 2009

LIMA, VLAG, Melo EA. Teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 7, p.187-190, 2004.

MADIGAN, Michael; MARTINKO, John M.; DUNLAP, Paul V.; CLARK, David. *Microbiologia de Brock*. 12. ed. Artmed, 2010. 1160 p.

MEDICAL MUSHROOMS. Disponível em: <<http://www.medicalmushrooms.net/>> Acesso em: 10. Ago. 2014.

MENSOR LL et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res*, v. 15, p. 127-130, 2001.

MOLZ, Patrícia et al. A metabolomics approach to evaluate the effects of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) treatment in undernourished young rats. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. V. 318, parte A, p. 194-197, jan. 2014.

MONDRAGÓN, Eduardo Ibarguen et al. Mathematical modeling on bacterial resistance to multiple antibiotics caused by spontaneous mutations. *Journal of Biosystems*, v. 117, p. 60-67, mar. 2014.

MORAES, Aurea et al. *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratório de Saúde*. Micologia. Capítulo 4. Disponível em: <<http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/d/cap4.pdf>>. Acesso em: 03 ago. 2013

MUSHROOM COLLECTING. Disponível em: <<http://mushroom-collecting.com/mushroomoyster.html>>. Acesso em: 10 ago. 2014

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food (Review). *Journal of Chromatography A*, n 1054, p. 95-111, 2004.

NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory*. Standards Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard—Eighth. NCCLS document M2-A8, Pennsylvania, USA: Edition Wayne, 2003.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, v. 153, p. 375-80, 1944.

OH, Jungmin et al. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Journal of Food Control*, ed. 2, v. 31, p. 403-409, jun. 2013

ÖZTÜRK, Mehmet et al. *In vitro* antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology*. V. 49, n. 6, p. 1353-1360, jun. 2011.

PANNALA, A.S.; CHAN, S.T.; O'BRIEN, J.P.; RICE-EVANS, A.C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.282, n.5, p.1161-1168, 2001.

PAPICH, Mark G. Antimicrobials, Susceptibility Testing, and Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) in Veterinary Infection Treatment. *Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, ed. 5, v. 43, p. 1079-1089, set. 2013.

PRASHANTH, Harish K. V.; THARANATHAN, R. N.. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in Food Science & Technology*. India, v. 18, p. 117-131, mar. 2007.

RAMALHO, Suyare Araújo et al. Effect of infusion time on phenolic compounds and caffeine content in black tea. *Journal of Food Research International*, ed. 1, v. 51, p. 155-161, abr. 2013.

RAO, Juluri R. et al. Antimicrobial properties of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*). *International Journal of Antimicrobial Agents*. V. 33, n. 6, p. 591-592, jun 2009.

REIS, Filipa S. et al. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between *in vivo* and *in vitro* samples. *Food and Chemical Toxicology*. V. 50, n. 5, p. 1201-1207, mai. 2012.

REN, Lu et al. Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. V. 3, n. 2, p. 41-51, abr. 2014.

ROSDAHL VT, PEDERSEN KB (editors). The Copenhagen Recommendations. Report from the Invitational EU Conference on The Microbial Threat, Copenhagen

Denmark, 9-10 September 1998. Copenhagen, *Denmark: Danish Ministry of Health, and Danish Ministry of Food, Agriculture and Fisheries*, 1998. Disponível em: <<http://www.im.dk/publikationer/micro98/index.htm>> Acesso em: 1. Fev. 2014.

SILVA, Marília Lordêlo Cardoso et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul/set. 2010.

SINGLETON, V. L.; JOSEPH, A.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, v. 16, p. 144-149, 1965.

SOMOGYI, M. A New Reagent for Determination of Sugars. *A new Sugar Reagent*, p. 61-68, 1945.

SOUSA, MP et al. Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de Plantas Medicinais Brasileiras. Ed. UFC, p. 445, 2004.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, Davis, v. 81, n. 1, p. 200-208, 2007

STEFANELLO, F.S. et al. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do cogumelo Shimeji (*Pleurotus ostreatus*). In: SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR, 4. 2012, Gramado. *Anais...* Porto Alegre: FAURGS - Fundação de Apoio da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

SUTIVISEDSEK N., Cheng H.N., Willett J.L., Lesch W.C., Tangsrud R.R., Biswas A. 2010. Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal Food Research International*, v. 43, p. 516-519.

TANG, S. Z.; KERRY, J. P.; SHEEHAN, D.; BUCKLEY, D. J.. Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. *Journal Food Chemistry*, v. 76, p. 45-51, 2002.

TURUMTAY, Emine Akyu et al. Correlation between phenolic compounds and antioxidant activity of Anzer tea (*Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*). *Journal Indurstrail Crops and Products*, v. 52, p. 687-694, jan. 2014.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Journal Food Chemistry*, Barking, v.111, p.816-823, 2008.

VIKSVEEN, Petter. Antibiotics and the development of resistant microorganisms. Can homeopathy be an alternative? *Journal of Homeopathy*, ed. 2, v. 92, p. 99-107, abr. 2003.

ZENG, Wei-Cai et al. Characterization of antioxidant polysaccharides from *Auricularia auricular* using microwave-assisted extraction. *Journal Carbohydrate Polymers*, China, v. 89, p. 694–700, jun. 2012.

ZHANG, Xiao et al. Synthesis and characteristics of chitin and chitosan with the (2-hydroxy-3 trimethylammonium) propyl functionality, and evaluation of their antioxidant activity in vitro. *Journal Carbohydrate Polymers*, China, jun. 2012.

ZIELINSKI, Acácio Antonio Ferreira et al. A comparative study of the phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. *Journal of Food Research International*, v. 60, p. 246-254, jun. 2014.

WIEGAND et al. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, v. 3, p. 163-175, jan. 2008.