

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ REITORIA DE GRADUAÇÃO E ASSUNTOS ESTUDANTIS
CURSO DE FARMÁCIA

Andressa Manente Ferreira
Gabriel Pereira Machado

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DO
COGUMELO SHIITAKE EM DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÕES**

Sorocaba / SP

2022

Andressa Manente Ferreira

Gabriel Pereira Machado

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DO
COGUMELO SHIITAKE EM DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÕES

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como exigência parcial
para obtenção do diploma de graduação
em Farmácia na Universidade de
Sorocaba.

Orientadora Prof. Dra. Denise Grotto.

Sorocaba / SP

2022

RESUMO

Introdução: Os cogumelos pertencem ao Reino Fungi e estima-se que possam existir mais de 140.000 cogumelos diferentes. Entre as características encontradas no cogumelo *Lentinula edodes* (popularmente conhecido como Shiitake) encontram-se propriedades antitumorais, antivirais e potencial antimicrobiano e antioxidante. **Objetivos:** Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de diferentes extratos do cogumelo Shiitake. **Métodos:** A obtenção dos extratos do cogumelo foi realizada utilizando água destilada fria e fervente e mistura hidroalcolica a 40% como solventes. Todos os extratos foram obtidos na concentração de 5%. Para avaliação do potencial antimicrobiano, o teste de disco-difusão foi realizado. Testes de avaliação da capacidade antioxidante foram realizados através do DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e da determinação de compostos fenólicos, além de um teste ilustrativo, utilizando a maçã. **Resultados:** No teste microbiológico, os extratos não demonstraram atividade antimicrobiana. Todos os extratos se mostraram antioxidantes; o extrato aquoso frio se mostrou com maior capacidade antioxidante e com maior quantidade de compostos fenólicos, enquanto o extrato hidroalcolico teve sua capacidade antioxidante aumentada conforme o tempo, e sua quantidade de compostos fenólicos foi semelhante ao do aquoso quente. No teste ilustrativo, os extratos não foram capazes de impedir maior escurecimento da maçã. **Conclusão:** Nenhum dos extratos foi capaz de inibir o crescimento das cepas selecionadas, por outro lado, todos os extratos se mostraram bons antioxidantes, em destaque o extrato aquoso a frio, que teve maior capacidade antioxidante, e maior concentração de ácido gálico.

Palavras-chave: antimicrobiano; antioxidante; extratos; shiitake.

SUMÁRIO

1	Introdução	5
2	Objetivos	7
2.1	Objetivos gerais	7
2.2	Objetivos específicos	7
3	Metodologia.....	7
3.1	Obtenção dos extratos	7
3.2	Teste de disco-difusão	8
3.3	Avaliação da capacidade antioxidante através do DPPH	8
3.4	Determinação de compostos fenólicos.....	9
3.5	Teste ilustrativo da capacidade antioxidante	10
4	Resultados e discussão	10
4.1	Obtenção dos extratos	10
4.2	Teste de disco-difusão	11
4.3	Avaliação da capacidade antioxidante através do DPPH	13
4.4	Determinação de compostos fenólicos.....	16
4.5	Teste ilustrativo da capacidade antioxidante	17
5	Conclusão	18
6	Referências	19

1 Introdução

Os cogumelos pertencem ao Reino Fungi e estima-se que possam existir mais de 140.000 de cogumelos diferentes. A diversidade de espécies de fungos e, conseqüentemente, de seus metabólitos, pode oferecer potenciais novos antibióticos e antimicrobianos no geral. Os cogumelos possuem inúmeros bioativos que exibem diversas propriedades, entre elas está a propriedade antimicrobiana e antioxidante (REIS *et al.*, 2012; REN *et al.*, 2014).

Dentre os diversos cogumelos, está o *Lentinula edodes*, um cogumelo comestível, popularmente conhecido como Shiitake. Trata-se de uma iguaria culinária que tem sido tradicionalmente usada como medicamento na Ásia há mais de 2000 anos. Ele é o segundo cogumelo comestível mais cultivado no mundo, responsável por cerca de 25% da produção mundial (RAO *et al.*, 2009).

O *Lentinula edodes* é altamente nutritivo, com baixas calorias e quantidades elevadas de vitaminas, proteínas, fibras e minerais. Além disso, contém alguns elementos essenciais para a nutrição humana, como cálcio, cobre, fósforo, manganês, magnésio e zinco (MOLZ *et al.*, 2014; RAO *et al.*, 2009).

Entre as características farmacológicas atribuídas aos cogumelos Shiitake, destacam-se as propriedades antitumorais e antivirais (HEARST *et al.*, 2009). Além disso, diversos estudos apontam atividade antimicrobiana relacionada ao *Lentinula edodes* (AIDA *et al.*, 2009; ALVES *et al.*, 2012; SHANG *et al.*, 2013).

A atividade antimicrobiana dos cogumelos se dá pela presença de vários metabólitos bioativos secundários, compostos voláteis, alguns fenóis, ácidos gálico, ácidos graxos livres e seus derivados. A sensibilidade de algumas bactérias frente aos extratos do cogumelo pode ser atribuída pela estrutura hidrofílica que elas possuem em seu espaço periplasmático (espaço entre a membrana plasmática e a membrana externa das bactérias gram-negativas), o que faz com que a parede celular seja mais permeável e conseqüentemente, essas bactérias ficam mais vulneráveis à ação dos compostos produzidos pelos cogumelos (GYAWALI *et al.*, 2014).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a resistência aos antibióticos ocorre de forma natural ao longo do tempo, em geral por

transformações genéticas. Contudo, o que preocupa as organizações de saúde são as bactérias que adquirem resistência a antibióticos que antes eram suscetíveis; pressão seletiva exercida pelas condições do meio, que favorece a emergência e disseminação de microrganismos resistentes, proliferação e disseminação de clones multirresistentes, resistentes a todos os antibióticos, de todas as classes e todos os espectros de ação, as quais podem ocorrer no nível global (SILVA, 2021).

Quanto sua atividade antioxidante, os cogumelos possuem elevado conteúdo de substâncias que são capazes de diminuir os efeitos prejudiciais dos radicais livres. Dentre os antioxidantes presentes nos cogumelos estão os compostos fenólicos, substâncias de elevada polaridade que podem ser extraídas dos cogumelos por meio de solventes como água (ALVAREZ-PARRILLA *et al.*, 2007).

A busca por compostos bioativos de origem natural com alta capacidade antioxidante aumentou consideravelmente nas duas últimas décadas. Porém, encontrar métodos extrativos eficientes a partir de fontes naturais, é o grande desafio para os pesquisadores (GIL-CHÁVEZ *et al.*, 2013).

Os métodos extrativos mais utilizados para obtenção de extratos vegetais incluem maceração, infusão, extração contínua quente, fluido supercrítico, entre outros. Além do método extrativo, diversos fatores podem influenciar a extração, como por exemplo o solvente utilizado (TIWARI *et al.*, 2011). O solvente utilizado e a polaridade podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, que é um dos principais aspectos para a extração de polifenóis e conseqüentemente na capacidade antioxidante (ROCKENBACH *et al.*, 2008).

A avaliação dos potenciais antimicrobiano e antioxidante são focos do presente estudo. Quanto à atividade antimicrobiana, acredita-se que os cogumelos precisam produzir compostos antimicrobianos para sobreviver no seu ambiente natural; portanto, esses tipos de substâncias estão presentes nos cogumelos (LINDEQUIST *et al.*, 2005). Além disso, os fungos produzem polissacarídeos, fenólicos, e outros metabólitos que podem se tornar potenciais novos antioxidantes naturais (REN *et al.*, 2014).

2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de três diferentes extratos do cogumelo Shiitake.

2.2 Objetivos específicos

- Obter 3 diferentes extratos do cogumelo Shiitake (extrato aquoso frio, aquoso quente e hidroalcolico);
- Avaliar a capacidade antimicrobiana, realizando o teste de disco-difusão;
- Avaliar a capacidade antioxidante por meio do teste de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e determinação de compostos fenólicos;
- Ilustrar a capacidade antioxidante com o teste da maçã.

3 Metodologia

3.1 Obtenção dos extratos

O cogumelo *L. edodes* foi fornecido pela empresa comercial Yuki Mushrooms (São Paulo, Brasil), para o estudo de Camargo *et al.* (2020). Os cogumelos foram picados e armazenados a – 80 °C por aproximadamente 24 h. O material congelado foi liofilizado por aproximadamente 48 h, até obter 10% de massa seca. O material foi então moído em moinho de facas (Marconi® MA340 Série 0004201), depois peneirado para obtenção de partículas homogêneas. O pó do cogumelo foi acondicionado em recipientes hermeticamente fechados e mantido em dessecador até o uso.

A obtenção dos extratos do cogumelo foi realizada utilizando água destilada (fria e fervente) e mistura hidroalcolica a 40%. Para obtenção dos extratos aquoso e hidroalcolico, a proporção utilizada sempre foi de 5 g do pó do cogumelo para 100 mL de solvente. A extração em água fria, na temperatura ambiente, e em solvente hidroalcolico foi realizada em homogeneizador shaker. Os frascos Erlenmeyer contendo o pó e o respectivo extrator foram mantidas por

3 horas em shaker, em uma extração lenta, a 120 rpm, sob abrigo de luz e à temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Em seguida, os extratos foram centrifugados a 3.000 rpm por 5 minutos, e os sobrenadantes foram filtrados a vácuo.

Para obtenção do extrato aquoso por água fervente, a proporção utilizada também foi de 5 g de pó para 100 mL de água fervente. Porém, para esse método de extração, a água a 100°C foi adicionada ao pó, e a mistura mantida sob descanso por 15 min. Em seguida, foi realizada a filtração a vácuo.

3.2 Teste de disco-difusão

Os microrganismos de coleção do laboratório LAMINFE, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9721 (gram-negativos) e *Staphylococcus aureus* ATCC 10390 (gram-positivos) foram utilizados na concentração de 10^6 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia), seguindo os padrões estabelecidos pela farmacopeia. Para o crescimento das cepas, foi utilizado o Tryptone Soya Broth – TSB soft, meio de cultura que apresenta menor quantidade de ágar, permitindo que os microrganismos cresçam imersos no meio de cultura e não só na superfície.

Após a homogeneização dos microrganismos com o meio de cultura, as soluções foram transferidas para placas de petri. Uma quantia de 50 microlitros de extrato foi adicionada em cada poço, para assim avaliar a capacidade antimicrobiana de cada extrato. As placas passaram 24 horas na geladeira para que o extrato pudesse difundir no ágar e em seguida as placas foram levadas à estufa, a 37 °C, por mais 24 horas, para que as cepas pudessem crescer (ATAIDE *et al.*, 2017; DOS SANTOS *et al.*, 2018).

3.3 Avaliação da capacidade antioxidante através do DPPH

O método do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) é um dos métodos mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante de diversos materiais *in natura*, liofilizado ou seco. Este método é baseado em uma medida do consumo do radical DPPH por um composto antioxidante. O modo mais utilizado para avaliar essa capacidade antioxidante de consumir o radical DPPH é na

forma de medição espectrofotométrica, pela diminuição da absorbância do radical DPPH após o início da reação (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

Para realizar o teste, foi utilizada uma solução de DPPH na concentração de 0,1 mM, em etanol 70%. Inicialmente, o espectrofotômetro foi zerado com 2 mL de etanol 70% (branco). Após, a leitura do controle foi realizada numa solução com 0,5 mL etanol 70% + 1,5 mL solução de DPPH (0,1 mM). Já o teste foi realizado com uma solução de 0,5 mL de cada extrato + 1,5 mL da solução de DPPH (0,1 mM), logo após a homogeneização a leitura foi realizada no que chamamos aqui de tempo zero. Os tubos com as amostras ficaram mantidos ao abrigo da luz e ao final de 15, 30, 45 e 60 min, a absorbância foi medida novamente. Todos os extratos foram testados em triplicata. O comprimento de onda utilizado para leitura foi 515 nm.

A capacidade da amostra em sequestrar o radical (DPPH) foi expressa como percentual (%) de inibição e calculada de acordo com a seguinte equação matemática:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{Abs}^1 - \text{Abs}^2}{\text{Abs}^1} \times 100$$

Em que: Abs¹ = absorbância do controle

Abs² = absorbância dos extratos

3.4 Determinação de compostos fenólicos

Para a determinação dos compostos fenólicos, o método de Folin-Ciocalteu foi utilizado (SCALBERT *et al.*, 1989). Foram utilizados 4 mL dos extratos de Shiitake, em triplicata, transferidos para balões volumétricos (100 mL) com metanol à 80%. Os balões foram agitados a cada dez minutos, por uma hora, para a extração dos fenóis. As soluções foram filtradas em papel filtro e centrifugadas a 3000 rpm, por 30 minutos, para obtenção do sobrenadante.

Para a quantificação dos compostos fenólicos, 2 mL do sobrenadante foram transferidos para um balão de 25 mL, e 1 mL de reagente Folin-Ciocalteu

foi adicionado. O volume foi completado com carbonato de sódio 20 % (preparado na véspera), nessa ordem, e permaneceram em repouso por 30 min, até a leitura em espectrofotômetro, em 760 nm. O espectrofotômetro foi zerado (branco) com carbonato de sódio.

O valor de compostos fenólicos foi calculado por meio do ajuste da curva de calibração nas concentrações: 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 e 4 µg/mL. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG)/mL de amostra. Todos os extratos foram testados em triplicata.

3.5 Teste ilustrativo da capacidade antioxidante

Para ilustrar a atividade antioxidante do extrato do cogumelo Shiitake, a fruta escolhida foi a maçã. Sabe-se que, quando cortada, a maçã entra em contato com o oxigênio presente no ar e começa um processo de “autodefesa” por meio de enzimas, conhecidas como polifenol oxidase. Esse processo resulta em novos produtos químicos como a quinona, que produz os pigmentos escuros (SILVEIRA, 2018).

Para o teste, as maçãs foram partidas ao meio, e em uma das partes foi aplicada e espalhada uma quantidade do extrato do cogumelo Shiitake, e outra parte foi mantida *in natura*. Esse processo foi realizado com os três extratos do cogumelo e após isso, a maçã ficou exposta por uma hora. A leitura foi feita de forma visual.

4 Resultados e discussão

4.1 Obtenção dos extratos

Os extratos foram obtidos conforme a metodologia descrita, na concentração de 5%. Inicialmente, a ideia era trabalhar com uma concentração maior; entretanto, essa concentração foi utilizada pois o cogumelo se apresenta como um pó denso e a diluição em água foi dificultada, sendo necessário uma quantidade pequena do pó para um grande volume de água. Além disso, como

todos os extratos foram filtrados a vácuo, o rendimento final foi de 50 mL de amostra para todos os métodos de extrações.

4.2 Teste de disco-difusão

Os resultados da atividade antimicrobiana estão apresentados nas Figuras 1, 2 e 3. Nenhum dos extratos foi capaz de inibir o crescimento dos microrganismos utilizados no teste de cultivo por imersão, não ocorrendo formação de halo de inibição.

Figura 1 – Atividade antimicrobiana com a bactéria *Staphylococcus aureus*; A: Extrato aquoso quente; B: Extrato aquoso frio; C: Extrato hidroalcolólico a 40%.

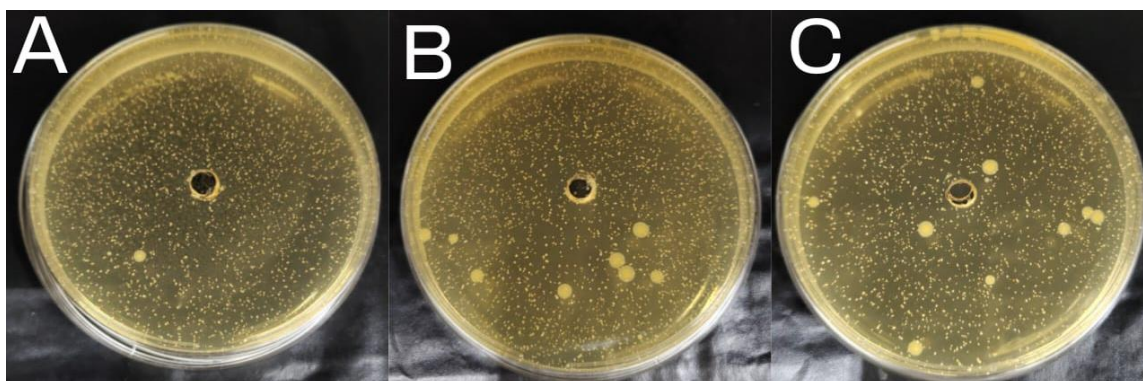


Figura 2 – Atividade antimicrobiana com a bactéria *Escherichia coli*; A: Extrato aquoso quente; B: Extrato aquoso frio; C: Extrato hidroalcolólico a 40%.

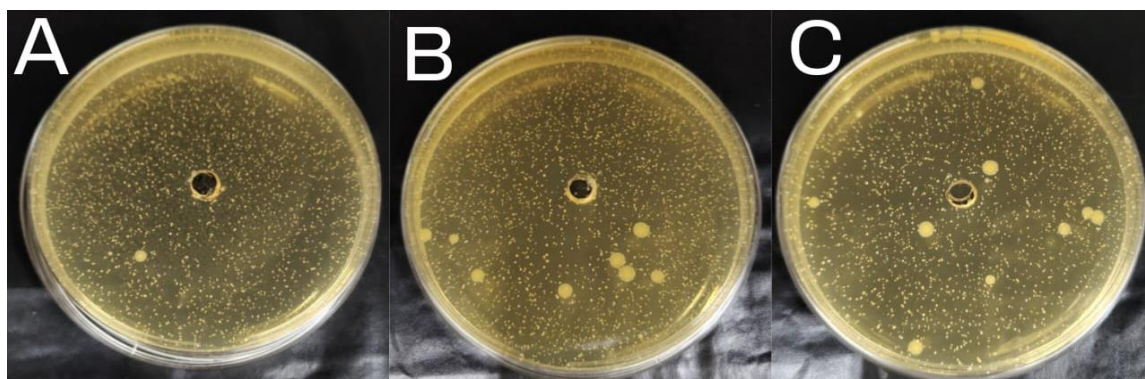
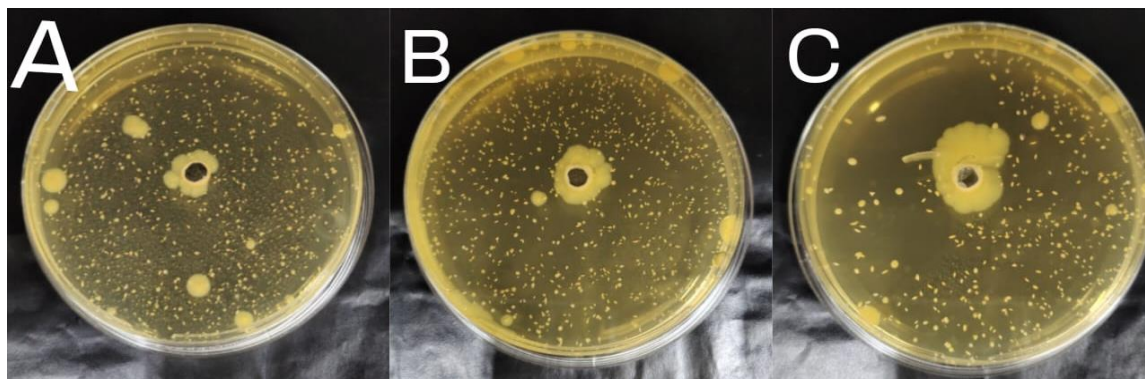


Figura 3 – Atividade antimicrobiana com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*; A: Extrato aquoso quente; B: Extrato aquoso frio; C: Extrato hidroalcolólico a 40%.



Segundo Oliveira *et al.* (2016), é possível que a maior resistência das bactérias Gram-negativas aos agentes antimicrobianos esteja relacionada à sua sofisticada parede celular, que apresenta maior barreira à permeabilidade de agentes externos quando comparada a das bactérias Gram-positivas. A parede celular de espécies Gram-negativas apresenta uma camada de lipopolissacarídeo externa adicional que restringe a penetração da maioria das moléculas, enquanto são permeáveis aos nutrientes. Esta eficiente barreira de permeabilidade tem sido responsabilizada pela dificuldade de a indústria farmacêutica produzir novas classes de compostos de amplo espectro, igualmente ativos contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. O efeito inibitório dos compostos fenólicos pode ser explicado pela sua interação com as proteínas da parede bacteriana por meio da ligação de hidrogênio, o que pode resultar em alterações na sua permeabilidade, causando destruição celular ou coagulação do seu conteúdo (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

O ácido gálico pode ser um dos potenciais agentes antibacterianos encontrados no *L. edodes*. O ácido gálico isolado produz alterações irreversíveis nas propriedades da membrana celular bacteriana, como mudança de hidrofobicidade, diminuição da carga negativa superficial e ocorrência de ruptura ou formação de poros nas membranas celulares com consequente vazamento de constituintes intracelulares essenciais (BORGES *et al.*, 2013).

Como observou-se nas figuras 1, 2 e 3, nenhum dos extratos mostrou inibição no crescimento dos microrganismos. Isso pode ter se dado pelo fato de que os extratos estão em uma concentração muito baixa, o que fez com que os

compostos dos extratos tivessem dificuldade em atravessar a parede bacteriana, pois tanto as cepas gram-positivas e gram-negativas tiveram um crescimento semelhante, com formação de colônias, com bactérias diluídas até 5×10^6 UFC. Nota-se na figura que houve também a presença de colônia maiores e diferentes o que pode indicar uma contaminação no teste, já que pouco tempo depois houve uma contaminação geral no laboratório em que o teste foi realizado.

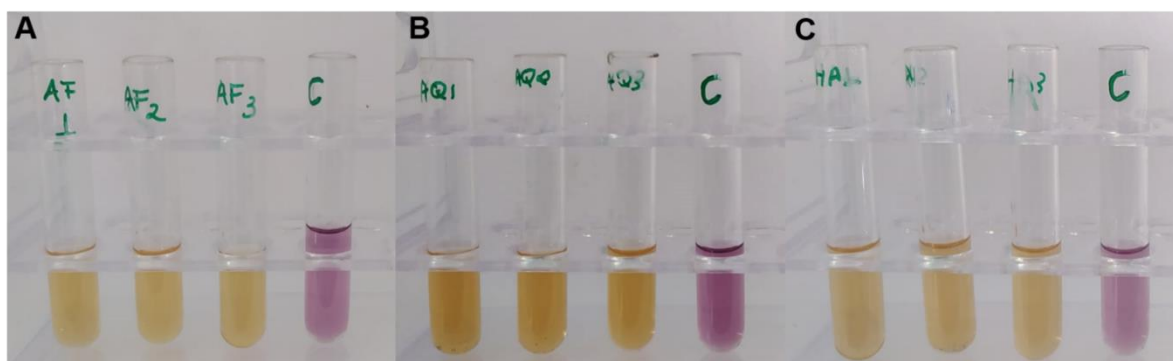
Semelhante aos nossos resultados, Kitzberger (2005) realizou o teste de cultivo por imersão com o extrato do Shiitake em concentrações análogas, e também não encontrou atividade antimicrobiana significativa. O autor avaliou a inibição das cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Scaldelai *et al.* (2019), por outro lado, encontraram ação antimicrobiana frente à *Escherichia coli*, mas somente com o extrato alcóolico do cogumelo Shiitake, com concentração de 10 g do pó do cogumelo em contato com 90 mL de álcool de cereais, por 5 dias, ou seja, uma concentração duas vezes maior que aquela usada nesse estudo, e por um tempo de contato muito superior.

4.3 Avaliação da capacidade antioxidante através do DPPH

A capacidade antioxidante se dá pela diminuição da absorbância do radical DPPH, que, de roxo, passa para amarelo. O método da atividade antioxidante pela captação do radical DPPH tem sido amplamente utilizado para se determinar a atividade antioxidante de alimentos (LEE *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2009; TSAI *et al.*, 2009).

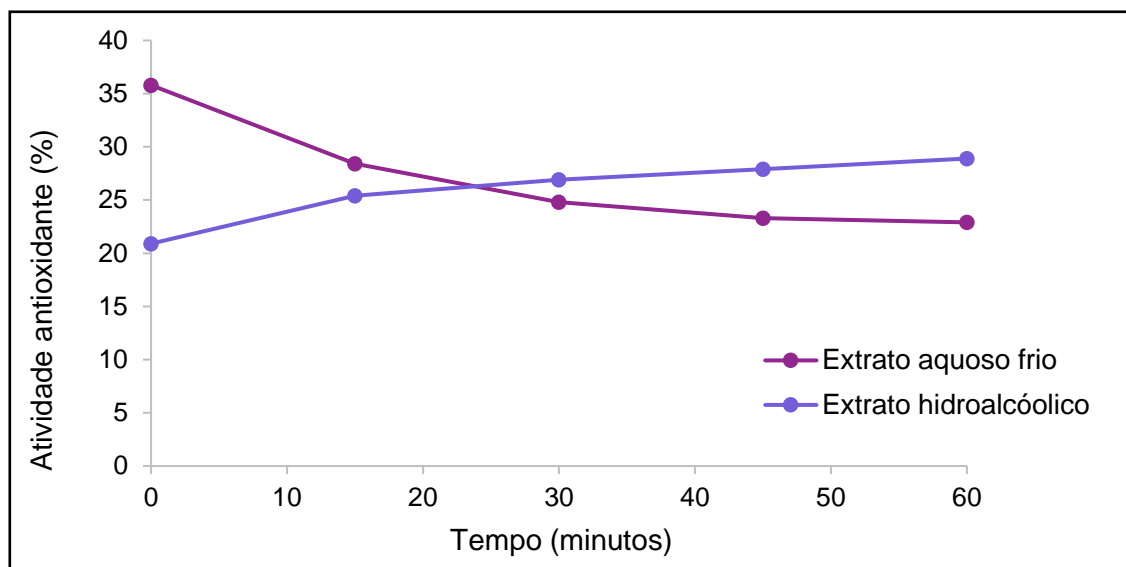
Após os extratos serem adicionados na solução de DPPH, houve mudança significativa na coloração, passando de roxo para amarelo, conforme metodologia. Assim, os extratos em todos os métodos de extrações demonstraram capacidade antioxidante (Figura 4).

Figura 4 – Representação das triplicatas do teste DPPH e seus respectivos controles (C), sendo em A) Extrato aquoso frio; em B) Extrato aquoso quente; em C) Extrato hidroalcolico a 40%.



A mudança de coloração ocorre por conta da localização do elétron livre ao longo da molécula de DPPH. O radical DPPH possui a cor violeta com uma absorção em solução de metanol, e uma substância antioxidante pode doar um átomo de hidrogênio para a molécula de DPPH, que a aceita para se tornar uma molécula estável. Assim, a forma reduzida DPPH-H se origina, com a perda da cor violeta, de acordo com o tempo, para o amarelo (KEDARE *et al.*, 2011).

Após a leitura das amostras pelo espectrofotômetro, os extratos se mostraram antioxidantes de maneiras diferentes de acordo com o tempo. O extrato aquoso frio mostrou maior atividade antioxidante no primeiro tempo (tempo 0) e ao longo do tempo sua atividade antioxidante diminuiu, indo de 35,8% para 22,9%. Já o extrato hidroalcolico teve sua capacidade antioxidante aumentada conforme o passar do tempo, indo de 20,9% para 28,9% após os 60 minutos (Figura 5).

Figura 5 – Capacidade antioxidante dos extratos aquoso frio e hidroalcolico.

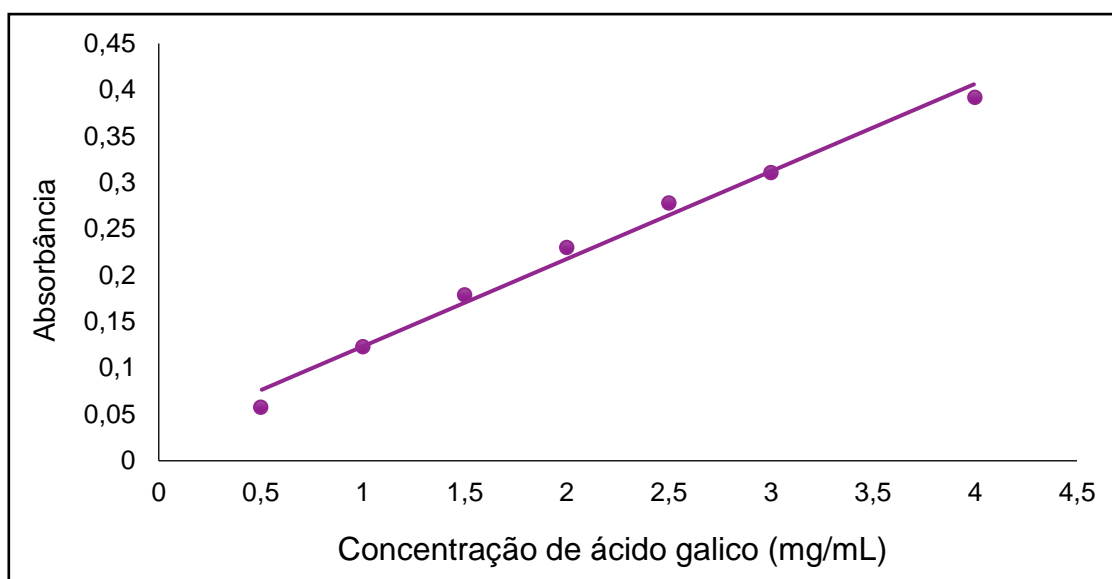
Quanto ao extrato aquoso quente, não foi possível realizar a leitura pelo espectrofotômetro, pois a absorvância da amostra se mostrou maior que a absorvância do controle. Como o extrato se mostrou capaz de alterar a cor quando adicionado ao DPPH, acredita-se que no processo de extração a quente, alguma substância diferente que nos outros métodos (a frio e hidroalcolico) pode ter sido extraída, e essa substância reagiu com o solvente (metanol), dificultando a leitura pelo equipamento. Sugere-se que algum tipo de proteína tenha sido extraído, pois sabe-se o metanol tem o poder de degradá-las, fazendo com que o meio fique turvo. Desta forma, a atividade antioxidante do extrato a quente, pelo método do DPPH, só pode ser mostrada de forma qualitativa (Figura 4; B).

O resultado obtido no método se assemelha ao de Silva (2010), em que o extrato aquoso na proporção de 8 g de cogumelo para 80 mL de solvente também teve sua capacidade antioxidante diminuída conforme o tempo. Tal fato pode ser justificado pelo solvente aquoso arrastar, juntamente com as substâncias antioxidantes, outros compostos de ação pró-oxidante. Bach *et al.* (2018) encontraram atividade antioxidante de 11% para o extrato etanólico do cogumelo Shiitake na concentração de 1 g de pó para 70 mL de solvente.

4.4 Determinação de compostos fenólicos

Antes de iniciar a determinação dos compostos fenólicos com as diferentes amostras de extratos, foi construída a curva padrão, que corresponde à relação entre a absorbância e a concentração, permitindo verificar a linearidade da reação e calcular de conversão de valores de absorbância em concentração (Figura 6).

Figura 6 – Curva padrão para determinação de compostos fenólicos.



Com o ajuste linear dos dados de absorbância e concentração de ácido gálico obteve-se a equação da reta $y = 0,0944x + 0,0279$ e um valor de R^2 igual a 0,9881.

Na literatura, muitos trabalhos são encontrados, reportando propriedades antioxidantes dos cogumelos, as quais são atribuídas aos compostos fenólicos (PUTTARAJU *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2008; CHYE *et al.*, 2008; YALTIRAK *et al.*, 2009). Para Sousa (2008) os compostos fenólicos são compostos bioativos que estão relacionados no processo de defesa contra danos oxidativos, devido a sua capacidade antioxidante.

Segundo Nedelkoska *et al.* (2013), os compostos fenólicos são exemplos de metabólitos secundários que, além de contribuírem para a sobrevivência dos cogumelos, podem ser benéficos para os seres humanos. Ahmad *et al.* (2012)

descreve que essas propriedades se devem às reações redox, que os permitem atuar como doadores de átomos de hidrogênio ou como agentes redutores.

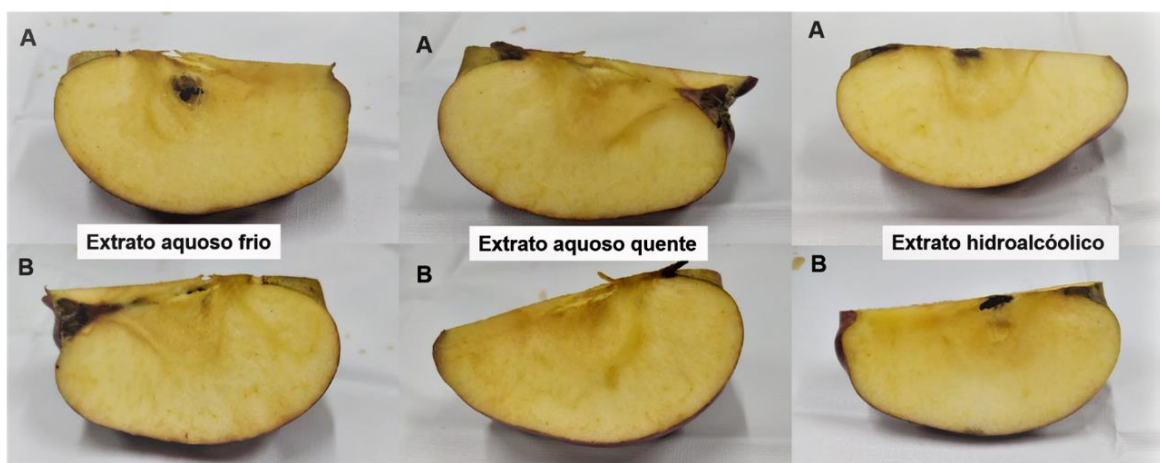
Avaliando os três diferentes tipos de extratos quanto aos compostos fenólicos, observou-se que o extrato aquoso a frio se destacou, com 0,075 mg EAG/mL de amostra (miligramas equivalentes a ácido gálico por mL de amostra), sendo seguido pelo extrato hidroalcolólico a 40%, com 0,018 mg EAG/mL de amostra, e o extrato aquoso a quente, com 0,017 mg EAG/mL de amostra.

Os resultados encontrados corroboram com os de Cheung *et al.* (2003) e Elmastas *et al.* (2007) que, ao analisarem extratos de várias espécies de cogumelos, encontraram correlação direta entre atividade antioxidante e o conteúdo de compostos fenólicos totais. Por outro lado, Tsai *et al.* (2007) utilizaram extração com solvente alcoólico, e este produziu maior poder antioxidante. A diferença entre os resultados sugere que não exista um único método universal para a extração de todos os compostos antioxidantes naturais.

4.5 Teste ilustrativo da capacidade antioxidante

No teste ilustrativo da capacidade antioxidante, os extratos, apesar de impedir maior escurecimento das maçãs, não mostraram tanta diferença em comparação a metade em que não foram acrescentados, como demonstrado na figura 7.

Figura 7 – Ilustração da capacidade antioxidante dos extratos; A: com extrato; B: sem extrato.



Após o teste, o pH dos extratos foram verificados e ambos estavam com pH em torno de 6. Isso pode explicar o fato de que nenhum dos extratos conseguiu alterar, significativamente, o escurecimento das maçãs, já que compostos ácidos são os que conseguem neutralizar a oxidação.

Os ácidos que são geralmente utilizados nos alimentos, para inibir o escurecimento, são o cítrico, fosfórico, málico, ascórbico, de ocorrência natural (REIS, 2007). No estudo de Reis, as maçãs que apontaram melhor resultado no que diz respeito à inativação enzimática e apresentaram menor escurecimento foram as mergulhadas no suco de limão do tipo taiti, que apresentou pH 2,18. Sendo assim, o resultado obtido não demonstra que os extratos do cogumelo Shiitake não são antioxidantes, mas que o pH dos mesmos não foi ácido o suficiente para poder impedir a oxidação da maçã de forma visual.

5 Conclusão

Quanto à atividade antimicrobiana, nenhum dos extratos foi capaz de inibir o crescimento das cepas selecionadas, não sendo possível observar halo de inibição. Por outro lado, todos os extratos se mostraram bons antioxidantes, em destaque o extrato aquoso a frio, que por meio do método do radical de eliminação DPPH teve maior capacidade antioxidante, e por meio da determinação de compostos fenólicos teve a maior concentração de ácido gálico.

Em pesquisas futuras, pretende-se aumentar a concentração dos extratos e o tempo de contato entre pó e solvente, e avaliar novamente o potencial antimicrobiano. Tal ato demonstraria se a inibição do crescimento dos microrganismos depende da concentração da amostra ou não. Além disso, poderia ser realizada a liofilização dos extratos, visando aumentar sua concentração mantendo suas propriedades funcionais. Seria interessante também realizar um extrato liofilizado utilizando outro solvente, como o etanol e avaliar novamente o potencial antimicrobiano e antioxidante.

6 Referências

AHMAD, N. *et al.* Antioxidant activity via DPPH, gram-positive and gram-negative antimicrobial potential in edible mushrooms. **Toxicology and Industrial Health**, v. 9, p. 826-834, 2012.

AIDA, F. *et al.* Mushrooms as a potential source of prebiotics: a review. **Trends in food science e technology**, v. 20, p. 567-575, 2009.

ALVAREZ-PARRILLA, E. *et al.* Total phenols and antioxidant activity of commercial and wild mushrooms from Chihuahua. **Ciencia y tecnología alimentaria**, v. 5, p. 329-334, 2007.

ALVES, J. *et al.* A review on Antimicrobial Activity of Mushroom (Basidiomycetes) Extracts and Isolated Compounds. **Planta Médica**, v. 78, p. 1707-1718, 2012.

ATAIDE, J. *et al.* Bacterial Nanocellulose Loaded with Bromelain: Assessment of Antimicrobial, Antioxidant and Physical-Chemical Properties. **Scientific Reports**, v. 7, p. 2-10, 2017.

BACH, F. *et al.* Atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato de *Lentinula edodes*. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)**, v. 7, p. 1-8, 2018.

BORGES, A. *et al.* Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, p. 256-265, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W. *et al.* Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CAMARGO, I. *et al.* Shiitake Culinary–Medicinal Mushroom, *Lentinus edodes* (Agaricomycetes): Absence of Changes in Maternal Reproductive Performance and Embryofetal Development In Vivo. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 8, p. 781-791, 2020.

CHEUNG, L. *et al.* Antioxidant activity and total phenolics of edible mushrooms extracts. **Food chemistry journal**, v. 2, p. 249-255, 2003.

CHYE, F., WONG, J., LEE, J.-S. Nutritional Quality and Antioxidant Activity of Selected Edible Wild Mushrooms. **Food Science Technology Institute**, v. 14, n. 4, p. 375-384, 2008.

ELMASTAS, M. *et al.* Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of food composition analysis**, v. 3, p. 337-345, 2007.

GIL-CHÁVEZ, G. *et al.* Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. **Reviews In Food Science and Food Safety**, v.12, p.5–23, 2013.

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

HEARST, R. *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, 2009.

KEDARE, S.; SINGH, R. Genesis and development of DPPH method of antioxidante assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 412-422, 2011.

KIM, M-Y. *et al.* Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7265- 7270, 2008.

KITZBERGER, C. **Obtenção de Extrato de Cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) com CO₂ a Alta Pressão**. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

LEE, I. *et al.* Lack of carcinogenicity of lyophilized *Agaricus blazei* Murill in a F344 rat two year bioassay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 87-95, 2008.

LINDEQUIST, U. *et al.* The pharmacological potential of mushrooms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 285-299, 2005.

MAZZOLA, P. *et al.* Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 241–248, 2009.

MOLZ, P. *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**, v. 318, p. 194-197, 2014.

NEDELKOSKA, D. *et al.* Screening of antibacterial activities of selected macedonian wild mushrooms. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 124, p. 333-340, 2013.

OLIVEIRA, D. *et al.* Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 111, p. 55-62, 2016.

PUTTARAJU, N. *et al.* Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9764- 9772, 2006.

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

REIS, F. **Efeito dos processos de branqueamento e acidificação sobre a cor e a absorção de gorduras de batatas-palha**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal do Paraná, 2007.

REIS, F. *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, 2012.

REN, L. *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.

ROCKENBACH, I. *et al.* Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p. 238-244, 2008.

SANTOS, C. *et al.* Bacterial nanocellulose membranes combined with nisin: a strategy to prevent microbial growth. **Cellulose**, v. 25, p. 6681-6689, 2018.

SCALBERT, A. *et al.* Tannins in wood: Comparison of different estimation methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 1324-1329, 1989.

SCALDELAI, M. *et al.* Ação de cogumelos in natura sobre o desenvolvimento bacteriano. **Revista Interciência**, v.1, p. 17-24, 2019.

SHANG, X. *et al.* In Vitro Anti-Helicobacter pylori Effects of Medicinal Mushroom Extracts, with Special Emphasis on the Lion's Mane Mushroom, *Hericium erinaceus* (Higher Basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 15, p.165-174, 2013.

SILVA, A. Atividade antioxidante dos extratos de Shiitake (*Lentinus edodes*) e de Cogumelo do sol (*Agaricus blazei*) Aplicados em óleo de soja sob aquecimento. **Repositório UNESP**, 2010.

SILVA, A.; JORGE, N. Influence of *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei* extracts on the prevention of oxidation and retention of tocopherols in soybean oil in an accelerated storage test. **Journal Food Science Technology**, v. 16, p. 386–389, 2012.

SILVA, C. **Avaliação de um programa de controle de antimicrobianos em um hospital universitário**. Dissertação de Mestrado em Ciências Pneumológicas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2021.

SILVEIRA, L. Por que as maçãs escurecem depois de cortadas? **Jornal momento químico**, v. 20, p. 1-7, 2018.

SOARES, A. *et al.* Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 775-781, 2009.

SOUSA, J. **Atividade Biológica de derivados do Ácido Cafeico: Efeito antioxidante e anti-inflamatório**. Dissertação (Mestrado), Universidade do Porto, 2008.

TIWARI, P. *et al.* Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v.1, n.1, p.98-106, 2011.

TSAI, S. *et al.* Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. **Lebensmittel-Wissenschaft e Technologie**, v. 8, p. 1392-1402, 2007.

TSAI, S. *et al.* Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 578-584, 2009.

YALTIRAK, T. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2052-2056, 2009.