

Subárea do item 7 das Normas de resumo: 2.12.99 - Microbiologia.

POTENCIAL ANTIBIÓTICO DE EXTRATOS DE COGUMELOS COMESTÍVEIS E PÃES FORMULADOS COM COGUMELOS.

Anderson C. Vieira^{1*}, Arlyane P. Lira², Silmara Almeida de Carvalho³

1. Estudante de IC do Curso de Biologia Bacharelado da UESB
2. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, pela UESB.
3. UESB- ITAPETINGA - Departamento de Ciências Exatas e Naturais / Orientadora.

Resumo:

Cogumelos como shiitake e *eryngi* são conhecidos por serem iguarias funcionais e nutracêuticas. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial antibiótico dos extratos brutos hexânicos destes dois cogumelos comestíveis e de suas formulações de pães com presença de 20% de suas farinhas dos cogumelos. Para isso foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos frente a seis bactérias patogênicas. Os resultados revelaram atividade dos extratos dos cogumelos e das formulações de pães frente a todas as bactérias testadas com menor CIM de 0,15 mg/mL do extrato de shiitake e 1,25 mg/mL do extrato de pão com 20% de shiitake frente a inibição da *E. cloacae*. Este resultado demonstra que a atividade observada no cogumelo comestível shiitake foi mantida na formulação de pão com 20% de cogumelo shiitake na forma de farinha, podendo-se concluir que a aplicação de cogumelo comestível em formulação alimentícia com objetivo de ampliar potencial biológico se faz possível.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana; *Lentinula edodes*; *Pleurotus Eryngi*.

Apoio financeiro: UESB, PIBITI- CNPq.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UESB.

Introdução:

O desenvolvimento de novos produtos alimentícios com objetivo de

aumentar o valor nutricional e/ou agregar ingredientes que trazem benefícios para a saúde tem sido a nova tendência das indústrias de alimentos. Um dos fatores que explicam esta circunstância é a preocupação crescente da população com a nutrição e saúde, bem como as sucessivas descobertas científicas sobre as características de alguns alimentos pouco consumidos no Brasil como quinoa, amaranto, farinha de banana verde, entre outros, mas com apelo de alto valor nutricional e ou funcional.

Dentro deste contexto inserem-se os cogumelos comestíveis. Muito consumidos na Europa e em países orientais como China e Japão, tem sua importância crescendo nos últimos anos. Atualmente, muitos pesquisadores consideram os cogumelos como alimentos funcionais e nutracêuticos, devido ao seu excelente valor nutricional e a presença de metabólitos que podem desempenhar diversas funções biológicas, uma dessas funções é a atividade antibiótica contra alguns grupos de bactérias (FURLANI e GODOY, 2005; SOUZA, 2014; MORAES e COLLA, 2006; PEREIRA, 2014; RAUD, 2008).

Dentre as pesquisas desenvolvidas com cogumelos existentes, em sua grande maioria são realizadas em países como Coréia, China e Japão, onde o cogumelo é um alimento de grande consumo e acesso pela maioria da população. No Brasil, faltam dados provenientes do desenvolvimento de pesquisas que possam caracterizar o perfil dos cogumelos cultivados no país, já que vários estudos evidenciam que diversos fatores locais exercem influência direta na composição de espécies (MATTILA *et. al.*,

2000; SALES-CAMPOS *et. al.*, 2008; PAULI, 2010).

O interesse da indústria por alimentos que desempenham atividades biológicas também está relacionado à busca por alternativas de transformação, conservação e alteração química de alimentos. As mudanças no processamento e a crescente exigência por alimentos mais naturais, com uma vida útil prolongada impulsionam a pesquisa de novos ingredientes. Estas características podem minimizar o uso de aditivos químicos para atrasar a deterioração microbiana de alimentos. (FAI *et. al.*, 2008).

Desta forma, o presente estudo apresentou como objetivo avaliar o potencial antibiótico de extratos de dois cogumelos comestíveis conhecidos mundialmente: o shiitake (*Lentinula edodes*) e o eryngui (*Pleurotus Eryngi*) e de pães de forma com aplicação de farinha de cogumelo frente a seis espécies de bactérias patogênicas comumente encontradas em alimentos.

Metodologia:

O experimento foi conduzido no Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia (LPNBio), da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus Juvino Oliveira, Itapetinga-BA. Foram preparadas farinhas dos cogumelos shiitake e eryngui e utilizadas na produção de formulações de pães de forma substituindo a farinha de trigo por farinha dos cogumelos na proporção de 20%. Após a preparação das formulações foram preparados extratos hexânicos das farinhas dos dois cogumelos testados e de três formulações de pães de forma: pão com shiitake (P20S), pão com eryngui (P20E) e pão padrão (PP), sendo este último sem substituição de farinha de trigo por farinha de cogumelo.

Os extratos foram preparados por imersão em hexano na proporção de 700 ml de solvente para 100g de amostra, em três extrações sucessivas com intervalo de 6h. O solvente foi concentrado em rota evaporador, obtendo um rendimento de extrato bruto de aproximadamente 1g cada.

Os microrganismos utilizados na técnica de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram cepas bacterianas padronizadas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 31299), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) –

Sa43, *S. aureus* (ATCC 25921) – Sa25, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter cloacae* (INCOS 006) e *Proteus vulgaris* (CBAM 0169); obtidas da Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM) pertencentes à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Para determinar a atividade antibacteriana (*in vitro*) dos extratos foi realizada a técnica de Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição em caldo *Mueller Hinton Broth*, segundo o manual do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003).

As bactérias foram previamente cultivadas em meio *Agar Mueller Hinton*, deixados em sua temperatura ótima para crescimento (37°C), por 18-24 horas.

Os extratos hexânicos utilizados no teste de CIM foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) e água na proporção de (40: 60), deixando-os em uma mesma concentração de 10mg/mL. Os extratos foram esterilizados por filtração em filtros de membrana PES de 0,22 µm da marca Kasvi (Curitiba, Brasil) e usado em oito diluições seriadas (5; 2,5; 1,25; 0,62; 0,3; 0,15; 0,07 e 0,03mg/mL).

Nos micropoços foram distribuídos 90 µL de caldo com os extratos diluídos nas concentrações para a adição dos microrganismos diluídos em solução salina 0,9 de acordo a concentração padrão 0,5 da escala *Mc Farland* (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata. Controles foram feitos para verificação da qualidade do meio de cultura, do extrato e dos microrganismos utilizados no teste.

As placas foram incubadas a 37°C/24 horas. Após o período de incubação, foi adicionado o corante Rezasurina na concentração de 0,01%, como indicador de crescimento microbiano. Após 24h, todas as cepas foram re-cultivadas para verificar se à atividade bacteriostática/bactericida. Os testes foram feitos em triplicata.

Resultados e Discussão:

A atividade antibiótica dos extratos hexânicos dos cogumelos shiitake e eryngui e a determinação da atividade bactericida/bacteriostática foram avaliadas, com todos os extratos apresentando

capacidade bacteriostática frente às seis cepas de bactérias patogênicas testadas, conforme valores de CIM apresentados na **Tabela 1**.

Microrganismos	Ext. Shiitake	Ext. Eryngui
<i>E. faecalis</i>	1,25 mg/ml	2,50 mg/ml
<i>S. aureus</i> (Sa43)	1,25 mg/ml	2,50 mg/ml
<i>S. aureus</i> (Sa25)	1,25 mg/ml	2,50 mg/ml
<i>P. aeruginosa</i>	1,25 mg/ml	1,25 mg/ml
<i>E. cloacae</i>	0,15 mg/ml	2,50 mg/ml
<i>P. vulgaris</i>	0,30 mg/ml	2,50 mg/ml

Tabela 1. Valores de CIM dos extratos hexânicos (Ext.) dos cogumelos shiitake e eryngui frente às bactérias patogênicas.

A capacidade bacteriostática dos extratos foi observada ao inocular material dos poços com inibição de crescimento dos microrganismos e constatar crescimento dos após 48h de incubação, o que caracteriza efeito bacteriostático dos extratos e não bactericida.

O extrato hexânico do cogumelo shiitake apresentou seus melhores resultados frente às bactérias *E. cloacae* e *P. vulgaris* com CIM de 0,15 e 0,30 mg/mL, respectivamente. O extrato do cogumelo eryngui apresentou pouca variação em seus resultados com CIM 2,5 mg/ml frente a todas as bactérias testadas com exceção a *P. aeruginosa* (CIM = 1,25 mg/mL), conforme descrito acima.

Os resultados obtidos nos testes com as formulações de pães contendo farinha de cogumelo shiitake e eryngui e do pão sem farinha de cogumelo revelaram atividade bacteriostática frente todos os microrganismos com variação da concentração, conforme resultados apresentados na **Tabela 2**.

Microrganismos	E.P20S	E.P20E	E.PP
<i>E. faecalis</i>	2,50 mg/mL	5,0 mg/mL	2,5 mg/mL
<i>S. aureus</i> (Sa43)	2,50 mg/mL	5,0 mg/mL	2,5 mg/mL
<i>S. aureus</i> (Sa25)	2,50 mg/mL	5,0 mg/mL	2,5 mg/mL
<i>P. aeruginosa</i>	2,50 mg/mL	2,5 mg/mL	2,5 mg/mL
<i>E. cloacae</i>	1,25 mg/mL	2,5 mg/mL	5,0 mg/mL

<i>P. vulgaris</i>	2,50 mg/mL	2,5 mg/mL	5,0 mg/mL
--------------------	------------	-----------	-----------

Tabela 2. Valores de CIM dos extratos dos pães com adição de shiitake e eryngui e do pão padrão frente às bactérias patogênicas.

Legenda: E.P20S – Extrato do pão de forma com 20% de farinha de shiitake; E.P20E – Extrato do pão de forma com 20% de farinha de eryngui; E.PP – Extrato do pão de forma padrão;

Foi possível observar capacidade bacteriostática nos extratos das formulações de pães com e sem farinha de cogumelo. Esperava-se que o extrato hexânico do pão padrão (E.PP) não apresentasse capacidade inibitória de crescimento para as bactérias patogênicas testadas uma vez que não apresentava em sua formulação a presença do cogumelo comestível.

O menor valor de CIM observado nos extratos hexânicos dos cogumelos avaliados foi associado ao shiitake na inibição do crescimento da *E. cloacae* (0,15 mg/mL), sendo mantida a mesma relação para os extratos hexânicos dos pães testados, ou seja, menor valor de CIM para o extrato hexânico do pão com 20% de farinha de shiitake na inibição da *E. cloacae* (1,25 mg/mL).

Mesmo após o cogumelo de shiitake desidratado passar pelo processo de trituração, peneiramento em peneiras de 40 mesh, aplicação em formulação de pão de forma com presença de outros ingredientes, assamento do pão com cogumelo, extração com solvente hexânico da formulação de pão, concentração de solvente em rotaevaporador com banho-maria a 50 °C sob vácuo de 600 mmHg, solubilização em DMSO e aplicação no teste CIM com diluição sucessiva na presença de caldo para crescimento de bactéria, observou-se o melhor resultado de concentração inibitória mínima frente a mesma bactéria patogênica *E. cloacae*. Portanto, pôde-se observar que parte do potencial da ação antimicrobiana observada no cogumelo foi repassada para a formulação de pão.

Porém resultados como os valores de CIM encontrados para os extratos da farinha de eryngui e da formulação de pão padrão iguais deixam a dúvida se o fator cogumelo realmente está influenciando no poder inibitório de crescimento das cepas testadas. Assim, mais testes precisam ser adotados no

sentido de comprovar o potencial inibitório de farinhas de cogumelos aplicados em formulações da área de panificação, como pães de forma.

Trabalhos com formulações de pães incluindo a farinha do shiitake na literatura fazem menção a atividade antibiótica do mesmo. Vieira e colaboradores (2016) avaliaram a atividade antibiótica de duas formulações de pães com aplicação e sem aplicação de farinha de shiitake e observaram inibição bacteriostática frente às bactérias *E. faecalis* e *S. aureus*. Neste trabalho foi observado um CIM de 1,25 mg/mL do extrato bruto do pão possuindo a farinha do shiitake frente a uma cepa de *S. aureus* e o extrato do pão sem a adição da farinha não teve atividade antibiótica, evidenciando que a presença de substâncias oriundas do shiitake na formulação teve interferência no resultado do teste.

Conclusões:

Com os resultados dos testes biológicos foi possível concluir que as farinhas dos cogumelos shiitake e eryngui possuem atividade bacteriostática, mas não foi possível afirmar que essa atividade foi mantida quando aplicada farinha dos cogumelos em formulação de pães com 20% de substituição.

Referências bibliográficas

VIEIRA, A.C; CAMPOS FILHO, P.C.; ALVES, M.V.; SOUZA, A.O; CARVALHO, S.A. Bread supplemented with shiitake mycelia as microbial inhibitor. **VI Congresso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, Córdoba, 2016.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. **CLSI document M2-A8** (ISBN 1-56238-485-6). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

FAI, Ana Elizabeth Cavalcante; STAMFORD, Thayza Christina Montenegro; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de

quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de polímeros**, v. 9, n. 5, p. 435-451, 2008.

FURLANI, R. P. Z; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64 (2), p. 149-154, 2005.

MATTILA, P; SUONPÄÄ, K; PIIRONEN, V. Functional properties of edible mushrooms. **Nutrition**, v. 16, n. 7, p. 694-696, 2000.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, 2007.

PAULI, PRISCILA ABACKERLI DE. **Avaliação da composição química, compostos bioativos e atividade antioxidante em cogumelos comestíveis**. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, 2010.

PEREIRA, A. F. C. **Potenciais alimentos funcionais com base em extratos de vinho de uva ou de videira**. Tese de Doutorado. [sn], 2014.

RAUD, Cécile. Os alimentos funcionais. **Revista de sociologia e política**, v. 16, n. 31, p. 85, 2008.

SALES-CAMPOS, C.; OLIVEIRA, L. A.; ARAUJO, L. M.; VAREJÃO, M. J. C.; ANDRADE, M. C. N. Composição mineral de uma linhagem de *Pleurotus ostreatus* cultivada em resíduos madeiros e agroindustriais da região amazônica. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.29(4), p. 868-872, out.-dez, 2009.

SOUZA, N. B.; CONTESSA, C. R. ; ALMEIDA, L. ; MORAES, C. C. ; MANERA, A. P. . Obtenção de compostos antimicrobianos a partir de diferentes espécies de cogumelos comestíveis. In: **XXVI Congresso Regional de Iniciação a Ciência & Tecnologia em Engenharia**, 2014.