



**Avaliação das propriedades antimicrobianas do Shiitake  
(*Lentinula edodes*) em isolados bacterianos responsáveis por  
Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (IACS)**

**Ana Cristina Oliveira Afonso**

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança  
e à Faculdade de Farmácia da Universidade de Salamanca, para obtenção do Grau de  
Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais*

Orientado por

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria da Conceição Fernandes (ESA, CIMO-IPB)**

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria José Félix Saavedra (CITAB, UTAD)**

**Bragança**

**Dezembro de 2019**

**“O sucesso, à semelhança da felicidade, não pode ser provocado. Tem de surgir naturalmente. E isso só acontece como efeito secundário espontâneo da dedicação do indivíduo a uma causa superior a ele.”**

*Viktor Frankl*

## AGRADECIMENTOS

Ao longo desta etapa que agora termina, participaram várias pessoas sem as quais esta dissertação não estaria completa, e que merecem o meu sincero agradecimento.

À minha orientadora, Professora Doutora Conceição Fernandes que prontamente me sugeriu a realização deste trabalho, pela sua amabilidade, paciência, disponibilidade, orientação e paciência. Agradeço todo o conhecimento transmitido que permitiu o desenvolvimento do meu espírito crítico.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Maria José Saavedra pela disponibilidade em me receber na sua equipa, acompanhamento, conhecimento transmitido, e por me ter dado completa liberdade na realização deste trabalho. Sem dúvida alguma que me ajudou a crescer profissional e pessoalmente.

À Professora Doutora Guilhermina Marques, coordenadora do Projeto FungiTech, por me inserir neste projeto e por todo o apoio científico prestado.

Ao Centro de Investigação e Tecnologias Agroambientais e Biológicas, CITAB, da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, pelo acolhimento, bem como pelas condições indispensáveis à concretização da parte experimental.

À Doutora Juliana Garcia pelo acompanhamento na realização deste trabalho e pelo apoio prestado ao longo destes meses.

Aos meus amigos. Obrigada pela amizade, pela paciência e compreensão da minha ausência nos últimos tempos.

À Adriana, Erika e Mikel, “mis compañeros”. Duas colombianas, um espanhol, e eu portuguesa, uma turma improvável que se tornou numa família. Apesar de não termos estado juntos durante esta etapa, o vosso apoio foi fundamental. Obrigada por cuidarem de mim quando estive longe da minha família, pelas conversas, brincadeiras e pelas longas tardes a me explicarem química.

Ao Daniel, agradeço a infinita paciência e compreensão. Obrigada por estares sempre do meu lado e por teres sempre uma palavra de motivação.

À minha família, principalmente aos meus pais, que me permitiram a realização de mais um sonho sem nunca colocar entraves.

Por último, mas não menos importante, ao meu avô e a Deus. Só nós é que sabemos o quão duro foi.

## FINANCIAMENTOS

A realização deste trabalho foi possível mediante o apoio financeiro das seguintes entidades:

CIMO - Centro de Investigação de Montanha, Instituto Politécnico de Bragança

CITAB - Centro de Investigação e Tecnologias Agroambientais e Biológicas, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Projeto FUNGITECH – Tecnologia e inovação na cadeia de produção do shiitake e de outros cogumelos com valor nutracêutico e medicinal, N.º 33788, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do NORTE 2020 (Programa Operacional Regional do Norte)



---

## TRABALHOS APRESENTADOS COM BASE NESTA TESE

A Afonso, C Fernandes, J Garcia, A. Duarte, MJ Saavedra. (2019). Caracterização da resistência a antibióticos de isolados de *Klebsiella pneumoniae* em Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (IACS). Semana da Ciência e Cidadania. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal (Comunicação por póster)

A Afonso, C Fernandes, J Garcia, F Nunes, G Marques, MJ Saavedra. (2019). Será o Shiitake (*Lentinula edodes*) eficaz contra isolados bacterianos multirresistentes? XXI Encontro Micológico Transmontano. Mogadouro, Portugal (Comunicação oral)

## RESUMO

A resistência bacteriana constitui atualmente uma das mais graves ameaças à Saúde Pública, havendo bactérias que são resistentes a mais do que uma classe de antibióticos. Uma das maiores problemáticas das resistências bacterianas são as IACS (Infeções associadas aos cuidados de saúde) provocadas por bactérias como *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenemos. Este fenómeno de resistência tem levado à procura de alternativas, quer seja pela síntese de novos compostos antibacterianos, quer seja pela procura de produtos naturais com propriedades antibacterianas.

Atendendo à composição química dos cogumelos em compostos bioativos, e variedade de trabalhos que demonstram as suas propriedades antibacterianas, surge então a hipótese de que estes compostos poderiam ser promissores aplicados à antibioterapia. Nesse contexto, este trabalho teve como principal objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de extratos de cogumelos da espécie *Lentinula edodes* (Shiitake), uma das espécies de cogumelos mais comercializada a nível mundial, em isolados de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, frequentemente relacionadas com as infeções associadas a cuidados de saúde. Dois tipos de extratos (aquoso e metanólico) obtidos de duas variedades de cogumelo Shiitake (Donko e Koshin) foram avaliados quanto ao seu potencial efeito antibacteriano em isolados responsáveis por IACS. O estudo incluiu um *screening* da atividade antimicrobiana, a avaliação do efeito sinérgico entre extratos e antibióticos e ainda a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB).

Os resultados mostraram que na avaliação da atividade antimicrobiana, houve um aumento do tamanho dos halos de inibição nos isolados de Gram-positivo com o aumento da concentração dos extratos aquosos de ambas as variedades, sendo a variedade Koshin a que apresentou melhores resultados. Na avaliação do efeito sinérgico observou-se que para os Gram-positivos, o aumento da concentração do extrato levou a que a ação de alguns antibióticos fosse potenciada. Contudo, nos isolados de Gram-negativo verificou-se a ocorrência de antagonismo com a adição de extrato ao meropenemo. Na determinação das CMIs, determinada em Gram-positivos, ambos os extratos foram eficazes, verificando-se inibição do crescimento a menores concentrações com o extrato aquoso da variedade Koshin. Estas diferenças entre as duas variedades e entre os dois solventes (aquoso e metanólico) podem ser explicadas pelo conteúdo em fenóis totais

*versus* atividade antioxidante, que foi maior no extrato aquoso da variedade Koshin. Assim sendo, valoriza-se o Shiitake como uma promissora fonte de compostos bioativos.

**Palavras-chave:** Atividade antibacteriana; concentração mínima inibitória; *Lentinula edodes*; multirresistência.

## RESUMEN

La resistencia bacteriana constituye actualmente una de las más graves amenazas en la Salud Pública, esto debido a la existencia de bacterias que son resistentes a más de una clase de antibióticos. Una de las mayores problemáticas a las resistencias bacterianas son las IAAS (infecciones asociadas a la atención en salud), provocadas por bacterias como *Staphylococcus aureus*, resistentes a la meticilina (MRSA) y *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenems. Este fenómeno de resistencia ha llevado a la búsqueda de alternativas, ya sea con la síntesis de nuevos compuestos antibacterianos, o por la introducción de productos naturales con propiedades antibacterianas.

En cuanto a la composición química de las setas, compuestos bioactivos, y variedad de trabajos que demuestran sus propiedades antibacterianas; surge entonces la hipótesis de que esos compuestos podrían ser grandes prometedores en la terapia con antibióticos. En este contexto, este trabajo tuvo como principal objetivo evaluar el potencial antimicrobiano de extractos de setas de la especie *Lentinula edodes* (Shiitake), una de las especies de setas más comercializadas a nivel mundial, en aislados de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, de ambiente hospitalario. Dos tipos de extractos (acuosos y metanólicos) obtenidos de dos variedades de setas Shiitake (Donko y Koshin) se estudiaron con el fin de evaluar su efecto antibacteriano en aislados responsables de las IAAS. El estudio incluyó un screening de la actividad antimicrobiana, la evaluación del efecto sinérgico entre extractos y antibióticos, así como la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB).

Los resultados mostraron que en la evaluación de la actividad antimicrobiana, hay un crecimiento en el tamaño de los halos de inhibición en Gram-positivos al aumentar la concentración de extractos acuosos de ambas variedades, arrojando mejores resultados la variedad Koshin. En la evaluación del efecto sinérgico, se observó que para Gram-positivos, el aumento de la concentración del extracto condujo a la acción de algunos antibióticos mejorados. Sin embargo, en Gram-negativos, se produjo antagonismo con la adición de extracto a meropenem. En la determinación de las CMI, analizadas en Gram-positivos, ambos extractos fueron efectivos, con inhibición del crecimiento a concentraciones más bajas con el extracto acuoso de la variedad Koshin. Estas diferencias entre las dos variedades de y entre los dos solventes (acuoso y metanólico) pueden explicarse por el contenido total de fenol versus la actividad antioxidante, que fue mayor en el extracto acuoso de la variedad Koshin. Por lo tanto, Shiitake se valora como una fuente prometedora de compuestos bioactivos.



**Palabras clave:** Actividad antibacteriana; concentración mínima inhibitoria; *Lentinula edodes*; resistencia a múltiples fármacos.

## ABSTRACT

Bacterial resistance is currently one of the most serious threats to public health, with bacteria that are resistant to more than one class of antibiotics. One of the major problems of bacterial resistance is the HCAs (Health care-associated infections), caused by bacteria such as methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*. This phenomenon of resistance has led to the search for alternatives, either by synthesizing new antibacterial compounds or by looking for natural products with antibacterial properties.

Given the chemical composition of mushrooms, bioactive compounds, and the variety of works that demonstrate their antibacterial properties, it is hypothesized that these compounds could be promisingly applied to antibiotic therapy. In this context, the main objective of this work was to evaluate the antimicrobial potential of mushroom extracts of the species *Lentinula edodes* (Shiitake), one of the most traded mushroom species in the world, in Gram-negative and Gram-positive bacteria isolates, frequently related. with healthcare-associated infections. Two types of extracts (aqueous and methanolic) obtained from two varieties of Shiitake (Donko and Koshin) mushroom were evaluated for their potential antibacterial effect on isolates responsible for HCAs. The study included screening for antimicrobial activity, evaluating the synergistic effect between extracts and antibiotics, and determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC).

The results showed that in the evaluation of antimicrobial activity, there was an increase in the size of inhibition halos in Gram-positive isolates with increasing concentration of aqueous extracts of both varieties, being Koshin variety the best results. In the evaluation of the synergistic effect, it was observed that for Gram-positive, the increased concentration of the extract led to the action of some antibiotics being enhanced. However, in Gram-negative isolates, antagonism occurred with the addition of extract to meropenem. In the determination of CMIs, determined in Gram-positive, both extracts were effective, with growth inhibition at lower concentrations with aqueous extract of the Koshin variety. These differences between the two varieties and between the two solvents (aqueous and methanolic) can be explained by the total phenol content versus antioxidant activity, which was higher in the aqueous extract of the Koshin variety. Thus, Shiitake is valued as a promising source of bioactive compounds.

**Keywords:** Antibacterial activity; minimum inhibitory concentration; *Lentinula edodes*; multidrug resistance

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	ii
FINANCIAMENTOS .....	iii
TRABALHOS APRESENTADOS COM BASE NESTA TESE .....	iv
RESUMO .....	v
RESUMEN .....	vii
ABSTRACT .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
ÍNDICE DE TABELAS .....	xiii
ABREVIATURAS .....	xiv
1. Enquadramento e Objetivos.....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	4
2.1. Resistência a antibióticos – um problema de Saúde Pública.....	5
2.1.1. Mecanismos de Resistência .....	7
2.1.2. Conceito “One Health” e Agentes patogénicos prioritários .....	10
2.1.2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	13
2.1.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
2.1.3. Novas estratégias: combate ao problema da resistência bacteriana .....	15
2.2. Cogumelos como fonte de compostos antimicrobianos .....	16
2.2.1. O Shiitake ( <i>Lentinula edodes</i> ) .....	19
2.2.1.1. Origem e características.....	19
2.2.1.2. Propriedades antimicrobianas do Shiitake.....	20
3. Material e Métodos .....	22
3.1. Origem das amostras dos cogumelos e dos isolados .....	23
3.1.1. Preparação dos extratos de Shiitake .....	24
3.2. Avaliação da atividade antibacteriana .....	25
3.2.1. <i>Screening</i> da atividade antibacteriana .....	25
3.2.2. Avaliação do efeito sinérgico entre extratos e antibióticos .....	28
3.2.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB).....	28
3.3. Caracterização dos extratos de Shiitake .....	29
3.3.1. Determinação dos fenóis totais.....	29
3.3.2. Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	30
3.4. Análise estatística .....	30

4. Resultados e Discussão.....	31
4.1. Identificação dos isolados bacterianos e caracterização da suscetibilidade a antibióticos .....	32
4.2. Avaliação da atividade antibacteriana .....	34
4.2.1. Screening da atividade antibacteriana .....	34
4.2.2. Avaliação do efeito sinérgico entre extratos e antibióticos .....	40
4.2.3. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB).....	48
4.3. Caracterização dos extratos de Shiitake .....	51
4.3.1. Determinação dos fenóis totais.....	51
4.3.2. Atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	53
5. Considerações Finais .....	55
6. Bibliografia.....	58
Anexos.....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1- Abordagem “ <i>Uma só Saúde</i> ” .....	11
Figura 2.2- Evolução em Portugal de isolados de agentes patogénicos resistentes .....	13
Figura 2.3- Aspeto geral do Shiitake ( <i>Lentinula edodes</i> (Berkeley) Pegler). ....	20
Figura 3.1- Representação esquemática do procedimento experimental adotado.....	23
Figura 3.2- Avaliação da atividade antibacteriana. ....	27
Figura 4.1- Aspeto das placas no <i>screening</i> da atividade antibacteriana .....	34
Figura 4.2- Aspeto dos halos de inibição do extrato aquoso para o isolado MJMC 102 a diferentes concentrações.....	37
Figura 4.3- Comparação dos valores de eficácia antibacteriana relativa (%) obtidos a diferentes concentrações ( $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) dos extratos aquosos das variedades Donko e Koshin de Shiitake para os mesmos isolados de Gram-positivo. ...	39
Figura 4.4- Comparação da eficácia antibacteriana relativa (%) dos extratos aquosos, concentração $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ entre variedades. ....	40
Figura 4.5- Comparação do efeito das concentrações na avaliação do sinergismo.....	41
Figura 4.6- Aspeto da microplaca para determinação da CMI através do método da microdiluição em placa com resazurina. ....	48
Figura 4.7- Composição em fenóis totais dos extratos aquosos e metanólicos das variedades Donko e Koshin de Shiitake. ....	51
Figura 4.8- Propriedades antioxidantes dos extratos aquosos e metanólicos de Shiitake, variedades Donko e Koshin.....	54

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1- Principais mecanismos de ação antibiótica .....	6
Tabela 2.2- Cogumelos com atividade antimicrobiana contra microrganismos mais relevantes a nível hospitalar .....	18
Tabela 3.1- Método de classificação da atividade antibacteriana .....	27
Tabela 3.2- Classe dos antibióticos utilizados no ensaio do efeito sinérgico.....	28
Tabela 4.1- Origem e identificação dos isolados bacterianos .....	32
Tabela 4.2- Caracterização do perfil de suscetibilidade dos isolados clínicos de Gram-negativo .....	33
Tabela 4.3- Caracterização do perfil de suscetibilidade dos isolados clínicos de Gram-positivo .....	34
Tabela 4.4- Comparação do tamanho dos halos de inibição (mm) obtidos com diferentes concentrações de extratos ( $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para os mesmos isolados de Gram-positivo.....	35
Tabela 4.5- Comparação dos valores dos halos de inibição (mm) obtidos com os extratos de Shiitake (concentração $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para isolados de Gram-positivo e Gram-negativo. ....	37
Tabela 4.6- Valores dos halos de inibição (mm) obtidos no ensaio da avaliação do efeito sinérgico com extratos a diferentes concentrações ( $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), para isolados de Gram-positivo. ....	46
Tabela 4.7- Valores dos halos de inibição (mm) obtidos no ensaio da avaliação do efeito sinérgico, para isolados de Gram-positivo (concentração $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).....	46
Tabela 4.8- Valores dos halos de inibição (mm) obtidos no ensaio da avaliação do efeito sinérgico, para isolados de Gram-negativo (concentração $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).....	47
Tabela 4.9- Concentração Mínima Inibitória ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e Concentração Mínima Bactericida, para os extratos aquosos e metanólicos da variedade Koshin. ....	50

## ABREVIATURAS

<b>ABC</b>	Adenosine triphosphate binding cassette
<b>ABTS</b>	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)
<b>AMC</b>	Amoxicilina/Ácido clavulânico
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BHI</b>	Brain Heart Infusion
<b>CETC</b>	Colección Española de Cultivos Tipo
<b>CDC</b>	Center for Disease Control and Prevention
<b>CHTMAD</b>	Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro
<b>CIP</b>	Ciprofloxacina
<b>CLSI</b>	Clinical & Laboratory Standards Institute
<b>CMI</b>	Concentração Mínima Inibitória
<b>CN</b>	Gentamicina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ERC</b>	Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenemos
<b>ESBL</b>	Enterobacteriaceae produtoras de $\beta$ -lactamases de espectro alargado
<b>ETP</b>	Ertapenemo
<b>EUCAST</b>	Comité Europeu de testes de suscetibilidade antimicrobiana
<b>GAE</b>	Equivalentes de ácido gálico
<b>IACS</b>	Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde
<b>IPM</b>	Imipenemo
<b>IZD</b>	Diâmetro da zona de inibição
<b>LEV</b>	Levofloxacina
<b>MATE</b>	Multidrug and toxic efflux
<b>MEM</b>	Meropenemo
<b>MFS</b>	Major facilitator family
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
<b>MSSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
<b>NAD</b>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
<b>OECD</b>	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBP</b>	Proteína de ligação à penicilina

---

<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RND</b>	Resistance-nodulation-division family
<b>SMR</b>	Small multidrug resistance
<b>TEAC</b>	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
<b>UTAD</b>	Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
<b>VA</b>	Vancomicina
<b>VISA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina
<b>WHO</b>	World Health Organization



# **1. Enquadramento e Objetivos**

A resistência aos antibióticos tem-se revelado um problema grave e crescente, que acarreta consequências tanto na saúde, como na economia a nível global. A resistência aos antimicrobianos traduz-se na capacidade de um microrganismo desenvolver mecanismos de resistência, através dos quais a molécula que está a ser utilizada no tratamento deixa de ser eficaz. A utilização indevida dos antibióticos é um dos principais fatores envolvidos no desenvolvimento de resistência.

Uma das principais consequências da resistência aos antibióticos são as infeções associadas aos cuidados de saúde (IACS) que emergem atualmente como um problema de Saúde Pública à escala global, com um peso significativo em termos de morbilidade, mortalidade e custos diretos e indiretos. *Klebsiella pneumonia* e *Staphylococcus aureus* são dois dos patógenos mais comuns que estão frequentemente implicados em infeções hospitalares.

*Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria oportunista que afeta principalmente pacientes imunodeprimidos e que sofrem de doenças graves subjacentes, como diabetes *mellitus* e doenças pulmonares obstrutivas crónicas. A grande problemática associada a este Gram-negativo é a resistência aos carbapenemos, antibióticos de última linha utilizados no tratamento da infeção por enterobactérias.

O *Staphylococcus aureus*, além de ser um dos principais patógenos humanos em ambientes hospitalares, também o é na comunidade, causando uma grande variedade de manifestações clínicas, desde leves infeções na pele até infeções sistémicas. O tratamento da infeção por *Staphylococcus aureus* tornou-se problemático devido ao número crescente de estirpes resistentes à meticilina (MRSA).

A resistência ao tratamento com os antibióticos comerciais tem desencadeado a procura de alternativas que incluem a síntese de novos compostos antibacterianos e/ou a procura de produtos naturais com propriedades antibacterianas. Dentro das matrizes naturais, os extratos de cogumelos têm vindo a ser explorados devido aos compostos antibacterianos que produzem, essenciais à sua sobrevivência. Também a ampla diversidade de grupos funcionais e de metabolitos com propriedades bioativas justificam a potencialidade destes extratos.

Neste contexto, pretende-se avaliar as propriedades antimicrobianas de extratos aquosos e metanólicos de duas variedades da espécie *Lentinula edodes* em bactérias patogénicas, isoladas em ambiente hospitalar que apresentem fenómenos de multirresistência a antibióticos e que são reconhecidas pela Organização Mundial de Saúde como ameaças à Saúde Pública. Para este efeito, utilizaram-se bactérias de

Gram-positivo e de Gram-negativo, nomeadamente, *Staphylococcus aureus* resistentes e sensíveis à meticilina (MRSA e MSSA), *Klebsiella pneumoniae* responsáveis por IACS. Este trabalho insere-se no projeto FungiTech, promovido pela empresa *Chikioshira SAG*, Lda. em colaboração com a UTAD.

Foram ainda objetivos deste trabalho:

- Avaliar a capacidade antimicrobiana dos diferentes extratos;
- Identificar quais as bactérias mais sensíveis aos extratos;
- Verificar se existe sinergismo com antibióticos;
- Determinar a concentração mínima inibitória dos extratos que apresentem ação antibacteriana;
- Caracterizar os extratos quanto ao teor em fenóis totais e atividade antioxidante, de modo a relacionar causa/efeito.

A dissertação encontra-se organizada em 6 capítulos. O primeiro capítulo corresponde a um enquadramento e justificação do estudo realizado, aos principais objetivos propostos e à descrição geral da organização da tese escrita. No segundo capítulo apresenta-se uma breve revisão bibliográfica, no qual se aborda a problemática da resistência aos antibióticos, os mecanismos de resistência bem como os principais agentes patogénicos, e ainda uma caracterização do Shiitake e das suas propriedades antimicrobianas. No terceiro capítulo encontram-se referidos os materiais e métodos utilizados na identificação dos isolados bacterianos, na obtenção dos diferentes extratos e na avaliação de atividade antibacteriana, bem como na sua caracterização química (quantificação de fenóis totais e avaliação da atividade antioxidante). No capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos e consequente discussão dos mesmos. No quinto capítulo referem-se as principais conclusões e recomendações alcançadas neste estudo. Finalmente apresenta-se a listagem da bibliografia utilizada para a realização deste trabalho.

## **2. Revisão Bibliográfica**

## **2.1. Resistência a antibióticos – um problema de Saúde Pública**

Desde a sua descoberta no século XX, os agentes antibióticos têm revelado uma grande e crescente importância no combate a infeções. Pode definir-se antibióticos como compostos naturais produzidos por microrganismos e que são capazes de inibir o crescimento (bacteriostáticos) ou de matar as bactérias (bactericidas) (Walsh, 2004).

Os antibióticos de origem natural e seus derivados semissintéticos compreendem a maioria dos antibióticos em uso clínico, e podem ser classificados em  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactâmicos), tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas, glicopeptídeos, cloranfenicol e rifampicinas. Os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas. Estes grupos de compostos atuam de diversas formas, interferindo nos processos metabólicos ou nas estruturas do organismo (Duarte, 2014a; Murray et al., 2015; Sousa et al., 2016).

Os mecanismos de ação estão principalmente relacionados com (i) inibição da síntese da parede celular; (ii) modificação da permeabilidade da membrana plasmática; (iii) inibição da síntese de ácidos nucleicos; e (iv) inibição da síntese de proteínas. Os principais mecanismos de ação destes agentes terapêuticos estão resumidos na tabela 2.1 (Tenover, 2006; Guimarães et al., 2010).

No entanto, o uso excessivo e muitas vezes inapropriado dos antibióticos em medicina humana e veterinária, as condições de higiene deficientes, o fluxo contínuo de viajantes, o aumento do número de pacientes imunodeprimidos, e a demora no diagnóstico das infeções bacterianas, têm favorecido o aumento da resistência a antibióticos. Este facto é reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um grave problema de Saúde Pública, representando um desafio de dimensões globais para a medicina (WHO, 2014, 2017a).

**Tabela 2.1-** Principais mecanismos de ação antibiótica (adaptado de Guimarães et al., 2010)

<b>Antibióticos</b>	<b>Alvo</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
$\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos, monobactâmicos)	Enzima transpeptidase	Inibe a formação de ligação cruzada entre cadeias de peptidoglicano levando à formação incorreta da parede celular bacteriana.
$\beta$ -lactâmicos (oximinopenicilinas)	Enzima $\beta$ -lactamase	Inibe as enzimas $\beta$ -lactamases.
Macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas, cloranfenicol	Subunidade 50S ribossômica	Inibe a síntese proteica bacteriana.
Aminoglicosídeos, tetraciclina	Subunidade 30S ribossômica	Inibe a síntese proteica bacteriana.
Glicopeptídeos (vancomicina, teicoplanina)	Dipeptídeo terminal D-Ala-D-Ala do peptidoglicano	Forma complexo com as cadeias peptídicas não ligadas e bloqueia a transpeptidação, levando à formação incorreta da parede celular bacteriana.
Lipopeptídeo (daptomicina)	Membrana plasmática	Bloqueia síntese de ácidos lipoteicoicos (componente da parede celular de bactérias Gram-positivo).
Rifampicina	RNA polimerase dependente de DNA	Inibição da síntese de RNA.
Fluoroquinolonas	Enzima DNA girase	Bloqueio da replicação do DNA.
Sulfonamidas	Enzima di-hidropteroato sintetase	Bloqueio da formação de co-fatores do ácido fólico.

A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OECD), através da publicação de um relatório periódico, projeta uma estimativa mundial dos efeitos da resistência a antimicrobianos a nível da mortalidade, morbilidade e custos económicos. No último relatório, emitido em novembro de 2018, constatou-se que Portugal se encontra entre os países com resultados de mortalidade mais elevados no conjunto de mais de 30 países analisados, com 11.3 por 100 mil habitantes, apenas ultrapassado por Itália, com 18.2 e pela Grécia, com 14.8. Em Portugal, os valores de mortalidade anual são quase o triplo da média dos países da OECD e o dobro da média da União Europeia. A OECD afirma ainda que três em cada quatro mortes poderiam ser evitadas gastando apenas cerca 1.74 euros por ano por pessoa em medidas simples, como melhor higienização das mãos, sobretudo entre os profissionais de saúde, e melhor utilização dos antibióticos (OECD, 2018).

### **2.1.1. Mecanismos de Resistência**

O desenvolvimento de resistência é um fenómeno natural causado por mutações em genes bacterianos, ou aquisição de genes de resistência exógenos. As bactérias podem adquirir vários mecanismos de resistência e, portanto, tornar-se resistentes a vários agentes antimicrobianos (OECD, 2018).

Os mecanismos de resistência aos antibióticos podem ser intrínsecos/inatos, se a bactéria possuir características estruturais ou enzimáticas que levem à resistência a um determinado antibiótico, ou adquiridos. A resistência adquirida pode dar-se pela alteração da permeabilidade da membrana celular ou do local de ação do antibiótico, inativação ou modificação dos antibióticos devido a mecanismos enzimáticos e ainda através das bombas de efluxo.

#### **Resistência intrínseca**

A resistência natural é uma característica intrínseca de um microrganismo e que ocorre sem uma exposição prévia ao antibiótico. O conhecimento da resistência intrínseca das diferentes espécies é útil na escolha de estratégias de tratamento empírico. O exemplo mais simples de resistência intrínseca numa espécie individual resulta da ausência de um alvo suscetível de um antibiótico específico (Tsuchido & Takano, 1998; Rice & Bonomo, 2005).

#### **Resistência adquirida**

Além da resistência intrínseca, as bactérias podem adquirir ou desenvolver resistência aos antibióticos, através de mecanismos bioquímicos. Estes mecanismos podem diminuir as concentrações intracelulares do antibiótico, como resultado da penetração deficiente na bactéria ou do efluxo de antibióticos; serem capazes de modificar o alvo antibiótico por mutação genética ou modificação do alvo; ou terem ainda a capacidade de inativar o antibiótico por hidrólise ou modificação (Blair et al, 2015).

##### **i) Alteração da permeabilidade da membrana celular**

Em comparação com espécies de Gram-positivo, bactérias de Gram-negativo são intrinsecamente menos permeáveis a muitos antibióticos, pois a sua membrana externa forma uma barreira. Isto deve-se à constituição da membrana que é composta por uma camada interna que possui fosfolípidos e uma camada externa que possui lipopolissacarídeos (LPS). Esta constituição vai conferir uma lenta penetração do fármaco, sendo que a passagem das moléculas do fármaco para uma célula será feita pelos seguintes mecanismos: difusão através de porinas, difusão através da bicamada, e por captação auto-promovida. O tipo de entrada depende da composição química da molécula

do fármaco. Posto isto, pequenas moléculas hidrofílicas como os  $\beta$ -lactâmicos e as quinolonas atravessam a membrana apenas através de porinas. Aminoglicosídeos e colistina não podem ser transferidos para a célula através de porinas, portanto, a auto-promoção da captação da célula é iniciada pela ligação aos lipopolissacarídeos do lado externo da membrana (Dzidic et al., 2008; Vargiu & Nikaido, 2012).

Este é o mecanismo de resistência observado relativamente aos aminoglicosídeos, à fosfomicina, quinolonas e tetraciclina (Neu & Gootz, 1996; Lambert, 2002).

## **ii) Alteração do local de ação do antibiótico**

Uma interação entre um antibiótico e uma molécula alvo é muito específica pelo que, até pequenas alterações numa molécula alvo, podem influenciar a ligação antibiótica ao alvo. Este tipo de resistência caracteriza-se pela diminuição ou mesmo ausência de afinidade do antibiótico ao local de ligação. Isto pode ocorrer devido a uma alteração da estrutura do peptidoglicano, a uma interferência na síntese de proteínas ou na síntese de DNA (Fluit et al, 2001; Rice & Bonomo, 2005; Giedraitiene et al, 2011).

- **Alteração da Estrutura do Peptidoglicano:** A alteração da estrutura do peptidoglicano consiste na inibição das enzimas que participam na construção do mesmo. Este mecanismo de resistência é observado em antibióticos tais como,  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactâmicos) e glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina). Para os  $\beta$ -lactâmicos, a presença de mutação em proteínas de ligação à penicilina (PBPs) leva a uma redução da afinidade (Giedraitiene et al, 2011). Já no caso da resistência adquirida aos antibióticos glicopeptídeos, esta tem como base a alteração do local de ligação, isto é, a passagem da acil-*D*-Ala-*D*-Ala para acil-*D*-Ala-*D*-Lac ou acil-*D*-Ala-*D*-Ser no terminal C. Esta mutação deve-se à presença do gene *vanA*, que resulta no fenótipo VanA, uma nova enzima *D*-Ala-*D*-Ala ligase. Com esta mutação a afinidade da vancomicina e teicoplanina diminui face à camada de “peptidoglicanos primitiva”. Caso a alteração ocorra devido ao gene *vanB*, então a resistência adquirida é só conferida à vancomicina (Fluit et al., 2001; Dzidic et al., 2008; Wright, 2005).
- **Interferência na Síntese de Proteínas:** Uma das formas de resistência é a modificação do alvo específico, interferindo com a síntese de proteínas (aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, estreptograminas, oxazolidinonas) ou na transcrição via RNA-polimerase (rifampicina) (Dzidic, et al., 2008). Os aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina, amicacina) ligam-se à subunidade



ribossomal 30S, enquanto o cloranfenicol se liga à subunidade ribossômica 50S e suprime a síntese proteica. Macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B bloqueiam a síntese proteica em bactérias Gram-negativo por ligação à subunidade ribossomal 50S (Lambert, 2002; Tenover, 2006; Giedraitiene et al, 2011).

- **Interferência na Síntese de DNA:** O mecanismo de resistência por interferência na síntese de DNA está descrito para os antibióticos fluoroquinolonas e consiste numa modificação de duas enzimas. Nas bactérias Gram-negativo, a DNA girase ou topoisomerase II (genes *gyrA* e *gyrB*) é o principal alvo das quinolonas. Nas bactérias Gram-positivo, tanto pode ser a DNA girase como a topoisomerase IV (subunidade *parC* e *parE*), dependendo da fluoroquinolona considerada. Mutações nos genes *gyrA* e *parC* são seguidas por falha na replicação, e as quinolonas/fluoroquinolonas não se podem ligar (Kim et al., 2002). Embora se pense que as quinolonas interajam principalmente com a subunidade A da DNA girase, foram descritas mutações na subunidade B, o que confere resistência para *Escherichia coli*. No entanto a frequência de mutações no gene *gyrB* é menor do que no gene *gyrA*, na maioria das espécies. Em relação à enzima topoisomerase IV, a sua subunidade *parC* é homóloga à *gyrA* e a subunidade *parE* é análoga à *gyrB* (Fluit et al., 2001).

### iii) Bombas de efluxo

As bombas de efluxo são proteínas de membrana que exportam, através de transporte ativo, antibióticos do meio intracelular para o extracelular, mantendo as concentrações intracelulares baixas. Ao analisar a resistência a antibióticos, a identificação e caracterização de bombas de efluxo é um dos problemas mais reais, uma vez que este mecanismo afeta de um modo geral todas as classes de antibióticos, com exceção das polimixinas (Lambert, 2002; Dzidic et al., 2008).

Existem diversos tipos de bombas de efluxo, que se categorizam em cinco classes de transportadores: *major facilitator family* (MFS), *multidrug and toxic efflux* (MATE), *resistance-nodulation-division family* (RND), *small multidrug resistance* (SMR), *adenosine triphosphate binding cassette* (ABC). As classes MFS, MATE, RND e SMR funcionam por troca de prótons, enquanto que a ABC atua por hidrólise de ATP (Dzidic et al., 2008).

#### **iv) Mecanismos enzimáticos**

O mecanismo enzimático de resistência resulta da produção, pela bactéria, de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico. Existem três principais mecanismos enzimáticos: hidrólise, transferência de grupos ou processo redox.

A hidrólise de antibióticos dá-se quando a estrutura dos antibióticos contém grupos ésteres e amidas, fazendo com que estes sejam suscetíveis às hidrolases. A quebra da ligação destes grupos é feita na presença destas enzimas, que podem ser excretadas pelas bactérias, levando à inativação do antibiótico antes que este atinja o alvo. O exemplo clássico é o das  $\beta$ -lactamases, que quebram o anel  $\beta$ -lactâmico das penicilinas e cefalosporinas. Existem dois mecanismos moleculares empregues pelas enzimas  $\beta$ -lactamases para hidrólise destes antibióticos: a quebra do anel  $\beta$ -lactâmico pela ação de enzimas do tipo serina (Ser), ou através do grupo dependente de zinco, nas designadas metalo- $\beta$ -lactamases, que é ativado na presença de água (Wright, 2005; Dzidic et al., 2008; Davies & Davies, 2010).

No mecanismo de transferência de grupos, os antibióticos mais afetados são os aminoglicosídeos, cloranfenicol, estreptograminas, macrolídeos e rifampicina, e o grupo de enzimas que são capazes de inativar estes antibióticos é chamado de transferases. A inativação é feita ligando os grupos adenil, fosforil ou acetil na periferia da molécula, podendo ocorrer reações de *O*-acetilação, *N*-acetilação, *O*-fosforilação, *O*-nucleotidilação, *O*-ribosilação, *O*-glicosilação e transferência de grupos tióis. Estas dependem da presença de co-substratos como ATP, acetil-Coenzima A, NAD<sup>+</sup>, UDP-glucose ou glutatona (Rice & Bonomo, 2005; Dzidic et al., 2008).

O mecanismo da inativação do antibiótico por um processo redox, caracteriza-se pela indução de oxidação ou redução pela bactéria patogénica (Wright, 2005).

#### **2.1.2. Conceito “One Health” e Agentes patogénicos prioritários**

Em maio de 2016, o economista britânico Jim O'Neill, divulgou um relatório estimando que em 2050 poderão ocorrer 10 milhões de mortes devido a infeções causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos, caso esta problemática não seja controlada (O'Neill, 2016). Quatro meses após o lançamento deste relatório, a Assembleia Geral das Nações Unidas deliberou sobre resistência antimicrobiana e emitiu uma declaração reafirmando o plano de ação global da OMS como a estrutura-chave para mitigar o problema. A declaração reconheceu que a saúde humana, animal e ambiental

estão ligadas, e que esta interligação é essencial para o desenvolvimento de medidas abrangentes e integradoras para combater a resistência antimicrobiana (Kahn, 2017).

A este conjunto de medidas foi atribuído o termo “*One Health*” (em português “Uma só Saúde”) que se define como uma abordagem colaborativa, multisectorial e transdisciplinar que tem como objetivo alcançar melhores resultados ao nível da saúde pública, reconhecendo a interconexão entre pessoas, animais, plantas e o ambiente (Figura 2.1). As áreas de trabalho em que uma abordagem “*One Health*” é particularmente relevante incluem a segurança alimentar, o controle de zoonoses e o combate à resistência a antibióticos (WHO, 2017b).



**Figura 2.1-** Abordagem “*Uma só Saúde*” (Adaptado de CDC, 2018)

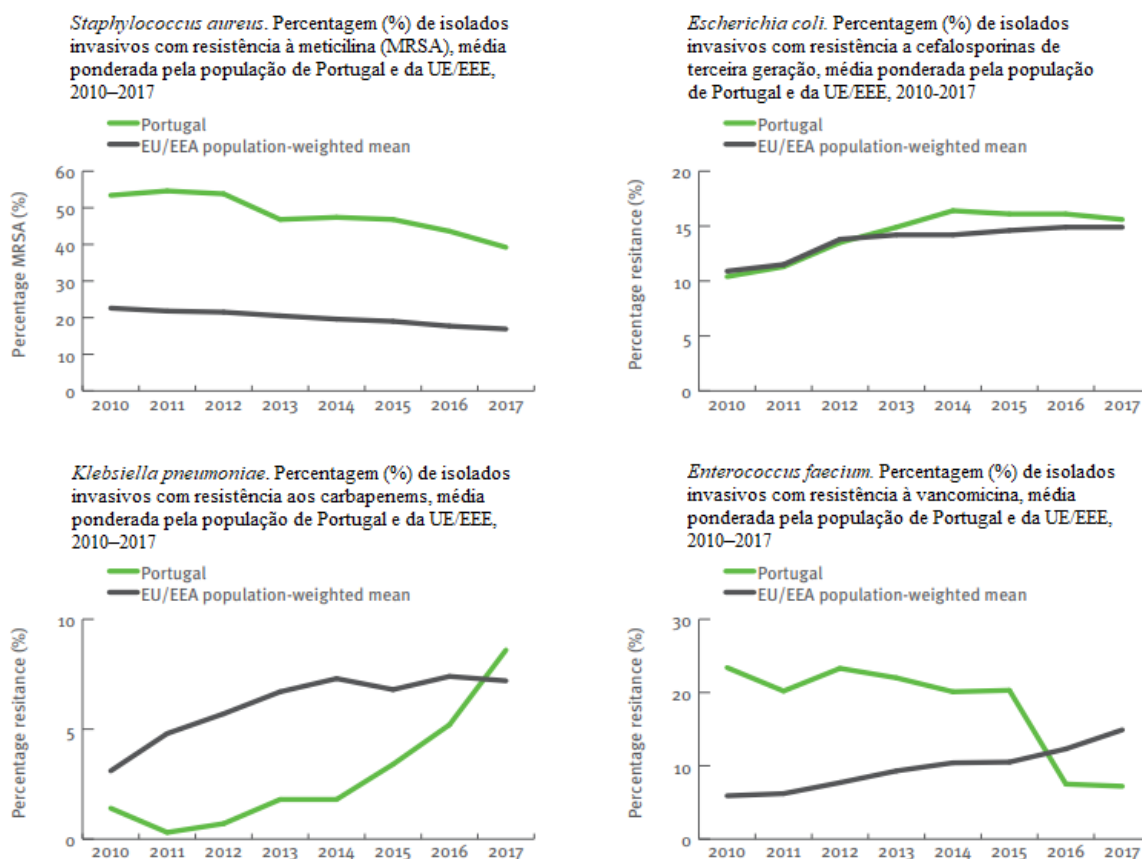
Considerando esta problemática dos agentes infecciosos multirresistentes, a OMS publicou em fevereiro de 2017 a lista de “agentes patogénicos prioritários” resistentes aos antibióticos, constituída por 12 famílias de bactérias que representam a maior ameaça para a saúde pública. Esta lista é dividida em 3 categorias, com base na gravidade das infeções que os microrganismos causam, na facilidade de se propagarem, no número de fármacos em uso e nos novos antibióticos que estão a ser estudados, sendo classificadas em *prioridade crítica*, *alta* e *média* (WHO, 2017a).

Segundo a OMS o grupo mais crítico classificado como (i) *prioridade crítica* inclui: as bactérias multirresistentes *Acinetobacter baumannii*, resistente a carbapenemos; *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a carbapenemos e Enterobacteriaceae, resistentes a carbapenemos, produtoras de ESBL. O grupo de (ii) *prioridade alta* abrange:

*Enterococcus faecium*, resistente à vancomicina; *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), com sensibilidade intermédia e resistência à vancomicina (VISA e VRSA, respetivamente); *Helicobacter pylori*, resistente à claritromicina; *Campylobacter* spp., resistente às fluoroquinolonas; *Salmonella*, resistente às fluoroquinolonas; *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a cefalosporina e resistente às fluoroquinolonas. O terceiro grupo (iii) *prioridade média* inclui: *Streptococcus pneumoniae*, resistente à penicilina; *Haemophilus influenzae*, resistente à ampicilina; *Shigella* spp., resistente às fluoroquinolonas. O segundo e o terceiro nível da lista, inclui bactérias que são cada vez mais resistentes aos fármacos e responsáveis por provocarem doenças comuns, como gonorreia ou intoxicação alimentar causada por bactérias do género *Salmonella* (WHO, 2017a; ECDC/EFSA, 2019).

Um dos problemas mais preocupantes relativamente à resistência a antibióticos são as infeções associadas aos cuidados de saúde (IACS). As IACS estão associadas a fatores de risco externo, como é o caso dos dispositivos invasivos (cateteres, válvulas, etc), e resultam frequentemente em estadia hospitalar prolongada, proporcionando um aumento dos custos, morbilidade e mortalidade. Em Portugal, o programa de prevenção e controlo de infeções e de resistência aos antimicrobianos no relatório de 2017 estimava uma prevalência de infeção nosocomial de 7,8% (DGS, 2017).

Na figura 2.2 é possível observar a evolução do número de isolados desde 2010 até 2017, em Portugal, de quatro agentes patogénicos resistentes. Tanto para os isolados de MRSA, como de *E. faecium*, verifica-se um decréscimo bastante significativo comparando o ano de 2010 com o de 2017. No caso dos isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, o panorama não é nada favorável, uma vez que o número de isolados resistentes aumentou de forma drástica.



**Figura 2.2-** Evolução em Portugal de isolados de agentes patogénicos resistentes (Fonte OECD, 2018)

Para a realização deste trabalho foram selecionados isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenems, e de *Staphylococcus aureus* resistentes/sensíveis à meticilina, pertencentes respetivamente aos grupos dos agentes de prioridade crítica e de prioridade alta.

### 2.1.2.1. *Klebsiella pneumoniae*

A família Enterobacteriaceae é composta por mais de 70 géneros, sendo 11 os mais importantes sob o ponto de vista clínico. Apresentam-se na forma de bacilos Gram-negativo, com dimensões médias de 0.5 µm x 3.0 µm, podendo ser imóveis ou móveis com flagelação peritrica, são anaeróbios facultativos, não apresentam exigências nutricionais, fermentam a glicose com ou sem produção de gás, reduzem os nitratos a nitritos e não possuem citocromo oxidase. A fermentação da lactose permite agrupar em coliformes (metabolizam lactose) e não coliformes (não metabolizam lactose) (Duarte, 2014b).

Dentro desta família encontra-se o género *Klebsiella*, constituído por bactérias coliformes, frequentemente encontradas na água, solo e plantas, e nos animais à superfície das mucosas. A espécie *K. pneumoniae* é o membro mais significativo deste género. No

Homem, *K. pneumoniae* é comensal das vias respiratórias superiores e do trato intestinal. Está frequentemente relacionada com infeções adquiridas na comunidade e hospitais, nomeadamente infeções urinárias, pneumonias e septicemias (Murray, 2017).

A resistência a vários antibióticos  $\beta$ -lactâmicos foi relatada pela primeira vez em *K. pneumoniae* em 1983, sendo essa resistência derivada da produção de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs), enzimas bacterianas que causam lise no anel  $\beta$ -lactâmico por hidroxilação irreversível da ligação amida. Desde então, a prevalência de *K. pneumoniae* produtora de ESBL aumentou drasticamente (Knothe, et al., 1983). Atualmente, os carbapenemos são considerados agentes de última instância no tratamento de infeções causadas por ESBL. A prevalência de Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenemos (ERC) continua a aumentar globalmente, constituindo uma ameaça à Saúde Pública devido às limitadas opções de tratamento disponíveis e às elevadas taxas de mortalidade e morbilidade (Gupta, et al., 2011; van Duin, et al., 2013). Em Portugal, o primeiro caso de carbapenemases foi reportado em 2009 (Machado, et al., 2010).

Fatores que estão implicados na virulência de isolados de *K. pneumoniae* podem incluir o sorotipo capsular, sistemas de eliminação de ferro, adesinas fimbriais e não fimbriais, que têm um papel importante no desenvolvimento da infeção (Victor, et al., 2007).

#### **2.1.2.2. *Staphylococcus aureus***

As bactérias pertencentes ao género *Staphylococcus* fazem parte da flora normal da pele e mucosas em humanos, tendo nichos específicos de acordo com a espécie em causa. Existem 41 espécies neste género sendo que, de todas as espécies, *S. aureus* foi a primeira a ser reconhecida como agente patogénico humano, estando associado a uma elevada taxa de mortalidade e morbilidade (Miragaia & Lencastre, 2014).

*S. aureus* é uma bactéria Gram-positivo, com forma de cocos esféricos (0.5 a 1.5  $\mu$ m de diâmetro), imóvel, não esporolada, anaeróbia facultativa, catalase positiva, oxidase negativa e que cresce a temperaturas entre os 18 e 40 °C. As colónias em gelose de sangue apresentam-se arredondadas, convexas, brilhantes e opacas. Neste meio é, em geral, observada uma zona de hemólise a envolver a colónia (Kloos, 1999). A principal característica que distingue esta espécie das restantes, é que o *S. aureus* apresenta uma proteína ligada à parede celular, capaz de aglutinar o plasma, denominada de coagulase. Com base nesta característica, o género *Staphylococcus* divide-se no grupo dos estafilococos coagulase positiva (*S. aureus* e outros estafilococos pouco frequentes em



humanos) e no grupo dos estafilococos coagulase negativa (maioria das outras espécies de *Staphylococcus*). (Santos et al., 2007; Miragaia & Lencastre, 2014).

O Homem constitui um reservatório natural para *S. aureus*, sendo o principal nicho ecológico a parte interna e anterior das narinas. *S. aureus* é principalmente um agente patogénico extracelular, pelo que a sua patogenicidade está essencialmente associada à capacidade de produção de fatores extracelulares tais como, fatores de adesão, de evasão e de invasão. Está frequentemente associado a infeções da pele e tecidos moles, como é o caso das feridas de pé diabético, endocardite, pneumonia, pneumonia necrosante, osteomielite, entre outras (Miragaia & Lencastre, 2014).

Um aspeto particularmente preocupante é a aquisição da resistência à meticilina pela maioria dos isolados de *S. aureus*, e consequentemente a todos os  $\beta$ -lactâmicos, através da aquisição do gene *mecA*. Este gene é responsável pela síntese da proteína de ligação à penicilina 2a (PLP2a), implicada na síntese do peptidoglicano, que apresenta uma baixa afinidade para a penicilina (Berger-Bachi & Rohrer, 2002).

Com o crescente aparecimento de resistências aos antibióticos, as estratégias atuais para o tratamento das infeções por *S. aureus* tornam-se cada vez menos eficazes, portanto, a pesquisa de terapêuticas/tratamentos alternativos aos antimicrobianos é imprescindível e urgente (Hecker et al., 2010).

### **2.1.3. Novas estratégias: combate ao problema da resistência bacteriana**

A resistência adquirida por bactérias a antibióticos tem aumentado drasticamente nos últimos anos, o que tem alarmado a comunidade científica, uma vez que as taxas de resistência se encontram elevadas, especialmente em ambiente hospitalar. Posto isto, existem alguns tipos de estratégias que podem ser adotadas na tentativa de contornar o problema da resistência bacteriana. São exemplos a prevenção de infeções bacterianas com o uso de vacinas, o uso racional de antibióticos, o desenvolvimento de novos antibióticos, a caracterização dos genes responsáveis pela resistência, entre outros (WHO, 2001). Nesse sentido, a pesquisa de novas substâncias antimicrobianas efetivas contra microrganismos patogénicos resistentes aos fármacos atuais é de extrema importância e urgência.

Os recursos naturais têm sido amplamente explorados nos últimos anos, nomeadamente os cogumelos, uma vez que podem ser uma fonte de novos potenciais antimicrobianos. Os produtos naturais são compostos químicos ubíquos, tipicamente produzidos por organismos vivos em resposta a estímulos externos, e que geralmente têm

atividade biológica ou farmacológica. Desde há milhares de anos que os produtos naturais têm sido utilizados na medicina tradicional como remédios, aplicados na forma de pomadas, poções e infusões. Nos dias de hoje, segundo a OMS, 70-95% da população mundial depende de medicamentos tradicionais para as necessidades de cuidados primários de saúde (WHO, 2011). As práticas medicinais tradicionais serviram de base a um número impressionante de medicamentos atualmente comercializados, como é o caso da aspirina (ácido acetilsalicílico isolado da casca do salgueiro *Salix alba* L.) e da morfina, isolada de *Papaver somniferum* L. (Butler, 2004; Alves et al., 2012; Dias et al., 2012).

Dentro desta grande fonte de princípios ativos que são os produtos naturais, encontram-se os cogumelos. Os cogumelos têm sido utilizados não só como medicamentos desde o princípio das civilizações, mas também como fonte de alimento. Dada a variedade de componentes químicos presente nos cogumelos, estes podem ser considerados uma fonte promissora de substâncias com potencial para novos produtos farmacêuticos.

## **2.2. Cogumelos como fonte de compostos antimicrobianos**

Desde há centenas de anos que os cogumelos medicinais são utilizados tradicionalmente na medicina alternativa de certas culturas, como é o caso da cultura chinesa e japonesa. Nas últimas décadas, o consumo de cogumelos tem aumentado, não só pelos fatores organoléticos e pelas suas propriedades nutricionais, mas também devido à evidência científica da sua capacidade de auxiliar o organismo no combate e prevenção de diversas doenças (Lindequist et al., 2005; Ferreira et al., 2009; Kalac, 2012).

Os cogumelos apresentam um grande valor nutricional uma vez que são bastante ricos em proteínas, apresentam um conteúdo importante em aminoácidos e fibras essenciais, e ainda por serem pobres em gordura. Os cogumelos comestíveis também fornecem um conteúdo nutricionalmente significativo de vitaminas (B1, B2, B12, C, D e E) (Mattila et al., 2000; Heleno et al., 2010), ácidos gordos insaturados, compostos fenólicos, tocoferóis, ácido ascórbico e carotenóides (Barros et al., 2007, 2008a, b; Ferreira et al., 2009; Vaz et al., 2010; Pereira et al., 2012).

São vários os extratos de cogumelos, bem como metabolitos secundários que têm sido relatados pela comunidade científica, como desempenhando importantes funções biológicas, tais como: atividade antioxidante, anti-tumoral, anti-inflamatória, imunomoduladora, hipoglicémica (Ferreira et al., 2009, 2010; Taofiq et al., 2016),



capacidade de inibição da agregação plaquetária (Hokama & Hokama, 1981), redução das concentrações de colesterol (Jeong et al., 2010), prevenção ou alívio de doenças cardíacas (Jeong et al., 2010) e atividade antimicrobiana (Alves et al., 2012).

No que diz respeito à atividade antimicrobiana, acredita-se que os cogumelos precisam de compostos antibacterianos e antifúngicos para sobreviver no seu ambiente natural, não sendo por isso surpreendente o facto deste tipo de compostos poderem ser isolados de cogumelos (Lindequist et al., 2005).

Já no início dos anos 20, do fungo *Sparassis crispa*, foi isolado um composto antifúngico e antibacteriano, o Sparassol. A descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928 é considerada o grande marco no tratamento das infeções bacterianas, e também este agente antibiótico foi produzido por um fungo, o *Penicillium notatum*. Desde então, são vários os compostos antifúngicos e antibacterianos que têm vindo a ser isolados de diferentes espécies fúngicas (Demir & Yamaç, 2008; Sousa et al., 2016).

São inúmeros os estudos que relatam a capacidade antibacteriana de diferentes espécies de cogumelos, conforme a tabela 2.2. Por exemplo, para o cogumelo mais cultivado do mundo, o *Agaricus bisporus*, está demonstrada actividade contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus flavus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (Tambekar et al., 2006; Barros et al., 2008a; Ozen, et al., 2011; Ozturk, et al., 2011).

**Tabela 2.2-** Cogumelos com atividade antimicrobiana contra microrganismos mais relevantes a nível hospitalar (Adaptado de Alves et al., 2012)

<b>Microrganismo</b>	<b>Espécie de cogumelo</b>	<b>Atividade antimicrobiana</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lentinula edodes</i>	IZD = 8mm
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lentinula edodes</i>	CMI > 1.5 - >50 mg/mL
MRSA	<i>Lentinula edodes</i> , <i>Phellinus linteus</i>	CMI=500 ug/ml
<i>Escherichia coli</i>	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Armillaria mellea</i> , <i>Boletus edulis</i> , <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Clitocybe alexandri</i> , <i>Clitocybe geotropa</i> , <i>Cortinarius sp.</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Hydnum repandum</i> , <i>Irpex lacteus</i> , <i>Lactarius camphoratus</i> , <i>Lactarius delicious</i> , <i>Lactarius piperatus</i> , <i>Lactarius volemus</i> , <i>Laetiporus sulphureus</i> , <i>Lentinula edodes</i> , <i>Lepista nuda</i> , <i>Leucoagaricus cf. cinereus</i> , <i>Macrolepiota procera</i> , <i>Marasmius sp.</i> , <i>Marasmius cf. bellus</i> , <i>Meripilus giganteus</i> , <i>Meripilus giganteus</i> , <i>Morchella costata</i> , <i>Morchella hortensis</i> , <i>Navesporus floccosa</i> , <i>Paxillus involutus</i> , <i>Phellinus rimosus</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Rhizopogon roseolus</i> , <i>Sparassis crispa</i> , <i>Suillus collitinus</i>	CMI=250ug/ml - >50 mg/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Agaricus bitorquis</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Lactarius piperatus</i> , <i>Lentinula edodes</i> , <i>Lepista nuda</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Ramaria flava</i>	CMI = 0.5 mg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Boletus edulis</i> , <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Cortinarius sp.</i> , <i>Cortinarius abnormis</i> , <i>Cortinarius ardesiacus</i> , <i>Cortinarius archeri</i> , <i>Cortinarius austroalbidus</i> , <i>Cortinarius austrovenetus</i> , <i>Cortinarius austroviolaceus</i> , <i>Cortinarius coelopus</i> , <i>Cortinarius clelandii</i> , <i>Dermocybe sp.</i> , <i>Cortinarius fulvoiubatus</i> , <i>Cortinarius ianthinus</i> , <i>Cortinarius memoria-annae</i> , <i>Cortinarius persplendidus</i> , <i>Cortinarius sinapicolor</i> , <i>Cortinarius submagellanicus</i> , <i>Cortinarius tricholomoides</i> , <i>Cortinarius vinosipes</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Hydnum repandum</i> , <i>Lactarius camphoratus</i> , <i>Lactarius delicious</i> , <i>Lactarius piperatus</i> , <i>Lactarius volemus</i> , <i>Laetiporus sulphureus</i> , <i>Lentinula edodes</i> , <i>Lepista nuda</i> , <i>Macrolepiota procera</i> , <i>Navesporus floccosa</i> , <i>Phellinus rimosus</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Ramaria flava</i>	CMI = 0.5–100 mg/mL

A atividade microbiana é expressa em CMI (concentração mínima inibitória) e IZD (zona interna do diâmetro)

### 2.2.1. O Shiitake (*Lentinula edodes*)

*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler, é um cogumelo nativo da Ásia Oriental, de nome chinês “*Shiang-gu*”, e nome japonês “*shiitake*”. É o segundo cogumelo comestível mais importante a nível de produção (Chang & Miles, 2004). Trata-se de um fungo aeróbio, saprotrófico, que coloniza madeira de várias espécies. Possui micélio septado, reproduz-se sexuadamente por intermédio de esporos exógenos (basidiósporos) ou assexuadamente (reprodução vegetativa) pela fragmentação do micélio (Alexopoulos & Beneke, 1952).

O cogumelo Shiitake possui esta designação pois está associado à árvore *shii*, nome da árvore *Castanopsis cuspidata* que fornece os troncos mortos essenciais ao seu desenvolvimento, e *take* que em japonês designa cogumelo (Wasser, 2005).

Taxonomicamente e tendo como base características macro e micro-morfológicas, bem como outras características, incluindo a análise de DNA, *L. edodes* pertence ao reino Fungi, divisão Basidiomycota, classe Agaricomycetes, ordem Agaricales, da família Tricholomataceae, estando incluído no género *Lentinula*. O epíteto específico *edodes* é derivado da palavra latina para "comestível" (Chen, 2005).

Este cogumelo possui propriedades bioativas como ações anti-trombótica, hipocolesterolémica, imunomoduladora, antifúngica, antibacteriana e antiviral (Jong & Birmingham, 1993).

#### 2.2.1.1. Origem e características

O cogumelo Shiitake é um saprófita que cresce naturalmente em troncos de madeira em decomposição de árvores de folha larga e caduca, particularmente nas árvores *Shii*, *Pasania* spp., *Quercus* spp. e outros carvalhos e faias asiáticos. A sua distribuição normal inclui climas quentes e húmidos no sudeste da Ásia (Stamets, 2011).

Em relação às suas características morfológicas, destacam-se (Silva et al., 2010):

- **Chapéu:** apresenta uma coloração castanha escura no centro e mais clara na periferia; é convexo, quase plano e possui uma superfície seca e fibrosa.
- **Lâminas:** brancas muito finas, de forma subcilíndrica, lisas e de paredes delgadas; tornam-se serrilhadas ou irregulares com a idade.
- **Pé:** fibroso, desprovido de anel e volva; tem 3 a 5 cm de largura e 8 a 13 mm de grossura.

O aspeto geral deste tipo de cogumelos pode ser visto na figura 2.3.



**Figura 2.3-** Aspeto geral do Shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler). (Fonte EOL)

### 2.2.1.2. Propriedades antimicrobianas do Shiitake

Diversos estudos comprovaram que o Shiitake possui compostos com atividade antibiótica atuando sobre microrganismos de natureza bacteriana, fúngica e viral. Vários extratos de *L. edodes* têm sido identificados como capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* e *E. coli*, devido à formação de ácido oxálico, um cristal comum nas superfícies celulares dos micélios de muitas espécies de cogumelos (Bender, et al., 2001). Ishikawa e colaboradores (2001) confirmaram a presença de substâncias com alto efeito inibitório, no filtrado da cultura do micélio e no extrato de micélio de *L. edodes* a *Bacillus subtilis*. Uma outra substância, a lentionina, proveniente da cultura líquida do crescimento micelial de *L. edodes* apresentou atividade inibitória contra *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium* e *Candida albicans* (Hatvani, 2001).

Além dos metabolitos extracelulares serem capazes de inibir os microrganismos, também os polissacarídeos de alto peso molecular, como o lentinano, têm essa capacidade. O lentinano  $[(C_6H_{10}O_5)_n]$  é um polissacarídeo com uma massa molecular média de 500 kDa, e que muitos autores apontam como tendo atividade antimicrobiana (Chihara, 1992). Este polissacarídeo é capaz de inibir *C. albicans* e *S. aureus* e de retardar o desenvolvimento do *Mycobacterium tuberculosis* (Wasser & Weis, 1999). Jong e Birmingham (1993) referem que o lentinano, substância isolada do extrato aquoso do corpo de frutificação do cogumelo, apresenta atividade antibacteriana contra *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Também num estudo com extrato aquoso contra *Pseudomonas* spp., o extrato foi significativamente mais ativo que a ciprofloxacina (controlo positivo) (Hearst, 2009). Este resultado é de extrema

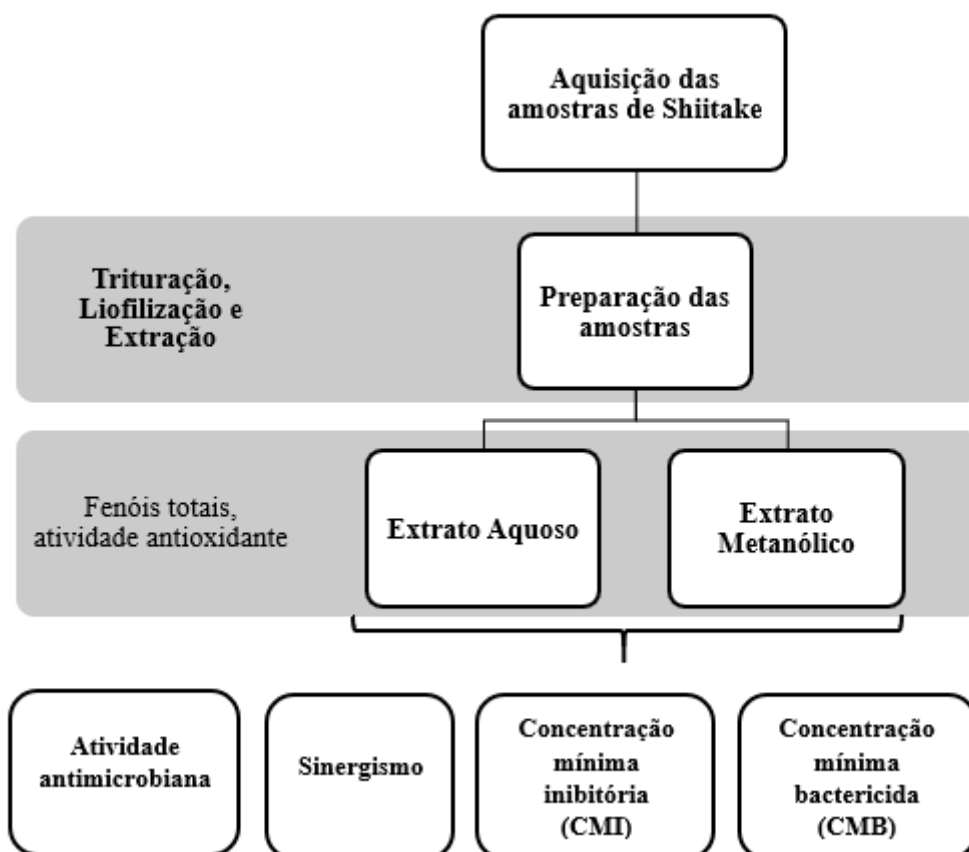
significância uma vez que estirpes de *Pseudomonas* spp. são consideradas, de acordo com a OMS, como agentes patogénicos de prioridade crítica (WHO, 2017a).

Outros metabolitos, como os compostos fenólicos, também possuem atividade antibacteriana uma vez que interferem na membrana celular do patógeno, levando à morte do mesmo (Ribeiro et al., 2015). Dentro destes compostos destacam-se os ácidos p-hidroxibenzóico e protocatecúico, principalmente contra bactérias de Gram-positivo (Teke et al., 2011; Alves et al., 2013). Chowdhury et al., (2015) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos metanólicos de 3 espécies de cogumelos comestíveis (*Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Hypsizygus tessulatus*) sendo o Shiitake quem apresentou melhor atividade antibacteriana. Os autores consideram que esta atividade possa estar relacionada com o conteúdo em compostos bioativos (compostos fenólicos, flavonoides e ácido ascórbico) que também foi superior no extrato metanólico do cogumelo Shiitake.

Deste modo, os macrofungos tornam-se numa fonte de novos compostos bioativos, uma vez que produzem um grande número de metabolitos com atividade antibacteriana para as espécies estudadas.

### **3. Material e Métodos**

Neste capítulo estão descritos todos os materiais e metodologias utilizados para a concretização dos objetivos inicialmente propostos. O trabalho foi estruturado em quatro partes: a primeira consistiu na realização de ensaios *in vitro* para determinação da atividade antimicrobiana; a segunda na avaliação do efeito sinérgico entre extratos e antibióticos comerciais; a terceira na determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB); e a quarta na quantificação dos fenóis totais e atividade antioxidante, conforme esquema da figura 3.1.



**Figura 3.1-** Representação esquemática do procedimento experimental adotado

### 3.1. Origem das amostras dos cogumelos e dos isolados

As amostras de cogumelo Shiitake foram disponibilizadas pela empresa *Chikioshira SAG, Lda* no âmbito do projeto FungiTech, e resultam de inoculação em tronco de carvalho em estufa. Os extratos prepararam-se a partir de duas variedades de cogumelo *Lentinula edodes* inteiro, nomeadamente Koshin e Donko, através da extração com água ou metanol. Os extratos foram preparados e caracterizados no Laboratório de Química da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD).

Os isolados bacterianos utilizados fazem parte das coleções MJMC e MJH, conservadas no Laboratório de Microbiologia Médica do Departamento de Ciências Veterinárias da UTAD, e resultam de amostras recolhidas desde 2004, no âmbito de protocolos estabelecidos entre o Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro (CHTMAD) sob a coordenação científica da Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria José Saavedra e Prof.<sup>a</sup> Doutora Conceição Fernandes e aprovados pela Comissão de Ética do CHTMAD.

A coleção MJMC001 – MIMC114 é composta por isolados provenientes de feridas de pé diabético do serviço de Medicina Interna – Consulta do Pé Diabético, e a coleção MJMC500 – MJMC700 por isolados de úlceras de diferentes serviços do CHTMAD. Da coleção MJH, fazem parte isolados de Gram-negativo resistentes aos carbapenemos, com diversas origens biológicas, destacando-se as estirpes de *Klebsiella pneumoniae*. Todas as estirpes são de origem humana e encontram-se conservadas neste Laboratório a  $-70^{\circ}\text{C}$ , em alíquotas de meio BHI (Brain Heart Infusion) com 15% (v/v) de glicerol.

A identificação dos isolados bacterianos foi efetuada com recurso às características morfológicas das colónias, coloração de Gram, métodos de identificação bioquímica convencionais e painéis de identificação (MicroScan WalkAway).

Na caracterização do perfil de sensibilidade dos isolados, e tal como na identificação, utilizam-se os painéis MicroScan WalkAway. Em síntese, os painéis apresentam 96 micropoços com um conjunto de antibióticos selecionados, em concentrações variadas, desidratados e com meio de cultura. Em todos os painéis existem também poços que contém apenas meio de cultura (controlo). A suspensão de microrganismo a ser testada deve ser diluída numa solução salina, a uma concentração aproximada de 0.5 na escala de McFarland. O aparelho monitoriza o crescimento em cada um dos poços do painel durante um intervalo de tempo que pode variar entre 16 a 20 horas. No final do tempo de incubação, os valores de CMI são determinados para cada antibiótico contido no painel. Um resultado interpretativo (sensível, intermédio ou resistente) será assinalado juntamente com uma CMI, de acordo com as interpretações definidas pelo CLSI.

O estudo da atividade antimicrobiana foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Veterinárias da UTAD.

### **3.1.1. Preparação dos extratos de Shiitake**

Foram preparados dois extratos diferentes para cada uma das variedades, Koshin e Donko, de cogumelo *Lentinula edodes*, nomeadamente extratos aquosos e extratos metanólicos, usando a mesma metodologia. Antes da extração, os cogumelos foram



conservados a -20 °C, liofilizados e posteriormente triturados para obtenção de um pó fino.

Os extratos foram preparados adicionando-se 200 mL de solvente (água destilada ou metanol a 80%) a 10 g de cogumelos secos (5% p/v). A mistura foi agitada (agitador orbital, uma hora, 150 rpm) e depois centrifugada 3500 rpm (centrífuga Sigma 3-30K, Alemanha). O sobrenadante foi filtrado (filtro Whatman nº 4), posteriormente foram adicionados 100 mL do solvente (água destilada ou metanol a 80%) ao sedimento (10% p/v). Este procedimento foi repetido 4 vezes, perfazendo um total de 600 mL. No caso da extração com água destilada, o volume extraído foi armazenado a -20 °C antes da liofilização para obtenção do extrato final. No caso do extrato metanólico, antes da liofilização para obtenção do extrato final, levou-se o volume total extraído (600 mL) ao evaporador rotativo para que dessa forma se pudesse evaporar o metanol.

### **3.2. Avaliação da atividade antibacteriana**

Nesta parte do trabalho foi realizada a avaliação do efeito antibacteriano dos extratos aquosos e metanólicos das duas variedades de Shiitake. Para tal foram feitos três tipos de abordagens: (i) *screening* da atividade antibacteriana, (ii) avaliação do efeito sinérgico entre extratos e antibióticos, e (iii) determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB).

Os testes de suscetibilidade aos extratos foram efetuados de acordo com os procedimentos adaptados nas normas do Comité Europeu de Testes de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (EUCAST, 2018), pelos métodos de difusão em disco em meio sólido e pela determinação da concentração mínima inibitória (CMI). Para a leitura e interpretação dos halos de inibição dos antibióticos comerciais, utilizaram-se as guidelines do EUCAST.

#### **3.2.1. Screening da atividade antibacteriana**

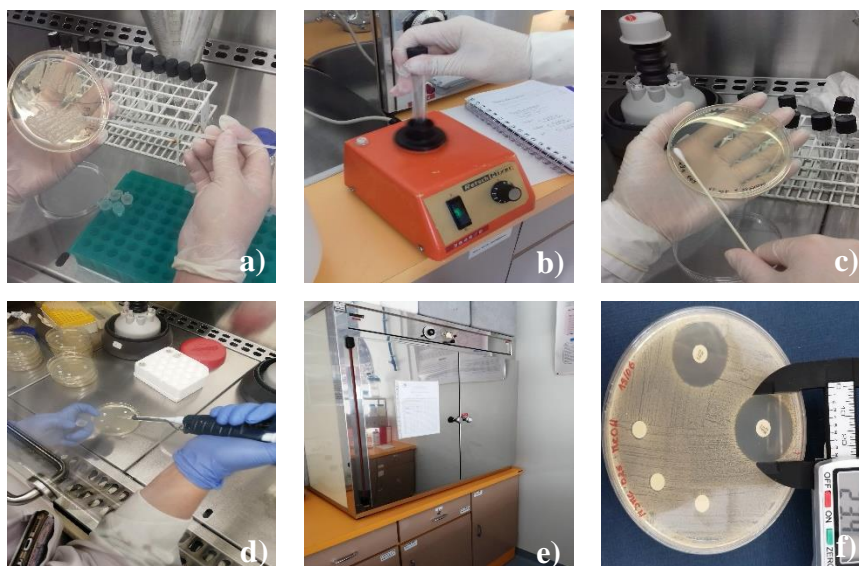
Para a realização do *screening* da atividade antibacteriana recorreu-se ao método da difusão em disco em meio sólido Mueller-Hinton Agar, de acordo com as normas EUCAST, com adaptação do método de difusão em disco originalmente descrito por Bauer *et al.* (1966). Este método baseia-se no princípio da difusão, através do agar, do composto depositado num disco estéril de papel de filtro. A ocorrência de um efeito antibacteriano observa-se pela formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano. Trata-se de um método prático e expedito para bactérias de crescimento

rápido, apresentando uma grande flexibilidade na escolha do número e do tipo de compostos a utilizar.

Antes de iniciar o procedimento foi necessário preparar o meio de cultura Mueller-Hinton Agar (Oxoid CM0337) segundo as indicações do fabricante (Anexo I), e de seguida foi colocado a esterilizar no autoclave (Modelo 075-L, JSM). Após esterilização, o meio foi distribuído em placas de Petri na câmara de fluxo laminar (Telstar Bio II Advance). Este é o meio de referência para a realização de antibiogramas, e tem que ser distribuído em placas de Petri de 92x16 mm (Sarstedt, Germany) de forma a que fique com uma altura de 4 mm de meio. Estas especificações são necessárias porque o tamanho do halo de inibição é influenciado pela profundidade do ágar, uma vez que o antimicrobiano se difunde em três dimensões, isto é, uma camada rasa de ágar produz uma zona de inibição maior do que uma camada mais profunda (Flanagan & Steck, 2017). Quanto aos isolados, estes foram semeados em Brain Heart Infusion Agar (Oxoid CM0225), a partir de culturas criopreservadas, e incubados a  $35 \pm 2$  °C durante 24h.

Posteriormente, fez-se a preparação do inóculo a utilizar nos ensaios, em condições de assépsia, e que consistiu na realização de uma suspensão em solução salina (0,9 % NaCl, MERCK), com a turbidez ajustada através de um densitómetro para o valor de 0.5 na escala de McFarland. De seguida inoculou-se pelo método de esgotamento à superfície. Aplicaram-se discos brancos estéreis (Oxoid CT0998B) com a ajuda de um dispenser e impregnaram-se com 12 µL dos extratos a testar. Os extratos foram dissolvidos em DMSO 10% e testados nas concentrações de 500 µg.mL<sup>-1</sup> e 1000 µg.mL<sup>-1</sup>. Como controlo negativo foi utilizado o solvente de ressuspensão (DMSO 10%) e como controlo positivo utilizou-se o antibiótico comercial Gentamicina (10 µg).

As placas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C durante 24 horas. Após esse período de incubação, fez-se uma medição do diâmetro dos halos de inibição. Na figura 3.2 são mostrados os diferentes passos executados.



**Figura 3.2-** Avaliação da atividade antibacteriana. **a)** Obtenção da colónia pura; **b)** Suspensão em tubo com soro fisiológico (0,5 na escala de McFarland); **c)** Inoculação pelo método de esgotamento à superfície em Mueller-Hinton agar; **d)** Impregnação dos discos com extratos; **e)** Incubação na estufa a  $35 \pm 2$  °C durante 24 horas; **f)** Medição dos halos de inibição.

A atividade antibacteriana dos extratos foi classificada segundo Aires *et al.*, 2009, como *Sem eficácia*, *Eficácia moderada*, *Boa eficácia* e *Elevada eficácia*, conforme a tabela 3.1:

**Tabela 3.1-** Método de classificação da atividade antibacteriana

<b>Sem eficácia</b>	(-)	Halo de inibição = 6
<b>Eficácia moderada</b>	(+)	$0 < \text{halo de inibição} < \text{halo de inibição do antibiótico}$
<b>Boa eficácia</b>	(++)	$\text{Halo de inibição do antibiótico} < \text{halo de inibição} < 2x \text{ halo de inibição do antibiótico}$
<b>Elevada eficácia</b>	(+++)	$\text{Halo de inibição} > 2x \text{ halo de inibição do antibiótico}$

Para a determinação da eficácia relativa, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Eficácia Antibacteriana Relativa (\%)} = \frac{[\text{halo de inibição}_{\text{extrato}} - \text{halo de inibição}_{\text{controlo negativo}}]}{\text{halo de inibição}_{\text{controlo positivo}}} \times 100$$

Esta equação compensa eventuais efeitos inibitórios do solvente DMSO e expressa a eficácia do extrato em relação à eficácia do antibiótico (Saavedra et al., 2012; Freitas et al., 2013).

### 3.2.2. Avaliação do efeito sinérgico entre extratos e antibióticos

Para a avaliação do efeito sinérgico recorreu-se ao método de difusão em disco em meio sólido (descrito em 3.2.1). Foram dispensados nas placas dois discos por antibiótico e num deles foi feita suplementação com 12 µL de extrato. Utilizaram-se oito antibióticos, nomeadamente a Gentamicina (CN), Amoxicilina/Ácido clavulânico (AMC), Ciprofloxacina (CIP), Vancomicina (VA), Levofloxacina (LEV), Imipenemo (IPM), Ertapenemo (ETP) e Meropenemo (MEM), pertencentes a quatro classes (Tabela 3.2).

Tanto na avaliação da atividade antibacteriana, como na avaliação do efeito sinérgico, as leituras foram realizadas por dois operadores distintos.

**Tabela 3.2-** Classe dos antibióticos utilizados no ensaio do efeito sinérgico

Classe de Antibiótico		Antibiótico
β-lactâmicos	Penicilinas	Amoxicilina/Ácido clavulânico (AMC)
	Carbapenemos	Imipenemo (IPM), Ertapenemo (ETP), Meropenemo (MEM)
Aminoglicosídeos		Gentamicina (CN)
Glicopeptídeos		Vancomicina (VA)
Fluoroquinolonas		Ciprofloxacina (CIP), Levofloxacina (LEV)

### 3.2.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A Concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos da variedade Koshin foi avaliada através do método da microdiluição em placa com resazurina, adaptado de Sarker *et al.*, (2007). Este método utiliza um indicador de oxidação-redução, a resazurina, que se torna rosa e fluorescente quando reduzido a resorufina por oxirredutases existentes no interior de células viáveis, o que permite a deteção de crescimento microbiano em volumes extremamente pequenos de solução sem a utilização de um espectrofotómetro.

Na realização deste método utilizaram-se microplacas estéreis de 96 poços (Tissue Culture Testplates, Orange Scientific, 96 Wells Flat, USA) de fundo chato e tampa.

Para a preparação do inóculo bacteriano, transferiu-se em condições de assépsia o isolado a testar para um frasco contendo 50 mL de caldo Mueller-Hinton e incubou-se over-night a 37 °C. Após 12-18 horas de incubação procedeu-se à leitura da densidade ótica a 500 nm (valores entre 0.5-1 para uma concentração de  $5 \times 10^6$  UFC/mL).

Na placa, foram distribuídos asseticamente 100  $\mu$ L de caldo Mueller-Hinton (Oxoid), com exceção dos poços das linhas A onde foram adicionados 200  $\mu$ L dos compostos a testar. A partir de cada poço dessa linha transferiu-se para o poço da linha seguinte 100  $\mu$ L, e assim sucessivamente até à linha H (diluições seriadas). As colunas 1, 2 e 3 correspondem aos controlos, sendo que foram realizados dois controlos negativos, um com Mueller-Hinton caldo e outro com DMSO 10%, e um controlo positivo (gentamicina).

Para cada composto foram testadas 8 concentrações: 1000  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, 500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, 250  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, 125  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, 62.5  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, 31.3  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, 15.6  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> e 7.8  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>.

Após as diluições adicionou-se a cada poço 20  $\mu$ L de inóculo e 20  $\mu$ L de solução de resazurina (Sigma – Aldrich). As placas foram tapadas e incubadas a  $35 \pm 2$  °C durante 18-24 horas.

A leitura foi feita visualmente através da observação da mudança de cor azul para rosa (redução da resazurina). Nos poços onde a cor permanece azul, significa que não ocorreu redução e, portanto, indica a inviabilidade bacteriana. Já nos poços onde se verifica alteração da cor de azul para rosa, considera-se que há viabilidade bacteriana.

Para a determinação da concentração mínima bactericida (CMB, menor concentração de extrato que diminui o crescimento bacteriano a pelo menos 99.0%), semeou-se o conteúdo de cada poço em que não houve alteração de cor em meio sólido Mueller-Hinton. Após o plaqueamento, incubaram-se as placas durante a noite a 37 °C para confirmar a existência ou não crescimento bacteriano.

### **3.3. Caracterização dos extratos de Shiitake**

#### **3.3.1. Determinação dos fenóis totais**

O conteúdo fenólico total nos extratos (duas variedades  $\times$  2 solventes) foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (Singleton Vernon et al., 1999). Em síntese, misturaram-se 5  $\mu$ L de extrato na concentração de 1  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (0.01 a 1.0  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> em metanol) com 195  $\mu$ L de água destilada numa placa de 96 poços, seguindo-se da adição

de 25 µL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após um período de incubação de 5 minutos, adicionou-se carbonato de sódio (75 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7%) e incubou-se por 2 horas no escuro e à temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 725 nm num leitor de microplacas Biotek Powerwave XS2 (BioTek Instruments, Inc. EUA) a 25 °C. Os resultados são expressos em mg de equivalente de ácido gálico por grama de peso seco (mg de GAE/g de peso seco), determinados através da equação da reta de calibração, obtida com padrões de ácido gálico.

### 3.3.2. Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

A determinação da atividade antioxidante *in vitro* foi realizada pelo método de “scavenging” do radical ABTS<sup>•+</sup>, de acordo com o método adaptado de Re *et al.*, (1999). O ensaio do radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)) também é conhecido como ensaio de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC). Preparou-se uma solução de ABTS a 7,4 mM com 2,45 mM de persulfato de potássio na razão 1:1 e incubou-se no escuro durante 16 horas à temperatura ambiente. Numa microplaca com 96 poços misturou-se 10 µL de extrato com 190 µL da solução ABTS e, após incubação, durante 6 min, no escuro e à temperatura ambiente, efetuou-se uma leitura a 734 nm num leitor de microplacas. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos por capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (mM trolox/g peso seco). A atividade antioxidante foi calculada também em termos de percentagem de inibição, de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = [(Abs \text{ controlo} - Abs \text{ amostra}) / (Abs \text{ controlo})] * 100$$

### 3.4. Análise estatística

Os resultados da avaliação da atividade antibacteriana são expressos como média ± desvio padrão.

Quanto à caracterização química dos extratos, todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os dados são expressos como média ± desvio padrão e foram analisados estatisticamente por análise de variâncias unidirecional (*one-way* ANOVA), seguidos do teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak's. As análises estatísticas foram realizadas usando o GraphPad Prim para Windows (Versão 7) e as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (95% de significância).

## **4. Resultados e Discussão**

#### 4.1. Identificação dos isolados bacterianos e caracterização da suscetibilidade a antibióticos

Para este estudo foram selecionados isolados da coleção MJH de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenemos, e de *Staphylococcus aureus* resistentes/sensíveis à meticilina, da coleção MJMC. Além disso, utilizaram-se duas estirpes de referência (CETC- Colección Española de Cultivos Tipo), contabilizando um total de 23 isolados, 8 de Gram-negativo e 15 de Gram-positivo (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1-** Origem e identificação dos isolados bacterianos

Estirpes	Origem	Referência dos Isolados
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=7)	Diversas origens	MJH 513, MJH 569, MJH 579, MJH 599, MJH 602, MJH 640, MJH 662
<i>S. aureus</i> MRSA (n=9)	Feridas de pé diabético	MJMC 025, MJMC 027, MJMC 102, MJMC 111
	Úlceras	MJMC 507, MJMC 534 B, MJMC 539, MJMC 545, MJMC 552
<i>S. aureus</i> MSSA (n=5)	Feridas de pé diabético	MJMC 018, MJMC 026, MJMC 109, MJMC 110
	Úlceras	MJMC 511
Estirpe de Referência (n=2)		CETC 434 ( <i>E. coli</i> )
		CETC 976 ( <i>S. aureus</i> )

A caracterização do perfil de suscetibilidade dos isolados feita através de painéis MicroScan WalkAway, mostrou que a maioria dos isolados clínicos utilizados no presente trabalho, correspondem a bactérias multirresistentes (tabelas 4.2 e 4.3), constituindo um problema a nível hospitalar devido às poucas opções terapêuticas. Nos isolados de Gram-negativo (tabela 4.2), destaca-se que todos os isolados foram resistentes à amoxicilina/ácido clavulânico e ao ertapenemo, este último um carbapenemo utilizado como último recurso no tratamento de infeções provocadas por ESBL. Os isolados MJH 569 e MJH 599 foram os que apresentaram um maior número de resistências, sendo evidente a baixa sensibilidade ao grupo dos  $\beta$ -lactâmicos. Além disso, ambos os isolados são produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado.



**Tabela 4.2-** Caracterização do perfil de suscetibilidade dos isolados clínicos de Gram-negativo

	MJH 513	MJH 569	MJH 579	MJH 599	MJH 602	MJH 640	MJH 662
Ampicilina	nd	R	nd	R	nd	R	nd
Amoxicilina/ Ácido clavulânico	R	R	R	R	R	R	R
Piperacilina/ Tazobactam	R	R	nd	R	R	R	R
Imipenem	I	I	I	I	I	I	I
Ertapenemo	R	R	R	R	R	R	R
Meropenem	R	R	I	S	I	R	I
Cefuroxima	nd	R	nd	R	nd	R	nd
Cefoxitina	R	R	nd	S	R	nd	nd
Cefotaxima	R	ESBL	nd	ESBL	R	R	R
Ceftazidima	nd	ESBL	nd	ESBL	nd	R	R
Ciprofloxacina	R	R	nd	R	R	S	S
Fosfomicina	nd	S	nd	S	nd	S	nd
Nitrofurantoína	nd	R	nd	nd	nd	S	nd
Norfloxacina	nd	R	nd	R	nd	S	nd
Levofloxacina	nd	R	nd	R	nd	S	nd
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	I
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	R	R	nd	R	nd	S	R
Tobramicina	R	R	nd	R	nd	S	nd
Amicacina	I	I	nd	I	I	S	I
Colistina	S	nd	nd	nd	S	S	S
Tigeciclina	S	nd	nd	nd	S	nd	S

**Legenda:** S, sensível; I, intermédio; R, resistente; ESBL,  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (esta classificação foi feita de acordo com as guidelines sugeridas pelo CLSI); nd, não determinado.

Quanto aos isolados de Gram-positivo (tabela 4.3), os antibióticos meticilina, amoxicilina/ácido clavulânico, ciprofloxacina e levofloxacina foram os que apresentaram um maior número de resistências. Os isolados MJMC 534 B, MJMC 539 e MJMC 552, provenientes de úlceras variadas, apresentaram multirresistência alargada a 7, 8 e 9 antibióticos, respetivamente, sendo por isso os mais resistentes. A gentamicina e a vancomicina foram os antibióticos mais eficazes, uma vez que treze dos catorze isolados foram sensíveis a estes antibióticos.

**Tabela 4.3-** Caracterização do perfil de suscetibilidade dos isolados clínicos de Gram-positivo

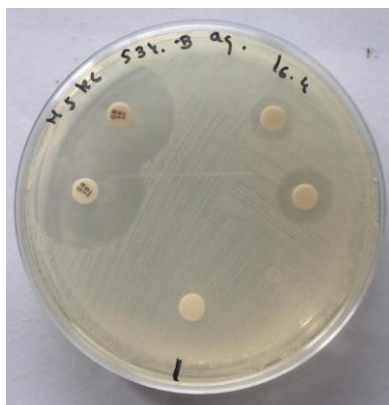
	MJMC 018	MJMC 025	MJMC 026	MJMC 027	MJMC 102	MJMC 109	MJMC 110	MJMC 111	MJMC 507	MJMC 511	MJMC 534 B	MJMC 539	MJMC 545	MJMC 552
Penicilina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	R	R	R
Meticilina	S	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R
Ampicilina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	R	nd	nd	nd	R
Amoxicilina/ Ácido clavulânico	R	S	R	S	R	S	S	R	R	S	R	R	S	R
Oxacilina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	R	S	R	nd	R	R
Clindamicina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	I	I	R	R	nd	R
Daptomicina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	S	S	nd	nd
Eritromicina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	S	R	R	nd	R
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Ciprofloxacina	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	R
Levofloxacina	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	R
Linezolid	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	S	nd	S	S	S	S
Trimetoprim/Sulf ametoxazol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	S	S	S	S	S	S
Vancomicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nd	S	S	S	S

**Legenda:** S, sensível; I, intermédio; R, resistente (esta classificação foi feita de acordo com as guidelines sugeridas pelo CLSI); nd, não determinado.

## 4.2. Avaliação da atividade antibacteriana

### 4.2.1. Screening da atividade antibacteriana

Os resultados do *screening* da atividade antibacteriana traduzem-se na medição dos halos de inibição observados (Figura 4.1) e estão expressos em milímetros (mm). Como referido, as leituras foram realizadas por dois operadores distintos.



**Figura 4.1-** Aspeto das placas no *screening* da atividade antibacteriana

Os resultados do *screening* da atividade antibacteriana dos extratos aquoso e metanólico das duas variedades de cogumelo Shiitake encontram-se apresentados nas tabelas 4.4 e 4.5.

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado por Alves *et al.* (2012), a maioria dos extratos de diferentes cogumelos estudados por vários autores, apresenta maior atividade antibacteriana contra estirpes de Gram-positivo, comparativamente às estirpes de Gram-negativo. Posto isto, começou por se fazer um primeiro ensaio experimental testando os extratos a uma concentração de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em 5 isolados, todos eles de Gram-positivo (tabela 4.4). Observou-se que na concentração testada, não existiram diferenças entre as duas variedades de cogumelo para o mesmo extrato, isto é, o tamanho do halo obtido foi igual tanto para a variedade Donko como para a variedade Koshin. No entanto quanto à eficácia, o extrato aquoso foi classificado como tendo *Eficácia moderada* contra 3 dos isolados testados, ou seja, o diâmetro do halo de inibição produzido foi superior ao diâmetro do disco com DMSO 10%, mas inferior ao halo de inibição do controlo positivo. O isolado MJMC 111 foi o mais sensível (halo de inibição de 8 mm para as duas variedades) aos extratos aquosos das duas variedades de Shiitake. Por outro lado, os extratos metanólicos de ambas as variedades não tiveram qualquer efeito sobre os isolados, ou seja, não houve a produção de um halo de inibição, para além da medida de 6 mm do diâmetro do disco.

**Tabela 4.4-** Comparação do tamanho dos halos de inibição (mm) obtidos com diferentes concentrações de extratos ( $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para os mesmos isolados de Gram-positivo

	Isolado	Extrato aquoso		Extrato metanólico		Controlos	DMSO 10%
		Donko	Koshin	Donko	Koshin	Gentamicina (CN)	
500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	MJMC102	$7 \pm 0,0 (+)$	$7 \pm 0,0 (+)$	$6 \pm 0,0 (-)$	$6 \pm 0,0 (-)$	S $24 \pm 0,0$	$6 \pm 0,0 (-)$
	MJMC109	$7 \pm 0,0 (+)$	$7 \pm 0,0 (+)$	$6 \pm 0,0 (-)$	$6 \pm 0,0 (-)$	S $25 \pm 0,5$	
	MJMC110	$6 \pm 0,0 (-)$	$6 \pm 0,0 (-)$	$6 \pm 0,0 (-)$	$6 \pm 0,0 (-)$	S $25 \pm 0,0$	
	MJMC111	$8 \pm 0,0 (+)$	$8 \pm 0,0 (+)$	$6 \pm 0,0 (-)$	$6 \pm 0,0 (-)$	S $24 \pm 0,5$	
	CETC976	$6 \pm 0,0 (-)$	$6 \pm 0,0 (-)$	$6 \pm 0,0 (-)$	$6 \pm 0,0 (-)$	S $21 \pm 0,0$	
1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	MJMC102	$8 \pm 0,0 (+)$	$12 \pm 0,0 (+)$	$6 \pm 0,0 (-)$	$6 \pm 0,0 (-)$	S $25 \pm 0,5$	$6 \pm 0,0 (-)$
	MJMC109	$9 \pm 0,0 (+)$	$11 \pm 0,0 (+)$	$6 \pm 0,0 (-)$	$6 \pm 0,0 (-)$	S $25 \pm 0,5$	
	MJMC110	$9 \pm 0,0 (+)$	$11 \pm 0,0 (+)$	$6 \pm 0,0 (-)$	$6 \pm 0,0 (-)$	S $25 \pm 0,5$	
	MJMC111	$9 \pm 0,0 (+)$	$10 \pm 0,0 (+)$	$6 \pm 0,0 (-)$	$6 \pm 0,0 (-)$	S $24 \pm 1,0$	
	CETC976	$7 \pm 0,0 (+)$	$7 \pm 0,0 (+)$	$6 \pm 0,0 (-)$	$6 \pm 0,0 (-)$	S $22 \pm 0,0$	

**Nota:** 6 mm corresponde ao diâmetro do disco. **Legenda:** (-) Sem eficácia; (+) Eficácia moderada.

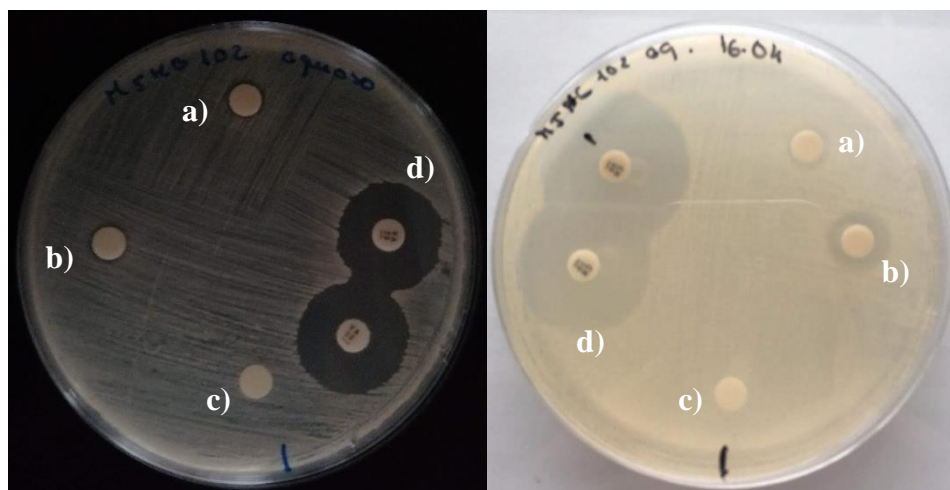
Tendo em conta os resultados promissores obtidos neste primeiro ensaio, decidiu-se testar os extratos a uma maior concentração e num maior número e variedade de isolados. Os extratos foram então testados à concentração de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  nos 5 isolados iniciais (tabela 4.4) e em 18 novos isolados (8 de Gram-negativo e 10 de Gram-positivo) (tabela 4.5).

Com o aumento da concentração dos extratos aquosos e para as duas variedades de Shiitake, verificou-se um aumento do tamanho dos halos de inibição. Além disso, tanto o isolado MJMC 110, como a estirpe de referência CETC 976, passaram de *Sem eficácia* a *Eficácia moderada*, isto é, na concentração de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  não apresentaram sensibilidade ao extrato aquoso, mas com o aumento da concentração foram sensíveis (tabela 4.4).

Por outro lado, o aumento da concentração dos extratos, tanto aquosos como metanólicos, não provocou efeito antimicrobiano contra os isolados de Gram-negativo testados (tabela 4.5). Em contrapartida para os Gram-positivos, apesar dos extratos metanólicos não serem efetivos nesta concentração, os extratos aquosos mostraram efeito em todos os isolados testados, isto é, todos os isolados apresentaram sensibilidade ao extrato, classificando-se o efeito como de *Eficácia moderada* (tabela 4.5).

Outro aspeto interessante que também se pôde verificar foi que, o extrato aquoso da variedade Koshin apresentou melhores resultados do que o extrato aquoso da variedade Donko nalguns isolados de Gram-positivo (Figura 4.2, tabelas 4.4 e 4.5). O menor valor de halo de inibição foi de 7 mm nos isolados MJMC 026, MJMC 027 e CETC 976, e o maior valor verificou-se para o isolado MJMC534 B (16 mm) com a variedade Koshin.

De referir que, para todos os isolados, o antibiótico utilizado como controlo positivo apresentou melhor atividade antibacteriana e que o DMSO 10% não produziu qualquer tipo de efeito sobre os isolados (o valor de 6 mm corresponde ao diâmetro do halo).



**Figura 4.2-** Aspeto dos halos de inibição do extrato aquoso para o isolado MJMC 102 a diferentes concentrações. À esquerda, 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; à direita, 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ : **a)** Extrato de Donko; **b)** Extrato de Koshin; **c)** Controlo negativo (DMSO 10%); **d)** Controlo positivo (gentamicina).

**Tabela 4.5-** Comparação dos valores dos halos de inibição (mm) obtidos com os extratos de Shiitake (concentração 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para isolados de Gram-positivo e Gram-negativo.

		Extrato aquoso		Extrato metanólico		Controlos	
		Donko	Koshin	Donko	Koshin	CN	DMSO 10%
Gram +	MJMC 018	7 $\pm$ 0,0 (+)	10 $\pm$ 0,0 (+)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	S <sup>24 <math>\pm</math> 0,2</sup>	6 $\pm$ 0,0 (-)
	MJMC 025	8 $\pm$ 0,0 (+)	8 $\pm$ 0,0 (+)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	S <sup>22 <math>\pm</math> 0,2</sup>	
	MJMC 026	8 $\pm$ 0,0 (+)	7 $\pm$ 0,0 (+)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	S <sup>22 <math>\pm</math> 0,0</sup>	
	MJMC 027	8 $\pm$ 0,0 (+)	7 $\pm$ 0,0 (+)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	S <sup>22 <math>\pm</math> 0,05</sup>	
	MJMC507	10 $\pm$ 0,0 (+)	10 $\pm$ 0,0 (+)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	S <sup>25 <math>\pm</math> 0,0</sup>	
	MJMC511	10 $\pm$ 0,0 (+)	10 $\pm$ 0,0 (+)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	S <sup>26 <math>\pm</math> 0,5</sup>	
	MJMC534 B	11 $\pm$ 0,0 (+)	16 $\pm$ 0,0 (+)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	S <sup>27 <math>\pm</math> 0,0</sup>	
	MJMC 539	9 $\pm$ 0,0 (+)	9 $\pm$ 0,0 (+)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	R <sup>15 <math>\pm</math> 0,2</sup>	
	MJMC 545	7 $\pm$ 0,0 (+)	8 $\pm$ 0,0 (+)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	S <sup>23 <math>\pm</math> 0,3</sup>	
Gram -	MJMC 552	9 $\pm$ 0,0 (+)	9 $\pm$ 0,0 (+)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	S <sup>25 <math>\pm</math> 0,2</sup>	6 $\pm$ 0,0 (-)
	MJH513	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	S <sup>17 <math>\pm</math> 0,0</sup>	
	MJH569	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	S <sup>21 <math>\pm</math> 0,0</sup>	
	MJH579	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	S <sup>19 <math>\pm</math> 0,5</sup>	
	MJH599	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	S <sup>18 <math>\pm</math> 0,0</sup>	
	MJH602	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	R <sup>22 <math>\pm</math> 0,5</sup>	
	MJH640	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	S <sup>20 <math>\pm</math> 0,0</sup>	
	MJH662	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	R <sup>13 <math>\pm</math> 0,0</sup>	
	CETC434	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	6 $\pm$ 0,0 (-)	S <sup>20 <math>\pm</math> 0,0</sup>	

**Nota:** 6 mm corresponde ao diâmetro do disco. **Legenda:** (-) sem eficácia; (+) eficácia moderada.

As propriedades antimicrobianas do Shiitake contra bactérias têm vindo a ser descritas por diversos autores. Venturini *et al.* (2008) prepararam extratos de 48 espécies de cogumelos, incluindo Shiitake, com diferentes solventes orgânicos e puderam observar

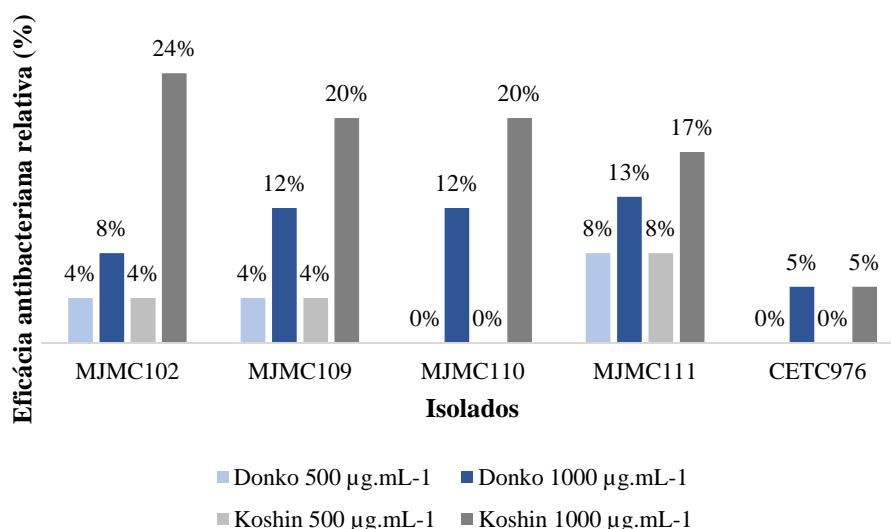
que, de um modo geral e à semelhança dos resultados que obtivemos no nosso trabalho, as bactérias Gram-positivo foram mais sensíveis que as Gram-negativo. Por outro lado, de entre todos os extratos, foram os extratos aquosos de *Clitocybe geotropa* e *Lentinula edodes* os que apresentaram maior atividade antimicrobiana. O extrato aquoso de *L. edodes* foi ativo contra *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*. Os extratos metanólicos apresentaram o segundo maior potencial antibiótico, sendo o extrato de *L. edodes* ativo contra as bactérias de Gram-positivo *Listeria monocytogenes* e *Clostridium perfringens*. Num estudo de 2009, Hearst e colaboradores avaliaram as propriedades antimicrobianas de extratos aquosos de dois cogumelos (*Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*) em 39 microrganismos (29 bactérias e 10 fungos). Nesse estudo, o extrato aquoso de cogumelo Shiitake ( $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentou atividade contra 28 das 29 bactérias. Os maiores valores de halo de inibição verificaram-se para *Pseudomonas* spp. ( $> 86 \text{ mm}$ ), seguindo-se dos halos de inibição para MRSA e MSSA (12 mm) e para *K. pneumoniae* de 8 mm. Chowdhury *et al.* (2015) avaliaram as propriedades antimicrobianas de extratos metanólicos de três cogumelos comestíveis, entre eles *Lentinula edodes*, e verificaram que os extratos de *L. edodes* foram os que apresentaram melhores resultados. Os extratos metanólicos de Shiitake foram ativos contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *E.coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi* e *K. pneumoniae*, tendo-se verificado o maior valor de halo de inibição para *B. subtilis* (17 mm), seguindo-se de *S. aureus* (16 mm). Os resultados obtidos neste trabalho mostram por isso um potencial de ação antibacteriana com interesse. Caso se aumentasse mais a concentração dos extratos testados, eventualmente o valor dos halos de inibição observados nos isolados seria maior e poderia aproximar-se dos halos obtidos com o antibiótico. De facto, para a concentração de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , o extrato aquoso apresentou uma *Eficácia moderada* para 3 dos isolados Gram-positivos testados e na concentração de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , o efeito apresentou-se como *Eficácia moderada* contra todos os isolados de Gram-positivo testados.

O facto de os extratos apresentarem atividade antibacteriana variada contra isolados de Gram-positivo e de Gram-negativo coincide com resultados obtidos noutros estudos, como é o caso de Gebreyohannes *et al.* (2019), que determinaram a atividade antibacteriana de vários tipos de extratos de cogumelos selvagens e observaram que os isolados de Gram-negativo (*E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*) foram mais resistentes, comparativamente aos de Gram-positivo (*S. aureus*). É possível que a resistência dos isolados de Gram-negativo aos extratos esteja relacionada com a

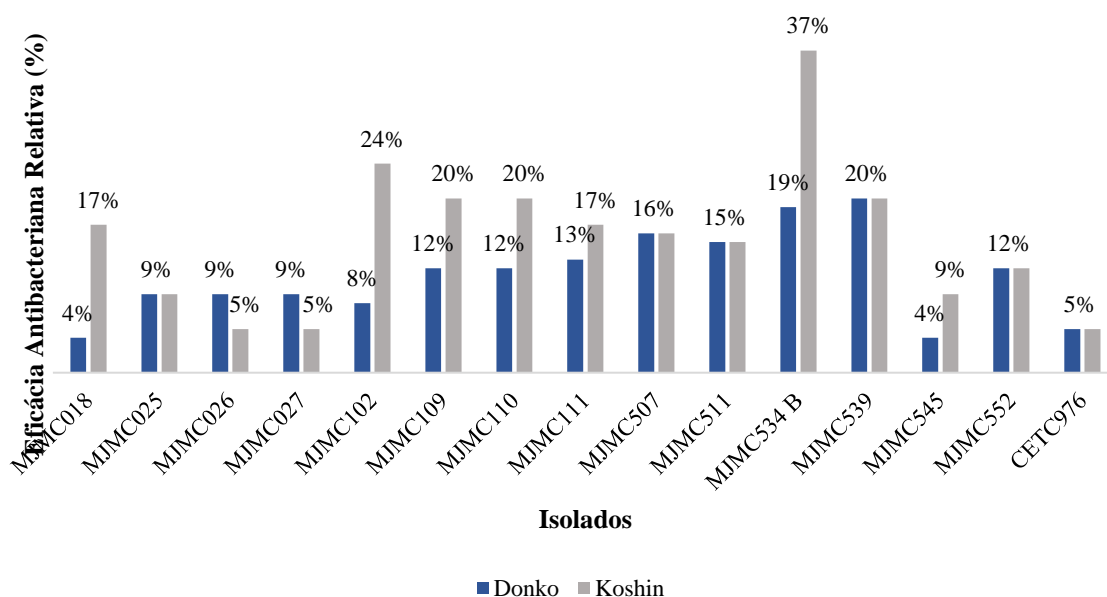
membrana externa que estes microrganismos possuem, composta por uma barreira de lipopolissacarídeos que restringe a penetração da maioria das moléculas (Oliveira et al., 2016).

Aplicando a fórmula da eficácia antibacteriana relativa aos extratos para os quais os isolados foram suscetíveis (extratos aquosos), observou-se que, aumentando a concentração também se aumenta a eficácia. Com o isolado MJMC 110, os extratos aquosos das variedades Donko e Koshin passaram de uma eficácia relativa de 0% para valores consideráveis de 12% e 20%, respetivamente (Figura 4.3). Mais uma vez foi possível demonstrar que a variedade Koshin, foi de um modo geral, a que apresentou melhores resultados, como observado no caso do isolado MJMC 534 B, com uma eficácia relativa de 19% para a variedade Donko e de 37% para a variedade Koshin. Não existem estudos que comparem a atividade antibacteriana entre diferentes variedades de Shiitake, portanto este trabalho é pioneiro nesse sentido.

Destaca-se ainda que os extratos tiveram maior eficácia relativa para isolados de feridas de pé diabético, variando entre 20 e 24% (Figura 4.4).



**Figura 4.3-** Comparação dos valores de eficácia antibacteriana relativa (%) obtidos a diferentes concentrações (500 µg.mL<sup>-1</sup> e 1000 µg.mL<sup>-1</sup>) dos extratos aquosos das variedades Donko e Koshin de Shiitake para os mesmos isolados de Gram-positivo.



**Figura 4.4-** Comparação da eficácia antibacteriana relativa (%) dos extratos aquosos, concentração 1000 µg.mL<sup>-1</sup> entre variedades.

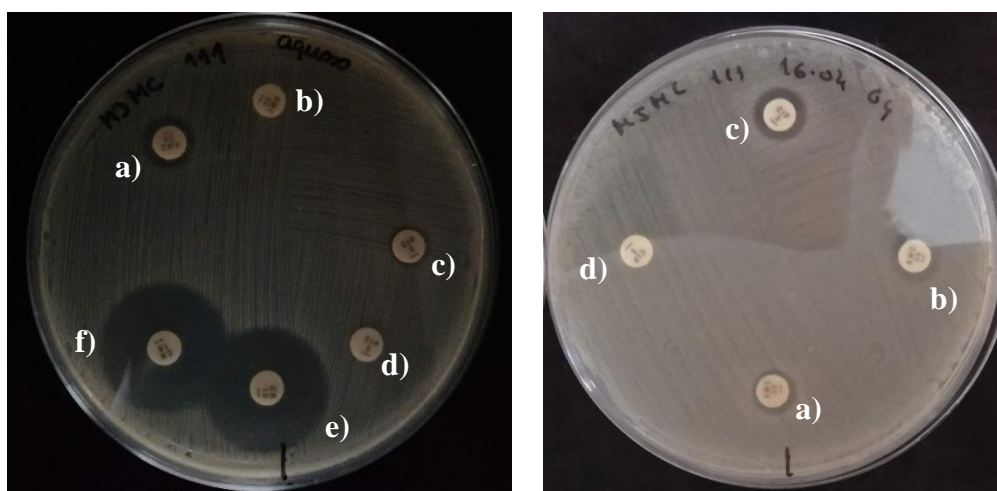
#### 4.2.2. Avaliação do efeito sinérgico entre extratos e antibióticos

As combinações de antibióticos são frequentemente utilizadas na prática clínica para promover o aumento da ação farmacológica ou para alcançar atividade sinérgica no tratamento de infeções bacterianas, aumentando dessa forma a sua eficácia. Assim sendo, o uso de agentes modificadores da resistência torna-se numa estratégia potencial usada para prolongar a vida útil dos antibióticos face ao aumento da resistência (Abreu et al., 2015). Sendo do conhecimento científico que os extratos de plantas possuem não só propriedades antibacterianas, mas também a capacidade de aumentar a actividade de um antibiótico em combinação com este, tal abordagem torna-se útil uma vez que poderá ser possível reduzir a dose efetiva de antibióticos e também reduzir os efeitos colaterais dos mesmos (Stefanovic, 2018).

A avaliação do efeito sinérgico baseou-se no método de difusão em disco em meio sólido, onde foram dispensados dois discos iguais de antibióticos, em que um deles foi impregnado com 12 µL de extrato aquoso/metanólico da variedade Koshin. Optou-se por esta variedade de Shiitake uma vez que foi a que apresentou melhores resultados no ensaio da atividade antimicrobiana. Optou-se também por testar o extrato metanólico, apesar de não ter tido resultados na atividade antimicrobiana porque, a modificação da resistência baseia-se na criação de uma relação sinérgica, ou seja, numa interação positiva criada quando dois agentes combinados exercem um efeito inibitório maior que a soma



de seus efeitos individuais, o que quer dizer que não é por não ter tido efeito quando testado individualmente que não poderá ser eficaz quando combinado com um antibiótico (Aiyegoro & Okoh, 2009). O esquema de concentrações foi o mesmo que na avaliação da atividade antimicrobiana, ou seja, foram testadas duas concentrações ( $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para os 5 isolados do *screening*, e para os restantes apenas foi testada a concentração de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Tal como na avaliação da atividade antimicrobiana, os resultados traduziram-se na medição dos halos de inibição observados (Figura 4.5).



**Figura 4.5-** Comparação do efeito das concentrações na avaliação do sinergismo. À esquerda, extrato aquoso ( $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ); à direita, extrato aquoso ( $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). **a)** Amoxicilina/Ácido clavulânico com extrato; **b)** Amoxicilina/Ácido clavulânico; **c)** Ciprofloxacina com extrato; **d)** Ciprofloxacina; **e)** Gentamicina com extrato; **f)** Gentamicina.

Nas tabelas 4.6 e 4.7 estão representados os valores dos halos de inibição do ensaio da avaliação do efeito sinérgico para isolados de Gram-positivo.

Para a concentração de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e com o extrato aquoso verificou-se a ocorrência de sinergismo em dois isolados. No isolado MJMC 109, o efeito sinérgico ocorreu para o antibiótico gentamicina (CN), um aminoglicosídeo, em que o tamanho do halo de inibição passou de 25 mm para 27 mm com a adição de extrato. No isolado MJMC 110 o halo de inibição da quinolona ciprofloxacina (CIP) passou de 27 mm para 29 mm. Com o extrato metanólico houve sinergismo no isolado MJMC 102 para o glicopeptídeo vancomicina (VA) e no MJMC 110 para a ciprofloxacina. Nesta concentração observou-se ainda efeito antagónico da ação do antibiótico amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) com ambos os extratos para o isolado CETC 976, e do mesmo antibiótico com o extrato metanólico nos isolados MJMC 102, MJMC 110 e MJMC 111.

Para a concentração 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , o extrato aquoso produziu efeito sinérgico com o aminoglicosídeo CN nos isolados MJMC 102 e MJMC 109; com o glicopeptídeo VA nos isolados MJMC 027, MJMC 102 e MJMC 109; com a quinolona CIP nos isolados MJMC 018, MJMC 025, MJMC 026, MJMC 027, MJMC 102, MJMC 110, MJMC 111, MJMC 507, MJMC 534 B, MJMC 539, MJMC 545 e MJMC 552; e com a fluoroquinolona levofloxacina (LEV) nos isolados MJMC 018, MJMC 102, MJMC 109, MJMC 111, MJMC 507 e MJMC 552. Relativamente ao extrato metanólico, para esta concentração, verificou-se ocorrência de sinergismo com o antibiótico CN nos isolados MJMC 025, MJMC 102 e MJMC 109, com a CIP nos isolados MJMC 025, MJMC 027, MJMC 110, MJMC 539 e MJMC 545, e com a VA nos isolados MJMC 018, MJMC 026, MJMC 109, MJMC 511. Nesta concentração observou-se ainda efeito antagónico com adição de extrato aquoso ao  $\beta$ -lactâmico amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) nos isolados MJMC 025, MJMC 026, MJMC 027, MJMC 109, MJMC 110, MJMC 511, MJMC 539, MJMC 545 e CETC 976; com a adição de extrato aquoso à levofloxacina nos isolados MJMC 025, MJMC 027 e MJMC 511; e com adição de extrato metanólico aos antibióticos AMC (isolados MJMC 018, MJMC 025, MJMC 026, MJMC 027, MJMC 102, MJMC 110, MJMC 507, MJMC 534 B, MJMC 539, MJMC 545, MJMC 552, CETC 976), CIP (MJMC 534 B), VA (MJMC 507) e LEV (MJMC 539).

Em suma, com o aumento da concentração, aumenta o número de casos de sinergismo, isto é, a ação do antibiótico é potenciada. Não foi observada nenhuma alteração do perfil de *Resistente* para *Sensível* nos antibióticos testados, no entanto, verificou-se situações em que os halos aumentaram de tamanho, nalguns casos aproximando-se do valor estipulado pelas guidelines do EUCAST para passar de *Resistente* para *Sensível*, como é o caso da combinação de extrato aquoso + amoxicilina/ácido clavulânico no isolado MJMC 534 B. Neste caso em concreto, trata-se de um isolado de MRSA proveniente de uma úlcera. O surgimento e disseminação de isolados de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos, particularmente MRSA, constitui um desafio global no tratamento das infeções causadas por este patógeno, sendo os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos a terapêutica de eleição (Sánchez-Sánchez, 2017). No entanto, devido à produção de  $\beta$ -lactamases, as opções terapêuticas são limitadas, daí a possível combinação de um antibiótico com inibidor de  $\beta$ -lactamases, como é o caso da combinação amoxicilina/ácido clavulânico, mais o extrato. O facto de os extratos terem reforçado o efeito, não só da amoxicilina/ácido clavulânico, mas também de outros

antibióticos contra alguns dos isolados, demonstra o potencial destes aliados à terapêutica convencional.

Observou-se ainda o aparecimento de halos de diâmetro moderado, para além do valor do controlo negativo, com a adição de extrato aquoso na concentração de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  – casos em que o antibiótico não teve qualquer efeito (tabela 4.7). No entanto, isto não deve ser considerado como um efeito sinérgico já que estes halos tinham sido observados previamente na avaliação da atividade antibacteriana dos extratos (tabela 4.5). Contudo, não deixa de ser relevante porque a maioria dos isolados em que se verificou esta situação foram provenientes de feridas de pé diabético. Apesar de existirem antibióticos eficazes sobre estes isolados, o facto de os extratos terem algum efeito, que poderá ser potenciado com o aumento da concentração testada, terá vantagens. As feridas de pé diabético são uma das principais complicações crónicas da diabetes *mellitus*, considerando-se como um problema crescente em todo o mundo e com um impacto socioeconómico significativo (Alexiadou e Doupis, 2012). A microbiota do pé diabético é composta muitas vezes por *S. aureus*, incluindo, estirpes resistentes à meticilina (MRSA). Estima-se que em Portugal ocorram anualmente uma média de 1600 amputações não traumáticas dos membros inferiores resultantes desta patologia (DGS, 2011).

Tal como no presente trabalho, Alves *et al.* (2014) reportaram efeito sinérgico contra MRSA utilizando extratos metanol/água de diferentes espécies de cogumelos selvagens, sendo que os efeitos sinérgicos foram observados para duas quinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina) e para alguns  $\beta$ -lactâmicos (penicilina, ampicilina e cefoxitina) com extratos das espécies *Mycena rosea* e *Fistulina hepática*. Outros autores também relataram efeitos sinérgicos de extratos vegetais e quinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina) contra MRSA (Bazzaz *et al.*, 2008; An *et al.*, 2011). No estudo de Braga e colaboradores (2011) foi avaliada a interação do extrato metanólico de romã com diferentes antibióticos, contra isolados de MRSA e MSSA, e verificaram que o efeito sinérgico ocorreu para os antibióticos cloranfenicol, gentamicina, ampicilina, tetraciclina e oxacilina, não se tendo verificado qualquer diferença no perfil de suscetibilidade ao extrato entre MRSA e MSSA. Os autores referem ainda que este extrato poderá ter um papel significativo no bloqueio das bombas de efluxo ou numa melhor captação/influxo do antibiótico, isto porque as bombas de efluxo funcionam através da hidrólise de ATP, e o que parece acontecer é a inibição do metabolismo energético através da inibição da ATP sintase.

Os resultados antagônicos observados na combinação dos extratos com o antibiótico amoxicilina/ácido clavulânico também merecem atenção. Ushimaru *et al.* (2012), avaliaram as interações entre extratos brutos de 6 plantas (*Psidium guajava*, *Zingiber officinale*, *Cymbopogon citratus*, *Caryophyllus aromaticus*, *Mikania glomerata* e *Allium sativum*) e antibióticos de referência, contra isolados de *Escherichia coli*. O extrato bruto de *A. sativum* foi o único que não apresentou antagonismo com os antibióticos, sendo que os restantes extratos apresentaram antagonismo, ou ausência de interação, com pelo menos um dos antibióticos. No caso do *C. citratus* o efeito antagônico foi observado com a amoxicilina/ácido clavulânico. Darwish e Aburjai (2010) descreveram que os extratos metanólicos de duas plantas, *Anagyris foetida* e *Lepidium sativum*, possuíam um efeito antagônico sobre a atividade da amoxicilina contra uma estirpe de referência de *E. coli* (sem resistência), mas que produziam efeito sinérgico contra *E. coli* ESBL. Estas variações observadas na atividade das combinações nas duas linhagens, de acordo com os autores, poderão indicar que os extratos impediram a ação da amoxicilina, não permitindo a inibição da biossíntese de peptidoglicano, podendo ter atuado através de outro mecanismo, como o bloqueio do efeito inibitório das enzimas  $\beta$ -lactamases. No caso em concreto deste trabalho, o efeito antagônico também pode ser eventualmente explicado pela quantidade de metabolitos presentes nos extratos brutos que poderão levar à diminuição da ação das substâncias ativas, através de competitividade pelo mesmo alvo de ação e/ou através da inibição do princípio ativo do antibiótico.

Nos isolados de Gram-negativo (tabela 4.8) não se verificou ocorrência de sinergismo entre os extratos e os antibióticos testados, podendo ser justificada a diferença dos resultados entre os isolados de *K. pneumoniae* e *S. aureus* pela diferença na estrutura das bactérias (presença de membrana externa que atua como barreira). Por outro lado, verificou-se para o carbapenemo meropenemo (MEM), a ocorrência de antagonismo com a adição dos extratos, observando-se uma diminuição de  $\pm 10$  mm na leitura dos halos, havendo inclusive uma alteração no perfil de suscetibilidade (passou de sensível para resistente). Chatterjee e colaboradores (2016) também observaram alteração no perfil de suscetibilidade com extratos hidroetanólicos de cinco cogumelos comestíveis (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus eous*, *Pleurotus sajorcaju* e *Calocybe indica*) em combinação com antibiótico meropenemo contra *Escherichia coli* ESBL, *Klebsiella pneumoniae* ESBL e *Acinetobacter baumannii*, tendo verificado a ocorrência de atividade antagonista contra *K. pneumoniae* e *A. Baumannii* com o extrato de *C. indica*, bem como contra os microrganismos testados com extrato de cogumelo *P. sajorcaju*. O grupo dos

carbapenemos representa uma última linha no combate às infeções por bactérias multirresistentes, devido ao largo espetro de ação contra bactérias de Gram-negativo e Gram-positivo, incluindo os microrganismos produtores de ESBL. Os carbapenemos agem inibindo a síntese da parede celular bacteriana, ligando-se e inativando as PBPs. De um modo geral, os carbapenemos entram nas bactérias de Gram-negativo através de proteínas localizadas na membrana externa, e acilam as PBPs que catalisam a formação de peptidoglicano. A intensidade de ligação às PBPs depende do tipo de carbapenemo (Meroueh et al., 2006). Como o meropenemo demonstra uma alta afinidade pela PBP 3 relativamente ao imipenemo e ertapenemo, isto poderá justificar o facto de se ter verificado efeito antagónico com a adição de extrato ao meropenemo, já que pode existir a possibilidade do extrato (compostos presentes no extrato) se ligarem primeiro à PBP 3.

**Tabela 4.6-** Valores dos halos de inibição (mm) obtidos no ensaio da avaliação do efeito sinérgico com extratos a diferentes concentrações (500 µg.mL<sup>-1</sup> e 1000 µg.mL<sup>-1</sup>), para isolados de Gram-positivo.

Extrato aquoso												Extrato metanólico									
Isolado	CN	CN + ext	AMC	AMC + ext	VA	VA + ext	CIP	CIP + ext	LEV	LEV + ext		CN	CN + ext	AMC	AMC + ext	VA	VA + ext	CIP	CIP + ext	LEV	LEV + ext
500 µg.mL <sup>-1</sup>	MJMC102	S 24 ± 0,0	S 23 ± 0,5	R 14 ± 0,0	R 14 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 21 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	n.d	n.d	S 24 ± 0,5	S 24 ± 0,5	R 14 ± 0,0	R 7 ± 0,0	S 19 ± 0,0	S 21 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	n.d	n.d
	MJMC109	S 25 ± 0,5	S 27 ± 0,5	S 36 ± 0,2	S 35 ± 0,5	S 19 ± 0,0	S 19 ± 0,0	S 35 ± 0,0	S 35 ± 0,2	n.d	n.d	S 25 ± 0,2	S 25 ± 0,2	S 36 ± 0,0	S 35 ± 0,0	S 19 ± 0,0	S 19 ± 0,0	S 35 ± 0,1	S 35 ± 0,1	n.d	n.d
	MJMC110	S 25 ± 0,0	S 25 ± 0,0	S 27 ± 0,05	S 27 ± 0,0	S 20 ± 0,5	S 20 ± 0,5	S 27 ± 0,0	S 29 ± 0,05	n.d	n.d	S 24 ± 0,1	S 24 ± 0,1	S 27 ± 0,2	R 20 ± 0,2	S 20 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 27 ± 0,0	S 30 ± 0,0	n.d	n.d
	MJMC111	S 24 ± 0,5	S 24 ± 0,5	R 11 ± 0,0	R 11 ± 0,5	S 21 ± 0,0	S 21 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 7 ± 0,0	n.d	n.d	S 23 ± 0,0	S 24 ± 0,5	R 11 ± 0,0	R 7 ± 0,0	S 21 ± 0,0	S 21 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	n.d	n.d
	CETC976	S 21 ± 0,0	S 21 ± 0,0	S 36 ± 0,0	S 24 ± 0,0	S 19 ± 0,0	S 19 ± 0,0	S 31 ± 0,0	S 31 ± 0,0	n.d	n.d	S 21 ± 0,0	S 21 ± 0,0	S 36 ± 0,5	S 24 ± 0,0	S 19 ± 0,0	S 19 ± 0,0	S 32 ± 0,0	S 32 ± 0,0	n.d	n.d
1000 µg.mL <sup>-1</sup>	MJMC102	S 25 ± 0,5	S 32 ± 0,0	R 14 ± 0,2	R 14 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 24 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 11 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 11 ± 0,0	S 24 ± 0,0	S 30 ± 0,0	R 14 ± 0,0	R 10 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 21 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0
	MJMC109	S 25 ± 0,5	S 28 ± 0,5	S 36 ± 0,2	S 36 ± 0,3	S 20 ± 0,0	S 22 ± 0,0	S 36 ± 0,15	S 36 ± 0,05	S 35 ± 0,5	S 38 ± 0,5	S 24 ± 0,0	S 28 ± 0,0	S 36 ± 0,0	S 36 ± 0,0	S 20 ± 0,5	S 23 ± 0,0	S 36 ± 0,0	S 37 ± 0,0	S 35 ± 0,5	S 35 ± 0,5
	MJMC110	S 25 ± 0,5	S 25 ± 0,5	S 27 ± 0,0	S 23 ± 0,4	S 20 ± 0,1	S 20 ± 0,05	S 28 ± 0,05	S 30 ± 0,5	S 35 ± 0,0	S 35 ± 0,0	S 25 ± 0,0	S 25 ± 0,0	S 27 ± 0,05	R 23 ± 0,05	S 20 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 27 ± 0,2	S 29 ± 0,0	S 35 ± 0,5	S 35 ± 0,5
	MJMC111	S 24 ± 1,0	S 25 ± 0,5	R 11 ± 0,0	R 11 ± 0,1	S 21 ± 0,2	S 21 ± 0,2	R 6 ± 0,0	R 11 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 11 ± 0,0	S 24 ± 0,0	S 24 ± 0,0	R 11 ± 0,0	R 11 ± 0,0	S 21 ± 0,5	S 21 ± 0,5	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0
	CETC976	S 22 ± 0,0	S 22 ± 0,0	S 36 ± 0,0	S 27 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 32 ± 0,0	S 33 ± 0,0	S 36 ± 0,0	S 36 ± 0,0	S 22 ± 0,0	S 22 ± 0,0	S 36 ± 0,0	S 27 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 32 ± 0,0	S 32 ± 0,0	S 36 ± 0,0	S 36 ± 0,0

**Tabela 4.7-** Valores dos halos de inibição (mm) obtidos no ensaio da avaliação do efeito sinérgico, para isolados de Gram-positivo (concentração 1000 µg.mL<sup>-1</sup>).

Extrato aquoso												Extrato metanólico									
Isolado	CN	CN + ext	AMC	AMC + ext	VA	VA + ext	CIP	CIP + ext	LEV	LEV + ext		CN	CN + ext	AMC	AMC + ext	VA	VA + ext	CIP	CIP + ext	LEV	LEV + ext
MJMC018	S 24 ± 0,2	S 24 ± 0,2	R 9 ± 0,05	R 9 ± 0,05	S 18 ± 0,0	S 18 ± 0,1	R 6 ± 0,0	R 9 ± 0,05	R 6 ± 0,0	R 9 ± 0,05		S 24 ± 0,3	S 24 ± 0,3	R 10 ± 0,0	R 7 ± 0,0	S 18 ± 0,0	S 20 ± 0,1	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0
MJMC025	S 22 ± 0,2	S 22 ± 0,2	S 28 ± 0,0	S 23 ± 0,15	S 20 ± 0,05	S 20 ± 0,05	S 30 ± 0,05	S 34 ± 0,1	S 33 ± 0,0	S 31 ± 0,05		S 22 ± 0,05	S 24 ± 0,0	S 28 ± 0,0	S 22 ± 0,0	S 20 ± 0,2	S 20 ± 0,2	S 30 ± 0,05	S 34 ± 0,1	S 33 ± 0,1	S 33 ± 0,1
MJMC026	S 22 ± 0,0	S 22 ± 0,0	R 16 ± 0,1	R 13 ± 0,05	S 18 ± 0,1	S 18 ± 0,1	R 6 ± 0,0	R 9 ± 0,2	R 6 ± 0,0	R 7 ± 0,15		S 22 ± 0,2	S 22 ± 0,2	R 16 ± 0,3	R 12 ± 0,3	S 19 ± 0,1	S 21 ± 0,1	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0
MJMC027	S 22 ± 0,05	S 22 ± 0,05	S 26 ± 0,1	S 22 ± 0,2	S 18 ± 0,2	S 20 ± 0,3	R 9 ± 0,0	R 11 ± 0,2	R 13 ± 0,0	R 11 ± 0,0		S 22 ± 0,2	S 22 ± 0,2	S 26 ± 0,1	S 23 ± 0,1	S 18 ± 0,2	S 18 ± 0,2	R 9 ± 0,3	R 13 ± 0,2	R 13 ± 0,2	R 13 ± 0,2
MJMC507	S 25 ± 0,0	S 25 ± 0,0	R 10 ± 0,0	R 9 ± 0,0	S 23 ± 0,0	S 23 ± 0,5	R 6 ± 0,0	R 10 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 12 ± 0,0		S 25 ± 2,0	S 25 ± 2,0	R 9 ± 0,0	R 6 ± 0,0	S 23 ± 1,0	S 21 ± 1,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0
MJMC511	S 26 ± 0,5	S 27 ± 0,0	S 36 ± 0,0	S 22 ± 0,0	S 21 ± 0,0	S 21 ± 0,0	S 30 ± 0,0	S 30 ± 0,0	S 36 ± 0,0	S 34 ± 1,0		S 26 ± 0,0	S 26 ± 0,0	S 36 ± 2,0	S 36 ± 2,0	S 21 ± 0,5	S 24 ± 0,5	S 31 ± 0,0	S 31 ± 0,0	S 36 ± 0,0	S 36 ± 0,0
MJMC534 B	S 27 ± 0,0	S 27 ± 0,0	R 11 ± 0,0	R 19 ± 0,0	S 24 ± 0,0	S 24 ± 0,0	R 10 ± 0,0	R 16 ± 0,0	R 18 ± 0,0	S 18 ± 0,0		S 27 ± 0,5	S 27 ± 0,5	R 11 ± 0,5	R 9 ± 0,5	S 24 ± 0,0	S 24 ± 0,0	R 10 ± 1,0	R 8 ± 1,0	R 18 ± 1,0	R 18 ± 1,0
MJMC539	R 15 ± 0,2	R 15 ± 0,2	R 17 ± 0,05	R 14 ± 0,4	S 21 ± 0,2	S 21 ± 0,2	R 6 ± 0,0	R 11 ± 0,2	R 9 ± 0,2	R 9 ± 0,2		R 15 ± 0,3	R 15 ± 0,3	R 17 ± 0,2	R 13 ± 0,2	S 21 ± 0,3	S 20 ± 0,2	R 6 ± 0,0	R 8 ± 0,0	R 9 ± 0,05	R 6 ± 0,0
MJMC545	S 23 ± 0,3	S 23 ± 0,3	S 26 ± 0,0	S 22 ± 0,1	S 19 ± 0,05	S 19 ± 0,05	S 27 ± 0,0	S 32 ± 0,1	S 29 ± 0,2	S 29 ± 0,2		S 23 ± 0,05	S 23 ± 0,05	S 26 ± 0,05	S 21 ± 0,05	S 20 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 27 ± 0,2	S 34 ± 0,2	S 29 ± 0,1	S 29 ± 0,1
MJMC552	S 25 ± 0,2	S 24 ± 0,3	R 10 ± 0,1	R 10 ± 0,2	S 20 ± 0,1	S 20 ± 0,1	R 6 ± 0,0	R 10 ± 0,2	R 6 ± 0,0	R 10 ± 0,2		S 25 ± 0,2	S 25 ± 0,2	R 10 ± 0,2	R 8 ± 0,2	S 20 ± 0,2	S 20 ± 0,2	R 6 ± 0,5	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0

**Legenda:** Perfil de sensibilidade segundo as guidelines do EUCAST para *Staphylococcus aureus*: Gentamicina (CN) S ≥ 18 mm; Amoxicilina/ Ácido Clavulânico (AMC) ≥ 20 mm; Ciprofloxacina (CIP) ≥ 21 mm; Vancomicina (VA) ≥ 12 mm; Levofloxacina (LEV) ≥ 22 mm

**Tabela 4.8-** Valores dos halos de inibição (mm) obtidos no ensaio da avaliação do efeito sinérgico, para isolados de Gram-negativo (concentração 1000 µg.mL<sup>-1</sup>).

Extrato aquoso											Extrato metanólico									
Isolado	CN	CN + ext	ETP	ETP + ext	IPM	IPM + ext	MEM	MEM + ext	AMC	AMC + ext	CN	CN + ext	ETP	ETP + ext	IPM	IPM + ext	MEM	MEM + ext	AMC	AMC + ext
MJH513	S 17 ± 0,0	S 16 ± 0,0	R 8 ± 0,0	R 6 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 20 ± 0,0	R 15 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	S 18 ± 0,0	S 18 ± 0,0	R 7 ± 0,0	R 7 ± 0,0	S 19 ± 0,0	S 19 ± 0,0	R 15 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0
MJH569	S 21 ± 0,0	S 21 ± 0,0	R 9 ± 0,0	R 6 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 17 ± 0,5	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 20 ± 0,0	R 9 ± 0,0	R 9 ± 0,0	S 19 ± 0,0	S 19 ± 0,0	S 17 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0
MJH579	S 19 ± 0,5	S 18 ± 0,5	R 17 ± 0,0	R 17 ± 0,0	S 21 ± 0,0	S 21 ± 0,0	S 20 ± 1,0	R 12 ± 0,5	R 10 ± 0,0	R 6 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 20 ± 0,0	R 18 ± 0,0	R 18 ± 0,0	S 22 ± 0,5	S 22 ± 0,5	S 20 ± 0,0	R 10 ± 0,0	R 9 ± 1,0	R 6 ± 0,0
MJH599	S 18 ± 0,0	S 18 ± 0,0	R 12 ± 0,0	R 12 ± 0,0	S 21 ± 0,5	S 21 ± 0,5	S 24 ± 0,0	R 11 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	S 19 ± 0,0	S 19 ± 0,0	R 11 ± 0,0	R 11 ± 0,0	S 21 ± 0,0	S 21 ± 0,0	S 25 ± 0,0	R 12 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0
MJH602	R 22 ± 0,5	S 21 ± 0,0	R 8 ± 0,0	R 6 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 17 ± 0,5	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	S 22 ± 0,5	S 22 ± 0,05	R 8 ± 0,0	R 8 ± 0,0	S 20 ± 0,5	S 20 ± 0,5	S 17 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 6 ± 0,0
MJH640	S 20 ± 0,0	S 19 ± 0,0	R 16 ± 0,0	R 16 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 19 ± 0,0	R 10 ± 0,0	R 8 ± 0,0	R 6 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 19 ± 0,0	R 16 ± 0,0	R 16 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 20 ± 0,0	R 11 ± 0,0	R 8 ± 0,0	R 6 ± 0,0
MJH662	R 13 ± 0,0	R 13 ± 0,0	R 14 ± 0,0	R 14 ± 0,0	S 21 ± 0,5	S 21 ± 0,5	S 20 ± 0,5	R 10 ± 0,0	R 7 ± 0,0	R 6 ± 0,0	R 13 ± 0,0	R 13 ± 0,0	R 15 ± 0,0	R 15 ± 0,0	S 20 ± 0,5	S 20 ± 1,5	S 20 ± 0,0	R 10 ± 0,0	R 7 ± 0,0	R 6 ± 0,0
CETC434	S 20 ± 0,0	S 20 ± 0,0	S 33 ± 0,5	S 33 ± 0,5	S 32 ± 0,0	S 32 ± 0,5	S 44 ± 0,0	S 29 ± 0,0	S 28 ± 0,0	R 12 ± 0,0	S 20 ± 0,5	S 20 ± 0,5	S 32 ± 0,0	S 32 ± 0,0	S 32 ± 0,0	S 32 ± 0,0	S 44 ± 0,0	S 26 ± 0,0	S 28 ± 0,0	R 12 ± 0,0

**Legenda:** Perfil de sensibilidade segundo as guidelines do EUCAST para *Klebsiella pneumoniae*: Gentamicina (CN) S ≥14 mm; Ertapenemo (ETP) S ≥25 mm; Imipenemo (IPM) ≥17 mm; Amoxicilina/ Ácido Clavulânico (AMC) ≥19 mm; Meropenemo (MEM) ≥16 mm

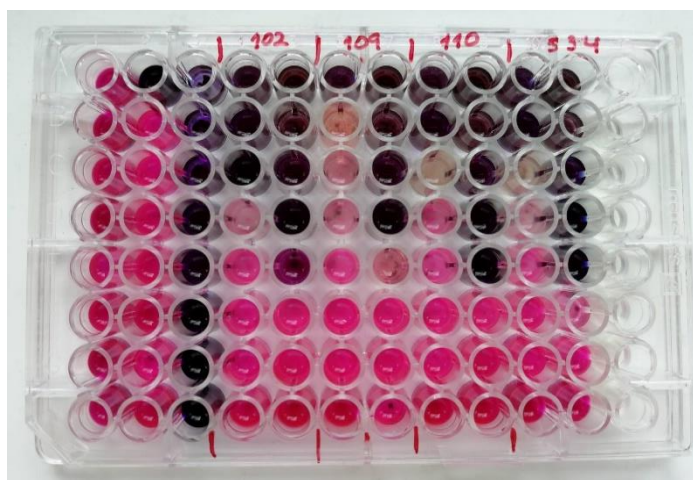


#### 4.2.3. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Concentração mínima inibitória (CMI) representa a concentração mais baixa, expressa em mg/L, que impede o crescimento de microrganismos dentro de um período de tempo definido (EUCAST, 2018). A CMI é considerada uma ferramenta fundamental para a determinação do perfil de suscetibilidade dos microrganismos aos agentes antimicrobianos. Esta técnica é realizada em meio líquido e denomina-se também como método das diluições sucessivas. Utiliza-se este método essencialmente para confirmar resistências dos microrganismos aos antibióticos e/ou estudar novos compostos cuja ação pode apresentar um efeito antimicrobiano. Os valores de CMI são ainda importantes indicadores da atividade antibacteriana (Smolskaite et al., 2015).

Tendo em conta os resultados obtidos na determinação da atividade antibacteriana, determinou-se a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e a Concentração Mínima Bactericida (CMB), para os extratos aquosos e metanólicos da variedade Koshin contra os isolados de Gram-positivo (Tabela 4.9).

Após realização da técnica e incubação durante 18-24h horas a  $35 \pm 2$  °C segundo o descrito em 3.2.3, procedeu-se à leitura visual através da observação da mudança da cor. Nos poços onde a cor permaneceu azul, não ocorreu redução o que significa inviabilidade bacteriana. Nos poços onde se verificou alteração da cor azul para rosa, considerou-se que existia viabilidade bacteriana (Figura 4.6).



**Figura 4.6-** Aspeto da microplaca para determinação da CMI através do método da microdiluição em placa com resazurina.



Relativamente ao extrato aquoso, os valores de CMI variaram entre 62,5 e 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para este extrato, os valores de CMI mínimos foram encontrados para os isolados MJMC 018, MJMC 102, MJMC 110, MJMC 111, MJMC 511 e MJMC 534B, e os máximos para os isolados MJMC 025 e MJMC 552. Quanto ao extrato metanólico, os valores variaram entre 250 e 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , correspondendo a menor concentração aos isolados MJMC 102 e MJMC 507, e a maior aos isolados MJMC 025, MJMC 026 e MJMC 109. Assim, em função destes resultados, o isolado MJMC 025 é considerado como o menos sensível uma vez que apresenta os valores de CMI mais elevados, e o isolado MJMC 102 como o mais sensível aos extratos.

Os resultados aqui obtidos com o extrato metanólico não vão de encontro aos obtidos na atividade antibacteriana pelo método de difusão em disco – *Sem eficácia*. Todavia, a ausência de uma zona de inibição não significa necessariamente que o extrato não seja eficaz frente ao microrganismo testado, mas sim que a difusão não foi completa, especialmente no caso dos compostos menos polares que se difundem mais lentamente no meio de cultura (Moreno et al., 2006).

Comparando os isolados de MSSA com os de MRSA, no extrato aquoso os valores variaram entre 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para MSSA e entre 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para MRSA. Já no extrato metanólico obtiveram-se valores de CMI entre 500 – 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 250 – 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para MSSA e MRSA respetivamente. De um modo geral, os menores valores de CMI ocorreram com o extrato aquoso.

Quanto aos valores de CMI do controlo positivo gentamicina, estes foram inferiores ao dos extratos. Contudo, para os isolados MJMC 026, MJMC 109, MJMC 110, todos MSSA, e MJMC 027, MJMC 545, ambos MRSA, as CMIs dos extratos foram iguais às da gentamicina.

Num estudo anteriormente desenvolvido pelo mesmo grupo de trabalho, avaliaram-se as propriedades antimicrobianas de extratos etanólicos de urtiga e lavanda contra 29 isolados de úlceras de pé diabético (Zenão et al., 2017). No presente trabalho foram incluídos 4 desses 29 isolados para determinação das CMIs dos extratos de Shiitake (MJMC 018, MJMC 025, MJMC 026 E MJMC 027), tendo-se observado que apesar dos valores de CMI para o extrato metanólico serem superiores aos demonstrados por Zenão et al. (2017), os extratos aquosos de Shiitake, ou apresentaram CMIs iguais ou foram inferiores aos obtidos com os extratos etanólicos de urtiga e lavanda. Estes resultados confirmam o potencial antimicrobiano do Shiitake.

**Tabela 4.9-** Concentração Mínima Inibitória ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e Concentração Mínima Bactericida, para os extratos aquosos e metanólicos da variedade Koshin.

	Isolado	Extrato aquoso		Extrato metanólico		Controlo positivo (CN)
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI
MRSA	MJMC 025	250,0	>1000,0	1000,0	>1000,0	125,0
	MJMC 027	125,0	>1000,0	500,0	>1000,0	125,0
	MJMC102	62,5	>1000,0	250,0	1000,0	7,8
	MJMC111	62,5	500,0	500,0	>1000,0	7,8
	MJMC507	125,0	>1000,0	250,0	1000,0	7,8
	MJMC534 B	62,5	1000,0	500,0	500,0	7,8
	MJMC 539	125,0	>1000,0	500,0	>1000,0	62,5
	MJMC 545	125,0	>1000,0	500,0	>1000,0	125,0
	MJMC 552	250,0	500,0	500,0	1000,0	125,0
MSSA	MJMC 018	62,5	>1000,0	500,0	>1000,0	7,8
	MJMC 026	125,0	>1000,0	1000,0	1000,0	125,0
	MJMC109	125,0	1000,0	1000,0	>1000,0	125,0
	MJMC110	62,5	1000,0	500,0	1000,0	62,5
	MJMC511	62,5	1000,0	500,0	1000,0	7,8

A determinação da CMB foi avaliada pela ausência ou presença de crescimento bacteriano (sementeira em meio sólido Mueller-Hinton do inóculo dos alvéolos em que a cor não se alterou para rosa), encontrando-se os resultados assinalados na tabela 4.9. Este ensaio mostrou que a maioria das CMIs apresentam um efeito bacteriostático sobre os isolados testados, exceto para os isolados MJMC 026 e MJMC 534 B com o extrato metanólico, em que a CMI apresenta um efeito bactericida (CMI igual à CMB).

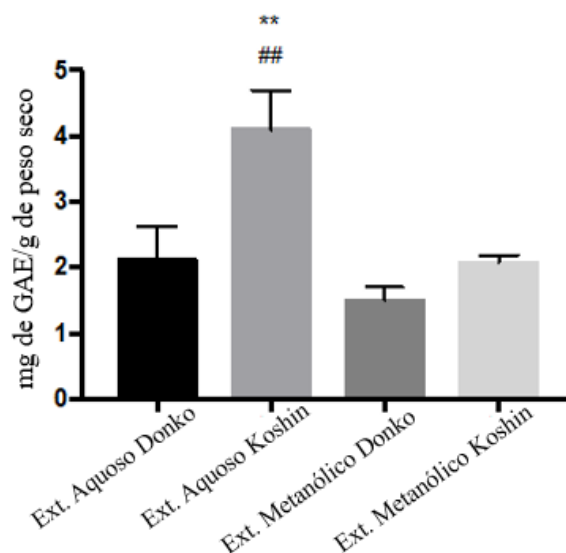
Os antibióticos bacteriostáticos são agentes quimioterápicos que retardam ou impedem o crescimento bacteriano, geralmente pela inibição da síntese proteica. Como resultado, o agente infeccioso é mais facilmente eliminado pelo sistema imunológico. Exemplo de antibiótico com este tipo de ação é a clindamicina, uma lincosamida, que é utilizada em infeções por bactérias de Gram-positivo como o *Staphylococcus aureus* (Pankey & Sabath, 2004). Daqui se conclui que o interesse da aplicação dos antibióticos não reside só no seu potencial efeito bactericida. De facto, apesar do extrato metanólico

apresentar também ação bactericida, ambos os extratos de Koshin têm potencial de ação bacteriostática.

### 4.3. Caracterização dos extratos de Shiitake

#### 4.3.1. Determinação dos fenóis totais

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários encontrados em várias fontes naturais, entre as quais os cogumelos, para proteção contra luz UV, insetos, vírus e bactérias (Heleno et al., 2015). Estes compostos possuem atividade antibacteriana interferindo na membrana celular do patógeno, tendo como consequência a morte do mesmo (Ribeiro et al., 2015). Os resultados obtidos para a determinação dos fenóis totais presentes nos diferentes extratos de Shiitake estão apresentados na figura 4.7.



**Figura 4.7-** Composição em fenóis totais dos extratos aquosos e metanólicos das variedades Donko e Koshin de Shiitake. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). As comparações estatísticas foram feitas usando a ANOVA *one-way*, seguida do teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak, (\*\* $p < 0.01$  extrato aquoso Koshin vs. extrato aquoso Donko; ## $p < 0.01$  extrato aquoso Koshin vs. extrato metanólico Koshin).

Analisando a figura 4.7, observa-se que o extrato aquoso da variedade Koshin foi o que apresentou um maior conteúdo em fenóis totais, apresentando diferenças significativas comparativamente, quer ao extrato metanólico da variedade Koshin, quer aos extratos da variedade Donko.

Reis *et al.* (2012), avaliaram o perfil fenólico de extratos metanólicos de alguns dos cogumelos mais comercializados a nível mundial, incluindo o Shiitake, e verificaram que este cogumelo, de entre os 5 estudados, não foi o que apresentou o melhor conteúdo em fenóis totais. Neste trabalho, o extrato metanólico de Koshin apresentou um valor de 2.07 mg GAE/g de peso seco, cerca de um quarto comparativamente ao valor obtido por estes autores (8.84 mg GAE/g de peso seco). Num outro estudo que caracterizava o perfil fenólico de cogumelos comestíveis, o conteúdo em compostos fenólicos para o Shiitake foi mais elevado no extrato metanólico (4.79 mg GAE/g de peso seco) do que no aquoso (1.33 mg GAE/g de peso seco) (Cheung *et al.*, 2003). Comparando com os resultados obtidos neste trabalho, os extratos com maior teor em fenóis totais foram os aquosos (4.09 mg GAE/g de peso seco). Isto poderá dever-se a vários fatores tais como, a natureza das diferentes amostras (se amostras silvestres ou de cultura) e por consequência as condições edafoclimáticas, o processo de extração (temperatura, tempo, concentração de solventes, agitação, entre outros) (Bach *et al.*, 2019).

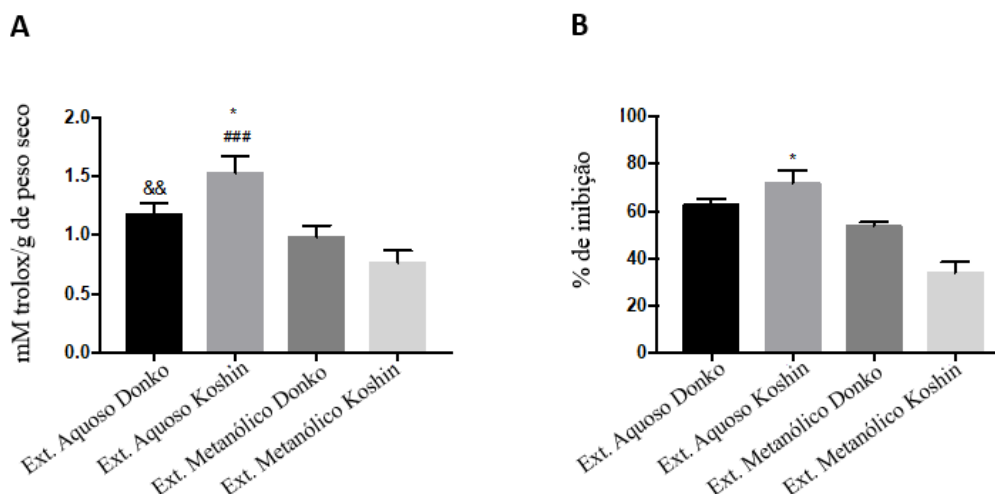
Alves *et al.* (2013) mostraram que os ácidos fenólicos, como os ácidos p-hidroxibenzóico, protocatecúico, vanílico e p-cumárico, eram os que apresentavam um maior potencial antibacteriano e que inibiram melhor MRSA do que MSSA, uma vez que os mesmo compostos e à mesma concentração não tiveram efeito inibitório sobre o MSSA. MRSA foi inibido pelos ácidos p-hidroxibenzóico, vanílico, siríngico e p-cumárico, e o MSSA pelo ácido ferúlico. Reis *et al.* (2012), determinaram o teor de ácido gálico, protocatecúico, p-hidroxibenzóico, p-cumárico, e um composto relacionado (ácido cinâmico), em cinco espécies de cogumelos. Destes compostos, foram encontrados no Shiitake (*Lentinula edodes*) os ácidos protocatecúico (0,36 µg/g de peso seco), p-hidroxibenzóico (1,57 µg/g de peso seco) e o ácido cinâmico (0,02 µg/g de peso seco). Mattila *et al.* (2001), detetou maiores teores dos ácidos protocatecúico (1,39 µg/g de peso seco), p-hidroxibenzóico (7,90 µg/g de peso seco), ácido cinâmico (1,60 µg/g de peso seco). Kim *et al.*, 2009 avaliaram também o perfil fenólico de 10 espécies de cogumelos, sendo que destes os que apresentaram um menor número de compostos fenólicos foram o *Lentinula edodes* e *Pleurotus eryngii*, que possuíam apenas três compostos fenólicos cada. No *L. edodes*, os compostos fenólicos identificados foram o ácido gálico (13 µg/g de peso seco), o ácido protocatecúico (16 µg/g de peso seco) e a catequina (3 µg/g de peso seco). Outros autores (Teke *et al.*, 2011) observaram também que os ácidos p-hidroxibenzóico e protocatecúico foram os compostos fenólicos com maior atividade contra a maioria das bactérias de Gram-positivo. Os diferentes compostos fenólicos

apresentam alta correlação entre toxicidade e hidrofobicidade, levando à alteração da permeabilidade, causando vazamento do conteúdo celular ou interferindo nas proteínas da membrana, o que resulta num rompimento da estrutura (Stefanovic, 2018). Estes resultados suportam a ideia de que no caso deste trabalho, os extratos aquosos poderão ser mais ricos em ácidos fenólicos, como o p-hidroxibenzóico e protocatecúico, comparativamente aos extratos metanólicos, justificando assim a sua ação nas bactérias.

#### **4.3.2. Atividade antioxidante *in vitro***

Está descrito na bibliografia que uma grande variedade de cogumelos possui propriedades antioxidantes, devido aos compostos que se encontram nos corpos frutíferos, nos micélios e nos meios de cultura. Estes podem ser compostos fenólicos, polissacarídeos, tocoferóis, flavonoides, entre outros (Sánchez, 2017).

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo método do radical ABTS<sup>•+</sup>, e os resultados obtidos estão apresentados na figura 4.8. Este ensaio é utilizado para avaliar a capacidade de eliminação de radicais livres e baseia-se na capacidade do antioxidante eliminar o ABTS<sup>•+</sup>. O valor médio de atividade antioxidante obtido para o extrato aquoso da variedade Koshin (1,532 mM trolox/g de peso seco) foi o mais elevado comparativamente aos restantes extratos (aquoso Donko, metanólico Koshin e metanólico Donko). Este resultado era espectável já que o extrato aquoso da variedade Koshin era o que apresentava maior teor em compostos fenólicos totais. Também na atividade antioxidante em percentagem de inibição, foram os extratos aquosos de ambas as variedades de Shiitake que apresentam os valores mais elevados. De facto, foram os extratos aquosos de ambas as variedades que apresentaram os resultados mais promissores nos efeitos antibacterianos e nos efeitos sinérgicos. Em concordância, os valores mais baixos de CMI foram obtidos com o extrato aquoso de Koshin (62,5 µg/mL).



**Figura 4.8-** Propriedades antioxidantes dos extratos aquosos e metanólicos de Shiitake, variedades Donko e Koshin: **(A)** Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC); **(B)** Capacidade de “scavenging” do radical ABTS<sup>•+</sup>, representada por % de inibição do radical. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). As comparações estatísticas da TEAC foram feitas usando a ANOVA *one-way*, seguida do teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak, (\*p < 0,05 extrato aquoso Koshin vs. extrato aquoso Donko; ###p < 0,001 extrato aquoso Koshin vs. extrato metanólico Koshin; &&p < 0,01 extrato aquoso Donko vs. extrato metanólico Koshin). As comparações estatísticas para % de inibição foram feitas usando ANOVA em Ranks, seguido do teste post-hoc de Dunn (\*p < 0,05 extrato aquoso Koshin vs. extrato metanólico Koshin).

Existe uma grande variedade de trabalhos nos quais se avalia a capacidade antioxidante de diferentes extratos de várias espécies de cogumelos. A atividade antioxidante e antibacteriana de vários extratos de 8 espécies de cogumelos (*Phaeolus schweinitzii*, *Inonotus hispidus*, *Tricholoma columbetta*, *Tricholoma caligatum*, *Xerocomus chrysenteron*, *Hydnellum ferruginum*, *Agaricus bisporus* e *Pleurotus ostreatus*) foi avaliada, tendo sido observado que, de um modo geral, os extratos metanólicos tiveram melhor atividade antibacteriana comparativamente aos extratos aquosos. No entanto, os extratos aquosos de *P. schweinitzii* e *I. hispidus* foram os que mostraram maior efeito antioxidante (Smolskaite et al., 2015). Por outro lado, Xu *et al.* (2019), avaliaram a atividade antioxidante de extratos etanólicos e aquosos de *Lactarius deliciosus* selvagens e mostraram que os extratos aquosos apresentavam uma capacidade antioxidante 2 a 3 vezes mais elevada, comparativamente aos extratos etanólicos, o que poderá estar relacionado com conteúdo em fenóis, que também foi maior no extrato aquoso. À semelhança destes trabalhos, a melhor capacidade antioxidante foi obtida com os extratos aquosos, principalmente da variedade Koshin, havendo concordância entre as propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos extratos aquosos.

## **5. Considerações Finais**

Tratando-se de um problema a nível global, a rápida disseminação de bactérias multirresistentes compromete a eficácia dos antibióticos disponíveis, o que torna urgente a necessidade de investigar e desenvolver novas alternativas. Os produtos naturais surgem então como uma potencial alternativa à antibioterapia convencional.

Dois tipos de extratos (aquoso e metanólico) obtidos de duas variedades de cogumelo Shiitake, Donko e Koshin, foram avaliados quanto ao seu potencial efeito antibacteriano em isolados responsáveis por infeções associadas aos cuidados de saúde. A caracterização do perfil de suscetibilidade mostrou que a maioria dos isolados clínicos utilizados no presente trabalho, correspondem a bactérias multirresistentes, consideradas um problema de Saúde Pública a nível global. O estudo incluiu uma avaliação da atividade antimicrobiana, a avaliação do efeito sinérgico entre extratos e antibióticos, determinação da CMI e CMB, e fez-se ainda uma caracterização dos extratos.

Na avaliação da atividade antimicrobiana através do método da difusão em disco, verificou-se que com o aumento da concentração dos extratos aquosos, de ambas as variedades de Shiitake, houve um aumento do tamanho dos halos de inibição nos isolados de Gram-positivo. Destaca-se que a variedade Koshin foi a que apresentou melhores resultados. Na avaliação do efeito sinérgico observou-se que com o aumento da concentração do extrato, a ação de alguns antibióticos foi potenciada. Não foi observada nenhuma alteração do perfil de *Resistente* para *Sensível*, no entanto, verificou-se situações em que os halos aumentaram de tamanho, aproximando-se em alguns casos do valor determinado pela EUCAST para passar de *Resistente* para *Sensível*. Nos isolados de Gram-negativo verificou-se a ocorrência de antagonismo com a adição de extrato ao antibiótico meropenemo. Na determinação da concentração mínima inibitória para os extratos aquosos e metanólicos da variedade Koshin contra os isolados de Gram-positivo, os valores variaram entre 62,5 e 250  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  e entre 250 e 1000  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , respetivamente.

As diferenças na atividade antimicrobiana entre as duas variedades de *L. edodes* e entre os dois solventes (aquoso e metanólico) podem ser explicadas pelo conteúdo em fenóis totais *versus* atividade antioxidante, que foi maior no extrato aquoso da variedade Koshin. No entanto, apesar de ambos os extratos (aquoso e metanólico) de Koshin apresentarem potencial bacteriostático, apenas o extrato metanólico apresentou também ação bactericida. Estes resultados sugerem que não será o elevado teor em fenólicos totais que condiciona o efeito antibacteriano, mas sim o seu perfil em compostos fenólicos.

Tendo em conta os resultados obtidos, pode-se concluir que os objetivos a que nos propusemos foram atingidos já que conseguimos avaliar o potencial antimicrobiano do



Shiitake. Os resultados demonstraram que o extrato aquoso foi o que apresentou melhores resultados, inibindo o crescimento dos isolados de Gram-positivo, observando-se ainda que a atividade é dependente do tipo de extrato, variedade de Shiitake, concentração, bem como da estirpe analisada. Contrariamente a resultados obtidos com cogumelos recolhidos na natureza, tratando-se este de um cogumelo produzido industrialmente, a padronização das condições de cultura poderá garantir uma maior constância nos resultados, ou seja, espera-se que os resultados sejam constantes ao longo do tempo.

Os cogumelos podem assim ser uma alternativa interessante, já que fornecem extratos com efeitos antibacterianos, bacteriostáticos e bactericidas, podendo ser usados como nutracêuticos ou medicamentos. Deste modo, e tendo em conta a problemática associada à resistência a antibióticos a nível global, o Shiitake constitui um potencial produto antibacteriano que pode ser utilizado profilaticamente prevenindo assim o risco de infeção. Por outro lado, poderá vir a ser utilizado em associação aos antibióticos, diminuindo assim o tempo de infeção e da possível ocorrência de eventuais fenómenos de resistência.

Como perspetivas futuras, e sendo estes resultados bastantes promissores, pretende-se avaliar o efeito dos extratos a uma maior concentração e num mais diversificado tipo de isolados, testar os extratos contra biofilmes, uma vez que aqui se utilizaram células planctónicas, fazer testes de citotoxicidade, e identificar e isolar o(s) composto(s) ativo(s).

## **6. Bibliografia**

- Abreu, A. C., Serra, S. C., Borges, A., Saavedra, M. J., Mcbain, A. J., Salgado, A. J., & Simoes, M. (2015). Combinatorial activity of flavonoids with antibiotics against drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Drug Resistance*, 21(6), 600-609.
- Aiyegoro, O. A., & Okoh, A. I. (2009). Use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics: implications in antimicrobial chemotherapy. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1147-1152.
- Aires, A., Mota, V. R., Saavedra, M. J., Monteiro, A. A., Simoes, M., Rosa, E. A., & Bennett, R. N. (2009). Initial *in vitro* evaluations of the antibacterial activities of glucosinolate enzymatic hydrolysis products against plant pathogenic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 2096-2105.
- Alexiadou, K. and Doupis, J. (2012). Management of Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Therapy*, 3(1), 4.
- Alexopoulos, C. J., & Beneke, E. S. (1952). Laboratory manual for introductory mycology. *Burgess Publishing Company*; Minneapolis.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., & Pintado, M. (2012). A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Medica*, 78(16), 1707-1718.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Froufe, H. J., Abreu, R. M. V., Martins, A., & Pintado, M. (2013). Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of applied microbiology*, 115(2), 346-357.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Lourenço, I., Castro, A., Pereira, L., Martins, A., & Pintado, M. (2014). Wild mushroom extracts potentiate the action of standard antibiotics against multiresistant bacteria. *Journal of applied microbiology*, 116(1), 32-38.
- An, J., Zuo, G. Y., Hao, X. Y., Wang, G. C., & Li, Z. S. (2011). Antibacterial and synergy of a flavanonol rhamnoside with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, 18(11), 990-993.
- Bach, F., Zielinski, A., Helm, C., Maciel, G., Pedro, A., Stafussa, A., Ávila, S., & Haminiuk, C. (2019). Bio compounds of edible mushrooms: in vitro antioxidant and antimicrobial activities. *LWT*, 107, 214-220.
- Barros, L., Baptista, P., & Ferreira, I. C. (2007). Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 45(9), 1731-1737.

- Barros, L., Correia, D. M., Ferreira, I. C., Baptista, P., & Santos-Buelga, C. (2008a). Optimization of the determination of tocopherols in *Agaricus* sp. edible mushrooms by a normal phase liquid chromatographic method. *Food Chemistry*, 110(4), 1046-1050.
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L. M., & Ferreira, I. C. (2008b). Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(8), 2742-2747.
- Barroso, H., & Melo-Silvestre, A. (2014). Fundamentos de Microbiologia. In H. Barroso & A. Melo-Silvestre (Eds), *Microbiologia Médica I*. (pp. 3-96). Lisboa: Lidel.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496.
- Bazzaz, F., Du, A. R., Iranshahi, M., Naderinasab, M., & Khajeh Karamodin, M. (2010). Evaluating the potentiating effect of galbanic acid from *Ferula szowitsiana* on three common antibiotics against resistant hospital isolates of *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 217-221.
- Bender, S., Lonergan, G. T., Backhaus, J., Cross, R. F., Dumitrache-Anghel, C. N., & Baker, W. L. (2001). The antibiotic activity of the edible and medicinal mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3(2-3).
- Berger-Bachi, B., & Rohrer, S. (2002). Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Archives of microbiology*, 178(3), 165-171.
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42.
- Braga, L. C., Leite, A. A., Xavier, K. G., Takahashi, J. A., Bemquerer, M. P., Chartone-Souza, E., & Nascimento, A. M. (2005). Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Canadian journal of microbiology*, 51(7), 541-547.
- Butler, M. S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, 67(12), 2141-2153.

- CDC. (2018). One Health Basics. (acedido em julho 2019)  
<https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>
- Chang, S. & Miles, P. G. (2004). Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. *CRC press* (2<sup>a</sup> ed., pp. 441-476).
- Chatterjee, D., Halder, D., & Das, S. (2016). Synergistic activity of the antibiotic meropenem in combination with edible mushroom extracts against multidrug resistant bacteria. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 10(6).
- Chen, C., Huang, M., Chen, H., Ke, S., Li, C., Wang, J., & Wu, L. (2011). Fusidic acid resistance among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a taiwanese hospital. *BMC Microbiology*, 11(1), 98.
- Chen, A. W. (2005). What is Shiitake. In *Shiitake cultivation*. Korea: MushWord, (Cap. 1, pp. 3-32).
- Cheung, L. M., Cheung, P. C., & Ooi, V. E. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food chemistry*, 81(2), 249-255.
- Chihara, G. (1992). Immunopharmacology of lentinan, a polysaccharide isolated from *Lentinus edodes*: its application as a host defense potentiator. *International Journal of Oriental Medicine*, 17, 57-77.
- Chowdhury, M. M. H., Kubra, K., & Ahmed, S. R. (2015). Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in Bangladesh. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14(1), 8.
- Darwish, R. M., & Aburjai, T. A. (2010). Effect of ethnomedicinal plants used in folklore medicine in Jordan as antibiotic resistant inhibitors on *Escherichia coli*. *BMC complementary and alternative medicine*, 10(1), 9.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evaluation of Antibiotic Resistance”. *Micribiology and Molecular Biology Reviews*. (Vol.8/12, pp 785-795).
- Demir, M. S., & Yamaç, M. (2008). Antimicrobial activities of basidiocarp, submerged mycelium and exopolysaccharide of some native basidiomycetes strains. *Journal of Applied Biological Sciences*, 2(3), 89-93.
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(2), 303-336.
- DGS (2011). Diagnóstico Sistemático do Pé Diabético. Circular Normativa nº 005/2011 de 21/01/2011. Acedido em: 12 de Outubro de 2019. (acedido em outubro de 2019)

<https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0052011-de-21012011-pdf.aspx>

- DGS. (2017). Programa de prevenção e controlo de infeções e de resistência aos antimicrobianos- PPCIRA 2017. Acedido em Janeiro de 2019, de Direção Geral de Saúde: (acedido em janeiro de 2019) <https://www.dgs.pt/programa-nacional-de-controlo-da-infeccao/relatorios/programa-de-prevencao-e-controlo-de-infecoes-e-de-resistencia-aos-antimicrobianos-relatorio-2017.aspx>
- Duarte, A. (2014a). Agentes antibacterianos: mecanismos de ação e de resistência. In H. Barroso & A. Meliço-Silvestre (Eds), *Microbiologia Médica 1*. (pp. 211-227). Lisboa: Lidel.
- Duarte, A. (2014b). *Enterobacteriaceae*. In H. Barroso & A. Meliço-Silvestre (Eds), *Microbiologia Médica 1*. (pp. 342-355). Lisboa: Lidel.
- Dzidic, S., Suskovic, J., & Kos, B. (2008). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. *Food Technology & Biotechnology*, 46(1), 11-21.
- ECDC/EFSA. (2019). Antimicrobial resistance shows no signs of slowing down. (acedido em fevereiro de 2019) [http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/190226?fbclid=IwAR3CWaUsKdK24KFKOHWyJV-iTjNqWX2N6b4\\_9rFm6LvMVSznTQWa8CBcTAU](http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/190226?fbclid=IwAR3CWaUsKdK24KFKOHWyJV-iTjNqWX2N6b4_9rFm6LvMVSznTQWa8CBcTAU)
- EOL. (2018). *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler 1976. (acedido em dezembro de 2018) <https://eol.org/pages/192749>
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). (2018). Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clinical Microbiology and Infection*, 6(9), 503-508.
- Ferreira, I. C., Barros, L., & Abreu, R. M. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16(12), 1543-1560.
- Flanagan, J. N., & Steck, T. R. (2017). The Relationship Between Agar Thickness and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Indian journal of microbiology*, 57(4), 503-506.
- Fluit, A. C., Visser, M. R., & Schmitz, F. J. (2001). Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 836-71.
- Freitas, E., Aires, A., de Santos Rosa, E. A., & Saavedra, M. J. (2013). Antibacterial activity and synergistic effect between watercress extracts, 2-phenylethyl

- isothiocyanate and antibiotics against 11 isolates of *Escherichia coli* from clinical and animal source. *Letters in applied microbiology*, 57(4), 266-273.
- Gebreyohannes, G., Nyerere, A., Bii, C., & Berhe Sbhatu, D. (2019). Determination of Antimicrobial Activity of Extracts of Indigenous Wild Mushrooms against Pathogenic Organisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.
- Giedraitiene, A., Vitkauskienė, A., Naginiene, R., & Pavilionis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 47(3), 137-146.
- Guimarães, D. O., Momesso, L. d. S., & Pupo, M. T. (2010). Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33(3), 667-679.
- Gupta, N., Limbago, B. M., Patel, J. B., & Kallen, A. J. (2011). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clinical infectious diseases*, 53(1), 60-67.
- Hatvani, N. (2001). Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(1), 71-74.
- Hearst, R., Nelson, D., McCollum, G., Millar, B. C., Maeda, Y., Goldsmith, C. E., & Moore, J. E. (2009). An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 15(1), 5-7.
- Hecker, M., Becher, D., Fuchs, S. and Engelmann, S. (2010). A proteomic view of cell physiology and virulence of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(2-3).
- Heleno, S. A., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., & Ferreira, I. C. (2010). Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 119(4), 1443-1450.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R., & Ferreira, I. C. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food chemistry*, 173, 501-513.
- Hokama, Y., & Hokama, J. L. (1981). *In vitro* inhibition of platelet aggregation with low dalton compounds from aqueous dialysates of edible fungi. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 31(1), 177-180.





- Mattila, P., Suonpaa, K., & Piironen, V. (2000). Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition*, 16(7), 694-696.
- Mattila, P., Könkö, K., Eurola, M., Pihlava, J. M., Astola, J., Vahteristo, L., & Piironen, V. (2001). Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(5), 2343-2348.
- Meroueh, S. O., Bencze, K. Z., Heseck, D., Lee, M., Fisher, J. F., Stemmler, T. L., & Mobashery, S. (2006). Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12), 4404-4409.
- Miragaia, M., Lencastre, H. (2014). *Staphylococcus aureus* e espécies relacionadas. In H. Barroso & A. Melo-Silvestre (Eds), *Microbiologia Médica 1*. (pp. 228-253). Lisboa: Lidel.
- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., & Vojnov, A. A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free radical research*, 40(2), 223-231.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2015). *Medical microbiology*. (7ª edição). Lisboa: Elsevier.
- Murray, P. R. (2017). *Basic medical microbiology*. (1ª edição). Elsevier.
- Neu, H. C., & Gootz, T. D. (1996). Antimicrobial chemotherapy. In 4th, & S. Baron (Eds.), *Medical microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston.
- OECD. (2018). Stemming the superbug tide: Just a few dollars more. *OECD health Policy Studies*. OECD Publishing, Paris
- Oliveira, D. A., Angonese, M., Gomes, C., & Ferreira, S. R. (2016). Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: sustainable recovery and biological activities. *The Journal of Supercritical Fluids*, 111, 55-62.
- O'Neill, J. (2016). The review on antimicrobial resistance: Tackling drug-resistant infections globally. Final report and recommendations. HM Government and Wellcome Trust. (acedido em julho 2019) [https://amr-review.org/sites/default/files/160525\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf)
- Ozen, T., Darcan, C., Aktop, O., & Turkekul, I. (2011). Screening of antioxidant, antimicrobial activities and chemical contents of edible mushrooms wildy grown in

- the Black Sea region of Turkey. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 14(2), 72-84.
- Ozturk, M., Duru, M. E., Kivrak, S., Mercan-Dogan, N., Turkoglu, A., & Ozler, M. A. (2011). 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: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(6), 1353-1360.
- Pankey, G. A., & Sabath, L. D. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clinical infectious diseases*, 38(6), 864-870.
- Pereira, E., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. C. (2012). Towards chemical and nutritional inventory of portuguese wild edible mushrooms in different habitats. *Food Chemistry*, 130(2), 394-403.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Reis, F. S., Martins, A., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2012). 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*, 50(5), 1201-1207.
- Ribeiro, A., Estanqueiro, M., Oliveira, M., & Sousa Lobo, J. (2015). Main benefits and applicability of plant extracts in skin care products. *Cosmetics*, 2(2), 48-65.
- Rice, L., & Bonomo, R. (2005). Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial. In Viclor Lorian, M. D. (Eds), *Antibiotics in Laboratory Medicine* (5<sup>a</sup> ed., pp. 441-476). Nova Iorque.
- Saavedra, M. J., Dias, C. S., Martinez-Murcia, A., Bennett, R. N., Aires, A., & Rosa, E. A. (2012). Antibacterial effects of glucosinolate-derived hydrolysis products against Enterobacteriaceae and Enterococci isolated from pig ileum segments. *Foodborne pathogens and disease*, 9(4), 338-345.
- Sánchez-Sánchez, M., Cruz-Pulido, W. L., Bladinieres-Cámara, E., Alcalá-Durán, R., Rivera-Sánchez, G. and Bocanegra-García, V. (2017). Bacterial Prevalence and Antibiotic Resistance in Clinical Isolates of Diabetic Foot Ulcers in the Northeast

- of Tamaulipas, Mexico. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 16(2), 129-134.
- Sánchez, C. (2017). Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and systems biotechnology*, 2(1), 13-22.
- Santos, A. L. dos, Santos, D. O., Freitas, C. C. de, Ferreira, B. L. A., Afonso, I. F., Rodrigues, C. R. and Castro, H. C. (2007). *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 43(6).
- Sarker, S. D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42, 321-324.
- Silva, R., Fritz, C., Cubillos, J., & Díaz, M. (2010). Manual para la producción de hongos comestibles (Shiitake). *Proyecto CONAMA-FPA RM-027-2010*. Santiago do Chile.
- Singleton Vernon, L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol. C*, 299, 152-78.
- Sousa, J.C., Machado, E., Novais, C., Peixe, L., Amorim, J., & Monteiro, N. (2016). Dados históricos sobre antibioterapia. *Antibióticos*. (Vol.I, 1ª edição, pp. 23-35). Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto.
- Smolskaite, L., Venskutonis, P. R., & Talou, T. (2015). Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 462-471.
- Stamets, P. (2011). *Growing gourmet and medicinal mushrooms* Ten Speed Press. (3<sup>a</sup> ed), Berkeley, USA.
- Stefanovic, O. D. (2018). Synergistic Activity of Antibiotics and Bioactive Plant Extracts: A Study Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Bacterial Pathogenesis and Antibacterial Control*, 23.
- Tambekar, D., Sonar, T., Khodke, M., & Khante, B. (2006). The novel antibacterials from two edible mushrooms: *Agaricus bisporus* and *Pleurotus sajor caju*. *International Journal of Pharmacology*, 2(5), 584-587.
- Taofiq, O., González-Paramás, A. M., Martins, A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. (2016). Mushrooms extracts and compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics - A review. *Industrial Crops and Products*, 90, 38-48.

- Teke, G. N., Kuate, J. R., Kueté, V., Teponno, R. B., Tapondjou, L. A., Tane, P., & Vilarem, G. (2011). Bio-guided isolation of potential antimicrobial and antioxidant agents from the stem bark of *Trilepisium madagascariense*. *South African journal of botany*, 77(2), 319-327.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119(6), S3-S10.
- Tsuchido, T., & Takano, M. (1988). Sensitization by heat treatment of *Escherichia coli* K-12 cells to hydrophobic antibacterial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(11), 1680-1683.
- Ushimaru, P. I., Barbosa, L. N., Fernandes, A. A. H., Di Stasi, L. C., & Júnior, A. F. (2012). In vitro antibacterial activity of medicinal plant extracts against *Escherichia coli* strains from human clinical specimens and interactions with antimicrobial drugs. *Natural product research*, 26(16), 1553-1557.
- van Duin, D., Kaye, K. S., Neuner, E. A., & Bonomo, R. A. (2013). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 75(2), 115-120.
- Vargiu, A. V., & Nikaido, H. (2012). Multidrug binding properties of the AcrB efflux pump characterized by molecular dynamics simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50), 20637-20642.
- Vaz, J. A., Heleno, S. A., Martins, A., Almeida, G. M., Vasconcelos, M. H., & Ferreira, I. C. (2010). Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: In vitro antioxidant activity and growth inhibition of human tumour cell lines. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(10), 2881-2884.
- Venturini, M. E., Rivera, C. S., Gonzalez, C., & Blanco, D. (2008). Antimicrobial activity of extracts of edible wild and cultivated mushrooms against foodborne bacterial strains. *Journal of food protection*, 71(8), 1701-1706.
- Victor, L. Y., Hansen, D. S., Ko, W. C., Sagnimeni, A., Klugman, K. P., & Von Gottberg, A. (2007). Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. *Emerging infectious diseases*, 13(7), 986.
- Wasser, S. P. (2005). Shiitake (*Lentinus edodes*). *Encyclopedia of Dietary Supplements*, 653-664.

- Wasser, S. P., & Weis, A. L. (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: Current perspectives. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1(1), 47-50.
- Walsh, C. (2004). Washington DC. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. *Protein Science*, 13, 3059-60.
- World Health Organization. (2001). WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. Geneva.
- World Health Organization. (2011). The world medicines situation report 2011. 3rd, Geneva.
- World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance: Global Report on surveillance 2014. Geneva.
- World Health Organization. (2017a). Agentes patogénicos prioritários. (acedido em janeiro de 2019) [http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812)
- World Health Organization. (2017b). One Health. (acedido em julho 2019) <https://www.who.int/features/qa/onehealth/en/>
- Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1451-1470.
- Xu, Z., Fu, L., Feng, S., Yuan, M., Huang, Y., Liao, J., Zhou, L., Yang, H., & Ding, C. (2019). Chemical Composition, Antioxidant and Antihyperglycemic Activities of the Wild *Lactarius deliciosus* from China. *Molecules*, 24(7), 1357.
- Zenão, S., Aires, A., Dias, C., Saavedra, M. J., & Fernandes, C. (2017). Antibacterial potential of *Urtica dioica* and *Lavandula angustifolia* extracts against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic foot ulcers. *Journal of Herbal Medicine*, 10, 53-58.
- Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M., & Fanelli, R. (2000). Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet (London, England)*, 355(9217), 1789-1790.

**Anexos**

## Anexo I – Meios de cultura

### Meio 1 - Meio de cultura *Brain Heart Infusion* agar (Oxoid)

Composição	g/L
Infusão de cérebro	12,5
Infusão de carne de coração	5,0
Glucose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato dissódico	2,5
Proteose de peptona	10,0
Agar	10,0

### Meio 2 - Meio de cultura Mueller-Hinton caldo (Oxoid)

Composição	g/L
Infusão de carne desidratada	300
Caseína hidrolisada	17,5
Amido	1,5

### Meio 3 - Meio de cultura *Brain Heart Infusion* agar (Oxoid)

Composição	g/L
Infusão de carne desidratada	2
Caseína hidrolisada	17,5
Amido	1,5
Agar-agar	17

## **Anexo II - Protocolo da determinação da CMI através do método da microdiluição em placa com resazurina**

### **Preparação do Inóculo**

1. A partir de uma cultura pura com 24h, transferir uma pequena porção para um frasco contendo 50 mL de caldo Mueller-Hinton e incubar over-night a 37 °C.
2. Após 12-18 horas de incubação proceder à leitura da densidade ótica a 500 nm (valores entre 0.5-1 para ter uma concentração de  $5 \times 10^6$  UFC/mL).

### **Preparação da Resazurina**

1. Dissolver 270 mg de resazurina em 40 mL de água destilada esterilizada.

### **Preparação da microplaca para determinação da CMI**

Para a realização deste método utilizam-se microplacas estéreis de 96 poços de fundo chato e com tampa.

1. Na placa, distribuir asseticamente 100 µL de caldo Mueller-Hinton (Oxoid) em todos os poços com exceção dos da linha A.
2. Nos poços da linha A, adicionar 200 µL dos compostos a testar (extratos e antibióticos). A partir de cada poço dessa linha transferir para o poço da linha seguinte 100 µL, e assim sucessivamente até à linha H (diluições seriadas).
3. Após as diluições adicionar a cada poço 20 µL de inóculo e 20 µL de solução de resazurina
4. Tapar as placas e incubar a 37 °C durante 24 horas.
5. A leitura faz-se visualmente através da observação da mudança de cor azul para rosa (redução da resazurina). Nos poços onde a cor permanece azul, significa que não ocorreu redução. Já nos poços onde se verifica alteração da cor de azul para rosa, considera-se que há viabilidade bacteriana.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
100 $\mu$ L A	200 $\mu$ L comp	200 $\mu$ L comp	200 $\mu$ L comp	200 $\mu$ L comp	200 $\mu$ L comp	200 $\mu$ L comp	200 $\mu$ L comp	200 $\mu$ L comp	200 $\mu$ L comp	200 $\mu$ L comp	200 $\mu$ L comp	200 $\mu$ L comp
100 $\mu$ L B	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH
100 $\mu$ L C	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH
100 $\mu$ L D	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH
100 $\mu$ L E	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH
100 $\mu$ L F	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH
100 $\mu$ L G	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH
100 $\mu$ L H	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH	100 $\mu$ L MH



No final das diluições, adicionar a cada poço 20  $\mu$ L de inóculo e 20  $\mu$ L de resazurina.