



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CRISTIANE URCINA JOANNA OLIVEIRA LIMA**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *Agaricus blazei Murrill*  
SOBRE BACTÉRIA PATOGÊNICA EM SERES HUMANOS**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Margô Gomes de Oliveira Karnikowski

Brasília/DF

2016

CRISTIANE URCINA JOANNA OLIVEIRA LIMA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *AGARICUS BLAZEI* MURRILL  
SOBRE BACTÉRIA PATOGÊNICA EM SERES HUMANOS

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde  
pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 02 de dezembro de 2016.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Margô Gomes de Oliveira Karnikowski, PhD – Faculdade de Ceilândia da  
Universidade de Brasília (FCE)**

**(Orientadora)**

---

**Eduardo Antônio Ferreira, PhD – Faculdade de Ceilândia da Universidade de  
Brasília (FCE)**

**(Examinador interno - Suplente)**

---

**Eliana Fortes Gris, PhD – Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília  
(FCE)**

**(Examinadora interna)**

---

**Maria Celeste Morita, PhD – Programa de Pós graduação Universidade  
Estadual de Londrina (UEL)**

**(Examinadora externa)**

---

**Maria Rita Carvalho Garbi Novaes, PhD – Programa de Pós graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)**

**(Examinadora interna)**

---

**Marileusa D. Chiarello, PhD – Programa de Pós graduação *stricto sensu* em  
Gerontologia da Universidade Católica de Brasília (UCB)**

**(Examinadora externa)**

*Dedico este trabalho aos meus pais, Suzano e Joana, que me ensinaram a dar os meus primeiros passos, passos estes que bem conduzidos e estruturados constituíram valores preciosos. E que me mostraram minhas limitações, mas principalmente as minhas possibilidades.*

*“A vida me ensinou...*

*A dizer adeus às pessoas que amo, sem tirá-las do coração;*

*Sorrir às pessoas que não gostam de mim,*

*Para mostrá-las que sou diferente do que elas pensam;*

*Fazer de conta que tudo está bem quando isso não é verdade,*

*Para que eu possa acreditar que tudo vai mudar;*

*Calar me para ouvir; aprender com meus erros.*

*Afinal, eu posso sempre ser melhor.*

*A lutar contra as injustiças, sorrir quando o que mais desejo é gritar todas as minhas  
dores para o mundo.*

*A não temer o futuro;*

*Ensinou me e está me ensinando a aproveitar o presente,*

*Como um presente que da vida recebi, e usá-lo como um diamante que eu mesmo  
tenha que lapidar, lhe dando forma da maneira que eu escolher.”*

*Charles Chaplin*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, mas principalmente na angústia e cansaço, levando-me a compreender e perceber que tenho capacidade para dar continuidade, prosseguir no caminho. Este é um momento que concilia o início e o término de mais uma etapa da minha vida, rogo a Ti, Ó Pai, que continue a iluminar o meu caminho e que me conceda a sabedoria e o discernimento...

A minha família que se mostrou disposta a me auxiliar nas minhas dificuldades.

Aos meus irmãos Washington, Teresa e Wanslei que consecutivamente se mostraram compreensivos nos momentos que julgava ser os mais difíceis. Amados, que vibram cada momento de conquista da nossa história.

A professora Dra. Margô Gomes de Oliveira Karnikowski, o meu carinho e a minha gratidão, pois soube além de transmitir seus conhecimentos e sua experiência, me apoiou em todas as minhas dificuldades e limitações, mas que principalmente me ensinou com exemplos antes de ensinar com palavras.

Aos professores doutores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Octávio Luiz Franco e Taia Maria Berto Rezende da Universidade Católica de Brasília, a minha singela gratidão. “Professor, sois o sal da terra e a luz do mundo. Sem vós tudo seria baço e a terra escura. Professor faz tua cadeira a cátedra de um mestre. Se souberes elevar teu magistério, ele te elevará à magnificência... Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina. Melhor professor nem sempre é o de mais saber e, sim aquele que, modesto, tem a dificuldade de manter o respeito e a disciplina da classe.” (Cora Carolina)

Aos meus amigos que souberam compreender a minha ausência, falta de tempo... Mas que sempre me incentivaram e apoiaram para a finalização deste propósito.

Aos funcionários dos Laboratórios de Tecnologia de Alimentos, Microbiologia e Bioensaios da Universidade Católica de Brasília (UCB), Marcos Sodré, Elias Rosa e Eliane de Jesus Santos, o meu agradecimento e homenagem, pois no desempenho de suas atribuições profissionais, contribuíram significativamente para a realização deste trabalho.

As minha queridas acadêmicas de iniciação científica Adriele Johner, Gabriela Abreu de Aviz e Thiene Rabelo Meneses Regadas Guilherme; da Universidade de Brasília e UCB, por acreditarem na pesquisa científica e auxílio ativo para concretização deste estudo.

Aos meus colegas de pesquisa Mirna de Souza Freire, Maurício Gonçalves Sousa, Osmar Nascimento Silva, Stella Maris de Freitas Lima que mesmo diante dos desafios inerentes a pesquisa científica; sempre demonstraram companheirismo, empenho, apoio e disponibilidade em ajudar.

Obrigada!

## RESUMO

**Introdução:** Evidências científicas veem demonstrando que *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) destaca-se dentre os demais patógenos por promover elevadas taxas de morbidade, mortalidade e aumento de custos hospitalares em âmbito mundial. Este microrganismo é intrinsicamente resistente à ampla diversidade de fármacos e capaz de se tornar resistente a diversos agentes antimicrobianos. Atualmente, verifica-se uma significativa limitação do arsenal terapêutico que pode ser empregado para o tratamento de infecções causadas por esta bactéria multirresistente. Estudos têm demonstrado que o cogumelo *Agaricus blazei* Murrill (AbM) apresenta atividade antimicrobiana. **Objetivo:** Avaliar a ação antimicrobiana dos extratos do *Agaricus blazei* Murrill sobre *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. **Métodos:** As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente foram obtidas de pacientes internados no Hospital Regional da Asa Norte do Distrito Federal. A multirresistência antimicrobiana foi determinada segundo os critérios do *National Committee for Clinical Labocamundongory Standasrds*. Os extratos, aquoso e metanólico, foram preparados a partir do basidiocarpo bruto do AbM e parte de sua composição química foi determinada, assim como os compostos fenólicos (polifenóis totais, polimerizados e não polimerizados; ésteres tartáricos e flavonóis) e ação antioxidante pelos métodos de DPPH e ABTS. Os testes *in vitro* contemplaram as avaliações da concentração inibitória mínima, do potencial hemolítico dos extratos, da viabilidade celular e quantificação de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12) em células RAW 264.7. No ensaio *in vivo*, os animais foram infectados com a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente para avaliação da ação antimicrobiana dos extratos do cogumelo na sobrevivência de camundongos. **Resultados:** Os dados da composição química do AbM demonstraram uma elevada quantidade de carboidratos, proteínas e fibras, associado a baixo teor de gorduras. O extrato metanólico apresentou uma maior quantidade de compostos fenólicos em relação ao aquoso, e ambos os extratos evidenciaram elevada atividade antioxidante pelo método ABTS. Os demais estudos *in vitro* demonstraram que o extrato metanólico apresentou atividade inibitória no crescimento de *P. aeruginosa*, ambos os extratos de AbM não promoveram atividade hemolítica e não estimularam a

secreção de citocinas. Além disso, os extratos diminuíram a viabilidade celular. Nos experimentos *in vivo*, o extrato aquoso aumentou a sobrevivência de camundongos com infecção em 60%, quando comparados com animais controle. **Conclusão:** Estes dados sugerem que o extrato aquoso do cogumelo AbM pode ser uma alternativa terapêutica para o tratamento de infecções bacterianas multirresistentes.

Palavras-chave: *Agaricus blazei* Murrill; *Agaricus basiliensis*; antimicrobiana; *Pseudomonas aeruginosa*; sepse.

## ABSTRACT

**Introduction:** Scientific evidence demonstrating see that *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) stands out among the other pathogens by promoting high rates of morbidity, mortality and increased hospital costs worldwide. This microorganism is intrinsically resistant to wide range of drugs and able to become resistant to many antimicrobial agents. Currently, there is a significant limitation in the therapeutic arsenal that can be used for the treatment of infections caused by multidrug this bacterium. Studies have shown that *Agaricus blazei* Murrill (AbM) has antimicrobial activity. **Objective:** To evaluate the antimicrobial action of *Agaricus blazei* Murrill extracts on multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods:** multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains were obtained from patients admitted to the Regional Hospital of the North Wing of the Federal District. The multidrug resistance was determined according to the criteria of the National Committee for Clinical Labocamundongory Standasrds. The extracts and aqueous methanol have been prepared from crude basidiocarp AbM and part of their chemical composition was determined, as well as phenolic compounds (total polyphenols polymerized and unpolymerized; Tartaric acid esters, flavonoids) and antioxidant activity by DPPH methods and ABTS. In vitro testing contemplated reviews the minimum inhibitory concentration, hemolytic potential of the extracts, the cellular viability and quantification of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12) in RAW 264.7 cells. In the in vivo test, the animals were infected with *Pseudomonas aeruginosa* multiresistant to evaluate the antimicrobial activity of mushroom extracts on the survival of mice. **Results:** The data on the chemical composition AbM showed a high amount of carbohydrates, protein and fiber, associated with low fat content. The methanol extract showed a greater amount of phenolic compounds in relation to the aqueous, and both extracts showed high antioxidant activity by ABTS method. Other in vitro studies showed that the methanol extract showed inhibitory activity on the growth of *P. aeruginosa*, both AbM extracts did not promote hemolytic activity and did not stimulate the secretion of cytokines. Moreover, the extracts decreased cell viability. In in vivo experiments, the aqueous extract increased the survival of mice infected by 60% when compared to control animals. **Conclusion:** These data suggest that the

aqueous extract of the mushroom AbM may be a therapeutic alternative for the treatment of multidrug-resistant bacterial infections.

Keywords: *Agaricus blazei* Murrill; *Agaricus Basiliensis*; antimicrobial; *Pseudomonas aeruginosa*; sepsis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principais fatores de virulência da <i>P. aeruginosa</i> .....	26
<b>Figura 2.</b> Modelos estruturais e funcionais das bombas de efluxo de <i>P. aeruginosa</i> , indicando a localização das proteínas constituintes da bomba e ação preferencial a determinados tipos de substratos .....	34
<b>Figura 3.</b> Cogumelo <i>Agaricus blazei</i> Murrill .....	37
<b>Figura 4.</b> Fluxograma dos experimentos iniciais .....	49
<b>Figura 5.</b> Fluxograma com a descrição dos experimentos <i>in vitro</i> .....	56
<b>Figura 6.</b> Fluxograma com a descrição dos experimentos <i>in vivo</i> .....	62
<b>Figura 7.</b> Avaliação da capacidade hemolítica dos extratos aquoso e metanólico (80%) do cogumelo AbM sobre eritrócitos de camundongos .....	71
<b>Figura 8.</b> Efeito dos extratos aquoso e metanólico do cogumelo AbM sobre a viabilidade de células RAW 264.7.....	73
<b>Figura 9.</b> Dosagem de IL-10 em sobrenadante de cultura células RAW 264.7 .....	74
<b>Figura 10.</b> Influência do extrato aquoso do cogumelo AbM, antibiótico e água estéril na sobrevivência de camundongos submetidos a infecção com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente .....	76
<b>Figura 11.</b> Influência do extrato metanólico do cogumelo AbM, antibiótico e água estéril na sobrevivência de camundongos submetidos a infecção com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente .....	76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Exemplo de mecanismo de resistência da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	32
<b>Tabela 2.</b> Propriedades biológicas do cogumelo AbM.....	40
<b>Tabela 3.</b> Análise da composição do cogumelo AbM desidratado e em pó .....	67
<b>Tabela 4.</b> Valores das análises do conteúdo fenólico e atividade antioxidante dos extratos aquoso e metanólico do cogumelo <i>Agaricus blazei</i> Murrill .....	68
<b>Tabela 5.</b> Percentual de inibição da bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente realizado com os extratos aquoso e metanólico do cogumelo <i>Agaricus blazei</i> Murrill (AbM), analisado pelo teste de Concentração Inibitória Mínima .....	70
<b>Tabela 6.</b> Avaliação da toxicidade grave em camundongos tratados com o extrato aquoso e metanólico do cogumelo AbM .....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS - ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

AbM - *Agaricus blazei* Murrill

ABTS - 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico

ADPRT – enzimas mono-ADP-ribosiltransferase

AG – aminoglicosídeo

Anti-QS – anticorpos quórum sensing

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – associação dos químicos analíticos oficiais

A. *Sylvaticus* - *Agaricus sylvaticus*

BHI - *Brain Heart Infusion Agar*

BL - betalactâmico

CC 50% - concentração citotóxica 50%

CD - células dendríticas

CCEO-3 - células tumorais escamosas orais

CF – cefalosporina

CIM - concentração inibitória mínima

CCl4 - tetracloreto de carbono

CP - carbapenêmico

DMEM – meio Dulbecco's modified Eagle's medium

DCNT - doenças crônicas não transmissíveis

DNA – ácido desoxirribonucleico

DO – densidade óptica

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

*E. coli* – *Escherichia coli*

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

EAG - equivalente de Ácido Gálico

EF2 - fator de alongamento 2 da células hospedeira

EGF - fator de crescimento epidérmico

ELISA – enzyme linked immunosorbent assay

EPS - substâncias poliméricas extracelulares

Fe - ferro

FGF - fator de crescimento de fibroblastos

FQ - fluoroquinolona

Hep-2 - células epiteliais humanas derivadas de um carcinoma da laringe

HK-Pa MR - antígeno bacteriano de *P. aeruginosa* multirresistente

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

HRAN - Hospital Regional da Asa Norte

IFN- $\gamma$  - interferon gama

IGF-I - fator de crescimento semelhante à insulina I

IL-8 – interleucina 8

IL-10 - interleucina 10

IL-12 - interleucina 12

IMP - imipenemase

INF – interferon

INF- $\gamma$  – interferon gama

LB - meio Luria-Bertani

LC50 - concentração letal

LPS - lipopolissacarídeo

Mex - Multidrug efflux pump

MH – meio muller hinton

MHC - complexo maior de histocompatibilidade

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio

M $\beta$ L - metalo- $\beta$ -lactamases

NAD<sup>+</sup> - Nicotinamida denina dinucleotídeo

NCCLS - *National Committee for Clinical Labocamundongory Standards*

NIH/3T3 - linhagens de células de fibroblastos não-tumorais

NOS - enzima óxido nítrico sintase

NK – natural killer

·NO - óxido nítrico

OPRF – canais de porinas

*P. aeruginosa* - *Pseudomonas aeruginosa*

PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas

PNP – polifenóis não polimerizados

PP – polifenóis polimerizados

QS - *quorum sensing*

RND - *resistance-nodulation-cell division*

RNS - espécies reativas de nitrogênio

ROS - espécies reativas de oxigênio

TGF- $\alpha$  - fator de crescimento transformador- $\alpha$

TGF- $\beta$  - fator de crescimento transformador- $\beta$

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

TSA - teste de sensibilidade antibiótica

T3SS - sistema de secreção tipo 3

SE - suspensão de eritrócitos

SES/DF – Secretaria de Saúde do Distrito Federal

SSG - *Sclerotinia sclerotiorum*

UCB - Universidade Católica de Brasília

UDP – uridina difosfato-glucose

UFG - Universidade Federal de Goiás

USA – United States of America

UTIs - unidades de terapia intensiva

VIM - integron Verona codificado

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	24
<b>1.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>: Microrganismo Resistente à Classe de Fármacos Antimicrobianos de Última Geração</b> .....	24
<b>1.1.2 Fatores de Virulência da <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	25
1.1.2.1 Flagelos e Pili Tipo IV .....	27
1.1.2.2 Sistema de Secreção Tipo III .....	27
1.1.2.3 Quorum Sensing e Biofilme .....	28
1.1.2.4 Proteases .....	29
1.1.2.5 Lipopolissacarídeo .....	29
1.1.2.6 Outros Fatores de Virulência .....	30
<b>1.1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e Resistência à Antibioticoterapia</b> .....	31
1.1.3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Fatores de Resistência e Antibioticoterapia .....	31
1.1.3.1.1 <i>Resistência Intrínseca</i> .....	32
1.1.3.1.2 <i>Resistência Adquirida</i> .....	35
1.1.3.1.3 <i>Resistência Adaptável</i> .....	36
<b>1.1.4 O Cogumelo <i>Agaricus blazei</i> Murrill</b> .....	36
1.1.4.1 Propriedades Funcionais do Cogumelo AbM .....	38
1.1.4.2 Compostos Bioativos do AbM .....	41
1.1.4.2.1 <i>Substâncias Antioxidantes</i> .....	42
1.1.4.2.2 <i>Ergosterol</i> .....	44
1.1.4.2.3 <i>Polissacarídeos</i> .....	44
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	48

2.1 OBJETIVO GERAL .....	48
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	48
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
3.1 AMOSTRA DO COGUMELO ABM.....	49
3.2 MÉTODOS.....	50
<b>3.2.1 Análises Químicas .....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.2 Extratos do cogumelo AbM .....</b>	<b>51</b>
3.2.2.1 Extrato Metanólico .....	51
3.2.2.2 Extrato Aquoso .....	51
<b>3.2.3 Avaliação do Conteúdo Fenólico .....</b>	<b>52</b>
3.2.3.1 Determinação de Polifenóis Totais .....	52
3.2.3.2 Determinação de Polifenóis Polimerizados (PP) e Não Polimerizados (PNP) .....	53
3.2.3.3 Determinação de Ésteres Tartáricos e Flavonóis .....	53
<b>3.2.4 Antioxidantes in vitro: Radicais DPPH e ABTS .....</b>	<b>53</b>
3.3 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> .....	54
<b>3.3.1 Seleção das Amostras de Bactérias, Preparação do Material de Cultura e Determinação do Perfil de Resistência Antimicrobiana.....</b>	<b>54</b>
<b>3.3.2 Preparo dos Inóculos Bacterianos .....</b>	<b>57</b>
<b>3.3.3 Preparo das Soluções dos Extratos do Cogumelo AbM .....</b>	<b>57</b>
<b>3.3.4 Avaliação da Atividade Antibacteriana .....</b>	<b>57</b>
<b>3.3.5 Avaliação do Potencial Hemolítico dos Extratos do Cogumelo AbM .....</b>	<b>58</b>
<b>3.3.6 Obtenção dos Antígenos Bacterianos .....</b>	<b>59</b>

<b>3.3.7 Avaliação da Viabilidade Celular <i>In Vitro</i> Utilizando MTT</b> .....	60
<b>3.3.8 Quantificação das Citocinas <i>In Vitro</i></b> .....	60
3.4 ENSAIOS <i>IN VIVO</i> .....	61
<b>3.4.1 Preparo do Microrganismo</b> .....	63
<b>3.4.2 Preparação dos Extratos do AbM: Aquoso e Metanólico</b> .....	63
<b>3.4.3 Animais</b> .....	64
<b>3.4.4 Delineamento experimental</b> .....	64
<b>3.4.5 Monitoramento e Sobrevida</b> .....	65
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	66
3.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	66
<b>4 RESULTADOS</b> .....	67
4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO COGUMELO ABM .....	67
<b>4.1.2 Análises do Conteúdo de Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante dos Extratos Aquoso e Metanólico do Cogumelo AbM</b> .....	68
4.2 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> .....	69
<b>4.2.1 Teste da Concentração Inibitória Mínima</b> .....	69
<b>4.2.2 Avaliação da Atividade Hemolítica</b> .....	69
4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO DOS EXTRATOS DO COGUMELO AbM .....	71
<b>4.3.1 Avaliação da viabilidade celular utilizando MTT</b> .....	71
<b>4.3.2 Dosagem de citocinas em linhagem de células RAW 264.7</b> .....	72
4.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DO COGUMELO ABM NA SOBREVIDA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À INFECÇÃO.....	74

<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>125</b>
<b>ANEXO A – DOCUMENTO COMPROBATÓRIO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA .....</b>	<b>125</b>
<b>ANEXO B – DOCUMENTO COMPROBATÓRIO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA .....</b>	<b>126</b>

## INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas hospitalares constituem-se em um problema de saúde pública mundial promovendo aumento da morbidade e mortalidade, e conseqüentemente encontram-se associadas a elevados custos hospitalares (1-2). Algumas infecções se destacam segundo as taxas de prevalência incluindo pneumonia, bacteremias e infecções do trato urinário e de sítio cirúrgico (3). Dentre os agentes etiológicos que induzem ao desenvolvimento destas infecções, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) assume um papel de destaque devido as suas elevadas prevalência e incidência (4-5).

Evidências científicas veem demonstrando que as infecções hospitalares bacterianas, especialmente as causadas por bactérias Gram-negativas, se apresentam uma grande ameaça devido à rápida disseminação de cepas resistentes aos agentes antimicrobianos disponíveis (6). Verifica-se que há um arsenal terapêutico limitado que pode ser empregado para o tratamento destes agentes patogênicos (7-8).

O surgimento de cepas resistentes de *P. aeruginosa* aos antibióticos convencionais, seja por processo natural ou acelerado por pressão seletiva, se constitui um assunto relevante na saúde pública em âmbito mundial, exigindo rápidas intervenções epidemiológicas, microbiológicas e terapêuticas (9-11). Dentre estas intervenções enfatiza-se a necessidade do uso racional de antimicrobianos, a melhora no controle de infecções e o investimento no desenvolvimento de novos fármacos (12).

Por outro lado, a busca por novas opções terapêuticas para a resistência microbiana tem sido prioridade na agenda de saúde mundial. No Brasil, fonte de inestimável biodiversidade, vários princípios ativos presentes em plantas e em alimentos podem ser considerados a base para terapias inovadoras e efetivas.

Neste contexto, o cogumelo *Agaricus blazei* Murrill (AbM) representa uma possibilidade para o tratamento e o controle das infecções hospitalares mais recorrentes. Pesquisas *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que frações do AbM

induzem ação antimicrobiana estimulando a secreção de citocinas e a ação de outros componentes do sistema imunitário, em quadros de pneumonia e septicemia induzidos em modelos animais (13-16). Entretanto, até o momento não há relatos de experimentos sobre a ação de extratos e/ou dos compostos bioativos do AbM em cepas de bactérias multirresistentes.

## 1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*: Microrganismo Resistente à Classe de Fármacos Antimicrobianos de Última Geração

*Pseudomonas* é um bacilo aeróbio, Gram-negativo reto ou ligeiramente reto, não fermentador de glicose, apresenta motilidade por meio de um ou mais flagelos polares, e possui a enzima oxidase (17).

*P. aeruginosa* tem sido a espécie mais frequentemente isolada de amostras clínicas (18-22). Esta bactéria pode ser encontrada principalmente em ambientes úmidos, mas poderá estar presente no solo, água e plantas. Entretanto, na microbiota de indivíduos saudáveis tem sido raramente encontrada. Contudo, em pacientes hospitalizados especialmente aqueles internados em unidades de terapia intensiva (UTIs) pode ser considerada uma das espécies bacterianas não fermentativas mais prevalentes entre as espécies clínicas, sendo a principal causadora de pneumonia nosocomial em hospitais brasileiros. Essa espécie de bactéria apresenta uma elevada facilidade de colonização em pacientes internados em ambiente hospitalar devido à frequente exposição destes aos instrumentos e aparelhos auxiliares, mãos de profissionais de saúde e uso de antimicrobianos de amplo espectro (17).

O principal sítio de colonização e reservatório da *P. aeruginosa* no homem é o trato gastrointestinal, podendo ser encontrada também em outros locais úmidos do corpo, como orofaringe, mucosa nasal, axilas e períneo. Ademais, em hospitais este microrganismo tem sido constantemente reintroduzido por meio de alimentos, principalmente frutas e vegetais (23).

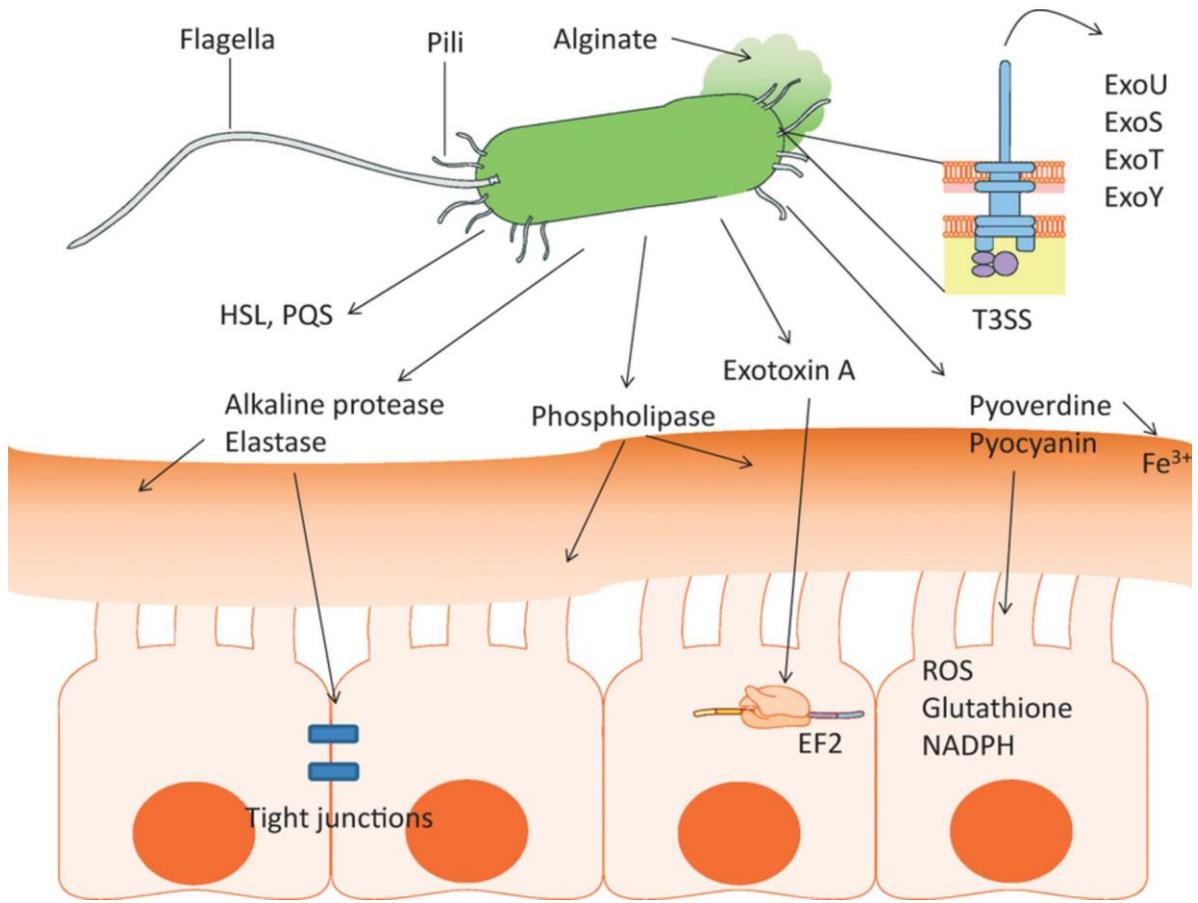
A depender de características ambientais e do estado imunitário do hospedeiro, a *P. aeruginosa* pode apresentar-se como microrganismo em repouso, ou atuar como um patógeno altamente virulento induzindo à infecções agudas.

Fatores de superfície bacteriana, tais como flagelos, pili e lipopolissacarídeo, bem como processos ativos, tais como a secreção de toxinas e a formação de biofilme são considerados fatores determinantes de virulência que afetam o resultado das infecções por *P. aeruginosa* (23).

### **1.1.2 Fatores de Virulência da *Pseudomonas aeruginosa***

Esta bactéria produz um elevado número de fatores de virulência que contribuem para sua patogênese, destacando-se especialmente: flagelos, pili ou fímbrias, lipopolissacarídeo, mecanismo *quorum sensing* (QS), biofilme, sistema de secreção tipo 3 (T3SS). Outros diversos fatores de virulência também são secretados por *P. aeruginosa*, como: proteases, lipases, fosfolipases e piocianina. Um resumo dos fatores de virulência da *P. aeruginosa* é representado na Figura 1 (17, 23).

O fenótipo da *P. aeruginosa* difere conforme o tipo de infecção, aguda ou crônica (24). Em infecções agudas esta bactéria expressa uma grande variedade de fatores de virulência, contudo, em infecções crônicas podem estar ausentes algumas das características bacterianas mais inflamatórias, tais como, flagelos e pili (25). Além disso, a *P. aeruginosa* em infecções crônicas tende a formar biofilme e aumenta a produção do exopolissacarídeo alginato (17, 23).



**Figura 1.** Principais fatores de virulência da *P. aeruginosa* (Gellatly & Hancock, 2013) (26).

Flagelos e pili tipo IV são as principais adesinas, capazes de se ligar a receptores gangliosídeos  $G_{M1}$  e  $G_{M2}$ . Juntamente com lipopolissacarídeo, estas estruturas superficiais são consideradas potencialmente inflamatórias. Uma vez que o contato com o epitélio do hospedeiro tenha ocorrido, o T3SS pode ser ativado, e este fator de virulência é responsável pela introdução de citotoxinas diretamente no interior da célula hospedeira, facilitando assim, a evasão das defesas do hospedeiro. Vários fatores de virulência são secretados por *P. aeruginosa* e têm efeitos diferentes no hospedeiro. Diversas proteases são produzidas, e podem degradar fatores do sistema complemento, mucinas, e alterar as junções das células epiteliais que conduzem a disseminação das bactérias. As lipases e fosfolipases podem ter como alvo os lipídios, bem como as membranas da célula hospedeira. Píocianina, um pigmento azul-esverdeado, pode interferir com as vias de transporte de elétrons da célula hospedeira. Píoverdina captura  $Fe^{3+}$  favorecendo uma vantagem competitiva em um ambiente no qual o ferro livre é escasso (26).

### 1.1.2.1 Flagelos e Pili Tipo IV

A *P. aeruginosa* possui um único flagelo polar e pili tipo IV. Estas estruturas da bactéria podem apresentar a função de adesão, motilidade e indução de resposta inflamatória (27).

O flagelo proporciona motilidade em um ambiente aquoso e é uma parte essencial da quimiotaxia bacteriana. Durante uma infecção, a bactéria pode aderir às células epiteliais hospedeiras através da ligação do seu flagelo ao receptor  $G_{M1}$  e pode provocar uma forte resposta inflamatória (27).

Dentre os fatores de adesão constituintes da *P. aeruginosa* o pili tipo IV é o mais importante e está envolvido na motilidade e na formação de biofilme (23). Flagelos e pili promovem motilidade em superfícies semi-sólidas (28, 29). Pili também pode levar à agregação, promovendo a formação de microcolônias em tecidos-alvo pelas bactérias, a concentração das bactérias em um local de forma eficaz e, proporcionar potencialmente proteção contra o sistema imunitário do hospedeiro e de antibióticos (30, 31). Por outro lado, pili é a principal adesina envolvida na fagocitose da *P. aeruginosa* (32).

### 1.1.2.2 Sistema de Secreção Tipo III

Diversas bactérias patogênicas Gram-negativas possuem um meio de introdução de toxinas diretamente no interior das células hospedeiras, através de um poro formado na membrana da célula hospedeira, denominado Sistema de secreção tipo III (T3SS). O T3SS da *P. aeruginosa* é um importante determinante de virulência, e a sua expressão está frequentemente associada com infecções agudas invasivas e tem sido associada ao aumento da mortalidade em pacientes infectados (17, 33). Apenas quatro exotoxinas, proteínas efetoras, foram identificadas - ExoY, ExoS, ExoT, e ExoU (33).

As quatro proteínas efetoras do T3SS da *P. aeruginosa* são expressas variavelmente em diferentes cepas desta bactéria. Quase todas as estirpes expressam uma das duas principais toxinas, que são as ExoU ou ExoS, mas muito raramente as duas associadas (34). A contribuição exata de cada uma das toxinas

na patogênese desta bactéria ainda não foi esclarecida, mas infere-se que o T3SS pode favorecer com que *P. aeruginosa* explore brechas na barreira epitelial, dificultando a cura da ferida durante a colonização e promover a lesão celular diretamente (ou seja, através ExoU) e indiretamente (isto é, recrutamento e ativação de neutrófilos), levando aos sintomas de pneumonia bacteriana. O ExoU e ExoT apresentam uma ação anti-fagocítica, e ExoY e ExoS inibem a síntese de interleucinas por macrófagos alveolares (33).

### 1.1.2.3 Quorum Sensing e Biofilme

*Quorum sensing* (QS) é um mecanismo presente em diversas bactérias, que permite uma adaptação coordenada da população bacteriana às alterações ambientais, mediada por moléculas de membrana chamadas auto-indutoras. Estas moléculas são produzidas por cada bactéria e atuam como co-fatores de transcrição de reguladores específicos quando atingem uma concentração elevada o suficiente. A concentração de moléculas auto-indutoras no meio é proporcional à concentração de bactérias. Estima-se que mais de 10% dos genes no genoma, e mais de 20% do proteoma bacteriano expresso são regulados pelo mecanismo QS (35).

As bactérias liberam moléculas auto-indutoras quando estimuladas pelo sistema QS, e essas por sua vez são detectadas pelas bactérias vizinhas que regulam a densidade da população bacteriana local e a expressão de genes. *P. aeruginosa* produz três moléculas auto-indutoras: lactona de homoserina de 3-oxo-dodecanoílo (3-oxo-C12 HSL), butirilo homo-serina lactona (C4 HSL) e 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (35, 36).

O sistema QS da bactéria *P. aeruginosa* possui aproximadamente 350 genes (6% do genoma da PA) e desempenham um papel na regulação de uma ampla variedade de processos, incluindo a formação de biofilme e de produção de numerosas toxinas. Logo, QS desempenha um papel essencial na virulência deste microrganismo (37, 38).

O biofilme é uma estrutura bacteriana, altamente organizada e sua formação está intrinsecamente relacionado ao sistema QS (39). O biofilme é composto por 50-90% de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que podem ser constituídas

por polissacarídeos, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas. A matriz EPS proporciona à bactéria uma resistência física contra forças mecânicas (por exemplo, água) e química pois, diminui a penetração de produtos químicos tóxicos (por exemplo, antibióticos) (40, 41).

No interior do biofilme há limitação de oxigênio e nutrientes, este fator contribui para o crescimento lento observado por bactérias no biofilme. Todos estes fatores podem levar ao aumento da resistência aos antibióticos (42), que também tem sido proposto por ser devido a alterações na expressão de genes de adaptação, a penetração lenta, sistema QS, e às concentrações mais elevadas de enzimas extracelulares, destruindo os antibióticos. A resistência do biofilme bacteriano aos antibióticos e desinfetantes contribui significativamente para a sua resistência e, portanto, este fator de virulência é considerado um grande problema clínico. O biofilme pode estar presente em equipamentos médicos como, cateteres e tubos endotraqueais (37), e tem sido proposto que a *P. aeruginosa* pode crescer no biofilme sobre os tecidos do hospedeiro / superfícies epiteliais durante infecções crônicas (39).

#### 1.1.2.4 Proteases

*P. aeruginosa* sintetiza diversas proteases, como: elastases (LasA e LasB) (43, 44). Estas proteases podem atuar em infecções oculares e em sepse, degradando imunoglobulinas e fibrina, e alterar junções epiteliais (23).

#### 1.1.2.5 Lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo (LPS) é um glicolípido complexo que forma uma monocamada da membrana externa e tem funções na antigenicidade, na resposta inflamatória, na exclusão de moléculas externas, e na mediação de interações com antibióticos (45). *P. aeruginosa* é composto de moléculas: lipídio A e polissacarídeo-O. A importância do lipopolissacarídeo para a bactéria é a iniciação da doença e a resistência aos antibióticos (45, 46).

Lípido A é um glicolípido que adere ao lipopolissacarídeo na membrana externa (46). Modificações no lípido A podem alterar a susceptibilidade da bactéria para polimixinas e peptídeos antimicrobianos catiônicos, bem como alterar as suas propriedades inflamatórias (45).

Podem existir dois tipos de polissacarídeo-O, simultaneamente, na *P. aeruginosa*: um polissacarídeo comum e outro específico. O polissacarídeo comum é um homopolímero de D-ramnose, com aproximadamente 70 açúcares longos e que induz uma resposta imunológica fraca. Ao contrário, o polissacarídeo-O específico é um heteropolímero variável tanto no comprimento da cadeia e na natureza dos açúcares, e este lipopolissacarídeo induz uma forte resposta imunológica. Algumas cepas de *P. aeruginosa* não produzem o polissacarídeo-O (45).

#### 1.1.2.6 Outros Fatores de Virulência

Outros fatores de virulência são secretados por *P. aeruginosa* e podem contribuir para a sua patogenicidade. Exotoxina A compõe a família de enzimas denominadas de mono-ADP-ribosiltransferase (ADPRT), sendo mais especificamente uma NAD<sup>+</sup> diftamida-ADP-ribosiltransferase. É um fator de virulência que inibe o fator de alongamento 2 da célula hospedeira (EF2) inibindo desse modo a síntese protéica e conduzindo à morte celular (47). As propriedades tóxicas de exotoxina A envolvem também a morte da célula hospedeira por apoptose (48, 49).

As lipases e fosfolipases destroem lípidios tensoativos e os fosfolípidos das membranas celulares do hospedeiro (23). O pigmento piocianina azul-verde da *P. aeruginosa* causa estresse oxidativo na célula infectada, interrompendo a ação da catalase, e transporte de elétron mitocondrial (50). Piocianina tem sido demonstrada *in vitro* para induzir apoptose em neutrófilos, assim como inibir a fagocitose de corpos apoptóticos por macrófagos (50, 51).

### 1.1.3 *Pseudomonas aeruginosa* e Resistência à Antibioticoterapia

O patógeno *P. aeruginosa* tem emergido como uma bactéria clinicamente relevante devido ao aumento do número de infecções produzidas por este microrganismo e a propagação mundial de cepas com resistência a várias classes de antibióticos (52, 53).

A *P. aeruginosa* pode desenvolver uma resistência intrínseca a múltiplas classes de antibióticos e é hábil para aquisição de uma resistência adaptável durante um curso terapêutico, portanto, as infecções causadas por esta bactéria apresentam uma relevante gravidade (54). Este patógeno apresenta uma elevada resistência associada à sua significativa capacidade de adquirir resistências adicionais por meio de mutações cromossômicas. Ao longo do tempo, houve a detecção de múltiplos determinantes de resistência aos antimicrobianos relacionados a esta bactéria, geralmente, localizados em íntegrans, adquiridos por transferência horizontal por meio de plasmídeos e/ou transposons. Dentre esses mecanismos, as carbapenemases são relevantes, devido ao amplo espectro de antibióticos afetados (54).

#### 1.1.3.1 *Pseudomonas aeruginosa*, Fatores de Resistência e Antibioticoterapia

As infecções causadas por *P. aeruginosa* são notoriamente difíceis de tratar devido à sua capacidade intrínseca de resistir a diversas classes de antibióticos, bem como a de adquirir resistência. Todos os mecanismos conhecidos de resistência aos antibióticos podem ser exibidos por esta bactéria (intrínseco, adquirido, e adaptativo) (Tabela 1). As taxas de resistência aumentam gradativamente, apesar do uso de terapias de combinação de drogas (55).

**Tabela 1** - Exemplo de mecanismo de resistência da *Pseudomonas aeruginosa*

<b>Mecanismo de resistência</b>	<b>Exemplo</b>	<b>Classes</b>
Bombas de efluxo	Intrínseca	MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM (cefalosporinas, carbapenêmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, ureidopenicilinas)
Impermeabilidade da membrana externa	Intrínseca	OprF, OprD, OprB (carbapenemos, aminoglicosídeos, quinolonas)
$\beta$ -lactamases AmpC	Intrínseca	Penicilinas
Mutação DNA girase	Adquirida	Topoisomerase de DNA (quinolonas) MexZ (quinolonas, cefapimes, aminoglicosídeos)
Transferência horizontal	Adquirida	Metallo-beta-lactamase, ESBLs (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos)
Alteração da membrana	Adaptativo	Modificação do Lipídio A (aminoglicosídeos, polimixinas)

Fonte: Moore & Flaws, 2011 (55) Mex – Multidrug efflux pump

#### 1.1.3.1.1 Resistência Intrínseca

A resistência intrínseca é codificada no cromossomo do microrganismo. No caso da *P. aeruginosa*, esta resistência é devido à baixa permeabilidade da sua

membrana externa, a superexpressão de bombas de efluxo de membrana, e a presença da enzima  $\beta$ -lactamase, AmpC (56).

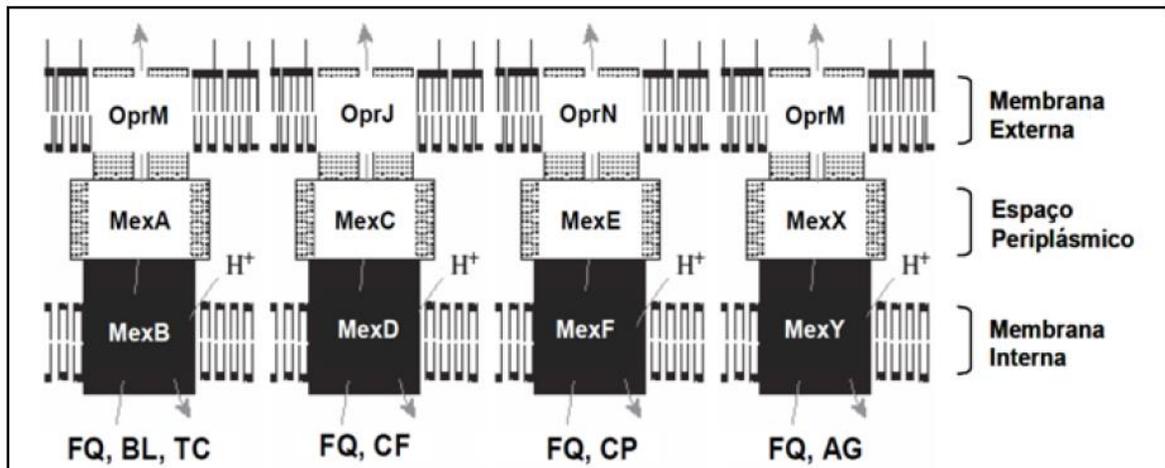
Os sistemas de efluxo de *P. aeruginosa* pertencem à família *resistance-nodulation-cell division* (RND). A abertura de um canal que atravessa as membranas interna e externa deste micrororganismo é a base destes sistemas, provocando a expulsão de moléculas para o exterior celular (57, 58).

*Multidrug efflux pump* (Mex) são os genes que pertencem ao genoma de *P. aeruginosa* e codificam os sistemas de efluxo da família RND, tendo sido já identificados 10 genes: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXYOprM, MexGHI, OpmD, MexVW-OprM, MexPQOpmE, MexMN-OprM e TriABC-OpmH (59).

Em bactérias Gram-negativas, as bombas de efluxo formam um sistema tripartite de proteínas de transporte que se localizam na: 1/ membrana interna (proteína constituída por uma bomba de transporte ativo, dependente de energia – MexB, MexD, MexF ou MexY), 2/ periplasma (proteína transmembrana que une os outros dois componentes – MexA, MexC, MexE ou MexX) e 3/ membrana externa (proteína formadora de canal extrusor, também denominado porina – OprJ, OprM ou OprN) (Figura 2) (60).

A membrana externa é uma barreira semi-permeável que restringe a absorção de pequenas moléculas hidrofílicas como por exemplo, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos para os canais de proteínas porina presentes no interior da membrana externa. Estima-se que a membrana externa da bactéria *P. aeruginosa* é 10 a 100 vezes menos permeável do que a da *Escherichia coli* (*E. Coli*), tendo menos canais grandes de porinas (formadas por OPRF) e um número maior de pequenos canais porinas (formado por proteínas, tais como: OprD e OprB) (61).

Referente às bombas de efluxo de *P. aeruginosa*, que se encontram relacionadas com a resistência a múltiplos antibióticos, quatro genes já foram identificados: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM (60). Estas bombas de efluxo podem ejetar uma ampla gama de antibióticos; por exemplo, MexAB-OprM e MexXY-OprM pode expulsar  $\beta$ -lactâmicos, cloranfenicol, fluoroquinolonas, macrolídeos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclina, trimetoprim e aminoglicosídeos (65, 66).



**Figura 2.** Modelos estruturais e funcionais das bombas de efluxo de *P. aeruginosa*, indicando a localização das proteínas constituintes da bomba e ação preferencial a determinados tipos de substratos. Mex – Multidrug efflux pump

FQ: fluoroquinolona; BL: betalactâmico; TC: tetraciclina; CF: cefalosporina; CP: carbapenêmico; AG: aminoglicosídeo.

Fonte: Adaptada de Aeschlimann (2003), Neves (2010) e Poole (2005) (62-64).

A enzima  $\beta$ -lactamase AMPc está localizada no periplasma e é eficiente na hidrólise de vários antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, tais como, penicilinas e cefalosporinas. A resistência atribuída por bombas de efluxo e AmpC é intrinsecamente associada à permeabilidade da membrana externa, porque a concentração de  $\beta$ -lactamase no periplasma é dependente da eficiência e da taxa pela qual eles são transportados através das porinas da membrana externa (67).

As  $\beta$ -lactamases são enzimas capazes de clivar o anel  $\beta$ -lactâmico, resultando na inativação de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. Normalmente, genes localizados em plasmídeos conjugados codificam estas enzimas. Uma característica importante destes plasmídeos se refere a sua capacidade de replicação e disseminação entre bactérias de diferentes espécies, assim como entre gêneros distintos. Portanto, as  $\beta$ -lactamases representam o principal mecanismo de resistência a  $\beta$ -lactâmicos em bactérias Gram-negativas (68).

As  $\beta$ -lactamases TEM-1 e TEM-2 são comumente encontradas na *P. aeruginosa* e possuem propriedades bioquímicas muito semelhantes, sendo consideradas enzimas de espectro restrito, e atuam na hidrólise de ampicilina e cefalosporinas de primeira geração como cefalotina e cefazolina, mas não

apresentam atividade contra cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, ou cefepima, cefalosporinas de amplo espectro que possuem uma cadeia lateral (68).

De forma geral, bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases são resistentes à maioria dos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas de espectro ampliado e aztreonam. Logo, os carbapenens são as opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases (68).

A resistência da *P. aeruginosa* às cefalosporinas de espectro ampliado pode ser decorrente da hiperexpressão de  $\beta$ -lactamase cromossômica associada à diminuição da permeabilidade da membrana externa ou, ainda, hiperexpressão de bombas de efluxo, as quais reduzem a concentração do antimicrobiano na célula bacteriana por meio da expulsão do mesmo (69).

A produção das  $\beta$ -lactamases pertencentes à classe D de Ambler e as que pertencem à classe B de Ambler, também denominadas metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ L), são outros mecanismos descritos que conferem resistência aos  $\beta$ -lactâmicos de espectro ampliado e carbapenens (69). Além disso, a síntese dessas enzimas tem sido comumente responsável pelo fenótipo de resistência a esses  $\beta$ -lactâmicos. As metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ Ls) pertencem às classes B de Ambler ou 3 de Bush-Jacoby-Medeiros, e fazem a hidrólise de todos os  $\beta$ -lactâmicos disponíveis comercialmente, exceto o monobactam e aztreona. As enzimas M $\beta$ Ls caracterizam-se por necessitarem de dois íons divalentes, usualmente zinco, como co-fator para atividade catalítica. Além disso, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou compostos derivados do ácido tiolático (i.e., ácido 2-mercaptopropiônico) inibem essas enzimas (70).

#### 1.1.3.1.2 Resistência Adquirida

Resistência adquirida pode ser resultante da transferência genética ou de mutações, incluindo os genes reguladores, que estabilizam ou melhoram os mecanismos de resistência intrínseca. Elementos do DNA, como plasmídeos e transposons, podem ser passados entre as bactérias por conjugação,

transformação, ou transdução e podem conferir resistência a um ou mais antibióticos. Estes elementos também podem intensificar a resistência intrínseca da *P. aeruginosa* (61).

#### 1.1.3.1.3 Resistência Adaptável

Resistência adaptável ocorre quando as condições ambientais, tais como: exposição a concentrações sub-inibitórias de antibióticos, ou estados de crescimento (formação de biofilme) promovem um aumento da resistência (61).

O arsenal terapêutico disponível para o tratamento de infecções causadas por *Pseudomonas* incluem piperacilina com tazobactam, ticarcilina com ácido clavulânico, ceftazidima, cephapim, aztreonam, aminoglicosídeos, ciprofloxacina e levofloxacina. No entanto, para *P. aeruginosa* multirresistente há diferentes mecanismos de resistência, por síntese de integron Verona codificado (VIM) e imipenemase (IMP), M $\beta$ L e produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (BLEEs), e a bactéria pode ser susceptível apenas à colistina (71).

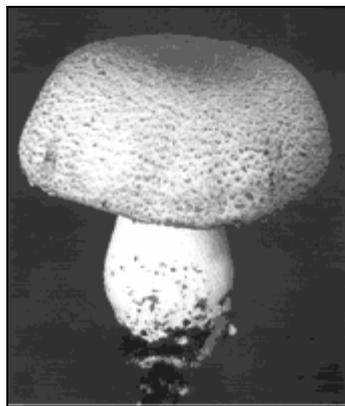
#### 1.1.4 O Cogumelo *Agaricus blazei* Murrill

Ao longo de muitos anos, os cogumelos vêm sendo utilizados por diversas culturas como, por exemplo, as orientais e ocidentais, para diferentes finalidades, especialmente, para fins gastronômico, medicinal e terapêutico. Contudo, destaca-se este último emprego dos cogumelos, pois têm despertado o interesse da comunidade científica visando investigar as prováveis ações destes na prevenção e ou tratamento de diversas comorbidades (72).

A espécie *Agaricus blazei* cultivada no Brasil tem sido pesquisada pelos japoneses desde a década de 80. Este cogumelo pode ser utilizado como alimento ou na forma de chás, ou em cápsulas com intuito de prevenir o desenvolvimento de doenças, como: câncer, doenças circulatórias, digestivas e urinárias (72).

De uma forma geral, os cogumelos em termos de composição química, apresentam uma elevada quantidade de proteínas, fibras alimentares, e vitaminas associados a um teor reduzido de gorduras. Podem ser considerados alimentos fontes de vitaminas C e algumas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina, biotina), pois possuem uma elevada quantidade destes nutrientes (73).

O AbM apresenta características semelhantes a outros tipos de cogumelo pertencente a família Agaricaceae, como um corpo definido com píleo, estirpe e raízes. A parte externa do píleo tem uma coloração marrom e possui na sua parte interna as lamelas ou esporângios, local onde os poros são formados. As lamelas encontram-se protegidas por um véu de cor creme. As raízes são hifas modificadas, com coloração branca (Figura 3) (74).



**Figura 3.** Cogumelo *Agaricus blazei* Murrill

Fonte: Firenzuoli et al., 2008 (74)

O cultivo deste basidiomiceto no Brasil iniciou-se entre as décadas de 60 e 70, utilizando técnicas de produção adaptadas que eram adotadas para cultivar o cogumelo *Agaricus bisporus* (“Champignon de Paris”), envolvendo as etapas: 1/ preparo do substrato de cultivo (compostagem), fase I da compostagem (“*outdoor*”), fase II da compostagem (pasteurização e condicionamento “*indoor*”), 2/ inoculação;

3/ colonização do substrato inoculado; 4/ cobertura do substrato; 5/ produção e 6/ processamento (75, 76). No entanto, somente a partir de 1.990 iniciou-se o cultivo do AbM para fins comerciais, contudo, ainda persistindo o uso de técnicas rudimentares e artesanais (77). Devido as evidências científicas estarem cada vez mais confirmando as propriedades terapêuticas do AbM, atualmente, o seu cultivo esta sendo realizado em diversos países (78).

Referente à sua composição nutricional, o corpo frutífero de cogumelos apresenta elevada quantidade de proteínas (40-45%), carboidratos (35-45%) além de outros compostos, como fibras (3-4%), cinzas (5-7%), vitaminas do complexo B, ácidos graxos poliinsaturados, lecitinas, ergosterol e fosfolipídios (79).

#### 1.1.4.1 Propriedades Funcionais do Cogumelo AbM

As pesquisas científicas *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos têm evidenciado que o cogumelo AbM e/ou seus extratos podem apresentar diversas propriedades funcionais, inclusive influenciando na prevenção e no tratamento de doenças, como: câncer, diabetes mellitus, hiperlipidemia, arterosclerose, hepatite crônica; além de ser usado para fins de minimizar o cansaço físico e o estresse emocional. Logo, os resultados provenientes destes estudos permitem inferir que o AbM é constituído por substâncias ativas que promovem múltiplas atividades, que se encontram descritas na Tabela 2.

O potencial papel anticlastogênico do cogumelo AbM foi demonstrado utilizando as linhagens AbM 99/26 e AbM 97/11, contudo apenas duas pesquisas *in vitro* corroboraram esta informação. Portanto, há a necessidade de realização de mais pesquisas para proporcionar uma maior consistência destes resultados descritos referente à ação anticlastogênica do AbM.

Dados de pesquisas *in vitro* e *in vivo* disponíveis inferem a função antimutagênica do cogumelo AbM, sendo observado também uma relação entre a

temperatura e a concentração do extrato deste cogumelo com a intensidade do efeito são descritos (83-89).

Embora haja discordâncias, a maioria das pesquisas *in vitro* e *in vivo* com camundongos sugere que os extratos de AbM (aquosos, alcoólicos e obtidos por hemicelulase) possuem a propriedade imunomoduladora. Neste sentido, observa-se que AbM pode atuar através do mecanismo de ativação de macrófagos e das células Natural Killer (NK) estimuladas pelo interferon gama (IFN- $\gamma$ ), que aumentam a expressão de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), óxido nítrico (NO) e algumas citocinas, principalmente as pró-inflamatórias. Entretanto, pesquisas em seres humanos (110, 111), incluindo um ensaio clínico randomizado em idosas, verificaram que os resultados obtidos com a suplementação oral com AbM são contrários aos observados em estudos em animais.

Dentre as pesquisas realizadas sobre as propriedades funcionais do AbM, a mais consolidada é a sua ação antitumoral, e inicialmente está sendo corroborada também em seres humanos, sendo que vários componentes bioativos deste cogumelo podem apresentar esta função terapêutica (100-104).

Referente à ação antioxidante dos extratos do AbM, a literatura tem confirmado esta propriedade, embora alguns estudos sejam divergentes em relação ao mecanismo de ação envolvido neste processo (105-109).

Estudos sugerem que o cogumelo AbM apresenta diversas substâncias bioativas responsáveis por suas propriedades funcionais, e dentre estes constituintes destacam-se as glucanas que além de promoverem uma resposta imunomoduladora podem induzir um aumento da ação antimicrobiana deste fungo (13, 91, 95). A glucana potencializa a imunidade celular e humoral a um grupo diversificado de micróbios, aumentando a resistência do hospedeiro às bactérias.

Evidências científicas resultantes de pesquisas *in vivo* têm demonstrado que frações do AbM induzem uma ação antimicrobiana. Os dados demonstraram que o extrato aquoso industrializado do cogumelo AbM e comercializado para fins medicinais no Japão, “Ando San”, administrado por gavagem, promoveu uma proteção profilática contra infecção por *Streptococcus pneumoniae* (14) e septicemia

letal após a indução da peritonite fecal (15) em camundongos, demonstrado pela redução da bacteremia e aumento da taxa de sobrevivência dos animais.

**Tabela 2** – Propriedades biológicas do cogumelo AbM.

<b>Atividade biológica</b>	<b>Referências</b>
Anticlastogênica	Bellini et al., 2003 (80); Luiz et al., 2003 (81); Matuo et al., 2007 (82)
Antimutagênica	Menoli et al., 2001 (83); Delmanto et al., 2001 (84); Martins de Oliveira et al., 2002 (85); Rodrigues et al., 2003 (86); Souza-Paccola et al., 2004 (87); Gutierrez et al., 2005 (88); Machado et al., 2007 (89)
Imunomoduladora	Smyth et al., 2002 (90); Ohno et al., 2001 (91); Shimizu et al., 2002 (92); Kaneno et al., 2004 (93); Takimoto et al., 2004 (94); Kasai et al., 2004 (95); Kawamura et al., 2005 (96); Ellertsen et al., 2006 (97); Yuminamochi et al., 2007 (98); Smiderle et al., 2011 (99)
Antitumoral	Kimura et al., 2004 (100); Kobayashi et al., 2005 (101); Kawamura et al., 2007 (102); Gao et al., 2007 (103); Ishii et al., 2011 (104)
Antioxidante	Izawa et al., 2004 (105); Ker et al., 2005 (106); Oliveira et al., 2006 (107); Cordeiro e Bach, 2006 (108); Carneiro et al., 2013 (109)

Os resultados das propriedades antimicrobianas do AbM podem ser influenciados pelo tipo e dosagem do extrato adotado, tempo de administração, além do tipo de cultivo. Tryggestad e colaboradores (2007) (16) avaliaram 05 tipos diferentes de extratos de AbM administrados por via oral em camundongos com sepse pneumocócica. Verificaram que a redução da bacteremia e o aumento da sobrevivência foram mais pronunciados quando foi utilizado o composto aquoso

constituído por 82% de AbM, 15% de *Erinaceum hericium* (Yamabushitake) e 3% de *Grifola frondosa* (Maitake). Logo, esta ação antimicrobiana do extrato pesquisado pode ser especialmente devido aos constituintes do AbM, contudo não podemos desconsiderar um efeito sinérgico dos demais cogumelos estudados.

Alguns estudos em animais e *in vitro* reportam que os mediadores pró-inflamatórios podem induzir a fagocitose de *S. aureus* e *Mycobacterium tuberculosis*, respectivamente. Logo se sugere que a interpretação destes resultados poderia ser extrapolada para o AbM, pois este cogumelo promove o aumento de diversas citocinas especialmente as pró-inflamatórias. Assim sendo, a elevação sérica de citocinas como a interleucina-8 (IL-8) e TNF- $\alpha$  resultantes da utilização do AbM observada nos trabalhos (13-15, 110) poderia intensificar o poder fagocítico das células imunitárias e promover efetividade na resposta a infecções por microrganismos patogênicos.

#### 1.1.4.2 Compostos Bioativos do AbM

Os componentes bioativos presentes no AbM são considerados os responsáveis pelas suas diversas atividades biológicas, atribuindo assim, a este cogumelo as suas propriedades antitumoral, antimetastático, antimicrobiano, hipolipemiante, imunomoduladora e antioxidante. O AbM possui lecitinas, esteróis, ergosterol, compostos fenólicos e polissacarídeos, estes últimos destacam-se por serem o principal responsável em induzir as ações funcionais do cogumelo AbM, portanto, têm despertado um maior interesse da comunidade científica em relação aos outros constituintes deste fungo. Entretanto, os demais compostos do AbM podem atuar sinergicamente com os polissacarídeos no organismo (112).

#### 1.1.4.2.1 Substâncias Antioxidantes

Os extratos de AbM são constituídos por associação complexa de antioxidantes e outras substâncias que podem atuar sinergicamente na redução dos radicais livres (113). Os compostos antioxidantes encontrados naturalmente em extratos metanólicos do AbM são: o ácido ascórbico, fenóis totais e tocoferóis. O AbM também apresenta histidina, manitol e monofosfato de adenosina que podem auxiliar na remoção de substâncias oxidativas (114).

As substâncias antioxidantes, especialmente os compostos fenólicos e os polifenóis, também apresentam uma ação antimicrobiana, por promover alteração na membrana celular bacteriana e pela eliminação de alguns fatores de virulência microbianos (115-117). Considerando que o cogumelo AbM apresenta uma quantidade significativa de compostos antioxidantes, pode-se inferir que estes constituintes podem ser um dos responsáveis pela ação antimicrobiana deste fungo. Entretanto, não há atualmente na literatura científica, nenhum estudo que avaliou a propriedade antimicrobiana das substâncias antioxidantes presentes no cogumelo AbM.

Um estudo comparativo verificou que o extrato seco do cogumelo AbM apresenta uma maior atividade antioxidante e uma quantidade elevada de tocoferóis e compostos fenólicos em relação ao extrato do cogumelo *Lentinus edodes*. Os pesquisadores sugerem que extratos de AbM analisados poderiam ser utilizados como fontes antioxidantes para fins de prevenção de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (118).

Alguns pesquisadores têm inferido que a ação antioxidante do cogumelo AbM está associada a presença de outros constituintes como os polissacarídeos e as proteínas, atuando assim, de maneira sinérgica aos compostos antioxidantes naturais, em ambas as fases de maturação deste basidiocarpo, imaturo e maduro (119, 120).

Um estudo *in vivo*, verificou que o tratamento com extrato aquoso do AbM em ratos diabéticos reduziu efetivamente o estresse oxidativo e contribuiu para a recuperação do tecido pulmonar (121).

Em outra pesquisa, investigou-se os prováveis efeitos protetores de um extrato do AbM em ratos com fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>). Os resultados demonstraram que o extrato do AbM na dosagem de 2.000 mg/kg foi capaz de melhorar a recuperação hepática e atenuar a toxicidade por CCl<sub>4</sub>. Contudo, a análise das enzimas antioxidantes não mostrou diferença, sugerindo que a remoção dos radicais livres não justifica os efeitos protetores verificados nesta pesquisa (122).

Al-bass e colaboradores (2012) (123) investigaram o efeito protetor do extrato aquoso do cogumelo AbM em ratos albinos com hepatotoxicidade induzida por CCl<sub>4</sub>. Os resultados indicam que o extrato de AbM é uma fonte natural de compostos antioxidantes e apresenta atividade hepatoprotetora contra danos no fígado induzidos por CCl<sub>4</sub>, quando administrado profilaticamente ou como forma de tratamento.

Evidências resultantes de uma pesquisa demonstram que o extrato aquoso macerado de AbM possui atividade antioxidante significativa, sendo demonstrada por três mecanismos, como: redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), interferindo na atuação de enzimas geradoras de ROS ou por supressão direta das espécies reativas (124).

As fases de maturação dos cogumelos podem influenciar na concentração e na bioatividade de algumas das suas substâncias bioativas, como por exemplo, os compostos antioxidantes.

Uma pesquisa foi realizada por Mourão e colaboradores (2011) com o intuito de avaliar a atividade antioxidante de cepas de AbM em diferentes fases de maturação. Os resultados evidenciaram que o AbM é uma fonte natural de compostos antioxidantes. Os extratos metanólicos apresentaram diferentes atividades antioxidantes entre as fases de maturação analisadas, ao passo que, o metanol a 60 °C por 60 minutos foi considerado o melhor solvente para extração de antioxidantes do AbM. Referente à melhor fase de maturação verificou-se que as cepas do basidiocarpo imaturo (fechado) têm uma maior atividade antioxidante

quando comparado com o cogumelo maduro (aberto), com um valor 24% superior (125).

#### *1.1.4.2.2 Ergosterol*

A maioria das células eucarióticas apresenta os lipídios estruturais denominados esteróis. Estas moléculas caracterizam-se por serem derivadas de isoprenos e apresentarem um núcleo esteróide composto de quatro anéis carbônicos fusionados, sendo um deles com quatro átomos de carbono e três com cinco átomos. A depender do tipo de organismo analisado, o núcleo esteróide apresenta-se ligado a grupos químicos laterais, ou associados a duplas ligações distintas (126). Os esteróis são denominados colesterol e ergosterol quando presentes em animais e fungos, respectivamente, entretanto, ambos apresentam uma estrutura similar. Em termos de cadeia, o colesterol é saturado, e o ergosterol é insaturado (127).

O ergosterol está presente em diversos cogumelos como constituinte da membrana celular. Este composto é considerado um bom indicador do crescimento do fungo, pois pode apresentar uma boa relação com a biomassa metabolicamente ativa fúngica (128). Alguns pesquisadores verificaram a presença do ergosterol em extratos de AbM, e sugerem que este composto pode atuar sinergicamente na ação antimicrobiana deste cogumelo (129).

#### *1.1.4.2.3 Polissacarídeos*

Os polissacarídeos são classificados como biopolímeros sintetizados por organismos vivos, e apresentam diversas composições químicas, funções biológicas e aplicabilidade. Estas macromoléculas são consideradas um tipo de carboidrato, compostas por várias unidades de monossacarídeos associados por ligações glicosídicas, obtidas pela eliminação de uma molécula de água entre o grupo

primário ou secundário de um resíduo e um grupo hidroxila hemiacetal. O número de resíduos que compõem os polissacarídeos é variável formando uma estrutura que pode ser ramificada, linear ou cíclica, assim como, a sua massa molecular pode ter uma ampla variação, entre milhares a milhões de daltons (130).

Em organismos vivos, os polissacarídeos apresentam-se isolados ou associados a outros compostos biológicos, especialmente a gorduras e proteínas, formando os gliconjugados. Contudo, essas moléculas exercem funções biológicas relevantes independentemente da forma como se apresentam, livres ou combinadas (131).

Em fungos, os polissacarídeos compõem 75% da hifa, principalmente em basidiomicetos, correspondendo a um elevado percentual da sua biomassa. Portanto, assumem uma função estrutural, como suporte para a hifa ou podem formar uma “capa” extracelular ao redor do micélio dos fungos (132).

Na natureza há uma grande diversidade de fungos constituídos por endo e exopolissacarídeos, e que veem despertando o interesse científico por provavelmente exercerem ações antioxidantes, antimutagênicas, anticoagulantes, antitrombóticas e imunomoduladoras; podendo ser considerada uma alternativa promissora para a aplicabilidade clínica em diversas comorbidades (133-135).

Entretanto, o resultado fisiológico promovido por estes polissacarídeos é modulado por alguns fatores físico-químicos, como: massa molecular, grau de ramificação e a conformação apresentada pelo material. Todos os parâmetros de caracterização química e conformação devem ser estudados para que se possam compreender os mecanismos de atuação destas moléculas bioativas no organismo humano (136).

Na parede celular fúngica está presente uma elevada quantidade de polissacarídeos, destacando-se as glucanas, sendo que a maioria destas apresenta-se com uma estrutura linear e com diferentes disposições das suas ligações glicosídicas, pertencentes à série alfa ( $\alpha$ ) ou beta ( $\beta$ ). Contudo, a forma predominante refere-se as  $\beta$ -glucanas podendo apresentar-se isoladas ou associadas às gorduras, proteínas ou outros polissacarídeos. Estas moléculas podem apresentar uma conformação simples até tripla hélice, sendo que esta última é considerada a mais comum, caracterizada pela união de três cadeias de polímeros (136).

As  $\beta$ -glucanas são sintetizadas nos fungos em várias etapas: reações de iniciação, alongamento da cadeia e ramificação. A reação de alongamento é catalisada pela enzima glucana  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) sintetase atuando sobre o substrato uridina difosfato-glucose (UDP-glucose) (137).

A estrutura linear das  $\beta$ -glucanas é formada por moléculas de D-glicose ligadas na posição  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) contendo cadeias laterais de glicose (ligação  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6) com variados tamanhos dispostos em diferentes intervalos ao longo do seu esqueleto central. A fonte e o método de extração adotados para obtenção dos polissacarídeos são os fatores que determinam a macroestrutura da  $\beta$ -glucana. No cogumelo AbM, as  $\beta$ -glucanas são constituídas por cadeias de D-glicose com ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) (138).

Os polissacarídeos apresentam propriedades farmacológicas justificadas pela sua ação imunomoduladora, especialmente no que se refere ao mecanismo de ativação do sistema imunitário. Estas macromoléculas promovem uma imunopotencialização, caracterizada pelo aumento da atividade fagocitária dos macrófagos, resultando na liberação de alguns mediadores inflamatórios, como o interferon e o fator de necrose tumoral (TNF), além de prostaglandinas, NO e espécies reativas de oxigênio. Logo, esta propriedade de estimulação promovida pelos polissacarídeos constituintes dos cogumelos está relacionada com a maturação, diferenciação e proliferação das células imunológicas (138).

As  $\beta$ -glucanas interagem com os receptores de diversos tipos de células imunitárias resultando na estimulação da ação fagocitária destas e/ou à liberação de grânulos citotóxicos. Evidências científicas provenientes de pesquisas *in vitro* veem demonstrando que a  $\beta$ -glucana promove uma estimulação direta dos leucócitos devido ao seu elevado peso molecular, e conseqüentemente induz a fagocitose, citotoxicidade e atividade antimicrobiana, incluindo a síntese de oxigênios reativos e nitrogênios intermediários (139-141).

As diversas propriedades funcionais atribuídas ao cogumelo AbM podem ser inerentes à ação promovida pela  $\beta$ -glucana, inclusive a antimicrobiana (142, 143).

Dados provenientes de pesquisa *in vivo*, demonstram que a  $\beta$ -glucana da *Sclerotinia sclerotiorum* (SSG) exerceu uma ação antimicrobiana protetora contra a infecção sistêmica promovida com os sorotipos de *Streptococcus pneumoniae*

sorotipos 6B e 4, quando administrada intraperitonealmente três dias antes da infecção (140, 144, 145).

Diferentes tipos de  $\beta$ -glucanas são capazes de estimular as células NK (13, 143) e a síntese de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos ativados (144). Pesquisadores inferem que o AbM é constituído por pequenas moléculas de glucanas, tornando a sua absorção mais rápida e fácil, e posteriormente, estas interagem com receptores celulares; especialmente CD11b/18, dectina-1 e *toll-like* 4 (141, 146), resultando na estimulação da resposta fagocitária e síntese de citocinas, logo, essas características podem justificar a ação antimicrobiana do cogumelo AbM (147).

Atualmente, verifica-se que há uma escassez de pesquisas científicas que objetivaram investigar a ação antimicrobiana promovida pelo cogumelo AbM, contudo, estudos *in vitro* e *in vivo* veem evidenciando que esta propriedade encontra-se relacionada com a presença  $\beta$ -glucanas (16) (142, 145).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação antimicrobiana de extratos aquoso e metanólico do *Agaricus blazei* Murrill sobre *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

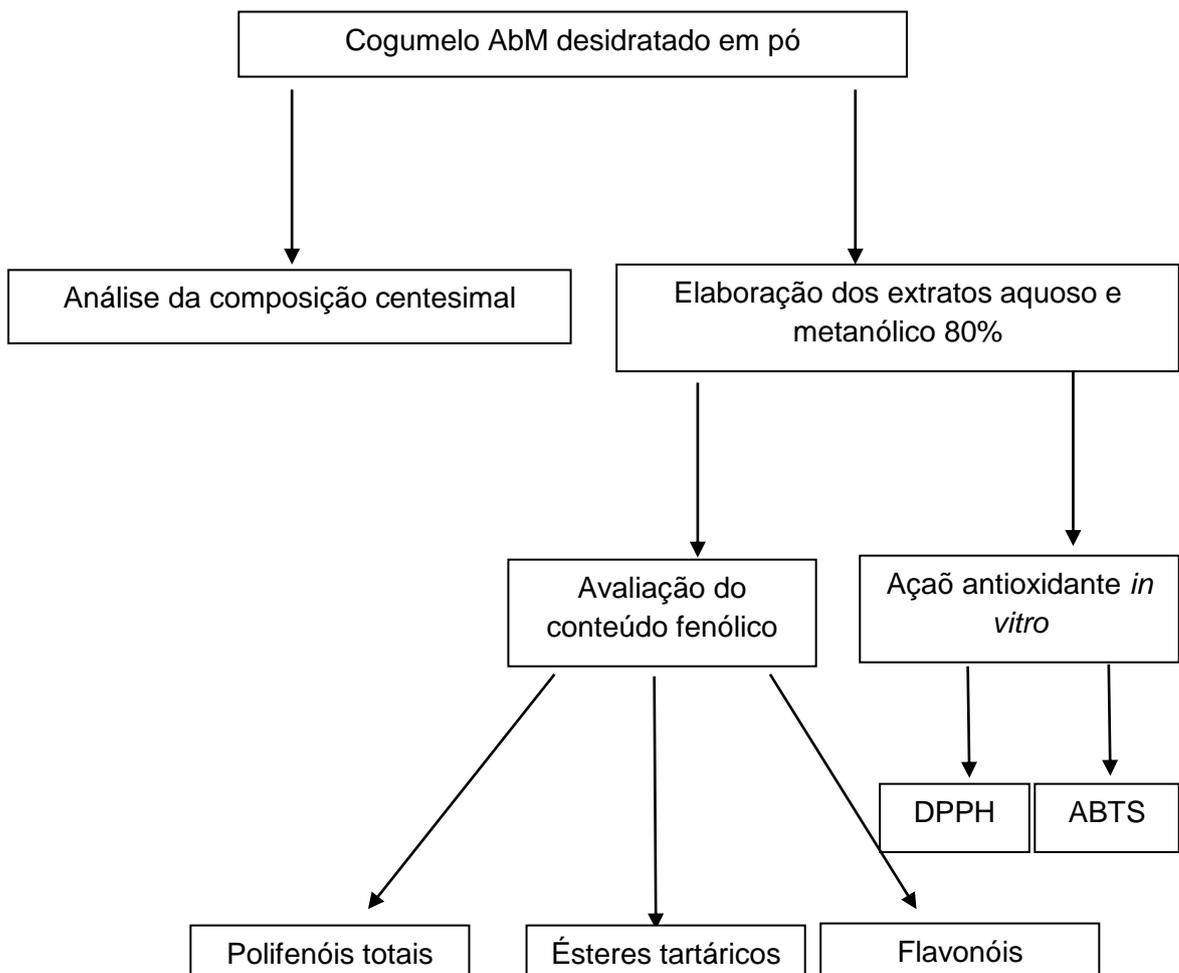
### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a composição química e atividade antioxidante do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill em pó desidratado.
- Quantificar a capacidade inibitória dos extratos, aquoso e metanólico, do *Agaricus blazei* Murrill sobre o crescimento de *P. aeruginosa* multirresistente.
- Avaliar o potencial hemolítico dos extratos aquoso e metanólico do *Agaricus blazei* Murrill.
- Investigar a capacidade imunomoduladora *in vitro* por meio da avaliação da síntese de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e interleucinas 10 e 12 (IL-10, IL-12) em linhagem de células RAW 264.7 tratadas com extratos do *Agaricus blazei* Murrill, aquoso e metanólico.
- Determinar a influência da administração intraperitoneal dos extratos aquoso e metanólico do *Agaricus blazei* Murrill na sobrevivência de camundongos com infecção produzida por cepa multirresistente de *P. aeruginosa*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRA DO COGUMELO ABM

Nesta etapa inicial dos experimentos foram realizados testes para analisar a composição centesimal da amostra do basidiocarpo bruto, desidratado e moído do AbM. Em seguida, foram elaborados os extratos aquoso e metanólico a 80% a partir dessa amostra de AbM. Posteriormente, realizaram-se os testes de avaliação do conteúdo fenólico de ação antioxidantes (Figura 4).



**Figura 4.** Fluxograma dos experimentos iniciais.

O basidiocarpo bruto, desidratado e moído do AbM foi obtido da estância Valemar®, em Piedade, São Paulo - SP (Brasil), referente a colheita de janeiro de 2.011, sendo mantido sob refrigeração em embalagem plástica vedada.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Análises Químicas

As análises realizadas para determinação da composição centesimal do cogumelo AbM desidratado e em pó foram feitas no Laboratório de Controle e Qualidade em Alimentos localizado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os testes para quantificação de umidade, resíduo mineral fixo (cinzas totais), carboidratos, proteínas, lipídeos e fibra alimentar total foram realizados seguindo os métodos oficiais estabelecidos pela Associação dos Químicos Analíticos Oficiais (AOAC) (AOAC, 1993, 1995, 1997, 2002) (148-151).

A determinação de umidade foi obtida pelo método de secagem em estufa a 105 °C durante 24 horas. O conteúdo de cinzas totais por meio da incineração da amostra em uma mufla a 550 °C por 12 horas. Para determinação das proteínas foi empregado o método de Kjeldahl, utilizando o fator de correção de 6,25. A metodologia de análise dos lipídeos foi realizada pelo método de Soxhlet, extração contínua e com solvente quente. A determinação de fibra alimentar total foi baseada na digestão enzimática sequencial da amostra seca do cogumelo pelas enzimas  $\alpha$ -amilase, protease e amiloglicosidase. O método da diferença foi utilizado para obtenção da quantidade de carboidrato total, subtraindo os valores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e fibras. O método de Manson-Walker foi utilizado para determinação dos açúcares totais e redutores em glicose e sacarose. As demais análises físico-químicas da matéria prima, tais como, sódio, potássio e vitamina C; foram realizadas segundo metodologia de Cecchi e colaboradores (152).

### 3.2.2 Extratos do Cogumelo AbM

#### 3.2.2.1 Extrato Metanólico

A quantidade de 100g do cogumelo AbM seco e desidratado (em refrigeração) foi pesada em frasco e adicionou-se 900 mL de metanol a 80% ao extrato do cogumelo, e agitou-se manualmente. Logo em seguida, o frasco tampado e protegido da luz foi levado para a placa giratória (rotação na velocidade 07) por 20 minutos. Posteriormente, o frasco foi colocado no ultrassom por 40 minutos. E por fim foi armazenado em refrigerador *overnight*.

A parte líquida da mistura armazenada foi filtrada e armazenada em frasco âmbar mantido sob refrigeração, permanecendo apenas a parte sólida. Essa parte bruta foi associada a 500 mL de metanol 80% e agitou-se bem manualmente. Logo em seguida, o frasco tampado e protegido da luz foi levado para a placa giratória (rotação velocidade 07) por 20 minutos. Posteriormente, o frasco foi colocado no ultrassom por 40 minutos. E por fim foi armazenado em refrigerador *overnight*.

Após 24 horas realizaram-se os mesmos procedimentos citados anteriormente até ao final da oitava extração. Todas as extrações líquidas foram reunidas em rotoevaporador (rotativo), depois este foi liofilizado e triturado, e armazenado em freezer acondicionado em frasco de vidro (protegido da luz).

#### 3.1.2.2 Extrato Aquoso

O extrato aquoso foi obtido suspendendo-se 100 gramas do cogumelo AbM seco e desidratado (em refrigeração) em 900 mL de água destilada, e em seguida a suspensão foi colocada em banho-maria a 60 °C por 6 horas. Posteriormente, esta

solução foi filtrada e rotoevaporada, depois esta foi liofilizada e triturada, e armazenada em freezer acondicionada em frasco de vidro (protegido da luz).

### 3.2.3 Avaliação do Conteúdo Fenólico

O conteúdo fenólico (polifenóis totais, polimerizados e não polimerizados, ésteres tartáricos e flavonóis) foram quantificados utilizando os padrões de grau de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (ácido caféico, ácido gálico, catequina e quercetina) provenientes do fabricante Sigma® (St. Louis, MO, USA). Ao passo que os reagentes empregados nestas análises foram de padrão analítico obtidos de diferentes indústrias fabricantes, como: acetona e metanol (Quimx®), hidróxido de sódio e ácidos sulfúricos (Vetec®), folin ciocalteau e DPPH (Sigma®), carbonato de sódio (Fmaia®); molibdato sódio (Merck®) e a vanilina (Fluka®).

Para determinação do conteúdo fenólico foram realizadas as análises: polifenóis totais (Folin), polifenóis não-polimerizados (índice de vanilina) e polimerizados segundo Paronetto (1977) (153); estimativa do conteúdo de flavonóis e ésteres tartáricos segundo Glories (1978) (154).

#### 3.1.3.1 Determinação de Polifenóis Totais

A concentração de polifenóis totais foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Singleton & Rossi (1965) (155).

Para quantificação foi empregada uma curva padrão com solução de ácido gálico nas seguintes concentrações: 50, 100, 150, 250 e 500 mg/L. O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi calculado, resultando  $R^2 = 0,9978$  ao nível de significância de 5%. O teor de polifenóis totais foi expresso em mg Equivalente de Ácido Gálico (EAG)/g de extrato.

### 3.2.3.2 Determinação de Polifenóis Polimerizados (PP) e Não Polimerizados (PNP)

A determinação de PP e PNP foram realizadas de acordo com Paronetto (1977) (155) e reação de vanilina, respectivamente. O método consiste na reação da vanilina com compostos fenólicos derivados do floroglucinol na posição C6 e C8, formando complexo de coloração vermelha com máximo de absorção entre 500-520 nm. A partir desta determinação foi calculada a porcentagem de polifenóis polimerizados (polifenóis polimerizados = polifenóis totais – polifenóis não-polimerizados) presentes nos extratos, e os resultados foram expressos em mg de catequina g<sup>-1</sup> de extrato.

### 3.2.3.3 Determinação de Ésteres Tartáricos e Flavonóis

A determinação de ésteres tartáricos e flavonóis foram realizados segundo método descrito por Glories (1978) (154), utilizando leituras espectrofotométricas em comprimento de onda em 320 e 360 nm, sendo os resultados expressos em mg<sup>-1</sup> de ácido caféico (ésteres tartáricos) e quercetina (flavonóis) g<sup>-1</sup> de extrato.

### 3.2.4 Antioxidantes *in vitro*: Radicais DPPH e ABTS

A atividade antirradical livre dos extratos foi determinada frente aos radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e ABTS ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (156). Utilizou-se o método DPPH, segundo Brand-Willians e colaboradores (1995) (157). O método de ABTS segundo Re e colaboradores (156), o Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2- ácido carboxílico) foi selecionado como referência para a quantificação da capacidade antioxidante (equivalente em Trolox mM TEAC).

### 3.3 ENSAIOS *IN VITRO*

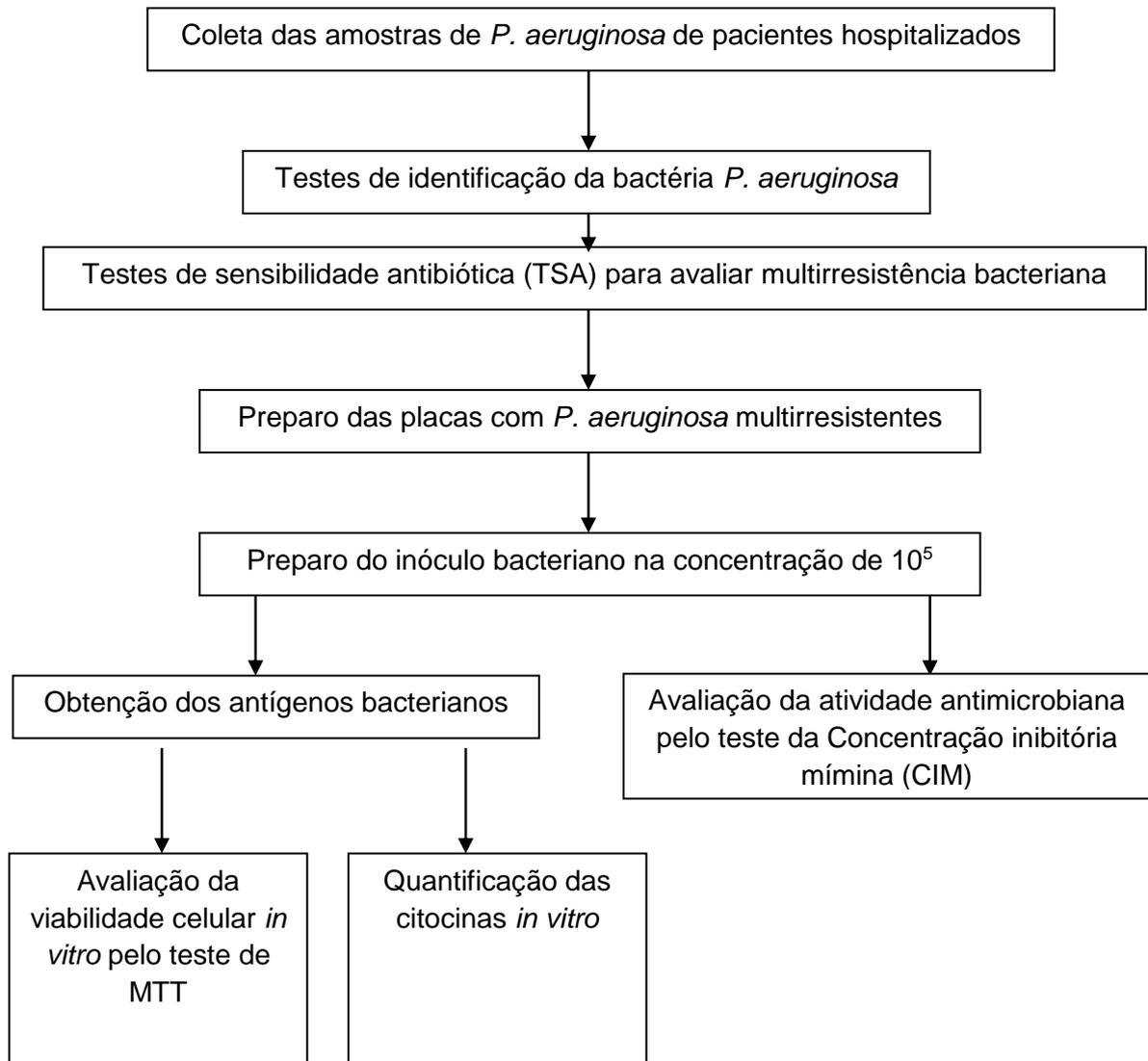
Os ensaios *in vitro* iniciaram-se com a obtenção das amostras da bactéria *P. aeruginosa* coletadas de pacientes hospitalizados, sucedendo-se os testes para identificação da espécie deste patógeno e de sensibilidade antibiótica para confirmação da resistência bacteriana. Posteriormente, houve a preparação de placas com *P. aeruginosa* multirresistente para fins de preparação do inóculo bacteriano para os testes de concentração inibitória mínima para análise da atividade antimicrobiana; obtenção do antígeno bacteriano, avaliação da viabilidade celular e quantificação da síntese de citocinas. E por fim, realizou-se o teste hemolítico para avaliar a segurança dos extratos aquoso e metanólico do AbM, porém no referido método não houve o uso do inóculo da *P. aeruginosa* (Figura 5).

#### **3.3.1 Seleção das Amostras de Bactérias, Preparação do Material de Cultura e Determinação do Perfil de Resistência Antimicrobiana**

As amostras da bactéria *P. aeruginosa* multirresistente foram cedidas pela Unidade de Patologia Clínica, do setor de Microbiologia, do Hospital Regional da Asa Norte (HRAN), público, pertencente à Secretaria de Saúde do Distrito Federal (SES/DF). As amostras foram coletadas de pacientes internados na unidade de terapia intensiva (UTI) em janeiro de 2013. Utilizaram-se swabs estéreis umedecidos em água peptonada para a coleta das amostras, e em seguida, foram semeadas em meio de cultura *Brain Heart Infusion Agar* (BHI Agar), utilizando a técnica de esgotamento em estrias, e as placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Logo após este período, algumas cepas bacterianas foram selecionadas aleatoriamente por meio de um mapa de placa (158). Foram realizados testes para identificação da *P. aeruginosa*: citocromo oxidase, produção de piocianina, motilidade, teste de ausência de fermentação. Os resultados considerados positivos

nas culturas dos materiais biológicos coletados foram submetidos aos critérios do “*National Committee for Clinical Laboratory Standards*” (NCCLS) (159), seguidos dos testes de sensibilidade antibiótica (TSA), avaliando os seguintes agentes antimicrobianos: Amoxicilina associado ao ácido clavulânico, Ampicilina sulbactam, Ampicilina, Cefoxitina, Ceftriaxone, Ciprofloxacina, Clindamicina, Daptomicina, Eritromicina, Gentamicina, Levofloxacina, Linezolida, Moxifloxacina, Nitrofurantoína, Oxalicina, Penicilina, Rifampicina, Tetraciclina e Vancomicina. Neste painel, avaliou-se a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano.

A multirresistência microbiana foi definida como a cepa bacteriana de *P. aeruginosa* que apresentou resistência a duas ou mais classes de antibióticos aos quais intrinsecamente eram susceptíveis seguindo os critérios do NCCLS (159). Após esta análise, as cepas MR de *P. aeruginosa* foram encaminhadas ao laboratório de Ciências Genômicas e Biotecnologia Molecular da Universidade Católica de Brasília (UCB). Neste laboratório, as placas da bactéria passaram pelos procedimentos, descritos a seguir. Com uma alça bacteriológica de 0,001 mL (1ul) foi retirada a amostra da placa com a bactéria e colocada em tubo falcon estéril (15 mL) contendo 3 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido. Posteriormente, este tubo foi colocado no *shaker* em agitação a 37 °C *overnight*. No segundo dia, preparou-se uma placa em meio LB sólido com a técnica das riscas sucessivas; e foi colocada em estufa 37 °C *overnight*. No terceiro dia, com alça bacteriológica de 0,001 mL (1ul) retirou-se uma colônia da placa e colocou-a para crescer em falcon (50 mL) contendo 5 mL de meio LB líquido; e logo após, foi colocado em *shaker* em agitação a 37 °C *overnight*. No quarto dia, a amostra foi centrifugada por 20 minutos a 4.500 rpm; desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* bacteriano com 5 mL de meio LB líquido. Em seguida, colocou-se 300 uL de glicérol ultra puro em eppendorf (1,5 mL) e foi autoclavado. Colocou-se 700 µL do meio LB líquido preparado com a bactéria em cada eppendorff preparado com o glicérol; após este foi homogeneizado e armazenado no freezer -80 °C. Para os testes foram preparadas as placas com a bactéria *P. aeruginosa* em meio LB sólido com a técnica das riscas sucessivas; armazenou-se em estufa 37 °C *overnight*, e posteriormente ao crescimento, as placas vedadas foram armazenadas em refrigeração.



**Figura 5.** Fluxograma com a descrição dos experimentos *in vitro*.

### 3.3.2 Preparo dos Inóculos Bacterianos

A bactéria MR *P. aeruginosa* foi cultivada em placa com meio LB sólido e após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C, colônias deste microrganismo foram isoladas e diluídas em meio MH na concentração desejada. Colônias da referida bactéria foram ressuspensas em caldo MH estéril (D.O. 0,5-1,0 a 600 nm,  $\sim 1 \times 10^8$  ufc/mL<sup>-1</sup>). O tubo com este microrganismo foi armazenado em caixa de isopor com gelo para estabilização do crescimento bacteriano até o momento do ensaio da CIM. Para realização dos testes *in vitro* foi utilizado meio MH (Himedia – Índia) contendo 10<sup>5</sup> células/mL da bactéria MR *P. aeruginosa* na metade da fase logarítmica de crescimento.

### 3.3.3 Preparo das Soluções dos Extratos do Cogumelo AbM

Os extratos metanólico e aquoso encontravam-se armazenados em frasco de vidro (protegido da luz) em refrigeração. Foram testadas as concentrações de 350 mg.mL<sup>-1</sup>, 300 mg.mL<sup>-1</sup>, 250 mg.mL<sup>-1</sup>, 200 mg.mL<sup>-1</sup>, 150 mg.mL<sup>-1</sup> e 100 mg.mL<sup>-1</sup>. Após cada pesagem, os extratos foram diluídos com 500 µl em meio MH, e em seguida foram mantidos em caixa com gelo dentro do fluxo, até o final do experimento.

### 3.3.4 Avaliação da Atividade Antibacteriana

A atividade antibacteriana *in vitro* dos compostos antimicrobianos foi avaliada pelo ensaio modificado de inibição do crescimento por microdiluição em caldo, de

acordo com o NCCLS (159). Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) para a bactéria MR *P. aeruginosa*. Cinquenta microlitros de meio Mueller-Hinton (Himedia – Índia) contendo  $10^5$  células/mL na metade da fase logarítmica de crescimento foram adicionados aos poços de uma placa contendo 50  $\mu$ L de diluições seriadas dos extratos aquoso e metanólico ( $100$  a  $350$   $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), gentamicina ( $150$   $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Após 24 horas de incubação, a  $37$  °C, em um leitor de microplaca com incubação (Bio-Tek PowerWave HT - USA), o crescimento bacteriano foi avaliado pela determinação da absorbância a 595 nm. A menor concentração que inibiu 100% o crescimento bacteriano foi considerada a CIM.

### **3.3.5 Avaliação do Potencial Hemolítico dos Extratos do Cogumelo AbM**

Para realização deste teste foi adotado como metodologias as citadas por Lima e colaboradores (2010) (160) e López-Abarrategui e colaboradores (2012) (161). A fim de obter amostras de sangue, os camundongos receberam 60  $\mu$ L de anestésico Cetamina+xilazina (60 e 10  $\text{mg}/\text{kg}$  respectivamente), para fins de coleta de sangue por punção cardíaca, 2 ml de sangue de três camundongos, totalizando 6 ml, e foi colocado em um tubo anticoagulante separadamente, em seguida, o sangue foi diluído em 9 volumes de solução salina (NaCl 0,85% +  $\text{CaCl}_2$  10mM), obtendo uma concentração de 1/10, sendo um tubo para cada extrato. Posteriormente, os eritrócitos foram lavados em solução salina por centrifugação (5.000 rpm/ 3 min) e ressuspensos em solução salina para se obter uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%, em triplicata. Posteriormente, foi pipetado em eppendorf 300  $\mu$ L de SE e 300  $\mu$ L dos extratos do AbM diluídos em PBS na concentração de  $350$   $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , totalizando um volume final de 600  $\mu$ L. Em outro eppendorf foi pipetado 300  $\mu$ L de SE e 300  $\mu$ L de Triton X-100 na concentração de 1%, como controle negativo. Em um quarto eppendorf utilizou-se como controle positivo o PBS. Logo, em seguida os eppendorfs (extratos metanol e aquoso, Triton e Branco) permaneceram sob uma estante dentro do fluxo laminar por 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (5.000 rpm/ 5min) e o sobrenadante transferido para uma microplaca (96 poços), sendo 100  $\mu$ L em triplicata para cada amostra para ser

medida a absorvância a 540 nm em um leitor de ELISA (Bio-Tek PowerWave HT - USA).

### 3.3.6 Obtenção dos Antígenos Bacterianos

As células de linhagem RAW 264.7 na presença de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e antígenos bacterianos de *P. aeruginosa* MR (HK – Pa MR) foram utilizadas para realizar o teste de viabilidade celular, e síntese *in vitro* de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12). As células RAW 264.7 utilizadas foram provenientes de monócitos murinos derivados de tumores induzidos em camundongos machos BALB/c infectados com o vírus da leucemia murina de Abelson e colaboradores (1970) (162). Estas células possuem receptores para imunoglobulinas, respondem de forma similar aos macrófagos obtidos de camundongos, além de serem alvos de ativação por polissacarídeos (163). Os antígenos foram obtidos como descrito a seguir. O preparo do inóculo da *P. aeruginosa* MR ocorreu conforme descrito no item 3.2.2. Para fins de determinação do número de bactérias que seria utilizado considerou-se o grau de absorvância de luz (1 D.O. =  $8 \times 10^8$  células/mL). Posteriormente, as bactérias foram centrifugadas a 4.000 rpm, a 4 °C, por 10 minutos e ressuspendidas em 9 mL de PBS filtrado (1x) pH 7,4. Logo em seguida, as células foram levadas em eppendorffs (2ml) para o equipamento banho-maria à seco, a 121 °C por 60 minutos (164). Após a morte das bactérias, os eppendorffs foram armazenados em freezer, até a realização do teste. Os antígenos bacterianos foram utilizados na concentração de  $5 \times 10^5$  UFC/mL, nos experimentos de mensuração da produção para a TNF-  $\alpha$ , IL-12 e IL-10.

### 3.3.7 Avaliação da Viabilidade Celular *In Vitro* Utilizando MTT

A atividade imunomodulatória dos extratos aquoso e metanólico do cogumelo AbM na concentração de 350 mg.ml<sup>-1</sup> foi avaliada em cultura de células RAW 264.7, pela avaliação de seus efeitos na viabilidade/proliferação celular, produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10. A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se a linhagem RAW 264.7 de monócitos, empregando o ensaio colorimétrico MTT (Sigma - USA). As células foram plaqueadas na concentração de 1x10<sup>5</sup> células/mL em meio DMEM-s (volume final de 200  $\mu$ L por poço), as mesmas foram incubadas por períodos de 24 e 72 horas com os extratos aquoso e metanólico de AbM na concentração de 350 mg.ml<sup>-1</sup>, em triplicata. Após cada período, 155  $\mu$ L do sobrenadante foi removido, e acrescentado 10  $\mu$ L de MTT (5 mg.mL<sup>-1</sup>)/poço, e as placas foram incubadas com as células por 3 horas. Posteriormente a esse período, a reação foi bloqueada com solução isopropanol-HCl 0,04M, sendo 60  $\mu$ L/poço; foram homogeneizadas para completa solubilização do conteúdo celular e a absorbância determinada em leitor de ELISA a 575 nm (Bio-Tek PowerWave HT - USA). A viabilidade celular nos grupos experimentais foi expressa em porcentagem após subtração da absorbância do meio de cultura e comparada ao grupo controle negativo, representado pela cultura celular em solução de lise (10 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA e 0,1% triton X-100) (164, 165).

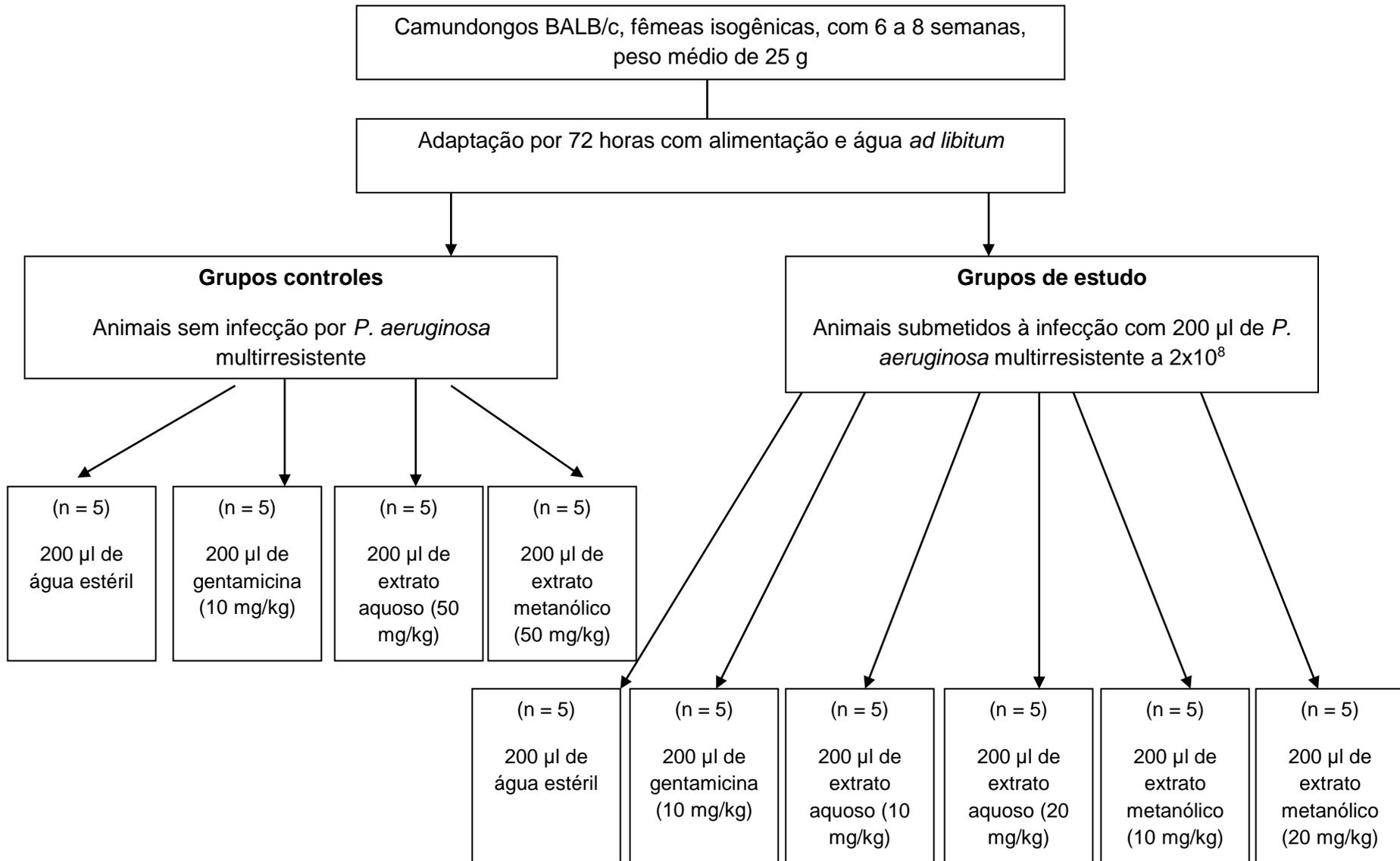
### 3.3.8 Quantificação das Citocinas *In Vitro*

Realizou-se a dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12 sintetizadas pelas culturas de células RAW 264.7 (sobrenadante), em dois períodos, após incubação com antígeno de *P. aeruginosa* MR (5x10<sup>5</sup> UFC/mL), com os extratos aquoso e metanólico de AbM, com e sem IFN- $\gamma$  (10  $\eta$ g.mL<sup>-1</sup>) (Peprotech - EUA) em microplacas. Posteriormente, estas microplacas foram incubadas em estufa durante

24 horas (TNF- $\alpha$  e IL-12) e 72 horas (IL-10) a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub>. O método ELISA foi adotado para determinação das concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12 no sobrenadante das culturas, baseando-se nas orientações discriminadas pelo fabricante (Peprotech - EUA), e os níveis das citocinas foram expressos em picogramas por mililitro (pg.mL<sup>-1</sup>).

### 3.4 ENSAIOS IN VIVO

Os ensaios *in vivo* foram executados com camundongos Balb/c, fêmeas provenientes do biotério que foram mantidos no alojamento por 72 horas antes da realização do experimento. No delineamento experimental houve a formação de quatro (4) grupos controles compostos por cinco (5) animais cada grupo que não foram submetidos à infecção com a *P. aeruginosa* multirresistente, e que foram administrados água estéril, antibiótico gentamicina (10 mg/kg), extratos aquoso e metanólico do cogumelo AbM na concentração de 50 mg/kg. Foram formados seis (6) grupos de estudo em que os animais foram submetidos à infecção com 2x10<sup>8</sup> ufc/mL<sup>-1</sup> da *P. aeruginosa* multirresistente e que foram tratados com: extrato aquoso de AbM (10 mg/kg e 20 mg/kg); extrato metanólico de AbM (10 mg/kg e 20 mg/kg), água estéril e gentamicina (10 mg/kg) (Figura 6).



**Figura 6.** Fluxograma com a descrição dos experimentos *in vivo*.

### 3.4.1 Preparo do Microrganismo

As colônias da bactéria *P. aeruginosa* MR foram cultivadas em placas com meio LB sólido e foram incubadas em estufa a 37 °C durante 24 horas. Colônias da referida bactéria foram ressuspendidas em caldo MH estéril (D.O. 0,5-1,0 a 600 nm,  $\sim 1 \times 10^8$  ufc/mL<sup>-1</sup>). Após a suspensão, as colônias foram centrifugadas a 1.000 x g por 15 min, e descartou-se o sobrenadante, e em seguida o pellet da bactéria foi ressuspendido, diluído em PBS, e armazenado em caixa com gelo até o momento do teste. Os animais que foram submetidos à infecção receberam por via intraperitoneal 200 µL de solução fisiológica com  $2 \times 10^8$  ufc/mL<sup>-1</sup> de bactéria (166, 167). E após 1 hora do desafio com a bactéria, os animais receberam por via intraperitoneal as soluções de extratos do cogumelo conforme desenho experimental.

### 3.4.2 Preparação dos Extratos do AbM: Aquoso e Metanólico

Para administração nos animais, os extratos aquoso e metanólico do AbM foram diluídas em 200 µl solução salina e administradas pelo método intraperitoneal aos camundongos. Para cada tipo de extrato foram testadas as concentrações de 10 mg/Kg e 20 mg/Kg.

### 3.4.3 Animais

No experimento foram utilizados camundongos Balb/c, fêmeas, isogênicas, com 6 a 8 semanas e peso médio de 25 g. Estes animais foram provenientes do biotério da Universidade Católica de Brasília (UCB) e mantidos no alojamento de animais localizado no Laboratório de Bioensaios desta referida instituição de ensino. Os camundongos foram mantidos agrupados ao acaso em gaiolas plásticas, com ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à água e alimentação, com troca diária de maravalha. Os experimentos foram realizados após um período mínimo de acondicionamento às condições do laboratório de 72 horas. No teste, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de 05 animais por caixa submetidos ao tratamento de acordo com o protocolo experimental. E em temperatura ambiente ideal de alojamento de 21 °C ( $\pm 2$  °C), umidade relativa do ar de (UR) 50-55% e exaustor de ar.

### 3.4.4 Delineamento Experimental

O delineamento experimental do ensaio com os animais contemplou a formação de 10 grupos, composto por 05 animais em cada um, totalizando 50 animais. Houve a formação de quatro grupos controles, com animais que não foram submetidos à infecção, e houve a administração de gentamicina, água estéril, e extratos aquoso e metanólico do cogumelo AbM. Foram formados 06 grupos de estudo, nestes animais foi induzida a infecção promovida pela bactéria *P. aeruginosa* MR, e estes foram tratados com os extratos aquoso e metanólico do cogumelo AbM utilizando 02 diferentes concentrações de cada tipo de extrato, utilizando como método a administração intraperitoneal. E por fim, dois grupos de animais infectados com a *P. aeruginosa* MR, sendo um grupo foi tratado com o antibiótico gentamicina e outro grupo controle foi administrado água estéril.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 10 grupos submetidos ao tratamento de acordo com o protocolo experimental a seguir:

**a) Grupos I, II, III e IV - Animais controles:** todos os camundongos destes quatro grupos não foram submetidos à infecção. Os animais dos dois primeiros grupos controles receberam apenas 200 µl de água estéril e 200 µl de gentamicina (10 mg/kg/dia). O terceiro e o quarto grupos controles foram constituídos de animais que receberam 200 µl de solução aquosa e metanólica do cogumelo AbM na concentração de 50 mg/kg a cada uma vez/dia (01x/dia) durante 07 dias de tratamento.

**b) Grupos V e VI** – os animais infectados com *P. aeruginosa* MR e tratados com 200 µl (concentração de 10 mg/kg e 20 mg/kg) de solução aquosa do extrato do cogumelo AbM intraperitoneal 01 hora após a inoculação e a cada uma vez/dia (01x/dia) durante 07 dias de tratamento.

**c) Grupos VII e VIII** – os animais infectados com *P. aeruginosa* MR e tratados com 200 µl (concentração de 10 mg/kg e 20 mg/kg) de solução metanólica do extrato do cogumelo AbM intraperitoneal 01 hora após a inoculação e a cada uma vez/dia (01x/dia) durante 07 dias de tratamento.

**d) Grupos IX e X** – os animais foram infectados com *P. aeruginosa* MR e em um dos grupos os animais foram tratados com 200 µl (concentração de 10 mg/kg) do antibiótico gentamicina intraperitonealmente 01 hora após a inoculação, e no outro grupo foi administrado 200 µl de água estéril, e a cada uma vez/dia (01x/dia) durante 07 dias de tratamento.

### 3.4.5 Monitoramento e Sobrevida

Posteriormente à indução da infecção, os camundongos foram avaliados a cada 24h00min durante os 07 dias de observação, para fins de determinação da

sobrevida e mortalidade. Os animais sobreviventes foram eutanasiados por punção cardíaca após anestesia profunda.

### 3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram representados pela média  $\pm$  desvio padrão. Todos os testes *in vitro* foram realizados em triplicata. Foram utilizados *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni e teste de Tukey para as análises de compostos fenólicos e ação antioxidante. Os resultados obtidos para viabilidade celular foram analisados utilizando teste t de *Student*. Em relação à comparação do tempo de sobrevida foi utilizada a curva de sobrevida de KAPLAN-MEIER. As análises foram realizadas utilizando o software *GraphPad PRISMA*® versão 5.0. Os resultados foram considerados significativos, quando  $p < 0,05$ .

### 3.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A presente pesquisa foi aprovada pelos Comitês de Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB) e da Universidade Católica de Brasília (UCB), números 44076/2010 e 002/16, respectivamente (Anexos A e B).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO COGUMELO ABM

Os dados provenientes da análise da composição do cogumelo AbM bruto e desidratado indicam uma elevada quantidade de carboidratos, proteínas e fibras, ao passo que a gordura apresentou níveis reduzidos (Tabela 3).

**Tabela 3** - Análise da composição do cogumelo AbM desidratado e em pó

<b>Componentes</b>	<b>Valor (g/100g)</b>
Umidade	6,43%
Cinzas	6,45%
Proteína bruta	38,03%
Lipídeos	3,30%
Fibra alimentar total	15,40%
Carboidratos totais	30,39%
Açúcares totais	13,38%
Açúcares redutores em glicose	2,06%
Açúcares redutores em sacarose	11,32%
Sódio	0,95 mg/g
Potássio	26,55 mg/g
Vitamina C	< 0,04 mg/g

#### 4.1.2 Análises do Conteúdo de Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante dos Extratos Aquoso e Metanólico do Cogumelo AbM

Os resultados demonstraram que dentre as amostras analisadas do cogumelo AbM, o extrato metanólico apresenta uma quantidade mais elevada de compostos fenólicos em comparação ao extrato aquoso, especialmente de polifenóis não polimerizados, ésteres tartáricos e flavonóis (quercetina, miricetina, kaempferol) (Tabela 4).

Os dados dispostos na tabela 4 mostram uma elevada atividade antioxidante dos extratos metanólico e aquoso pelo método de ABTS. Ressalta-se que não foi possível determinar a atividade antioxidante pelo método de DPPH do extrato aquoso devido à limitação no momento da execução do teste, em que o mesmo precipitou impossibilitando a realização do teste.

**Tabela 4** - Valores das análises do conteúdo fenólico e atividade antioxidante dos extratos aquoso e metanólico do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill

Análises	Metanol 80% (Média ± SD)	Aquoso (Média ± SD)
PT (µg/mg)	26,2 ± 0,47***	7,68 ± 0,05***
PNP (µg/mg)	2,61 ± 0,05	0,358 ± 0,04
PP (µg/mg)	23,6 ± 0,34***	7,32 ± 0,07***
ET (ng/mg)	126,7 ± 1,44***	42,30 ± 0,69***
FLA (ng/mg)	80,2 ± 3,12***	40,49 ± 0,39***
DPPH (µM)	104,61 ± 1,11	
ABTS (µM)	122,3 ± 2,75***	126,66 ± 3,80***

PT: polifenóis totais - µg ácido gálico/mg de extrato; PNP: polifenóis não polimerizados - µg catequina/mg de extrato; PP: polifenóis polimerizados; ET: ésteres tartáricos – ng ácido cafeico/mg de extrato; FLA - flavonóis -ng quercetina/mg de extrato. DPPH e ABTS: µM de TROLOX. Teste de Tukey.

\*\*\* p<0,001

## 4.2 ENSAIOS *IN VITRO*

### 4.2.1 Teste da Concentração Inibitória Mínima

Os resultados do teste da concentração inibitória mínima (CIM) demonstraram que a concentração de 350 mg.ml<sup>-1</sup> do extrato metanólico do cogumelo AbM foi capaz de inibir o crescimento bacteriano contra a *P. aeruginosa* MR. Ao passo, que a concentração de 350 mg.ml<sup>-1</sup> do extrato aquoso do AbM apenas reduziu o crescimento bacteriano do microrganismo avaliado no teste da CIM (Tabela 5). O controle positivo utilizado nestes experimentos (gentamicina), quando administrado 150 µg.ml<sup>-1</sup>, inibiu o crescimento bacteriano em 100% para a *P. aeruginosa* MR.

### 4.2.2 Avaliação da Atividade Hemolítica

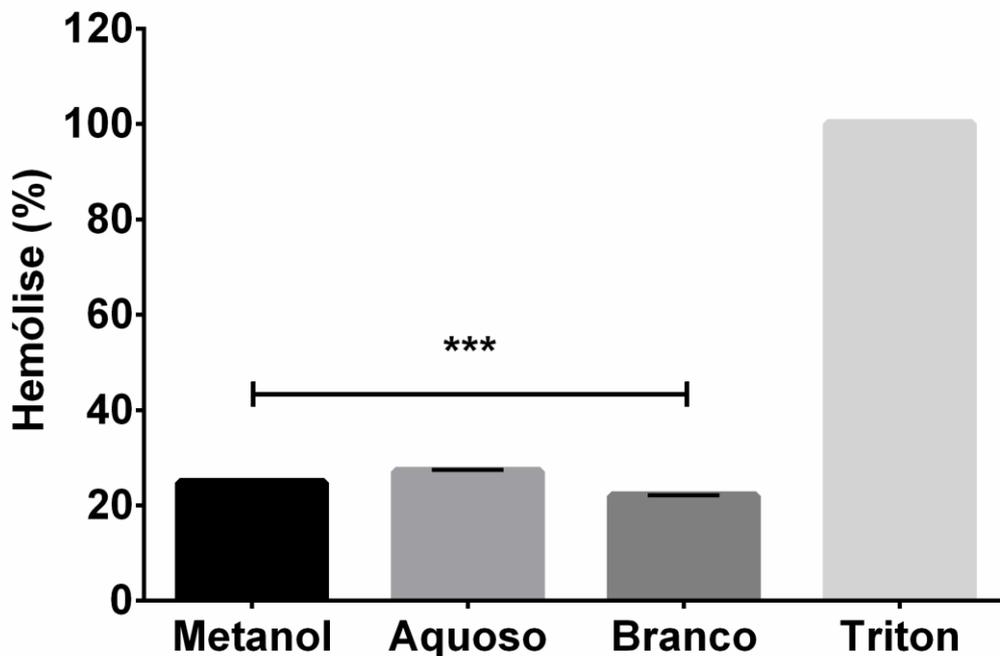
A atividade hemolítica dos extratos aquoso e metanólico (80%) do cogumelo AbM foi avaliada contra os eritrócitos de camundongos. No referido teste, o PBS e o Triton X-100 foram empregados como controle negativo e positivo, respectivamente.

Os dados demonstram que os extratos do cogumelo AbM analisados na concentração de 350 mg.mL<sup>-1</sup> não apresentaram atividade hemolítica (Figura 7).

**Tabela 5** - Percentual de inibição de crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente realizado com os extratos aquoso e metanólico do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill (AbM), analisado pelo teste da Concentração inibitória mínima (CIM)

<b>Extratos do cogumelo AbM</b>	<b>Concentração do extrato (mg.ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Percentual de inibição (%)</b>	<b>DP</b>
Metanólico	100	4,5	0,04
	150	6,7	0,07
	200	6,1	0,06
	250	20,9	0,05
	300	30,8	0,02
	350	100	3,60
Aquoso	100	6,7	0,07
	150	7,1	0,05
	200	5,8	0,08
	250	7,1	0,04
	300	6,7	0,06
	350	7,3	0,10

Observação: Os dados são referentes ao tempo de 300 minutos.



**Figura 7** - Avaliação da capacidade hemolítica dos extratos aquoso e metanólico (80%) do cogumelo AbM sobre eritrócitos de camundongos. Foram utilizados como controle positivo 0,1 % de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), e como controle negativo o PBS (branco), obtendo valores de hemólise, respectivamente, de 100% e 22%. A ruptura de hemoglobina foi avaliada a  $\lambda$  550 nm e apresentada como percentual de hemólise. Os dados são representativos de três experimentos independentes (média  $\pm$  DP).

\*\*\*  $p < 0,001$

### 4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO DOS EXTRATOS DO COGUMELO AbM

#### 4.3.1 Avaliação da viabilidade celular utilizando MTT

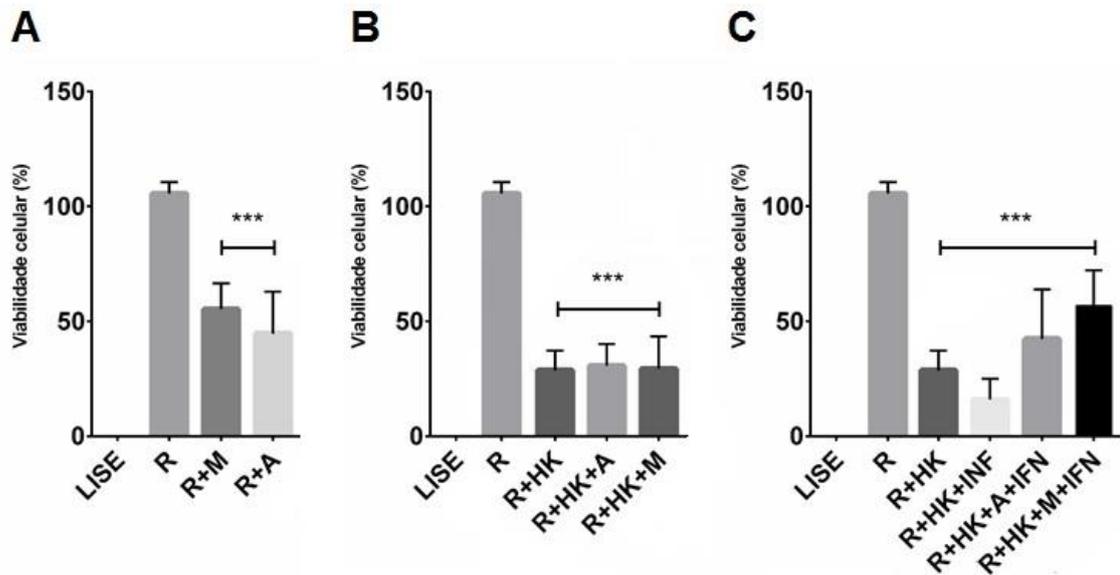
A Figura 8 apresenta a porcentagem da viabilidade/proliferação celular em relação ao controle positivo (células em cultura com meio suplementado – grupo R), cuja absorbância foi considerada 100% de viabilidade/proliferação celular. Os dados demonstram um decréscimo significativo na viabilidade/proliferação celular em todos os tratamentos na presença dos extratos aquoso e metanólico do cogumelo AbM na

concentração avaliada de 350 mg.mL<sup>-1</sup>. A viabilidade celular foi de 55% e 45% quando as células RAW 264.7 foram estimuladas com os extratos metanólico e aquoso do AbM, respectivamente ( $p < 0,001$ ) (Figura 8A). Em adição quando acrescentado o antígeno morto pelo calor da *P. aeruginosa* (HK – Pa) às culturas celulares, a viabilidade celular ficou em torno de 25% nos grupos estimulados com ambos os extratos metanólico e aquoso do AbM ( $p < 0,001$ ) (Figura 8B). Ao passo que, quando houve o acréscimo do IFN- $\gamma$  nas culturas, a viabilidade foi de 48% e 55% nos grupos estimulados com os extratos metanólico e aquoso do AbM, respectivamente ( $p < 0,001$ ) (Figura 8C).

#### **4.3.2 Dosagem de citocinas em linhagem de células RAW 264.7**

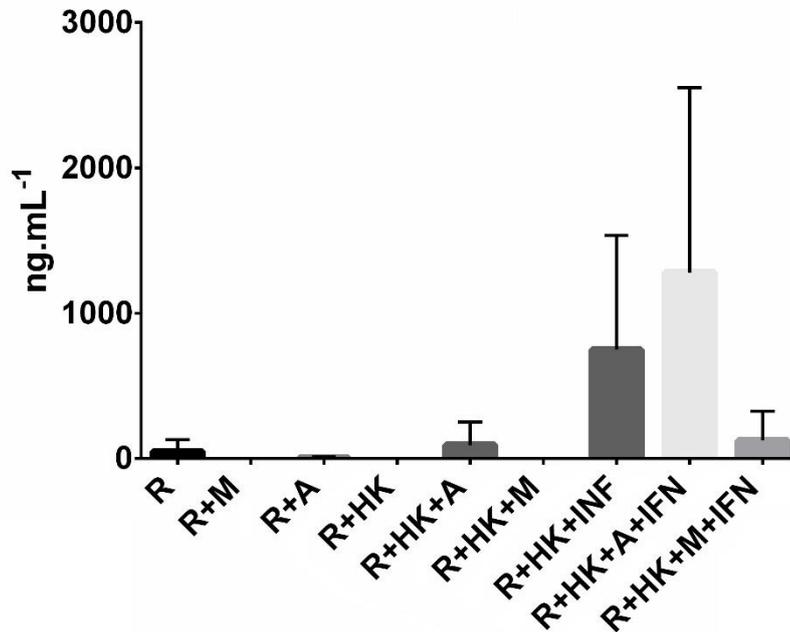
No presente trabalho, também foram avaliados os efeitos dos extratos aquoso e metanólico do cogumelo AbM sobre a secreção de TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12 por células RAW 264.7, estimulados ou não por antígenos bacterianos de *P. aeruginosa* multirresistente (HK-Pa) e IFN- $\gamma$ .

Os tratamentos com os extratos aquoso e metanólico do cogumelo AbM não foram capazes de estimular a produção de citocinas IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$  pelas células RAW 264.7. As células com HK-Pa e tratadas com os extratos aquoso e metanólico do cogumelo AbM na presença de IFN- $\gamma$  não estimularam os níveis de IL-12 e TNF- $\alpha$ , exceto a IL-10, o extrato aquoso do AbM estimulou uma maior síntese desta citocina, porém sem diferença estatística (Figura 9).



**Figura 8** - Efeito dos extratos aquoso e metanólico do cogumelo AbM sobre a viabilidade de células RAW 264.7. Os extratos aquoso e metanólico foram testados nas concentrações de 350 mg.mL<sup>-1</sup> para avaliar a viabilidade das células RAW 264.7 quando na presença de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e antígenos bacterianos mortos pelo calor de *P. aeruginosa* (HK). As células foram incubadas durante 72 horas, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT e como controle negativo foi utilizada solução de lise celular (10 mM Tris, pH 7.4; 1 mM EDTA e 0,1% Triton X-100). Os dados representam a média de três experimentos realizados em triplicata, sendo expressos como média  $\pm$  desvio padrão. R = células RAW, R + M: células RAW e extrato metanólico, R + A: células RAW e extrato aquoso, R + HK: células RAW e antígeno da *P. aeruginosa*; R+ HK + M: células RAW, antígeno da *P. aeruginosa* e extrato metanólico; R+ HK + A: células RAW, antígeno da *P. aeruginosa* e extrato aquoso; R + HK + INF: células RAW, antígeno da *P. aeruginosa* e IFN- $\gamma$ ; R+ HK + INF + M: células RAW, antígeno da *P. aeruginosa*, IFN- $\gamma$  e extrato metanólico; R+ HK + INF + A: células RAW, antígeno da *P. aeruginosa*, IFN- $\gamma$  e extrato aquoso.

\*\*\* p<0,001



**Figura 9** - Dosagem de IL-10 em sobrenadante de cultura células RAW 264.7. As células foram estimuladas por 72 horas com os extratos aquoso e metanólico foram testados nas concentrações de 350 mg.ml<sup>-1</sup>, na presença ou ausência de antígeno bacteriano de *P. aeruginosa*, com ou sem IFN- $\gamma$  (10 ng.mL<sup>-1</sup>). Os dados representam a média de três experimentos realizados em triplicata, sendo expressos como média  $\pm$  desvio padrão. R = células RAW, R + M: células RAW e extrato metanólico, R + A: células RAW e extrato aquoso, R + HK: células RAW e antígeno da *P. aeruginosa*; R+ HK + M: células RAW, antígeno da *P. aeruginosa* e extrato metanólico; R+ HK + A: células RAW, antígeno da *P. aeruginosa* e extrato aquoso; R + HK + INF: células RAW, antígeno da *P. aeruginosa* e IFN- $\gamma$ ; R+ HK + IFN + M: células RAW, antígeno da *P. aeruginosa*, IFN- $\gamma$  e extrato metanólico; R+ HK + IFN + A: células RAW, antígeno da *P. aeruginosa*, IFN- $\gamma$  e extrato aquoso. A análise estatística foi realizada utilizando teste de Bonferroni, com p não significativo em relação ao controle.

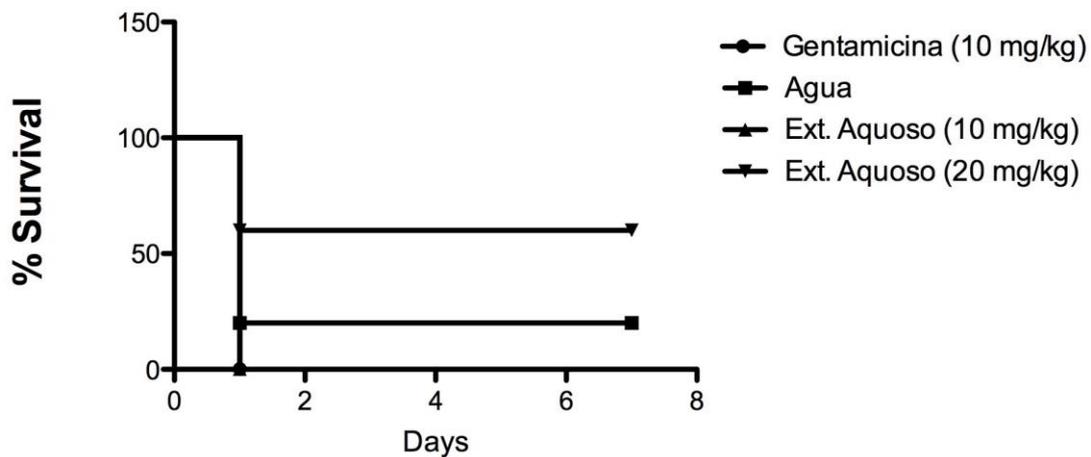
#### 4.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DO COGUMELO ABM NA SOBREVIVÊNCIA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À INFECÇÃO

No ensaio *in vivo* para avaliação da ação antimicrobiana dos extratos aquoso e metanólico do cogumelo AbM os animais dos quatro grupos controles (água estéril, gentamicina, extrato aquoso e extrato metanólico) que não foram submetidos à infecção com a *P. aeruginosa* MR tiveram uma sobrevivência de 100% durante os 07 dias de tratamento, evidenciando que os extratos analisados não foram tóxicos aos animais (Tabela 6).

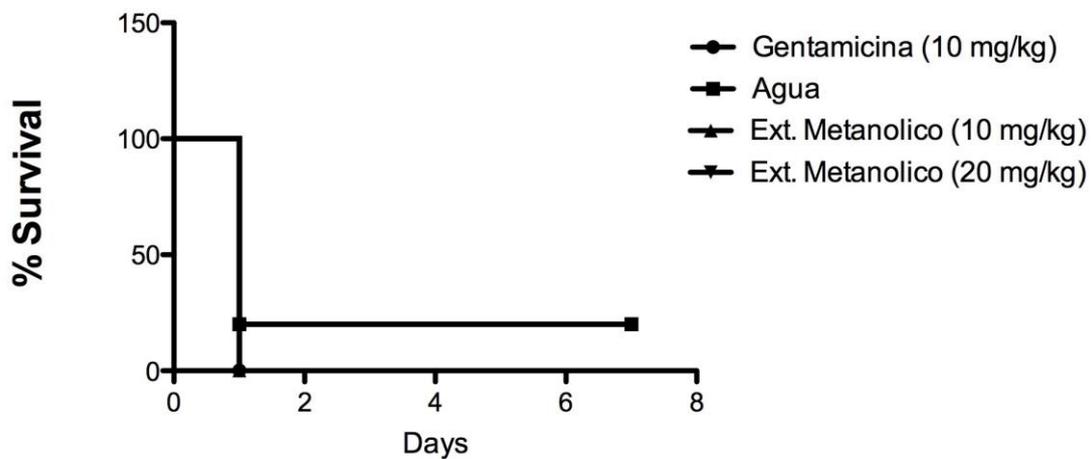
**Tabela 6** - Avaliação da toxicidade grave em camundongos tratados com o extrato aquoso e metanólico do cogumelo AbM. Cada animal foi injetado intraperitonealmente com uma solução de 200 µl do extrato aquoso e metanólico do cogumelo AbM em solução salina. As doses dos extratos administradas nos camundongos foram 50 mg.kg<sup>-1</sup> de peso corporal. Os animais foram inspecionados quanto a efeitos adversos para 6h, e a mortalidade foi monitorada durante 07 dias.

	Resultado	Dose (mg.kg)
<b>Gentamicina – camundongos (n)</b>	5 - No effect	10
<b>Extrato aquoso do cogumelo AbM (n)</b>	5 - No effect	50
<b>Extrato metanólico do cogumelo AbM (n)</b>	5 - No effect	50

Os extratos aquoso e metanólico do cogumelo AbM, na concentração de 20 mg/Kg, apresentaram um efeito benéfico na sobrevivência de camundongos submetidos a infecção com a *P. aeruginosa* MR. Os camundongos infectados foram tratados com doses diferentes dos extratos aquoso e metanólico, 01 hora e a cada 24 horas posteriormente a infecção e a sobrevivência foi analisada durante 7 dias. Verificou-se que 100% e 80% dos camundongos infectados tratados com gentamicina (10 mg/Kg) e água estéril, respectivamente, morreram durante as primeiras 24 horas, logo, apenas 20% dos animais tratados com água estéril permaneceram vivos até o fim do ensaio (Figuras 10 e 11). Nos grupos de animais tratados com os extratos aquoso e metanólico na concentração de 10 mg/Kg, todos os animais morreram após 24 horas. Entretanto, observou-se que 60% e 20% dos animais tratados com 20 mg/Kg dos aquoso e metanólico, respectivamente, estavam vivos após 24 horas e até o final do tratamento (Figuras 10 e 11). Comparando a taxa de mortalidade global dos grupos tratados com o antibiótico gentamicina, os animais tratados com o extrato aquoso do cogumelo AbM apresentaram uma tendência para a sobrevivência prolongada.



**Figura 10** . Influência do extrato aquoso do cogumelo AbM, antibiótico e água estéril na sobrevivência de camundongos submetidos a infecção com *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. Camundongos BALB/c foram inoculados intraperitonealmente com  $10^8$  células/mL de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. Os animais foram tratados com diferentes concentrações do extrato aquoso do cogumelo AbM (10 e 20 mg/Kg), água estéril, gentamicina (10 mg/Kg), após 01 hora a infecção e durante 7 dias consecutivamente. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 11** . Influência do extrato metanólico do cogumelo AbM, antibiótico e água estéril na sobrevivência de camundongos submetidos a infecção com *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. Camundongos BALB/c foram inoculados intraperitonealmente com  $10^8$  células/mL de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. Os animais foram tratados com diferentes concentrações do extrato metanólico do cogumelo AbM (10 e 20 mg/Kg), água estéril, gentamicina (10 mg/Kg), após 01 hora a infecção e durante 7 dias consecutivamente. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo, a composição centesimal do cogumelo AbM desidratado e em pó revelou uma elevada quantidade de carboidratos, proteínas e fibras, ao passo que o teor de lipídeos encontra-se reduzido. Estes resultados são semelhantes aos identificados por outras pesquisas (168, 169).

A composição centesimal dos cogumelos pode ser influenciada por diversos fatores, como: transporte, armazenamento, manipulação, tipo de substrato, época e as condições de crescimento, fatores intrínsecos e genéticos, características ambientais, fase de desenvolvimento e parte do basidioma analisado, processamento pós-colheita, linhagem e espécie (170).

Geralmente, os cogumelos comestíveis podem ser considerados alimentos de elevado valor nutricional, pois apresentam quantidades significativas de carboidratos e proteínas, além de serem constituídos por reduzido teor de lipídios (73).

A proteína bruta analisada na presente pesquisa apresentou valor de 38,03%. Esta quantidade pode ser considerada superior à verificada em outros estudos com esta espécie (171-174) e aos valores médios encontrados em cogumelos, geralmente, entre 19 e 35% (175).

Outro aspecto característico dos cogumelos consiste no baixo teor de lipídios, geralmente, apresentam valores inferiores a 5% do peso seco. Nesta pesquisa, verificou-se um valor de 3,3%, considerado compatível a referência para cogumelos, contudo, é uma quantidade superior a descrita por outros estudos que observaram valores próximos de 1% no cogumelo AbM (168, 176).

Nos cogumelos, um dos constituintes que se destaca são os carboidratos, apresentando uma variação na quantidade deste nutriente de acordo com a espécie, sendo descritos valores entre 35 a 70% do peso seco (177). Neste estudo, obteve-se um teor de 30,39% de carboidratos totais. Este resultado é inferior ao encontrado por outras pesquisas com esta espécie, como 34,78% (176), 38,3% (178) e 39,41% (168).

As fibras alimentares destacam-se entre os nutrientes, pois promovem diversos benefícios à saúde humana, especialmente na prevenção e/ou tratamento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (179). Segundo Mizuno (2002) (180), o elevado teor de fibras do AbM alcança valores médios entre 20 a 28%, incluindo além das  $\beta$ -glucanas, outros tipos de fibras, como pectina, hemiceluloses e quitina. No presente trabalho, observou-se uma quantidade de 15,4% de fibra presente no cogumelo AbM. Dados provenientes de outros estudos verificaram um maior teor de fibras neste cogumelo, especificando valores de aproximadamente 21-24% (73, 168, 181). A grande variabilidade na quantidade de fibras constituintes dos cogumelos pode ser justificada pelo método empregado para análise deste nutriente.

A avaliação de umidade do AbM desidratado revelou um valor de 6,43%, quantidade que pode ser considerada normal baseando-se nos valores preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2005) recomendando no máximo 12% (182). Os valores de umidade em outras espécies de cogumelo, como *Agaricus bisporus* (8,95%), *Lentinula edodes* (9%), *Pleurotus florida* (9,1%) e *Pleurotus ostreatus* (9,3%) (178), assemelham-se ao resultado de umidade obtido neste estudo.

Em relação ao teor de cinzas, verificou-se nesta pesquisa um valor de 6,45% para o cogumelo AbM desidratado, compatível aos resultados encontrados por outros pesquisadores (168, 176, 183).

O potássio foi outro nutriente que apresentou um valor de 26,5 mg, sendo considerado superior ao encontrado por Alliatti e colaboradores (2014), cuja quantidade foi de 18 mg. O potássio exerce um papel relevante na ação anti-hipertensiva no tratamento não-farmacológico (174).

A análise dos compostos fenólicos do cogumelo AbM no presente estudo demonstrou que o extrato metanólico contém uma maior quantidade destas substâncias em relação ao extrato aquoso. Pode-se inferir que este extrato do AbM provavelmente possui atividade antioxidante devido ao significativo teor de compostos fenólicos identificados (184).

Normalmente, durante o metabolismo energético normal e patológico, as células sintetizam os radicais livres, espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), favorecendo o desenvolvimento de diversas doenças e

de processos degenerativos decorrentes do envelhecimento (185). Enzimas e substâncias antioxidantes proporcionam uma ação protetora contra os radicais livres, sendo que estas últimas podem ser provenientes dos alimentos, como por exemplo: ácido ascórbico, carotenóides, compostos fenólicos e tocoferol (186-188).

A atividade antioxidante dos cogumelos é exercida especialmente pelos compostos fenólicos (187, 189, 190).

Costa e colaboradores (2011) confirmaram o potencial antioxidante do cogumelo AbM, e inferiram que o álcool pode diluir a maioria dos compostos antioxidantes constituintes em cogumelo (191). Pesquisadores verificaram que extratos hidroalcoólicos de *A. Brasiliensis* ou AbM do corpo de frutificação e micélio são ricos em compostos fenólicos (192).

A ação antioxidante de compostos fenólicos é devido às suas estruturas químicas e propriedades redox promovendo a neutralização de radicais livres, quelatão de metais reativos e a supressão do oxigênio (193).

A diferença verificada neste estudo referente à quantidade de compostos fenólicos nos extratos do AbM, pode ser devido ao solvente empregado. O metanol é o solvente mais comum para extrair pequenas moléculas de cogumelos, incluindo moléculas antioxidantes (177, 194). Mourão e colaboradores (2011) evidenciaram que a condição mais favorável para a extração de antioxidantes do cogumelo AbM é com o solvente metanol a 60 °C durante 60 minutos (195).

Os compostos fenólicos também apresentam uma ação antimicrobiana que pode ser justificada por três mecanismos: 1/aumento da permeabilidade da membrana celular e perda de constituintes celulares; 2/inativação de enzimas essenciais ou sistemas enzimáticos que exercem funções significativas, como a síntese de energia, produção de componentes estruturais e de metabólitos essenciais; ou 3/destruição ou interação com o material genético (115, 116, 196).

Os polifenóis são capazes de eliminar alguns fatores de virulência microbianos, tais como: redução da adesão às células hospedeiras, inibição da produção de biofilme e neutralização das toxinas bacterianas (117). Evidências científicas confirmam que os polifenóis também atuam em conjunto com os antibióticos a fim de potencializar a sua eficácia, exigindo assim uma menor dose do antibiótico, e, conseqüentemente reduz as reações adversas a estes medicamentos.

Estas descobertas têm implicações potenciais em retardar o desenvolvimento de resistência bacteriana devido à necessidade de se utilizar menores concentrações dos antibióticos (197).

Nesta pesquisa a capacidade antioxidante foi avaliada utilizando-se DPPH e ABTS (198). Os dados demonstraram o potencial antioxidante do extrato metanólico do AbM pelo método DPPH, sendo este resultado corroborado por alguns pesquisadores (195, 199-201). Estes estudos encontraram algumas diferenças, como estirpes com basidiocarpo fechado e o cultivo ao ar livre do cogumelo, apresentaram maior atividade antioxidante quando comparadas com basidiocarpo aberto e com o cultivo em estufa, assim como, esta ação foi mais pronunciada com o extrato metanol:água.

Em nosso estudo a precipitação do radical DPPH ao tentar-se avaliar a ação antioxidante do extrato aquoso inviabilizou o resultado pelo referido método. Pode-se inferir que uma provável justificativa seria relativa à solubilidade dos radicais ABTS e DPPH. O radical ABTS é solúvel em água e solução alcoólica, assim, pode estar dissolvido em meio aquoso e orgânico, dessa maneira a atividade antioxidante pode ser medida em meio hidrofílico ou lipofílico dependendo da natureza da amostra. Em contraponto o radical DPPH pode somente ser dissolvido em meio orgânico, especialmente etanol, sendo essa uma limitação para esse método (202).

A presente pesquisa evidenciou a ação antioxidante dos extratos aquoso e metanólico 80% do AbM pelo método ABTS. Fernandes (2006) demonstrou que o extrato bruto etanólico do AbM e suas diferentes frações (hexano, acetato de etila e hidroalcoólica) apresentaram uma atividade antioxidante analisada pela técnica ABTS (203).

O cogumelo AbM apresenta outros compostos que exercem a atividade antioxidante, como: diferentes tipos de polissacarídeos (204, 205), ácidos orgânicos (206, 207), tocoferóis (114),  $\beta$ -glucana (208). A ação antioxidante deste cogumelo pode ser justificada por uma associação de moléculas que o constituem, portanto, não pode ser designada a um componente específico (208).

Os resultados do teste da ação antimicrobiana *in vitro* demonstraram que o extrato metanólico do cogumelo AbM apresentou atividade inibitória para *P. aeruginosa* MR nas concentrações de 350 mg.ml<sup>-1</sup>, ao passo que o extrato aquoso

induziu apenas uma redução do crescimento bacteriano nas concentrações iguais e/ou superior a 300 mg.ml<sup>-1</sup>. Outras pesquisas também confirmaram a propriedade antimicrobiana do AbM pelo método de microdiluição (209-212).

Entretanto, Zhu-qiu e colaboradores (2001) não verificaram ação antimicrobiana dos extratos do AbM, aquoso e metanólico, contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichi coli*, segundo o método de microdiluição (213).

As bactérias Gram-negativas apresentam algumas diferenças estruturais em relação aos microrganismos Gram-positivos, como: a presença de uma membrana externa sobre uma camada delgada de peptidoglicano e um número elevado de bombas de efluxo. Estes fatores explicariam a menor inibição de compostos antimicrobianos contra as bactérias Gram-negativas (214). A membrana externa destas bactérias torna a superfície altamente hidrofílica, ao passo que a carga negativa da superfície da parede das bactérias Gram-positivas pode reduzir sua resistência a compostos antibacterianos (215).

O teste de microdiluição em caldo confirmou a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos do AbM em três diferentes concentrações (50%, 75% e 100%) contra o *Streptococcus mutans* UA159 e *Streptococcus sobrinus* 6715. Ressalta-se que valores do CIM variaram entre 87,4 e 444,5 mg.mL<sup>-1</sup>, destacando-se o extrato etanólico de 100% que foi o mais ativo (CIM 87,4 mg mL<sup>-1</sup>) (210).

Mazzuti e colaboradores (2012) confirmaram a ação antimicrobiana de extratos do AbM (hexano, diclorometano, acetato de etila e água) obtidos por diferentes técnicas de extração (Soxleth, maceração, hidrodestilação e cossolvente), testados contra bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, utilizando a técnica de microdiluição. Contudo, neste estudo todos os resultados da CIM contra as bactérias Gram-negativas, *E. coli* e *P. aeruginosa*, foram superiores a 2.000 µg/mL, com exceção do extrato diclorometano, que apresentou CIM de 1.500 µg/mL contra *E. coli* (211).

A CIM do extrato etanólico do AbM para *P. aeruginosa* foi determinada pelo método de microdiluição com 0,2 mg/mL (200 µg/mL). A análise da composição química deste cogumelo revelou elevada quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, compostos fenólicos e tocoferóis (212).

Os resultados do teste *in vitro* da atividade hemolítica obtidos no presente estudo, demonstraram que os extratos aquoso e metanólico do cogumelo AbM não provocaram a hemólise dos eritrócitos de camundongos, sugerindo sua segurança para uso terapêutico em animais e humanos. Esta evidência também foi corroborada por outras pesquisas que utilizaram o extrato aquoso do AbM em eritrócitos humanos (216, 217).

O uso de extratos e/ou compostos bioativos naturais provenientes de plantas e cogumelos na terapia coadjuvante ou no tratamento de diversas doenças, desperta a necessidade de corroborar as propriedades terapêuticas destas substâncias associadas a sua incapacidade de promover reações adversas (218).

Os cogumelos podem apresentar diferentes níveis de toxicidade a depender do tipo de cultivo e compostagem, portanto, podem representar um risco a saúde humana. Entretanto, o AbM é utilizado popularmente há vários anos especialmente, por povos indígenas, e algumas pesquisas científicas vêm evidenciando a baixa toxicidade deste cogumelo (216, 219-222).

O ensaio de viabilidade celular utilizando MTT *in vitro* teve como intuito identificar a ausência de interferências dos referidos extratos sobre a viabilidade/proliferação celular. Os resultados evidenciaram que extratos metanólico e aquoso do AbM provocaram uma redução na viabilidade/proliferação celular (Figura 8). Uma provável justificativa para essa redução na viabilidade/proliferação celular, pode ser devido a um efeito tóxico dos extratos analisados na concentração de 350 mg.mL<sup>-1</sup>.

Faccin e colaboradores (2007) evidenciaram uma baixa toxicidade dos extratos aquoso e etanólico do cogumelo AbM pelo teste de MTT, posteriormente a 72h de incubação das células, pois a concentração citotóxica foi obtida apenas com uma quantidade elevada das amostras, 2.302 e 969 ug.mL<sup>-1</sup>, respectivamente (223).

Entretanto, Orsine e colaboradores (2013) investigou o provável efeito citotóxico do extrato aquoso do cogumelo *A. sylvaticus* ou AbM sobre as linhagens de células de fibroblastos não-tumorais (NIH/3T3) e de células tumorais escamosas oral (CCEO-3), utilizando o teste de redução do MTT após 24 horas de incubação com o extrato. Diferentes concentrações do extrato aquoso do cogumelo foram utilizadas 0,01 mg.ml<sup>-1</sup>, 0,02 mg.ml<sup>-1</sup>, 0,04 mg.ml<sup>-1</sup>, 0,08 mg.ml<sup>-1</sup>, 0,16 mg.ml<sup>-1</sup>, e 0,32

mg.ml<sup>-1</sup>. Determinou-se a concentração do extrato capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% (CC 50%). Os resultados evidenciaram que o extrato aquoso do cogumelo *A. sylvaticus* ou AbM não apresentou nenhum efeito citotóxico sobre as linhagens de células NIH/3T3 e CCEO-3, pois a CC 50% foi de 0,06194 mg.ml<sup>-1</sup> e 0,06468 mg.ml<sup>-1</sup>, respectivamente (224).

Algumas pesquisas têm evidenciado que os extratos provenientes do cogumelo AbM estimulam a proliferação de várias linhagens celulares, dentre elas monócitos humanos (110), macrófagos (13, 95, 225); células NK (94, 98); monócitos e granulócitos (226); e células dendríticas (96, 227).

Monócitos humanos de adultos jovens foram estimulados com diferentes concentrações de extrato aquoso de AbM 0,1%, 0,5%, 2,0%, 5,0%, 10,0% ou 15,0% a 37 °C por 6 horas (110).

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos foram tratados com diferentes frações de extratos do AbM aquoso e etanólico provenientes do micélio e do corpo de frutificação, durante 6 horas e 72 horas (13).

Extrato aquoso de AbM (25 mg/kg) foi administrado intraperitonealmente em camundongos. Após 4 dias, culturas de macrófagos foram estabelecidas do exsudato peritoneal. Posteriormente, macrófagos foram cultivados em placa de cultura com ou sem extrato AbM nas concentrações de 0,1 a 1,0 mg/ml a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24h e 48 h, o RNA total foi isolado. Extrato aquoso de AbM promoveu aumento da expressão dos níveis de RNAm de IL-1 e IL-6 (225).

Células mononucleares periféricas humanas foram cultivadas em meio contendo 40 ng/ml de hemicelulase derivada do cogumelo AbM durante 16 h. Os níveis de IL-12 nos sobrenadantes foram medidos. Os resultados indicaram que hemicelulase do AbM induziu a expressão de IL-12 por monócitos/macrófagos (95).

Extrato aquoso de AbM na concentração de 300 mg/dia administrado por via oral durante cinco dias promoveu um aumento da atividade das células NK (94).

Administração diária de 32 mg e 64 mg de extrato aquoso de AbM em camundongos C57BL/6 durante 2 semanas, promoveu o aumento da atividade citotóxica das células NK derivadas do fígado mediada pela estimulação de INF- $\gamma$  e IL-12 (98).

O aumento da expressão do receptor CD11b em monócitos e granulócitos humanos estimulados por extrato aquoso de AbM, promoveu o aumento do potencial fagocítico e a habilidade destas células para induzir diapedese em focos inflamatórios (226).

Células dendríticas cultivadas com proteoglicano derivado do extrato aquoso de AbM durante 24 horas de incubação foram estimuladas pelo aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86), do complexo de histocompatibilidade (MHC-II) e IL-12p 70 (227).

Assim como, hemicelulase proveniente do AbM estimularam células dendríticas derivadas de camundongos resultante do aumento da regulação das moléculas de superfície, tais como CD40, CD80 e complexo de histocompatibilidade principal classe I (MHC-I). No entanto, a hemicelulase não estimulou a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-12 p40, TNF- $\alpha$  e IL-1 (96).

Atualmente, dispõe-se de alguns estudos que investigaram a influência de cogumelos e/ou extratos destes sobre células RAW 264.7, evidenciando uma atividade imunoestimulante, como: o aumento da ativação dos fatores de transcrição de IL-1 e IL-6 (228); elevação da expressão do RNAm da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), (229); redução significativa da síntese de TNF- $\alpha$ , e diminuição nas expressões de RNAm de iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  (230); e redução da produção de TNF- $\alpha$  (231). Contudo, há uma escassez de pesquisas que investigaram a associação destas células com o cogumelo AbM (232, 233).

A análise da provável ação imunomodulatória *in vitro* dos extratos aquoso e metanólico do AbM foi realizada com testes que investigaram a síntese de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10, analisadas no tempo experimental de 24h (TNF- $\alpha$ , IL-12) e 72 h (IL-10). Estes testes foram realizados seguindo as mesmas condições experimentais adotadas no teste de avaliação da viabilidade celular.

Os resultados comprovaram que nenhum dos extratos do cogumelo AbM promoveu a estimulação das células RAW 264.7 a sintetizarem TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10. Mesmo quando os antígenos bacterianos de *P. aeruginosa* multirresistente (HK-Pa MR) mortos pelo calor e o IFN- $\gamma$  foram adicionados à suspensão celular não houve nenhuma produção das citocinas referidas. Contudo, apenas o extrato aquoso do

AbM estimulou a produção de IL-10 quando as células foram tratadas com HK-Pa MR em combinação com o IFN- $\gamma$ , porém a diferença não foi estatisticamente significativa. Assim como, o HK-Pa MR não estimulou a produção de TNF- $\alpha$  na ausência de IFN- $\gamma$ .

Entretanto, evidências científicas provenientes de estudos *in vitro* têm verificado que antígenos da bactéria *P. aeruginosa* morta pelo calor (HK-Pa) são capazes de estimular a síntese de diversos mediadores inflamatórios, especialmente TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-12; por diferentes tipos de células humanas, como: células séricas, leucócitos e células U937 (47, 234-237).

Portanto, os dados observados neste estudo não estão condizentes aos apresentados na literatura científica. A provável justificativa para os resultados obtidos pode ser a baixa viabilidade celular promovida pelos extratos aquoso e metanólico do AbM, pois uma redução da atividade das mitocôndrias altera a capacidade de resposta inflamatória, suprimindo a secreção de citocinas pelas células RAW 264.7 (238). É importante ressaltar, que a resposta obtida *in vivo* é resultante da atividade de diversos tipos celulares, diferentemente do que acontece em um experimento *in vitro*.

As células RAW 264.7 apresentam uma resposta similar aos macrófagos obtidos de camundongos, e também apresentam receptores para imunoglobulinas, além de serem alvos de ativação por polissacarídeos, sendo que estes são considerados os principais constituintes dos cogumelos (163). Os macrófagos são células fagocíticas residentes em tecidos linfóides e não linfóides, são componentes exclusivos da imunidade inata e estão relacionados com o processo de ativação. Essas células são responsáveis por iniciar as respostas imunes, além de apresentarem outras diversas funções, como a destruição de células apoptóticas, e a síntese de diversos fatores de crescimento: fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), fator de crescimento transformador- $\alpha$  e  $\beta$  (TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ), fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Os macrófagos ativados são as células apresentadoras de antígenos mais eficientes, pois, expressam elevados níveis de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC classe II) e as moléculas co-estimuladoras, além da atividade fagocitária, e uma maior produção de NO e citocinas (239, 240).

No processo inflamatório promovido pelo sistema imune, os macrófagos sintetizam e secretam citocinas e NO na circulação, resultando assim, em efeitos sistêmicos, que estão envolvidos nas respostas imunitárias e defesa do hospedeiro, e exercem uma potente atividade antimicrobiana (241, 242).

Citocinas são pequenas proteínas relacionadas com a regulação dos processos inflamatórios, e são classificadas em: anti-inflamatórias (IL-10); pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ ), e outras com ação quimioatrativas (IL-8) (47).

A citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  é sintetizada especialmente por macrófagos no período inicial da infecção atuando a nível hipotalâmico, promovendo assim, o surgimento da febre, a qual inibe a multiplicação bacteriana. Esta citocina estimula e ativa os macrófagos e neutrófilos a produzirem NO, facilita a passagem de células dos vasos para o sítio da infecção e eleva a expressão de moléculas de adesão (seletina Pe ICAM) nas células endoteliais (243).

Dentre as moléculas relevantes na imunofarmacologia destaca-se a citocina TNF- $\alpha$ , pois, promove efeitos biológicos benéficos em diversas células, principalmente relacionados com processos fisiológicos, ou imunomoduladores ou inflamatórios. Assim como, é considerado um mediador citotóxico que contribue para que os macrófagos possam exercer a propriedade antimicrobiana (244).

Em resposta a exposição do organismo a produtos microbianos, como LPS, células dendríticas (CD), monócitos e macrófagos produzem a citocina IL-12, por meio da sinalização TLR-4 (245). Essa citocina é importante nas respostas imunes humoral e celular, pois estimula e mantém a produção de células Th1 efectoras e de memória, induz a produção de IFN- $\gamma$  pelas células *natural killer* (NK) e células T (246).

Dentre as funções da citocina IL-12 destaca-se a indução da síntese de IFN- $\gamma$ , ao passo que a sua ação pró-inflamatória é dependente de IFN- $\gamma$ . Em síntese, células apresentadoras de antígenos produzem IL-12, essa citocina estimula a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK e T, e o IFN- $\gamma$  ativa as células apresentadoras de antígenos. Portanto, observa-se um importante mecanismo de feedback positivo

na interação entre o IFN- $\gamma$  e a IL-12, promovendo assim um controle das infecções mediado por células (247).

O interferon (IFN) é outra citocina importante, que apresenta uma classificação determinada de acordo com a sua ação, sendo que o IFN do tipo II ou IFN- $\gamma$  atua nas infecções microbianas (248).

O IFN- $\gamma$  regula as imunidades inata e adquirida, destacando-se as atividades antiproliferativas, antivirais, apresentação de antígeno, ativação de macrófagos, aumenta a atividade das células NK, controle da apoptose e morte de microrganismos intracelulares. A principal ação do IFN- $\gamma$  é aumentar a síntese de IL-12 pelas células apresentadoras de antígenos, resultando na inibição da resposta Th2 (248). Nos estágios iniciais da resposta imune os macrófagos produzem IFN- $\gamma$ . Logo, a síntese desta citocina pelos macrófagos ativados influenciará nas imunidades inata e adquirida, determinando assim o repertório da resposta imunológica e alterando o equilíbrio Th1/Th2 já no momento da apresentação do antígeno (249).

Na resposta imune Th2 envolve a participação de diversas citocinas, destacando-se a IL-10, que desenvolve uma atividade regulatória, pois uma das suas principais funções é a inibição da síntese de IFN- $\gamma$  e IL-12, ou seja, inibe os mediadores pró-inflamatórios. A IL-10 exerce também outras funções, como: inibe a expressão de moléculas co-estimuladoras, induz a síntese de IL-4, modula doenças alérgicas em humanos, inibe a produção de IFN- $\gamma$  por células NK e macrófagos; e limita a síntese de outras citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$ ) (249). A IL-10 interfere na apresentação de antígenos pelas células dendríticas e macrófagos, pois diminui a expressão da molécula de histocompatibilidade II (MHC II), além de inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-6. Devido a esta função, a IL-10 impede a ativação de células T, terminando assim as reações da imunidade mediada por células (55). Portanto, a IL-10 atua nos macrófagos ativados fazendo com que estas células retornem ao estado de repouso à medida que ocorre a erradicação da infecção microbiana (250).

O provável potencial terapêutico do AbM foi avaliado no ensaio *in vivo* com animais submetidos à infecção com patógeno multirresistente. O extrato aquoso deste cogumelo promoveu um aumento da sobrevivência de camundongos submetidos

à infecção com *P. aeruginosa* MR. Estes dados sugerem um relevante potencial da utilização dos extratos do cogumelo AbM na infecção. Contudo, é importante ressaltar que, a atividade antimicrobiana apresentada por este extrato no modelo experimental de infecção com a *P. aeruginosa* MR foi observado no ensaio *in vivo*, e contrariamente, os testes *in vitro* realizados na presente pesquisa não evidenciaram estes resultados. Assim como, outros pesquisadores observaram que em seu estudo não houve efeito antimicrobiano do AbM ao utilizar o método *in vitro* apesar de constatarem esta propriedade em camundongos (14). A justificativa para os resultados negativos verificados por ambas as pesquisas, provavelmente baseia-se no fato que o mecanismo de ação antimicrobiana das substâncias bioativas presentes no cogumelo necessita de um envolvimento com o sistema imunitário, principalmente o inato, o qual não pode ser evidenciado *in vitro* (251).

Atualmente, verifica-se uma escassez de pesquisas que investigaram a ação antimicrobiana do cogumelo AbM *in vitro* e *in vivo*, somente três estudos em animais. Apenas no estudo de Bernardshaw e colaboradores (2005) empregou-se ambos os métodos anteriormente citados (14). Os pesquisadores demonstraram que o extrato do cogumelo exerceu ação contra microorganismos que causam infecções letais resultantes de pneumococos (14), peritonite fecal (15) e sepse pneumocócica (16).

Bernardshaw e colaboradores (2005) verificaram que a administração oral de um extrato aquoso de AbM, industrializado, promoveu um efeito protetor contra infecção por *Streptococcus pneumoniae* 6B, quando administrado 2h e 24 h antes da inoculação. Associado a ausência de efeito antibiótico sobre pneumococos *in vitro*. A taxa de sobrevivência de camundongos que receberam o extrato de AbM 2 horas antes da infecção foi de 38% dos animais até o sexto dia de tratamento, e de 25% no sétimo dia. O efeito profilático do extrato AbM foi confirmado quando foi administrado 24 h antes da infecção, 38% de animais que receberam extrato de AbM sobreviveram 10 dias após a infecção. Segundo os pesquisadores, neste estudo, o extrato do cogumelo não foi administrado após a infecção devido a elevada taxa de mortalidade precoce entre os animais controles no modelo de infecção analisado (14).

No segundo estudo que evidenciou a ação antimicrobiana do cogumelo AbM em animais, os resultados demonstraram uma redução da bacteremia e aumento da

sobrevida, devido a diminuição da septicemia letal, em camundongos com peritonite fecal. Os camundongos com peritonite grave, que foram tratados com a administração oral de 200 µl de extrato aquoso de AbM 24 horas antes da indução da peritonite, apresentaram uma taxa de sobrevivência de 33% no segundo dia, e reduziu para 25% até o último dia do experimento (15).

Tryggestad e colaboradores (2007) investigaram a propriedade antimicrobiana de cinco extratos industrializados do cogumelo AbM em camundongos submetidos a modelo de sepse pneumocócica. Os extratos foram administrados oralmente um dia antes da inoculação com as bactérias. Os resultados evidenciaram que apenas um dos extratos investigados promoveu um efeito protetor significativo, reduzindo a bacteremia e aumento da taxa de sobrevivência em 38% até o quinto dia de experimento (16).

Na presente pesquisa, a análise da sobrevida avaliada para animais infectados com um dos mais importantes patógenos humanos, a bactéria *P. aeruginosa* MR, permite-nos inferir o relevante papel terapêutico que o extrato aquoso do cogumelo AbM tem na ação antimicrobiana e pode ser um relevante promissor no desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento de infecções promovidas por microrganismos multirresistentes. Na comparação dos resultados obtidos neste estudo com os dados da literatura (14-16), observa-se a expressividade dos mesmos, uma vez que, a taxa de sobrevida verificada nesta pesquisa com o extrato aquoso do AbM foi superior as demais demonstradas por outros pesquisadores, 60% versus 38% e 25%. Cabe destacar que a administração do extrato do cogumelo AbM foi realizado neste estudo 01 hora após a infecção com a bactéria multirresistente e as outras pesquisas o tratamento com este extrato ocorreu profilaticamente 24 horas antes da indução com os microrganismos analisados.

Outro aspecto importante a ser discutido, é o tipo de extrato do cogumelo utilizado na execução dos procedimentos metodológicos das pesquisas, pois este exerce influência direta nas evidências científicas obtidas. É relevante influência que alguns fatores ambientais e metodológicos podem exercer no tipo e quantidade de compostos bioativos constituintes do AbM como, método de cultivo, condições climáticas e solo, uso do cogumelo *in natura* ou extrato desidratado e seco, tipo de

solvente na extração, metodologia para preparo das soluções, armazenamento (252-254). É importante destacar que os três estudos (14-16) que constataram o efeito antimicrobiano do AbM *in vivo* utilizaram como reagente um extrato aquoso comercializado (Ando San™). Apesar de este produto ser amplamente utilizado pela população japonesa, julga-se que seria extremamente relevante a descrição da composição química deste extrato, o que não ocorreu nas pesquisas que o utilizaram como reagente, para fins de supor quais as prováveis substâncias responsáveis por esta propriedade antibacteriana e nortear pesquisas futuras (255, 256).

Pesquisadores verificaram que extratos de diversos cogumelos apresentam diversas substâncias antimicrobianas representadas pelos compostos de baixo peso molecular que são principalmente metabólitos secundários, tais como: terpenos e outros sesquiterpenos, esteróides, antraquinonas, derivados do ácido benzóico, e quinolinas, mas também os metabólitos primários, como o ácido oxálico. Entretanto, os peptídeos e as proteínas são considerados os principais compostos antimicrobianos de alto peso molecular presentes nos cogumelos. Os dados disponíveis na literatura indicam uma atividade antimicrobiana mais elevada dos extratos de cogumelos, contra bactérias Gram-positivas. Entretanto, nesta pesquisa o cogumelo AbM não foi citado (257).

Atualmente, está bem consolidado na literatura que o basiodimiceto AbM é constituído por diversos compostos bioativos que promovem várias propriedades funcionais, seja atuando isoladamente e/ou sinergicamente, logo seria um dado muito significativo ter o conhecimento de qual(ais) substância(s) ativa(s) exerce(m) a função antimicrobiana. Entretanto, a literatura científica não dispõe de uma resposta concreta sobre qual o composto bioativo constituinte do AbM que exerce esta função e sobre o mecanismo de ação. Mas, dentre as hipóteses sugeridas por alguns pesquisadores destacam alguns compostos, como:  $\beta$ -glucanas (258, 259), substâncias antioxidantes (124, 192, 195, 199, 204, 205), ácido linoléico, ergosterol (103, 260-262), tocoferol (114), compostos fenólicos (263), nucleotídeos e nucleosídeos (264).

Alguns pesquisadores sugerem que a ação antimicrobiana promovida por extratos do cogumelo AbM seria justificada na premissa que  $\beta$ -glucanas estimulam a

síntese e secreção de citocinas por macrófagos (13), principalmente as pró-inflamatórias e ativa o sistema complemento (92). Logo, o AbM contém uma significativa quantidade de  $\beta$ -glucanas (142, 143, 145) que ao estimular o sistema imunológico inato poderiam exercer um efeito antimicrobiano (265, 266).

Hetland e colaboradores (2013) (267) realizaram um estudo de revisão, que visou comparar os efeitos antimicrobianos dos seguintes tipos de polissacarídeos:  $\beta$ -glucanas, pectina e do extrato comercial do cogumelo AbM, Ando San <sup>TM</sup>, sendo este último, o reagente utilizado nas pesquisas de Bernardshaw e colaboradores (2005 e 2006) (14, 15) e Tryggstad e colaboradores (2007) (16). Este extrato destacou-se entre os demais polissacarídeos investigados,  $\beta$ -glucanas e pectina; pois demonstrou maior eficácia na ação antimicrobiana.

A propriedade antimicrobiana das  $\beta$ -glucanas foi comprovada *in vitro* em macrófagos infectados com *M. tuberculosis* (145) e *in vivo*, em camundongos com infecção promovida por *M. bovis* (268).

As  $\beta$ -glucanas promovem a estimulação do sistema imunológico inato por meio da sua ligação com alguns receptores específicos em células do sistema imunológico, como o receptor *toll-like 2* (TLR2), dectina-1 e CD11b/18. Entretanto, os cogumelos podem conter outras substâncias moleculares, além das  $\beta$ -glucanas, que podem similarmente ativar uma resposta imune inata (269).

O mecanismo de ação que justifica os efeitos antimicrobianos resultantes do extrato do cogumelo AbM, Ando San <sup>TM</sup>, pode ser resultante da elevação dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias MIP-2, equivalente a interleucina-8 (IL-8) em humanos, e o TNF- $\alpha$  em camundongos que receberam o extrato do cogumelo AbM (14), ou seja, este efeito protetor promovido pelo AbM provavelmente foi mediado pela imunidade inata.

O estudo com um modelo de peritonite em camundongos (15) verificou que o extrato Ando San <sup>TM</sup> exerceu uma ação antimicrobiana e os pesquisadores sugerem que o mecanismo de ação que justifica esta propriedade, baseia-se na ação inibitória do receptor TLR-4 mediada pela estimulação celular da ativação do NF- $\kappa$ B via TLR-2. Este mecanismo pode explicar a proteção exercida pelo extrato neste modelo de sepse induzida por microrganismo Gram-negativo (270).

Soković e colaboradores (2014) levantam a hipótese de que o mecanismo de ação que justifica a propriedade antimicrobiana promovida pelo cogumelo AbM não baseia-se na estimulação da imunidade inata, mas seria explicada pela indução de anticorpos *quorum sensing* (anti-QS) (271). Compostos de detecção anti-QS demonstram interromper a formação de biofilme e, conseqüentemente tornam as bactérias mais susceptíveis aos antibióticos; e estes compostos também proporcionam a capacidade de reduzir os fatores de virulência da bactéria; bem como promover a eliminação das bactérias em modelos animais (272).

Um estudo investigou a ação do extrato aquoso de AbM sobre os fatores de virulência do sistema *quorum sensing* (QS) e formação de biofilme contra a bactéria *P. aeruginosa*. Os resultados demonstraram que o extrato aquoso do AbM exibiu uma atividade anti-quorum, promovendo efeitos sobre todos os mecanismos testados, como redução na formação do biofilme e motilidade, e diminuição na síntese do pigmento piocianina. Os pesquisadores sugerem que mediante estes dados obtidos o extrato aquoso do AbM pode ser utilizado para prevenir e/ou para controlar o crescimento de *P. aeruginosa* (271).

Dentre os compostos constituintes do AbM, verifica-se a presença do ácido linoléico (211), sendo considerado um dos componentes bioativos responsáveis pela atividade antimicrobiana deste cogumelo (273), pois promove o rompimento das membranas das células bacterianas e ocasiona a lise celular (274).

Apenas uma pesquisa isolou e identificou a substância com ação bactericida *in vitro*, ácido 13-hidroxi-cis-9, trans-11-octadecadienóico (13ZE-LOH) extraído do corpo de frutificação do AbM pelos solventes clorofórmio-metanol (209).

Pesquisadores verificaram que 2,4-di-hidroxibenzóico e ácidos protocatecuico foram os compostos fenólicos com maior atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Além disso, os compostos fenólicos inibiram mais do que os antibióticos utilizados para o tratamento da infecção promovida pela *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (275).

Por outro lado, o AbM contém uma diversidade de outros compostos, como ergosterol (129), outros tipos de ácidos graxos (276), polissacarídeos (277) e

substâncias alcalinas (91), que também podem desempenhar um papel sinergicamente importante na ação antimicrobiana.

No presente estudo observou-se que a administração intraperitoneal dos extratos do cogumelo AbM possibilitou a ação antimicrobiana dos mesmos. Logo, outra questão a ser esclarecida embasada pela teoria científica se refere a qual via de administração dos extratos do AbM empregada que favorece uma maior absorção das substâncias bioativas e que ao mesmo tempo seja a mais natural do ponto de vista humano. Os trabalhos de Bernardshaw e colaboradores (14, 15) e Tryggestand et al. (2007) confirmaram que a administração oral do extrato aquoso de AbM em camundongos promoveu a ação antimicrobiana (16). Contudo, algumas pesquisas em humanos (110, 111) que avaliaram outras propriedades do cogumelo AbM não verificaram nenhum efeito ao administrar o extrato deste fungo por via oral.

O importante papel que as doenças infecciosas assumem no âmbito da saúde pública mundial, devido às suas repercussões negativas em promover o aumento da morbidade e mortalidade do indivíduo acometido, e a elevação dos custos hospitalares, e associado a este cenário, verifica-se um número reduzido de medicamentos disponíveis para o tratamento destas infecções devido ao crescente número de microrganismos multirresistentes aos antibióticos convencionais. Os dados apresentados pela presente pesquisa são os pioneiros a corroborar a ação antimicrobiana do extrato aquoso do AbM em cepa de bactéria multirresistente. Entretanto, verifica-se a relevância no desenvolvimento de mais investigações clínicas no intuito de evidenciar os mecanismos da ação antimicrobiana de extratos do cogumelo AbM, assim como na identificação das substâncias bioativas que exercem essa propriedade terapêutica.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa nos permitem descrever algumas conclusões. A composição centesimal do cogumelo bruto AbM desidratado é similar à dos demais cogumelos, composto por uma elevada quantidade de carboidratos, proteínas e fibras, e a um reduzido teor de lipídios. Os extratos aquoso e metanólico do AbM apresentaram elevada atividade antioxidante. A análise comparativa da quantidade de compostos fenólicos revelou que o extrato metanólico destaca-se em relação ao aquoso, pois tem um valor maior de polifenóis (totais e polimerizados), estéres tartáricos e flavonóis. Nos testes *in vitro*, o extrato metanólico apresentou ação antimicrobiana contra a bactéria multirresistente, *P. aeruginosa*. Os extratos analisados nesta pesquisa na concentração de 350 mg.mL<sup>-1</sup> não evidenciaram atividade hemolítica. Contudo, os extratos aquoso e metanólico reduziram a viabilidade de células RAW 264.7, e não apresentaram atividade imunomodulatória, pois não estimularam essa linhagem celular na secreção de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12. Entretanto, o extrato aquoso na concentração de 20 mg/kg promoveu o aumento significativo da sobrevida de animais com infecção pela bactéria *P. aeruginosa* multirresistente, evidenciando assim, uma ação antimicrobiana relevante. Ressalta-se que sendo este o primeiro estudo a demonstrar que o extrato aquoso do cogumelo AbM pode ser uma opção terapêutica no tratamento de infecções causadas por microrganismos multirresistentes, e associado a escassez de pesquisas científicas que avaliaram esta propriedade deste cogumelo, torna-se relevante a corroboração desta evidência por mais estudos *in vivo* com outros tipos de bactérias.

## REFERÊNCIAS

1. Welsh CA, Flanagan ME, Hoke SC, Doebbeling BN, Hcartheterwaldt L, Agency for Healthcare Research and Quality Hospital-Acquired Infections Collaborative. Reducing health care-associated infections (HAIs): lessons learned from a national collaborative of regional HAI programs. *Am J Infect Control* 2012; 40:29-34.
2. Sprague L. Health care-associated infections: is there an end in sight? *Issue Brief Natl Health Policy Forum* 2009.
3. Klevens RM, Edwards JR, Richards CL, Jr., Horan TC, Gaynes RP, Pollock DA, et al. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep* 2007; 122:160-6.
4. Aly NYA, Al-Mousa HH, Al-Asar ESM. Nosocomial Infections in a Medical-Surgical Intensive Care Unit. *Med Princ Pract.* 2008;17:373–377.
5. Ott E, Saathoff S, Graf K, Schwab F, Chaberny IF. The Prevalence of Nosocomial and Community Acquired Infections in a University Hospital. An Observational Study. *Dtsch Arztebl Int* 2013; 110(31–32): 533–40
6. Sommer R, Joachim I, Wagner S, Titz A. New approaches to control infections: anti-biofilm strategies against gram-negative bacteria. *Chimia (Aarau).* 2013;67(4):286-90.
7. Ranji SR, Steinman MA, Shojania KG, Gonzales R. Interventions to reduce unnecessary antibiotic prescribing: a systematic review and quantitative analysis. *Med Care* 2008; 46:847-62.
8. Ho J, Tambyah PA, Paterson DI. Multiresistant Gram-negative infections: a global perspective. *Curr Opin infect Dis.* 2010;23(6):546-53.
9. Kollef MH. Gram-negative bacterial resistance: evolving patterns and treatment paradigms. *Clin. Infect. Dis.* 2005;15,40 (Suppl 2):85-88.

10. Bratu S, Quale J, Cebular S, Heddurshetti R. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, New York: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B. *European J Clin Microbiol & Infect Dis*. 2005; 24,3:196-201.
11. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwartz D, Tarabeia J, Fefer I, Schwaber MJ. Surveillance cultures and duration of carriage of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2007;45(5):1551-1555.
12. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Op in Microbiol*. 2000;3:489-495.
13. Sorimachi K, Akimoto K, Ikehara Y, Inafuku K, Okubo A, Yamazaki S. Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions in vitro. *Cell Struct Funct*. 2001;26:103–8.
14. Bernardshaw S, Johnson E, Hetland G. An extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill administered orally protects against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Scand J Immunol*. 2005;62:393–8.
15. Bernardshaw S, Hetland G, Grinde B, Johnson E. An extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murill protects against lethal septicemia in a mouse model for fecal peritonitis. *Shock*. 2006;24:319–20.
16. Tryggestad AMA, Espevik T, Forland DT, Ryan L, Hetland G. The Medical Mushroom *Agaricus blazei* Murill Activates NF-κB via TLR2. 13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro, 2007: P2.23 INI-02 Signalling pathways of innate immune receptors; P1193.
17. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host Interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:1209–1223.
18. Tsitsopoulos PP, Iosifidis E, Antachopoulos C, Anestis DM, Karantani E, Karyoti A, Papaevangelou G, Kyriazidis E, Roilides E, Tsonidis C. Nosocomial bloodstream infections in neurosurgery: a 10-year analysis in a center with high antimicrobial drug-resistance prevalence. *Acta Neurochir (Wien)*. 2016.

19. Suwantarat N, Carroll KC. Epidemiology and molecular characterization of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in Southeast Asia. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2016; 5:15.
20. Kaye KS, Stockwell RE, Bell SC, Kidd TJ. Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management. *Pharmacotherapy*. 2015;35(10):949-62.
21. Buhl M, Peter S, Willmann M. Prevalence and risk factors associated with colonization and infection of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review. *Expert Rev Respir Med*. 2016 May;10(5):505-19.
22. Labarca JA, Salles MJ, Seas C, Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit. Rev. Microbiol*. 2016;42(2):276-92.
23. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect*. 2006;36:78–91.
24. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, et al. *Genetic adaptation by Pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients*. *P Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 8487–8492.
25. Hogardt M, Heesemann J. *Adaptation of Pseudomonas aeruginosa during persistence in the cystic fibrosis lung*. *Int J Med Microbiol*. 2010; 300: 557–562.
26. Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis*. 2013; 67(3):159-73.
27. Miao EA, Andersen-Nissen E, Warren SE, Aderem A. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol*. 2007; 29: 275–288.
28. Kohler T, Curty LK, Barja F, van Delden C, Pechere J. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol*. 2000; 182: 5990–5996.

29. Yeung AT, Torfs EC, Jamshidi F, Bains M, Wiegand I, Hancock RE, Overhage J. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR. *J Bacteriol.* 2009; 191: 5592–5602.
30. Craig L, Pique ME, Tainer JA. Type 4 pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2: 363–378.
31. Sriramulu DD, Lünsdorf H, Lam JS, Römling U. Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *J Med Microbiol.* 2005; 54: 667–676.
32. Kelly NM, Kluffinger JL, Pasloske BL, Paranchych W, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa* pili as ligands for nonopsonic phagocytosis by fibronectin-stimulated macrophages. *Infect Immun.* 1989; 57: 3841–3845.
33. Hauser AR. The type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7: 654–665.
34. Shaver CM, Hauser AR. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun.* 2004; 72: 6969–6977.
35. Deep A, Chaudhary U, Gupta V. Quorum sensing and bacterial pathogenicity: from molecules to disease. *J Lab Physicians.* 2011; 3: 4–11.
36. Heeb S, Fletcher MP, Chhabra SR, Diggle SP, Williams P, Cámara M. Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011; 35: 247–274.
37. Veessenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T, Rello J. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Crit Care Med.* 2009; 37(5):1777–1786.
38. Juhas M, Eberl L, Tummeler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol.* 2005;7:459–471.
39. Bjarnsholt T, Tolker-Nielsen T, Hoiby N, Givskov M. Interference of *Pseudomonas aeruginosa* signalling and biofilm formation for infection control. *Expert Rev Mol Med.* 2010; 12: e11.
40. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol.* 2009; 11: 1034–1043.

41. Lieleg O, Caldara M, Baumgartel R, Ribbeck K. Mechanical robustness of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Soft Matter*. 2011; 7: 3307–3314.
42. Mah TC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001; 9: 34–39.
43. Engel LS, Hill JM, Moreau JM, Green LC, Hobden JA, O'Callaghan RJ. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV produces corneal damage and contributes to bacterial virulence. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998; 39: 662–665.
44. de Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun*. 2000; 68: 4839–4849.
45. King JD, Kocincova D, Westman EL, Lam JS. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immun*. 2009; 15: 261–312.
46. Lam JS, Taylor VL, Islam ST, Hao Y, Kocincova D. Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Front Microbiol*. 2011; 2: 1–25.
47. Schultz MJ, Speelman P, Zaat SAJ, Hack CE, van Deventer SJH, Poll TVD. The effect of *Pseudomonas* exotoxin A on cytokine production in whole blood exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2000; 29:227-232.
48. Wolf P, Elsässer-Beile U. *Pseudomonas exotoxin A*: from virulence factor to anti-cancer agent International. *J Med Microbiol*. 2009; 299: 161–176.
49. Du X, Youle RJ, FitzGerald DJ, Pastan I. *Pseudomonas exotoxin A*-mediated apoptosis is Bak dependent and preceded by the degradation of Mcl-1. *Mol Cell Biol*. 2010; 30: 3444–3452.
50. Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med*. 2004; 10: 599–606.
51. Bianchi SM, Prince LR, McPhillips K, et al. Impairment of apoptotic cell engulfment by pyocyanin, a toxic metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 177: 35–43.
52. Long Q, Huang C, Liao P, Xie J. Proteomic insights into *Acinetobacter baumannii* drug resistance and pathogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*.. 2013;23(3):227-55.

53. Chatterjee SS, Otto M. Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. *Clinical Epidemiology*. 2013;5:205–217.
54. Juan NC, Oliver A. Carbapenemases in *Pseudomonas* spp. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28 Suppl1:19-28.
55. Moore NM, Flaws ML. Antimicrobial resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Lab Sci*. 2011; 24(1):47-50.
56. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*. 2009; 58(Pt 9):1133-48.
57. Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plésiat P. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(5):1797-802.
58. Lomovskaya O, Warren M, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, Cho D, Chamberland S, Renau T, Leger R, Hecker S, Watkins W, Hoshino K, Ishida H, Lee VJ. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(1):105-16.
59. Mima T, Joshi S, Gomez-Escalada M, Schweizer HP. Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. *J Bacteriol*. 2007;189(21):7600-9.
60. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22(4): 582-610.
61. Breidenstein EB, de La Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol*. 2011;19(8):419-26
62. Aeschlimann JR. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Pharmacotherapy*. 2003; 23(7):916-24.

63. Neves PR. Alterações da permeabilidade e expressão de bombas de efluxo em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenem. 2010. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
64. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(1): 20-51.
65. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis.* 2002; 34: 634–640.
66. Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res.* 2003; 2: 48–62.
67. Jacoby, G. A. AmpC beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009; 22:161-82.
68. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. *N Engl J Med.* 27-1-2005;352(4):380-91.
69. Héritier C, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(1): 268-73.
70. Poirel L. *et al.* Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. OXA-58, a novel class D  $\beta$ -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(1):202-8.
71. European Antimicrobial Resistance Surveillance System. EARSS Annual report 2008.
72. Ribeiro VL. Produção de *Agaricus blazei* Murril no Brasil. Anais do 1º. Simpósio Internacional sobre cogumelos, alimentação, saúde, tecnologia e meio ambiente no Brasil. Brasília: Ed. Urben AF, Santos JKP, Oliveira HCB. Embrapa, agosto 2003.p.71-6.
73. Furlani RPZ, Godoy HT. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2005;64(2):149-154.

74. Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* murrill: review of literature and pharmaco-toxicological problems. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2008;5(1):3–15.
75. Braga GC. Productivity *Agaricus blazei* Murril in relation to the cultivation environment, the substratemass and the casing layer. Botucatu: Departamento de Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Unesp, p. 73, 1999. (Tese de Doutorado).
76. Eira AF, Braga GC. Manual do cultivo do “champignon” (*Agaricus spp*). Botucatu, SP: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1997. 45p.
77. Braga GC, Eira AFL, Celson GP, et al. Manual de cultivo de *Agaricus blazei* Murril “cogumelo do sol”. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1998. 44p.
78. Wasser SP, Didukh MY, De Amazonas MAL, Nevo E, Stamets P, Da Eira AF. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun *Agaricus* (the Himematsutake Mushroom) indeed *ABM*? *Intern J of Med Mushrooms*. 2002;4:267–90.
79. Manzi P, Gambelli L, Marconi S, Vivanti V, Pizzoferrato L. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food chemistry*. 1999;65:477-482.
80. Bellini MF, Giacomina NL, Eirab AF, Ribeiroc LR, Mantovania MS. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* in CHO-k1 cells, studying different developmental phases of the mushroom. *Toxicology in vitro*. 2003;17:465–469.
81. Luiz RC, Jordão BQ, da Eira AF, Ribeiro LR, Mantovani MS. Mechanism of anticlastogenicity of *Agaricus blazei* Murill mushroom organic extracts in wild type CHO (K(1)) and repair deficient (xrs5) cells by chromosome aberration and sister chromatid exchange assays. *Mutat Res*. 2003;528(1-2):75-9.

82. Matuo R, Oliveira RJ, Silva AF, Mantovani MS, Ribeiro LR. Anticlastogenic Activity of Aqueous Extract of *Agaricus blazei* in Drug-Metabolizing Cells (HTCs) During Cell Cycle. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2007;17(3):147-52.
83. Menoli RC, Mantovani MS, Ribeiro LR, Speit G, Jordão BQ. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. *Mutat Res*. 2001;496(1-2):5-13.
84. Delmanto RD, de Lima PL, Sugui MM, da Eira AF, Salvadori DM, Speit G, Ribeiro LR. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutat Res*. 2001;496(1-2):15-21.
85. Martins de Oliveira J, Jordão BQ, Ribeiro LR, Ferreira da Eira A, Mantovani MS. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murrill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(12):1775-80.
86. Rodrigues SB, Jabor IAS, Marques-Silva GG, Rocha CLMSC. Avaliação do potencial antimutagênico do Cogumelo do Sol (*Agaricus blazei*) no sistema *methG1* em *Aspergillus (=Emericella) nidulans*. *Acta Scientiarum. Agronomy, Maringá*, 2003;25(2):513-517.
87. Souza-Paccola EA, Bomfeti CA, Favaro LCL, Fonseca ICB, Paccola-Meirelles LD. Antimutagenic action of *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* on *Aspergillus nidulans* conidia. *Braz. J. Microbiol*. 2004;35(4):311-315.
88. Gutierrez ZR, Mantovani MS, Eira AF, Ribeiro LR, Jordão BQ. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill in vitro. *Toxicol In Vitro*. 2005;19(4):533-9.
89. Machado MP, Filho ER, Terezan AP, Ribeiro LR, Mantovani MS. Cytotoxicity, genotoxicity and antimutagenicity of hexane extracts of *Agaricus blazei* determined in vitro by the comet assay and CHO/HGPRT gene mutation assay. *Toxicol Mech Methods*. 2007;17(3):147-52.
90. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:850–61.

91. Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, Yadomae T. Antitumor beta glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. *Biol. Pharmac. Bull.* 2001;24:820-828.
92. Shimizu S, Kitada H, Yokota H, Yamakawa J, Murayama T, Sugiyama K, et al. Activation of the alternative complement pathway by *Agaricus blazei* Murill. *Phytomedicine.* 2002;9:536–45.
93. Kaneno R, Fontanari LM, Santos SA, Di Stasi LC, Rodrigues Filho E, Eira AF. Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice. *Food Chem Toxicol.* 2004;42:909–16.
94. Takimoto H, Wakita D, Kawaguchi K, Kumazawa Y. Potentiation of cytotoxic activity in naïve and tumor-bearing mice by oral administration of hot-water extracts from *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Biol Pharm Bull* 2004;27(Suppl 3):S404-06.
95. Kasai H, He LM, Kawamura M, Yang PT, Deng XW, Munikanta M, et al. IL-12 Production Induced by *Agaricus blazei* Fraction H (ABH) Involves Toll-like Receptor (TLR). *Evid Based Complement Alternat Med.* 2004;1:259–67.
96. Kawamura M, Kasai H, He L, Deng X, Yamashita A, Terunuma H, et al. Antithetical effects of hemicellulase-treated *Agaricus blazei* on the maturation of murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology.* 2005;114:397–409.
97. Ellertsen LK, Hetland G, Johnson E, Grinde B. Effect of a medicinal extract from *Agaricus blazei* Murill on gene expression in a human monocyte cell line as examined by microarrays and immuno assays. *Int Immunopharmacol* 2006;6(Suppl 2):S133-43.
98. Yuminamochi E, Koike T, Takeda K, Okumura IHK. Interleukin-12- and interferon- $\gamma$ -mediated natural killer cell activation by *Agaricus blazei* Murill. *Immunology.* 2007;121:197–206
99. Smiderle FR, Ruthes AC, van Arkel J, Chanput W, Iacomini M, Wichers HJ, Van Griensven LJ. Polysaccharides from *Agaricus bisporus*

- and *Agaricus brasiliensis* show similarities in their structures and their immunomodulatory effects on human monocytic THP-1 cells. *BMC Complement Altern Med.* 2011;11:58.
100. Kimura Y, Kido T, Takaku T, Sumiyoshi M, Baba K. Isolation of an anti-angiogenic substance from *Agaricus blazei* Murill: its antitumor and antimetastatic actions. *Cancer Sci.* 2004;95:758–64.
  101. Kobayashi H, Yoshida R, Kanada Y, Fukuda Y, Yagyu T, Inagaki K, Kondo T, Kurita N, Suzuki M, Kanayama N, Terao T. Suppressing effects of daily oral supplementation of  $\beta$ -glucan extracted from *Agaricus blazei* Murill on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in mouse model. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005;131:527–38.
  102. Kawamura M, Kasai H. Delayed Cell Cycle Progression and Apoptosis Induced by Hemicellulase-Treated *Agaricus blazei*. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2007;4(1):83 – 94.
  103. Gao L, Sun Y, Chen C, Xi Y, Wang J, Wang Z. Primary mechanism of apoptosis induction in a leukemia cell line by fraction FA-2- $\beta$ -ss prepared from the mushroom *Agaricus blazei* Murill. *Braz J Med Biol Res.* 2007;11:1545–55.
  104. Ishii PL, Prado CK, Mauro Mde O, Carreira CM, Mantovani MS, Ribeiro LR, Dichi JB, Oliveira RJ. Evaluation of *Agaricus blazei* in vivo for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2011;59(3):412-22.
  105. Izawa S, Inoue Y. A screening system for antioxidants using thioredoxin-deficient yeast: discovery of thermostable antioxidant activity from *Agaricus blazei* Murill. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;64(4):537-42.
  106. Ker YB, Chen KC, Chyau CC, Chen CC, Guo JH, Hsieh CL, Wang HE, Peng CC, Chang CH, Peng RY. Antioxidant capability of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *Agaricus blazei* mycelia. *J Agric Food Chem.* 2005;53(18):7052-8.
  107. Oliveira OMM, Fernandes AS. Avaliação da capacidade antioxidante de frações orgânicas de cogumelo *Agaricus blazei* Murril e estudos das enzimas

- de peroxidase e polifenoxidase. Colombo, 2006. p. 76 (Embrapa Florestas. Documento, 183).
108. Cordeiro VR, Bach EE. Peroxidase and poliphenoxidase differentiated fungi *Agaricus* and *Ganoderma*. Colombo, 2006. p. 115 (Embrapa Florestas. Documento, 183).
109. Carneiro AA, Ferreira IC, Dueñas M, Barros L, da Silva R, Gomes E, Santos-Buelga C. Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. *Food Chem.* 2013;138(4):2168-73.
110. Johnson E, Forland DT, Saetre L, Bernardshaw SV, Lyberg T, Hetland G. Effect of an extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on release of cytokines, chemokines and leukocyte growth factors in human blood *ex vivo* and *in vivo*. *Scand J Immunol.* 2009;69(3):242-250.
111. Lima CUJO, Souza VC, Morita MC, Chiarello MD, Karnikowski MGO. *Agaricus blazei* Murrill and inflammatory mediators in elderly women: a randomized clinical trial. *Scandinavian Journal of Immunology.* 2012;75:336–341.
112. Dalla Santa HS, Rubel R, Vitola FMD, Leifa F, Tararthuch AL, Lima Filho CJH, Figueiredo BC, Dalla Santa OR, Raymundo MS, Habu S, Soccol CR. Kidney Function Indices in Mice after Long Intake of *Agaricus brasiliensis* Mycelia (= *Agaricus blazei*, *Agaricus subrufescens*). Produced by Solid State Cultivation). *OnLine Journal of Biological Sciences.* 2009; 9 (1): 21-28.
113. Izawa S, Inoue YA. A screening system for antioxidants using thioredoxin-deficient yeast: discovery of thermostable antioxidant activity from *Agaricus blazei* Murill. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004;64(4):537-542.
114. Tsai S, Tsai H, Mau J. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. *Lebensm. Wiss. Technol.* 2007;40(8):1392-1402.

115. Baydar N.G.; Sagdic, O.O.E.E.; Ozkan, G.; Cetin, S. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2006, 41, 799–804.
116. Martin JG. Atividade antimicrobiana de produtos naturais: erva-mate e resíduos agroindustriais. 98f. Dissertação de mestrado apresentada a Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP - Piracicaba, 2011.
117. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2012; 23, 174–181.
118. Carneiro AA, Ferreira IC, Dueñas M, Barros L, da Silva R, Gomes E, Santos-Buelga C. Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. *Food Chem.* 2013;138(4): 2168-73.
119. Camelini CM, Maraschin M, Mendonça MM, Zucco C, Ferreira AG, Tavares LA. Structural characterization of  $\beta$ -glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products. *Biotechnol. Lett.* 2005;27(17):1295-1299.
120. Ker YB, Chen KC, Chyau CC, Chen CC, Guo JH, Hsieh CL, Wang HE, Peng CC, Chang CH, Peng RY. Antioxidant capability of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *Agaricus blazei* mycelia. *J. Agric. Food. Chem.* 2005;53(18):7052-7058.
121. Di Naso FC, de Mello RN, Bona S, Dias AS, Porawski M, Ferraz Ade B, Richter MF, Marroni NP. Effect of *Agaricus blazei* Murill on the pulmonary tissue of animals with streptozotocin-induced diabetes. *Exp Diabetes Res.* 2010;2010:543926.
122. Wu MF, Hsu YM, Tang MC, Chen HC, Chung JG, Lu HF, Lin JP, Tang NY, Yeh C, Yeh MY. *Agaricus blazei* Murill extract abrogates CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. *In Vivo.* 2011;25(1):35-40.
123. Al-Dbass AM, Al- Daihan SK, Bhat RS. *Agaricus blazei* Murill as an efficient hepatoprotective and antioxidant agent against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 2012;19:303–309.

124. Hakime-Silva RA, Velloso JCR, Khalil NM, Khalil OAK, Brunetti IL, Oliveira OMMF. Chemical, enzymatic and cellular antioxidant activity studies of *Agaricus blazei* Murrill. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 2013; 85(3):1073-1081.
125. Mourão F, Umeo SH, Takemura OS, Linde GA, Colauto NB. Antioxidant activity of *Agaricus brasiliensis* basidiocarps on different maturation phases. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011;42:197-202.
126. Song Z, Nes WD. Sterol Biosynthesis Inhibitors: Potential for Transition State Analogs and Mechanism-Based Inactivators Targeted at Sterol Methyltransferase. *Lipids*. 2007;42:15-33.
127. Souza W, Rodrigues JCF. Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2009; 2009:1-19.
128. Galvão JG, Guerreiro MC, Souza JA, Coura SMC. Uso do fungo *Fusarium oxysporum* como indicador de ametrina, através da medida de biomassa, pela quantificação de ergosterol. *Ciência e Agrotecnologia*. 2003;27(4):840-845.
129. Takaku T, Kimura Y, Okuda H. Isolation of an Antitumor Compound from *Agaricus blazei* Murrill and Its Mechanism of Action. *J. Nutr.* 2001;131(5):1409-1413.
130. Zohuriaan MJ, Shokrolahi F. Thermal studies on natural and modified gums. *Polymer Testing, Essex*. 2004;23(5):575-579.
131. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger, princípios de bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
132. Gutiérrez A, Prieto A, Martínez AT. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus, *Pleurotus*. *Carbohydrate Research*. 1996;281(1):143-154.
133. Freimund S, Sauter M, Käppeli O, Dutler HA. New non-degrading isolation process for 1,3- $\beta$ -Dglucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Polymers*. 2003;54(2):159-171.

134. Corradi da Silva ML, Martinez PF, Izeli NL, Silva IR, Vasconcelos FD, Cardoso MS. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. *Química Nova*. 2006;29(1):85-92.
135. Zhang L, Li X, Xu X, Zeng F. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentin. *Carbohydrate Research*. 2005;340(8):1515-1521.
136. Leung MYK, Liub C, Koon JCM, Fung KP. Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology Letters*. 2006;105(2):101–114.
137. Douglas CM. Fungal  $\beta$ - (1→3)-D-Glucan synthesis. *Medical Mycology*. 2001; Supl. 1:55-66.
138. Angeli JPF, Ribeiro LR, Bellini MF, Mantovani MS.  $\beta$ -Glucan extracted from the medicinal mushroom *Agaricus blazei* prevents the genotoxic effects of benzo[a]pyrene in the human hepatoma cell line HepG2. *Arch. Toxicol*. 2008:1-6. Australian Bureau of Statistics. Causes of death, Australia, 1997. ABS Catalogue n. 3303.0. Belconnen: Australian Bureau of Statistics; 1999.
139. Ishibashi K, Miura NN, Adachi Y, Ohno N, Yadomae T. Relationship between solubility of Grifolan, a fungal 1,3- $\beta$ - D -glucan, and production of Tumor Necrosis Factor by macrophages in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2001;65: 1993-2000.
140. Brown GD, Gordon S. Fungal  $\beta$ -glucans and mammalian immunity. *Immunity*. 2003;19:311-315.
141. Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, Gordon S, Wong SY: Dectin-1 is a major  $\beta$ -glucan receptor on macrophages. *J Exp Med*. 2002;196:407Y412.
142. Hetland G, Ohno N, Aaberg IS, Lovik M. Protective effect of  $\beta$  -glucan against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2000; 27:111-116.

143. Godshall CJ, Scott MJ, Burch PT, Peyton JC, Cheadle WG: Natural killer cells participate in bacterial clearance during septic peritonitis through interactions with macrophages. *Shock*. 2003;19:144Y149.
144. Chihara G: Recent progress in immunopharmacology and therapeutic effects of polysaccharides. *Dev Biol Stand*. 1992;77:191Y197.
145. Hetland G, Sandven P: " $\beta$ -1,3 glucan reduces growth of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophage cultures. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002; 33:41Y45.
146. Roeder A, Kirshning CJ, Rupec RA, Schaller M, Weindl G, Korting HC: Toll-like receptors as key mediators in innate fungal immunity. *Med Mycol*. 2004; 42:485Y498.
147. Tsujimoto H, Ono S, Majima T, Kawarabayashi N, Takayama E, Kinoshita M, Seki S, Hiraide H, Moldawer LL, Mochizuki H: Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis. *Shock*. 2005; 23: 39Y44.
148. AOAC-Association of Official and Agricultural Chemistry. *Official Methods of Analysis*. Washington, D.C, USA. 1993.
149. AOAC-Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. Washington, DC, USA. 1995.
150. AOAC-Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Gaitheersburg, USA. 1997.
151. AOAC. Association Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of the Association Chemist*. Washington, DC, USA. 2002.
152. Cecchi HM. *Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos*. Universidade Estadual de. Campinas. Editora UNICAMP, 2ª edição. SP. 2003.
153. Paronetto L. *Polifenoli e Tecnica Enologica*. Selepress: Milan, 1977.p.101-132.
154. Glories Y. *La couleur des vins rouges. 2ème partie mesure, origine et interpretation*. *Connaissance de la Vigne et du Vin*. 1984;18:253-271.

155. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1965;16:144-158.
156. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999; 26:1231-1237.
157. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, London, 1995;28:25-30.
158. Brown GS, Betty RG, Brockmann JE, Lucero DA, Souza CA, Walsh KS, Boucher RM, Tezak MS, Wilson MC, Rudolph T, Lindquist HD, Martinez KF. Evaluation of rayon swab surface sample collection method for *Bacillus* spores from nonporous surfaces. *Journal of Applied Microbiology*. 2007;103:1074-1080.
159. National Committee for clinical laboratory standards. *Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada*. 8. ed. [S.I.]: NCCLS, 2003.
160. Lima TB, Silva ON, Oliveira JT, Vasconcelos IM, Scalabrin FB, Rocha TL, Grossi-de-Sá MF, Silva LP, Guadagnin RV, Quirino BF, Castro CF, Leonardecz E, Franco OL Identification of *E. dysenterica* laxative peptide: a novel strategy in the treatment of chronic constipation and irritable bowel syndrome. *Peptides*. 31(8):1426-33, 2010.
161. Lopes-Abarratequi C, Alba A, Silva ON, Reyes-Acosta O, Vasconcelos IM, Oliveira JT, Migliolo L. Functional characterization of a synthetic hydrophilic antifungal peptide derived from the marine snail *Cenchritis muricatus*. *Biochimie*. 2012;94:968-974.
162. Abelson HT, Rabstein LS. Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res*. 1970. 30(8): 2213-22.

163. Ramamoorthy L, Tizard IR. Induction of apoptosis in a macrophage cell line RAW 264.7 by acemannan, a  $\beta$ -(1,4)-acetylated mannan. *Molecular Pharmacology*. 1998. 53(1):415-421.
164. Ribeiro Sobrinho AP, de Melo Maltos SM, Farias LM, de Carvalho MA, Nicoli JR, de Uzeda M, Vieira LQ. Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17(6):344-53.
165. Kurien BT, Scofield RH. Western Blotting. *Methods* 2006. 38:283-93.
166. Okuyama-Nishida Y, Akiyama N, Sugimori G, Nomura K, Ogawa K, Homma KJ, Kazuhisa S, Tsujimoto M, Natori S. Prevention of Death in Bacterium-Infected Mice by a Synthetic antimicrobial Peptide, L5, through Activation of Host Immunity. *Antimicrob. Agents chemother*. 2009;53(6):2510.
167. Mayer L, Mullaly SC, Kindrachuk J, Waldbrook H, Elliott MR, Easton DM, Mayer ML, Mullaly SC, Kindrachuk J, Jenssen H, Hancock RE. Synthetic Cationic Peptide IDR-1002 provides protection against bacterial infections through chemokine induction and enhanced leukocyte recruitment. *J Immunol*. 2010;184:2539-255.
168. Miranda AM. Estudo do potencial hipocolesterolêmico e antioxidante do *Agaricus blazei* (cogumelo do sol) em modelo de hipercolesterolemia induzida por dieta em ratos. Dissertação de Mestrado. 137f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal Ouro Preto, Minas Gerais, 2011.
169. Stefanello FS. Avaliação da atividade antioxidante do cogumelo do sol (*Agaricus blazei* Murril) e sua aplicação em linguiça. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2013.
170. Helm CV, Coradin JH, Kestring DR. Evaluation of Chemical Composition of the Edible Mushroom *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus bisporus portobello*, *Pleorotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. Technical Communication -Embrapa. 2009, 235 p.

171. Shibata CKR, Demiate IM. Cultivo e análise da composição química do cogumelo do sol (*Agaricus blazei murrill*). Publ, UEPG Ci. Biol. Saúde. 2003; 9(2): 21-32.
172. Monteiro CS, Kalluf V, Penteadó PTPS, Waszczyński N, Freitas RJS, Stertz SC. Caracterização química do cogumelo *Agaricus blazei* Murril. Visão acadêmica. 2005; 6(1):7-13.
173. Tsai SY, Tsai H, Mau JL. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. Food Chem. 2008; 107 (3):977-83.
174. Alliatti C. Enriquecimento nutricional no cultivo do *Agaricus blazei* com ferro e zinco e elaboração de preparação alimentícia com a farinha do cogumelo. 99f. Dissertação (Mestrado em Ambiente e Desenvolvimento) – Centro Universitário Univates, Lajeado, Minas Gerais, 2014.
175. Chang ST, Buswell JA. Mushrooms nutraceuticals. Word journal Microbiology & Biotechnology. 1996; 12:473-476.
176. Oliveira ECM, Oliveira ER, Lima LCO, Boas EVBV. Composição centesimal do cogumelo do sol (*Agaricus blazei*). R. Uni. Alfenas. 1999; 5:169-172.
177. Mau JL, Lin HC, Chen CC. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002; 50, 6072e6077.
178. Eira AF. Importância dos cogumelos. *Cultivo do Cogumelo Medicinal Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al). Viçosa: Aprenda Fácil Editora, 2003; 398 p.
179. Mello VD, Laaksonen, DE. Fibras na dieta: tendências atuais e benefícios à saúde na síndrome metabólica e no diabetes melito tipo 2. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. 2009; 53(5): 509-518.

180. Mizuno, T. Medicinal properties and clinical effects of culinary-medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill (Agaricomycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2002; 4:299-312.
181. Monteiro CS, Kalluf V, Penteado PTPS, Waszczynskyj N, Freitas RJS, Stertz SC. Caracterização química do cogumelo *agaricus blazei* Murril. *Visão Acadêmica*. 2005; 6:7-13.
182. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 272, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis.
183. Pedroso A, Tamai F. Análise e composição química do *Agaricus Blazei Murril*. Apostila de estudo da USP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2001.
184. Soares AA. Atividade antioxidante e compostos fenólicos do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Maringá, PR, 2007.
185. Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet*, 2000;355:1179e1180.
186. Babar N, Oberoi HS, Uppal DS, Palil RT. Total phenolic and antioxidant capacity of extracts obtained from six important residues. *Food Research International*, 2011; 44, 391e396.
187. Dimitrios B. Sources of natural phenolics antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, 2006; 17, 505e512.
188. Wong JY, Chye FY. Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2009; 22, 269e277.
189. Gulcin I, Elmastas M, Aboul-Enein HY. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) assayed by different methodologies. *Phytother Res*. 2007;21(4):354-61.
190. Kim MY, Seguin P, Ahn JK, Chun SC, Kim EH, Seo SH, Kang EY, Kim SL, Park YJ, Ro HM, Chung IM. Phenolic compound concentration and

- antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *J Agric Food Chem.* 2008;56(16):7265-70.
191. Costa JV, Novaes, MRCG, Asquiere ER. Chemical and Antioxidant Potential of *Agaricus sylvaticus* Mushroom Grown in Brazil. *J Biomed Bioanal* 2011; 3 (2): 49-54.
192. Carvajal AESS, Koehnlein EA, Soares AA, Eler GJ, Nakashima ATA, Bracht A, Peralta RM. Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (*A. blazei*) and their antioxidant properties. *LWT- Food Science and Technology.* 2012; 46(2):493-499.
193. Chun SS, Vatter DA, Lin YT, Shetty K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry.* 2005; 40:809-816.
194. Vaz JA, Heleno SA, Martins A, Almeida GM, Vasconcelos MH, Ferreira ICFR. Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: in vitro antioxidant activity and growth inhibition of human tumour cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 2010; 48, 2881e2884.
195. Mourão F, Harue HS, Seiko TO, Linde AL, Barros CN. Antioxidant Activity of *Agaricus brasiliensis* Basidiocarps on Different Maturation Phases. *Braz J Microbiol.* 2011; 42(1):197-202.
196. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2004; 94(3):223-253.
197. Jayaraman P, Sakharkar MK, Lim CS, Tang TH, Sakharkar KR. Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa in vitro*. *Int. J. Biol. Sci.* 2010, 6, 556–568.
198. Vargas PN, Hoelzel SC, Rosa CS. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. *Alimentos e Nutrição.* 2008. 19: 11-15.

199. Silva AC, Oliveira MC, Del-Re LW, George. Use of the mushroom extracts natural antioxidant in soybean oil. *Science and Agrotechnology* 2009; 33: 1103-1108.
200. Al-Fatimi M, Schroder G, Kreisel H, Lindequist U. Biological activities of selected basidiomycetes from Yemen. *Pharmazie*. 2013; 68(3):221-6.
201. Yamanaka D, Motoi M, Ohno N. Differences in antioxidant activities of outdoor- and indoor-cultivated *Agaricus brasiliensis*, and protective effects against carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice. *BMC Complement Altern Med*. 2014; 14: 454.
202. Gulçin I. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2010; 11: 210-218.
203. Fernandes AS. Avaliação da capacidade antioxidante de frações orgânicas do cogumelo *Agaricus blazei* Murril e purificação parcial de peroxidase e polifenoloxidase. 72f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2006.
204. Jia S, Li F, Liu Y, Ren H, Gong G, Wang Y, Wu S. Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murrill. 2013; 62:66-9.
205. Wu S, Li F, Ren H, Gong G, Wang Y, Ly Z, Liu Y. Drying effects on the antioxidant properties of polysaccharides obtained from *Agaricus blazei* Murrill. *Carbohydr Polym*. 2014;103:414-7.
206. Kayashima T, Katayama T. Oxalic acid is available as a natural antioxidant in some systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002; 1573, 1e3.
207. Valentão P, Lopes G, Valente M, Barbosa P, Andrade PB, Silva BM, et al. Quantitation of nine organic acids in wild mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005; 53, 3626e3630.

208. Percário S, Naufal AS, Gennari MS, Gennari JL. Antioxidant activity of edible mushroom blushing wood, *Agaricus sylvaticus* Schaeff. (Agaricomycetidae) *in vitro*. Int J Med Mush 2009; 11: 133-140.
209. Osaki Y, Kato T, Yamamoto K, Okubo J, Miyazaki T. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a Basidiomycete *Agaricus blazei*, Jun-17. Yakugaku Zasshi.1994;114(5):342-50.
210. Lund RG, Del Pino FAB, Serpa R, Nascimento JS, Silva VM, Ribeiro GA, Rosalen PL. *Agaricus brasiliensis* against mutans streptococci. Pharmaceutical Biology. 2009; 47(9): 910-915
211. Mazzutti S, Ferreira SRS, Riehl CAS, Smania Jr. A, Smania FA, Martínez J. Supercritical fluid extraction of *Agaricus brasiliensis*: antioxidant and antimicrobial activities. The Journal of Supercritical Fluids. 2012, 70:48-56.
212. Stojkovic D, Reis FS, Glamoclija J, Ciric A, Barros L, Van Griensven LJ, Ferreira IC, Sokovic M. Cultivated strains of *Agaricus bisporus* and *A. brasiliensis*: chemical characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial properties for the final healthy product--natural preservatives in yoghurt. 2014; 25;5(7):1602-12.
213. Zhu-qiu Y, Zhang Y. Study of antibacterial effects of *Agaricus blazei*. J. Food Science. 2001; 22 (04):84-87.
214. Koneman EW, Allen SE, Janda WM, Schreckenberger PD, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas Color, 5th ed., Panamericana, Buenos Ayres, 1999.
215. Wang YS, He HP, Yang JH, Di YT, Hao XJ. New Monoterpenoid coumarins from *Clausena anisum-olens*. Molecules. 2008; 13:931-7.
216. Valadares DG, Duarte MC, Oliveira JS, Chávez-Fumagalli MA, Martins VT, Costa LE, Leite JP, Santoro MM, Régis WC, Tavares CA, Coelho EA. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. Parasitol Int. 2011;60(4):357-63.

217. Orsine JVC, Costa RV, Silva RC, Santos MFMA, Novaes MRCG. The acute cytotoxicity and lethal concentration (LC50) of *Agaricus sylvaticus* through hemolytic activity on human erythrocyte. *Int J Nutr Met.* 2012; 4(11), 19-23.
218. Oga S. *Fundamentos de Toxicologia.* 2003; 2nd ed. São Paulo: Atheneu; p. 696.
219. Gandhi VM, Cherian KM. Red cell haemolysis test as an in vitro approach for the assessment of toxicity of karanja oil. *Toxicol. Vitro.* 2000; 14-6: 513-516.
220. Yin Y, Fu W, Fu M, He G, Traore L. The immune effects of edible fungus polysaccharides compounds in mice. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2007;16 Suppl 1:258-60.
221. Novaes MRCG, Novaes LCG, Melo AL, Recôva VL. Avaliação da toxicidade aguda do cogumelo *Agaricus sylvaticus*. *Com. Ciências da Saúde.* 2007; 18-3: 227-36.
222. Wong JH, Ng TB, Jiang Y, Liu F, Sze SC, Zhang KY. Purification and characterization of a Laccase with inhibitory activity toward HIV-1 reverse transcriptase and tumor cells from an edible mushroom (*Pleurotus cornucopiae*). *Protein Pept Lett.* 2010;17(8):1040-7.
223. Faccin LC, Benati F, Rincão VP, Mantovani MS, Soares SA, Gonzaga ML, Nozawa C, Carvalho Linhares RE. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. *Letters in Applied Microbiology.* 2007; 45(1):24-28.
224. Orsine JVC, Brito LM, Silva RC, Almeida MFMS, Novaes MRC. Cytotoxicity of *Agaricus sylvaticus* in non-tumor cells (NTH/3T3) and tumor (OSCC-3) using tetrazolium (MTT) assay. *Nutr Hosp.* 2013; 28(4):1244-1254.
225. Nakajima A, Ishida T, Koga M, Takeuchi T, Mazda O, Takeuchi M. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill on antibody-producing cells in mice. *Int Immunopharmacol.* 2002; 2:1205–11.

226. Bernardshaw SV, Lyberg T, Hetland G, Johnson E. The effect of an extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murill on expression of adhesion molecules and production of reactive oxygen species in monocytes and granulocytes in whole blood *ex vivo*. *APMIS*. 2007;115:719–25.
227. Kim GY, Leea M, Hee-Leea J, Moona D, Leea C. Effect of water-soluble proteoglycan isolated from *Agaricus blazei* on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 2005;5:1523–32.
228. Son CG, Shin JW, Cho JH, Yun CH, Han SH. Induction of murine interleukin-1 beta expression by water-soluble components from *Hericium erinaceum*. *Acta Pharmacol Sin*. 2006;27(8):1058-64.
229. Kim SP, Moon E, Nam SH, Friedman M. *Hericium erinaceus* mushroom extracts protect infected mice against *Salmonella Typhimurium*-Induced liver damage and mortality by stimulation of innate immune cells. *J Agric Food Chem*. 2012; 60(22):5590-6.
230. Fangkrathok N, Junlatat J, Spripanidkulchai B. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Lentinus polychrous* extract. 2013; 147(3):631-7.
231. Lee SS, Tan NH, Fung SY, Sim SM, Tan CS, Ng ST. Anti-inflammatory effect of the sclerotium of *Lignosus rhinocerotis* (Cooke) Ryvardeen, the Tiger Milk mushroom. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:359.
232. Heming TA, Tuazon DM, Dave SK, Chopra AK, Peterson JW, Bidani A. Post-transcriptional effects of extracellular pH on tumour necrosis factor-alpha production in RAW 246.7 and J774 A.1 cells. *Clin Sci (Lond)*, 2001; 100(3): 259-66.
233. Shu CH, Wen BJ, Lin KJ. Monitoring the polysaccharide quality of *Agaricus blazei* in submerged culture by examining molecular weight distribution and TNF-alpha release capability of macrophage cell line RAW 264.7. *Biotechnol Lett*. 2003; 25(24): 2061-4.
234. Schultz MJ, Speelman P, van der Poll T. Erythromycin inhibits *Pseudomonas aeruginosa*-induced tumour necrosis factor-alpha production in human whole blood. *J Antimicrob Chemother*. 2001; 48(2):275-8.

235. Dejager L, Vandevyver S, Ballegeer M, Van Wonterghem E, An L, Jeffrey R, Kolbeck R, Libert C. Pharmacological inhibition of type I interferon signaling protects mice against lethal sepsis. *J Infect Dis.* 2014; 209(6):960-70.
236. Staugas REM, Harvey DP, Ferrante A, Nandoskar M, Allison AC. Induction of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) by *Pseudomonas aeruginosa* and exotoxin A – Induced suppression of lymphoproliferation and TNF, lymphotoxin, gamma interferon, and IL-1 production in human leukocytes. *Infection and Immunity.* 1992; 60(8):3162-3168.
237. Tzepe IM, Giamarellos-Bourboulis EJ, Carrer DP, Tsaganos T, Claus RA, Vaki I, Pelekanou A, Kotsaki A, Tziortzioti V, Topouzis S, Bauer M, Papapetropoulos A. Angiopoietin-2 enhances survival in experimental sepsis induced by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2012; 343(2): 278-287.
238. Kuo Y, Huang Y, Chen C, Lin Y, Chuang K, Tsai W. Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by *Agaricus blazei*. *J Lab Clin Med.* 2002;140:176-187.
239. Nozell S, Laver T, Patel K, Benveniste EN. Mechanism of IFN-beta mediated inhibition of IL-8 gene expression in astrogloma cells. *J Immunol* 2006; 177:822–30.
240. Broos S, Hulpiau P, Galle J, Hooghe B, Van Roy F, De Bleser P. ConTra v2: a tool to identify transcription factor binding sites across species, update 2011. *Nucleic Acids Res* 2011; 39:W74–8.
241. Im SA, Wang W, Lee CK, Lee YN. Activation of Macrophages by Exopolysaccharide Produced by MK1 Bacterial Strain Isolated from NeungeeMushroom, *Sarcodon aspratus*. *Immune Netw.* 2010;10(6):230-8.
242. Rausch-Fan X, Matejka M: From plaque formation to periodontal disease, is there a role for nitric oxide? *Eur J Clin Invest* 31;833-835, 2008.
243. Machado PRL, Araujo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. *An. Bras. Dermatol.* 2004. 79(6): 647-662.

244. Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2001; 2(10): 907–916
245. Liu M, Zheng S, Wang X, Wen Z. Regulatory roles of IL-12, IL-4 and IFN-gamma on IgE synthesis in atopic patients. *Chin Med J (Engl).* 1999; 112(6):550-3.
246. Stobie L, Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Glaichenhaus N, Wu CY, Seder RA. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(15):8427-32.
247. Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O’shea JJ, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* 2001 Oct;22(10):556-60.
248. Mountford AP, Coulson PS, Cheever AW, Sher A, Wilson RA, Wynn TA. Interleukin-12 can directly induce T-helper 1 responses in interferon-gamma (IFN-gamma) receptor-deficient mice, but requires IFN-gamma signalling to downregulate T-helper 2 responses. *Immunology.* 1999;97(4):588-94.
249. Taylor SC, Schacks SJ, Qu Z, Wiley P. Type 2 cytokine serum levels in healthy sickle cell disease patients. *J Natl Med Assoc.* 1997; 89(11):753-7.
250. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular.* 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 580p.
251. Lull C, Wichers HJ, Savelkoul HFJ. Antiinflammatory and Immunomodulating Properties of Fungal Metabolites. *Mediators of Inflammation.* 2005; 2: 63–80.
252. Dai YC, Zhou LW, Cui BK, Chen YQ, Decock C. Current advances in *Phellinus sensu lato*: medicinal species, functions, metabolites and mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010; 87 (5):1587-93.
253. Montoya S, Sanches OJ, Levin L. Polysaccharide production by submerged and solid-state cultures from several medicinal higher Basidiomycetes. *Int. J. Med. Mushrooms.* 2013; 15, 71-79.

254. Lim L, Lee C, Chang E. Optimization of solid state culture conditions for the production of adenosine, cordycepin, and D-mannitol in fruiting bodies of medicinal caterpillar fungus *Cordyceps militaris* (L.:Fr.) Link (Ascomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms*. 2012; 14, 181-187.
255. Stojkovic D, Reis FS, Barros L, Glamoclija J, Ciric A, van Griensven LJ, Sokovic M, Ferreira IC. Nutrients and non-nutrients composition and bioactivity of wild and cultivated *Coprinus comatus* (O.F.Müll.) Pers. *Food Chem. Toxicol*. 2013; 59:289-96.
256. Su CH, Lai MN, Lin CC, Ng LT. Comparative characterization of physicochemical properties and bioactivities of polysaccharides from selected medicinal mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2016; 177:1-9.
257. Alves MJ, Ferreira ICFR, Dias J, Teixeira V, Martins A, Pintado MA. Review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extract and isolated compounds. *Planta Med*. 2012; 78 (16):1707-1718.
258. Gonzaga ML, Bezerra DP, Alves AP, de Alencar NM, Mesquita RO, Lima MW, Soares SA, Pessoa C, de Moraes MO, Costa-Lotufo LV. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by an alpha-(1-->4)-glucan-beta-(1-->6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. *J. Nat. Med*. 2009; 63(1):32-40.
259. Yamanaka, D, Motoi M, Ishibashi K, Miura NN, Adachi Y, Ohno N. Effect of *Agaricus brasiliensis*-derived cold water extract on Toll-like receptor 2-dependent cytokine production in vitro. *Immunopharmacol. Immunotoxicol*. 2012; 34(4):561-70.
- 260.** Zou X. Fed-batch fermentation for hyperproduction of polysaccharide and ergosterol by medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochemistry*. 2006;41 (4): 970-974.
261. Hetland G, Johnson E, Lyberg T, Bernardshaw S, Tryggestad AMA, Grinde B. Effects of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on immunity, infection and Cancer. *Scand. J. Immunol*. 2008; 68 (4):363-370.

262. Shu CH, Lin KJ. Effects of aeration rate on the production of ergosterol and blazeispirol A by *Agaricus blazei* in batch cultures. J. Taiwan Inst. Chem. Engineers. 2011; 42, 212-216.
263. Soares AA, Souza CGM, Daniel FM, Ferrari GP, Costa SMG, Peralta RM. Antioxidant activity and phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murrill) in two stages of maturity. Food Chemistry. 2009; 112, 775e781.
264. Oliveira AL, Eler GJ, Bracht A, Peralta RM. Purinergic effects of a hydroalcoholic *Agaricus brasiliensis* (*A. blazei*) extract on liver functions. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010; 58, 7202e7210.
265. Shin MS, Lee S, Lee KY, Lee HG. Structural and biological characterization of aminated-derivatized oat beta-glucan. J. Agric. Food Chem. 2005; 53:5554-8.
266. Chan GC, Chan WK, Sze DM. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. J. Hematol. Oncol. 2009; 10;2:25.
267. Hetland G, Johnson E, Eide DM, Grinde B, Samuelsen ABC, Wiker HG. Antimicrobial effects of  $\beta$ -glucans and pectin and of the *Agaricus blazei* based mushroom extract, AndoSan™. Examples of mouse models for pneumococcal-, fecal bacterial-, and mycobacterial infections. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. 2013;2:889-898.
268. Hetland G, Lovik M, Wiker HG. Protective effect of  $\beta$ -glucan against *Mycobacterium bovis*, BCG infection in Balb/c mice. Scand J Immunol. 1998; 47:548-553.
269. Dalonso N, Goldman GH, Gern RM.  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015; 99(19):7893-906.
270. Tryggstad AMA, Espevik T, Forland DT, Ryan L, Hetland G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill promotes NF- $\kappa$ B activation via stimulation of TLR2 and inhibits its activation via TLR4. Journal of pharmaceutical and biomedical sciences (J Pharm Biomed Sci.) 2013;29(29): 753-761.

271. Soković M, Ćirić A, Glamočlija J, Nikolić M, van Griensven LJLD. *Agaricus blazei* hot water extract shows anti quorum sensing activity in the nosocomial human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*. 2014; 19, 4189-4199.
272. Ta CAK, Arnason JT. Mini review of phytochemicals and plant taxa with activity as microbial biofilm and quorum sensing inhibitors. *Molecules*. 2016; 21(1):4.
273. Fortes RC, Novaes MRCG. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos Agaricales e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. *Rev. Bras. Cancerol*. 2006; 52 (4):363-371.
274. Lee DY, Ji IH, Chang HI, Kim CW. High-level TNF-  $\alpha$  secretion and macrophage activity with soluble  $\beta$ -glucans from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosc. Biotechnol Biochem*. 2002;66:233-238.
275. Alves MJ, Ferreira ICFR, Froufe HJC, Abreu RMV, Martins A, Pintado M. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *J. Appl. Microbiol*. 2013; 115 (2):346–357.
276. Huang CB, Alimova Y, Myers TM, Ebersole JL. Short and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch. oral boil*. 2011; 56 (7):650-654.
277. Hu SH, Cheung PC, Hung RP, Chen YK, Wng JC, Chang SJ. Antitumor and immunomodulating activities of exopolysaccharide produced by big cup culinary- medicinal mushroom *clitocybe maxima* (higher basidiomycetes) in liquid submerged culture. *Int. J. Med. Mushrooms*. 2015; 17 (9):891-901.

## ANEXOS

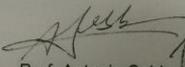
## ANEXO A – DOCUMENTO COMPROBATÓRIO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

  
**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 30 de junho de 2010.

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "**Cogumelo Agaricus Blazei Murill e Ação Antimicrobiana Sobre Cepas Resistentes de Acinetobacter Baumannii, Pseudomonas Aeruginosa e Staphylococcus Aureus**", UnBDOC nº. 44076/2010, sob responsabilidade da Profª. Drª. Margô Gomes de Oliveira Karnikowski, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

  
Prof. Antonio Sebben  
Coordenador do CEUA



## ANEXO B – DOCUMENTO COMPROBATÓRIO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA

**CEUA**  Universidade Católica de Brasília

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Atividade antimicrobiana de extratos de *Agaricus blazei* Murrill sobre bactéria patogênica em seres humanos.”, registrada com o nº **002/16**, sob a responsabilidade de Octávio Luiz Franco - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UCB) da Universidade Católica de Brasília, em reunião de 31 / 05 / 2016.

<b>Finalidade</b>	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	30 de dezembro de 2016.
<b>Espécie / linhagem/ raça</b>	<i>Mus musculus</i> – Balbc.
<b>Nº de Animais</b>	60
<b>Peso / Idade</b>	30g / 6 a 8 semanas.
<b>Sexo</b>	Macho e Fêmea
<b>Origem</b>	Biotério Central da Universidade Católica de Brasília.

Prof.ª. Dr.ª. Juliana Louz de Carvalho  
 Coordenadora do Conselho de Ética  
 do Uso de Animais/UCB  
 Universidade Católica de Brasília

Brasília, 28 de junho de 2016.