



ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE *Lentinula edodes*

F. BACH¹, C. V. HELM², A. C. PEDRO¹, A. P. STAFUSSA¹, G. M. MACIEL³, C. W. I. HAMINIUK³

¹Universidade Federal do Paraná. Setor de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química

²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Embrapa Florestas

³Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Departamento de Ciência e Tecnologia Ambiental
E-mail para contato: fabi.b.eng@gmail.com

RESUMO – O *L. edodes*, comumente conhecido como Shiitake, é um cogumelo comestível que além de apresentar importante valor nutricional, vem sendo estudado devido a sua composição promissora de compostos biologicamente ativos. Os objetivos desse estudo foram (i) determinar os compostos fenólicos totais, flavonoides totais, atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato fenólico de *L. edodes* e, (ii) identificar e quantificar os compostos presentes no extrato fenólico por CLUE. A atividade antioxidante *in vitro* foi determinada pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP. Os compostos fenólicos foram isolados e quantificados em cromatógrafo de ultra eficiência (CLUE). A atividade antimicrobiana foi investigada frente a quatro cepas de bactérias patogênicas por meio do método de microdiluição. Os níveis de compostos fenólicos totais e flavonoides totais foram de 4,91 mg GAE/g e 1,13 CE/g. Foi possível identificar e quantificar 6 compostos fenólicos, além do ácido fumárico, presentes no extrato fenólico obtido. A maior atividade antioxidante foi verificada pelo método ABTS (28,85 $\mu\text{mol TE/g}$). O extrato fenólico inibiu todas as bactérias patogênicas estudadas ($\text{MIC} \leq 100 \text{ mg/mL}$) e apresentou maior efetividade sobre o *S. aureus*. A presença de compostos biologicamente ativos, extraídos por um solvente não tóxico, sugere que o extrato de *L. edodes* pode ser aplicado na indústria alimentícia e/ou farmacêutica como um agente antioxidante e antimicrobiano natural.

Palavras-chave: ácido gálico, DPPH, ABTS, FRAP, CLUE, bactéria.

1. INTRODUÇÃO

Várias espécies de cogumelos comestíveis têm sido apontadas como fonte de compostos bioativos, além de apresentarem um importante valor nutricional (Kalač, 2013). Para sobreviver em ambiente natural, produzem metabólitos secundários, que apresentam atividades antioxidantes e antimicrobianas. Os compostos fenólicos são exemplos de metabólitos secundários, que além de contribuir para a sobrevivência dos cogumelos, podem ser benéficos para os seres humanos (Nedelkoska *et al.*, 2013).

As propriedades antioxidantes dos fenólicos provenientes das plantas e dos cogumelos devem-se às reações redox, que os permitem atuar como doadores de átomos de hidrogênio ou como agentes redutores (Ahmad *et al.*, 2012). Os compostos fenólicos são compostos aromáticos hidroxilados que possuem um ou mais anéis aromáticos, com um ou mais grupos hidroxila, responsáveis pela característica antioxidante, pois apresentam a capacidade de eliminar radicais livres (Liu *et al.*, 2013).

Estudos *in vitro* e epidemiológicos sugerem que o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos pode diminuir significativamente o risco de alguns problemas de saúde devido às suas



propriedades antioxidantes, antimutagênicas, anti-inflamatórias e antibacterianas (Alves *et al.*, 2013). Além da busca por compostos antioxidantes, nos últimos anos os pesquisadores de todo o mundo iniciaram um rastreamento de novas drogas bactericidas e/ou bacteriostáticas que apresentem diferentes mecanismos de ação daquelas já conhecidas. Isso porque, a resistência a antibióticos tem aumentado nos últimos anos e tornou-se uma preocupação global. Esta situação forneceu o impulso para a busca de substâncias antimicrobianas de várias fontes, como plantas medicinais e também cogumelos (Alves *et al.*, 2013; Nedelkoska *et al.*, 2013).

O *Lentinula edodes*, comumente conhecido como cogumelo Shiitake, é o segundo cogumelo comestível cultivado mais importante do mundo. Tem atraído o interesse dos pesquisadores devido às suas propriedades medicinais e vários compostos biologicamente ativos (Hearst *et al.*, 2009). Estes compostos exibem propriedades antitumoral, antifúngica, antibacteriana, hipoglicêmica e antioxidante. A atividade antimicrobiana de *L. edodes* foi confirmada contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos filamentosos, leveduras e vírus (Keles *et al.*, 2011).

Tendo em vista a necessidade de encontrar novas opções de agentes antimicrobianos, e se possível que sejam provenientes de fonte natural e possam ser obtidos por meio de uma dieta saudável, os objetivos desse estudo foram (i) determinar os compostos fenólicos totais, flavonoides totais, atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato fenólico de *L. edodes* e, (ii) identificar e quantificar os compostos presentes no extrato fenólico por CLUE.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cogumelo

Aproximadamente 3,0 kg de *Lentinula edodes* (Shiitake) cultivados no município de Campina Grande do Sul/PR, Brasil, foram liofilizados e triturados para a obtenção de partículas inferiores a 32 mesh (0,5 mm). O material pulverizado foi embalado a vácuo e armazenado sob proteção da luz até a realização das análises.

2.2 Obtenção do extrato fenólico

O extrato fenólico do cogumelo *L. edodes* foi obtido seguindo parâmetros previamente estudados e otimizados pelos autores. O tempo de extração foi pré-estabelecido em 2 horas, com agitação contínua de 100 rpm. A temperatura de extração foi de 36,5 °C. O solvente utilizado foi etanol a 25% e a razão sólido:líquido de 1:70. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 1075,20 x g por 15 min. e o sobrenadante foi analisado.

2.3 Determinação dos CFT e dos Flavonoides Totais (FT)

Os CFT dos extratos foram determinados de acordo com o procedimento que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu, conforme Singleton *et al.* (1965), com pequenas modificações. A absorbância foi medida a 725 nm e os valores obtidos foram comparados com uma curva de calibração de ácido gálico (0 a 100 mg/L). Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente (GAE) por g de cogumelo seco (mg GAE/g MS).

A determinação dos FT foi realizada por meio de análise colorimétrica, empregando cloreto de alumínio, conforme Jia *et al.* (1999), com pequenas modificações. A absorbância foi medida a 510 nm e comparada com uma curva de calibração de catequina (0 a 400 mg/L). Os resultados foram expressos em mg de catequina equivalente (CE) por g de cogumelo seco (mg CE/g MS).



2.4 Determinação da atividade antioxidante (*in vitro*)

A atividade antioxidante via eliminação de radicais livres foi determinada pelo ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), conforme Brand-Williams *et al.* (1995), com pequenas modificações. Em seguida, a absorbância foi medida a 515 nm, em espectrofotômetro (UV/VIS Shimadzu-1800). O potencial antioxidante de redução do ferro (FRAP) foi determinado segundo a metodologia descrita por Benzie *et al.* (1996), com pequenas modificações. A absorbância foi lida em comprimento de onda de 593 nm. A atividade sequestradora do radical ABTS (2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) dos extratos dos cogumelos foi determinada conforme Re *et al.* (1999). A absorbância foi obtida a 734 nm, em espectrofotômetro. Os resultados foram comparados com uma curva padrão (Trolox 0-2500 µmol/L) e expressos em µmol de Trolox equivalente por g de cogumelo seco (TE µmol/g MS).

2.5 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE-DAD)

Os compostos fenólicos e não-fenólicos foram determinados de acordo com o método proposto por Gasic *et al.*, (2014), com pequenas alterações. Primeiramente, o extrato fenólico foi filtrado em um filtro de seringa de nylon de 0,22 µm e 0,5 µL da amostra foi injetada em um cromatógrafo líquido de ultra eficiência (CLUE). O CLUE Acquity H-Class (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um sistema de bomba quaternária Waters, um auto-amostrador (Milford, MA, Estados Unidos) e um detector de matriz de diodo Aquad (Waters, Milford, MA, EUA) foi utilizado. Utilizou-se uma coluna Acquity BEH C18 (50 mm x 2,1 mm) com partículas de 1,7 µm (Waters, Milford, MA, EUA) a 30 °C.

O monitoramento dos cromatogramas foi realizado a 280, 290 e 370 nm, uma vez que a maioria dos compostos fenólicos exibem absorções máximas próximas destes comprimentos de onda. A determinação dos compostos fenólicos e não-fenólicos foram realizadas comparando-se o tempo de retenção e os espectros com curvas-padrão de ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido p-cumárico, campferol, ácido fumárico e ácido benzoico.

2.6 Atividade antimicrobiana (*in vitro*)

A atividade antimicrobiana foi testada determinando a concentração mínima inibitória (MIC), utilizando o método de microdiluição de acordo com o protocolo descrito por Wiegand, Hilpert e Hancock (2008). A MIC é definida como a menor concentração do agente antimicrobiano (extrato fenólico) que impede o crescimento microbiano. O extrato foi liofilizado e reidratado com água estéril. A concentração do extrato testada foi de 200 a 0,39 mg/mL.

O cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio foi utilizado para avaliar a mudança de coloração do meio (incolor para rosa), indicando o crescimento bacteriano. Cada placa teste incluiu um controle de crescimento e um controle de esterilidade. A amoxicilina foi utilizada como antibiótico de referência.

O extrato fenólico foi testado contra 4 bactérias: 2 Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Bacillus cereus* ATCC 11778) e 2 Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enteritidis* ATCC 13076). Os micro-organismos foram fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Curitiba (*E. coli* e *S. aureus*), pelo Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (*B. cereus*) e pelo Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (*S. enteritidis*).



2.7 Análise de dados

A análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foram realizados utilizando o programa Statistica versão 10.0 para avaliar as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os valores médios de cada variável analisada. Com exceção da determinação da atividade antimicrobiana que foi realizada em duplicata, as demais análises foram realizadas em três repetições.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Compostos Fenólicos Totais e poder antioxidante

A concentração de CFT encontrada no extrato fenólico foi igual a 4,91 mg GAE/g MS, enquanto que o conteúdo de flavonoides totais (FT) foi de 1,13 mg CE/g MS, representando 23% dos CFT do cogumelo. Keleş *et al.* (2011) quantificaram os CFT de 24 cogumelos e encontraram valores que variaram de 0,42 a 12,78 mg GAE/g (MS).

A atividade antioxidante do *L. edodes* foi avaliada pelos métodos de DPPH, ABTS e FRAP e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 1. Ambos os métodos de eliminação radical são populares para a determinação da capacidade antioxidante de produtos alimentícios, devido aos procedimentos simples, rápidos, sensíveis e reprodutíveis (Oliveira *et al.*, 2016). O ensaio de ABTS apresentou maior poder antioxidante (28,85 $\mu\text{mol TE/g}$), enquanto o DPPH obteve o menor resultado (11,48 $\mu\text{mol TE/g}$). Apesar do extrato avaliado em cada ensaio ser o mesmo, os mecanismos de ação envolvidos nos métodos são diferentes.

As moléculas de DPPH e ABTS são dois radicais livres estáveis e coloridos, que são receptores tanto de um átomo de hidrogênio como de um elétron para se tornar uma molécula diamagnética estável. Ao receberem um átomo de hidrogênio ou um elétron de um agente antioxidante, como os compostos fenólicos, a forma reduzida do radical é gerada, seguida pela perda de cor (Zielinski *et al.*, 2016). Enquanto isso, o FRAP é caracterizado somente pela capacidade de transferência de elétrons, que resulta na redução de íons ferro (Fe^{3+} para Fe^{2+}) na presença de compostos antioxidantes (Craft *et al.*, 2012).

Tabela 1 – Concentração de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante do extrato de *L. edodes*

Análises	<i>L. edodes</i>	
Compostos Fenólicos Totais (mg GAE/g MS)	4,91 \pm 0,18	
Flavonoides totais (mg CE/g MS)	1,13 \pm 0,03	
Atividade antioxidante ($\mu\text{mol TE/g MS}$)	DPPH	11,48 \pm 0,21
	ABTS	28,85 \pm 2,11
	FRAP	17,32 \pm 0,19

GAE – Ácido gálico equivalente. CE – Catequina equivalente. TE – Trolox Equivalente. DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. ABTS – ácido 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico). FRAP – Poder antioxidante de redução do ferro.

Os ácidos fenólicos são classificados em hidroxicinâmicos e hidroxibenzoicos (Dai *et al.*, 2010; Heleno *et al.*, 2015). Segundo Brand-Williams *et al.* (1995) os derivados de ácidos hidroxicinâmicos são melhores antioxidantes dos que os ácidos hidroxibenzoicos, por apresentarem dupla ligação na molécula ($-\text{HC}=\text{CHCOOH}$) que participa da estabilização do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado.

Entre os derivados do ácido hidroxicinâmico, somente o ácido p-cumárico (4-hidroxicinâmico) (de 2,47 $\mu\text{g/g}$) foi identificado. Os derivados de ácido hidroxibenzoicos



quantificados foram os ácidos gálico (3,4,5-trihidroxibenzoico) (157,84 $\mu\text{g/g}$), benzoico (32,33 $\mu\text{g/g}$), protocatecuico (3,4-dihidroxibenzoico) (9,44 $\mu\text{g/g}$) e *p*-hidroxibenzoico (4-hidroxibenzoico) (5,65 $\mu\text{g/g}$) (Tabela 2). Apenas um flavonoide foi identificado: o campferol (6,52 $\mu\text{g/g}$). O ácido fumárico (não fenólico) apresentou a maior concentração (3657,24 $\mu\text{g/g}$) entre os compostos identificados. Autores encontraram teores com uma ampla variação na concentração desse composto (0-28,200 $\mu\text{g/g dm}$) para diferentes espécies de cogumelos (Stojkovic *et al.*, 2013).

No geral, a concentração dos compostos fenólicos quantificados no *L. edodes*, por CLUE, foram superiores as encontradas na literatura (Reis *et al.*, 2012). Possivelmente isso tenha ocorrido, pois a obtenção do extrato se deu em condições previamente otimizadas, além da utilização de um CLUE, que possui maior sensibilidade para separar e quantificar os compostos, se comparado ao CLAE (cromatógrafo líquido de alta eficiência), comumente utilizado.

Tabela 2 – Compostos fenólicos e não fenólico quantificados por CLUE no extrato de *L. edodes*

Compostos analisados	<i>L. edodes</i> ($\mu\text{g/gMS}$)	
Compostos Fenólicos	Ácido <i>p</i> -cumárico	2,47 \pm 0,23
	Ácido gálico	157,84 \pm 0,42
	Ácido benzoico	32,33 \pm 2,20
	Ácido protocatecuico	9,44 \pm 0,49
	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	5,65 \pm 0,06
	Campferol	6,52 \pm 0,24
Compostos Fenólicos Totais	214,25	
Compostos Não-Fenólicos	Ácido fumárico	3657,24 \pm 11,27
	Compostos Não-Fenólicos Totais	3657,24

O composto fenólico quantificado em maior concentração no cogumelo foi o ácido gálico, que consiste em uma molécula planar, constituída por um anel aromático, três grupos hidroxilas fenólicos e um grupo ácido carboxílico. Os três grupos hidroxila estão ligados ao anel aromático numa posição orto um em relação ao outro proporcionando a atividade antioxidante desta molécula (Velika *et al.*, 2012; Badhani *et al.*, 2015). Galato *et al.* (2001) demonstraram, através do estudo de oito compostos fenólicos e análogos, que a atividade antioxidante de uma molécula aumenta com o aumento do número de grupos hidroxila ligados ao anel aromático. Verificou-se que o ácido gálico exibia a maior capacidade antioxidante entre os vários polifenóis. Deste modo, foi constatado que vários fatores, tais como o número e a posição do grupo hidroxila, a presença de outros grupos funcionais e a sua posição em relação aos grupos hidroxila, afetam a atividade antioxidante e anti-radical (Badhani *et al.*, 2015).

A atividade antioxidante do *p*-hidroxibenzoico deve-se à posição da hidroxila na molécula, que apresenta dois grupos metoxi adjacentes ao grupo OH, aumentando substancialmente a disponibilidade do hidrogênio para reação (Rice-Evans *et al.*, 1996). Os ácidos monohidroxibenzoicos mostraram uma maior atividade antioxidante na posição *o* (orto) e *p* (para) em comparação com a posição *m* (meta) em termos de capacidade de doação de hidrogênio contra o radical superóxido (Velika *et al.*, 2012).

Os extratos naturais podem ser mais benéficos que os compostos bioativos isolados, uma vez que a interação sinérgica dos compostos pode aumentar as propriedades dos componentes individuais. Além disso, o uso de extratos naturais pode ser benéfico considerando que os níveis máximos legais para aditivos alimentares sintéticos são estabelecidos com base em vários parâmetros toxicológicos que geralmente não são aplicáveis a compostos que ocorrem naturalmente (Oliveira *et al.*, 2016).



3.2 Atividade antimicrobiana *in vitro*

A tabela 3 apresenta a concentração mínima inibitória (MIC) do extrato fenólico do cogumelo *L. edodes* frente a bactérias Gram positivas (*B. cereus* e *S. aureus*) e Gram negativas (*S. enteritidis* e *E. coli*).

Tabela 3 – Atividade antimicrobiana do extrato de *L. edodes*

Micro-organismos testados	MIC (mg/mL)	
	<i>Lentinula edodes</i>	Antibiótico padrão Amoxicilina
Gram positivos	<i>Bacillus cereus</i>	12,50
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,56
Gram negativos	<i>Salmonella enteritidis</i>	1,00
	<i>Escherichia coli</i>	12,50

MIC – concentração mínima inibitória.

O extrato fenólico de *L. edodes* apresentou atividade antimicrobiana para todas as cepas testadas. Sua efetividade foi maior para micro-organismos Gram-positivos, o que também foi observado por (Oyetayo, 2009) ao estudar a atividade antibacteriana de *L. subnudus* sobre as bactérias *B. cereus*, *S. aureus* e *S. typhinurium*. O melhor resultado para inibição (que apresentou a menor MIC) foi obtido contra o *S. aureus* (1,56 mg/mL), semelhante ao encontrado por Taofiq *et al.* (2016) para a mesma bactéria (2,5 mg/mL). O *S. aureus* também foi mais sensível à amoxicilina. Nedelkoska *et al.* (2013) obtiveram a MIC variando entre 5 a 50 mg/L ao avaliar a atividade antibacteriana de seis cogumelos. As bactérias Gram-negativas (*S. enteritidis* e *E. coli*) foram menos sensíveis aos agentes antibacterianos intrínsecos do cogumelo, necessitando maior concentração desses para que ocorresse inibição.

Segundo Oliveira *et al.* (2016), é possível que a maior resistência das bactérias Gram-negativas aos agentes antimicrobianos, esteja relacionada à sua sofisticada membrana celular, que apresenta maior barreira à permeabilidade de agentes externos quando comparada à membrana celular das bactérias Gram-positivas. A membrana celular de espécies Gram-negativas apresenta uma camada de lipopolissacarídeo externa adicional que restringe a penetração da maioria das moléculas, enquanto são permeáveis aos nutrientes. Esta eficiente barreira de permeabilidade tem sido responsabilizada pela incapacidade da indústria farmacêutica produzir novas classes de compostos de amplo espectro, igualmente ativos contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. O efeito inibitório dos compostos fenólicos pode ser explicado pela sua interação com as proteínas da membrana bacteriana por meio da ligação de hidrogênio, o que pode resultar em alterações na sua permeabilidade, causando destruição celular ou coagulação do seu conteúdo. A literatura informa que a atividade antimicrobiana de extratos de plantas pode estar relacionada às condições de cultivo da planta, uma vez que os componentes ativos, geralmente substâncias fenólicas, são sintetizados como resposta ao estresse, como ataques de micro-organismos ou radiação UV forte (Oliveira *et al.*, 2016).

O ácido gálico pode ser um dos potenciais agentes antibacterianos encontrados no *L. edodes*. Segundo Borges *et al.* (2013), o ácido gálico produz alterações irreversíveis nas propriedades da membrana celular bacteriana como mudança de hidrofobicidade, diminuição da carga negativa superficial e ocorrência de ruptura ou formação de poros nas membranas celulares com consequente vazamento de constituintes intracelulares essenciais. Essas conclusões foram obtidas após avaliação do mecanismo de ação do ácido gálico em *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa*.



Além dos compostos fenólicos supracitados, o ácido *p*-cumárico foi estudado isoladamente por Lou *et al.* (2012) contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e foi considerado antibacteriano contra todas as bactérias patogênicas com MIC variando de 10 a 80 µg/mL. O ácido mostrou ter mecanismo duplo de atividade antibacteriana: rompendo as membranas celulares bacterianas e ligando-se ao DNA genômico para inibir as funções celulares, conduzindo à morte.

4. CONCLUSÃO

Foi verificado que o extrato fenólico de *L. edodes* apresentou importante atividade antioxidante e antimicrobiana. Foram identificados seis compostos fenólicos, além do ácido fumárico. O cogumelo *L. edodes* possui agentes antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de cepas de *S. enteritidis*, *S. aureus*, *B. cereus* e *E. coli*. A presença de compostos biologicamente ativos, extraídos por um solvente não tóxico, sugere que o extrato de *L. edodes* pode ser aplicado na indústria alimentícia e/ou farmacêutica como um agente antioxidante e antimicrobiano natural.

5. REFERÊNCIAS

- AHMAD, N.; MAHMOOD, F.; AKBAR KHALIL, S.; ZAMIR, R.; FAZAL, H.; ABBASI, B. H. Antioxidant activity via DPPH, gram-positive and gram-negative antimicrobial potential in edible mushrooms. *Toxicology and Industrial Health*, 30(9), 826–834, 2012.
- ALVES, M. J.; FERREIRA, I. C. F. R.; FROUFE, H. J. C.; ABREU, R. M. V.; MARTINS, A.; PINTADO, M. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *J. Appl Mic.* v. 115, p. 346–357, 2013.
- BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *Royal Society of Chem. Adv.* v. 5, p. 27540–27557, 2015.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Bioch.*, v. 239, p. 70–76, 1996.
- BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA, M. J.; SIMÕES, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Mic. Drug Resist.*, v. 19, p. 256–65, 2013.
- BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, v. 2, p. 455–475, 1960.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sc. and Tech.*, v. 28, p. 25–30, 1995.
- CRAFT, B. D.; KERRIHARD, A. L.; AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B. Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *C. Rev F Sc F Saf.* v. 11, p. 148–173, 2012.
- DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* v. 15, n. 10, p. 7313–7352, 2010.
- GALATO, D.; CKLESS, K.; SUSIN, M. F.; GIACOMELLI, C.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; SPINELLI, A. Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure-antioxidant activity. *Redox report: communications in free radical research.* v. 6, n. 4, p. 243–50, 2001.
- GASIC, U.; KECKES, S.; DABIC, D.; TRIFKOVIC, J.; MILOJKOVIC-OPSENICA, D.; NATIC, M.; TEŠIC, Z. Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. *Food Chemistry.* v. 145, p. 599–607, 2014.
- HEARST, R.; NELSON, D.; MCCOLLUM, G.; MILLAR, B. C.; MAEDA, Y.; GOLDSMITH, C. E.; MOORE, J. E. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complem. Therapies*



Clin. Pract., v. 15, p. 5–7, 2009.

- HELENO, S. a.; BARROS, L.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J. R. P.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I. C. F. R. Phenolic, polysaccharidic, and lipidic fractions of mushrooms from northeastern Portugal: Chemical compounds with antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.* v. 60, p. 4634–4640, 2012.
- JIA, Z.; TANG, M.; WU, J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* v. 64, p. 555–559, 1999.
- Kalač, P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *J. of the Sc. of Food and Agric.* v. 93, p. 209–218, 2013.
- KELEŞ, A.; KOCA, L.; GENÇCELEP, H. Antioxidant properties of wild edible mushrooms. *J. of Food Proc & Tech.* v. 2, n. 6, p. 1–6, 2011.
- LIU, J.; JIA, L.; KAN, J.; JIN, C. In vitro and in vivo antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*A. bisporus*). *Food Chem. Toxicol.* v. 51, p. 310–316, 2013.
- LOU, Z.; WANG, H.; RAO, S.; SUN, J.; MA, C.; LI, J. p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control*, 25(2), 550–554, 2012.
- NEDELKOSKA, D. N., PANCEVSKA, N. A., AMEDI, H., VALESKA, D., IVANOVA, E., KARADELEV, M., KUNGULOVSKI, D. Screening of antibacterial activities of selected Macedonian wild mushrooms. *J. Nat. Sc.*, v. 124, p. 333–340, 2013.
- OLIVEIRA, D. A.; ANGONESE, M.; GOMES, C.; FERREIRA, S. R. S. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. *J. Supercritical Fluids.* v. 111, p. 55–62, 2016.
- OYETAYO, V. O. Free radical scavenging and antimicrobial properties of extracts of wild mushrooms. *Brazilian J. of Microb.* v. 40, p. 380–6, 2009
- RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* v. 26, p. 1231–1237.
- REIS, F. S., MARTINS, A., BARROS, L., FERREIRA, I. C. F. R. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between in vivo and in vitro samples. *Food Chem. Tox.* v. 50, p. 1201–1207, 2012.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure - Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med.* v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.
- SINGLETON, V., ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. and Vitic.*, 16, p. 144–158, 1965.
- STOJKOVIC, D.; REIS, F. S.; BARROS, L.; GLAMOCLJIA, J.; CIRIC, A.; VAN GRIENSVEN, L. J. I. D., FERREIRA, I. C. F. R. Nutrients and non-nutrients composition and bioactivity of wild and cultivated *Coprinus comatus*. *Pers. Food and Chem. Toxicol.*, v. 59, p. 289–296, 2013
- TAOFIQ, O.; HELENO, S. A., CALHELHA, R. C.; ALVES, M. J., BARROS, L.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R. Development of Mushroom-Based cosmeceutical formulations with anti-inflammatory, anti-tyrosinase, antioxidant, and antibacterial properties. *Molecules*, v. 21, p. 1–12, 2016.
- VELIKA, B.; KRON, I. Antioxidant properties of benzoic acid derivatives against superoxide radical. *Free Radicals and Antioxidants*, v. 2, n. 4, p. 62–67, 2012.
- WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols.* v. 3, p. 163–75, 2008.
- ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; BETA, T. Multi-response optimization of phenolic antioxidants from white tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze) and their identification by LC-DAD-Q-TOF-MS/MS. *LWT-Food Sc Tech.* v. 65, p. 897–907, 2016.