

Propriedades antimicrobianas e antioxidantes de extratos produzidos a partir de colonizados de basidiomicetos em tortas oleaginosas

Bárbara Monteiro Lyra¹, Marina Borges Guimarães², Lucas Cantalogo Pereira³, Jéssica do Vale⁴, Raquel Bombarda Campanha⁵, Aparecido A. Conceição⁶, Pérola Oliveira Magalhães Dias Batista⁷, Félix Goncalves de Siqueira⁸, Simone Mendonça⁹

Resumo

As tortas (resíduos da extração mecânica de óleo) da semente do pinhão-manso (TSPM) e do caroço de algodão (TCA) já se mostraram de grande interesse devido ao seu potencial como fonte proteica na nutrição animal, entretanto apresentam compostos tóxicos que poderiam limitar aplicações com esta finalidade. Alguns fungos do filo *Basidiomycota*, cogumelos comestíveis, podem ser cultivados nestes materiais e promover a destruição destes compostos tóxicos, além de produzir compostos com atividades antioxidante e antimicrobiana. Sendo assim, as tortas colonizadas por esses macrofungos poderiam ser uma alternativa ao uso de antibióticos utilizados como promotores de crescimento na nutrição animal. Este trabalho avaliou as atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de biomassas lignocelulósica-microbiana após a fase de colonização de TSPM e de TCA misturados com casca de coco-verde em diferentes proporções. Os macrofungos empregados foram da família *Pleurotaceae* (BRM055674) e da família *Panaceae* (BRM 044603), em TSPM e TCA, respectivamente. Extratos metanólicos foram produzidos a partir de cada substrato e após sua colonização com os fungos. A atividade antioxidante foi avaliada por meio de três métodos (FRAP, ABTS e DPPH). Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados por teste de difusão de disco com os extratos contra bactérias patogênicas, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 27154) e *Salmonella enterica* (ATCC 14028) e posteriormente calculada a concentração inibitória mínima (CIM). Em todos os fermentados houve redução na atividade antioxidante, possivelmente devido à produção de enzimas oxidativas pelos basidiomicetos. Os resultados sugerem que os extratos metanólicos obtidos a partir dos colonizados de macrofungo BRM055674 contendo 20% de TSPM em coco verde e com fungo BRM 044603 contendo 80% de TCA em coco verde possuem as melhores combinações de atividades antioxidante e leve atividade antimicrobiana (500 µg/mL), respectivamente.

¹ Graduanda em Farmácia, Universidade de Brasília, bolsista da FAP-DF, bmlyra.97@gmail.com

² Farmacêutica, doutoranda em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, marinaborgesguimaraes@gmail.com

³ Graduando em Farmácia, Universidade de Brasília, bolsista do CNPq, lucas.cantalogo.pereira@gmail.com

⁴ Graduanda em Farmácia, Universidade de Brasília, bolsista da FAP-DF, jessica.nobrepacheco@gmail.com

⁵ Química, mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, raquel.campanha@embrapa.br

⁶ Biotecnologista, mestre em Biociências, Universidade Federal do Mato Grosso, aparecido.aac@gmail.com

⁷ Farmacêutica, doutora em Biotecnologia (USP), professora-adjunta da Universidade de Brasília, perolam@gmail.com

⁸ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (UnB), pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

⁹ Farmacêutica, doutora em Saúde Pública (USP), pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

Palavras-chave: tortas oleaginosas, basidiomiceto, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante.

Introdução

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) tem sido considerado uma das alternativas de interesse para atender a demanda de óleo vegetal a ser usado na produção de biodiesel e bioquerosene no Brasil. Há interesse do uso da torta residual da extração do óleo no mercado de nutrição animal, que é rica em proteínas (de 46% a 63%, dependendo do método de extração do óleo). No entanto, a presença de compostos bioativos tóxicos, alergênicos e antinutricionais ainda restringe o uso da torta para nutrição animal, sendo os ésteres de forbol (EF) os principais componentes tóxicos (Laviola; Rodrigues, 2019).

O caroço de algodão também é uma semente oleaginosa utilizada para a produção de biodiesel e seu subproduto, a torta do caroço de algodão também possui potencial de utilização na alimentação animal devido seu alto teor nutritivo por ser rico em proteicas (>20%), possuir fibras e carboidratos. Entretanto, os problemas provocados na nutrição animal pelo uso do caroço de algodão são relacionados à presença do gossipol livre (GL), um composto polifenólico responsável na planta pela proteção contra insetos, que afeta a fertilidade dos animais e também tem efeitos tóxicos em monogástricos (Conceição et al., 2018).

Pesquisas recentes sugerem que o uso de resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos, além de ser economicamente viável, reduz problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo após o processamento ou consumo (Conceição, 2018; Gomes et al., 2015). Nesse contexto, os macrofungos do filo *Basidiomycota* desempenham papel fundamental na biodestoxificação desses resíduos agroindustriais, além de produzir metabólitos bioativos com propriedades medicinais, como a atividade antimicrobiana (Barros et al., 2007).

O uso de antimicrobianos como aditivos na agropecuária tem contribuído para o sucesso do agronegócio e conseqüentemente, para o superávit da balança comercial brasileira. Em contrapartida, o mau uso de antibióticos em animais contribui para o aumento de resistência antimicrobiana causada por bactérias resistentes aos fármacos disponíveis, sendo este um problema de saúde mundial, atualmente (Septimus, 2018).

Os fungos filamentosos são fontes de substâncias com atividades antimicrobianas, antioxidantes e imunomodulatórias. O potencial antimicrobiano dos extratos de fungos filamentosos é bem reportado. A implementação dos derivados de macrofungos na alimentação animal com a finalidade de reduzir o uso indiscriminado de antimicrobianos é uma alternativa de grande importância e interesse comercial (Barros et al., 2007).

Diante do potencial dos fungos filamentosos e a busca do direcionamento sustentável das tortas oleaginosas, o objetivo deste trabalho foi analisar atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos de colonizados de dois macrofungos em TSPM em TCA para posterior uso na alimentação animal.

Material e Métodos

Preparo e obtenção dos colonizados

Uma espécie de fungo da família *Pleurotaceae* (BRM055674) e um da família *Panaceae* (BRM044603), oriundos da coleção de microrganismos da Embrapa Agroenergia, foram mantidos em repique contínuo em BDA. Para o preparo das sementes, os microrganismos foram inoculados em trigo (previamente umedecido e autoclavado a 121°C durante 1 hora). As biomassas foram preparadas nas concentrações de TSPM e TCA a 20%, 50% e 80% em casca de coco verde com a umidade ajustada em 60%. Foram pesados 500 g dos substratos em sacos e esterilizados em autoclave durante 1 hora a 121°C. O procedimento de autoclavagem foi repetido novamente para evitar contaminação de microrganismos endófitos. Após o resfriamento, foram adicionados 30 g de inóculo do macrofungo comestível BRM055674 em substratos contendo TSPM e 30 g de inóculo de BRM044603 nos sacos com os substratos de TCA. Os sacos inoculados, juntamente com sacos controle sem inóculo (nomeados como substratos) foram mantidos em ambiente sem controle de temperatura e umidade até a colonização total dos sacos (30 dias). Em seguida, os colonizados foram retirados dos sacos, secos em estufa de circulação de ar a 40 °C durante 48 horas e triturados em moinho de facas tipo Willey (peneira de 0,85 mm).

Produção dos extratos

Para a obtenção dos extratos metanólicos foram utilizados 10 g de colonizados secos e triturados em 200 ml de metanol que foram colocados em erlenmeyer e incubados em shaker (180 rpm), temperatura ambiente (25°C), protegido de luz, por 48 horas. Após as 48 horas, os extratos brutos foram filtrados em papel filtro, recolhidos e evaporados em Rotaevaporador (Rotavapor R210/215, Büchi Labortechnik, Flawil, Suíça) com banho a 40 °C. Em seguida, os extratos foram liofilizados, para a eliminação da água residual e posteriormente mantidos em freezer a -20° até a realização das análises.

Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada a partir dos extratos dos substratos não colonizadas e dos colonizados por diferentes métodos que simulam a formação de espécies reativas de oxigênio. Foram empregados ensaios da atividade antioxidante, tais como pela captura de radicais (DPPH[•], ABTS^{•+}), diminuição da formação de espécies reativas de oxigênio - EROs (FRAP). O método DPPH (2,2 difenil-1- picrilhidrazil) foi realizado conforme método de Pires et al. (2017). O método de ABTS foi adaptado a partir do método descrito por Re ET AL. (1999). O método de FRAP foi adaptado do método de urrea-Victoria et al. (2016). Os resultados foram expressos em µg de trolox/mg de extrato para os ensaios de DPPH e ABTS, e em µgFe²⁺/mg de extrato pela análise de FRAP. As análises foram realizadas em triplicata, a análise estatística foi realizada com o software RStudio (R Core Team, 2016) e as imagens com o software GraphPrism8 (GraphPad Software, La Jolla, California, EUA).

Atividade antimicrobiana

O teste de difusão de disco foi realizado para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos, os quais foram submetidos ao rotavapor, e, posteriormente, ressuspendidos e diluídos em DMSO (dimetilsulfóxido) a 20%. Em cada disco de papel filtro estéril com diâmetro de 6,0 mm foram inoculados 20 µL de extrato. Cada extrato foi diluído em diferentes concentrações (2, 20, 200 e 2000 µL/disco). Os discos foram incubados em placas de Petri estéreis com meio MHA onde foram previamente inoculados os microrganismos patogênicos *Staphylococcus aureus* (ATCC 27154, produtora de enterotoxina), *Salmonella enterica* Typhi (ATCC 14028) e *Escherichia coli* (ATCC 27154), por 24 horas a 35°C. O método de microdiluição de caldo foi realizado nos extratos que apresentaram halos maiores que 10 mm e foi realizado conforme método descrito nos documentos M7-A6 do National Committee for Clinical Laboratory Standards, M100-S15 e M100-S17 (CLSI, 2007), a fim de se obter a concentração inibitória mínima (CIM).

Resultados e Discussão

Todos os fermentados foram submetidos à quantificação de EF e GL em estudo prévio (dados não publicados). As quantificações de EF foram de 10,8 ppm (TSPM20%), 55,0 ppm (TSPM50%) e 46,0 ppm (TSPM80%), sendo todas as concentrações menores da concentração considerada segura para consumo animal de 90 ppm (Gomes et al., 2018). Em relação ao GL, as quantificações foram de 0,11 ppm (TCA20%), 0,13 ppm (TCA50%) e 0,19 ppm (TCA80%). A concentração segura de GL para o consumo animal é de 60 ppm (Saunders, 2017).

Atividade antioxidante

Na concentração de TSPM20% (Tabela 1), não houve diferença na atividade antioxidante dos colonizados em relação àquela dos respectivos substratos não inoculados, em todos os métodos empregados. Pelo método ABTS, houve aumento na atividade antioxidante no colonizado em TSPM20%, sendo este o maior valor encontrado em todos os tratamentos (53,5 µg trolox/mg de extrato). Já nas concentrações de TSPM50% e TSPM80%, pelos métodos FRAP e DPPH, foi possível observar redução na atividade antioxidante dos colonizados em relação aos substratos.

Entre os ensaios realizados em TCA, foi observado que a atividade antioxidante medida pelos métodos de DPPH e ABTS foram inferiores que as observadas para a TSPM; e que quanto maior a concentração de casca de coco (20% TCA) maior a queda da atividade antioxidante percebida após a colonização (Tabela 2) pelos métodos DPPH e FRAP. No teste FRAP, o colonizado TCA80% não apresentou queda em sua atividade após o cultivo; pelo método ABTS apenas a concentração de TCA20% apresentou queda na sua atividade do colonizado em relação à substrato, enquanto pelo método DPPH as atividades antioxidantes dos colonizados foram menores que seus respectivos substratos.

Tabela 1. Atividade antioxidante dos extratos metanólicos dos substratos não fermentados e fermentados de BRM055674 em diferentes concentrações de TSPM, pelos ensaios de DPPH, ABTS e FRAP.⁽¹⁾

Substrato	Amostra	DPPH [*] (µg de Trolox/ mg de extrato)	ABTS ^{**} (µg de Trolox/ mg de extrato)	FRAP (µg de Fe ²⁺ /mg de extrato)
TSPM 20%	Substrato	33,6 ± 1,2 ^{Aa}	36,0 ± 1,4 ^{Ab}	42,7 ± 0,8 ^{Aa}
	Fermentado	22,5 ± 0,4 ^{Aa}	54,6 ± 3,7 ^{Aa}	41,1 ± 0,9 ^{Aa}
TSPM 50%	Substrato	9,4 ± 0,1 ^{Ba}	13,9 ± 0,3 ^{Aa}	29,2 ± 0,3 ^{Aa}
	Fermentado	8,2 ± 0,1 ^{Bb}	10,1 ± 1,2 ^{Ba}	23,4 ± 0,8 ^{Bb}
TSPM 80%	Substrato	18,1 ± 1,0 ^{Aa}	31,0 ± 0,8 ^{Aa}	44,7 ± 0,7 ^{Aa}
	Fermentado	8,4 ± 0,3 ^{Bb}	13,0 ± 2,7 ^{Bb}	25,6 ± 0,6 ^{Bb}

⁽¹⁾ BRM055674: espécie da família *Pleurotaceae*; TSPM: torta de semente de pinhão-manso. Médias diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas diferem médias de uma amostra (substrato ou fermentado) em diferentes concentrações de TSPM de um mesmo ensaio; letras minúsculas diferem entre si entre substrato e fermentado em uma mesma concentração de TSPM de um mesmo ensaio.

Tabela 2. Atividade antioxidante dos extratos metanólicos dos substratos não fermentados e fermentados de BRM 44603 em diferentes concentrações de TCA, pelos ensaios de DPPH, ABTS e FRAP.⁽¹⁾

Substrato	Amostra	DPPH [*] (µg de Trolox/ mg de extrato)	ABTS ^{**} (µg de Trolox/ mg de extrato)	FRAP (µg de Fe ²⁺ /mg de extrato)
TCA 20%	Substrato	18,9 ± 0,3 ^{Aa}	12,9 ± 0,4 ^{Aa}	35,2 ± 1,5 ^{Ba}
	Fermentado	11,0 ± 0,3 ^{Cb}	10,2 ± 0,8 ^{Ab}	22,5 ± 0,5 ^{Bb}
TCA 50%	Substrato	17,9 ± 0,2 ^{Ba}	11,2 ± 1,4 ^{Aa}	39,2 ± 1,4 ^{Aa}
	Fermentado	14,6 ± 1,2 ^{Bb}	11,3 ± 1,2 ^{Aa}	32,5 ± 0,8 ^{Ab}
TCA 80%	Substrato	16,9 ± 0,4 ^{Ba}	13,5 ± 1,1 ^{Aa}	36,7 ± 1,0 ^{Ab}
	Fermentado	16,8 ± 0,7 ^{Ab}	11,9 ± 0,4 ^{Aa}	35,3 ± 0,5 ^{Aa}

⁽¹⁾ BRM44603: espécie da família *Pleurotaceae*; TCA: torta de caroço de algodão. Médias diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas diferem médias de uma amostra (substrato ou fermentado) em diferentes concentrações de TCA de um mesmo ensaio; letras minúsculas diferem entre si entre substrato e fermentado em uma mesma concentração de TCA de um mesmo ensaio.

Segundo Floegel et al. (2011) comparando-se os métodos DPPH e ABTS, o último se mostrou mais fiel em relação a compostos antioxidantes lipofílicos e de alta pigmentação. É importante ressaltar que os métodos não têm a mesma sensibilidade, portanto esses fatores podem ser responsáveis por diferenças nos resultados entre os testes. A diminuição da atividade antioxidante após a colonização foi vista também por Lin; Wei; Chou (2006). Os fungos basidiomicetos são conhecidos por serem capazes de degradar lignoceluloses de biomassas e nesse processo libera enzimas com grande potencial oxidativo inespecífico, sendo uma explicação para a diminuição da atividade antioxidante quando as biomassas são colonizadas (Kersten; Cullen, 2007). No entanto, o colonizado de TSPM 20% apresentou resultados mais altos de atividade antioxidante tanto pelo método ABTS quanto FRAP.

Atividade antimicrobiana

Foram considerados com atividade antimicrobiana os extratos que apresentaram em placa halos de inibição maiores de 10 mm, e resistentes quando foram menores que 10mm, ou não houve formação de halo, conforme sugerido na literatura (Oliveira et

al., 2008). Conforme Tabela 3, é possível observar que todos os extratos se mostraram resistentes contra as bactérias gram-negativas (*S. enterica*, *E. coli*). Já contra *S. aureus* os extratos de TCA80, TSPM20 se mostraram sensíveis com halos maiores que 10 mm. Em contrapartida, os extratos de TCA20, TCA50 e TSPM80 com um halo menor que 10 mm, se mostraram resistentes contra a mesma. Esses resultados estão em concordância com o fato já conhecido na literatura, de que a atividade antimicrobiana de cogumelos contra bactérias gram-positivas é maior do que aquele com atividade contra bactérias gram-negativas (Shen et al., 2017). Uma das razões que explica esse fenômeno é que as bactérias gram-negativas possuem uma membrana externa e o espaço periplásmico ao redor da parede celular menos permeável do que outras membranas que permite a difusão livre apenas de água e alguns gases. Outra explicação é sobre um mecanismo ainda inexplicável com relação a abertura e fechamento das porinas que podem dificultar a entrada livre de substâncias, principalmente antibióticos (Venturini et al., 2008).

Tabela 3. Halos de inibição de extratos metanólicos contra *S. aureus* (ATCC 27154), *S. enterica* Typhy (ATCC 14028) e *E. coli* (ATCC 25922) pelo teste de difusão de disco.⁽¹⁾

Extrato	Conc. (mg/disco)	Halo (mm)		
		<i>S. aureus</i>	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>
Amoxicilina	10	35,7 ± 0,6	36,0 ± 0,0	20,6 ± 1,2
Controle (-)	-	N.S.	N.S.	N.S.
TCA20	2000	7,0 ± 0,0	N.S.	N.S.
TCA50	2000	9,5 ± 1,5	N.S.	N.S.
TCA80	2000	10,5 ± 0,7	N.S.	9,0 ± 1,4
TSPM20	2000	11,5 ± 0,7	N.S.	N.S.
TSPM50	2000	9,5 ± 0,7	N.S.	N.S.
TSPM80	2000	11,5 ± 0,7	N.S.	N.S.

(1) N.S.: não sensível; TCA20: extrato metanólico de BRM044603 em TCA a 20%; TCA50: extrato metanólico de BRM044603 em TCA a 50%; TCA80: extrato metanólico de BRM044603 em TCA a 80%; TSPM20: extrato metanólico de BRM055674 em TSPM a 20%; TSPM50: extrato metanólico de BRM055674 em TSPM a 50%; TSPM80: extrato metanólico de BRM055674 em TSPM a 80%;

O ensaio de microdiluição de caldo foi realizado nos extratos TSPM20, TSPM80, e TCA80, os quais apresentaram halo de inibição maior que 10 mm contra *S. aureus*. A concentração inibitória mínima (CIM) foi de 500 µg/mL para todos os extratos, sendo de 125 µg/mL para o controle positivo (amoxicilina). Conforme o documento M7-A6 do CLSI/NCCLS e os suplementos M100-S15 e 17, considera-se CIM de 500 a 1000 µg/mL como atividade antimicrobiana leve. Portanto, os três extratos testados neste ensaio apresentaram atividade antimicrobiana leve (NCCLS, 2003; CLSI, 2007).

Conclusões

O presente estudo demonstrou que os microrganismos não produziram antioxidantes, pelo contrário, houve perda de atividade antioxidante no substrato fermentado que em relação ao substrato não fermentado. Isso pode ocorrer devido a produção de enzimas oxidativas por fungos das famílias *Pleurotaceae* e *Panaceae*, que são degradadores matéria lignocelulósica. As menores perdas de atividade antioxidante dos fermentados

de BRM055674 ocorreram nos extratos na concentração de TSPM20%, em relação ao substrato não fermentado. Para os fermentados de BRM44603, os extratos na concentração de TCA80%, tiveram a menor perda de atividade antioxidante em relação ao substrato não fermentado. A respeito do potencial antimicrobiano, os extratos dos fermentados de TCA80, TSPM20 e TSPM80 apresentaram atividade leve contra *S. aureus*.

Portanto, considerando que na literatura está descrito que a fermentação em estado sólido de basidiomicetos é capaz de degradar EF e GL presentes em nas tortas de pinhão-manso e caroço de algodão, respectivamente, além dos ensaios prévios de degradação que apresentaram resultados dentro dos níveis recomendados para alimentação animal nas concentrações de compostos tóxicos, sugere-se ensaios in vivo para a comprovação do seu uso seguro.

Apoio Financeiro

Embrapa Agroenergia, FAP-DF, CNPq, Capes.

Referências

- BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; VAZ, J. A.; FERREIRA, I. C. F. R.; BAPTISTA, P.; ESTEVINHO, L. M. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 2, p. 151–156, 2007.
- CONCEIÇÃO, A. A. Biodegradação de Substâncias Tóxicas/Antinutricionais Presentes em Tortas de Sementes Oleaginosas e Produção de Lovastina por Cocultivo de Macrofungos e *Aspergillus Terreus*. **Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia**, 2018.
- CONCEIÇÃO, A. A.; SOARES NETO, C. B.; RIBEIRO, J. A. de A.; SIQUEIRA, F. G. de; MILLER, R. N. G.; MENDONÇA, S. Development of an RP-UHPLC-PDA method for quantification of free gossypol in cottonseed cake and fungal-treated cottonseed cake. **Plos one**, v. 13, n. 5, p. e0196164, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196164>
- FLOEGEL, A.; KIM, D.-O.; CHUNG, S.-J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of food composition and analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043–1048, 2011.
- GOMES, T. G.; HADI, S. I. I. A.; COSTA ALVES, G. S.; MENDONÇA, S.; DE SIQUEIRA, F. G.; MILLER, R. N. G. Current Strategies for the Detoxification of *Jatropha curcas* Seed Cake: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 11, p. 2510–2522, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05691>
- GOMES, T. G.; MACHADO, A. E. V.; ARAÚJO, A. P.; LAVIOLA, B. G.; RIBEIRO, J. A. de A.; CAMPANHA, R. B.; HELM, C. V.; MENDONÇA, S.; DE SIQUEIRA, F. G. Degradação de ésteres de forbol da torta de pinhão-manso por macrofungos e potencial como substrato para produção de cogumelos comestíveis. In: 2015, **Embrapa Agroenergia-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. : In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 2., 2015 ..., 2015.
- KERSTEN, P.; CULLEN, D. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, n. 2, p. 77–87, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.07.007>
- LAVIOLA, B. G.; RODRIGUES, E. V. Pinhão-manso: pesquisas, conhecimentos e práticas. **Embrapa Agroenergia-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2019.
- LIN, C.-H.; WEI, Y.-T.; CHOU, C.-C. Enhanced antioxidative activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi. **Food microbiology**, v. 23, n. 7, p. 628–633, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.12.004>
- OLIVEIRA, I. S.; LIMA, J. C. S.; SILVA, R. M.; MARTINS, D. T. O. Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, p. 587–593, 2008.

PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D.; CHOW, F. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo**, 2017.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. 2016.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

SAUNDERS, W. B. Systemic and Multi-Organ Diseases. *In*: CONSTABLE, PETER; W HINCHCLIFF, KENNETH; DONE, STANLEY; GRUENBERG, W. (org.). **Veterinary Medicine**. 11ª Edição ed. Nova Iorque: Elsevier, 2017. p. 2002-2214.

SEPTIMUS, E. J. Antimicrobial resistance: an antimicrobial/diagnostic stewardship and infection prevention approach. **Medical Clinics**, v. 102, n. 5, p. 819–829, 2018.

SHEN, H.; SHAO, S.; CHEN, J.; ZHOU, T. Antimicrobials from mushrooms for assuring food safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 2, p. 316–329, 2017.

URREA-VICTORIA, V.; PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D.; CHOW, F. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. **Instituto de Biociências: Universidade de São Paulo**, 2016.

VENTURINI, M. E.; RIVERA, C. S.; GONZALEZ, C.; BLANCO, D. Antimicrobial activity of extracts of edible wild and cultivated mushrooms against foodborne bacterial strains. **Journal of food protection**, v. 71, n. 8, p. 1701–1706, 2008.