

2.08.02 – Bioquímica de Microorganismos.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FUNGOS COMESTÍVEIS COM POSSÍVEL APLICAÇÃO TERAPÊUTICA

Thaís Kimura Tomo^{1*}, Emanuelle Neiverth de Freitas², Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli³

1. Estudante da FFCLRP-USP

2. Pesquisadora da FMRP-USP

3. Professora da FFCLRP-USP - Departamento de Biologia/Orientadora

Resumo

Além de serem ricas em nutrientes, as espécies de basidiomicetos comestíveis *Ganoderma* sp., *Lentinus sajor-caju*, *Pleurotus albidus* e *Pleurotus ostreatus* possuem compostos antioxidantes em seus micélios que desempenham um papel importante para o organismo humano. Esses compostos permitem a neutralização de radicais livres e a redução do estresse oxidativo, o qual pode levar ao desenvolvimento de doenças, como alguns tipos de câncer e Alzheimer. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antioxidante dos extratos aquosos obtidos a partir do micélio das espécies de basidiomicetos citadas anteriormente. As atividades antioxidantes foram analisadas por meio do conteúdo de compostos fenólicos totais e de três ensaios antioxidantes: ABTS, poder de redução do ferro (FRAP) e capacidade de sequestro do radical hidroxila (OH). Todas as espécies apresentaram potencial antioxidante, destacando-se *Ganoderma* sp. e *P. albidus*, que exibiram os resultados mais significativos.

Palavras-chave: Extratos; micélio; radicais livres.

Apoio financeiro: CNPq.

Trabalho selecionado para a JNIC: FFCLRP-USP.

Introdução

A oxidação é uma das reações que transformam macromoléculas em energia, a qual é utilizada pelo organismo para manter suas atividades metabólicas. Durante essa reação, espécies reativas ao oxigênio (EROs) podem ser produzidas em baixas quantidades [1]. As EROs são moléculas, átomos ou íons altamente instáveis por possuírem um ou mais elétrons não pareados em uma de suas órbitas [1]. Para se estabilizarem, capturam elétrons de outras moléculas, oxidando-as. A fim de evitar que a quantidade de EROs se torne muito elevada, mecanismos de defesa endógenos baseados na ação de moléculas antioxidantes são ativados. Essas moléculas inibem a oxidação provocada pelos radicais livres, doando-lhes um de seus elétrons para estabilizá-los [1]. Quando a quantidade de EROs torna-se exacerbada e os antioxidantes endógenos não são suficientes, gera-se um estado de desbalanceamento chamado estresse oxidativo. Nele, as células podem ter seu funcionamento comprometido, já que as EROs podem reagir com algumas macromoléculas, alterar as funções biológicas delas e, assim, desencadear o desenvolvimento de diversas doenças, como Alzheimer e alguns cânceres [2].

Como, sob estresse oxidativo, os antioxidantes endógenos não são suficientes para combater a elevada quantidade de EROs, torna-se necessária a obtenção de antioxidantes exógenos por meio de alimentos e suplementos a fim de incrementar a proteção contra os radicais livres. Esses antioxidantes podem ser obtidos a partir de cogumelos comestíveis [1], grupo o foco deste trabalho.

Com base nos conhecimentos reportados na literatura quanto às propriedades antioxidantes de basidiomicetos comestíveis, este trabalho teve como objetivo avaliar o conteúdo total de compostos fenólicos e as atividades antioxidantes dos extratos aquosos das espécies *Ganoderma* sp., *Lentinus sajor-caju*, *Pleurotus albidus* e *Pleurotus ostreatus*. Para isso, como objetivos específicos foram realizados: o isolamento dessas espécies, o preparo da biomassa micelial para a extração aquosa de compostos antioxidantes presentes nos micélios, a avaliação do conteúdo de compostos fenólicos e a realização dos ensaios antioxidantes nos extratos aquosos: sequestro do radical ABTS, poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) e capacidade de sequestro do radical hidroxila (OH).

Metodologia

Sementes das espécies *Ganoderma* sp., *L. sajor-caju*, *P. albidus* e *P. ostreatus* foram obtidas do

laboratório de micélios e produção de cogumelos comestíveis Funghi & Flora (Valinhos, SP). Todas as sementes vieram em sacos contaminados por fungos e bactérias devido ao transporte. As espécies foram, então, isoladas após sucessivos repiques e cultivadas para obtenção da biomassa micelial. O meio de cultivo baseou-se no método descrito por Contato et al. (2020) [3] e era composto por farelo de trigo 10% (w/v) em água destilada e solução mineral de Vogel 2% (v/v) [4]. Posteriormente, os micélios foram submetidos à extração aquosa para obtenção dos extratos conforme o método descrito por Contato et al. (2020) [3].

Os extratos foram utilizados para estimar os compostos fenólicos totais e as atividades antioxidantes. O conteúdo de compostos fenólicos totais foi avaliado de acordo com o método de Singleton e Rossi (1965) [5] e expresso em microgramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por miligramas de extrato. Já a atividade antioxidante dos extratos aquosos de cada espécie estudada foi avaliada por meio de três diferentes ensaios: I) sequestro do radical ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid)), II) poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), e III) sequestro do radical hidroxila (OH). O ensaio ABTS foi conduzido conforme o método de Thaipong et al. (2006) [6]. Amostras dos extratos em diferentes concentrações foram avaliadas quanto à eficiência do sequestro de radicais ABTS. A concentração de extrato (mg/mL) que resultou em 50% de redução dos radicais ABTS (EC50) foi calculada a partir do gráfico da eficiência do sequestro de radicais ABTS (%) contra a concentração das amostras. Água destilada e hidroxitolueno butilado (BHT) foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente. O ensaio FRAP seguiu o método de Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000) [7]. A curva padrão foi construída com Trolox e os resultados foram expressos em μM de equivalentes de Trolox (ET) por miligrama de extrato. O ensaio da capacidade de sequestro do radical hidroxila (OH) foi conduzido conforme o método de Mu et al. (2012) [8]. Soluções sem peróxido de hidrogênio e amostra foram usadas como branco e controle negativo, respectivamente. O cálculo da EC50 para radical hidroxila foi realizado conforme descrito previamente para o ensaio do ABTS. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas.

Resultados e Discussão

A Tabela 1 ilustra os resultados (média \pm desvio padrão) dos rendimentos de extração aquosa, dos ensaios que avaliaram as atividades antioxidantes (ABTS, FRAP e sequestro do radical hidroxila) e dos fenólicos totais.

Os rendimentos da biomassa micelial foram expressos em gramas de biomassa micelial. O meio à base de farelo de trigo possibilitou um crescimento significativo dos micélios, obtendo-se uma quantidade considerável de biomassa micelial. O fungo *P. ostreatus* foi o que apresentou maior crescimento nas condições de cultivo utilizadas, com um rendimento médio de 3,7g de micélio. Dessa forma, nota-se que o farelo de trigo constitui uma importante fonte de nutrientes para os fungos se desenvolverem. A Tabela 1 apresenta médias das biomassas secas diferentes entre espécies, representando um crescimento desigual entre micélios no meio de cultivo, considerado normal ao se trabalhar com organismos vivos, uma vez que, mesmo dentro de uma mesma espécie, a assimilação de nutrientes pode ser diferente e resultar em crescimentos miceliais distintos.

O extrato de *P. albidus* exibiu maior quantidade de compostos fenólicos ($24,9 \pm 2,4 \mu\text{g}/\text{mg}$), seguido por *Ganoderma* sp. ($21,3 \pm 3,6 \mu\text{g}/\text{mg}$). Estudos já haviam apresentado que extratos de *Ganoderma lucidum* exibiram compostos fenólicos como flavonóides e ácido gálico [9].

No ensaio ABTS, as menores concentrações que causaram inibição de 50% das atividades antioxidantes foram as dos extratos de *Ganoderma* sp. ($2,4 \pm 0,5 \text{ mg}/\text{mL}$) e *P. albidus* ($3,7 \pm 0,3 \text{ mg}/\text{mL}$). Gambato et al. (2018) observaram que os extratos de *P. albidus* modularam a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), mantendo, assim, a defesa antioxidante endógena [10].

Extratos de *P. albidus* ($17,8 \pm 0,3 \mu\text{M ET}/\text{mg}$) e *Ganoderma* sp. ($16,6 \pm 0,1 \mu\text{M ET}/\text{mg}$) foram os que apresentaram maior poder de redução do ferro no ensaio FRAP. Fenóis que se ligam rapidamente ao ferro ou que se transformam em compostos com reatividade mais baixa são melhor analisados em ensaios de curto período de reação, como o FRAP [11]. Isso indica que os extratos de *P. albidus* e *Ganoderma* sp. apresentam maiores quantidade de fenóis que se ligam rapidamente ao ferro em relação a *L. sajor-caju* e *P. ostreatus*. Essa relação ainda se alinha com os resultados obtidos na avaliação do conteúdo de compostos fenólicos, dos quais *P. albidus* e *Ganoderma* sp. apresentaram maiores quantidade de fenólicos totais. Além disso, já foi reportado que atividade antioxidante de *Ganoderma lucidum* pode ser atribuída aos polissacarídeos, já que extratos de polissacarídeos dessas espécies exibiram habilidade de doar hidrogênio no ensaio FRAP [12].

As espécies *P. ostreatus* ($3,1 \pm 0,1 \text{ mg}/\text{mL}$) e *Ganoderma* sp. ($4,0 \pm 0,2 \text{ mg}/\text{mL}$) exibiram maior capacidade de sequestro do radical hidroxila resultando em uma menor EC50. Foi sugerido que a presença de ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno e flavonóides pode contribuir para a atividade antioxidante dos extratos de *P. ostreatus* [13].

Tabela 1. Rendimento micelial, compostos fenólicos totais e ensaios antioxidantes (ABTS, FRAP e OH).

Espécie	Rendimento Seco (g)	Fenólicos Totais (EAG) ^a	ABTS (EC50)	FRAP ^b	Sequestro do radical hidroxila (EC50)
<i>Ganoderma</i> sp.	1,2 ± 0,5	21,3 ± 3,6	2,4 ± 0,5	16,6 ± 0,1	4,0 ± 0,2
<i>Lentinus sajor-caju</i>	1,3 ± 0,5	8,5 ± 1,3	4,6 ± 0,2	10,0 ± 0,8	5,8 ± 0,2
<i>P. albidus</i>	0,5 ± 0,0	24,9 ± 2,4	3,7 ± 0,3	17,8 ± 0,3	14,1 ± 0,2
<i>P. ostreatus</i>	3,7 ± 0,5	8,8 ± 0,9	4,7 ± 0,0	10,7 ± 0,7	3,1 ± 0,1

a µg de equivalente de ácido gálico (EAG) por mg de extrato.

b µM de equivalente de Trolox (ET) por mg extrato.

Conclusões

O potencial antioxidante dos basidiomicetos comestíveis é atribuído à presença de diversos componentes, como fenóis e polissacarídeos, que apresentam habilidade scavenger, quelante e redutora, também sendo capazes de alterar vias de sinalização celular e de regular a expressão de genes que expressam enzimas antioxidantes. A partir dessas informações, as espécies comestíveis *Ganoderma* sp., *Lentinus sajor-caju*, *Pleurotus albidus* e *Pleurotus ostreatus* foram selecionadas e usadas para a obtenção de compostos antioxidantes. Para isso, meios suplementados com farelo de trigo foram inoculados com o micélio dessas espécies. Esse tipo de meio demonstrou-se vantajoso por três motivos: o baixo custo do farelo, o fácil acesso a ele e o crescimento micelial relativamente rápido nesse tipo de meio. Além disso, os extratos aquosos obtidos a partir da biomassa micelial são mais vantajosos frente aos do corpo de frutificação e aos alcoólicos, uma vez que o tempo de desenvolvimento do micélio e a citotoxicidade são menores. Essas vantagens tornam o produto mais barato e reduzem a demanda energética para produzi-lo. Os extratos aquosos obtidos a partir da biomassa micelial de todas as espécies estudadas neste trabalho exibiram atividade antioxidante em todos os ensaios realizados, destacando-se *Ganoderma* sp. e *P. albidus*, que apresentaram os resultados mais significativos na maioria das avaliações. Nesse sentido, os resultados sugerem que o micélio de todas as espécies estudadas, principalmente os de *Ganoderma* sp. e de *P. albidus*, podem ser usados para produção de nutracêuticos, como fontes de antioxidantes naturais suplementares para combater doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

Referências bibliográficas

- [1] C. Sánchez, "Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms," **Synthetic and Systems Biotechnology**, vol. 2, no. 1. 2017, doi: 10.1016/j.synbio.2016.12.001.
- [2] M. Kozarski et al., "Antioxidants of edible mushrooms," **Molecules**, vol. 20, no. 10. 2015, doi: 10.3390/molecules201019489.
- [3] A. G. Contato et al., "Biochemical Properties and Effects on Mitochondrial Respiration of Aqueous Extracts of Basidiomycete Mushrooms," **Cell Biochem. Biophys.**, vol. 78, no. 1, pp. 111–119, 2020, doi: 10.1007/s12013-020-00901-w.
- [4] H. J. VOGEL, "A convenient growth medium for *Neurospora crassa*," **Genet. Bull.**, vol. 13, 1956.
- [5] V. L. Singleton e J. A. Rossi, "Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents," **Am. J. Enol. Vitic.**, vol. 16, no. 3, 1965.
- [6] K. Thaipong et al., "Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts," **J. Food Compos. Anal.**, vol. 19, no. 6–7, pp. 669–675, 2006, doi: 10.1016/j.jfca.2006.01.003.
- [7] R. Pulido, L. Bravo, e F. Saura-Calixto, "Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay," **J. Agric. Food Chem.**, vol. 48, no. 8, pp. 3396–3402, 2000, doi: 10.1021/jf9913458.
- [8] H. Mu et al., "Antioxidative properties of crude polysaccharides from *Inonotus obliquus*," **Int. J. Mol. Sci.**, vol. 13, no. 7, pp. 9194–9206, 2012, doi: 10.3390/ijms13079194.
- [9] S. Veljović et al., "Chemical composition, antiproliferative and antioxidant activity of differently processed *Ganoderma lucidum* ethanol extracts," **J. Food Sci. Technol.**, vol. 54, no. 5, pp. 1312–1320, 2017, doi: 10.1007/s13197-017-2559-y.

- [10] G. Gambato et al., "*Pleurotus albidus* modulates mitochondrial metabolism disrupted by hyperglycaemia in EA.hy926 endothelial cells," **Biomed Res. Int.**, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/2859787
- [11] Í. Gulcin, "Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview," **Archives of Toxicology**, vol. 94, no. 3. 2020, doi: 10.1007/s00204-020-02689-3.
- [12] M. Kozarski et al., "Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*," **J. Food Compos. Anal.**, vol. 26, no. 1–2, pp. 144–153, May 2012, doi: 10.1016/j.jfca.2012.02.004.
- [13] T. Jayakumar, "In-vitro and in-vivo antioxidant effects of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*," **Food Res. Int.**, vol. 44, no. 4, pp. 851–861, 2011, doi: 10.1016/j.foodres.2011.03.015.