

## Prospecção de substâncias antioxidantes em cogumelos da região sudoeste do Paraná

## Screening of antioxidant substances in mushrooms from the southwestern region of Paraná

### RESUMO

O intuito do projeto que originou o presente experimento é prospectar substâncias antioxidantes em cogumelos da região Sudoeste do Paraná. Foram realizadas fermentações em meio líquido, com os cogumelos de seis linhagens adquiridas comercialmente: *Pleurotus ostreatus* (linhagens preta, branca e cinza) (SP, PO2 e POP2), *P. pulmonarius* (PSC), *P. citrinopileatus* (PC) e *P. djamor* (PL3) com a finalidade de avaliar a atividade antioxidante dos caldos de cultivo, através de um método baseado no radical ABTS+. Os cultivos submersos foram conduzidos entre 25°C e 30°C, em incubadora com agitação orbital, a 120 rpm, por 21 dias. Observou-se que os extratos analisados dos fermentados de micélio geraram uma modesta atividade antioxidante. Dentre as linhagens analisadas, PC foi a que teve mais atividade antioxidante, enquanto PL3 teve a menor. Podemos concluir parcialmente que os caldos de fermentação de micélio das espécies avaliadas não são efetivos para a obtenção de antioxidantes, com os meios e condições de cultivo testados. Estudos adicionais são necessários para se avaliar outras espécies, meios e condições de cultivo, bem como técnicas de recuperação e extração.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cogumelos. Antioxidantes. ABTS.

### ABSTRACT

The purpose of the project which originated the present experiment is to screen mushrooms from the southwestern region of Paraná for antioxidant substances. Submerged fermentations were performed with six commercial strains: *Pleurotus ostreatus* (black, white and grey strains) (SP, PO2 e POP2), *P. pulmonarius* (PSC), *P. citrinopileatus* (PC) and *P. djamor* (PL3), in order to evaluate the antioxidant activity of the cultivation broths, by the application of a method based in the ABTS+ radical. Submerged cultivations were conducted in between 25°C and 30°C, in a shaker incubator, at 120 rpm, for 21 days. Modest antioxidant activities were observed for the evaluated mycelial cultivation broths. Among the analysed strains, PC showed the highest antioxidant activity, while PL3 showed the lowest activity. It is possible to partially conclude that the mycelial fermentation broths of the evaluated species are not effective for the obtention of antioxidants, using the proposed cultivation medium and conditions. However, additional studies are needed for evaluating other species, media and conditions, as well as recovery and extraction procedures.

**KEYWORDS:** : Mushrooms. Antioxidants. ABTS.

Eduardo Felimberti Cezar  
[eduardocez@alunos.utfpr.edu.br](mailto:eduardocez@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Federal do Paraná,  
Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Kelli Cristina Bacchi  
[kellibacchi@alunos.utfpr.edu.br](mailto:kellibacchi@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Federal do Paraná,  
Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Francisco Menino Destéfani  
Vítola  
[franciscovitola@utfpr.edu.br](mailto:franciscovitola@utfpr.edu.br)  
Universidade Federal do Paraná,  
Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Recebido:** 19 ago. 2020.

**Aprovado:** 01 out. 2020.

**Direito autoral:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



## INTRODUÇÃO

O fenômeno da oxidação é o processo em que íons ou moléculas perdem elétrons. Essas reações ocorrem simultaneamente com reações redutoras, que são responsáveis por adquirir os elétrons perdidos. Uma reação de oxidação ocorre de três maneiras: com a perda de elétrons, com a perda de um hidrogênio (próton) ou quando se adiciona oxigênio à substância (ATKINS; JONES, 2012).

Os radicais livres são resultantes de reações de oxirredução e são definidos como, átomos ou moléculas que têm em comum elétrons desemparelhados dispostos em uma parte importante da sua estrutura. Estão ligados ao envelhecimento e à morte celular, pois quando esses átomos e moléculas são liberados no metabolismo celular, estão altamente instáveis e reativos, assim, causando várias reações de oxidação em cadeia e originando danos na célula ou lise celular levando-as à morte, e logo, acarretando doenças degenerativas e o envelhecimento precoce em plantas, em animais e em seres humanos (SOLOMONS & FRYHLE, 2009).

Em contrapartida a esse fenômeno temos as espécies antioxidantes, que inibem (total ou parcialmente) reações oxidativas. Os exemplos mais comuns dessas substâncias são:  $\beta$ -caroteno, ascorbato (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e compostos fenólicos (BARBOSA et al., 2010).

A eficácia desses compostos depende da estabilidade do radical antioxidante formado durante as reações com radicais livres, do envolvimento do hidrogênio fenólico nas reações radicais, e das modificações nas estruturas químicas (Hall, 2001).

Os cogumelos comestíveis possuem vários compostos bioativos como glicoproteínas, polissacarídeos, que apresentam propriedades antibióticas e antioxidantes. Os principais compostos antioxidantes sintetizados por cogumelos são os ácidos fenólicos, flavonóides e tocoferóis (KRAKOWSKA et al. 2020).

O cultivo de cogumelos comestíveis é indicado em países em desenvolvimento com índice elevado de desnutrição por seu elevado conteúdo proteico. E nos países desenvolvidos, novas pesquisas vêm sendo realizadas para melhoria de qualidade produtiva e redução de custos de produção (CHANG et al., 1992).

No Brasil, o mercado de cogumelos comestíveis e medicinais apresenta grande potencial, com inúmeros produtos já existentes e uma quantidade relevantes de pesquisas em desenvolvimento. Na região sudoeste do Paraná, o clima subtropical úmido com invernos registrando geadas severas e o verão com temperaturas amenas (mínima de 23°C e máxima de 32°C) são excelentes para o desenvolvimento de macrofungos (TABALIPA; FIORI, 2008).

Em um levantamento dos macrofungos da região de Dois Vizinhos publicados no ano de 2019, foram registrados cogumelos dos filos Ascomycota e Basidiomycota. São citados também 4 gêneros e 3 famílias. Vale destacar o gênero Ganodermataceae com fungos que têm nível considerável de antioxidantes e antitumorais (OLIVEIRA, FERRARI, & ESTEVAN, 2019). O propósito do presente trabalho é prospectar substâncias antioxidantes em cogumelos da região Sudoeste do Paraná, no município de Dois Vizinhos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As espécies utilizadas para a análise foram isoladas diretamente de linhagens comerciais adquiridas com as empresas Funghi & Flora e Brasmicel. Isolamentos de espécies nativas não se desenvolveram a tempo de realizar as análises. Linhagens comerciais e seus respectivos códigos: *Pleurotus ostreatus* (linhagens preta, branca e cinza) (SP, PO2 e POP2), *P. pulmonarius* (PSC), *P. citrinopileatus* (PC) e *P. djamor* (PL3).

Reagentes utilizados: glicose, extrato de levedura,  $MgSO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , Agar Batata Dextrosado. Vidrarias e equipamentos utilizados: placas de Petri, Erlenmeyer (250 mL e 500 mL), proveta (100 mL), alça de platina, balança analítica, câmara de fluxo laminar, bico de bunsen, autoclave, BOD, estufa biológica e incubadora com agitação orbital (“shaker”).

Foi pesado o BDA para o volume de uso (250 mL ou 500 mL) e diluído em água destilada para uma concentração de 40 g/L. A solução de BDA vertida em um Erlenmeyer fechado com um tampão de algodão foi levada para autoclavagem (20 min) juntamente com as placas de Petri. O BDA foi vertido nas placas de Petri no interior da câmara de fluxo laminar. Após a solidificação do BDA as placas foram transferidas para BOD a 25°C, e depois de um período de 24 Horas, foram utilizadas para os isolamentos e manutenção das linhagens fúngicas.

As placas de Petri com BDA foram colocadas no interior da câmara de fluxo laminar e deixadas por um período de 20 minutos sob radiação ultra violeta (UV). Após desligar a lâmpada UV, as linhagens para inoculação foram também colocadas na câmara, foi ligado o bico de Bunsen e flambada a alça de platina. Com cuidado, foi retirada uma pequena parte do micélio de cada matriz e transferida para o centro das placas contendo meio de cultivo fresco (todo o processo próximo a chama para evitar contaminações). As placas foram fechadas e incubadas em BOD a 25°C, até o micélio colonizar completamente as placas.

Foi realizada a pesagem de 4 compostos para nutrição e crescimento do micélio em meio aquoso: glicose 10 g/L, extrato de levedura 4 g/L,  $MgSO_4$  0,3 g/L, e  $KH_2PO_4$  0,3 g/L. Todos os compostos foram transferidos para Erlenmeyers com 500 mL de água destilada e em seguida, os caldos foram levados para autoclavagem por um período de 20 min. Após o processo de esterilização, o meio foi levado para o interior da câmara de fluxo laminar e submetido a radiação UV por 20 min. Logo após o término do tempo de UV, foram inseridas na câmara as placas com o inóculo de interesse para fermentação. Os repiques foram realizados com alça de platina devidamente flambada em chama e os Erlenmeyers foram vedados com tampões de algodão e também com papel Kraft. Os frascos inoculados foram inseridos no “shaker” na frequência de agitação de 120 rpm e na temperatura de 28°C.

Após 21 dias, as fermentações que obtiveram crescimento micelial, foram levadas à câmara de fluxo laminar para retirada com a pipeta de 1 mL de amostras do líquido da fermentação (tomando cuidado para evitar a entrada de materiais sólidos na ponteira da pipeta) e armazenadas em microtubos de 2 mL, que foram congelados a -6°C para armazenamento até a realização das análises.

O método utilizado para medir a atividade antioxidante dos fermentados líquidos de cogumelos foi o ABTS, baseado na captura do radical 2,2’-

azinobis(3etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS•), que pode ser formado por uma reação eletroquímica, química ou enzimática (RUFINO, et al., 2007).

Reagentes utilizados: Trolox (ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2carboxílico) (PM = 250,29); ABTS (2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzo tiazolino-6sulfônico) ou sal diamônio) (PM = 548,68); persulfato de potássio (PM = 270,3); água destilada; álcool etílico P.A. e álcool metílico P.A.

Vidrarias e equipamentos utilizados: balança analítica, balões volumétricos de 10 mL, 50 mL, 1.000 mL, espectrofotômetro, cubetas de plástico (4 x 1 x 1 cm), proveta de 50 mL. e pipetas automáticas (20 µL a 200 µL e 100 µL a 1000 µL).

Dirigiu-se 500 mL de álcool metílico para um balão volumétrico de 1 L. completou-se até o menisco com água destilada, logo após de ser homogeneizada, a solução foi transferida para um recipiente de vidro âmbar.

Dissolveu-se em um balão volumétrico, com volume de 50 mL, 192 mg de ABTS com água destilada, homogeneizou-se e a solução foi direcionada a um frasco de vidro de coloração âmbar, envolvido com papel alumínio.

Em um balão volumétrico de 10 mL foi homogeneizado 378,4 mg de persulfato de potássio com água destilada até atingir o menisco, e transferido para um frasco de vidro de coloração âmbar.

O preparo do radical ABTS• se deu a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio. O reagente foi mantido no escuro à temperatura ambiente, por um período de 16 horas. Para as análises, diluiu-se a solução em álcool etílico até obter uma absorbância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm.

Homogeneizou-se 25 mg de Trolox com 50 mL de álcool etílico em um balão volumétrico, e usando álcool etílico diluiu-se o Trolox estoque variando as concentrações de 100 µM a 1800 µM.

Em ambiente com pouca luz, transferiu-se a quantidade de 30 µL das soluções de Trolox, que foram previamente diluídas, para tubos de ensaio, em duplicata. Adicionou-se aos tubos 3 mL de radical ABTS• e a mistura foi homogeneizada. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro a 734 nm, após 6 min. de reação. Álcool etílico foi utilizado como branco para calibrar.

Foi construído um gráfico com as concentrações e absorbâncias obtidas e calculada a equação da reta. A partir da equação pôde-se calcular a atividade antioxidante das amostras em relação ao Trolox (TEAC).

Foi utilizado o mesmo método descrito para elaboração da curva (volume, comprimento de onda, reagentes) para análise das amostras de fermentados. Foi retirado exclusivamente o Trolox, substituído por amostras do fermentado de micélio.

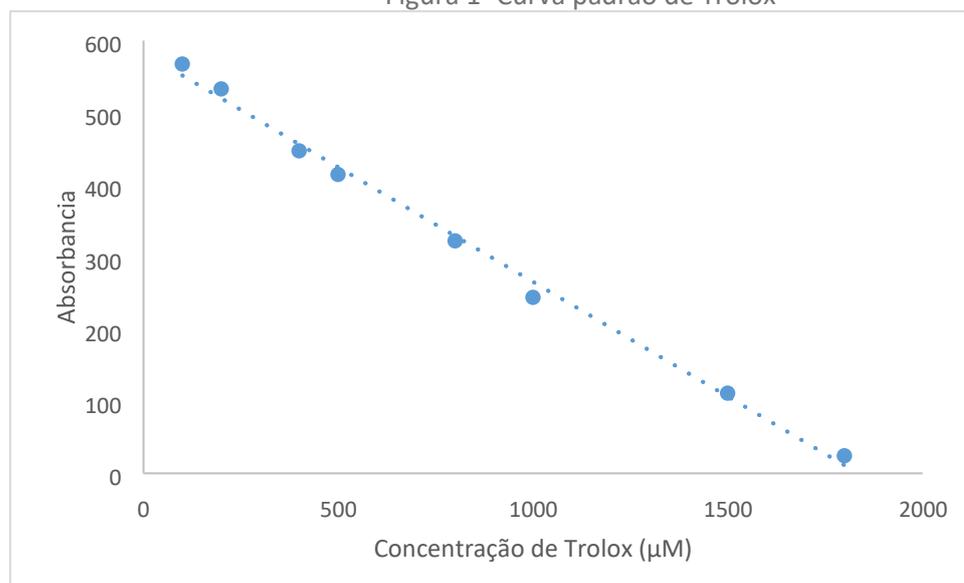
Após a leitura, as absorbâncias de cada amostra foram anotadas, e o equivalente em concentração de Trolox foi calculado substituindo as absorbâncias na equação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o período de 10 dias de fermentação de micélio foram obtidas as amostras dos caldos de fermentação, as quais foram submetidas à metodologia de ABTS• para quantificar via espectrofotômetro UV-VIS o quanto os extratos do micélio fermentado equivalem ao Trolox (antioxidante conhecido e purificado).

Para a curva padrão de Trolox (Figura 1) para comparação com os caldos fermentados de micélio, obteve-se a equação  $y = 0,318x + 583,41$ , com  $R^2 = 0,9951$ . Sendo “y” a absorbância das amostras multiplicada por 1000 e “x” a concentração de Trolox em  $\mu\text{M}$ .

Figura 1- Curva padrão de Trolox



Fonte Autoria própria (2020).

Após as análises dos extratos com o método do ABTS• foi observado que os fermentados de micélio têm alguma atividade antioxidante, ainda que modesta, conforme os resultados apresentados na Tabela 1. Dentre as espécies analisadas, o *Pleurotus citrinopileatus* (PC) foi o que resultou em mais atividade antioxidante comparado aos demais fungos. O *Pleurotus djamor* (PL3) teve a menor atividade antioxidante, assim sendo o fungo mais inviável para o processo de fermentação com objetivo de extrações de compostos antioxidantes.

Quadro 1- Amostragens

Amostra (Extrato)	Concentração (mM Trolox/L)
PL3	619,50
PO2	2453,88
PSC	2453,88
PC	6332,27
POP2	5336,48

Fonte: Autoria própria (2020).

## CONCLUSÃO

Podemos concluir parcialmente que os caldos de fermentação de micélio das espécies avaliadas não são efetivos para a obtenção de antioxidantes, com os meios e condições de cultivo testados. Estudos adicionais são necessários para se avaliar outras espécies, meios e condições de cultivo, bem como técnicas de recuperação e extração.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à UTFPR, ao orientador Francisco Vítola e a Paula Montanher por ter cedido os reagentes para o método de análise, e aos colegas Kelli Bacchi, Patricia Marins, Juliane Casarim, Mariana Rodrigues e Fábio Antonelo por ajudarem no decorrer do projeto. E também a minha família e namorada pelo apoio.

## REFERÊNCIAS

AMBRUSSI, A. N. C. O. **Fotocatálise heterogênea aplicada ao desenvolvimento de ensaios para avaliação de atividade antioxidante**. 2018. 156 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufpi.br/xmlui/handle/123456789/1966?show=full>. Acesso em: 28 jul. 2020.

ATKINS, P; JONES, L. **Princípios de química**: questionando a vida moderna e o meio ambiente. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2012. 910 p. Tradução técnica: Ricardo Bicca de Alencastro.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; DE CÁSSIA GONÇALVES ALFENAS, R.; et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de**

**Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010 . Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S14155273201000040013](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S14155273201000040013). Acesso em: 25 ago, 2020.

CHANG, S.T.; LARQUE, A.S; MARTINEZ, D.C; MORALES, M.; SOBAL, M. Thecultivation of edible mushrooms as a boost for rural development: a casestudy from Cuetzalan ara, México: **AT Source**. v.20, n.1, p.22-25, 1992.

Eira, A. F. **Cultivo de cogumelos (compostagem, condução e ambiente)**. Botucatu, São Paulo, Brasil.p. 71-81.2012. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/files/rifib/IIIRifib/71-81.pdf> . Acesso em: 27 ago.2020.

FEITOSA, C. M. **Antioxidantes**: aspectos químicos, farmacológicos e terapêuticos. Campinas: Átomo, 2017.

Hall C. 2001. Editores: Pokorný, J; Yanishlieva, N; Gordon M. **Antioxidants in food: practical applications**. Cambridge. Inglaterra: Woodhead Publishing Limited. p. 159-209.

KRAKOWSKA, A.; ZIĘBA, P.; WŁODARCZYK, A.; et al. Selected edible medicinal mushrooms from Pleurotus genus as an answer for human civilization diseases. **Food Chemistry**, v. 327, p. 127084, 2020. Elsevier Ltd. Disponível em: [https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/32446029/Selected\\_edible\\_medicinal\\_mushrooms\\_from\\_Pleurotus\\_genus\\_as\\_an\\_answer\\_for\\_human\\_civilization\\_diseases](https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/32446029/Selected_edible_medicinal_mushrooms_from_Pleurotus_genus_as_an_answer_for_human_civilization_diseases). Acesso em: 15 ago, 2020.

MAZZUTTI, S. **Obtenção de Extrato de Cogumelo do Sol (Agaricus Brasiliensis): Atividade Antioxidante, Antibacteriana e Antifúngica**. 2012, dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/99313>. Acesso em: 22 ago. 2020.

MILLER, N.; RICE-EVANS, C. A; DAVIES, M. J; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. **Clinical science**, London, V 84, N.4, P.407-412, 1993.

MIZUNO, T. Medicinal Properties and Clinical Effects of Culinary Medicinal Mushroom Agaricus blazei Murrill (Agaricomycetidae) (Review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, 299-312, 2002.

OLIVEIRA, L., FERRARI, F., & ESTEVAN, D. Fungos macroscópicos do sudoeste do Paraná: primeiros registros. **Biomedicina e Farmácia: Aproximações**, **Atena Edit.ora**. p. 37-47. 2019. Disponível em: <https://www.atenaeditora.com.br/postartigo/16389>. Acesso em: 11 ago, 2020.

QUEIRÓS, B. C. R. **Efeitos Sinérgicos da Capacidade Antioxidante de Cogumelos**. Dissertação (Mestrado), Universidade de Aveiro, Portugal, 2009. Disponível em: <https://ria.ua.pt/handle/10773/829>. Acesso em: 19 ago, 2020.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZJIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Fortaleza: Embrapa, 2007. (Comunicado Técnico).

SOLOMONS, T. W. G; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. Vol.1. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009.

STAFUSSA, Ana Paula. **Propriedades antioxidantes e perfil dos compostos fenólicos de cogumelos**. 2013. 32 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Engenharia de Alimentos, Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos,, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2013. Disponível em: <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/970>. Acesso em: 19 jul. 2020.

TABALIPA, N. L.; FIORI, A. P. Estudo Do Clima Do Município De Pato Branco, Paraná. **Synergismus scyentifica UTFPR**, v. 3, n. 4, p. 3–5, 2008. Disponível em: <http://revistas.utfpr.edu.br/pb/index.php/SysScy/article/view/287>. Acesso em : 31 ago, 2020.