

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DO COGUMELO COMESTÍVEL *Pleurotus ostreatus*

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACT OF EDIBLE MUSHROOM *P. ostreatus*

TATIANE BRUGNARI^{1*}, CAMILA GABRIEL KATO², VANESSA GESSER CORREA³, EMANUELLE NEIVERTH DE FREITAS⁴, MARIENE MARQUES NOLLI⁵, CRISTINA GIATTI MARQUES DE SOUZA⁶

1. Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas -Universidade Estadual de Maringá; 2. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos-Universidade Estadual de Maringá; 3. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos-Universidade Estadual de Maringá; 4. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas -Universidade Estadual de Maringá; 5. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas Universidade Estadual de Maringá; 6. Professora Doutora do Departamento de Bioquímica - Universidade Estadual de Maringá.

* UEM – Universidade Estadual de Maringá – Avenida Colombo, 5790, Jardim Universitário, Maringá, Paraná, Brasil. CEP: 87020-090. tatiane.bru@gmail.com

Recebido em 22/12/2015. Aceito para publicação em 04/02/2015

RESUMO

Diversos trabalhos científicos comprovaram que os cogumelos são alimentos de alto valor nutricional e de quantidades proteicas elevadas. É provado também que os cogumelos possuem compostos bioativos com propriedades terapêuticas, como por exemplo, a capacidade de produzir substâncias antioxidantes. Com base nesses dados o presente trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente o extrato aquoso obtido a partir do corpo de frutificação de *Pleurotus ostreatus*, bem como avaliar a sua capacidade antioxidante. Dentre os valores obtidos na atividade antioxidante destaca-se um CE₅₀ (concentração efetiva para se obter 50% de atividade antioxidante estimada em 100%) de 52 µg/ml na captação do radical livre ABTS. Outros ensaios *in vitro* para medir a capacidade total antioxidante também foram realizados como captação dos radicais DPPH, atividade quelante do íon ferroso e poder redutor.

PALAVRAS-CHAVE: *Pleurotus ostreatus*, Atividade Antioxidante, Extração Aquosa.

ABSTRACT

Several scientific studies show that mushrooms are food of high nutritional value and high protein quantities. It is also proved that the mushrooms have bioactive compounds with therapeutic properties, the ability to produce antioxidants. Based on these data the present study aimed to chemically characterize the aqueous extract obtained from *Pleurotus ostreatus* fruiting body as well as evaluate its antioxidant capacity. Among the values obtained in antioxidant activity highlighted a EC₅₀ (effective concentration to achieve 50% of antioxidant ac-

tivity estimated at 100%) of 52 µg / ml in the capture of free radical ABTS. Other *in vitro* assays for measuring the total antioxidant capacity They were also performed as capture of DPPH radical, chelating activity of the ferrous ion and reducing power.

KEYWORDS: *Pleurotus ostreatus*, antioxidant activity, aqueous extraction.

1. INTRODUÇÃO

Os cogumelos são macrofungos com um corpo frutífero distinto, e classificados como Basidiomycetes¹. São conhecidos desde os primórdios da humanidade por suas propriedades medicinais e nutricionais, além do grande potencial econômico, revelado recentemente pelos avanços da biotecnologia². Sob o ponto de vista nutricional, os cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus*, apresentam elevado conteúdo proteico quando comparados à maioria dos vegetais, podendo representar um alimento que contém alto teor de proteínas de boa qualidade, aminoácidos essenciais, elevada proporção de ácidos graxos insaturados, diversas vitaminas e minerais, além de baixos teores de gorduras, colesterol e calorias³. De sabor agradável e fácil cultivo é bastante popular na culinária. Uma característica importante dos cogumelos é a de possuírem compostos bioativos com propriedades medicinais, reconhecidas pelas culturas orientais, principalmente China e Japão. Diversos são os estudos que atribuem aos cogumelos propriedades terapêuticas, tais como antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, antitumoral, entre outras.

Os compostos fenólicos dos cogumelos apresentam excelente atividade antioxidante e não são mutagênicos⁴, compreendem um dos grupos de componentes não es-

senciais da dieta que tem sido associado com a inibição da aterosclerose e câncer^{5,6}. Sua bioatividade pode estar relacionada com a habilidade em quelar metais, inibir lipoxigenase e eliminar radicais livres⁷. Extratos de acetato de etila e metanol do *Pleurotus florida* demonstraram-se potentes quanto à inibição de radicais hidroxila e das atividades de peroxidação lipídica⁸. Outros trabalhos demonstraram a bioatividade dos extratos do basidioma de *Pleurotus spp*⁹ e confirmaram inibição da peroxidação lipídica pelo extrato de *Pleurotus pulmonarius*. Dentre os cogumelos comestíveis com conhecidas propriedades funcionais cita-se os seguintes gêneros: *Auricularia*, *Flammulina*, *Grifola*, *Hericium*, *Lentinus*, *Pleurotus* e *Tremella*.

Até o presente momento, muitas pesquisas foram direcionadas para as propriedades nutricionais dos cogumelos comestíveis e relativamente poucos estudos se concentram sobre suas propriedades antioxidantes. Diante do exposto o objetivo desse trabalho foi avaliar a propriedade antioxidante no extrato aquoso do corpo de frutificação do cogumelo *P.ostreatus*, como também caracterizar sua composição química.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato aquoso

O cogumelo utilizado nesse estudo foi adquirido de um comerciante local (Maringá, PR, Brasil). Obtido in natura, o basidioma foi seco em estufa a 38°C e triturado em moimho de facas até a formação de um pó. Para obtenção do extrato aquoso, 200 ml de água destilada foi acrescentada a 20g do material triturado. A mistura permaneceu sob agitação (130 rpm) por 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida o material foi filtrado e o resíduo sólido submetido ao mesmo procedimento por duas vezes. O extrato obtido foi liofilizado e armazenado a -20°C até o uso e posteriormente foi dissolvido em água destilada para posteriores análises.

Caracterização química do extrato

Para quantificar compostos fenólicos foi utilizado o método de Singleton e Rossi (1965)¹⁰, onde em 2,0 ml de amostra foram adicionados de 0,3 ml de carbonato de sódio Na₂CO₃ 1,9 M e 100 µl de reagente Folin Ciocalteu (1 M/L). A mistura foi incubada por 1 hora no escuro e a lida em espectrofotômetro a 725 nm. Uma curva de calibração de ácido gálico foi construída sob as mesmas condições, e o resultado expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG/ml). O método de Antrona¹¹ foi usado para quantificar carboidratos totais onde em banho de gelo, 1 ml de amostra foi misturado com 5 ml do reagente de antrona, posteriormente a mistura foi fervida em banho-maria por 10 minutos e retornada pelo mesmo tempo ao banho de gelo e a leitura da absorbância realizada a 625 nm. O método de Bradford (1976)¹² foi uti-

lizado para dosar proteínas, onde 2500 µl de solução de Bradford foi adicionado a 250 µl da amostra, incubado sob condições de temperatura e luminosidade ambiente por 5 minutos e a absorbância lida a 595 nm.

Atividade Antioxidante

Quatro métodos¹³ foram usados para avaliar as propriedades antioxidantes: DPPH, ABTS, Atividade Quelante do Íon Ferroso e Poder Redutor. Por ação do antioxidante, o DPPH• (cor púrpura) é reduzido formando difenil-picril-hidrazina (coloração amarela). O desaparecimento da cor pode ser monitorado pelo decréscimo da absorbância a 515nm. Dessa forma várias concentrações do extrato aquoso (0,150 ml) foram misturadas com 2,850 ml da solução do radical DPPH (0,1 mM). A mistura foi deixada por 1 h à temperatura ambiente, no escuro. Água foi usada como controle no lugar dos extratos e BHT (0,02%) serviu de controle positivo. A capacidade de sequestrar o radical DPPH foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{DPPH atividade antioxidante(\%)} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

O ABTS^{•+} foi obtido pela reação entre o ABTS (7,4 mM) e persulfato de potássio, onde a formação do radical pode ser observada pela coloração azul-esverdeada. A perda de cor após tempo determinado indica a capacidade sequestrante da amostra. Após 12 horas no escuro, a solução estoque foi armazenada e congelada até o momento do uso por até dois dias. A 1 ml dessa solução foram acrescentados 59 ml de metanol e a absorbância foi corrigida para 1,1 ± 0,01. A capacidade de sequestro do radical ABTS^{•+} foi verificada misturando-se 2,850 ml da solução de ABTS^{•+} com 0,150 ml do extrato aquoso em diferentes concentrações. A mistura permaneceu no escuro por 2 h e a absorbância foi lida a 734 nm. (Abs amostra). Água destilada foi usada como controle (Abs controle). O BHT foi usado como controle positivo. A capacidade antioxidante foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{ABTS atividade antioxidante(\%)} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

A atividade quelante do íon ferroso dos extratos foi determinada usando 0,7 ml do extrato em diferentes concentrações diluído em 0,7 ml de água destilada e misturados com 0,175 ml de FeCl₂ (0,5 mM). A absorbância (A0) foi medida a 550 nm. Depois disso, a reação foi iniciada pela adição de 0,175 ml ferrozina (0,5 mM). A mistura foi agitada vigorosamente e deixada à temperatura ambiente durante 20 min. e a absorbância (A1) foi medida a 550 nm. Como controle foi utilizado água destilada (A controle). EDTA (0,5 mM) foi usado como

controle positivo. A porcentagem de inibição da ferrozina-Fe²⁺ formada foi calculada como se segue:

$$\text{Atividade quelante (\%)} = \frac{A_{\text{controle}} - (A_1 - A_0)}{\text{Abs controle}} \times 100$$

O ensaio de poder redutor foi realizado usando o método de descrito por Oyaizu (1986)¹⁴, com algumas modificações. Diferentes concentrações de extrato foram preparadas, para cada 1,0 ml de extrato foram adicionados 2,5 ml de tampão de fosfato (0,2 M, pH 6,6) e 2,5 ml de ferricianeto de potássio (1%). A mistura foi incubada a 50°C durante 20 minutos. Após foi dispensado sobre a mistura 2,5 ml de ácido tricloroacético (10%), em seguida, centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos. 2,5 ml do sobrenadante foi misturado com 2,5 ml de água destilada e 0,25 ml de solução de FeCl₃ (0,1%). A absorbância foi medida a 700 nm. O BHT foi usado como controle positivo. A absorbância medida é comparada a do padrão e indica o poder redutor da reação.

Análise estatística

Os resultados experimentais foram obtidos pela média ± desvio padrão de três extrações. Foram submetidos ao teste ANOVA, comparados pelo teste Tukey (p < 0,05) usando o programa Graph Pad Prism® (GraphPad Software, San Diego, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento de extração calculado com base na porcentagem de peso seco do cogumelo foi de 30,99 ± 3,66%. O rendimento foi semelhante aos encontrados em vários cogumelos comestíveis, 15,9% e 43,9%¹⁵. O cogumelo *Pleurotus ostreatus* é uma fonte importante de carboidratos, fibras, minerais e vitaminas, o que os promove à classe dos alimentos nutricionalmente ricos¹⁶. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos da caracterização química em mg/g de extrato seco.

Tabela 1. Caracterização química em mg/g de extrato seco do extrato aquoso de *P. ostreatus*

Métodos	Extrato aquoso de <i>Pleurotus ostreatus</i> (mg/g)
Compostos fenólicos	20,7±1,5
Carboidratos	427,8±13
Proteínas	29±0,7

Cada valor foi expresso pela média ± desvio padrão (n=3).

Os teores de carboidratos e proteínas obtidos neste trabalho estão de acordo com Bernas *et. al* (2006)¹⁷, os quais relatam que, dos constituintes dos cogumelos,

os carboidratos são encontrados em grande quantidade, podendo variar de 16 a 85% em massa seca.

Diferentes extratos podem conter diferentes tipos e quantidades de compostos fenólicos que podem ser responsáveis pela atividade antioxidante, mas os extratos de cogumelos possuem também vários tipos de ácidos orgânicos que também são reativos nos vários métodos de antioxidantes, especialmente na quelação íon ferroso¹⁸. Antioxidantes naturais derivados de plantas, principalmente fenólicos são de considerável interesse como suplementos e conservantes de alimentos¹⁹. Considerando dados encontrados na literatura para o mesmo gênero, o extrato aquoso de *P. ostreatus* possui quantidades elevadas destes compostos (tabela 1). Sudah *et. al* (2012)²⁰ relataram o valor de 8,77±0,22 mg/g de compostos fenólicos em extrato aquoso do *Pleurotus eous*. Valores de 7,73 ±0,23 mg/g de extratos aquosos de *Pleurotus ferulae* foram encontrados por Tsai *et. al* (2009)²¹.

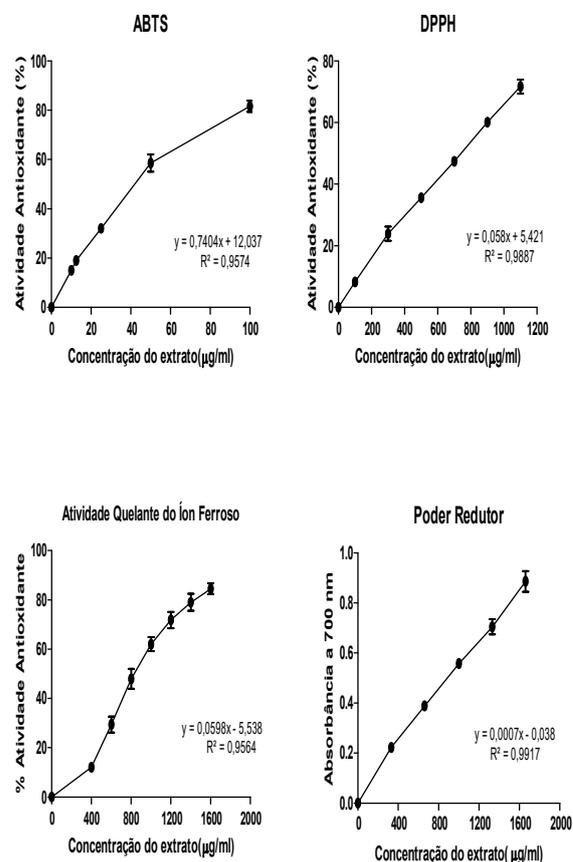


Figura 1. Atividade antioxidante do extrato aquoso de *P. ostreatus*

Vários métodos são utilizados para avaliar a capacidade antioxidante *in vitro*, de compostos naturais encontrados em alimentos. Em nossos estudos podemos afirmar que o extrato aquoso do cogumelo *P. ostreatus* ob-

teve eficiente atividade antioxidante em todos os métodos testados. Para todos os ensaios foram testadas diversas concentrações de cada extrato, a fim de encontrar através de linear regressão a concentração de extrato capaz de conferir 50% de atividade antioxidante (CE_{50}), conforme pode ser observado na Figura 1.

Os métodos que obtiveram melhores resultados de CE_{50} foram ABTS e DPPH, $0,77 \pm 0,01$ e $0,052 \pm 0,002$ mg/ml de extrato respectivamente. Esses resultados demonstram boa atividade sequestrante radicalar quando comparados a outros estudos já relatados do *P. ostreatus*, Tsai et al (2009)²¹ demonstraram um CE_{50} de $5,58 \pm 0,24$ mg/ml pelo método de DPPH. Esses são os métodos mais populares para verificar a atividade antioxidante em extratos, ambos com vantagens e desvantagens. O teste ABTS é amplamente utilizado para determinar a atividade antioxidante de compostos tanto hidrofílicos como lipofílicos²² e o DPPH é mais amplamente utilizado para determinar a atividade antiradicalar/ antioxidante de extratos de plantas ou mesmo compostos fenólicos purificados²³. O extrato se mostrou eficiente também em quelar íons ferrosos, CE_{50} de $0,93 \pm 0,04$ mg/ml, Lee et al (2007)²⁴ relataram que foram necessários $3,50 \pm 0,02$ mg/ml de extrato aquoso de *Pleurotus citrinus pileatus* para alcançar 50% de atividade quelante. Quanto ao poder redutor, o extrato obteve bons resultados, $0,88 \pm 0,03$ mg/ml quando comparado aos estudos de Tsai et al (2009)²¹ que relataram $3,42 \pm 0,08$ e $4,22 \pm 0,13$ mg/ml para extrações etanólicas e aquosa respectivamente do *P. ostreatus*.

4. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o consumo do corpo de frutificação do *P. ostreatus* pode ser benéfico para a saúde, uma vez que ele provavelmente oferece proteção antioxidante aos danos do sistema oxidativo, por ser importante fonte de compostos fenólicos capazes de combater, suprimir e inibir a formação de radicais livres. O mesmo pode ser dito sobre o seu uso como suplemento alimentar ou na indústria farmacêutica. Mais estudos são necessários para identificar as principais moléculas antioxidantes encontradas nesse cogumelo.

5. FINANCIAMENTO

Este projeto teve apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- [1] Singer R. Mushrooms and truffles. London: Leonard Hill Ltd.; 1961.
- [2] Urban AF. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2° ed. 2004; 186.
- [3] Sturion GL, Ranzani MRT. Composição em minerais de cogumelos comestíveis cultivados no Brasil - *Pleurotus* spp e outras espécies desidratadas. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 2000; 50(1):102-8.
- [4] Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. Food Chem 2003; 81(2):249-55.
- [5] Teissedre PL, Frankel EN, Waterhouse AL, Peleg H, German J B. Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. JSci Food Agric 1996; 70(1):55-61.
- [6] Williams GM, Iatropoulos MJ. Anticarcinogenic effects of synthetic phenolic antioxidants. Oxidants, antioxidants, and free radicals. USA: Taylor and Francis. 1997; 341-50.
- [7] Decker EA. Phenolics: prooxidants or antioxidants?. Nutr Rev 1997; 55(11): 396-407.
- [8] Jose N, JANARDHANAN KK. Antioxidant and antitumor activity of *Pleurotus florida*. Current Science 2000; 79(7): 941-3.
- [9] Jose N, Ajith TA, JANARDHANAN KK. Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of culinary-medicinal mushroom *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. (Agaricomycetidae). Int J Med Mushr 2002; 4(4):329-35.
- [10] Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 1965; 16(3):144-58.
- [11] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; 72(7):248.
- [12] Trevelyan WE, Harrison TS. Dosagem de glicídeos totais pelo método de antrona. J. Biochem 1952, 50:292.
- [13] Soares AS, Souza CGM, Daniel FM, Ferrari GP, Costa SMG, Peralta RM. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. Food Chem 2009; 112(4):775-81.
- [14] Oyaizu M. Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine. Jap J Nutr. 1986; 44(6):307-15.
- [15] Yang J-H, Lin H-C, Mau J-L. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. Food Chem 2002; 77:229-35.
- [16] Rampinelli JR, Silveira MLL, Gern RMM, Furlan AS, NINOW, JL, WISBECK E. Valor nutricional de *Pleurotus djamar* cultivado em palha de bananeira. Alim Nutr Araraquara 2010; 21(2):197-202.
- [17] Bernas E, Jaworska G, Lisiewska Z. Edible mushrooms as a source of valuable nutritive constituents. Acta Sci Pol Technol Alim 2006; 5:5-20.
- [18] Valentão P, Lopes G, Valente M, Barbosa P, Andrade PB, Silva BM, et al. Quantitation of nine organic acids in wild mushrooms. J Agric and Food Chem 2005; 53:3626-30.
- [19] Halliwell B, Aeschbach R, Loliger L, Aruoma OI. The characterization of antioxidant. Food Chem Toxicol 1995; 33(7):601-17.
- [20] Sudha G, Vadivukkarasi S, Babu R, Shree I, Lakshmanan P. Antioxidant Activity of Various Extracts from an Edible Mushroom *Pleurotus*. Food Sci Biotechnol 2012; 21(3):661-8.
- [21] Tsai SY, Huang SJ, Lo SH, Wu TP, Lian PY, Mau JL. Flavor components and antioxidant properties of several cul-

- tivated mushrooms. *Food Chem* 2009; 113(2):578–84.
- [22]Leong LP, Shui G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets 2002; *Food Chem*; 76(1):69-75.
- [23]Shalaby EA, Shanab SMM. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *I J Geo-MarSci* 2013;42(5): 556-564.
- [24]Lee YL, Huang GH, Liang ZC, Mau JL. Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinus pileatus*. *LWT* 2007; 40(5):823-33.