

Análise do potencial antioxidante do consumo oral da farinha produzida com micélio de *Agaricus brasiliensis* em hamsters hipercolesterolêmicos

The antioxidant potential of oral intake of flour produced from *Agaricus brasiliensis* mycelium in hamsters with hypercholesterolemia

RIALA6/1605

Ana Cláudia THOMAZ¹, Herta Stutz DALLA SANTA², Elisa PEREZ³, Daiana NOVELLO⁴, Melissa dos Santos RAYMUNDO², Fernanda BOVO⁵, Kelly Cristina de Brito OLIVEIRA⁶, Flávia Donadio PITA⁷, Rosilene REBECA⁸

*Endereço para correspondência: ¹Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR. Rua General Carneiro, 181 - Alto da Glória, Curitiba, PR, 80060-900, Brasil. Tel: (41) 9516-7064. E-mail: anaclathomaz@gmail.com

²Setor de Ciências Exatas e Tecnologia, Curso de Engenharia de Alimentos, UNICENTRO. Guarapuava, PR, Brasil.

³Setor de Ciências da Saúde, Curso de Farmácia, UNICENTRO. Guarapuava, PR, Brasil.

⁴Setor de Ciências da Saúde, Curso de Nutrição, UNICENTRO. Guarapuava, PR, Brasil.

⁵Setor de Ciências da Saúde, Curso de Farmácia, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR, Brasil.

⁶Setor de Ciência Biológicas, UNICENTRO. Guarapuava, PR, Brasil.

⁷Setor de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP. São Vicente, SP, Brasil.

⁸Setor de Ciências Biológicas, Curso de Biologia, UNICENTRO. Guarapuava, PR, Brasil.

Recebido: 16.07.2013 - Aceito para publicação: 18.06.2014

RESUMO

O sistema de defesa antioxidante inibe ou reduz os danos causados às células pelas espécies reativas de oxigênio. Alguns compostos antioxidantes presentes na dieta auxiliam na defesa antioxidante do plasma. O potencial antioxidante do consumo oral de farinha produzida com micélio de *Agaricus brasiliensis* fermentado sobre grãos de trigo foi analisado nos plasmas de hamsters *Golden Syrian* machos hipercolesterolêmicos, que foram divididos em quatro grupos: P (dieta padrão), H (dieta hipercolesterolêmica padrão), C (dieta padrão + 10 % de farinha de trigo contendo micélio de *A. brasiliensis*), e HC (dieta hipercolesterolêmica padrão + 10 % de farinha de trigo contendo micélio de *A. brasiliensis*). Os animais foram alimentados durante 40 dias e depois sacrificados para coletar materiais biológicos. A análise da capacidade antioxidante mostrou que a dieta do grupo C induziu maior aumento significativo da concentração de antioxidantes no plasma (0,39 mg.mL⁻¹, expresso em ácido ascórbico). O grupo HC apresentou maior capacidade antioxidante do que grupo H (p < 0,05), pois inibiu 20,2 % do branqueamento da crocina. O grupo H inibiu 10,4 %, porém o grupo HC demonstrou capacidade antioxidante semelhante ao do grupo P (16,64 %). O consumo da farinha de trigo contendo micélio de *A. brasiliensis* estimulou a proteção antioxidante no plasma dos animais.

Palavras-chave. *Agaricus brasiliensis*, capacidade antioxidante, hipercolesterolemia, espectrofotômetro, trigo.

ABSTRACT

The main function of antioxidant defense system is to inhibit or reduce the cells damage caused by reactive oxygen species. Some antioxidants occurring in the diet enhance the antioxidant defense of plasma. The antioxidant potential of oral intake of a flour produced with *A. brasiliensis* mycelium fermented on wheat grains was evaluated in plasma samples from male hypercholesterolemic *Syrian Golden* hamsters, were divided into four groups: P (standard diet), H (standard hypercholesterolemic diet), C (standard diet + 10 % of wheat flour containing mycelium of *A. brasiliensis*), and HC (standard diet hypercholesterolemic + 10 % wheat flour containing mycelium of *A. brasiliensis*). The animals were fed for 40 days and then sacrificed for collecting plasma. The antioxidant capacity analysis showed that the dietary intake of group C induced the most significant increase of antioxidants concentrations in plasmas (0.39 mg.mL⁻¹, expressed in ascorbic acid). The HC group showed higher antioxidant capacity than the H group (p < 0.05), as it inhibited 20.2 % of crocin bleaching, while the H group inhibited 10.4 % only; however the HC group showed a similar antioxidant capacity of P group (16.64 %). It is suggested that the consumption of wheat flour containing mycelium of *A. brasiliensis* induced the antioxidant protection in animals plasma.

Keywords. *Agaricus brasiliensis*, antioxidant capacity, hypercholesterolemia, spectrophotometer, wheat.

INTRODUÇÃO

A produção de radicais livres, de espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e animal, observada em diversas condições fisiológicas¹.

A origem das espécies reativas pode ser por fontes endógenas, como processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo, tais como: redução de flavinas e tióis; resultado da atividade de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases; presença de metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de elétrons; detoxificação hepática por meio do citocromo P-450; fagocitose e síntese de prostaglandinas. As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem tabaco, drogas, medicamentos, poluição do ar, solventes orgânicos, agrotóxicos e radiações². Além disso, o excesso de gordura no organismo, também pode levar ao aumento da geração de radicais livres³⁻⁵.

Quando a produção de radicais livres é exacerbada ou quando o sistema antioxidante é insuficiente ocorre o estresse oxidativo onde há um desequilíbrio no sistema pró e antioxidante podendo levar a oxidação da camada lipídica da membrana celular e alterações na sua estrutura e permeabilidade. Os danos oxidativos podem estar relacionados com processos patológicos como câncer, pancreatite, diabetes, hipertensão, doenças cardíacas, catarata, envelhecimento precoce entre outros^{6,7,1}.

Os agentes antioxidantes são compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares⁷.

O sistema de defesa antioxidante do organismo tem como principal função inibir ou reduzir os danos causados às células pelas espécies reativas de oxigênio. Existe uma grande variedade de substâncias antioxidantes adquiridas por meio da dieta que após serem absorvidas pelo organismo participam do sistema antioxidante do plasma^{8,1}.

Cogumelos comestíveis vêm sendo cada vez mais utilizados devido as suas propriedades funcionais. *Agaricus brasiliensis* (*A. blazei* Murill, *A. subrufescens*), também conhecido como cogumelo do sol, é um cogumelo originário da cidade de Piedade, São Paulo, Brasil, descoberto em 1960. O interesse crescente em cogumelos, em especial o *A. brasiliensis* deve-se à presença de diferentes biomoléculas, especialmente

polissacarídeos, que tem importante função de estimular o sistema imunológico, além de uma variedade de metabólitos secundários tais como compostos fenólicos, ácido ascórbico e tocoferóis possivelmente envolvidos na atividade antioxidante do cogumelo⁹⁻¹³.

Em estudo realizado por Ker et al¹¹, o extrato obtido com polissacarídeos presentes no micélio do cogumelo mostrou uma significativa capacidade de remover radicais livres obtidos pela diluição do reagente DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), e segundo Soares¹², nos estudos realizados com o basidiocarpo, foi constatado que o cogumelo é uma importante fonte de antioxidantes naturais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante da ingestão da farinha produzida com micélio de *A. brasiliensis* fermentado sobre grãos de trigo em hamsters hipercolesterolêmicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção da farinha e cultivo do micélio de *A. brasiliensis* sobre grãos de trigo

O cultivo do micélio do cogumelo *A. brasiliensis* sobre grãos de trigo, para obtenção da farinha contendo micélio, foi realizado de acordo com Dalla Santa¹⁴. Os grãos de trigo foram previamente umedecidos por 12 horas em água destilada, distribuídos em bandeja com altura de 1,5 cm³, autoclavados (121 °C/45 min) e inoculados com suspensão a 5,0 % (v/v) de micélio do cogumelo *A. brasiliensis* em meio padrão contendo glicose (20,00 g/L), extrato de levedura (3,95 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,30 g/L), e K₂HPO₄.3H₂O (0,50 g/L) e pH 6,0 (± 0,2) utilizando-se seringas autoclavadas (121 °C/45 min). O trigo inoculado ficou em estufa (Nova Ética, Brasil) a 30,0 °C durante 20 dias. No 21º dia, o trigo foi seco em estufa (Nova Ética, Brasil) sob 60 °C por 24 h e moído obtendo-se a farinha de trigo contendo micélio que foi misturada à ração.

Capacidade antioxidante *in vitro* da farinha de trigo contendo *A. brasiliensis* pelo método ABTS (2,2-azinobis-3etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)

Após o cultivo do micélio sobre os grãos de trigo e o processo de moagem, a farinha obtida foi peneirada em peneira com abertura de 300,0 mm (Bertel, Brasil). A farinha de trigo *in natura* foi obtida de acordo com os mesmos procedimentos descritos, porém sem a inoculação da suspensão de micélio.

Para a extração das substâncias antioxidantes

da farinha de trigo fermentada com micélio de *A. brasiliensis* (FTF) e *in natura* (FT) utilizou-se o seguinte procedimento: 40,0 mL de solvente (água ou água:metanol 50:50 v/v) foram adicionados a 5,0 g de amostra (125 mg.mL^{-1}) e mantidos sob agitação por tempo adequado (60 minutos e 150 minutos) em chapas de agitação magnética (Quimis, Brasil), conforme segue: FT 1 e FTF 1 (água/60 min); FT 2 e FTF 2 (água/150 min); FT 3 e FTF 3 (água:metanol/60 min) FT 4 e FTF 4 (água:metanol/150 min). Após período de agitação, os extratos foram filtrados em papel filtro de 110 mm de diâmetro (Whatman nº 1) e utilizados na avaliação da capacidade antioxidante, *in vitro*, pelo método ABTS, que baseia-se na descoloração do radical ABTS (2,2-azinobis-3etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico) com persulfato de potássio, conforme a metodologia de Kuskoski et al¹⁵. A porcentagem de inibição do radical foi calculada em função da concentração de Trolox (6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), vitamina E sintética. Os resultados foram expressos em TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) e em porcentagem de inibição do radical ABTS.

Tratamentos dos animais

O ensaio biológico foi desenvolvido no laboratório de Fisiologia Humana do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), PR, 2010.

Foram utilizados 40 hamsters machos (*Mesocricetus auratus*) da raça *Golden Syrian*, com 120 dias de idade, pesando em média 134 g, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia, vinculado a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual de São Paulo. Os animais foram transportados até o local do experimento em quatro caixas com dez animais em cada uma, em veículo climatizado. Esta espécie foi escolhida por ser muito usada em estudos de efeito de drogas e dieta sobre o metabolismo de lipídios e aterosclerose¹⁶.

Após o transporte, os animais foram alojados em caixas coletivas de polipropileno (10 por caixa) com tamanho de 43x43x20 cm, no Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Farmácia da UNICENTRO, com temperatura média de 25 °C, sendo expostos por 12 horas à claridade e 12 horas ao ambiente escuro, permanecendo em período de adaptação ao ambiente durante quatorze dias e recebendo

dieta comercial na forma particulada (granulometria maior 2,0 mm) da BioBase (BIO-TEC[®]). O experimento durou 54 dias (14 dias de adaptação e 40 dias utilizando as dietas experimentais).

Delineamento experimental e dietas experimentais

Durante a fase de adaptação utilizou-se a ração comercial BioBase (BIO-TEC[®]) com granulometria menor que 2,0 mm, para os quatro grupos. Após o período de adaptação, dividiram-se os grupos de animais em: **Grupo H** (n = 10 animais) que recebeu uma formulação para indução da hipercolesterolemia que foi baseada em Frota et al¹⁷; **Grupo HC** (n = 10 animais) que recebeu uma formulação para indução da hipercolesterolemia, porém contendo na ração hipercolesterolêmica adição de micélio do cogumelo *A. brasiliensis* produzido por cultivo sólido em grãos de trigo na forma particulada (granulometria maior que 2 mm); **Grupo C** (n = 10 animais) que foi alimentado com uma dieta contendo na ração padrão, utilizada na fase de adaptação, adição de micélio do cogumelo *A. brasiliensis* produzido por cultivo sólido em grãos de trigo na forma particulada (granulometria maior 2 mm) e; **Grupo P**, controle ou padrão (n = 10 animais), neste grupo os animais foram alimentados com a mesma ração comercial utilizada na fase de adaptação.

As dietas experimentais foram administradas durante 40 dias e podem ser verificadas na Tabela 1.

As rações foram preparadas semanalmente. Os ingredientes foram pesados em uma balança (Bel, Brasil) e misturados com o auxílio de uma espátula, após foram armazenadas a 4 °C no laboratório de Pesquisa de Cultivo de Cogumelo do Departamento de Engenharia de Alimentos da UNICENTRO, até o momento de sua utilização.

Os animais receberam ração e água *ad libitum*. Durante o experimento, os mesmos foram pesados semanalmente para avaliar o peso individual e do grupo. As dietas foram pesadas e trocadas diariamente, para verificar a quantidade diária ingerida pelo grupo, desprezando-se qualquer remanescente da dieta.

Coleta de material biológico

Para a coleta de material biológico (sangue), no 41º dia de experimento, os hamsters foram sacrificados de acordo com Damy et al¹⁸. Foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de xilazina (Rompum[®]) – 10 mg/kg de peso (pré-anestésico geral) e cloridrato

Tabela 1. Ingredientes e composição química das dietas

Dietas/ Ingredientes	P	H	C	HC
Ração comercial BIO-TEC® (%)*	100	84,6	90	75
Cloreto de colina (%)	-	0,3	-	0,3
Gordura de coco (%)	-	13,5	-	13,5
Óleo de soja (%)	-	1,6	-	1,6
Micélio de <i>A. brasiliensis</i> (%)***	-	-	10,0	10,0
Composição química**				
Matéria mineral máxima (%)	10,0	10,0	10,0	10,0
Proteína mínima (%)	22,0	22,0	22,0	22,0
Extrato etéreo mínimo (%)	4,0	4,0	4,0	4,0
Colesterol (%)	-	0,1	-	0,1
Cálcio máximo (%)	1,4	1,4	1,4	1,4
Matéria fibrosa máxima (%)	8,0	8,0	8,0	8,0

*A ração comercial BIO-TEC® é composta por: milho moído, farelo de soja, farelo de trigo, premix aminoácido mineral vitamínico, calcário calcítico, fosfato bicálcico e cloreto de sódio (sal comum); **Informada pela empresa BioBase fabricante da ração BIO-TEC® ratos e camundongos; Grupo P: dieta comercial padrão; Grupo H: dieta experimental hipercolesterolêmica; Grupo C: dieta experimental com micélio de *A. brasiliensis*; Grupo HC: dieta experimental hipercolesterolêmica com micélio de *A. brasiliensis*; ***Micélio de *A. brasiliensis* produzido por cultivo sólido em grãos de trigo na forma particulada (farinha contendo micélio)

de ketamina (Ketalar®) – 100mg/kg de peso (anestésico geral). Antes da coleta de sangue, as seringas foram lavadas com heparina (Liquemine®). Após a anestesia, o sangue foi coletado individualmente por punção cardíaca em tubos heparinizados e submetidos à centrifugação (3.500 rpm por 15 min). O sobrenadante (plasma) foi então armazenado em microtubos tipo Eppendorf e estocados a -80 °C para as análises do colesterol total e capacidade antioxidante. Ressalva-se que um dos animais do grupo H foi a óbito imediatamente antes que seu sangue pudesse ser retirado.

Análise da concentração de colesterol total

O colesterol total foi medido através do kit Colestat (Wiener®), baseado no método enzimático-colorimétrico (CHOP/PAP) com colesterol esterase, colesterol oxidase e 4-aminoantipirina. A leitura dos resultados foi realizada em espectrofotômetro (BioPlus 2000, Brasil), em 505 nm do Laboratório de Química Farmacêutica (LabQFar) do Departamento de Farmácia da UNICENTRO.

Análise da capacidade antioxidante

A crocina utilizada na avaliação da capacidade antioxidante do plasma foi isolada do açafrão segundo metodologia de Hadizadeh et al¹⁹. Sua concentração foi

ajustada para 25 µM, com adição do mesmo tampão, usando o coeficiente $\epsilon_{443} = 89,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ através da fórmula $C \cdot \text{dil} = A/\epsilon$, onde C = concentração em mol/L; dil = diluição da amostra; e A = absorvância da amostra, de acordo com Lussignoli et al²⁰.

As análises da capacidade antioxidante foram realizadas no plasma dos 4 diferentes grupos de hamsters. A metodologia utilizada foi adaptada de Lussignoli et al²⁰, conforme descrito a seguir: em microtubos do tipo eppendorf de 2,0 mL foram adicionados 100 µL da solução de crocina e 10 µL de plasma, sendo que o volume foi completado para 150 µL com a solução tampão, os microtubos foram aquecidos em banho-maria a 37 °C por 10 min. Em seguida, foi adicionado 100 µL de 2,2'-azobis-(2-amidinopopane) dihydrochloride (ABAP) (5,0 mg.mL⁻¹) recém preparado em tampão fosfato 10 mM pH 7.4. Foram feitos brancos para o plasma de cada animal, preparado da mesma maneira, porém com a substituição do ABAP por 100 µL de tampão fosfato pH 7,4. A reação ocorreu durante 90 minutos em banho-maria a 37 °C. Após 90 minutos, os microtubos foram abertos e em cada um deles foi adicionado 1 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,4 sendo agitados manualmente, para a realização da leitura em espectrofotômetro Ultravioleta (marca 600 Plus – Femto, Brasil) a 450 nm.

A porcentagem de inibição do branqueamento da crocina foi calculada de acordo com Lussignoli et al²⁰. Os resultados da capacidade antioxidante do plasma foram expressos em miligrama de ácido ascórbico por mililitro de plasma utilizando uma curva analítica de ácido ascórbico.

Para a curva analítica, usou-se como padrão externo o ácido L-ascórbico (AA). Primeiramente uma solução-estoque de AA 5 mg.mL⁻¹ foi preparada, logo após diferentes volumes dessa solução foram colocados em balões de 5 mL e o volume final completado com solução tampão fosfato. Em microtubos tipo Eppendörf foram adicionados 40 µL de cada solução de ácido ascórbico, 100 µL de crocina a 25 µM, 100 µL de ABAP a 5 mg.mL⁻¹ e 10 µL de tampão fosfato 10 mM e pH 7,4. Os microtubos foram deixados durante 90 min em banho-maria a 37 °C. As soluções resultantes foram diluídas em 1 mL de tampão fosfato 10,0 mM e pH 7,4. Com essas amostras foram feitas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro Ultravioleta (marca 600 Plus – Femto, Brasil) a 450,0 nm, para a obtenção da equação da reta, intervalo e coeficiente de correlação linear²¹. As análises foram realizadas no Laboratório de Química Farmacêutica (LabQFar) do Departamento de Farmácia da UNICENTRO.

Questões éticas

Todos os procedimentos realizados com os animais foram executados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas no “*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*”, de acordo com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná, PR (Ofício nº 23075.0376612/2010-60).

Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se Análise de Variância (ANOVA), Teste de Tukey e t de *Student* com nível de 5 % de significância, utilizando-se o *software Statgraphics Plus*, versão 5.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capacidade antioxidante, *in vitro*, da farinha contendo micélio de *A. brasiliensis*

As capacidades antioxidantes dos extratos da farinha de trigo e da farinha de trigo contendo micélio estão demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2. Capacidades antioxidantes dos extratos de farinha de trigo contendo micélio e farinha de trigo *in natura*, expressas como TEAC - Trolox equivalent antioxidant capacity (mmol trolox.kg de amostra⁻¹) e porcentagem de inibição do radical ABTS (2,2-azinobis-3etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico)

Avaliação/ Amostra	TEAC (mmol trolox.kg ⁻¹)		Inibição do radical ABTS (%)	
	FT	FTF	FT	FTF
	(Média±DP)	(Média±DP)	(Média±DP)	(Média±DP)
1	0,44±0,00 ^{abB}	0,62±0,02 ^{cA}	18,1±0,20 ^{abB}	25,1±0,72 ^{cA}
2	0,38±0,05 ^{bbB}	0,73±0,01 ^{ba}	15,5±2,01 ^{bb}	29,7±0,47 ^{ba}
3	0,48±0,02 ^{abB}	1,44±0,04 ^{aA}	19,6±0,66 ^{abB}	58,7±1,80 ^{aA}
4	0,51±0,00 ^{abB}	1,46±0,05 ^{aA}	20,6±0,15 ^{abB}	59,6±2,16 ^{aA}

Letras maiúsculas diferentes na linha mostram diferença significativa pelo teste t de *student* ($p < 0,05$); letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); FT 1: farinha de trigo *in natura* em água/60 min; FT 2: farinha de trigo *in natura* em água/150 min; FT 3: farinha de trigo *in natura* em água:metanol/60 min; FT 4: farinha de trigo *in natura* em água:metanol/150 min; FTF 1: farinha de trigo contendo micélio em água/60 min; FTF 2: farinha de trigo contendo micélio em água/150 min; FTF 3: farinha de trigo contendo micélio em água:metanol/60 min; FTF 4: farinha de trigo contendo micélio em água:metanol/150 min; DP: desvio-padrão

A capacidade antioxidante apresentada pelos extratos obtidos a partir da farinha do trigo *in natura* (FT 1, FT 2, FT 3 e FT 4) variou entre 15,5 % e 20,6 % de inibição do radical ABTS na concentração testada (125 mg.mL⁻¹).

A farinha *in natura*, independentemente do solvente e do tempo de extração, apresentou capacidade antioxidante significativamente menor que a farinha contendo micélio, o que é esperado já que o extrato de trigo integral não apresenta grande capacidade antioxidante comparado com outros cereais e frutas²².

Os extratos da farinha contendo micélio (FTF 1, FTF 2, FTF 3 e FTF 4) apresentaram valores de inibição do radical ABTS entre 25,1 % e 59,6 %. Entretanto, as menores porcentagens, assim como TEAC, estiveram correlacionadas aos extratos aquosos FTF 1 e FTF 2, enquanto as maiores capacidades antioxidantes são dadas aos extratos aquometanólicos (FTF 3 e FTF 4). O tempo de 150 minutos afetou significativamente ($p < 0,05$) o desempenho dos extratos aquosos da farinha fermentada, sendo a maior capacidade antioxidante em TEAC observada no extrato FTF 2. Os tempos de extração de 60 minutos e 150 minutos foram eficientes para a extração de todos os compostos antioxidantes solúveis em água:metanol (50:50 v/v) não demonstrando diferença estatística quanto à inibição do radical ABTS e TEAC entre as amostras FTF3 e FTF 4. Não foram localizados, na literatura científica, estudos que avaliaram a capacidade antioxidante da farinha de trigo contendo micélio. Entretanto, Ker et al¹¹, utilizando água a 100 °C para extrair os polissacarídeos do micélio, concluíram que o extrato pode funcionar como um bom antioxidante, enquanto Soares¹² não encontrou diferença significativa entre a capacidade antioxidante de diferentes extratos de cogumelo *A. brasiliensis*.

Considerando a capacidade antioxidante

encontrada *in vitro* neste estudo, foi realizada avaliação para verificar se tal capacidade antioxidante se mantinha, *in vivo*, a partir do consumo oral.

Análise da concentração de colesterol total

Os resultados das análises das concentrações dos colesteróis totais nos plasmas dos animais estão apresentados na Tabela 3.

Observa-se que os grupos de animais que receberam a dieta hipercolesterolêmica com micélio (HC) e sem micélio de *A. brasiliensis* (H) apresentaram significativamente concentrações de colesteróis totais maiores ($p < 0,05$) que os grupos P e C. A dieta contendo micélio não reduziu o nível de colesterol total dos animais.

Os dados obtidos não comprovam cientificamente o uso popular de *A. brasiliensis* como hipocolesterolêmico²⁴ e discordam de Miranda et al²⁵, que verificaram redução significativa nos níveis de colesterol total e colesterol não-HDL em ratos hipercolesterolêmicos que receberam dieta contendo 1 % de *A. brasiliensis*. Porém, é válido ressaltar que este estudo utilizou o micélio de *A. brasiliensis* fermentado sobre grãos de trigo e não o corpo de frutificação ou extrato puro como nos estudos de Miranda et al²⁵ e nos relatos populares.

Análise da capacidade antioxidante proveniente da ingestão da farinha contendo *A. brasiliensis* em plasma de hamsters hipercolesterolêmicos

O método da crocina baseado na inibição do seu branqueamento pelos radicais peróxido dodoado pela hidrólise térmica do ABAP perante a adição de antioxidantes foi utilizado no presente trabalho por ser um método simples e rápido para a mensuração do

Tabela 3. Concentração de colesterol total dos hamsters alimentados com diferentes dietas

Dietas experimentais/ Avaliação	P (Média ± DP)	H (Média ± DP)	C (Média ± DP)	HC (Média ± DP)
Colesterol total (mg.dL ⁻¹)	107,60 ± 9,11 ^b	165,0 ± 22,63 ^a	93,22 ± 12,53 ^b	155,90 ± 13,92 ^a

Fonte: Oliveira²³; Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Turkey ($p \leq 0,05$); Grupos: P: dieta padrão, H: dieta experimental hipercolesterolêmica, C: dieta experimental com *A. brasiliensis*, HC: dieta experimental hipercolesterolêmica com *A. brasiliensis*; DP: desvio-padrão

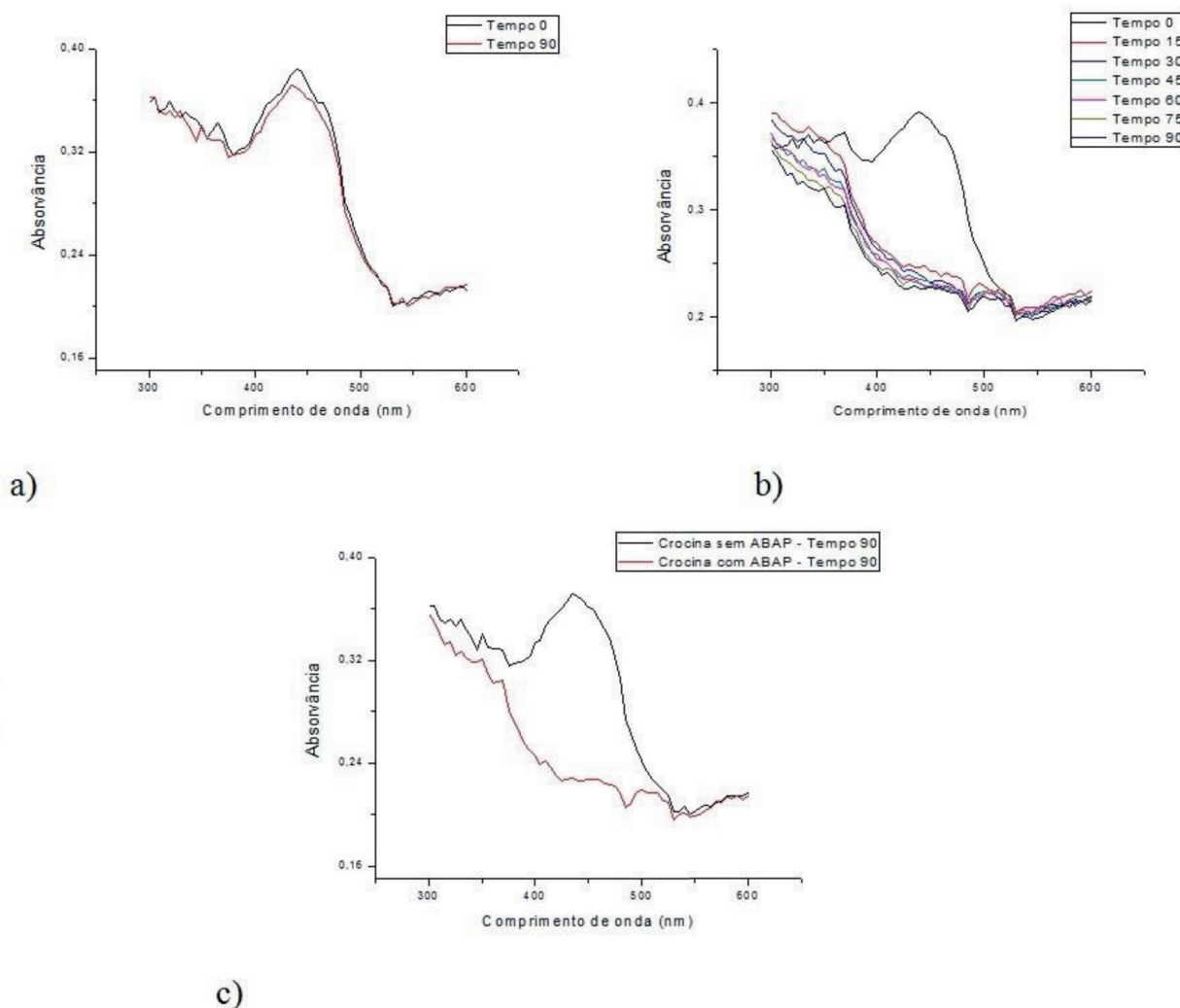


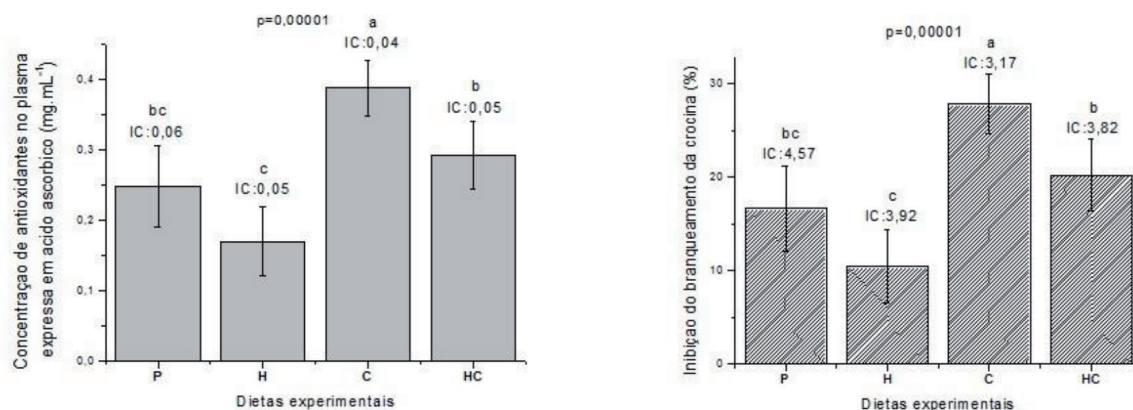
Figura 1. Absorção espectral do extrato de crocina (25 µM) na presença de tampão fosfato 10 mM, pH 7,4 e na ausência de ABAP (2,2'-azobis-(2-amidinopopane) dihydrochloride) após 90 minutos de incubação a 37 °C (a), na presença de tampão fosfato 10 mM, pH 7,4 e na presença de ABAP (2,2'-azobis-(2-amidinopopane) dihydrochloride) (5 mg.mL⁻¹) em intervalos de tempo de incubação a 37° C diferentes (b) e na ausência e na presença de ABAP (2,2'-azobis-(2-amidinopopane) dihydrochloride) (5 mg.mL⁻¹) após 90 min de incubação a 37 °C (c)

poder antioxidante em fluidos extracelulares utilizando pequenas quantidades de amostras^{19,20}. Entretanto, as análises foram feitas em espectrofotômetro ultravioleta, pois os testes realizados com ELISA mostraram que o equipamento utilizado não teve sensibilidade para analisar as diferenças nas absorvâncias das amostras. A Figura 1 apresenta as curvas que descrevem o comportamento dos espectros de absorção de luz entre 300 nm e 600 nm, do extrato de crocina utilizado nos testes com os plasmas dos hamsters submetidos aos diferentes tratamentos dietéticos.

A Figura 1 (a) mostra que o extrato de crocina no tampão fosfato 10 mM, pH 7,4, sofre pouca oxidação

durante os 90 min de incubação a 37 °C. A Figura 1 (b e c) mostra que a crocina sofre oxidação pelos radicais livres gerados pelo ABAP, e que essa oxidação é visível após 90 min de incubação a 37 °C.

Os resultados da capacidade antioxidante do plasma dos hamsters podem ser visualizados por meio da concentração de antioxidantes no plasma expressa ácido ascórbico (mg.mL⁻¹) e da porcentagem de inibição do branqueamento da crocina como mostra a Figura 2. Os resultados da concentração foram expressos em ácido ascórbico por ele ser o mais conhecido entre os antioxidantes hidrossolúveis presentes no plasma sanguíneo.



a)

b)

*Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); P: dieta padrão; H: dieta hipercolesterolêmica; C: dieta padrão+micélio; HC: dieta hipercolesterolêmica+micélio; valores da concentração (mg.mL^{-1}) \pm intervalo de confiança (IC): P: $0,25 \pm 0,06$, H: $0,17 \pm 0,05$, C: $0,39 \pm 0,04$, HC: $0,29 \pm 0,05$; Valores da inibição do branqueamento da crocina (%) \pm intervalo de confiança: P: $16,64 \pm 4,57$, H: $10,43 \pm 3,92$, C: $27,81 \pm 3,17$, HC: $20,20 \pm 3,82$.

Figura 2. Concentração de antioxidantes no plasma dos hamsters expressa em ácido ascórbico (mg.mL^{-1}) (a) e da porcentagem de inibição do branqueamento da crocina pelos radicais gerados pelo ABAP (2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride) (b)

A partir da Figura 2 (a), verifica-se que o grupo que recebeu a dieta padrão com micélio (C) apresentou maior concentração de antioxidantes ($p < 0,05$), sendo a menor concentração verificada no grupo H.

O grupo P apresentou valor de concentração de antioxidantes no plasma de $0,25 \pm 0,06 \text{ mg.mL}^{-1}$, enquanto que o grupo H, que recebeu a dieta hipercolesterolêmica, apresentou um valor inferior, mas não estatisticamente significativo, de $0,17 \pm 0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Os animais do tratamento HC apresentaram maior concentração de antioxidantes ($0,29 \pm 0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$) que o grupo H ($0,17 \pm 0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$), porém igual ao grupo padrão ($0,25 \pm 0,06 \text{ mg.mL}^{-1}$). Os resultados mostram que houve um efeito favorável do micélio do cogumelo *A. brasiliensis*, fazendo com que a resposta antioxidante no plasma do grupo HC aumentasse, apesar da condição de hipercolesterolemia estabelecida, se equiparando com o grupo sem alteração nos níveis de colesterol.

Com relação ao branqueamento da crocina, o grupo C apresentou a maior porcentagem de inibição (27,81 %) possivelmente pela maior disponibilidade de substâncias antioxidantes presentes na ração. O grupo HC inibiu 20,20 % do branqueamento enquanto o grupo que recebeu apenas dieta hipercolesterolêmica inibiu 10,43 % do branqueamento ($p < 0,05$), demonstrando que mesmo na situação de hipercolesterolemia, a dieta

contendo o micélio foi efetiva para proteger a oxidação da crocina.

Vasconcelos et al¹ descreve sobre o funcionamento do sistema antioxidante no organismo e resalta a importância da introdução de antioxidantes exógenos, por exemplo, da forma como foi realizada através da ração ofertada aos animais. Não foram encontrados na literatura outros trabalhos analisando a capacidade antioxidante no material biológico de animais hipercolesterolêmicos alimentados com farinha contendo *A. brasiliensis* fermentado sobre grãos de trigo. Contudo, Sá-Nakanishi et al²⁶, trabalhando com ratos idosos alimentados com extrato aquoso de *A. brasiliensis* administrado por via intragástrica, observaram que havia uma maior capacidade antioxidante total e menor estresse oxidativo, em homogenizado de tecido cerebral.

Além disso, Al-Dbas et al²⁷ observaram que o extrato de *A. brasiliensis* apresentou ação hepatoprotetora, elevando os níveis de antioxidantes e reduzindo a peroxidação lipídica em ratos com hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono. Niwa et al²⁸, mostraram que os tratamentos com extrato de *A. brasiliensis* puderam suprimir o aumento do estresse oxidativo em ratos diabéticos.

Os resultados obtidos nesse trabalho enfatizam que há um efeito sistêmico do micélio do cogumelo,

fazendo com que a resposta antioxidante do plasma aumente, tanto nos animais saudáveis como nos hipercolesterolêmicos. Indivíduos com elevados níveis de colesterol merecem atenção especial quanto à disponibilidade de substâncias antioxidantes, no caso, fornecidas pela ingestão da farinha de trigo contendo micélio na dieta do grupo HC, já que nos últimos anos vem sendo proposto que o acúmulo de LDL-c no sangue faz com que essas lipoproteínas se associem com os materiais da matriz extracelular e sofram peroxidação lipídica induzindo a resposta inflamatória e liberação de macrófagos, levando ao acúmulo de colesterol nos macrófagos e formação de células espumosas ricas em lipídeos precursoras das estrias de gordura no endotélio e das placas ateroscleróticas^{29,30}.

É importante lembrar que radicais livres estão envolvidos no desenvolvimento de doenças como aterosclerose, Alzheimer, câncer, diabetes entre outras^{6,7,31}. Assim, compostos que aumentem a antioxidação sistêmica através da administração oral, tais como o apresentado no presente trabalho, mostram-se de grande interesse na prevenção de tais doenças.

Alguns estudos sugerem que a oxidação da LDL pode provocar a aterosclerose e outras doenças cardiovasculares, entretanto o número de mortes é maior naqueles indivíduos com baixos níveis plasmáticos de vitamina C, sugerindo que a mesma pode prevenir o risco dessas doenças por evitar a oxidação da LDL^{31,32}. Sendo assim, é possível inferir que os hamsters do grupo HC tiveram menor oxidação plasmática (maior proteção para doenças cardiovasculares), uma vez que a concentração de antioxidantes no plasma (expresso em ácido ascórbico) é significativamente maior que naqueles hipercolesterolêmicos que não receberam o micélio de cogumelo (H).

Os dados aqui apresentados mostram que a farinha testada apresenta potencial antioxidante tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Tais dados mostram-se ainda mais relevantes, quando ressalva-se o fato dos testes terem sido efetuados em animais hipercolesterolêmicos. Assim, trabalhos que comprovem cientificamente as indicações do uso do cogumelo *A. brasiliensis* e proponham um provável mecanismo de ação, tais como o apresentado neste artigo, apresentam-se de grande valia para a nutrição e medicina humana. É válido lembrar ainda, que a farinha aqui estudada é de fácil produção e baixo custo quando comparada ao produto comercial. Porém, diante da dificuldade em encontrar na literatura trabalhos que

explorem a utilização dessa farinha como suplemento alimentar ou como terapia coadjuvante no tratamento das doenças produzidas pelo estresse oxidativo, mais estudos a esse respeito, especialmente em humanos, devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

1. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores do dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova*.2007;30(4):1323-38.
2. Carreiro DM. Terapia nutricional no estresse oxidativo. *In: Silva SMCS, Mura JDAP, editores. Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia. São Paulo: Roca; 2007. p. 611-22.*
3. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*.1989;320:915-24.
4. Napoli C. Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*.2003;1010:698-709.
5. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*.2004;114:1752-61.
6. Thomas JA. Estresse oxidativo e defesa antioxidante. *In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editores. Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença – 9ª ed. Barueri: Manole, 2003. p. 801-11.*
7. Jordão Junior AA, Vannucchi H. Radicais livres e antioxidantes. A importância da dieta. *In: Vannucchi H, editor. Nutrição Clínica. Nutrição e Metabolismo. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 417-30.*
8. Koury JC, Donangelo CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev Nutr*.2003;16(4):433-41.
9. Huang SJ, Huang LC, Chen CC, Mau JL. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*. *In: Broderick A, Nair T, editors. Proceedings of the third international conference on mushroom biology and mushroom products. Sydney, Austrália, 1999. p. 266- 74.*
10. Izawa S, Inoue Y. Screening system for antioxidants using thioredoxin-deficient yeast: discovery of thermostable antioxidant activity from *Agaricus blazei* Murill. *Appl Microbiol Biotechnol*.2004;64(4):537-42.
11. Ker YB, Chen KC, Chyau CC, Guo JH, Hsieh CL, Wang HE, et al. Antioxidant capability of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *Agaricus blazei* Mycelia. *J Agr Food Chem*.2005;53(18):7052-58.
12. Soares AA. Atividade antioxidante e compostos fenólicos do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill. [mestrado] Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2007.
13. Dalla Santa HS, Rubel R, Vitola FMD, Leifa F, Tararthuch AN, Cavalcante JHLF, et al. Kidney function indices in mice after long intake of *Agaricus brasiliensis* mycelia (= *Agaricus blazei*, *Agaricus subrufescens*) produced by solid state cultivation. *Online J Biol Sci*.2009;9(1):21-8.

14. Dalla Santa HS. Efeitos no metabolismo e ação imunomoduladora em camundongos do micélio de *Agaricus brasiliensis* produzido por cultivo no estado sólido [doutorado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2006.
15. Kuskoski EM, Ausero AG, García-Parilla MC, Troncoso AM, Fett R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciênc Tecnol Aliment*.2004;24(4):691-3.
16. Bravo E, Cantafora A, Orfu G. Why prefer the golden Syrian hamster to the Wistar rat in experimental studies on plasm lipoprotein metabolism? *Comp Biochem Physiol*.1994;107:347-55.
17. Frota KM, Mendonça S, Saldiva PH, Cruz RJ, Arêas JA. Cholesterol-lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. *J Food Sci*.2008;73(9):235-40.
18. Damy SB. Aspectos fundamentais da experimentação animal – Aplicações em cirurgia experimental. *Rev Assoc Med Bras*.2010;56(1):103-11.
19. Hadizadeh F, Mohajeri SA, Seifi M. Extraction and purification of crocin from saffron stigmas employing a simple and efficient crystallization method. *Pakistan J Biol Sci*.2010;13(14):691-8.
20. Lussignoli S, Fraccaroli M, Andrioli G, Brocco G, Bellavite P. A microplate-based colorimetric assay of the total peroxyl radical trapping capability of human plasma. *Anal Biochem*.1999;269(1):38-44.
21. Brasil, Resolução RE nº 899, 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. D.O.U. – Diário Oficial [da] União; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.
22. Oliveira MS, Dors GC, Souza-Soares LA, Badiale-Furlong E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. *Alim Nutr*.2007;18(3):267-75.
23. Oliveira KCB. Avaliação do efeito da ingestão do micélio de *Agaricus brasiliensis* produzido por cultivo no estado sólido sobre o perfil lipídico sanguíneo de hamsters. Guarapuava: Universidade Estadual do Centro-Oeste; 2010.
24. Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G. The medicinal [trabalho de conclusão de curso] mushroom *Agaricus blazei* Murril: review of literature and pharmaco-toxicological problems. *Evid Based Complement Alternat Med*.2009;5(1):3-15.
25. Miranda AM, Ribeiro GM, Cunha AC, Silva LS, Santos RC, Pedrosa ML, et al. Hypolipidemic effect of the edible mushroom *Agaricus blazei* in rats subjected to a hypercholesterolemic diet. *J Physiol Biochem*.2014;70(1):215-24.
26. Sá-Nakanishi AB, Soares AA, Oliveira AL, Comar JF, Peralta RM, Bracht A. Effects of treatment old rats with na aqueos *Agaricus blazei* extract on oxidative and functional parameters of the brain tissue and brain mitochondria. *Oxid Med Cell Longev*.2014;ID article 563179. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/563179>.
27. Al-Dbas AM, Al-Daihan SK, Bhat RS. *Agaricus blazei* Murril as an efficient hepatoprotective and antioxidante agent against CCl4-induced liver injury in rats. *Saudi J Biol Sci*.2012;19(3):303-9.
28. Niwa A, Tajiri T, Higashino H. *Ipomoea batatas* and *Agaricus blazei* ameliorate diabetic disorders with therapeutic antioxidant potencial in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Clin Biochem Nutr*.2011;48(3):194-202.
29. Silva DC, Cerchiaro G, Honório KM. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. *Quim Nova*.2011;34(2):300-05.
30. Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, Werf FV, Collen D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation*.1998;98:1487-94.
31. Bagchi K, Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterr Health*.1998;4(2):350-60.
32. Nyssönen K, Porkkala E, Salonen R, Korpela H, Salonen JT. Increase in oxidation resistance of atherogenic serum lipoproteins following antioxidant supplementation: A randomized double-blind placebo-controlled clinical Trial. *Eur J Clin Nutr*.1994;48(9):633-42.