

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO PURIFICADO DO COGUMELO *Agaricus blazei* CULTIVADO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

N. B. SOUZA *¹, C. R. CONTESSA¹, L. ALMEIDA¹, A. P. MANERA¹ e C. C. MORAES¹

¹ Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, 96413-170 - Bagé, RS – Brasil

*nathieli.souza.1995@gmail.com

RESUMO - Cogumelos são fungos macroscópicos e por não possuírem clorofila, necessitam absorver nutrientes do ambiente para sobrevivência, utilizando substâncias orgânicas em decomposição para sua nutrição. Alguns cogumelos como o *Agaricus blazei* tem mostrado seu potencial antimicrobiano frente a bactérias, bolores e algumas doenças, pela ação de compostos bioativos encontrados no micélio e corpo de frutificação. Para um maior aproveitamento destes compostos do basidiocarpo do cogumelo, são necessárias etapas de purificação. Existem muitas formas de purificar um composto, mas as técnicas cromatográficas em geral são preferidas, por sua resolução e recuperação obtidas. Com isso, objetivou-se a extração, purificação por permeação em gel e a análise antimicrobiana do extrato do cogumelo *Agaricus blazei*, frente ao micro-organismo *Staphylococcus aureus*. A fim de avaliar a capacidade antimicrobiana do extrato, foram feitas análises de porcentagem de inibição utilizando a metodologia descrita pela NCCLS (2003), as leituras de absorvância dos poços da microplaca com as amostras, foram feitos em leitora de microplacas e após, foram realizados os cálculos de porcentagem de inibição. Os resultados de inibição obtidos foram satisfatórios para 3 frações purificadas do extrato, frente ao micro-organismo estudado, mostrando a eficiência do processo de purificação, visto que a amostra bruta do extrato do cogumelo não apresentou inibição contra o mesmo micro-organismo.

Palavras chaves: cogumelos comestíveis, antimicrobiano e purificação.

1. INTRODUÇÃO

Cogumelos são fungos macroscópicos, segundo Raven (2007) que se caracterizam por serem saprófitas. Como não possuem clorofila, necessitam absorver nutrientes do ambiente para sobrevivência, utilizando substâncias orgânicas em decomposição para sua nutrição (TRABULSI, *et. al.*, 2002). Os cogumelos podem ser alucinógenos, venenosos ou comestíveis, os pertencentes a esta última classificação tem em sua composição moléculas biologicamente ativas como polissacarídeos, glicoproteínas entre outras (NOVAES & FORTES, 2005).

Segundo Godoy (2008) existe na terra aproximadamente 140.000 espécies de cogumelos, dentre esses apenas 200 espécies já tiveram seus benefícios medicinais comprovados. Cogumelos em geral são alimentos com baixos teores energéticos além de elevadas quantidades de minerais, aminoácidos essenciais, vitaminas e fibras (MAZZUTI, 2012).

O cogumelo *Agaricus blazei* também conhecido como *Agaricus brasiliensis* é um cogumelo comestível, nativo do Brasil conhecido comercialmente como Cogumelo do Sol, este possui importantes características funcionais e nutricionais (ALLIATTI, 2014). Segundo Mizuno *et. al.* (1990), o corpo de frutificação do *Agaricus blazei* fresco apresenta 85-87% de água e sua composição química em base seca é constituída de cerca de 40-45% de proteínas, rico em lisina e leucina, 3-5% de gorduras, sendo essas 72-85% polinsaturadas, apresenta 38-45% de carboidratos, 6-8% de fibras, 5-7% de cinzas, dentre estas minerais como potássio, cálcio, fósforo, magnésio, zinco, ferro, selênio e cádmio (MIZUNO, 2002). Além de vitaminas B1, B2, niacina, vitamina K e tocoferol (PIERO, 2003).

Quanto a suas características medicinais, vários estudos têm reportado que o *Agaricus blazei* apresenta atividade antibactericida (BERNARDSHAW; JOHNSON; HETLAND, 2005), antioxidante (SILVA *et. al.*, 2009), anticancerígena (MANTOVANI *et. al.*, 2008) e antifúngica (MAZZUTI, 2012), entre outros. Contessa, *et. al.* (2014) sugere que a produção de compostos bioativos pelos cogumelos se dá quando estes se sentem ameaçados, produzindo-os como sistema de defesa.

Um dos compostos bioativos mais estudados em cogumelos são as β -glucanas, polissacarídeos eficientes no tratamento de várias enfermidades (ELLERTSEN; HETLAND, 2009). Além deste composto o cogumelo *Agaricus blazei* apresenta moléculas bioativas com a lecitina, antitumoral, antimutagênica e hemaglutinizante; o ergosterol que funciona como anticarcinogênico e inibidor da angiogênese; o ácido linoléico que atua como bactericida; os esteróides que atuam contra os tumores; a arginina que funciona como anticarcinogênica e a glutamina com efeitos antioxidantes, entre outros (LAKHANPA; RANA, 2005; FORTES; NOVAES, 2006; SORIMACHI; NAKAMOTO, 2011)

Para um maior aproveitamento de alguns compostos bioativos deste cogumelo, são necessários processos de purificação, este é um processo que consiste na separação de compostos, permitindo assim a purificação e em consequência a concentração do composto de interesse. Métodos de purificação por técnicas de alta resolução são muito utilizados para este tipo de processo, uma técnica interessante é a cromatográfica por exclusão molecular, onde a coluna é recheada com resina, que contem tamanhos dos poros controlados, na qual as moléculas menores penetram estes, levando mais tempo para saírem da coluna, já as com peso molecular maior não entram nos orifícios, percorrendo o interior da coluna mais rapidamente (ZUÑIGA, *et. al.*, 2003).

A cromatografia de permeação em gel por exclusão molecular quando utilizada no extrato de fungos tem como objetivo a separação de compostos presentes neste extrato, isolando os componentes com atividade antimicrobiana e ocasionando a eliminação dos compostos indesejáveis, separando-os em várias frações (PESSOA & KILIKIAN, 2005; SCHMIDELL *et. al.*, 2001).

O fungo *Agaricus blazei* produz compostos com atividade bacteriana e antifúngica como já comprovados por Mazzuti (2012), tendo em vista a importância destes compostos na indústria de alimentos percebe-se que sua purificação torna-se interessante para diversos ramos da indústria alimentícia. Por estes motivos, teve-se por objetivo extrair e purificar o extrato obtido de

Agaricus blazei e avaliar sua ação sobre o desenvolvimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, patogênica ao homem.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultivo

Para obtenção do extrato, foi necessário o cultivo do micélio do fungo *Agaricus blazei* em Agar Extrato de Malte, por fermentação em estado sólido. A partir de uma placa com o fungo já desenvolvido, este foi repicado com bisturi estéril, no tamanho de 1 cm² para um crescimento radial uniforme, então foi colocado sobre o Agar já solidificado em placa de Petri com 9 cm de diâmetro e incubado em estufa bacteriológica com circulação de ar à 25 °C até o desenvolvimento total do fungo no perímetro da placa.

2.2. Extração

O extrato do micélio do fungo *Agaricus blazei* foi obtido a partir da extração do agente antimicrobiano contido no micélio com auxílio de solvente com Tween p.s. 80 e uma alça bacteriológica, que auxilia na raspagem das hifas presas ao Agar. Após a raspagem a solução resultante foi acondicionada em frasco âmbar, para evitar perdas de componentes por foto-oxidação. O frasco contendo a amostra foi submetido à agitação em shaker na temperatura de 60 °C. A solução foi filtrada com membrana de 0,45µm, para a retirada de partículas maiores presentes no extrato, que poderiam interferir nos procedimentos posteriores.

2.3. Purificação

Foi utilizada uma coluna cromatográfica C10/20 (GE Healthcare), preenchida com gel Sephacryl (40–20.000 KDa) até altura de 10 cm. A coluna foi previamente recheada e esterilizada com álcool 70%. Após, foi alimentado 1 mL de extrato do cogumelo com auxílio do eluente tampão fosfato de sódio pH 6,5 e uma bomba peristáltica a uma vazão de 0,1 mL/min. Foram recolhidas 10 frações na saída da coluna, para análise da atividade antimicrobiana.

2.4. Análise Antimicrobiana

Todas as análises foram feitas a partir da metodologia descrita nas normas da NCCLS (2003), onde nas microplacas com 96 poços foram adicionados 145 µL de caldo Müller Hinton, utilizado como nutriente para o desenvolvimento do micro-organismo, 135 µL de extrato purificado, a fração de interesse ou a amostra bruta (sem purificação) e por último 20 µL de microbiota contaminante, neste caso o micro-organismo que se deseja analisar é o *Staphylococcus aureus*, o qual foi incubado em caldo BHI 24 horas antes do uso, todos os poços com amostra foram realizados em triplicata. Além dos poços com amostra, foi realizada uma triplicata de poços controle, onde no lugar das 135 µL de extrato, foi adicionada a mesma quantidade de água com Tween p.s. 80. Nestes poços considerou-se 100% de crescimento do micro-organismo para posteriores cálculos de porcentagem de inibição. As leituras de

absorvância foram realizadas em leitora de Elisa na faixa de 630 nm, considerando duas leituras, uma após a inoculação do micro-organismo nos poços e uma 16 horas após a incubação na temperatura de 35 °C em estufa bacteriológica.

2.5. Cálculos de Porcentagem de Inibição

Os cálculos de porcentagem de inibição do micro-organismo foram realizados baseados na equação (1), onde a absorvância dos poços controle foram considerados como 100% de crescimento microbiano e a absorvância dos poços com amostras considerados como X%, onde quanto mais turvo o meio, maior o crescimento do micro-organismo naquela solução.

$$\% \text{ inibição} = \frac{(100 - \text{Absorvância Poços Amostra})}{\text{Absorvância Poços controle}} \times 100 \quad (1)$$

2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As porcentagens de inibição das 10 frações de extrato purificadas em relação ao micro-organismo *Staphylococcus aureus*, estão dispostas na Figura 1.

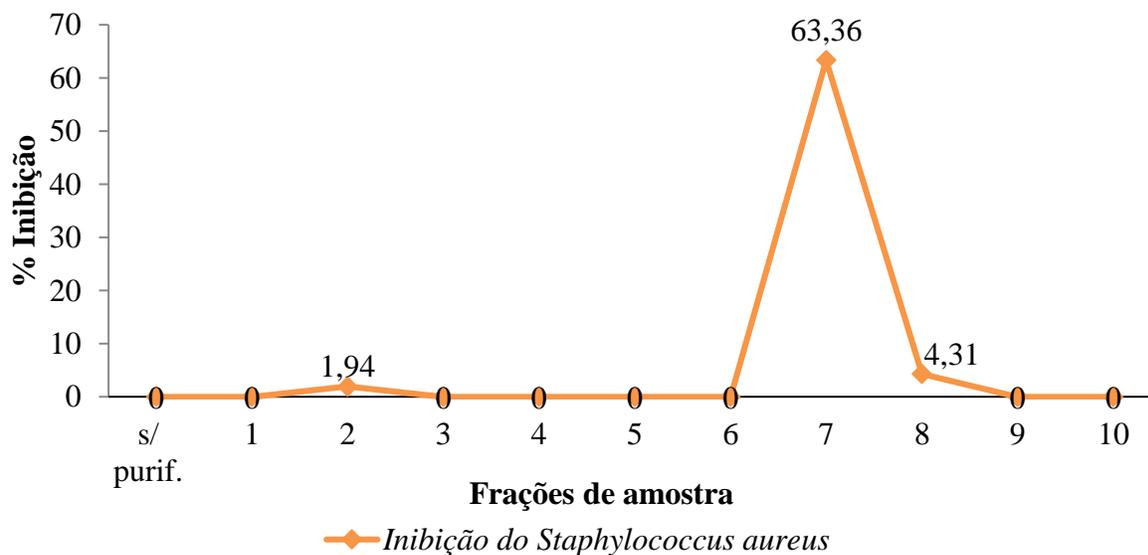


Figura 1- Porcentagem de inibição das frações frente ao micro-organismo *Staphylococcus aureus*.

Na Figura 1, pode-se constatar que o cogumelo *Agaricus blazei* nas condições de estudo, não apresentou compostos com ação antimicrobiana no extrato bruto, contudo Contessa, *et. al.*

(2014) mostra que a porcentagem de inibição do agente depende das condições que o micélio do fungo está durante a extração. No entanto, o extrato apresentou compostos com ação antimicrobiana, que se destacaram após a purificação e seu isolamento nas frações 2, 7 e 8, sendo que na 7 o composto teve maior atividade contra o desenvolvimento do micro-organismo, 63,36% de inibição. Souza, *et. al.* (2014) em seus estudos apontam uma porcentagem de $23,4 \pm 0,32\%$ de inibição do extrato bruto do cogumelo *Agaricus blazei*, cultivado por fermentação em estado sólido em Agar dextrose batata, contra o micro-organismo *Staphylococcus aureus* e $11,08 \pm 0,16\%$ para o micro-organismo *Escherichia coli*, nas mesmas condições de estudo, confirmam os resultados satisfatórios quanto à presença do agente.

Os resultados de Mazzuti (2012) demonstraram o poder de controle da bacteriose do tomateiro provocada por *Xanthomonas vesicatoria*, a partir do extrato aquoso de basidiocarpos de *Agaricus blazei*, comprovando a presença de compostos com ação antibactericida com poder de controle da bactéria.

Contudo, são necessários mais estudos na área de purificação de biocompostos oriundos de extratos de biomassa de cogumelos, pois ainda é uma área de pesquisa pouco explorada e estes fungos se mostram interessantes quanto à presença de compostos com diversas ações de interesse na indústria tanto alimentícia como farmacêutica e cosmética. Os próximos estudos serão voltados à determinação e caracterização dos compostos presentes neste extrato, que apresentam ação antimicrobiana contra outros micro-organismos estudados.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que o micélio do cogumelo *Agaricus blazei* produziu compostos com ação antimicrobiana, que se destacaram após a purificação pela técnica de permeação em gel, nas condições de estudo. A purificação resultou em 3 frações com atividade antimicrobiana, sendo que em uma delas obteve-se cerca de 63% de inibição frente ao *S. aureus*, mostrando a eficiência do processo.

6. AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos (LMTA) da Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, Campus Bagé, pelo espaço físico, ao Programa de Desenvolvimento Acadêmico – PDA e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo incentivo financeiro à pesquisa e a Fundação Universidade Regional de Blumenau - FURB pela oportunidade.

7. REFERÊNCIAS

ALLIATI, C. Enriquecimento nutricional no cultivo do *Agaricus blazei* com ferro e zinco e elaboração de preparação alimentícia com a farinha do cogumelo. Centro Universitário UNIVATES. 99 pag. Lajeado – RS. 2014.

BERNARDSHAW, S; JOHNSON, E; HETLAND, G. An Extract of the Mushroom *Agaricus blazei* Murill Administered Orally Protects Against Systemic *Streptococcus pneumoniae* Infection in Mice. Scandinavian Journal of Immunology, v. 62, n. 4, p. 393-398, 2005.

CONTESSA, C. R; SOUZA, N. B; ALMEIDA, L; MANERA, A. P; MORAES, C. C. Avaliação da atividade antimicrobiana do cogumelo comestível *Pleorotus sajor-caju* em diferentes temperaturas. XXVI Congresso Regional de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia - CRICTE, 2014.

FORTES, R. C; NOVAES, M. R. C. G. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos Agaricales e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 52, n. 4, p. 363-371, 2006.

LAKHANPAL, T. N; RANA, M. Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. Plant Genetic Resources, v. 3, n. 2, p. 288-303, 2005.

MANTOVANI, M. S; Bellini, M. F; Angeli, J. P. F; Oliveira, R. J; Silva, A. F; Ribeiro, L. R. β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Reviews in Mutation Research*, v. 658, n. 3, p. 154-161, 2008.

MAZZUTTI, S. Obtenção de extrato de Cogumelo do Sol (*Agaricus Brasiliensis*): atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica. Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis. 119 pag. Santa Catarina- SC, 2012.

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.

MIZUNO, T; HAGIWARA, T; NAKAMURA, T; ITO, H; SHIMURA, K; SUMIYA, T; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. Agricultural and Biological Chemistry, v. 54, n. 11, p. 2889 – 2896, 1990.

NCCLS. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição; v. 23, nº. 2, 2003.

NOVAES, M. R. C. G; FORTES R. C. Efeitos antitumorais de cogumelos comestíveis da família agaricaceae. Nutr Bras 2005;4(4):207-17.

PESSOA, Jr. A; KILIKIAN, B. V. Purificação de Produtos Biotecnológicos. 1ª ed. Barueri-SP: Manole, 2005.

PIERO, R. M. Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shitake) e *Agaricus blazei* (Cogumelo-do-Sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos. Universidade de São Paulo – USP. 171 pag. Piracicaba –SP. 2003.

RAVEN, P. H; EVERT, R. F; EICHHORN, S. E. Biologia Vegetal. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

SILVA, A. C. et al. Utilização de extrato de cogumelo como antioxidante natural em óleo vegetal. Ciência e agrotecnologia, v. 33, n. 4, p. 1103-1108, 2009.

SORIMACHI, K; NAKAMOTO, T. Alternative Medicine Safety: *Agaricus blazei* and Propolis. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, v. 14, p. 616-621, 2011.

SOUZA, N. B; CONTESSA, C. R; ALMEIDA, L; MANERA, A. P; MORAES, C. C. Obtenção de compostos antimicrobianos a partir de diferentes espécies de cogumelos comestíveis. Universidade Federal do Pampa. Bagé – RS, 2014.

SOUZA, N. B; CONTESSA, C. R; ALMEIDA, L; MANERA, A. P; MORAES, C. C; Extração e purificação por ultrafiltração de compostos bioativos de *Agaricus blazei*. Universidade Federal do Pampa. Bagé – RS, 2015.

TRABULSI, L. R. Microbiologia. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002.

ZUÑIGA, A. D. G; PEREIRA, J. A. M; COIMBRA, J. S. R; MINIM, L. A; ROJAS, E. E. G. Revisão: Técnicas usadas no processo de purificação de Biomoléculas. Revista B. CEPPA, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 61-82, Paraná, 2003.