



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Atividade antioxidante e compostos
fenólicos do cogumelo
Agaricus blazei Murrill**

Andréia Assunção Soares

Orientadora: Prof^a. Dra. Cristina Giatti Marques de Souza

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Rosane Marina Peralta

Maringá
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANDRÉIA ASSUNÇÃO SOARES

**Atividade antioxidante e compostos
fenólicos do cogumelo
Agaricus blazei Murrill**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular), da Universidade Estadual de Maringá para obtenção do grau de Mestre.

Maringá
2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

S676a Soares, Andréia Assunção
Atividade antioxidante e compostos fenólicos do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill / Andréia Assunção Soares. -- Maringá : [s.n.], 2007.
56 [1] f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora : Prof. Dr. Cristina Giatti Marques de Souza.
Co-orientadora : Prof. Dra. Rosane Marina Peralta
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2007.

1. Cogumelos medicinais. 2. Atividade antioxidante.
3. Alimentos funcionais. 4. Compostos fenólicos totais.
I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas.

Cdd 21.ed. 579.6

Orientadora

Prof^a Dra. Cristina Giatti Marques de Souza

Co-orientadora

Prof^a Dra. Rosane Marina Peralta

*"Há para todas as coisas, um tempo
determinado por Deus".
Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo
para todo o propósito debaixo do céu:
Há tempo de nascer e tempo de morrer;
Tempo de plantar e tempo de arrancar o que se
plantou;
Tempo de matar e tempo de curar;
Tempo de derrubar e tempo de edificar;
Tempo de chorar e tempo de rir;
Tempo de prantear e tempo de saltar;
Tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntar
pedras;
Tempo de abraçar e tempo de afastar-se de
abraçar;
Tempo de buscar e tempo de perder;
Tempo de guardar e tempo de jogar fora;
Tempo de rasgar e tempo de coser;
Tempo de estar calado e tempo de falar;
Tempo de Amar e tempo de aborrecer;
Tempo de guerra e
Tempo de Paz..."*

Eclesiastes 3, 1-8

*Aos meus pais Antonio e Cleusa
A minha irmã Dayana*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dra. Cristina Giatti Marques de Souza, pela dedicação, apoio e competente orientação que possibilitou a realização deste trabalho.

À Prof^a Dra. Rosane Marina Peralta pelo constante apoio e empenho durante a realização deste trabalho.

À Prof^a Dra. Sandra Maria Gomes da Costa pela confiança e credibilidade depositada na minha vida profissional e pessoal.

À Maria Aparecida Ferreira Costa e a Alvina Chaves pela amizade e gentil colaboração.

Às colegas do laboratório: Cissa, Giseli, Giseli Cristina, Ana, Francielle, Regina, Heloísa e Márcia pela convivência harmoniosa, descontração, incentivo e espírito coletivo.

A toda minha família e amigos pela convivência que contribuiu para meu crescimento pessoal, consciente e responsável.

Aos meus pais Antonio e Cleusa e a minha irmã Dayana, pelo amor e confiança depositada em mim em todos os momentos da minha vida.

ABSTRACT

Mushrooms, especially basidiomycetous fungi, are valuable food, low in calories and high in minerals, essential amino acids, vitamins and fibers. Some of them produce compounds with potential pharmacological effects and are called medicinal mushrooms. Studies have demonstrated that the regular consumption of mushrooms or consumption of isolated bioactive constituents present in mushrooms is benefit to health. Mushrooms may thus be considered as functional food. The list of possible effects of mushrooms which promote good health is long and includes immunity improvement, blood levels cholesterol and lipid reduction, blood pressure reduction, blood glucose attenuation, among several other actions. Mushrooms accumulate a variety of secondary metabolites such as phenolic compounds, polyketides, terpenes and steroids possibly involved in their medicinal effects and functional values. It is important to note that the accumulation of these compounds is dependent of management, processing and maturity at the time of harvest.

Agaricus blazei Murril, is a basidiomycete popularly known in Brazil as *Cogumelo do Sol* and *Cogumelo Piedade*. It was brought to Japan where it is known as *Himematsutake*, *Agarikusutake* or *Kawarihiratak*. It is widely used today in several Oriental countries both as an edible mushroom, considered as functional food and natural therapy in the form of a medicinal extract used mostly for prevention and treatment of cancer. In Brazil it is a consumed as concentrated extract or tea and popularly used against a variety of diseases such as diabetes, atherosclerosis, hypercholesterolemia, heart disease, etc. Although some works have described that its isolated β -glucan could stimulate the proliferation of lymphocyte T-cells in mice and exhibit antitumor and

antimicrobial activities in animals, *A. blazei* medical effects are intensively promoted without any real scientific evidence of clinical benefit for the patients. The basidiocarps of *A. blazei* are normally commercialized in young (immature) stage due to commercial requirements. The mature fruiting bodies have lower commercial value, although in this stage the basidiocarps are also rich in β -glucans.

In the first work, the antioxidant activities and total phenolic contents of *Agaricus blazei* Murrill methanolic extracts at different fruiting body maturity stages (young - YB and mature - MB) were evaluated. Several biochemical assays were used to screen the antioxidant properties: reducing power, radical scavenging capacities, inhibition of lipid peroxidation and chelating ability for ferrous ions. Minor differences in the composition of phenolic compounds were detected, but the extracts showed similar antioxidant activities, except for the chelating ability for ferrous ions, higher in MB than in YB. Our results support the use of both young and mature fruiting bodies of *A. blazei* as good sources of antioxidant compounds.

The objective of the second study was to compare the efficiency of different solvents (absolute ethanol, hydroalcoholic solution at 20, 50 and 70%, cereal alcohol at 25%, cold water, and water at 60° C) in the extraction of phenolic compounds with antioxidant activity from young basidioma of *Agaricus blazei*. All extractor solutions were efficient in the extraction, with exception of absolute ethanol, and could be used to obtain extracts with high anti-oxidant activities.

The results obtained in this study, confirm Cogumelo do Sol as an important source of natural antioxidants. Further studies are necessary to identify the main antioxidant molecules found in this important mushroom.

Key words: *Agaricus blazei*, young fruiting body, maturity stage, total phenolic compounds, antioxidant activity.

RESUMO

Cogumelos, especialmente os basidiomicetos, são alimentos valiosos, com baixos teores energéticos e elevadas quantidades de minerais, aminoácidos essenciais, vitaminas e fibras. Alguns deles produzem compostos com potenciais efeitos farmacológicos e são chamados de cogumelos medicinais. Estudos têm demonstrado que o consumo regular de cogumelos ou o consumo de seus constituintes bioativos é benéfico para a saúde. Cogumelos podem, portanto, serem considerados como alimentos funcionais. A lista de possíveis efeitos benéficos dos cogumelos é longa e incluem aumento da imunidade, redução dos níveis sanguíneos de colesterol e lipídeos, redução da pressão sanguínea, atenuação dos níveis sanguíneos de glicose, entre várias outras ações. Cogumelos acumulam uma variedade de metabólitos secundários tais como compostos fenólicos, policetídeos, terpenos e esteróides possivelmente envolvidos em seus efeitos medicinais e funcionais. É importante registrar que o acúmulo destes compostos é dependente do manejo, processamento e maturidade no período da colheita.

Agaricus blazei Murril, é um basidiomiceto conhecido no Brasil como *Cogumelo do Sol* e *Cogumelo Piedade*. Foi introduzido no Japão onde é conhecido como *Himematsutake*, *Agarikusutake* ou *Kawarihiratak*. É largamente utilizado em vários países do Oriente como cogumelo comestível, considerado como alimento funcional na forma de extratos medicinais usados na prevenção e tratamento de câncer, diabetes, aterosclerose, hipercolesterolemia, doenças cardíacas, etc. Embora alguns trabalhos tenham descrito que sua β -glucana isolada possa estimular a proliferação de linfócitos T em ratos e exibir atividades antitumor e antimicrobial em animais, os efeitos medicinais de *A. blazei* são intensivamente promovidos sem evidências científicas de benefícios clínicos para os pacientes. Os basidiocarpos (corpos de frutificação) de *A. blazei* são comercializados normalmente no estágio

jovem (imaturos), devido a exigências do mercado. Os corpos de frutificação maduros têm menor valor comercial, embora neste estágio os basidiocarpos sejam ricos em β -glucanas.

No primeiro artigo, as atividades antioxidantes e os conteúdos em fenólicos totais de extratos metanólicos *Agaricus blazei* em diferentes estágios de maturidade (jovens - YB e maduros - MB) foram avaliados. Diversos ensaios bioquímicos foram utilizados para avaliar suas propriedades antioxidantes: poder redutor, capacidade em seqüestrar radicais livres, inibição da peroxidação lipídica e habilidade em quelar íons ferrosos. Pequenas diferenças na composição em compostos fenólicos foram detectadas, mas os extratos apresentaram atividades antioxidantes muito similares, exceto para a habilidade em quelar metais, maior nos extratos de basidiomas maduros que dos basidiomas jovens. Nossos resultados sustentam o uso de ambos, maduros e imaturos basidiomas de *A. blazei* como boas fontes de compostos antioxidantes.

O objetivo do segundo trabalho foi comparar a eficiência de diferentes solventes (etanol absoluto, soluções hidro-alcoólicas a 20, 50 e 70%, álcool de cereais a 25%, água fria e água a 60° C) na extração de compostos fenólicos com atividade antioxidante de basidiomas jovens de *Agaricus blazei*. Todas as soluções extratoras foram eficientes, exceto o etanol absoluto, e podem ser utilizados para a obtenção de extratos com elevada atividade antioxidante.

Os resultados obtidos neste estudo confirmam o Cogumelo do Sol como uma importante fonte de antioxidantes naturais. Estudos futuros são necessários para a identificação das suas principais moléculas antioxidantes.

Palavras chaves: *Agaricus blazei*, basidiomas jovens, estágios de maturação, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado é apresentada na forma de 02 artigos científicos:

- 1 Antioxidant activities and total phenolic contents of *Agaricus blazei* Murrill methanolic extracts at different fruiting body maturity stages. Andréia Assunção Soares, Rosane Marina Peralta, Sandra Maria Gomes da Costa, Francielle Marina Daniel, Gisele Pezente Ferrari e Cristina Giatti Marques de Souza, a ser submetido ao periódico científico ***Food Chemistry***.
- 2 Avaliação da extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante do basidioma jovem de *Agaricus blazei* Murrill (cogumelo do sol). Andréia Assunção Soares, Sandra Maria Gomes da Costa, Rosane Marina Peralta, Cristina Giatti Marques de Souza a ser submetido ao periódico científico ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***.

ARTIGO 1

Antioxidant activities and total phenolic contents of *Agaricus blazei* Murrill methanolic extracts at different fruiting body maturity stages.

Andréia Assunção Soares⁽¹⁾, Rosane Marina Peralta⁽²⁾, Sandra Maria Gomes da Costa⁽³⁾, Francielle Marina Daniel⁽¹⁾, Gisele Pezente Ferrari⁽¹⁾ and Cristina Giatti Marques de Souza^{(2)*}

⁽¹⁾Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas; ⁽²⁾Departamento de Bioquímica; ⁽³⁾Departamento de Biologia; Universidade Estadual de Maringá, 87.020-900, Maringá, PR, Brazil.

Abstract

The antioxidant activities and total phenolic contents of *Agaricus blazei* Murrill methanolic extracts at different fruiting body maturity stages (young - YB and mature - MB) were evaluated in this work. Several biochemical assays were used to screen the antioxidant properties: reducing power, radical scavenging capacities, inhibition of lipid peroxidation and chelating ability for ferrous ions. Minor differences in the composition of phenolic compounds were detected, but the extracts showed similar antioxidant activities, except for the chelating ability for ferrous ions, higher in MB than in YB. Our results support the use of both young and mature fruiting bodies of *A. blazei* as good sources of antioxidant compounds.

Key words: *Agaricus blazei*; antioxidant activity; phenolic compounds; mushrooms; maturity stage.

1. Introduction

Free radicals are produced in normal and pathological cell metabolism. Oxidation is essential to most living organisms for the production of energy to fuel biological processes. However, oxygen-centred free radicals and other reactive oxygen species (ROS) are involved in the onset of many diseases such as cancer, rheumatoid arthritis, cirrhosis and arteriosclerosis as well as in degenerative processes associated with ageing. Almost all organisms are well protected against free radical damage by oxidative enzymes such as superoxide dismutase and catalase or chemical compounds such as α -tocopherol, ascorbic acid, carotenoids, polyphenol compounds and glutathione (Niki, Shimaski & Mino, 1994). However, these systems are many times insufficient to totally prevent the damage, resulting in diseases and accelerated ageing. Natural products with antioxidant activity may be used to help the human body to reduce oxidative damage (Halliwell & Gutteridge, 2003; Mau, Chao & Wu, 2001). Many fruits, vegetables, herbs, cereals, sprouts, seeds and edible mushrooms have been investigated for antioxidant activity in the last years. Mushrooms, especially basidiomycetous fungi, are a popular and valuable food, low in calories and high in minerals, essential amino acids, vitamins and fibers (Mattila et al., 2002). Some of them produce compounds with potential pharmacological effects and are called medicinal mushrooms (Mau, Lin & Song, 2002).

For centuries, mushrooms have been used as food and for medicinal or functional purposes by various ethnic groups throughout the world, especially in Japan, China and Mexico (Chang & Buswell, 2003). Studies have demonstrated that the regular consumption of mushrooms or consumption of isolated bioactive constituents present in mushrooms is benefit to health. Mushrooms may thus be considered as functional food (Chang, 1996). The list of possible effects of mushrooms which promote good health is long and includes immunity improvement

(Inoue, Kodoma & Namba, 2002), blood levels cholesterol and lipid reduction (Cheng, Hou & Lu, 2002, Fukushima et al., 2001), blood pressure reduction (Kabir, Yamaguchi & Kimura, 1987), blood glucose attenuation (Konno et al., 2001), among several other actions. Mushrooms accumulate a variety of secondary metabolites such as phenolic compounds, polyketides, terpenes and steroids possibly involved in their medicinal effects and functional values (Turkoglu et al., 2007). It is important to note that the accumulation of these compounds is dependent of management, processing and maturity at the time of harvest (Barros et al., 2007, Brauer, Kimmons & Phillips, 2002).

Agaricus blazei Murril is a basidiomycete popularly known in Brazil as *Cogumelo do Sol* and *Cogumelo Piedade*. It was brought to Japan where it is known as *Himematsutake*, *Agarikusutake* or *Kawarihiratak*. It is widely used today in several Oriental countries both as an edible mushroom, considered as functional food, and natural therapy in the form of a medicinal extract used mostly for prevention and treatment of cancer. In Brazil it is a consumed as concentrated extract or tea and popularly used against a variety of diseases such as diabetes, atherosclerosis, hypercholesterolemia, heart disease, etc. (Guterrez et al., 2004; Menoli et al., 2001; Bellini et al., 2003; Firenzuoli, Gori & Lombardo, 2007; Mizuno, 1995). Although some works have described that its isolated β -glucan could stimulate the proliferation of lymphocyte T-cells in mice (Mizuno et al., 1998) and exhibit antitumor and antimicrobial activities in animals (Yan et al., 1999), *A. blazei* medical effects are intensively promoted without any real scientific evidence of clinical benefit for the patients (Firenzuoli, Gori & Lombardo, 2007; Menoli et al., 2001).

The basidiocarps of *A. blazei* are normally commercialized in young stage, due to commercial requirements. The mature fruiting bodies have lower commercial value, although in this stage the

basidiocarps are also rich in β -glucans (Camelini et al., 2005). The aim of this work was to compare the total phenolic content and the antioxidant activities of *Agaricus blazei* in two stages of fruiting body maturity. The antioxidant properties were evaluated through reducing power, DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2-Azino-bis-(3-ethybenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging activities, ferrous ion chelating ability, and inhibition of lipid peroxidation by β -carotene-linoleate system.

2. Materials and methods

2.1. Basidiocarp selection

Fruiting bodies (basidiocarps) of *Agaricus blazei* were obtained from a local producer in Maringá, PR, Brazil in Spring 2006. The basidiocarps were harvested and dried in two stages of maturity, young (cap closed), designated in this work as YB and mature (cap opened), designated here as MB (Figure 1).



Figure 1. *Agaricus blazei* fruiting bodies in two stages of maturity: young (YB) and mature (MB).

2.2. Methanolic extracts

Prior to use the basidiocarps were milled until obtaining a fine powder. The samples (5 g) were extracted by stirring with 100 ml of

methanol, at room temperature and at 130 rpm for 24 h, and filtered through Whatman n° 1 paper. The filtrates were concentrated with a rotary vacuum evaporator at 50° C. The resultant extracts were stored in freezer until use.

2.3. Determination of total phenolic contents

Total soluble phenolic compounds in the methanolic extracts were measured according to the method of Singleton & Rossi (1965) and expressed as catechin equivalents. A sample of methanolic extract was added to distilled water for 2 ml final volume. After, it was mixed with 0.3 ml of a saturated sodium carbonate (Na_2CO_3) solution and 0.1 ml of Folin-Ciocalteu 1mol/L phenol reagent. The mixture was placed for 1 h at room temperature in dark. The absorbance was measured at 725 nm against the blank.

2.4. Antioxidant properties

2.4.1. Reducing Power

The reducing power was assayed according to the method of Kuda et al. (2005) with some modifications. Different concentrations of methanolic extracts of mushrooms (1.0 ml) were mixed with 2.5 ml of phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) and 2.5 ml of 1% potassium ferricyanide. The mixture was then incubated at 50° C for 20 min. After, 2.5 ml of trichloroacetic acid (10%) was added to the mixture, which was then centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. Finally, 1.25 ml from the supernatant was mixed with 1.25 ml of distilled water and 0.25 ml FeCl_3 solution (0.1%, w/v). The absorbance was measured at 700 nm. The assays were carried out in triplicate and the results were expressed as mean values \pm standard deviations. Increased absorbance values indicate a higher reducing power. The extract concentration providing 0.5 of absorbance (EC_{50}) was calculated from the graph of

absorbance at 700 nm against the extract concentration. Butylated hydroxytoluene (BHT) was used as standard.

2.4.2. Ferrous ion chelating ability

The ferrous ion chelating ability of the methanolic extracts was determined according to the method of Senevirathne et al. (2006). A sample (0.7 ml) of each extract was diluted in 0.7 ml of distilled water and mixed with 0.175 ml of FeCl_2 (0.5 mM) and the absorbance (A_0) was measured at 550 nm. After, the reaction was initiated by the addition of 0.175 ml ferrozine (0.5 mM). The mixture was shaken vigorously for 1 min, and left standing at room temperature for 20 min when the absorbance (A_1) was measured at 550nm. The control contains water instead sample. The percentage of inhibition of ferrozine- Fe^{2+} complex formation was calculated as follows: Chelating ability (%) = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$. A lower absorbance indicates higher chelating ability. The extract concentration providing 50% chelating ability (EC_{50}) was calculated from the graph of antioxidant activity percentage against extract concentration. EDTA (0,5 mM) was used as the positive control.

2.4.3. β -carotene-linoleic acid assay

The antioxidant activity of extracts was evaluated by the β -carotene linoleate model system (Mi-Yae, Tae-Hun & Nak-Ju, 2003). β -Carotene (0.2 mg) was dissolved in 1.0 ml of chloroform. After, 0.02 ml of linoleic acid plus 0.2 ml of Tween 80 was added and mixture was left standing at room temperature for 15 min. After evaporation of chloroform, 50 ml of oxygenated distilled water was added and the mixture was shaken to form an emulsion (β -Carotene-linoleic acid emulsion). Aliquots of 3.0 ml of this emulsion were transferred into test tubes containing 0.2 ml of different concentrations of extracts. The tubes were shaken and incubated at 50° C in a water bath. As soon as

the emulsion was added to each tube, the zero time absorbance (A_0) was measured at 470 nm using a spectrophotometer. A second absorbance (A_1) was measured after 120 min. A blank, without β -carotene was prepared for back-ground subtraction. Lipid peroxidation (LPO) inhibition was calculated using the following equation: LPO inhibition (%) = $A_1/A_0 \times 100$. The assays were carried out in triplicate and the results expressed as means values \pm standard deviations. The extract concentration providing 50% antioxidant activity (EC_{50}) was calculated from the graph of antioxidant activity percentage against extract concentration. BHT was used as standard.

2.4.4. DPPH radical scavenging activity

The free radical scavenging activities of extracts were measured by using 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil (DPPH \cdot) (Blois, 2002). Briefly, 150 μ l of each extract at various concentrations were added to 2.850 ml of DPPH solution (0.1 mM), vigorously shaken and maintained for 24 h at room temperature in the dark. Methanol was used instead mushroom extract as a control. Then the absorbance was measured at 515 nm. The capability to scavenge the DPPH radical was calculated using the following equation: DPPH scavenging effect (%) = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, where A_0 was the absorbance of the control reaction and A_1 the absorbance in the presence of the sample. The assays were carried out in triplicate and the results expressed as mean values \pm standard deviations. The extract concentration providing 50% inhibition (EC_{50}) was calculated from the graph of DPPH scavenging effect against extract concentration. BHT was used as standard.

2.4.5 ABTS \cdot^+ radical scavenging activity

The free radical scavenging activities of extracts were also measured by using ABTS \cdot^+ [(2,2-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Thaipong et al., 2006). ABTS radical cation was

generated by adding 7.4 mM ABTS to 2.6 mM potassium persulfate solution and the mixture was left to stand overnight in the dark at room temperature. The ABTS radical cation solution was diluted with methanol to obtain an absorbance of 1.1 ± 0.02 units at 734 nm. Fresh ABTS^{•+} solution was prepared for each assay. An aliquot of 150 μ l of methanolic extracts at various concentrations were added to 2.850 ml of ABTS^{•+} solution for 2 h at room temperature in the dark. Methanol or water was used instead of mushroom sample as a control and BHT and catechin were used as standards. Then the absorbance was taken at 734 nm. The capability to scavenge the ABTS radical cation was calculated using the following equation: ABTS scavenging effect (%) = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, where A_0 was the absorbance of the control reaction, and A_1 , the absorbance in the presence of the sample. The assays were carried out in triplicate and the results expressed as mean values \pm standard deviations. The extract concentration providing 50% inhibition (EC50) was calculated from the graph of ABTS scavenging effect against extract concentration. BHT was used as standard.

2.5. Thin-layer chromatography analysis

Thin-layer chromatography was performed on plates of 10 cm x 10cm silica gel Polygram Sil G (Macherey - Nagel, Germany). Plates were developed in a horizontal chamber saturated with ethyl acetate: water: formic acid (85:15:10). After drying the plates were revealed using two sprays. Spray A (ferric chloride-potassium ferricyanide [$\text{FeCl}_3\text{-K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$]) was used to locate phenolic compounds. This spray was prepared at moment of the use by mixing equal volume of each salt solution at 1%. The reagent has an orange-brown colour and the phenolics present in the plate are detected by the formation of blue spots (Barton, Evans & Gardner, 1952). Spray B (0.04% DPPH in methanol) was used to locate antioxidant compounds. The use of purple reagent detected the presence of antioxidant compounds in the plate by

the formation of white spots. Upon the development and viewing of a TLC plate, the starting point and solvent front (the level the solvent reached when the plate was removed from the developing tank) were marked and all spots observed on the plate were circled in lead pencil. The location of each spot on the plate was then represented numerically by calculating a retention factor (R_f).

2.6. Column chromatographic analysis

A sample of 200 μ l of the methanolic extract was applied to a column (1.0 cm diameter and 10 cm height) silica gel 60 (100-200 mesh), grade 634, Aldrich-Germany. The material was eluted using ethyl acetate: water: formic acid solvent (85:15:10), followed by an elution using the same system in the proportion 50:50:10. Fractions (500 μ l each) were collected in test tubes and the presence of phenolics and antioxidant activities were determined by using Folin-Ciocalteu's phenol reagent and DPPH reagent, respectively.

2.7. HPLC Analysis

The selected fractions eluted from silica gel chromatography were analyzed in a HPLC system (Shimadzu Corp.), using a reversed phase Shimpak C 18 column (4.6 x 250mm), with a diode array detector, operating at 280 nm. A solvent system consisting of water: acetic acid: methanol (80:5:15) was used as mobile phase at a flow rate of 1ml/min and the injection volume was 20 μ l.

2.8. Statistical analysis

All analyses were performed in triplicate. The data were expressed as means \pm standard deviations and one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey test were carried out to test for any significant differences between the means. Differences between means at 5% ($P < 0.05$) level were considered significant.

2.9. Chemicals

The DPPH, ABTS, β -Carotene, linoleic acid, catechin, BHT, Folin-Ciocalteu phenol reagent were obtained from Sigma Chemical Co. Other chemicals were analytical degree.

3. Results and Discussion

3.1. Extraction yield

The yields of methanol extracts (% dry weight of mushroom) from both stages of maturity of *A. blazei* were very similar, 28.14 ± 1.97 % for YB and 31.65 ± 3.67 % for MB. The yield of extraction of young stage in the present work was similar to that obtained in previous work also using methanol as extractor (Huang & Mau, 2006). Tsai (2004) used ethanol and hot water to extract *A. blazei* and found extraction yields of 15.6 and 47.3%, respectively. Methanol appears to be more efficient than ethanol as extractor for *A. blazei*, but less efficient than water. The yields obtained in this work were superior than those obtained from other medicinal mushrooms such as *Coriolus versicolor* (9.16%) and *Ganoderma lucidum* (5.61%) (Mau, Lin & Song, 2002) using methanol as extractor. However, they were similar to those found for several edible mushrooms with yield varying from 15.9 to 43.9% (Yang, Lin & Mau, 2002).

3.2. EC₅₀ values and total phenolic contents

In Table 1 we present EC₅₀ values obtained in the antioxidant activity assays and the total phenolic contents for both YB and MB extracts. The mushroom in both stages revealed very similar antioxidant properties (no significant difference between EC₅₀ values, $P > 0.05$), except for the chelating ability, where MB presented a lower value of EC₅₀ ($P < 0.05$). The antioxidant properties are inversely correlated with their EC₅₀ values and values lower than 10 mg/ml are

indicative of the effective antioxidant activity (Lee, Ming-Tsung & Mau, 2007). The total phenolic contents did not change significantly in both maturity stages, and were quite high: 37.94 ± 1.16 mg/g dry YB extract and 36.90 ± 2.61 mg/g MB extract ($P > 0.05$). The antioxidant activity of plant materials is well correlated with the content of their phenolic compounds (Velioglu et al., 1998). More recently, several researchers have shown a correlation between total phenolic content and antioxidant activity in mushroom extracts (Turkoglu et al., 2007, Cheung et al., 2003; Puttaraju et al., 2006). Considering the fact that similar amounts of phenolics were obtained in both extracts, but MB presented higher chelating ability, it is reasonable to conclude that other factors, not related with the total phenolic contents, may be implicated in this property.

3.3. Antioxidant properties

The methanolic extracts were subjected to screening for their antioxidant activities. Several complementary test systems, namely β -carotene-linoleic acid assay, DPPH and ABTS radical scavenging activities, reducing power and ferrous ion chelating ability were used for the analysis.

3.3.1. Reducing power

Figure 2B shows the reducing power of YB and MB methanolic extracts as a function of their concentration. In this assay, the yellow colour of the test solution changes to various shades of green and blue, depending on the reducing power of each compound (Barros et al., 2007). The presence of reducers causes the conversion of the Fe^{3+} /ferricyanide complex used in this method to the ferrous form. By measuring the formation of Perl's Prussian blue at 700 nm, it is possible to determine the Fe^{2+} concentration. BHT (0.2 mg/ml) the positive control used in this test, had a reducing power value of at 0,771. The

reducing power of YB and MB extracts increased with their concentrations. At 5, 10 and 20 mg/ml, reducing powers from both extracts were around 0.3, 0.6 and 0.8, respectively. Huang et al. (1999) found that the methanolic extract from *A. blazei* showed a reducing power of 0.86 at 10 mg/ml, while a reducing power of around 0.7 was found to a ethanolic extract of the mushroom (Tsai, Tsai & Mau, 2007). With regard to reducing powers, the methanolic extracts of YB and MB of *A. blazei* were good as compared to edible and medicinal mushroom in general (Choi et al., 2006). However, exceptionally high reducing power has been described by some medicinal mushrooms. For example, 4 mg/ml methanolic extracts of *Ganoderma tsugae* and *Ganoderma lucidum*, present reducing powers of 2.38 and 2.28, respectively (Mau, Lin & Song, 2002).

3.3.2 Ferrous ion chelating ability

The chelating abilities of YB and MB extracts for ferrous ions were assayed in this work by the method of Kuda et al. (2005) and Senevirathne et al. (2006). In this assay the chelating agents disrupt the ferrozine-Fe²⁺ complex decreasing the red colour. The measurement at 550 nm of the rate of colour reduction therefore allows estimation of the chelating activity (Yamaguchi et al, 2000). A lower absorbance indicates higher chelating ability. Chelating effects of methanolic extracts from YB and MB of *A. blazei* on ferrous ion increased with their concentrations (Figure 2C). The chelating abilities of the methanolic extracts of MB were higher than those of extracts of YB. At 10 and 20 mg/ml, MB chelated 62±7.8% and 78±6.1% of ferrous ions whereas YB chelated 46±6.3% and 61±6.9%, respectively (P<0.05). EDTA (positive control) showed a high chelating ability of 99.3% at 0.2 mg/ml. Tsai, Tsai & Mau (2007) reported that ethanolic extracts of *A. blazei* had chelating abilities of 58.8% at 20 mg/ml. These authors suggest that moderate to high ferrous-ions chelating abilities showed by mushrooms

could be beneficial to health. Iron can stimulate lipid peroxidation by the Fenton reaction, and also accelerates peroxidation by decomposing lipid hydroperoxides into peroxy and alkoxy radicals that can themselves abstract hydrogen and perpetuate the chain reaction of lipid peroxidation (Halliwell, 1991, Chang et al., 2002).

3.3.3. β -carotene-linoleic acid assay

Figure 2A shows the antioxidant activity of the mushroom extracts as measured by the bleaching of β -Carotene-linoleate system. The free radical linoleic acid attacks the highly unsaturated β -carotene, and the presence of different antioxidants can hinder the extent of β -Carotene-bleaching by neutralizing the linoleate free radical and other free radicals formed in the system (Jayaprakasha, Singh & Sakariah, 2001). The absorbance decreased rapidly in samples without antioxidant whereas, in the presence of an antioxidant, the colour is retained for a long time (Kumaran & Karunakaran, 2006). BHT, the positive control used in this test, had 92% of antioxidant activity at 0.2 mg/ml.

The LPO inhibition of YB and MB extracts increased with the increasing concentration. At 2, 5 and 10 mg/ml, the LPO inhibition of both extracts were around 45, 80 and 90%, respectively. Similar values of LPO inhibition was found for methanolic extracts of *Lentinula edodes* (Cheung, Cheung & Ooi, 2003). In a previous study where the antioxidant activity of *Lactarius piperatus* was evaluated as a function of fruiting body maturity stages, no significant differences between LPO inhibition by immature and mature fruiting body extracts were found (Barros et al., 2007)

3.3.4. DPPH and ABTS radical scavenging activities

DPPH and ABTS, stable free radicals with characteristic absorptions at 515 and 734 nm, respectively, were used to study the radical scavenging effects of extracts. As antioxidants donate protons to these

radicals, the absorptions decrease. The decrease in absorption is taken as a measure of the extent of radical scavenging. Free radical scavenging capacities of the extracts are shown in Figure 3. The scavenging effects of both extracts increased with their concentrations to similar extents, around 90% at the concentration of 6 mg/ml. This value was considerably lower than that related by Huang et al. (1999) who found a high scavenging ability of 97.1 % at 2.5 mg/ml for the methanolic extract from *A. blazei*. The standard BTH presented a scavenging effect of 92% at the concentration of 0.2 mg/ml. Free radical-scavenging is one of the known mechanisms by which antioxidants inhibit lipid oxidation. These tests are standard assays of antioxidant activity and they provide a technique for screening the radical scavenging activity of specific compounds or extracts (Amatowicz et al., 2004).

3.4. Chromatographic analysis of phenolic compounds in the extracts

The phenolics present in both methanolic extracts were analyzed firstly by TLC using two specific spraying reagents, one to detect phenolic compounds and other to detect antioxidant activity. The revelation with FeCl_3 showed the presence of at least six spots, with *rf*'s of 0.77, 0.63, 0.47, 0.35, 0.22 and 0.05, respectively identified from the top as 1 to 6 in both extracts (Fig. 4). All of them showed antioxidant activities. Moderate antioxidant activities were detected in spots 2 and 4, and strong antioxidant activity was detected in spot 6. Identical volumes of both extracts were then applied to a silica gel column. The phenolic compounds were fractionated using ethyl acetate: water: formic acid solvent (Fig 5). Two major peaks of phenolic compounds and antioxidant activities (F_1 and F_2) were then analyzed by HPLC. The F_2 fractions of both extracts were very similar. However, F_1 fractions of YB

and MB presented some differences, specially the amount of phenolic with retention time near 5 min, more evident in YB extracts (Fig. 6).

4. Conclusions

Although in this work no attempt to identify the phenolics were undertaken, our analysis revealed minor differences in the composition of phenolic compounds in both maturity stages of *A. blazei*. Both extracts however, showed similar antioxidant activities, except the chelating ability for ferrous ions, higher in MB than in YB.

It is important to note that this is the first work to report the use of fruiting body of *A. blazei* in two maturity stages. In previous investigations the maturity stage of the fruiting bodies was not informed. Considering the regular conditions of commercialization of *A. blazei*, it is reasonable to suppose that these studies were done using young fruiting bodies. Our results support the use of young and mature fruiting bodies of *A. blazei* as good sources of antioxidant compounds.

Acknowledgements

This project was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundo Paraná. We thank the technical assistance of M. A. F. Costa and A. Chaves.

5. References

- Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, *84*, 551-562.
- Barros, L. Baptista P. & Ferreira, I.C.F.R. (2007). Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity

- measured by several biochemical assays. *Food and chemical toxicology*. Doi : 10.1016/j.fct.2007.03.006.
- Barton, G. M., Evans, R. S., & Gardner, J. A. F. (1952). Paper chromatography of phenolics substances. *Nature*, *170*, 249-250.
- Bellini, M.F., Giacomini, N.L., Eira, A. F., Ribeiro, L.R., & Mantovani, M.S. (2003). Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-K1 cells, styling different developmental phases of the mushroom. *Toxicology in Vitro*, *17*, 465-469.
- Blois, M. S. (2002). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, *26*, 1199-1200.
- Brauer, D., Kimmons, T., & Phillips. (2002). Effects of Management on the Yield and High-Molecular-Weight Polysaccharide Content of Shiitake (*Lentinula edodes*) Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 5333-5337.
- Camelini, M.C., Mendonça, M. de, Dias, F. P., & Maraschin, M. (2005). β -Glucanas do Cogumelo *Agaricus subrufescens* Peck (sinonímia *Agaricus blazei* Murrill sensu Heinemann, = *Agaricus brasiliensis* Wasser, Diduck, de Amazonas & Stamets): extração, análise de rendimento, estrutura química e atividade biológica. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, *35*, 36-47.
- Chang, L. W., Yen, W. J., Huang, S. C., & Duh, P. D. (2002). Antioxidant activity of sesame coat. *Food Chemistry*, *78*, 347-354.
- Chang, R. (1996). Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition Rev*, *54*, S91-93.
- Chang, S. T., & Buswell, J. A. (2003). Medicinal mushrooms - A prominent source of nutraceuticals for the 21st century. *Curr. Top. Nutraceutical Res*, *1*, 257-280.
- Cheng, H.-H., Hou, W.-C., & Lu, M.-L. (2002). Interactions of lipid metabolism and intestinal physiology with *Tremella fuciformis* berk edible mushrooms in rats fed a high-cholesterol diet with or without Nebacitin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 7438-1743.

- Cheung, L. M., Cheung, C. K., & Ooi, V. E. C. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, *81*, 249-255.
- Choi, Y., Lee, S. M., Chun, J., Lee, H. B., & Lee, J. (2006). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*, *99*, 381-387.
- Firenzuoli, F., Gori, L., & Lombardo, G. (2007). The Medicinal Mushrooms *Agaricus blazei* Murrill: review of literature and pharmaco-toxicological problems. *eCAM*. Doi: 10.1093/ecam/nem007.
- Fukushima, M., Ohashi, T., Fujiwara, Y., Sonoyama, K., & Nakano, M. (2001). Cholesterol-lowering effects of maitake (*Grifola frondosa*) fiber, shiitake (*Lentinus edodes*) fiber, and enokitake (*Flammulina velutipes*) fiber in rats. *Exp. Biol. Med.* Vol., *226*, 758-765.
- Guterrez, Z. R., Mantovani, M. S., Eira, A. F., Ribeiro, L. R., & Jordão, B. Q. (2004). Variation of antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murill in vitro. *Toxicology in Vitro*, *18*, 301-309.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *American Journal of Medicine*, *91*, 1422.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2003). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Huang, S.-J., Huang, L.-C., Chen, C.-C., & Mau, J.-L. (1999). Antioxidant properties of *Agaricus blazei*. In: Broderick, A., Nair, T. (Eds), *Proceedings of the third international conference on mushroom biology and mushroom products* (pp. 266-274), Sydney, Austrália.
- Huang, S-J., & Mau, J-L. (2006). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of γ -irradiation. *Science Direct LWT*, *39*, 707-716.

- Inoue, A., Kodama, N., & Namba, H. (2002). Effect of maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the control of the T lymph node Th-1/Th-2 proportion. *Biol. Pharm. Bull*, 25, 536-540.
- Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., & Sakariah, K.K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73, 285-290.
- Kabir, Y., Yamguchi, M., & Kimura, S. (1987). Effect of shiitake (*Lentinus edodes*) and maitake (*Grifola frondosa*) mushrooms on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats. *Journal Nutr. Sci. Vitaminol.*, 33, 341-346.
- Konno, S., Tortorelis, D. G., Fullerton, S. A., Samadi, A. A., Hettiarachchi, J., & Tazaki, H. (2001). A possible hypoglycemic effect of maitake mushrooms on Type 2 diabetic patients. *Diabetic Medicinal*, 18, 1007-1010.
- Kuda, T., Tsunekawa, M., Goto, H., & Araki, Y. (2005). Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 625-633.
- Kumaran, A., & Karunakaran, R. J. (2006). Antioxidant and free radical scavenging of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, 97, 109-114.
- Lee Y-L. Ming -Tsung, Y., & Mau, J-L. (2007). Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizigus marmoreus* . *Food Chemistry*, 104, 1-9.
- Mattila, P., Salo-Vaananen, P., Konko, k., Aro, H., & Jalava, T. (2002). Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finlands. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6419-22.
- Mau, J.-L., Chao, G.-R., & Wu, K.-T. (2001). Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5461-5467.
- Mau, J.-L., Lin, H.-C., Song, S.-F. (2002). Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Research International*, 35, 519-526.

- Mau, J-L., Lin, H-C., & Chen, C-C. (2002). Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6072-6077
- Menoli, R.C.R.N., Mantovani, M.S., Ribeiro, L.R., Speit, G., & Jordão, B.Q. (2001). Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murill extracts on V79 cells. *Mutation Research*, 496, 5-13.
- Mizuno, M., Morimoto, M., Minate, K., & Tsuchida, H. (1998). Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62, 434-437.
- Mizuno, T. (1995). Health foods and medicinal usages of mushrooms. *Food Rev. International*, 11, 69-81.
- My-Yae, S., Tae-Hun, K., & Nak-Ju, S. (2003). Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts. *Food Chemistry*, 82, 593-597.
- Niki, E., Shimaski, H., Mino, M. (1994). Antioxidantism-Free Radical and Biological Defence. Gakkai Syuppan Center, Tokyo.
- Puttaraju, G. N., Venkateshaiah, U. S., Dharmesh, M. S., Urs, N. M. S., & Somasundaram, R. (2006). Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9764-9772.
- Senevirathne, M., Kim, S-H., Siriwardhana, N., Ha, J-H., Lee, K-W., & Jeon, Y-J. (2006). Antioxidant potential of *Ecklonia cava* on reactive oxygen species scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. *Food Science Technology. International*, 12(1): 27-38.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC

- assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669-675.
- Tsai, H-L. (2004). Taste quality antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis* and *Coprinus comatus*. *Master's Thesis, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan*.
- Tsai, S-Y., Tsai, H-L & Mau, J-L. (2007). Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *Science Direct LWT*, 40, 1392-1402.
- Turkoglu, A., Duru, E. M., Mercan, I. K., & Gezer, K. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 101, 267-273.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113-4117.
- Yamaguchi, F., Ariga, T. Yoshimira, Y., & Nakazawa, H. (2000). Antioxidant and anti-glycation of carcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 180-185.
- Yan, J., Vetvicka, V., Xia, Y., Coxon, A., Carrol, M.C., Mayadas, T. N. & Ross, G.D. (1999). β -Glucan, a "specific" biological response modifier that uses antibody to target tumors for cytotoxic recognition by leukocyte complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *The journal of immunology*, 163, 3045-3052.
- Yang, J.-H., Lin, H.-C., & Mau, J.-L. (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*, 77, 229-235.

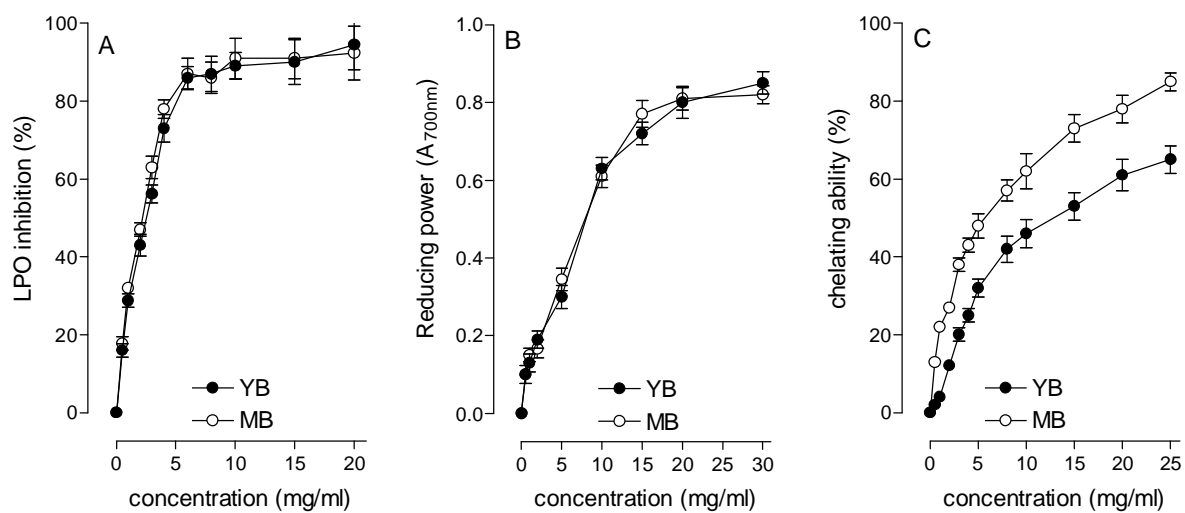


Figure 2. Antioxidant properties of the methanolic extracts at fruiting body maturity two stages: YB - young (●) and MB - mature (○) from *A. blazei*.

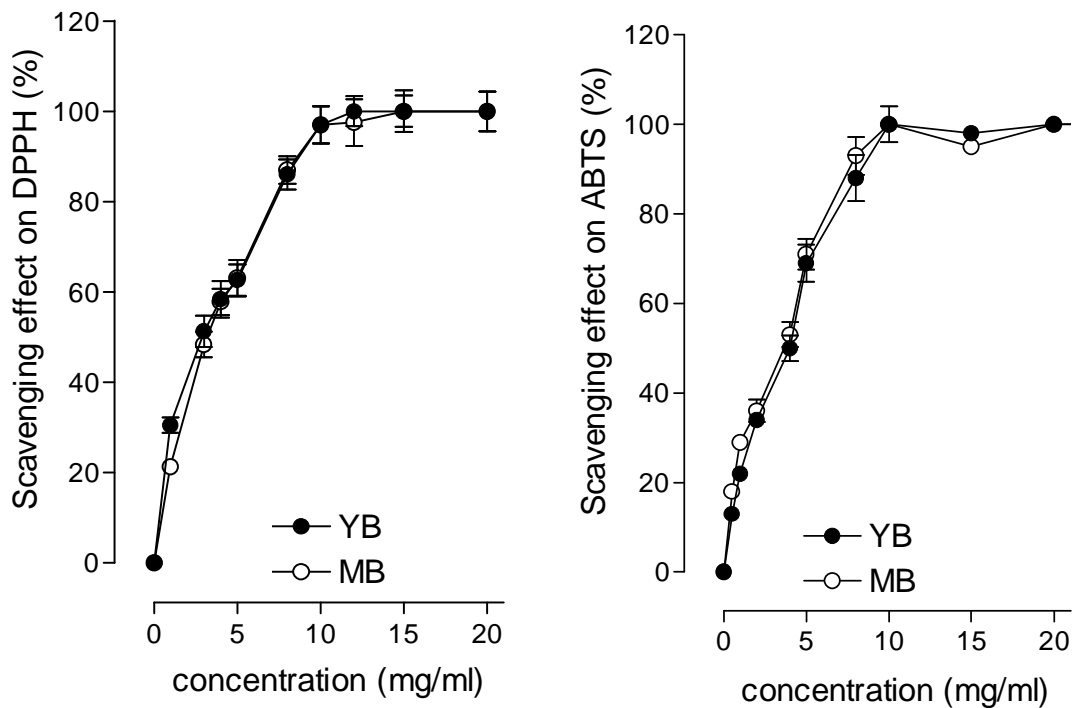


Figure 3. Antioxidant properties of the methanolic extracts at fruiting body maturity two stages: YB - young (●) and MB - mature (○) from *A. blazei*.

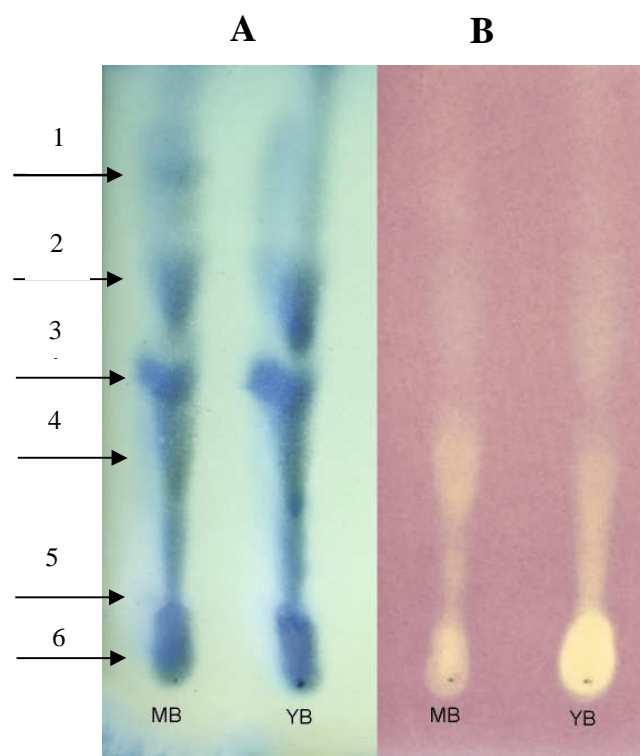


Figure 4. TLC chromatogram of methanolic extracts of young basidiocarp (YB) and mature basidiocarp (MB) from *A. blazei*. A: Revelation with FeCl₃ showed at least 6 different phenolic compounds identified as 1 to 6 in both extracts. B: DPPH revelation to antioxidant activity.

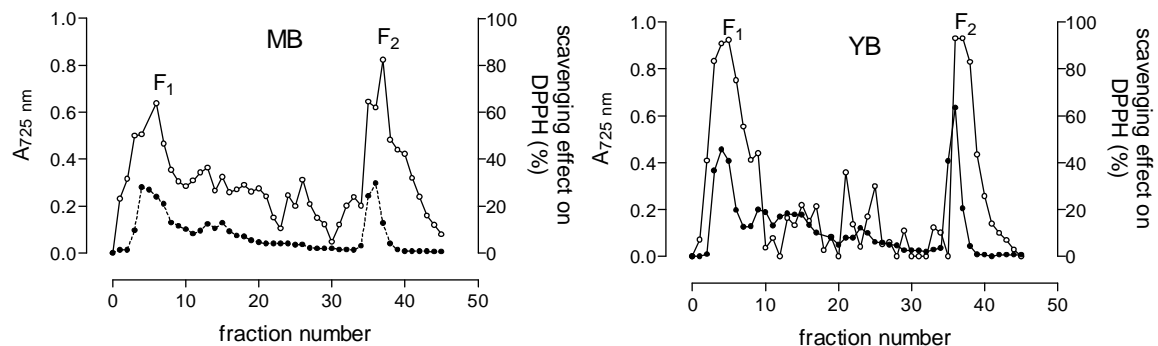


Figure 5. Silica gel column profiles of methanolic extracts of young basidiocarp (YB) and mature basidiocarp (MB) from *A. blazei*. (●) phenolic compounds; (○) antioxidant activity.

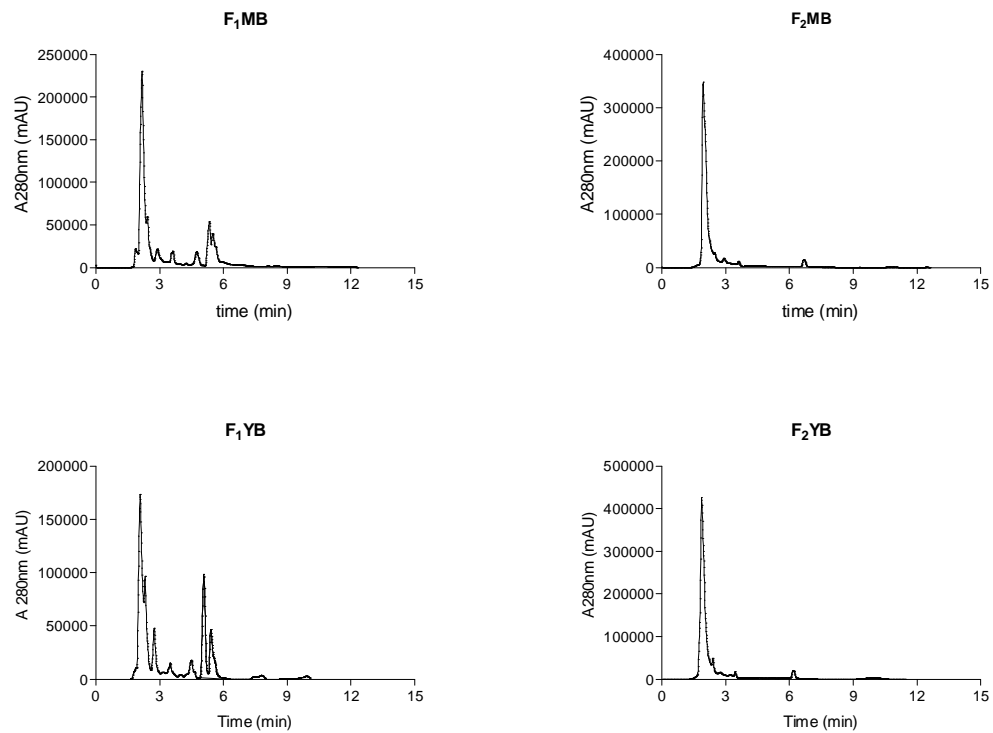


Figure 6. HPLC-UV profiles of F₁ and F₂ fractions from YB - young basidiocarp and MB - mature basidiocarp extracts of *A. blazei*.

Table 1. EC₅₀ values obtained in the antioxidant activity assays and total phenolic content of *A. blazei* in two maturity stages (young e mature).

Maturity stage	EC ₅₀ values (mg/ml)					Phenolic contents	
	DPPH	ABTS	Reducing power	LPO inhibition	Chelating ability	mg/g dry extract	mg/g dry mushroom
YB	3.0 ^a	4.0 ^a	8.0 ^a	2.4 ^a	13.0 ^a	37.94 ± 1.16 ^a	12.02 ± 0.15 ^a
MB	3.2 ^a	3.8 ^a	8.0 ^a	2.1 ^a	5.0 ^b	36.90 ± 2.61 ^a	10.31 ± 0.17 ^a

In each column, different letters mean significant differences (P<0.05)

ARTIGO 2

Avaliação da extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante do basidioma jovem de *Agaricus blazei* Murrill (Cogumelo do Sol).

Andréia Assunção Soares⁽¹⁾, Sandra Maria Gomes da Costa⁽²⁾, Rosane Marina Peralta⁽³⁾ & Cristina Giatti Marques de Souza⁽³⁾

⁽¹⁾Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas, ⁽²⁾Departamento de Biologia,

⁽³⁾Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, 87.020-900, Maringá, PR, Brasil.

Resumo:

A eficiência do solvente alcoólico (etanol absoluto, ET_{abs}), soluções hidroalcoólicas (etanol a 20% [ETOH₂₀], 50% [ETOH₅₀] e 70% [ETOH₇₀] e álcool de cereais a 25% [ACE]) e soluções aquosas (fria [AF] e a 60° C [AQ]) na extração de compostos fenólicos totais da atividade antioxidante de basidiomas jovens de *Agaricus blazei* foi avaliada neste trabalho. Todas as soluções extratoras apresentaram eficiências semelhantes na extração dos compostos fenólicos (P>0,05), à exceção do etanol absoluto que apresentou o menor rendimento (P<0,05). Os cinco extratos contendo maior quantidade de compostos fenólicos foram testados para atividade antioxidante utilizando cinco metodologias: poder redutor, inibição da peroxidação lipídica pelo método do branqueamento do sistema β-caroteno-linoleato, atividade quelante do íon ferroso e atividades sequestrantes dos radicais DPPH e ABTS. Nenhuma diferença (P>0,05) foi observada para atividade antioxidante testada pelos métodos de seqüestro de radicais livres, inibição da peroxidação lipídica e poder redutor. Para a atividade quelante de íon ferroso, a ordem de eficiência foi AF=ACE>AQ>ETOH₅₀>ETOH₇₀.

Palavras chaves: *Agaricus blazei*, basidiomas jovens, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante

Abstract

The efficiency of alcoholic solvent (absolute ethanol, ET_{abs}), hydro-alcoholic solution (ethanol at 20% [$ETOH_{20}$], 50% [$ETOH_{50}$] and 70% [$ETOH_{70}$] and cereal alcohol at 25% [ACE]) and cold water ([AF] and water at 60° C [AQ]) in the extraction of total phenolic compounds and in antioxidant activity of young fruiting body of mushroom *Agaricus blazei* was evaluated in this work. All extractor solutions were efficient in the phenolic extractions ($P > 0,05$), with exception of absolute ethanol, the less efficient of them ($P < 0,05$). The five richest phenolic compounds extracts were tested to antioxidant activity by using five methodologies. No significant difference was observed ($P > 0,05$) for antioxidant activities tested by using radical DPPH and ABTS scavenging capacities, reducing power, and lipidic peroxidation inhibition by β carotene-linoleate emulsion system. The order of efficiency of chelating ability for ferrous was $AF = ACE > AQ > ETOH_{50} > ETOH_{70}$.

Key words: *Agaricus blazei*, Young fruiting body, total phenolic compounds, antioxidant activity.

1. Introdução

O cogumelo comestível *Agaricus blazei* Murrill, popularmente conhecido como *Cogumelo do Sol* tem sido consumido em diferentes países especialmente pelo seu potencial terapêutico. Conhecimentos científicos sobre suas propriedades medicinais ainda são insuficientes, embora seja amplamente utilizado no combate ao estresse, na estimulação do sistema imunológico, na redução do colesterol, como antioxidante e anticarcinogênico (Menoli et al., 2001; Dias, Abe & Schwan, 2004).

O basidiocarpo do *A. blazei* é considerado um alimento nutricionalmente de boa qualidade pelo alto teor de proteínas e baixa porcentagem de gorduras, mas para efeitos benéficos a saúde é consumido principalmente como chá – extrato (Guterrez et al., 2004; Oliveira et al., 2002).

Além das β -glucanas, que possuem atividade antimutagênica, antiviral, antialérgica, antitumoral, imunomoduladora e antioxidante, outras substâncias bioativas como os terpenos, lipídios e fenóis foram identificados e caracterizados evidenciando as propriedades medicinais dos basidiomicetos. Os efeitos dessas substâncias incluem a ativação do sistema imunológico que modulam e melhoram a resposta imune (Guterrez et al., 2004.; Lindequist et al., 2005; Lull, Wichers & Savelkoul, 2005).

Compostos fenólicos também encontrados em cogumelos são metabólitos secundários e excelentes antioxidantes (Cheung, Cheung & Ooi, 2003; Soares, 2002). Do ponto de vista biológico, antioxidantes podem ser definidos como compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (Jordão-Júnior et al., 1998). Além de agir como sequestradores de radicais e quelantes de metais, antioxidantes fenólicos funcionam tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo bloqueando

reações em cadeia. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático (Soares, 2002; Moreira & Mancini-Filho, 2004).

Antioxidantes sintéticos têm sido utilizados na estabilização de alimentos: butil hidroxil anisol (BHA), butil hidroxil tolueno (BHT) e terc butil hidroquinona (TBHQ) são adicionados a gorduras e óleos comestíveis para prevenir a deterioração oxidativa. Entretanto, tem sido relatado que os antioxidantes BHA e BHT possuem propriedades tóxicas e carcinogênicas (Soares, 2002; Cheung, Cheung & Ooi, 2003; Puttaraju et al., 2006).

A oxidação é essencial para a manutenção dos processos biológicos em muitos organismos vivos e os radicais livres são continuamente produzidos. Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana celular e o seu alvo podem ser proteínas, lipídeos, carboidratos e o DNA (Vannucchi et al., 1998; Bianchi & Antunes, 1999). Dentre as ações patológicas associadas ao aumento da formação de radicais livres e estresse oxidativo, a peroxidação lipídica talvez represente o impacto mais abrangente, sendo uma das maiores causas de deterioração de alimentos, afetando cor, sabor, textura e valor nutricional (Vannucchi et al., 1998).

Os organismos possuem sistemas antioxidantes que protegem contra os danos provocados pelos radicais livres, e também através de sistemas de reparo tais como as enzimas catalases que previnem o acúmulo de moléculas alteradas por oxidação. O envelhecimento desequilibra o sistema antioxidante que pode levar a deterioração das funções fisiológicas e conseqüentemente a doenças. Entretanto, os antioxidantes presentes na dieta alimentar são de grande interesse como agentes protetores para auxiliar na redução dos danos oxidativos. Antioxidantes naturais foram isolados de sementes oleaginosas, folhas, raízes, frutos, ervas e cogumelos comestíveis que exibiram uma significativa atividade antioxidante (Mau, Lin, & Song, 2002; Soares,

2002). A popularidade do basidiomiceto *A. blazei* tem aumentado consideravelmente devido as suas propriedades funcionais, existindo a necessidade de fazer estudos sobre os compostos encontrados no seu basidiocarpo, que de acordo com padrões morfológicos pré - estabelecidos são colhidos principalmente no estágio imaturo, quando o píleo ou chapéu está fechado (Camelini et al., 2005).

Tem sido relatado que a atividade antioxidante de cogumelos está relacionada com o seu conteúdo em compostos fenólicos (Velioglu et al., 1998; Turkoglu et al., 2007). Em estudos de atividade antioxidante de cogumelos comestíveis, o metanol é o solvente mais empregado (Cheung, Cheung & Ooi, 2003; Cheung & Cheung, 2005; Mau et al., 2005; Huang & Mau, 2006), embora o etanol e água também sejam utilizados (Velioglu et al., 1998; Tsai, Tsai & Mau, 2007). Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante de diferentes extratos obtidos a partir do basidiocarpo jovem do cogumelo comestível *A. blazei* utilizando etanol e água como solventes.

2. Materiais e Métodos

2.1. Cogumelos

Foram utilizados basidiocarpos jovens (píleos fechados) de *Agaricus blazei* Murril, obtidos de um produtor local da cidade de Maringá, PR, Brasil.

2.2. Preparo da amostra

Os basidiocarpos secos ao ar foram moídos até a formação de um pó fino e armazenados em saco plástico fechado em temperatura ambiente na ausência de luz até o momento do uso.

2.3. Extração

A extração foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Cheung, Cheung & Ooi, (2003) com algumas modificações e foram identificados com especificado a seguir: extração aquosa a temperatura ambiente (AF), extração aquosa a 60° C (AQ), extração com etanol a 70% (ETOH₇₀), extração com etanol a 50% (ETOH₅₀), extração com etanol 20% (ETOH₂₀), extração com etanol obtido de cereais a 25% (ACE) e extração com álcool absoluto (ET_{abs}). Foram adicionados 20 mL de cada um dos solventes a 2 g do material moído. As misturas permaneceram sob agitação de 100 rpm por 3 h. Os sólidos residuais foram removidos por filtração em papel de filtro Whatman nº 1 a vácuo. Os filtrados foram utilizados para determinação de fenólicos totais. Os cinco melhores extratos foram liofilizados e usados para os testes de atividade antioxidante.

2.4. Determinação dos Compostos Fenólicos Totais

As concentrações dos compostos fenólicos totais dos sete extratos foram determinadas de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). A uma alíquota de 2,0 mL da amostra convenientemente diluída, adicionou-se 0,3 mL de carbonato de sódio - Na₂CO₃ 1,9 M e 0,1 mL de reagente fenol de Folin Ciocalteu 1 mol/L. Após 1 hora no escuro, as absorbâncias foram determinadas a 725nm em espectrofotômetro Micronal. Catequina foi utilizada como referência. Os resultados foram expressos em mg/ml de equivalentes em catequina (EC).

2.5. Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos diferentes extratos dos basidiocarpos jovens do cogumelo do sol foi testada através dos métodos descritos a seguir.

2.5.1 Poder redutor

O poder redutor foi determinado de acordo com as metodologias de Kuda et al. (2005), Zhu et al. (2002) e Yen & Chen, (1995) com algumas modificações. Um volume de 1,0 mL da amostra convenientemente diluída foi misturado com 2,5 mL de Tampão Fosfato 50 mM - pH 7,0 e 2,5 mL de Ferricianeto de Potássio [$K_3Fe(CN)_6$] - 1% e incubado por 20 minutos em banho-maria a 50° C. Após esse período, foi adicionado 2,5 mL de Ácido Tricloroacético (TCA) a 10% e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. Foi retirado 1,25 mL do sobrenadante e adicionou-se a 1,25 mL de água destilada 0,25 mL de Cloreto Férrico ($FeCl_3$) - 0,1%. A absorbância foi determinada a 700 nm. Elevado valor de absorbância das amostras indica alto poder redutor. Butil hidroxi tolueno (BHT) a 0,2 mg/mL foi utilizado como controle positivo.

2.5.2 Atividade Quelante do íon Ferroso

Foi realizada conforme as metodologias de Kuda et al. (2005) e Senevirathne et al. (2006) com algumas modificações. A um volume de 0,7 mL da amostra adicionou-se 0,7 mL de água destilada e 0,175 mL de Cloreto Ferroso ($FeCl_2$) a 0,5mM. Mediu-se a absorbância (A_1) a 550nm. Após a leitura, adicionou-se 0,175 mL de Ferrozina a 2,5mM, e a mistura foi mantida por 20 minutos em temperatura ambiente. A absorbância da mistura (A_2) foi medida a 550nm. EDTA (ácido etileno-diaminotetraacético) foi usado como controle positivo. A baixa absorbância indica alto efeito quelante. A atividade quelante do íon ferroso é expressa como (%) = $[(1 - (A_2 \text{ amostra} - A_1 \text{ amostra})) / (A_2 \text{ controle} - A_1 \text{ controle})) \times 100]$.

2.5.3 Método da Emulsão β -caroteno-linoleato - Método do branqueamento do β -Caroteno:

O método de branqueamento do β -caroteno foi realizado de acordo com os métodos de Velioglu et al. (1998), Cheung, Cheung & Ooi, (2003), Reddy, Urooj & Kumar (2005) e Kumaran & Karunakaran, 2006, com algumas modificações. Foi dissolvido (0,2 mg) β -caroteno em 1,0 mL de Clorofórmio. Em seguida, foi adicionado 0,02 mL de ácido linoléico e 0,2 mL de Tween 80 e a mistura foi mantida em repouso em temperatura ambiente por cerca de 15 minutos, até a evaporação do clorofórmio. Em seguida, adicionou-se 50 mL de água destilada oxigenada (aerada) à solução de β -caroteno-ácido linoléico, colocado em frasco com tampa e agitado vigorosamente até formar uma emulsão. Foi realizado o mesmo procedimento para o branco, sem utilizar o β -caroteno. A emulsão branca fornece o valor da turbidez das amostras. Após, adicionou-se 3,0 mL da emulsão do β -caroteno-ácido linoléico em 0,2 mL das amostras, e as misturas foram incubadas em tubos fechados em banho-maria a 50° C por 120 minutos. As leituras foram realizadas em T_0 e de 20 em 20 minutos, até completar 120 minutos, a 470nm. Foram feitos tubos controle-positivo com BHT - 0,2mg/mL. A atividade antioxidante foi expressa como % de inibição em relação ao controle: $AA\% = (\text{valor } \beta\text{-caroteno após 2 horas } T_{120} / \text{valor inicial } T_0 \text{ do } \beta\text{-caroteno}) \times 100$

2.5.4 Ensaio DPPH (atividade sequestrante)

Realizado segundo as metodologias de Thaipong et al. (2006) e Choi et al. (2006). O DPPH (1,1 difenil 2 picril-hidrazil) - 0,024g de DPPH foi diluído em 100 mL de metanol. Um volume de 10 ml desta solução foi adicionado a 45 mL de metanol e mediu-se a absorbância da mesma a 515 nm, corrigindo-a para próximo de 1,1. A 2,85 mL da solução adicionou-se 0,15 mL da amostra. Após 24 horas no escuro a temperatura ambiente, a absorbância foi determinada a 515 nm. A

atividade sequestrante foi expressa como % de eficiência do sequestro dos radicais livres. $\% = (1 - A_{\text{amostra}} / A_{\text{controle}}) \times 100$. BHT (0,2mg/mL) serviu como controle positivo.

2.5.5 Ensaio ABTS^{•+} (atividade seqüestrante)

Realizado segundo as metodologias de Thaipong et al. (2006) e Choi et al. (2006). Foram preparadas separadamente uma solução 7,4 mM de ABTS (2,2'azinobis-3-etilbenz-tiazolína-6-ácido sulfônico) e uma solução 2,6 mM de persulfato de potássio. As duas soluções foram misturadas em volumes iguais, sendo a solução resultante armazenada no escuro, em temperatura ambiente, por 12 horas, para formar a solução ABTS^{•+}. Desta solução, retirou-se 1,0 mL e adicionou-se 59 mL de metanol. A absorbância (734 nm) desta solução foi corrigida para um valor próximo de 1,1. Para o ensaio, um volume de 2,85 ml desta solução foi adicionado a 0,15 ml de amostra. Após 2 horas no escuro a temperatura ambiente, a absorbância foi determinada a 734 nm. O controle positivo foi realizado com BHT (0,2mg/mL). A atividade seqüestrante foi expressa como % de eficiência do seqüestro dos radicais livres: $\% = (1 - A_{\text{amostra}} / A_{\text{controle}}) \times 100$.

2.6. Análises estatísticas

Todas as determinações foram efetuadas em triplicatas e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e Teste de Tukey, em nível de significância de 5%, utilizando o programa Graph Pad Prisma[®] versão 3.0.

2.7. Reagentes

DPPH, ABTS, β -caroteno, ácido linoléico, reagente de Folin-Ciocalteu, catequina e BHT foram adquiridos de Sigma Co[®]. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação do conteúdo em compostos fenólicos totais nos diferentes extratos

As quantidades em compostos fenólicos presentes em cada um dos extratos é apresentada na tabela 1. As extrações hidroalcoólicas e aquosas não foram significativamente diferentes ($P > 0.05$), apesar dos maiores valores terem sido obtidos na extração aquosa a quente. Este tipo de procedimento simula a preparação do chá de cogumelo do sol e de ervas medicinais popularmente conhecidas (Tsai, Tsai & Mau, 2007). A extração aquosa quente e sob pressão em diferentes tempos, do cogumelo *Lentinus edodes* (Shiitake), aumentou a concentração de compostos fenólicos e flavanóides. Este resultado sugere que o tratamento a quente promove o rompimento da parede celular liberando mais facilmente os compostos fenólicos e flavanóides a eles ligados (Choi et. al., 2006). A extração etanólica foi inferior às extrações hidroalcoólicas e aquosas ($P < 0,05$). O extrato ACE também produziu resultados positivos quanto à extração de compostos fenólicos. É através do álcool de cereais 25%, próprio para consumo humano, que o extrato comercial de *A. blazei* é obtido e comercializado em lojas de produtos naturais. Estes resultados reforçam o achado geral que a maioria dos compostos fenólicos encontrados em cogumelos são polares (Vaskovsky, Khotimcheko, & Eugenia, 1998).

Tabela 1. Quantidade em fenólicos totais nas diversas extrações de *A. blazei*.

Extratos	Compostos fenólicos (mg/ml)⁽¹⁾
Aquoso a frio	1,84±0,11 ^a
Aquoso a 60° C	2,55±0,41 ^a
Álcool de cereais ⁽²⁾ 25%	1,97±0,34 ^a
Etanol 20%	1,79±0,92 ^a
Etanol 50%	2,09±0,39 ^a
Etanol 70%	1,94±0,39 ^a
Etanol absoluto	0,49±0,02 ^b

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($P > 0.05$). ⁽²⁾ Etanol extraído de milho ou arroz, próprio para consumo humano.

3.2. Atividade antioxidante

Os extratos dos cinco extratos em maior quantidade de compostos fenólicos, foram liofilizados e 20 mg do material seco foram ressuspensos em 1 ml de água destilada para avaliação das atividades anti-oxidantes.

3.2.1. Poder redutor

Neste ensaio, a cor amarela da solução teste muda para verde ou azul dependendo do poder redutor de cada componente. Desta forma a presença de antioxidantes ou outros redutores causa a conversão de complexo Fe^{3+} /ferricianeto usado no método para a forma ferrosa. Alta absorbância a 700 nm indica alto poder redutor. A figura 1A mostra o efeito redutor dos cinco extratos liofilizados dos basidiocarpos jovens. Não houve diferença ($P > 0.05$) entre os cinco extratos na concentração usada (20 mg/mL do extrato liofilizado), onde o efeito redutor variou entre 0,200 a 0,325 de Absorbância. O efeito redutor do BHT, um

antioxidante sintético, foi de 0,771. Esses dados mostram que os compostos fenólicos totais dos cinco extratos foram menos eficientes em causar a conversão/redução do complexo do Fe^{3+} /ferricianeto de potássio para a forma Fe^{2+} . Huang et. al. (1999) encontrou que extratos metanólicos de *A. blazei* mostraram poder redutor de 0,86 a 10 mg/ml enquanto que extratos etanólicos de *A. bisporus* tiveram poder redutor de 0,76 a 20mg/ml (Lo, 2005). Sabe-se que o tipo de composto fenólico pode influenciar na atividade antioxidante de extratos de cogumelos e plantas. Segundo Ribeiro et. al. (2006), a composição destes extratos pode variar de acordo com a espécie de cogumelo avaliada, origem geográfica da espécie, a fase de desenvolvimento do corpo de frutificação além do método de extração.

3.2.2. Atividade Quelante do íon Ferroso

Neste método, a ferrozina forma um complexo com o Fe^{+2} , sendo que a presença de outros agentes quelantes reduz a formação do complexo com a ferrozina resultando em diminuição da cor vermelha proveniente da formação do complexo ferrozina- Fe^{+2} . A habilidade dos cinco extratos dos basidiocarpos jovens em quelar o íon ferroso é representada na figura 1B. Neste teste, o extrato ETOH₇₀ foi o menos eficiente em quelar o íon ferroso. Os melhores extratos foram AF e ACE ($P > 0.05$), onde a porcentagem em eficiência foi moderada, 57,51% e 54,38% respectivamente. Entretanto, para os outros extratos a atividade quelante do íon ferroso ficou abaixo destes valores. EDTA, o controle positivo mostrou 100% de eficiência.

A extração de compostos fenólicos totais em plantas e cogumelos é influenciada pela sua natureza química, pelos agentes extratores envolvidos e pelas condições de extração (Naczki & Shahidi, 2004) evidenciando a variação nos resultados obtidos por diferentes pesquisadores. Os extratos aquosos e o álcool de cereais a 25% foram muito mais eficientes que os extratos alcoólicos a 50 e 70%. Tal fato

sugere que os compostos fenólicos extraídos em meio aquoso foram mais eficientes como quelantes de íons ferroso.

3.2.3 Inibição da peroxidação lipídica (método da emulsão β -caroteno-linoleato)

Neste sistema teste, o beta-caroteno sofre descoloração rápida na ausência de um antioxidante. O BHT é usado como controle positivo, pois ele praticamente inibe o consumo do beta-caroteno durante o período de incubação.

A ação antioxidante dos cinco extratos dos basidiocarpos jovens foi também observada no sistema β -caroteno-linoleato (figura 1C). Os extratos aquosos e etanólicos reduziram a peroxidação lipídica da ordem de 60 a 80%, e apesar da eficiência ter sido na seguinte ordem: $\text{ETOH}_{70} > \text{ETOH}_{50} > \text{AF} > \text{AQ} > \text{ACE}$, não houve diferença significativa na eficiência dos 4 primeiros extratos ($P > 0,05$). O mais eficiente dos extratos (ETOH_{70}) reduziu a peroxidação em 83%, porém em concentração maior que a do BHT usado como controle positivo (0,2mg/mL), que teve um efeito inibidor de 91,83%. É sugerido que os compostos fenólicos presentes em cogumelos atuem neutralizando os radicais livres do ácido linoléico.

3.2.4 Atividade sequestrante de DPPH \cdot e ABTS \cdot^+

Estes são dois métodos comumente utilizados para ensaios de medida da atividade sequestrante. Trata-se de ensaios rápidos nos quais as medidas realizadas a 515 nm (DPPH) e 734 nm (ABTS) quando apresentam baixas absorbâncias indicam uma alta atividade sequestradora de radicais dos extratos. Os radicais livres DPPH \cdot e ABTS \cdot^+ possuem cor púrpura e cor verde azulado, respectivamente, que diminuem pela exposição à sequestrantes de radicais por proverem átomos de hidrogênio ou pela doação de elétrons (Amarowicz et. al., 2004, Thaipong et al., 2006). O seqüestro de radicais livres é conhecido

como um fenômeno na inibição da oxidação lipídica o que pode ser prejudicial aos componentes celulares afetando a função celular (Puttaraju et. al., 2006). As figuras 1D e 1E mostram as atividades sequestrantes dos extratos dos basidiocarpos jovens sobre os radicais de DPPH[•] e ABTS^{•+}. Todos os extratos apresentaram perfil de atividade semelhante nos dois métodos, não sendo diferentes entre si e do controle positivo BHT ($P > 0.05$). A eficiência no seqüestro dos radicais foi dose dependente considerando que o uso dos extratos em concentrações inferiores a 20 mg/ml reduziu o poder sequestrante dos radicais (dados não mostrados). O controle positivo BHT na concentração de 0,2 mg/mL teve comportamento semelhante aos extratos. Alimentos que contenham quantidades significantes de ácidos graxos polinsaturados contribuem para o uso de antioxidantes sintéticos como o BHT, cuja salubridade vem sendo questionada. Os antioxidantes naturais apresentam funções similares aos antioxidantes comerciais retardando ou inibindo a oxidação de lipídeos ou outras moléculas (Birch et al, 2001).

4. Conclusões

Vários trabalhos tem relacionado a atividade antioxidante de extratos cogumelos com seus conteúdos em compostos fenólicos (Turkoglu et al., 2007; Cheung & Cheung, 2005; Mau et. al., 2005; Velioglu et al., 1998).

Os resultados obtidos evidenciam o caráter polar dos compostos fenólicos presentes no corpo de frutificação de *A. blazei* uma vez que os extratores mais polares resultaram em maior rendimento na extração de compostos fenólicos. Apesar de que uma escala de eficiência em relação a quantidade de compostos fenólicos, possa ser construída: (AQ > ETOH₅₀ > ACE > ETOH₇₀ > AF > ETOH₂₀ > ET_{abs}), não houve diferença significativa entre as extrações, à exceção do etanol absoluto, extrator muito menos eficiente que os demais. Em todos os testes com exceção

do íon quelante ferroso, não houve diferença significativa entre os extratos, parecendo haver uma relação entre a quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos. A atividade antioxidante de extratos obtidos a partir de produtos naturais geralmente é inferior à promovida por compostos sintéticos, porém deve ser levado em consideração que existe uma grande diversidade de materiais na natureza que podem servir ao propósito de obter estes compostos. A escolha de solventes e a padronização dos métodos de extração que proporcionem elevada produtividade são desejáveis. Os estudos sobre a ação e composição destes extratos com a finalidade de usá-los na preservação de alimentos ou na dieta humana como nutracêuticos ainda se faz necessário.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundo Paraná. Os autores agradecem o apoio técnico de Maria Aparecida F. Costa e Alvina Chaves.

5. Referências Bibliográficas

- Amarorowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J. A. (2004). Free – radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the *Canadian prairies*. *Food Chemistry*, 84: 551-562.
- Bianchi, M. L. P., & Antunes, L. M. G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista Nutrição Campinas*, 12(2): 123-130.
- Birch, A E., Fenner G. P., Watkins, R., & Boyd, L. C. (2001). Antioxidant properties of evening primrose seed extracts. *Journal Agricultural food Chemistry*, 49 : 4502-4507.

- Camelini, M.C., Mendonça, M. de., Dias, F. P., & Maraschin, M. (2005). β -Glucanas do Cogumelo *Agaricus subrufescens* Peck (sinonímia *Agaricus blazei* Murrill sensu Heinemann, = *Agaricus brasiliensis* Wasser, Diduck, de Amazonas & Stamets): extração, análise de rendimento, estrutura química e atividade biológica. *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento*, 35, 36-47.
- Cheung, L. M., Cheung, C. K., & Ooi, V. E. C. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 81, 249-255.
- Cheung, L. M., & Cheung, P.C. K. (2005). Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry*, 89, 403-409.
- Choi, Y., Lee, S. M., Chun, J., Lee, H. B., & Lee, J. (2006). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*, 99, 381-387.
- Dias, E.S., Abe, C., & Schwan, R.F. (2004). Truths and myths about the mushroom *Agaricus blazei*. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 61(5): 545-549.
- Guterrez, Z. R., Mantovani, M. S., Eira, A. F., Ribeiro, L. R., & Jordão, B. Q. (2004). Variation of antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murill in vitro. *Toxicology in Vitro*, 18, 301-309.
- Huang, S-J., & Mau, J-L. (2006). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of γ -irradiation. *Science Direct LWT*, 39, 707-716.
- Huang, S-J., Huang, L.-C., Chen, C.-C., & Mau, J.-L. (1999). Antioxidant properties of *Agaricus blazei*. In: Broderick, A., Nair, T. (Eds.), *Proceedings of the third international conference on mushroom biology and mushroom products* (pp.266-274) Sydney, Australia.

- Jordão-Júnior, A. A., Chiarello, P. G., Bernardes, M. S. M., & Vanucchi, H. (1998). Peroxidação Lipídica e Etanol: papel da glutathione reduzida e da vitamina E. *Medicina. Ribeirão Preto*, 31, 434-449.
- Kuda, T., Tsunekawa, M., Goto, H., & Araki, Y. (2005). Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 625-633.
- Kumaran, A., & Karunakaran, R. J. (2006). Antioxidant and free radical scavenging of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, 97, 109-114.
- Lindequist, U., Timo, H. J.N., & Julich, W-D. (2005). The pharmacological potencial of mushrooms. *Oxford University Press*, 2(3): 285-299.
- Lo, S. -II (2005) Quality evaluation of *Agaricus bisporus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ferulae* and *Pleurotus ostreatus* and their antioxidant properties during posharvest storage. *Master's Thesis, National Chung – Hsing University, Taichung, Taiwan*.
- Lull, C., Wichers, J. H., & Savelkoul, F. J. H. (2005). Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation*, 2, 63-80.
- Mau, J-L., Lin, H-C., & Song, S-F. (2002). Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Research International*, 35, 519-526.
- Mau, J-L., Tsai, S-Y., Tseng, Y-H., & Huang. S-J. (2005). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsuge*. *Food Chemistry*, 93, 641-649.
- Menoli, R.C.R.N., Mantovani, M.S., Ribeiro, L.R., Speit, G., & Jordão, B.Q. (2001). Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murill extracts on V79 cells. *Mutation Research*, 496, 5-13.
- Moreira, A. V. B., & Mancini-Filho, J. (2004). Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. *Revista Nutrição. Campinas*, 17(4): 411-424.

- Naczki, M. & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: 95-111.
- Oliveira, J. M. de., Jordão, B. Q., Ribeiro, L. R., Eira, A. F. da., & Mantovani, M. S. (2002). Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1775-1780.
- Puttaraju, G. N., Venkateshaiah, U. S., Dharmesh, M. S., Urs, N. M. S., & Somasundaram, R. (2006). Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9764-9772.
- Reddy, V., Urooj, A., & Kumar, A. (2005). Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application in biscuits. *Food Chemistry*, 90, 317-321.
- Ribeiro, B., Rangel, J., Valentão, P., Baptista, P., Seabra, R.M. & Andrade, P.B. (2006). Contents of Carboxylic Acids and two Phenolics and antioxidant Activity of Dried Portuguese Wild Edible Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8530-8537.
- Senevirathne, M., Kim, S-H., Siriwardhana, N., Ha, J-H., Lee, K-W., & Jeon, Y-J. (2006). Antioxidant potential of *Ecklonia cava* on reactive oxygen species scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. *Food Science Technology. International*, 12(1): 27-38.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Soares, S. E. (2002). Phenolic acids as antioxidants. *Revista Nutrição Campinas*, 15(1): 71-81.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC

- assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669-675.
- Tsai, S-Y., Tsai, H-L & Mau, J-L. (2007). Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *Science Direct LWT*, 40, 1392-1402.
- Turkoglu, A., Duru, E. M., Mercan, I. K., & Gezer, K. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 101, 267-273.
- Vannucchi, H., Moreira, E. A. M., Cunha, D.F.da., Junqueira-Franco, M.V.M., Bernardes, M.M. & Jordão-Júnior, A.A.J. (1998). Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. *Medicina. Ribeirão Preto, Simpósio: Nutrição Clínica*, 31: 31-44.
- Vaskovsky, V., Khotimcheko, S. & Eugenia, M. (1998). Distribution of diacyl glycerotrimethylhomoserine and phosphatidylcholine in mushrooms. *Phytochemistry*, 4, 755-760.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113-4117.
- Yen, G-C., & Chen, H-Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 27-32
- Zhu, Q. Y., Hackman, R. M., Ensunsa, J. L., Holt, R. R., & Keen, C. L. (2002). Antioxidative Activities of Oolong tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6929-6934.

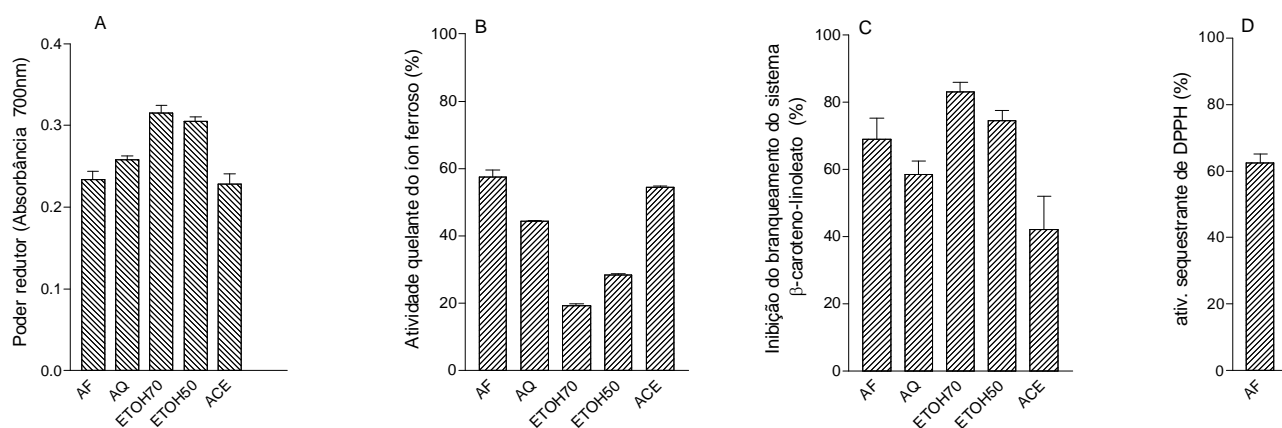


Figura 1. Atividade antioxidante dos diferentes extratos de *A. blazei*. Os testes foram realizados com extratos nas concentrações de 2,0 mg/ml (poder redutor), 5 mg/ml (inibição da peroxidação lipídica) e 3,0 mg/ml (atividade quelante do íon ferroso e atividades sequestrantes de radicais DPPH e ABTS). AF= extrato aquoso a frio; AQ= extrato aquoso a 60° C; ETOH₇₀= extrato etanólico a 70%; ETOH₅₀= extrato etanólico a 50%; ACE= extrato de álcool de cereais a 25%.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)