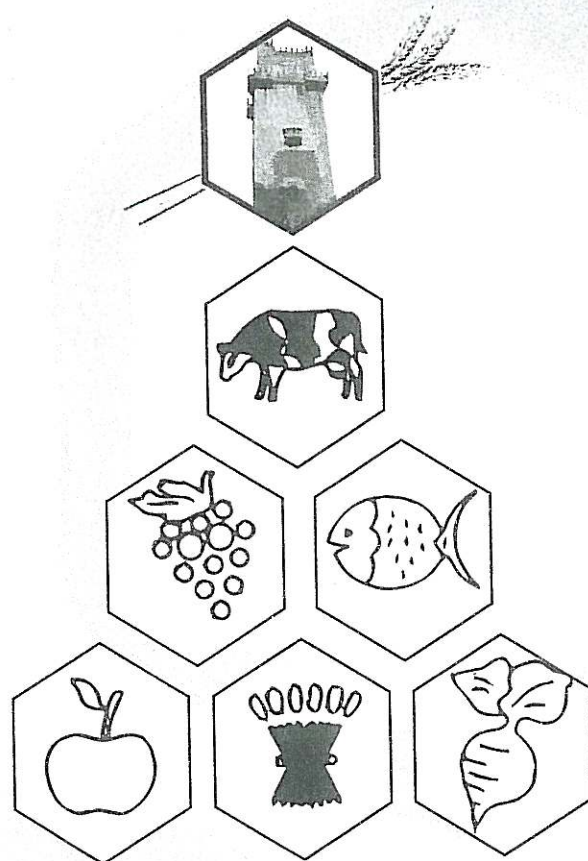


ACTAS DO 8º ENCONTRO DE QUÍMICA DOS ALIMENTOS



**Alimentos Tradicionais,
Alimentos Saudáveis e
Rastreabilidade**

Beja, Março de 2007

Instituto Politécnico de Beja
Escola Superior Agrária de Beja
Sociedade Portuguesa de Química

ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Lactarius piperatus* EM DIFERENTES FASES DE MATURAÇÃO

Barros, L.; Baptista, P. e Ferreira, I.C.F.R. *

CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança
Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal
Tel +351-273 303219 Fax +351-273 325 405 e-mail: iferreira@ipb.pt

Palavras-chave: Cogumelo silvestre; Antioxidantes; Actividade antioxidante; Fase de maturação

Resumo: Neste trabalho, avaliou-se o efeito do estado de maturação do corpo frutificante de um cogumelo silvestre, *Lactarius piperatus*, na sua actividade antioxidante e produção de antioxidantes. Realizaram-se vários testes bioquímicos para determinar as propriedades antioxidantes: poder redutor, capacidade bloqueadora de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), inibição da hemólise de eritrócitos mediada por radicais peróxido e inibição da peroxidação lipídica pelo método do β -caroteno-linoleato. Foram também determinadas as quantidades de fenóis, flavonóides, ácido ascórbico, β -caroteno e licopeno presentes em corpos frutificantes imaturos, maduros e degradados. O estado maduro, mas ainda com esporos imaturos foi aquele em que foram encontrados mais antioxidantes e valores de EC₅₀ mais baixos para a actividade antioxidante.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais com actividade antioxidante podem ser úteis no auxílio do sistema endógeno protector contra a produção de radicais livres, podendo ser utilizados como nutracêuticos. Nessa perspectiva, os antioxidantes presentes na nossa dieta assumem uma grande importância como possíveis agentes protectores que ajudem a corpo humano na redução dos danos oxidativos. Nos últimos anos, têm aparecido vários antioxidantes naturais isolados de diferentes partes das plantas, tais como, sementes oleaginosas, cereais, vegetais, frutos, folhas, raízes, especiarias e ervas. Os cogumelos, em particular, produzem vários metabolitos secundários, incluindo compostos fenólicos, poliquétidos, terpenos e esteróides. A qualidade do nutracêutico depende da composição química do corpo frutificante, sobretudo no que concerne ao teor em fenóis e flavonóides. Os compostos fenólicos constituem um dos maiores grupos de componentes não essenciais da nossa dieta associados à inibição da aterosclerose e cancro [1]. Os flavonóides também demonstraram várias acções bioquímicas e farmacológicas, nomeadamente actividade antimicrobiana, antitrombótica, antimutagénica e anticarcinogénica [2].

Alguns estudos apresentados pelo nosso grupo [3,4] e por outros autores [5-12] descrevem uma correlação entre a actividade antioxidante de cogumelos e o seu conteúdo em fenóis. No entanto, nenhum dos estudos que descreve a composição dos cogumelos em antioxidantes e/ou a sua actividade antioxidante refere o estado de desenvolvimento dos carpóforos. Mais, nenhum dos estudos teve como objectivo avaliar a actividade antioxidante em diferentes fases de desenvolvimento dos carpóforos, para uma potencial aplicação na preparação de nutracêuticos.

Neste trabalho, avaliou-se a produção de antioxidantes e a actividade antioxidante do basidiomiceta, *L. piperatus*, em quatro fases de maturação do carpóforo. A actividade antioxidante foi avaliada através do efeito bloqueador em radicais livres de DPPH, do poder

reductor, da inibição da hemólise em eritrócitos induzida por AAPH (di-hidroclorato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) e da inibição da peroxidação lipídica pelo sistema β -caroteno-linoleato. Estes ensaios têm sido exaustivamente utilizados como modelos de avaliação dos danos provocados pela peroxidação de biomembranas. Os valores obtidos foram correlacionados com os conteúdos em compostos fenólicos, ácido ascórbico, β -caroteno e licopeno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Seleção dos carpóforos e preparação das amostras

Lactarius piperatus (L.) Pers. foram colhidos num Carvalho (*Quercus pyrenaica*) de Bragança (Nordeste de Portugal), na Primavera de 2006. Foram seleccionados vários carpóforos em diferentes estados de maturação: imaturos (chapéu fechado; Fase I), maduros (chapéu aberto) com esporos imaturos (Fase II), maduros com esporos maduros (Fase III) e degradados (Fase IV). Após liofilização e trituração dos carpóforos (~5g de cada amostra), procederam-se a três extracções sucessivas de 24 h em metanol.

2.2. Determinação de componentes antioxidantes

Os fenóis totais foram determinados na presença do reagente de Folin e Ciocalteu's, fazendo ligeiras alterações ao procedimento descrito por Singleton & Rossi [13]. O ácido gálico foi usado para obter a curva-padrão (0,01-0,4 mM).

Os flavonóides foram determinados pelo método descrito por Jia *et al.* [14], tendo-se usado (+)-catequina para obter a curva-padrão (0,022-0,34 mM).

O ácido ascórbico foi obtido usando 2,6-dicloroindofenol, de acordo com o método de Klein & Perry [15]. O ácido L-ascórbico puro foi usado para obter a curva-padrão (0,020-0,12 mg/ml).

O β -caroteno e o licopeno foram determinados de acordo com o método descrito por Nagata & Yamashita [16] e aplicando a fórmula Licopeno (mg/100ml) = $-0.0458A_{663} + 0.372A_{505} - 0.0806A_{453}$; β -caroteno (mg/100ml) = $0.216A_{663} - 0.304A_{505} + 0.452A_{453}$.

2.3. Ensaios de avaliação da actividade antioxidante

O efeito bloqueador das amostras em radicais livres de DPPH foi avaliado de acordo com o método de Hatano *et al.* [17]. Determinou-se o efeito medindo o decréscimo da absorvância a 517 nm, devido à redução do radical DPPH (Actividade bloqueadora de radicais (%)) = $[(A_{DPPH} - A_E) / A_{DPPH}] \times 100$; A_E - absorvância da solução após a adição do extracto; A_{DPPH} - absorvância da solução de DPPH). Foram usados como padrões o BHA (2-*tert*-butil-4-metoxifenol) e o α -tocoferol.

O poder reductor das amostras foi determinado de acordo com o método de Oyaizu [18]. O poder reductor foi avaliado medindo a absorvância a 700 nm, após mistura das amostras com compostos férricos; uma absorvância alta indica um elevado poder reductor. Foram usados como padrões o BHA e o α -tocoferol.

A inibição da hemólise de eritrócitos mediada por radicais livres peróxilo foi avaliada de acordo com o método de Miki *et al.* [19]. Determinou-se o efeito protector dos extractos de cogumelos na hemólise de eritrócitos induzida por AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) e calculando a % inibição hemólise = $[(A_{AAPH} - A_E) / A_{AAPH}] \times 100$, onde A_E é a absorvância da amostra contendo o extracto metanólico de cogumelo e A_{AAPH} é a absorvância do controlo que não contém extracto metanólico. Foi usado como padrão o ácido L-ascórbico.

A inibição da descoloração do β -caroteno determinou-se usando o sistema β -caroteno-linoleato [20]. A inibição da peroxidação lipídica (descoloração do β -caroteno na presença de ácido linoleico foi determinada espectrofotometricamente a 470 nm e calculada através da equação: actividade antioxidante = (β -caroteno após 2h de ensaio/ β -caroteno inicial) x 100. Foi usado como padrão o TBHQ (*tert*-butil-hidroquinona).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 apresentam-se as concentrações de fenóis totais, flavonóides, ácido ascórbico, β -caroteno e licopeno presentes em extractos metanólicos de *L. piperatus* em diferentes fases de maturação. Verificou-se que os fenóis são os compostos antioxidantes encontrados em maior quantidade, que o ácido ascórbico é pouco abundante (0,03–0,16 mg/g) e que o β -caroteno e licopeno só existem em quantidades vestigiais (<34 μ g/g). As fases em que o carpóforo apresenta esporos imaturos (fases I e II) revelaram uma concentração elevada de fenóis e flavonóides. A quantidade encontrada na fase III (com esporos maduros) e na fase IV (degradado) decresceu significativamente ($p < 0,05$) em relação aos teores obtidos na primeira fase. Provavelmente, a maturação provoca a formação de espécies reactivas de oxigénio, que são neutralizadas por compostos fenólicos, resultando na diminuição dos mesmos pela sua capacidade antioxidante.

Tabela 1. Componentes antioxidantes (média \pm s) presentes em *Lactarius piperatus* em diferentes fases de maturação. Em cada linha, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
Fenóis (mg/g)	5,52 \pm 0,14 b	5,76 \pm 0,09 a	3,09 \pm 0,12 c	2,03 \pm 0,11 d
Flavonóides (mg/g)	1,26 \pm 0,09 b	1,58 \pm 0,02 a	0,35 \pm 0,03 c	0,19 \pm 0,01 d
Ác. ascórbico (mg/g)	0,15 \pm 0,01 a	0,16 \pm 0,01 a	0,13 \pm 0,01 b	0,03 \pm 0,01 c
β -caroteno (μ g/g)	26,08 \pm 0,05 b	33,78 \pm 0,05 a	17,22 \pm 0,00 c	15,11 \pm 0,02 d
Licopeno (μ g/g)	8,14 \pm 0,03 b	13,04 \pm 0,02 a	5,80 \pm 0,01 c	5,41 \pm 0,01 d

Na tabela 2 apresentam-se os valores de EC₅₀ obtidos nos vários ensaios de actividade antioxidante realizados em carpóforos de *L. piperatus* em diferentes fases de maturação.

A fase II revelou melhores propriedades antioxidantes (valores de EC₅₀ significativamente mais baixos; $p < 0,05$) o que esta em concordância com o maior conteúdo de compostos antioxidantes encontrado nessa fase. Os valores de EC₅₀ obtidos para o efeito bloqueador de radicais livres de DPPH e para o poder redutor foram melhores do que os obtidos para a inibição da hemólise de eritrócitos e para a inibição da peroxidação lipídica (POL).

Tabela 2. Valores de EC₅₀ obtidos nos testes de avaliação da actividade antioxidante de *Lactarius piperatus* em diferentes fases de maturação. Em cada linha, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Valores de EC ₅₀ (mg/L)	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
Efeito bloqueador	13.92±0.73 c	5.19±0.03 d	20.24±0.78 b	23.44±3.33 a
Poder redutor	2.83±0.01 c	2.29±0.02 d	5.40±0.05 b	5.50±0.03 a
Inibição da hemólise	32.92±0.72 c	12.14±0.03 d	38.91±0.18 b	>50.0 a
Inibição da POL	15.26±4.15 c	12.08±3.15 c	34.25±5.46 b	45.06±2.21 a

Cerca de dois terços das mortes relacionadas com tumores podem ser evitadas através de um estilo de vida saudável. Assim uma dieta adequada que envolva o consumo de antioxidantes, nomeadamente os existentes nos cogumelos, pode minimizar os riscos de cancro. Assim, é importante saber a fase de maturação do carpóforo mais adequada para o seu consumo no que concerne à produção de antioxidantes e, pelo que nos apercebemos, este estudo é o primeiro a demonstrar que a produção de componentes antioxidantes por cogumelos silvestres e as suas propriedades antioxidantes dependem da fase de maturação do corpo frutificante.

Agradecimentos

Fundação para a Ciência e a Tecnologia (projecto de investigação POCI/AGR/56661/2004).

Referências

- [1] G.M. Williams, M.J. Iatropoulos - *Oxidants, antioxidants, and free radicals*, Taylor & Francis, USA (1997) 341-350.
- [2] C. Kandaswami, E. Middleton - *Natural antioxidants. Chemistry, health effects and practical applications*, Champaign, IL, AOCS Press (1997) 174-194.
- [3] I.C.F.R. Ferreira, P. Baptista, M. Vilas-Boas, L. Barros - *Food Chem.* **100** (2007) 1511-1516.
- [4] L. Barros, M.-J. Ferreira, B. Queirós, I.C.F.R. Ferreira, P. Baptista - *Food Chem.* (2007) in press.
- [5] G.-C. Yen, C.-Y. Hung - *Food Res. Int.* **33** (2000) 487-492.
- [6] J.-L. Mau, H.-C. Lin, S.-F. Song - *Food Res. Int.* **35** (2002) 519-526.
- [7] J.-H. Yang, H.-C. Lin, J.-L. Maub - *Food Chem.* **77** (2002) 229-235.
- [8] L.M. Cheung, P.C.K. Cheung, V.E.C. Ooi - *Food Chem.* **81** (2003) 249-255.
- [9] J.-L. Mau, C.-N. Chang, S.-J. Huang, C.-C. Chen - *Food Chem.* **87** (2004) 111-118.
- [10] L.M. Cheung, P.C.K. Cheung - *Food Chem.* **89** (2005) 403-409.
- [11] K.M. Lo, P.C.K. Cheung - *Food Chem.* **89** (2005) 533-539.
- [12] A. Turkoglu, M.E. Duru, N. Mercan, I. Kivrak, K. Gezer - *Food Chem.* **101** (2007) 267-273.
- [13] V.L. Singleton, J.A. Rossi - *Am. J. Enol. Vitic.* **16** (1965) 144-158.
- [14] Z. Jia, M. Tang, J. Wu - *Food Chem.* **64** (1999) 555-559.
- [15] B.P. Klein, A.K. Perry - *J. Food Sci.* **47** (1982) 941-945.
- [16] M. Nagata, I. Yamashita - *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish* **39** (1992) 925-928.
- [17] T. Hatano, H. Kagawa, T. Yasuhara, T. Okuda - *Chem. Pharm. Bull.* **36** (1988) 2090-2097.
- [18] M. Oyaizu - *Jap. J. Nutri.* **44** (1986) 307-315.
- [19] M. Miki, H. Tamia, M. Mino, Y. Yamamoto, E. Niké - *Arch. Biochem. Biophys.* **258** (1987) 373-380.
- [20] S. Mi-Yae, K. Tae-Hun, S. Nak-Ju - *Food Chem.* **82** (2003) 593-597.