

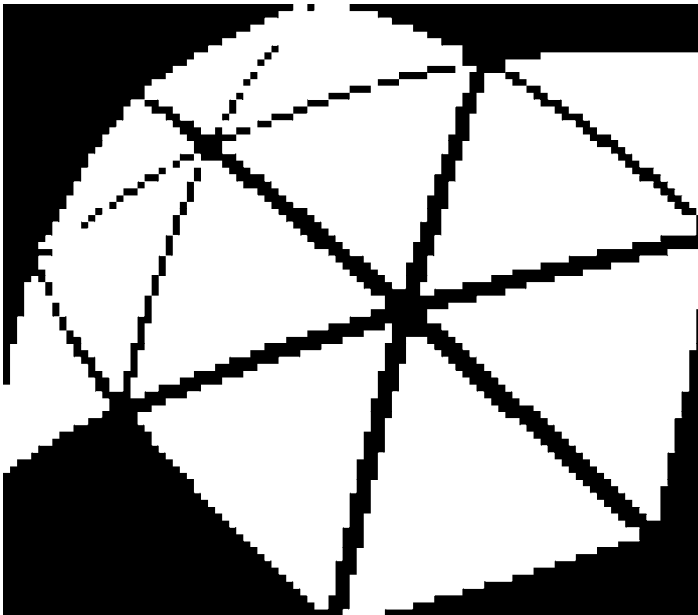
UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Avaliação da capacidade antioxidante de
frações orgânicas do cogumelo *Agaricus
blazei* Murril e purificação parcial de
peroxidase e polifenoloxidase

ADRIANO SILVA FERNANDES

Dissertação de Mestrado

2006



Instituto de Química

ADRIANO SILVA FERNANDES

Avaliação da capacidade antioxidante de frações orgânicas do cogumelo *Agaricus blazei* Murril e purificação parcial de peroxidase e polifenoloxidase.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Maysa Furlan

ARARAQUARA
2006

FICHA CATALOGRÁFICA

F363a Fernandes, Adriano Silva
 Avaliação da capacidade antioxidante de frações orgânicas do cogumelo
Agaricus blazei Murril e purificação parcial de peroxidase e polifenoloxidase /
Adriano Silva Fernandes. – Araraquara : [s.n], 2006
 71 f. : il.

 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Química

 Orientador: Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira

 Co-orientador: Maysa Furlan

 1. Enzimologia. 2. Antioxidantes. 3. Cogumelos. 4. Espécies reativas.
I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

Dados Curriculares

Nome: Adriano Silva Fernandes

RG: 29.675.877-9

Idade: 26 anos

Nasc: 09/02/1980 – Brasileiro

Estado Civil: Solteiro

Endereço: Av. Cônego Aldomiro Storniolo,361 Jd. Universal, Araraquara – SP

CEP: 14801-510

e-mail: adrifern@posgrad.iq.unesp.br

Fone: (16) 3336 8583

Formação

- 2000 – 2003 Graduação em Bacharelado em Química. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
Título: Estudos de Fracionamento Cromatográfico e Dosagem Antioxidante do Cogumelo do Sol, *Agaricus blazei* Murril.
Orientador: prof. Dra. Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira.
Bolsista do(a): Ministério da Educação e do Desporto, MEC, Brasil.
- 2004 – 2006 Mestrado em Biotecnologia. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
Título: Avaliação da capacidade antioxidante de frações orgânicas do cogumelo *Agaricus blazei* Murril e purificação parcial de peroxidase e polifenoloxidase.
Orientador: prof. Dra. Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira.
Bolsista do(a): Capes

Formação Complementar

- 2005 – 2005 Estagiário docente na disciplina de Fundamentos de Bioquímica (5º Licenciatura em Química). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
- 2004 – 2004 Estratégias de ensino aprendizagem em Química. (Carga horária: 12h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
- 2004 – 2004 O lugar da química na escola reflexões sobre o currículo no cotidiano escolar. (Carga horária: 8h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
- 2001 – 2004 Extensão universitária em Programa Especial de Treinamento PET. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
- 2003 – 2003 Gerenciamento de resíduos sólidos. (Carga horária: 2h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
- 2003 – 2003 Células combustíveis. (Carga horária: 8h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
- 2003 – 2003 Monitoria de Química Inorgânica Estrutural (3º Bacharelado em Química). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
- 2002 – 2002 Química forense. (Carga horária: 8h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
- 2001 – 2001 Técnicas de espectrometria atômica. (Carga horária: 6h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

- 2001 – 2001 O ensino de química no segundo grau. (Carga horária: 6h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
- 2001 – 2001 Aplicação em cromatografia líquida preparativa e espectrofotometria ultra violeta/visível. (Carga horária: 6h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
- 2001 – 2001 Voz no uso profissional. (Carga horária: 2h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Linhas de Pesquisa

1. Enzimologia
2. Peroxidases
3. Espécies reativas de oxigênio

Áreas de Atuação

1. *Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Bioquímica / *Subárea:* Enzimologia / *Especialidade:* Radicais Livres e Espécies Reativas de Oxigênio.
2. *Grande área:* Ciências Exatas e da Terra / *Área:* Química / *Subárea:* Química Orgânica / *Especialidade:* Química dos Produtos Naturais.
3. *Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Bioquímica / *Subárea:* Enzimologia / *Especialidade:* Peroxidases.
4. *Grande área:* Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Ciência de Alimentos / *Especialidade:* Enzimologia.

Idiomas

Compreende: Inglês (Bem), Espanhol (Bem).
Fala: Inglês (Razoavelmente), Espanhol (Pouco).
Lê: Inglês (Bem), Espanhol (Bem).
Escreve: Inglês (Razoavelmente), Espanhol (Pouco).

Prêmios e Títulos

- 2003 Orador da turma de formandos, Instituto de Química.

Produção Bibliográfica

Artigos Publicados em Periódicos

1. FERNANDES, Adriano Silva; PET, Grupo. Um projeto de Extensão Universitária na Pesquisa do Ensino de Química. Enciclopédia Biosfera, Goiânia, 2004.
2. HAKIME-SILVA, Ricardo Alexandre; VELLOSA, José Carlos Rebuglio; KHALIL, Najeh Maisar; FERNANDES, Adriano Silva; BRUNETTI, Iguatemi Lourenço; OLIVEIRA, Olga Maria Mascarenhas de Faria. Antioxidant activity of water extract of *Agaricus blazei* Murril (Cogumelo do Sol) - Submetido. Fitoterapia, 2005.

3. FERNANDES, Adriano Silva; BUFFA-FILHO, Waldemar; HAKIME-SILVA, Ricardo Alexandre; VELLOSA, José Carlos Rebuglio; FURLAN, Maysa; BRUNETTI, Iguatemy Lourenço; OLIVEIRA, Olga Maria Mascarenhas de Faria. Antioxidant activity of *Agaricus blazei* - Submetido. Fitoterapia, 2005.

Trabalhos em Eventos

1. FERNANDES, Adriano Silva; PET, Grupo. Introdução ao Software ACDLabs/Chemsketch. In: XXIII ENEQUI - Encontro Nacional dos Estudantes de Química, 2004, São Carlos, 2004.
2. FERNANDES, Adriano Silva; PET, Grupo. Um dia na Universidade - PET. In: XXXIII Semana da Química, 2003, Araraquara, 2003.
3. FERNANDES, Adriano Silva; PET, Grupo. Um dia na Universidade - PET. In: I Evento de Educação em Química, 2003, Araraquara, 2003.
4. FERNANDES, Adriano Silva. Isolation of Secondary Metabolic with Antioxidant Capacity from Mushroom of the Sun, *Agaricus blazei* Murril. In: 34a. Reunião Anual da SBBq, 2005, Águas de Lindóia, SP, 2005.

Dados Complementares

Participação em Eventos

1. XXXIV Reunião Anual da SBBq, Águas de Lindóia, SP, 2005. (Participações em eventos/Congresso).
2. Química na Cozinha. 2004. (Participações em eventos/Oficina).
3. XXXIV Semana da Química. 2004. (Participações em eventos/Encontro).
4. XXIII ENEQUI - Encontro Nacional dos Estudantes de Química. 2004. (Participações em eventos/Encontro).
5. XXXIII Semana da Química. 2003. (Participações em eventos/Encontro).
6. III SUDESTE PET. 2003. (Participações em eventos/Encontro).
7. I Evento de Educação em Química. 2003. (Participações em eventos/Encontro).
8. XXXII Semana da Química. 2002. (Participações em eventos/Encontro).
9. II SUDESTE PET. 2002. (Participações em eventos/Encontro).
10. Comissão Organizadora do Evento. 2002. (Participações em eventos/Encontro).
11. XIII Encontro Regional de Química. 2001. (Participações em eventos/Encontro).
12. XXXI Semana da Química. 2001. (Participações em eventos/Encontro).
13. I SUDESTE PET. 2001. (Participações em eventos/Encontro).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Dorival de Jesus Fernandes e Sônia Maria da Silva Fernandes, e aos meus irmãos Marcelo Silva Fernandes e Fabiana Silva Fernandes, pelo amparo e colaboração.

A minha namorada Bertha Furlan Polegato e família, pelo carinho e respeito que me dedicaram, ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Prof^ª. Dr^ª. Olga Maria M. de Faria Oliveira, não só pela orientação mas, também, pela amizade, que permeou nossa convivência ao longo destes anos.

A todos os professores do departamento, que admito contribuíram para a minha formação e na organização desta dissertação.

Aos meus colegas do laboratório, pelo apoio dado durante este trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos os amigos que fiz.

Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.

(Fernando Pessoa)

RESUMO

Nos organismos vivos aeróbios, processos fisiológicos produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) como subprodutos ou com a finalidade de combater microorganismos invasores. Estas espécies têm sido estudadas, pois promovem mutações de DNA, processos de envelhecimento e várias patologias. A formação de espécies reativas e radicais livres são equilibradas naturalmente pela existência de compostos conhecidos como antioxidantes. Tais compostos na dieta, são agentes protetores do corpo humano na remoção dos radicais livres. Os cogumelos são fungos conhecidos, desde a antiguidade, devido sua utilização, pelo homem, como alimento de elevado valor nutritivo e terapêutico. Neste sentido, a busca por opções terapêuticas para diferentes patologias faz da pesquisa de produtos naturais um campo fértil em opções de moléculas com diferentes atividades biológicas. A relevância da pesquisa de produtos naturais proporciona a descoberta de novos fármacos e o estudo de cogumelos que apresentem substâncias que possam agir sobre as diferentes espécies oxidantes geradas em nosso organismo torna-se de grande importância. No estudo da avaliação do potencial antioxidante das amostras deve-se considerar que: um composto deve ser testado em concentrações disponíveis *in vivo* e ao avaliar os antioxidantes, deve-se utilizar pelo menos uma espécie relevante biologicamente. Deve-se perguntar como age o antioxidante, se ele age diretamente sobre a ERO ou ele inibe a sua geração e, ainda, se ele age indiretamente regulando defesas antioxidantes endógenas. Assim, este trabalho teve por objetivo a partição (usando técnicas cromatográficas como: CCD e CLAE) e validação, *in vitro*, das frações do cogumelo *Agaricus blazei* Murril como produtos antioxidantes (usando metodologias pré-estabelecidas, como: radical ABTS, radical DPPH, Radical Superóxido, TNB/HOCl e TNB/H₂O₂). Foi também avaliado a presença das enzimas peroxidase e polifenoloxidase.

Observou-se que, nos sistemas ABTS e DPPH, as amostras apresentaram capacidade antioxidante comparáveis à padrões conhecidos (trolox e ácido úrico), sendo que mostraram perfis de inibição semelhante entre elas, com exceção da fração hexânica, que não foi capaz de promover o seqüestro destes radicais modelos. No sistema TNB/HOCl, as amostras apresentaram pequena atividade (não foi possível determinar o IC₅₀), sendo que suas atividades foram muito inferiores aos padrões. No sistema TNB/H₂O₂, nenhuma amostra apresentou capacidade de seqüestrar o H₂O₂. Com relação ao sistema radical superóxido, as amostras foram incapazes de promover o seqüestro do radical O₂^{•-}, pelo contrário, neste sistema foi observada uma atividade pró-oxidante por parte das amostras. As amostras protéicas não revelaram presença de peroxidase na cinética H₂O₂/Guaiacol. Ao passo que, na cinética com Catecol, mostraram a presença de polifenoloxidase, sendo que neste caso o fator de purificação aumentou a cada passo de purificação.

Palavras-chaves: Enzimologia, antioxidantes, Cogumelos e Espécies reativas.

ABSTRACT

In aerobic living organisms, physiologic processes produce reactive oxygen species (ROS) as by-products or to fight against microorganisms. These species have been studied, whereas they promote DNA mutation, aging process and several pathologies. Reactive species and free radicals generation are equilibrated by antioxidants. Thus, these antioxidants in diets, are protector agents to the human body in removal of free radicals. Since antiquity the mushrooms are consumed as a high nutritional meal and therapeutic worth. In this manner, the search of new medicines turns natural products research an important option for discovering molecules with different biological activities. Natural products research is relevant for discovering molecules able to fight against oxidant species. In evaluating the antioxidant potential of substances, it is important to considerate: a compound should be tested at concentrations achievable *in vivo* and in assaying antioxidants, one should use biologically relevant ROS. It is important to know if it works directly over the oxidant or if it works by regulating endogenous antioxidants defenses. Thus, this work had as objective the partition (using chromatographic techniques, as: TLC and HPLC) and validation, *in vitro*, of the *Agaricus blazei* Murril mushroom fractions as antioxidant products (using pre-established methodologies, as: ABTS radical, DPPH radical, Superoxide radical, TNB/HOCl and TNB/H₂O₂). It was also evaluated, the presence of peroxidase and polyphenoloxidase enzymes. The evaluated fractions showed antioxidant activity similar to the patterns (trolox and uric acid) in removal of ABTS radical and DPPH radical, except for the hexanic fraction. In the TNB/HOCl system, the samples presented small activity (it wasn't possible to determine IC₅₀), and your activities were very inferior to the patterns. In the TNB/H₂O₂ system, the samples didn't presented activity to kidnap H₂O₂. In the superoxide system, the samples weren't able to promote the kidnapping of the radical O₂[•],

in this system pro-oxidizer activity was observed. The protein samples didn't present presence of peroxidase in the kinetics H_2O_2 /Guaiacol. While, in the kinetics with Catecol, they showed the presence of polifenoloxidase, and in this case, the purification factor increased to each purification step.

Keywords: Enzimology, antioxidants, mushroom and reactive species.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – redução tetravalente do oxigênio no complexo citocromo oxidase mitocondrial.....	22
Figura 2 – Geração de espécies reativas de oxigênio.	23
Figura 3 – Identificação das amostras de <i>Agaricus blazei</i> Murril usadas para avaliar capacidade antioxidante.	38
Figura 4 – Identificação das amostras de <i>Agaricus blazei</i> Murril usadas para dosar peroxidase e polifenoloxidase.	39
Figura 5 – Estruturas moleculares dos padrões antioxidantes.....	41
Figura 6 – Estrutura molecular do ABTS.....	43
Figura 7 – Estrutura molecular do DPPH.....	43
Figura 8 – Estruturas moleculares do DTNB e do TNB.	44
Figura 9 – Estrutura molecular do Guaiacol.	45
Figura 10 – Estrutura molecular do catecol.....	45
Figura 11 – Cromatograma do extrato bruto etanólico da amostra em pó de <i>Agaricus blazei</i> Murril, via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).....	48
Figura 12 – Cromatogramas das amostras de <i>Agaricus blazei</i> Murril, via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).	49
Figura 13 – Espectros de absorção dos picos apresentados no cromatograma do extrato bruto etanólico (figura 11) da amostra de <i>Agaricus blazei</i> Murril.	50

Figura 14 – Cromatogramas das amostras de <i>Agaricus blazei</i> Murril, via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DEQ).	51
Figura 15 – Cromatogramas das amostras de <i>Agaricus blazei</i> Murril, via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV-Vis).	52
Figura 16 – Espectro de absorção do radical ABTS ^{•+}	53
Figura 17 – Ação seqüestradora sobre o ABTS ^{•+} (0,1mM).	54
Figura 18 – Valores de IC ₅₀ na supressão do radical ABTS ^{•+}	55
Figura 19 – Espectro de absorção do DPPH.	55
Figura 20 – Ação seqüestradora sobre o radical DPPH (60μM).	56
Figura 21 – Valores de IC ₅₀ na supressão do radical DPPH.	56
Figura 22 – Oxidação do TNB 80μM pelo ácido hipocloroso 22μM, na ausência e na presença de padrão antioxidante.	57
Figura 23 – Sistema TNB (80μM) ação seqüestradora sobre o HOCl (22μM).	58
Figura 24 – Ação seqüestradora sobre o O ₂ ^{•-}	59

ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABTS** – 2,2'-azinobis(3-ethybenzothiazoline-6-sulfonic acid)
- A.E.** – atividade específica
- ATP** – adenosina tri-fosfato
- CCD** – cromatografia em camada delgada
- CLAE** – cromatografia líquida de alta eficiência
- **DAD** - detector UV-Vis com arranjo de diodos
 - **DEQ** – detector eletroquímico
- DPPH** – 1,1-difenil-2-picril-hidrazil
- DTNB** – ácido 5-5'ditio(2-nitrobenzóico)
- EB** – extrato bruto de *Agaricus blazei* Murril
- EBE** – extrato bruto etanólico de *Agaricus blazei* Murril
- ERO** – espécies reativas de oxigênio
- GSH** – glutationa
- HRP** – *Horseradish peroxidase*
- LPMN** – leucócitos polimorfonucleares
- NADH** – nicotinamida adenina dinuceotídeo, reduzida
- NADPH** - nicotinamida adenina dinuceotídeo fosfato, reduzida
- NBT** – nitro blue tetrazolium ou sal de tetrazólio
- NOS** – óxido nítrico síntase
- pACOET** – fração acetato de etila
- pG25** – fração protéica obtida após gel filtração em Sephadex G-25
- pHEX** – fração hexano
- pHID** – fração hidroalcoólica
- PMS** – Phenazine methilsulfate ou metassulfato de fenazina
- PPTSAL** – fração protéica obtida após precipitação salina
- PVP** – polyvinylpyrrolidone
- SOD** – superóxido dismutase
- TNB** – 5-tio-2-nitrobenzóico
- UV-Vis** – ultravioleta-visível
- π – orbital pi ligante
- π^* – orbital pi antiligante

LISTA DE SÍMBOLOS

g – grama

mg – miligrama

μg – micrograma

mL – mililitro

μL – microlitro

mM – milimolar

μM – micromolar

μA – microampere

min – minuto

s – segundo

cm – centímetro

nm – nanômetro

$^{\circ}\text{C}$ – grau Celsius

eV – elétronvolts

pH – $-\log$ da concentração de hidrogênio

IC₅₀ – concentração de amostra que promove 50% de inibição

v₀ – velocidade inicial

DP – desvio padrão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	O Cogumelo <i>Agaricus blazei</i> Murril	19
1.2	Espécies reativas de oxigênio (ERO) e estresse oxidativo	20
1.3	Capacidade antioxidante	30
1.4	Peroxidases	31
1.5	Antioxidantes na dieta	32
2	OBJETIVOS	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	Equipamentos	37
3.2	Obtenção de <i>Agaricus blazei</i> Murril e tratamentos realizados	37
3.2.1	Amostras obtidas para avaliar capacidade antioxidante	38
3.2.2	Amostras obtidas para dosar peroxidase e polifenoloxidase	39
3.3	Estudo do perfil químico das amostras de <i>Agaricus blazei</i> Murril, via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)	40
3.4	Estudo do perfil eletroquímico das amostras da <i>Agaricus blazei</i> Murril, via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DEQ)	40
3.5	Avaliação do potencial antioxidante	41
3.5.1	Sistema radical ABTS	42
3.5.2	Sistema radical DPPH	43
3.5.3	Sistema TNB/HOCl e TNB/H ₂ O ₂	43
3.5.4	Sistema radical superóxido	44
3.6	Determinação da atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase	45
3.6.1	Sistema amostra/H ₂ O ₂ /Guaiacol (dosagem de peroxidase)	45
3.6.2	Sistema amostra/Catecol (dosagem de polifenoloxidase)	45
3.7	Dosagem de proteínas totais e determinação da atividade específica (A.E.)	46
3.8	Análise estatística dos dados	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	Estudo do perfil químico das amostras de <i>Agaricus blazei</i> Murril, via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)	48
4.2	Estudo do perfil eletroquímico das amostras de <i>Agaricus blazei</i> Murril, via Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DEQ)	50
4.3	Avaliação do potencial antioxidante	53
4.3.1	Sistema radical ABTS	53
4.3.2	Sistema radica DPPH	54
4.3.3	Sistema TNB/HOCl e TNB/H ₂ O ₂	57
4.3.4	Sistema radical superóxido	59
4.4	Dosagem das enzimas peroxidase e polifenoloxidase	60
4.4.1	Sistema amostra/H ₂ O ₂ /Guaiacol (dosagem de peroxidase)	60
4.4.2	Sistema amostra/Catecol (dosagem de polifenoloxidase)	61
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	62
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 – INTRODUÇÃO

Estudos têm mostrado que o consumo de frutas, de vegetais e de produtos naturais, isolados de plantas e microorganismos, pode auxiliar contra doenças crônicas. Tais propriedades, “promotoras ou auxiliares da saúde”, de frutas, vegetais e microorganismos devem-se à presença de certos compostos presentes, nestas matrizes. Alguns desses, em especial os polifenóis, têm sido investigados quanto a sua atividade seqüestradora ou captadora de radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio (Bors, et al., 1990; Rice-Evans, et al., 1996; Bravo, 1998).

Nos organismos vivos, inúmeros processos fisiológicos produzem radicais livres, principalmente, os que contêm oxigênio – espécies reativas de oxigênio ERO – como produtos secundários. O dano oxidativo, causado por tais espécies, tem sido relacionado com o processo de envelhecimento e várias patologias (Babior, 1984; Adam & Cilento, 1982; Rimm et al., 1996; Yildiz, et al., 1998). Contudo, certos organismos como o de humanos, possuem defesa antioxidante natural e sistemas de reparo (enzimas) que estão envolvidos na proteção contra tais danos oxidativo. Assim, antioxidantes em dietas são de grande interesse, como possíveis agentes de proteção auxiliar ao corpo humano, na redução destes danos (Hakime-Silva, 2004).

1.1 O Cogumelo *Agaricus blazei* Murril

Os cogumelos são fungos conhecidos desde a antiguidade devido à utilização destes, pelo homem, como alimento de elevado valor nutritivo e terapêutico. No entanto, na natureza, existem centenas de espécies diferentes de cogumelos, sendo que alguns são venenosos, outros alucinógenos, incluindo outros que possuem propriedades medicinais curativas e até supostamente afrodisíacas. Existe, no mundo, cerca de 10 mil espécies

conhecidas de cogumelos, segundo especialistas, das quais 700 são comestíveis, 50 tóxicas e de 50 a 200 usadas em práticas medicinais (Pesquisa FAPESP, 2004).

Carnudo e macio ao toque, o fungo *Agaricus blazei* Murril é comestível e medicinal. Diferentemente dos demais cogumelos, que só se desenvolvem na ausência de luz e na umidade, o agárico cresce sob a presença de luz. Está sendo usado no tratamento contra diversas doenças, tais como: câncer, AIDS, artrite reumatóide, artrose, arteriosclerose, diabetes, hipertensão e na prevenção do envelhecimento. Seu uso, também, é indicado como coadjuvante nos tratamentos convencionais de câncer, pois minimiza os efeitos colaterais característicos das terapias invasivas como: quimioterapia, radioterapia, etc (Hakime-Silva, 2004).

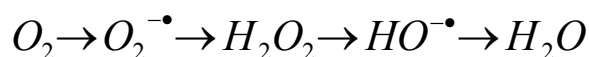
Segundo pesquisas realizadas pelo Prof. Mamdooh Ghoneum, Doutor em imunologia da Universidade da Califórnia, o *Agaricus blazei* pode ser considerado um potente modificador de resposta biológica para tratamento complementar e/ou alternativo do câncer. Sua principal propriedade é a de fortalecer o sistema imunológico do organismo. Atende, perfeitamente, as tendências holísticas da medicina do séc. XXI, que visa empregar métodos que estimule as respostas imunológicas e defensivas do organismo. O cientista afirmou que o *Agaricus blazei* está para o câncer assim como a penicilina, na década de 40, estava para as infecções. Apresenta uma força poderosa e eficaz na manutenção da saúde (Hakime-Silva, 2004).

1.2 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Estresse Oxidativo

Define-se como radical livre toda espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados. O elétron livre, que caracteriza o radical livre, pode estar centrado em um átomo de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre ou átomos de metais de

transição. Na natureza existem duas importantes substâncias que podem gerar ou atuar como radicais livres, o oxigênio no estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico (NO), sendo este último, sintetizado em diversas células e, atualmente, é identificado tanto como o fator relaxante dependente do endotélio (Moncada, 1991) como um importante vasodilatador (Ignarro et al, 1988).

Em condições fisiológicas, de todo o oxigênio molecular captado nas mitocôndrias e processado na cadeia respiratória, só 1 a 5% escapam e formam oxirradicais (Figura 1). O oxigênio pode dar origem a diversas espécies reativas, seja por absorção de energia ou por transferência de elétrons. Uma via de formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) – oxidantes de maior importância biológica – consiste na redução unieletrônica do oxigênio à água na qual a entrada de 4 elétrons na molécula de oxigênio promove o aparecimento do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}), intermediários parcialmente reduzidos do oxigênio molecular. Vale notar que nem todas as ERO são radicais, o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete não possuem elétrons desemparelhados, e sua reatividade é atribuída ao fato de seus elétrons de valência estarem situados em órbitas mais distantes do núcleo, o que leva o átomo a um estado químico altamente reativo (Ciência Hoje, 2000).



O principal problema é que o H_2O_2 atravessa facilmente as membranas celulares, o que leva a danos significativos. Essas espécies reativas de oxigênio para se estabilizarem devem doar ou receber elétrons de uma ou outra molécula, tornando esta última uma espécie também radicalar e a consequência disto é a oxidação dos fosfolípidios de membranas celulares e subcelulares, do DNA, e das proteínas (Duran & Cadenas, 1987).

Normalmente a geração de oxirradicais se dá a partir da formação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Mathy-Hartert et al, 1998). Este radical pode se produzido por três vias

principais: reação fotoquímica, peroxidação lipídica e na “explosão oxidativa” de fagócitos.

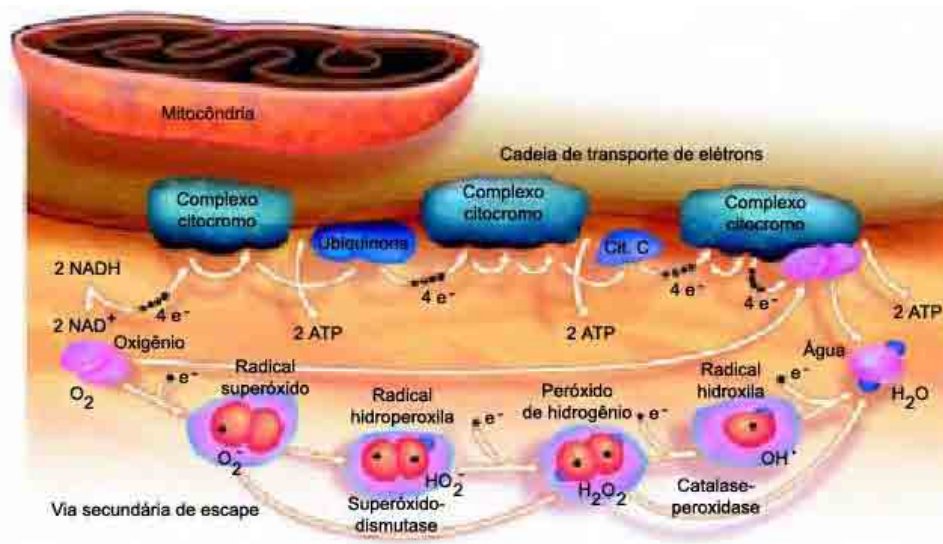


Figura 1: Redução tetravalente do oxigênio no complexo citocromo oxidase mitocondrial

(fonte: Ciência Hoje, vol. 27, nº 158).

Os leucócitos polimorfonucleares (LPMN), principalmente dos neutrófilos, fagocitam e destroem microorganismos invasores e, desta maneira, desempenham um importante papel nos mecanismos de defesa do organismo em todos os níveis tissulares. Ao lado dessas funções de importância vital, a outra face da fisiologia do processo fagocitário apresenta um componente variável de auto-agressão, cuja importância, vem sendo, cada vez mais, destacada na literatura (Chapple, 1997). Para exercer a sua função, os LPMN devem migrar para o sítio da infecção induzidos por sinais químicos específicos, reconhecer, fagocitar e finalmente destruir o patógeno invasor. Sua atividade microbicida é um processo dinâmico que requer energia. As alterações metabólicas associadas com a ação antimicrobiana dos LPMN (aumento do metabolismo de carboidratos e consumo de oxigênio) são referidas como explosão ou surto oxidativo ou respiratório (Babior, 1984).

Assim, um rápido aumento do metabolismo dos carboidratos, pela via das pentoses fosfato (Henderson & Chapple, 1996), associado a um aumento do consumo de O_2 , e sob

ação da enzima de membrana NADPH oxidase, é produzido o radical ânion superóxido. Uma vez formado, o ânion superóxido gera outras ERO, estas, por sua vez, podem interagir entre si e com outras biomoléculas (Chapple, 1997). A figura 2 mostra esta geração de ERO.

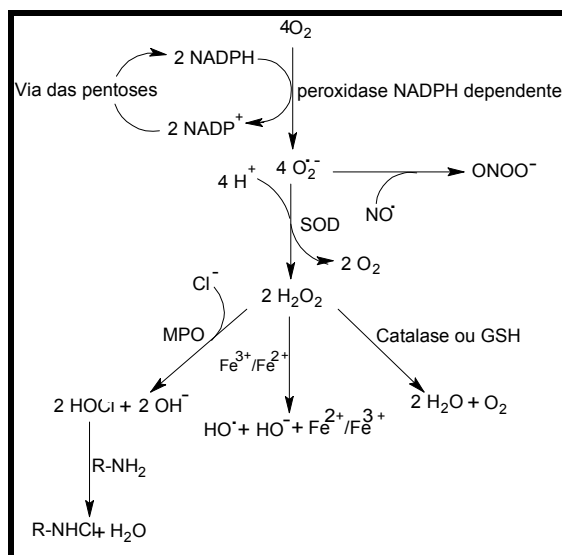


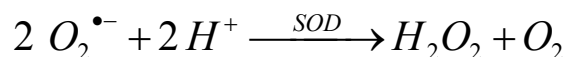
Figura 2: Geração de espécies reativas de oxigênio.

Anion superóxido (O₂^{•-})

É formado após a primeira redução monoelétrica do oxigênio, podendo ocorrer em quase todas as células aeróbicas. Também é produzido durante a ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (Halliwell & Gutteridge, 1990; 1986). Têm sido observadas lesões biológicas, associadas a sistemas geradores de radical superóxido; seja em sistemas enzimático, fagocítico ou químico (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

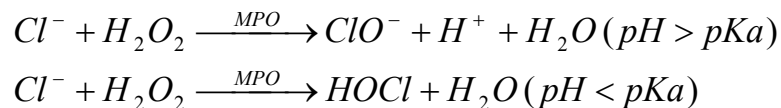
A maior parte do oxigênio consumido pela “explosão oxidativa” de neutrófilos é convertida em peróxido de hidrogênio por dismutação do radical ânion superóxido. Esta conversão pode ser espontânea ou através da ação da enzima superóxido dismutase (SOD).



Apesar de não ser um radical livre, pois não contém elétrons desemparelhados na camada de valência, o H₂O₂ é um metabólito extremamente deletério, pois participa de reações que levam à produção do radical hidroxil (Ferreira & Matsubara, 1997). Além disso, o H₂O₂ é altamente tóxico para as células. Esta espécie tem facilidade de difusão em camadas lipídicas, sendo capaz de atravessar membranas e, desta maneira, pode reagir com membranas biológicas ou com proteínas ligadas ao íon Fe⁺⁺. Vale lembrar, também, que o peróxido de hidrogênio tem vida longa, podendo atuar em sítios distantes daquele em que foi gerado (Ferreira & Matsubara, 1997).

Ácido hipocloroso (HOCl)

O ácido hipocloroso é formado através da oxidação de íons cloreto na presença de peróxido de hidrogênio. A reação é catalisada pela enzima mieloperoxidase (Lapenna & Cuccurullo, 1996).



Esta espécie pode ser considerada como o agente oxidante mais abundante gerado por leucócitos do sangue (Lapenna & Cuccurullo, 1996). O ácido hipocloroso é um agente oxidante extremamente reativo. Além de atacar biomoléculas de grande importância fisiológica, tais como: tióis, tioéteres, aminas, aminoácidos, nucleotídeos e ascorbato (Weis, 1989; Halliwell & Gutteridge, 1989; Eaton, 1993), ele é capaz de gerar outras ERO, tais como: oxigênio singlete e radical hidroxil, através de sua reação com peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, respectivamente (Weiss, 1989; Lapenna & Cuccurullo, 1996).

O ácido hipocloroso apresenta, ao mesmo tempo, ação protetora contra bactérias e agressora aos tecidos. Células de mamíferos e de bactérias não são capazes de eliminar o HOCl através de uma via catalítica, visto que defesas enzimáticas contra oxidantes clorados não estão presentes nestes organismos (Lapenna & Cuccurullo, 1996).

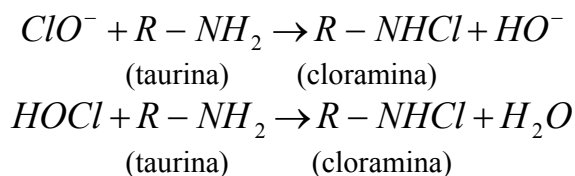
A mieloperoxidase é uma enzima catiônica em pH fisiológico e, desta maneira, é capaz de se ligar a estruturas biológicas aniônicas, tais como: fosfolipídeos de membranas celulares. Esta enzima, também, catalisa a geração de HOCl, biomolécula que promove injúria celular (Weiss, 1989). A mieloperoxidase foi encontrada em lesões de aterosclerose humana (Daugherty et al, 1994), sugerindo, assim, possuir função de agente oxidante clorinado, nos processos aterogênicos (Lapenna & Cuccurullo, 1996). Neste contexto, o HOCl pode modificar, por oxidação, lipoproteínas de baixa densidade para uma forma aterogênica. Aparentemente, ocorre a oxidação de resíduos de lisina da apoproteína B-100 (Hazell & Stocker, 1993; Hazel et al, 1994).

O desenvolvimento de moléculas, farmacologicamente capazes de antagonizar os efeitos do HOCl, pode ajudar a combater a injúria tecidual (Lapenna & Cuccurullo, 1996). Alguns autores sugerem que drogas antiinflamatórias (Wasil et al, 1987), tais como: rifampicina e tetraciclina (Wasil et al, 1988) e captopril (Aruoma et al, 1991), possuem

esta capacidade. O seqüestro farmacológico do HOCl será, terapeuticamente, significativo se, na concentração da droga *in vivo*, a reação com o ácido hipocloroso for rápida o bastante, de maneira a proteger as moléculas-alvo, biologicamente importantes, da oxidação pelo HOCl (Halliwell, 1995; Lapenna & Cuccurullo, 1996).

Cloraminas

O ácido hipocloroso é capaz de formar grupos de oxidantes conhecidos como cloraminas, através de sua reação com aminas primárias ou secundárias; moléculas estas, que estão prontamente disponíveis em sistemas biológicos (Thomas et al, 1986; Weiss, 1989).

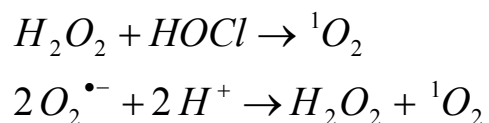


As cloraminas são agentes oxidantes de vida longa e menos tóxicos que o HOCl. Sua reatividade é dependente de sua lipossolubilidade. A monocloramina (NH₂Cl), que é formada pela reação entre HOCl e a amônia, por ser altamente lipossolúvel, é mais reativa do que o próprio HOCl (Babior, 2000). O β-aminoácido taurina, aminoácido de maior abundância em neutrófilos (Zgliczynski, 1971), é o principal alvo do HOCl nestas células, formando assim, a taurina cloramina (TauCl).

Estes agentes oxidantes, particularmente as monocloraminas, estão relacionadas à injúria gástrica observada na presença de *Helicobacter pylori*. Esta bactéria produz elevadas quantidades de amônia e ativa os neutrófilos que, por sua vez, produzem ácido hipocloroso. Assim, é formado NH₂Cl pela reação da amônia com o HOCl (Lapenna & Cuccurullo, 1996).

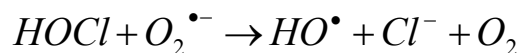
Oxigênio singlete (1O_2)

O estado excitado singlete do oxigênio não é um radical, uma vez que não contém elétrons desemparelhados na camada de valência. Sua toxicidade é devida ao fato de que reage com uma grande variedade de compostos biológicos, como: lipídeos de membrana. Pode ser produzido através da reação do H_2O_2 com HOCl ou pela dismutação espontânea do $O_2^{\bullet-}$ (Halliwell & Gutteridge, 1990).

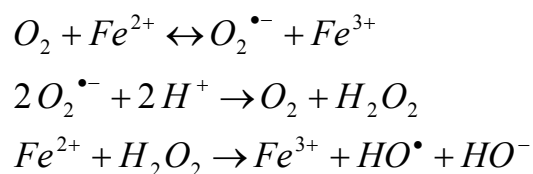


Radical hidroxil (HO^{\bullet})

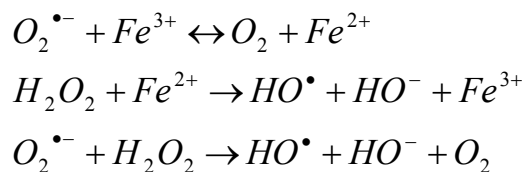
É um dos mais reativos radicais conhecidos. Pode ser gerado a partir da reação do HOCl e $O_2^{\bullet-}$ ou pelas reações de Fenton e Harber-Weiss.



Reação de Fenton (Ferreira & Matsubara, 1997).



Reação de Harber-Weiss (Ferreira & Matsubara, 1997).



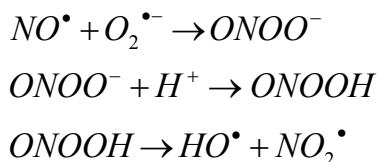
A combinação, extremamente rápida, do OH^{\bullet} com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido, confirma sua alta reatividade. Assim, se o radical hidroxil for produzido próximo a uma molécula de DNA, e a este DNA estiver ligado um metal, poderão ocorrer modificações de bases nitrogenadas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, o radical hidroxil pode inativar uma variedade de proteínas ao oxidar seus grupos sulfidrílicos, formando assim, pontes dissulfeto (Ferreira & Matsubara, 1997). Também, pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados (lipoperoxidação) das membranas celulares (Halliwell & Gutteridge, 1986).

Óxido nítrico (NO^{\bullet}) e peróxinitrito ($OONO^{\bullet}$)

Em meio biológico, estas diferentes espécies, formam-se, rapidamente, a partir do momento que a enzima óxido nítrico síntase (NOS) torna-se cataliticamente ativa. A NOS é a enzima responsável pela produção endógena de óxido nítrico, através da oxidação de uma molécula de L-arginina em óxido nítrico e L-citrulina (MacMicking et al, 1997). Existem duas formas de NOsintase: a constitutiva, enzima com menor atividade, está presente no endotélio vascular e sistema nervoso central e produz baixas quantidades de oxido nítrico que atuam como moléculas sinalizadoras, e a indutiva que é uma enzima de alta afinidade produzida por fagócitos, quando estes são estimulados (Babior, 2000).

O óxido nítrico é um radical gasoso, lipossolúvel e hidrossolúvel; é uma espécie reativa do nitrogênio que reage com o oxigênio em água para formar outros radicais (MacMicking et al, 1997).

O peróxinitrito (OONO^-), é formado pela reação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ com o óxido nítrico, é um potente agente oxidante, possui propriedades similares ao radical hidroxil. Pode ser protonado e, desta maneira, formar o ONOOH que, posteriormente, se decompõe em HO^\bullet e radical dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet). As etapas descritas encontram-se representadas a seguir:



Radical hidroperoxila (HO_2^\bullet)

É a forma protonada do radical superóxido. Existem evidências de que seja mais reativo do que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Evidentemente, alguns oxirradicais podem ser formados sem uma primeira produção de radical superóxido, como por exemplo, a formação de peróxido de hidrogênio por reação com metais de transição e por enzimas (Halliwell. & Gutteridge, 1989).

Em condições normais, a concentração destas espécies reativas dentro das células é extremamente baixa pelo fato de existirem enzimas antioxidantes que as removem, ou impedem sua formação. Estes radicais tendem a ser eliminados do organismo pelo

conjunto das enzimas glutathione peroxidase, glutathione reductase, superóxido dismutase e pela catalase (Khalil, 2002).

1.3 Capacidade Antioxidante

Uma definição ampla para o termo antioxidante é: “uma substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada ao substrato oxidável (que inclui várias substâncias encontradas em tecidos vivos, incluindo proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos), impede ou previne, significativamente, a oxidação desse substrato” (Vannucchi, H.; 1998). Antioxidantes podem ser estudados em sistemas biológicos, quando existe a intermediação das ERO, com a utilização de ensaios que medem a produção destas.

As espécies radicalares estão envolvidas nos mecanismos de reações inflamatórias ou atuam como segundos mensageiros para manter diversas funções celulares. Assim, o equilíbrio, entre a formação e a remoção de espécies radicalares no organismo, deve ser regulado de forma que as reações e processos metabólicos, dependentes das mesmas, possam ocorrer em um nível adequado para a manutenção da fisiologia das células (Halliwell, 1992).

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar na morte celular (Halliwell & Gutteridge, 1989). Este tipo de lesão oxidativa é definida como estresse oxidativo.

Neste contexto, os principais meios de defesa antioxidante no organismo podem ser divididos em três grupos: antioxidantes enzimáticos, antioxidantes não enzimáticos e proteínas ligadoras de metais. Os sistemas enzimáticos envolvem as enzimas do ciclo redox da glutatona, particularmente a glutatona peroxidase, a superóxido dismutase e a catalase, que converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. A proteção não enzimática por pequenas moléculas, dentre as quais as mais utilizadas são glutatona, ubiquinona, ácido úrico, bilirrubina, NADPH e NADH, flavonóides, vitamina C, vitamina E, β -carotenóides e licopeno. Entre as proteínas ligadoras de metais podemos citar a ceruloplasmina (cobre), metalotioneína (cobre), albumina (cobre), transferrina (ferro), ferritina (ferro) e a mioglobina (ferro).

1.4 Peroxidases

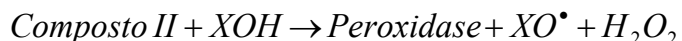
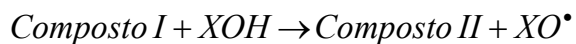
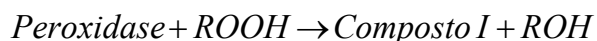
As peroxidases são enzimas que oxidam uma variedade de xenobióticos, através do peróxido de hidrogênio (Saunders, 1973). A enzima nativa contém um grupamento heme, geralmente ferriprotoporfirina IX, com quatro nitrogênios pirrólicos ligados ao Fe (III). A quinta posição de coordenação na porção proximal do heme está ocupada por um resíduo de histidina. A sexta posição de coordenação permanece livre, na enzima nativa, na porção distal do heme (O'Brien, 2000).

Peroxidases são encontradas tanto em animais como vegetais, sugerindo que tais enzimas devam ser uma parte essencial de todos os seres vivos (Brunetti & Faria-Oliveira, 1995). As peroxidases de plantas, como a *horseradish peroxidase* (raiz forte – rábano silvestre), consistem de aproximadamente 300 aminoácidos, com um grupamento heme ligado não covalentemente. As peroxidases de mamíferos são muito maiores (576-738 aminoácidos) e apresentam o grupamento heme ligado covalentemente (O'Brien, 2000).

A peroxidase de raiz forte (HRP) é, provavelmente, a peroxidase mais estudada e pode ser facilmente extraída da planta “rábano silvestre – raiz forte”, da qual provém seu nome.

Esta enzima tem uma massa molecular de 42,1 KDa, é uma hemoproteína, cujo grupo prostético, a protoporfirina IX, está ligada, não-covalentemente, à parte protéica da molécula (O'Brien, 2000).

A oxidação de xenobióticos, por peroxidases, pode ser representada pelo ciclo de reações a seguir:



1.5 Antioxidantes na dieta

A prevenção às doenças tem sido aceita como a maneira mais promissora de se controlar patologias. O consumo de frutas e vegetais auxiliam na prevenção de processos degenerativos, diminuindo a incidência e a taxa de mortalidade por câncer ou doenças cardiovasculares, por exemplo. A prevenção, que as frutas e os vegetais promovem contra estas patologias, tem sido atribuída à ação de antioxidantes presentes nesses alimentos (Yen et al, 2001).

Devido ao potencial carcinogênico de antioxidantes sintéticos, antioxidantes naturais são alvos alternativos para minimizar ou retardar os processos de deterioração oxidativa em alimentos e para o desenvolvimento de alimento funcionais. A atividade antioxidante de compostos fenólicos de plantas e fungos deve-se às suas propriedades REDOX e estruturas químicas, que possibilitam a estes compostos exercerem a função de

neutralizar radicais livres, quelar metais reativos e agirem como supressores de oxigênio no estado singlete e triplete (Chun et al, 2005).

Compostos fenólicos, oriundos do metabolismo secundário de plantas, são bons agentes antioxidantes naturais (Atoui et al, 2005). A atividade antioxidante de compostos orgânicos depende de algumas características estruturais, que incluem, na maioria dos casos, a presença de grupamentos fenólicos. Desta forma, flavonóides, fenilpropanóides e outros compostos aromáticos são os principais alvos na procura por antioxidantes (Velloso, 2005).

A busca por opções terapêuticas para diferentes patologias faz da pesquisa de produtos naturais um campo fértil em opções de moléculas com diferentes atividades biológicas. As plantas apresentam, em seus metabólitos secundários, uma grande fonte de possíveis fármacos, devido à diversidade de moléculas com as mais variadas estruturas e propriedades químicas. A relevância da pesquisa de produtos naturais proporciona a descoberta de novos fármacos e o estudo de substâncias, que possam agir sobre diferentes espécies oxidantes geradas em nosso organismo, torna-se de grande importância (Velloso, 2005).

2 – OBJETIVOS

O objetivo, do presente trabalho, foi promover a partição (usando técnicas cromatográficas como: CCD e CLAE) e a avaliação, *in vitro*, das frações do cogumelo *Agaricus blazei* Murril como produtos antioxidantes, utilizando para isto metodologias pré-estabelecidas, como:

A) Sistemas químicos

- i) Radical ABTS
- ii) Radical DPPH
- iii) TNB/HOCl
- iv) TNB/H₂O₂
- v) Radical Superóxido

Foram avaliados, também, pelos sistemas acima citados, biomoléculas antioxidantes referências (trolox e ácido úrico), na tentativa de estabelecer uma comparação quantitativa da atividade antioxidante em relação às amostras.

Além disso, objetivou-se avaliar a presença de peroxidase e polifenoloxidase, através de cinéticas enzimáticas com seus substratos específicos:

B) Sistema para dosagem de peroxidase

- i) Amostra/H₂O₂/Guaiacol

C) Sistema para dosagem de polifenoloxidase

- i) Amostra/Catecol

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

Todos os ensaios espectrofotométricos foram realizados em espectrofotômetro UV/VIS HP 8452, *diode array*, acoplado a um microcomputador dedicado HP – PC III.

Equipamentos utilizados para análise das amostras, em CLAE: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (DAD). Varian Prostar Ternário de Bombas, Modelo 240. Detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD). Aquisição de dados via Software Class VP. Cromatógrafo Analítico CLAE-DEQ. Varian Pro Star 9090 EICD. Detector eletroquímico amperométrico (eletrodo de trabalho carbono vítreo, e eletrodo referência Ag/AgCl). Bomba modelo 210. Aquisição de dados via Software Class VP.

3.2 Obtenção de *Agaricus blazei* Murril e tratamentos realizados

O *Agaricus blazei* Murril foi coletado na “Estância Valemar” (São Jose do Rio Preto - SP) e identificado pelo Dr. Arailde Fontes Urben (pesquisador da EMBRAPA). O basidiocarpo do *Agaricus blazei* Murril foi seco a 40°C por 24 horas em um forno com circulação de ar forçada, e depois triturado até ficar em pó.

Para os ensaios, que visam avaliar a capacidade antioxidante, as amostras não são de compostos isolados, sendo extrato e frações orgânicas obtidas através de extração etanólica e partição com solvente orgânicos do pó de *Agaricus blazei* Murril. A identificação destas amostras é feita no item 3.2.1.

Para os ensaios de dosagem de peroxidase e polifenoloxidase as amostras foram extraídas em tampão fosfato de potássio 5,0mM pH 6,50 com 1% de PVP (polyvinylpyrrolidone). A identificação das amostras é feita no item 3.2.2.

3.2.1 Amostras obtidas para avaliar capacidade antioxidante

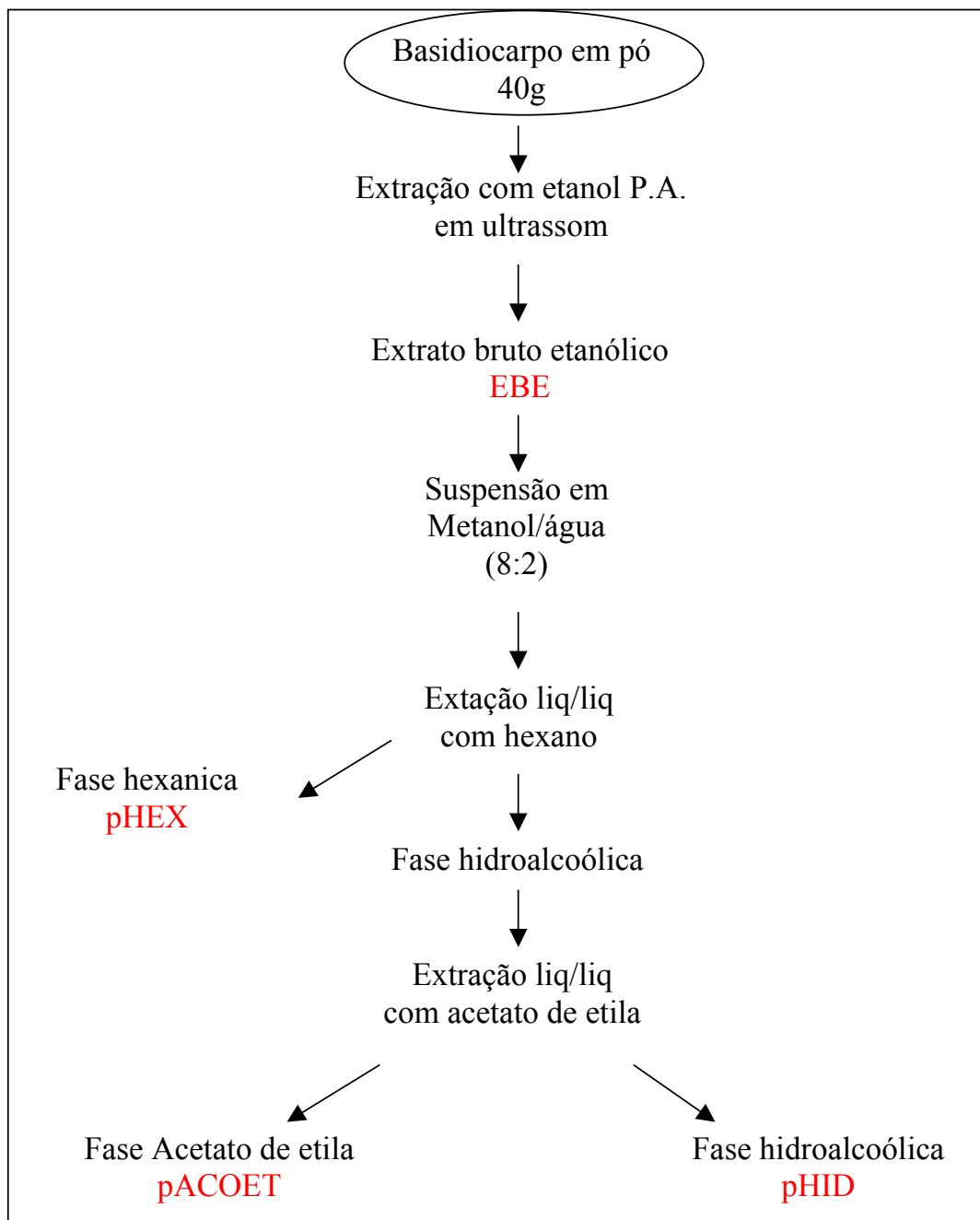


Figura 3: Identificação das amostras de *Agaricus blazei* Murril usadas para avaliar capacidade antioxidante.

3.2.2 Amostras obtidas para dosar as enzimas peroxidase e polifenoloxidase

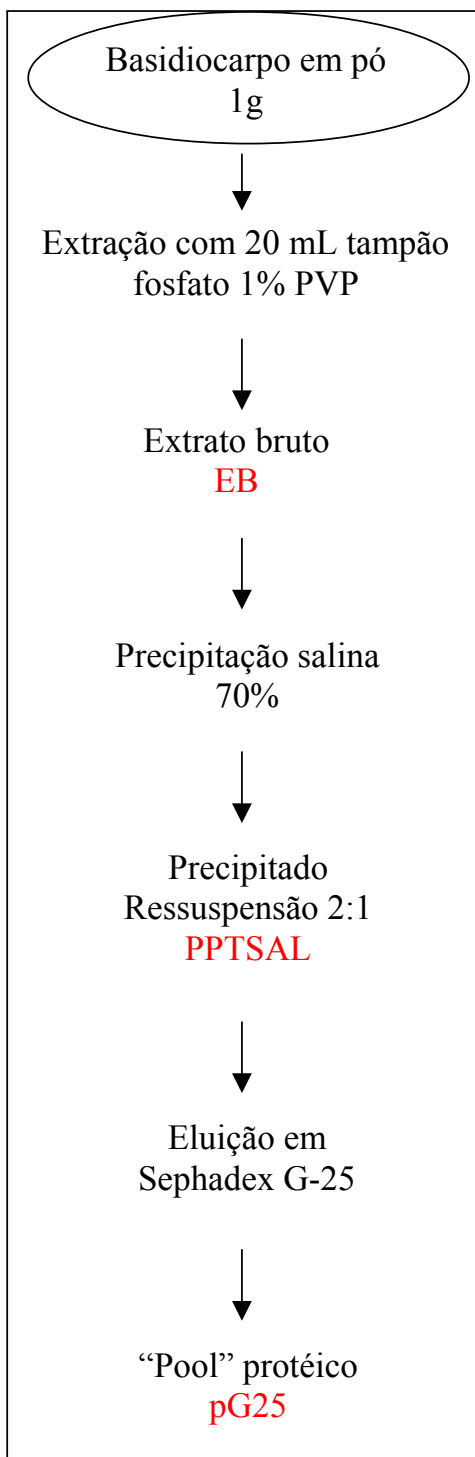


Figura 4: Identificação das amostras de *Agaricus blazei* Murril usadas para dosar peroxidase e polifenoloxidase.

3.3 Estudo do perfil químico das amostras de *Agaricus blazei* Murril, via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).

Para traçar o perfil químico do *Agaricus blazei* Murril, as amostras EBE, pHEX, pACOET e pHID, obtidas por extração etanólica e partição líquido-líquido do extrato bruto etanólico da amostra em pó, foram submetidas à análise via CLAE-DAD de acordo com as condições descritas a seguir:

Coluna: fase reversa C₁₈;

Comprimento de onda: 200-500 nm

Modo: Gradiente de 5-100% de metanol em água;

Fluxo: 1,0 mL.min⁻¹;

Volume de injeção: 10 µL;

Tempo de análise: 45 min.

3.4 Estudo do perfil eletroquímico das amostras de *Agaricus blazei* Murril, via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DEQ).

A fim de determinar a potencialidade do *Agaricus blazei* Murril, como antioxidante, as amostras EBE, pACOET e pHID, obtidas por extração etanólica e partição líquido-líquido do extrato bruto etanólico da amostra em pó, foram submetidas a análise via CLAE-DEQ (CLAE acoplada a detector eletroquímico) nas condições descritas a seguir:

Coluna: fase reversa C₁₈;

Modo: Isocrático; Metanol/Água (2:8) e 0,2% Ac. Acético;

Fluxo: 1,0 mL.min⁻¹;

Volume de injeção: 20 μ L;

Tempo de análise: 30 min.

Potencial da cela: 0,7 eV

Sensibilidade da cela: μ A

Este tipo de detector cromatográfico (detector eletroquímico) é capaz de revelar a presença, somente, de metabólitos que possuam potencial oxi-redoz; tais metabólitos podem atuar como antioxidantes.

3.5 Avaliação do potencial antioxidante

Para os ensaios antioxidantes foram avaliados, além das amostras de *Agaricus blazei* Murril, o ácido úrico e trolox (figura 5) como biomoléculas antioxidantes de referência.

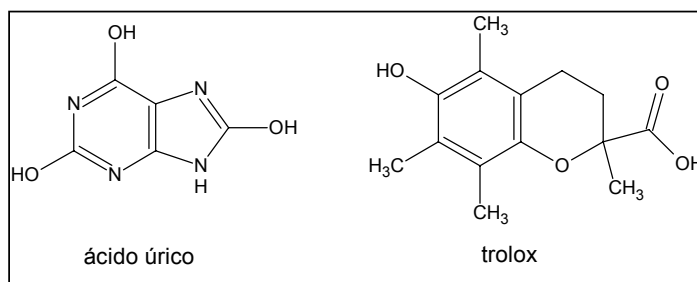


Figura 5: Estruturas moleculares dos padrões antioxidantes.

Para os cálculos das porcentagens de inibição, foi utilizada uma das seguintes equações, dependendo se o sistema é direto ou indireto, sendo “X” o comprimento de onda (nm) em que são feitas as leituras.

Sistema direto

$$\text{Equação 1: } INIBIÇÃO(\%) = \left(1 - \left(\frac{A_{Xnm} \text{ Teste}}{A_{Xnm} \text{ Max}} \right) \right) \times 100$$

Onde: $A_{Xnm} \text{ Max}$ é a absorbância na ausência de amostra e

$A_{Xnm} \text{ Teste}$ é a absorbância na presença de amostra.

Sistema indireto

$$\text{Equação 2: } INIBIÇÃO(\%) = \left(1 - \left(\frac{A_{Xnm} \text{ Max} - A_{Xnm} \text{ Teste}}{A_{Xnm} \text{ Max} - A_{Xnm} \text{ Min}} \right) \right) \times 100$$

Onde: $A_{Xnm} \text{ Max}$ é a absorbância na ausência do agente oxidante e de amostra,

$A_{Xnm} \text{ Min}$ é a absorbância na presença do agente oxidante e ausência de amostra e

$A_{Xnm} \text{ Teste}$ é a absorbância na presença do agente oxidante e de amostra

3.5.1 Sistema radical ABTS

O radical catiônico do ABTS [2,2'-azinobis(3-ethybenzothiazoline-6-sulfonic acid)] (Figura 6) é corriqueiramente utilizado para avaliar as habilidades dos flavonóides e agentes fenólicos como sequestradores de radicais (Pellegrini et al.1999). Este radical é gerado em solução, segundo Pellegrini et al (1999), com substituição do etanol por tampão fosfato de potássio 5mM. O $ABTS^{\bullet+}$ apresenta picos nos comprimento de onda 630nm, 734nm e 812nm (Pellegrini et al, 1999). Em tubos de ensaio pipetou-se as amostras, e, a seguir, $ABTS^{\bullet+}$ em concentração final 0,1mM. Completaram-se os volumes para 2mL com tampão fosfato de sódio 5mM, pH 7,4 à 25°C. Nos ensaios avaliou-se a ação antioxidante pelo decréscimo da absorbância em 734nm. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão das porcentagens de inibição calculadas através da equação 1.

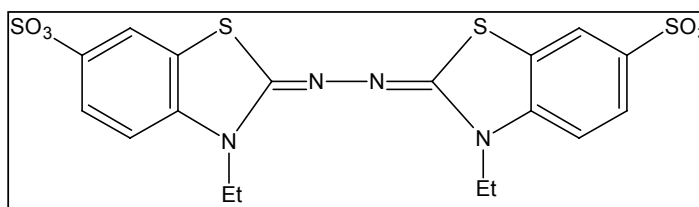


Figura 6: Estrutura molecular do ABTS.

3.5.2 Sistema Radical DPPH

Em tubos de ensaio pipetou-se as amostras (em diferentes concentrações), e, a seguir, DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil, figura 7) em concentração final $60\mu\text{M}$. Completaram-se os volumes para 1mL com etanol absoluto. Incubou-se a mistura por 15 minutos, ao fim dos quais se leu a absorbância em 531nm. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão das porcentagens de inibição calculadas através da equação 1.

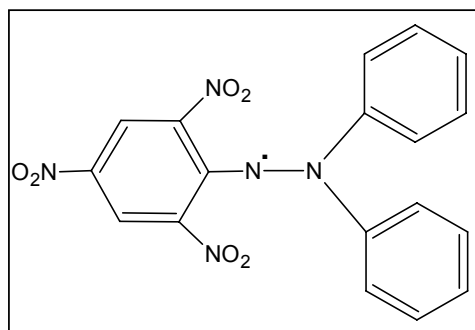


Figura 7: Estrutura molecular do DPPH.

3.5.3 Sistema TNB/HOCl e TNB/H₂O₂

O TNB (5-tio-2-nitrobenzóico, figura 8) foi preparado segundo Ching et al (1994) e sua concentração foi determinada espectrofotometricamente através de seu coeficiente de extinção molar em 412nm ($13600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Ching et al, 1994), assim como, as concentrações de HOCl ($350\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 298nm; Zgliczynski et al, 1971) e H₂O₂ (80

$M^{-1}cm^{-1}$ em 230nm; Brestel, 1985). As reações foram efetuadas em tampão fosfato de sódio 5mM, pH 7,4 à 25°C. Em tubos de ensaio, pipetou-se a amostra (em diferentes concentrações), seguida por tampão (q.s.p. volume final da reação = 1mL), TNB 80 μ M e HOCl 22 μ M, ou H₂O₂ 100 μ M. Incubou-se por 15 minutos (para ensaio com HOCl) ou por 2 horas (para ensaio H₂O₂) e leu-se a absorbância em 412nm (Velloso, 2005). Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão das porcentagens de inibição calculadas através da equação 2.

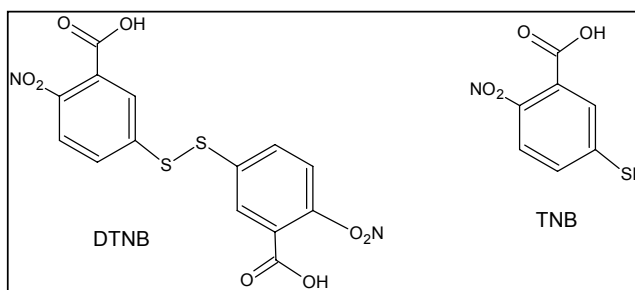


Figura 8: Estruturas moleculares do DTNB e do TNB.

3.5.4 Sistema radical superóxido

O ânion superóxido reage com o NBT para formar uma formazana. A intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração do radical (Kakkar et al, 1984). O ensaio foi realizado em solução de pirofosfato de sódio (0,025M, pH 8,3), sendo que a mistura reacional continha 25 μ L de metassulfato de fenazina 372 μ M, 75 μ L de NBT 600 μ M, 50 μ L de NADH 1561 μ M e diferentes concentrações das amostras de *Agaricus blazei* Murril em volume final de 1mL. As reações foram iniciadas pela adição de NADH. Após incubação, por 90 segundos a 25°C foram adicionados 100 μ L de ácido acético glacial e 900 μ L de tampão pirofosfato de sódio. Após vigorosa agitação a intensidade de cor da mistura foi

medida em 560nm. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão das porcentagens de inibição calculadas através da equação 1.

3.6 Determinação da atividade de enzimas peroxidase e polifenoloxidase

3.6.1 Sistema amostra/H₂O₂/Guaiacol (Dosagem de peroxidase)

Em tampão fosfato, pH 6,5, a 37°C, temos amostra (diferentes concentrações) e H₂O₂ 0,5mM. A reação é iniciada com a adição de guaiacol 2mM (substrato específico para peroxidase) e monitorada em 470nm por 1 minuto. Determinou-se v_0 .

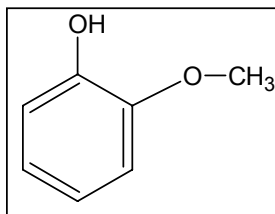


Figura 9: Estrutura molecular do Guaiacol.

3.6.2 Sistema amostra/Catecol (Dosagem de polifenoloxidase)

Em tampão fosfato, pH 6,5, a 37°C, temos amostra (diferentes concentrações). A reação é iniciada com a adição de Catecol 2mM (substrato específico para polifenoloxidase) e monitorada em 420nm por 1 minuto. Determinou-se v_0 .

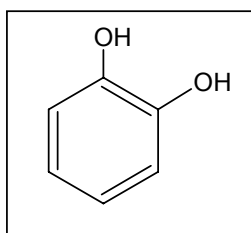


Figura 10: Estrutura molecular do catecol.

3.7 Dosagem de Proteínas Totais e determinação da atividade específica (AE).

A dosagem de proteínas totais foi realizada nas amostras identificadas no item 3.3.2. Para isso usou-se o método de Hartree (Hartree, 1972).

Com os dados de velocidade inicial v_0 e o conteúdo protéico das amostras, a atividade específica é calculada segundo a seguinte fórmula:

$$A.E. = v_0 / \mu g \text{ proteina}$$

3.8 Análise Estatística

Os resultados, de triplicatas, são expressos em média \pm desvio padrão (DP).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo do perfil químico das amostras de *Agaricus blazei* Murril, via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).

O cromatograma obtido do extrato bruto etanólico (figura 11) mostra que é possível contar no mínimo sete picos referentes aos metabólitos do *Agaricus blazei* Murril. Já nos cromatogramas das frações (figura 12) temos que a fração hexânica não apresentou nenhum pico, e por isso esta foi desprezada em futuras injeções, enquanto as frações acetato de etila e hidroalcoólica mostraram similaridade no perfil cromatográfico, quando comparadas com o extrato bruto etanólico, por apresentarem os mesmos picos predominantes em tempos de retenção equivalentes.

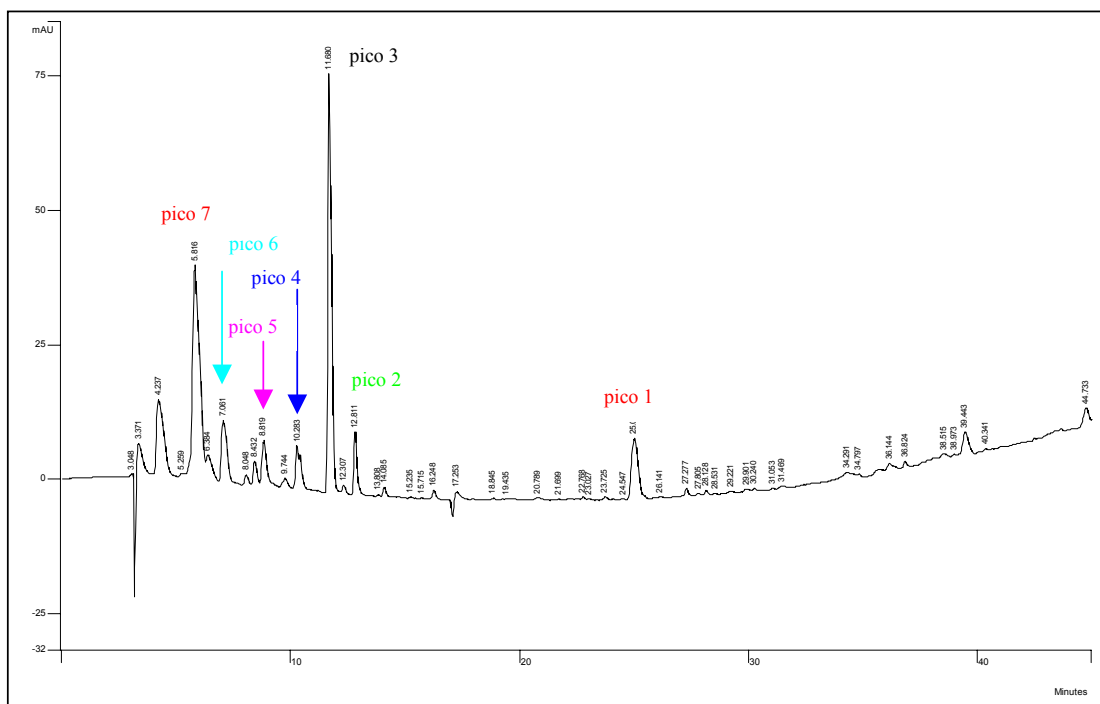


Figura 11: Cromatograma do extrato bruto etanólico da amostra em pó de *Agaricus blazei* Murril, via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).

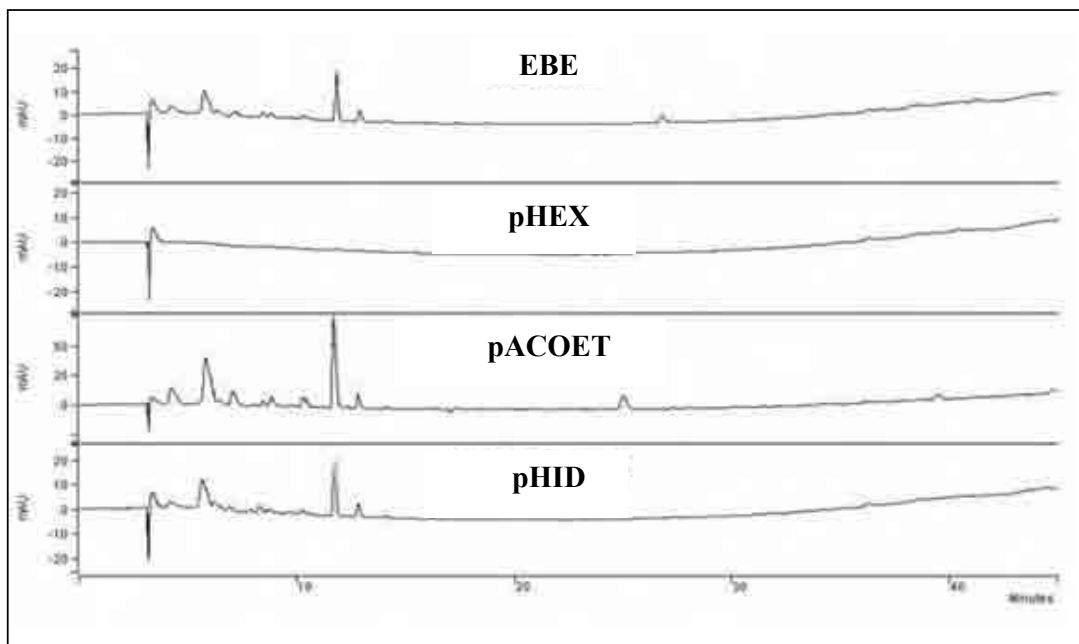


Figura 12: Cromatogramas das amostras de *Agaricus blazei* Murril, via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD). Onde: **EBE** – extrato bruto etanólico; **pHEX** – fração hexânica; **pACOET** – fração acetato de etila e **pHID** – fração hidroalcoólica.

Analisando os espectros de absorção dos picos (figura 13), que foram anteriormente apresentados na figura 11, vemos que os picos 2 e 5 tem perfis de absorção semelhantes aos metabólitos da família dos flavonóides. Desta maneira, podemos sugerir que o pico 2 pode ser referente a um flavonóide e que o pico 5 pode ser devido a um flavonóide com padrão de substituição diferente do pico 2, substituição esta que intensifica a banda de absorção em 266nm. Os outros picos apresentaram espectros de absorção semelhantes entre si, mostrando apenas uma banda de absorção intensa entre 260-270nm, estas bandas de absorção são características de transições $\pi \rightarrow \pi^*$, conhecidas como “banda B” e presentes em alguns compostos aromáticos como: benzeno, alquilbenzenos, tolueno, fenóis, tiofenóis e anisol.

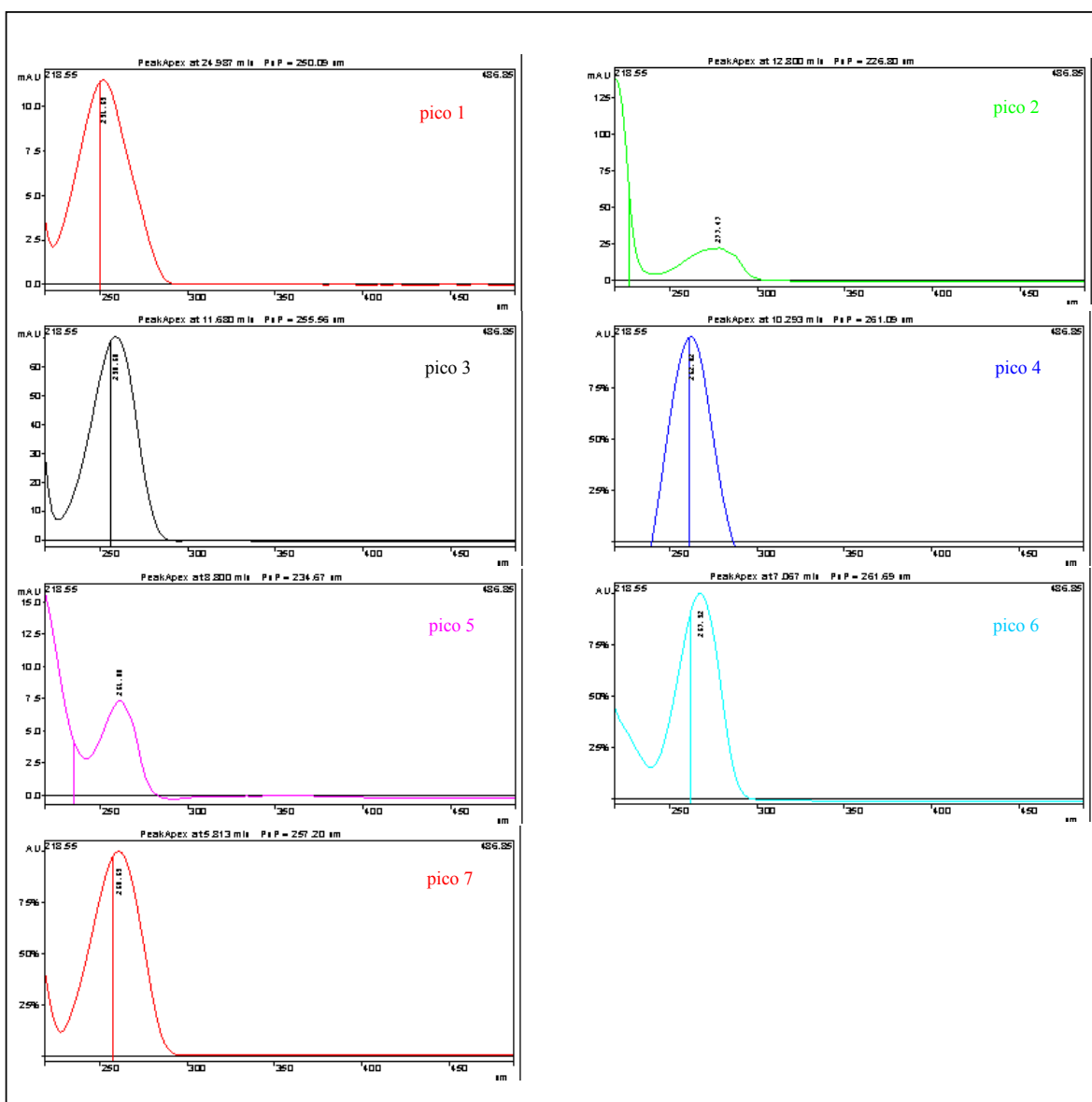


Figura 13: Espectros de absorção dos picos apresentados no cromatograma do extrato bruto etanólico (figura 11) da amostra de *Agaricus blazei* Murril.

4.2 Estudo do perfil eletroquímico das amostras de *Agaricus blazei* Murril, via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DEQ).

Observando os cromatogramas, obtidos ao injetar as amostras de extrato bruto etanólico, fração acetato de etila e fração hidroalcoólica e um cromatógrafo líquido de alta

eficiência equipado com detector eletroquímico amperométrico, foi possível verificar eletroatividade promissora nestas amostras (figura 14).

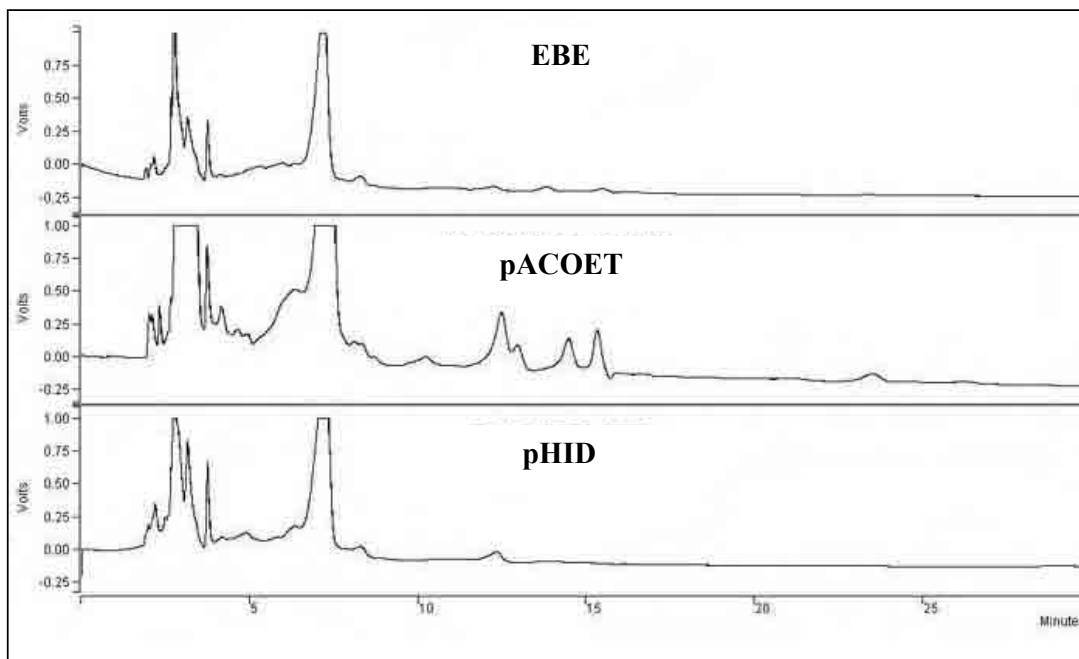


Figura 14: Cromatogramas das amostras de *Agaricus blazei* Murril, via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DEQ). Onde: **EBE** – extrato bruto etanólico; **pACOET** – fração acetato de etila e **pHID** – fração hidroalcoólica.

A análise em CLAE-DEQ, apesar de mostrar resultado animador quanto à existência de potencial redox, é insuficiente para afirmar que as amostras contêm biomoléculas antioxidantes. Com esta técnica, podemos apenas afirmar que existem metabólitos com potencial eletroativo promissor. Deve-se lembrar que para uma biomolécula ter capacidade antioxidante avaliada ela deve ser testada em concentrações disponíveis *in vivo* e utilizar pelo menos uma espécie relevante biologicamente. Como outros testes complementares foram realizados (resultados mostrados a seguir) podemos confirmar para quais tipos de espécies reativas e radicais livres, as amostras atuam como sequestradoras.

Nas mesmas condições estabelecidas (item 3.4 pag. 26) para a obtenção dos cromatogramas de CLAE-DEQ, as amostras foram, agora, injetadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector UV-Vis, sendo que o comprimento de onda do detector foi fixado em 253,6nm (figura 15).

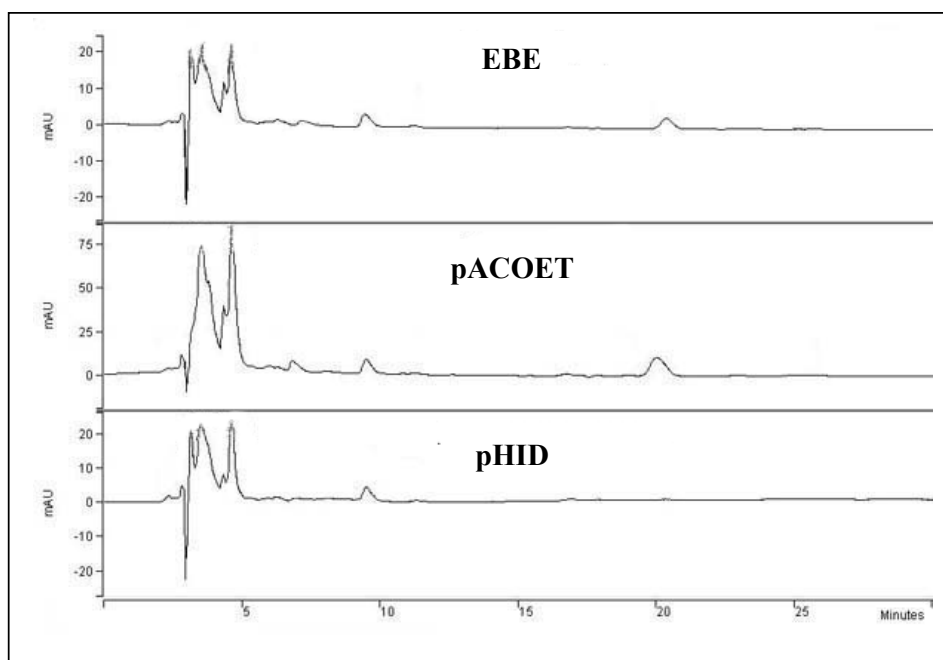


Figura 15: Cromatogramas das amostras de *Agaricus blazei* Murril, via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV-Vis). Onde: **EBE** – extrato bruto etanólico; **pACOET** – fração acetato de etila e **pHID** – fração hidroalcoólica.

Comparando os cromatogramas das figuras 14 e 15, foi possível constatar que existiu um pequeno desvio. Isso, provavelmente, se deve pelo fato de que no CLAE-DEQ a fase móvel não é misturada por um sistema de bombas, e sim uma bomba única bombeia uma fase móvel preparada manualmente. Isto pode ter resultado numa pequena variação na polaridade da fase móvel. Mesmo assim, é possível observar, em ambos gráficos, que cada um dos cromatogramas possuem dois picos majoritários.

4.3 Avaliação do potencial antioxidante

Foram analisadas diferentes espécies reativas (radicalares ou não): modelos sintéticos ($\text{ABTS}^{\bullet+}$ e DPPH) ou existentes em sistemas biológicos (HOCl , H_2O_2 e O_2^-). Além das amostras obtidas do *Agaricus blazei* Murril, testaram-se, também, substâncias com reconhecida ação antioxidante: o ácido úrico (antioxidante endógeno) e trolox (análogo da vitamina E).

4.3.1 Sistema radical ABTS

Neste sistema, o radical é gerado pela reação do ABTS com persulfato de potássio. O radical gerado apresenta três picos de absorção sendo o maior em 734nm, comprimento de onda utilizado nos ensaios (figura 16). Na presença de sequestradores, desse radical, a intensidade da absorbância em 734nm diminui e a diferença da absorção na ausência e na presença das amostras nos fornece a porcentagem de inibição a ser relacionada nos gráficos dose-resposta apresentados.

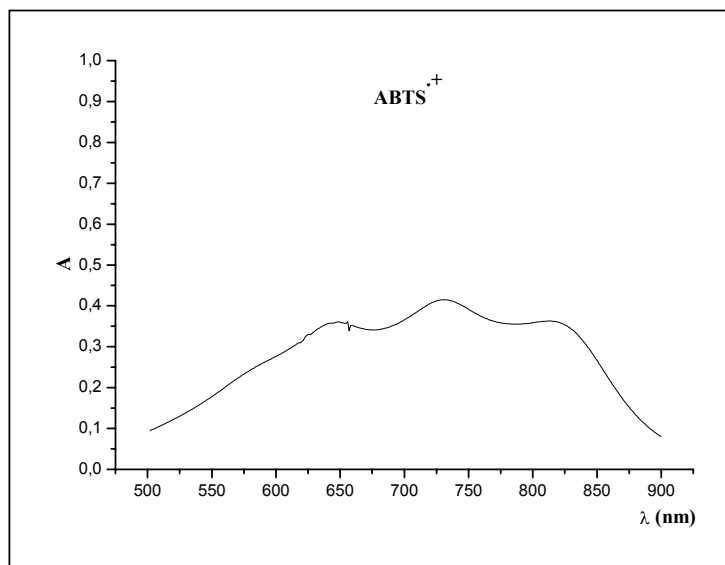


Figura 16: Espectro de absorção do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

O trolox apresentou o menor valor de IC_{50} , isso indicaria que este é um antioxidante de maior eficiência do que o ácido úrico no sistema ABTS. Porém, vemos que o ácido úrico alcança um patamar de inibição maior que o trolox (figura 17A).

As amostras de *Agaricus blazei* Murril apresentaram ação semelhante contra o radical $ABTS^{\bullet+}$, sendo que o perfil antioxidante, bem como os valores de IC_{50} foram, praticamente, os mesmos. A única exceção foi a fração hexânica que não apresentou atividade antioxidante mensurável neste sistema (figura 17B).

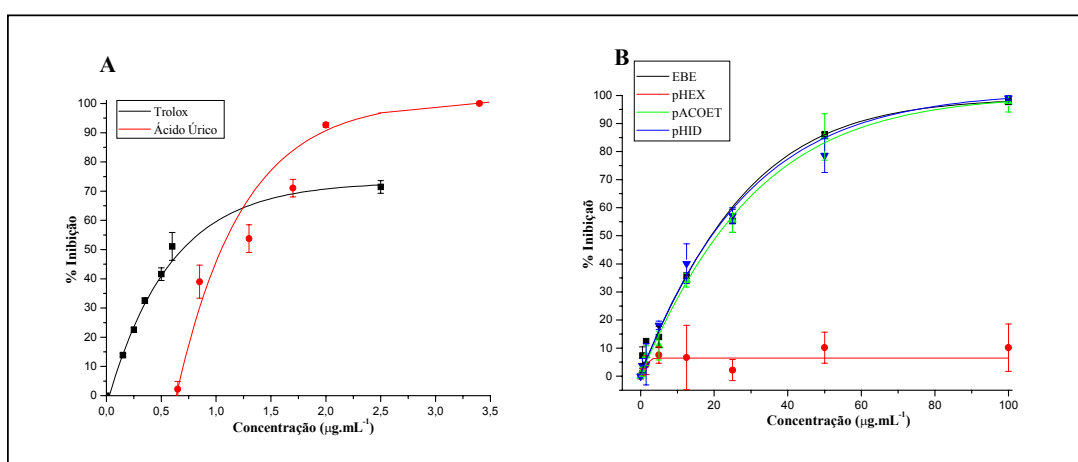


Figura 17: Ação seqüestradora sobre o $ABTS^{\bullet+}$ (0,1mM). Tampão fosfato de sódio 5mM, pH 7,4 à 25 °C.

A – padrões; **B** – *A. blazei* Murril. **EBE** – extrato bruto etanólico; **pHEX** – fração hexano; **pACOET** – fração acetato de etila; **pHID** – fração hidroalcoólica. **n = 3**.

Comparando o IC_{50} dos padrões e das amostras de *Agaricus blazei* Murril, notamos que os padrões possuem menores valores de IC_{50} (figura 18). Vale lembrar, porém, que as amostras não são de metabólitos purificados, e sim, extrato e frações orgânicas, portanto, a capacidade antioxidante destas, no sistema radical ABTS, foi considerada muito boa.

4.3.2 Sistema radical DPPH

O DPPH é um radical estável, muito utilizado nos estudos com antioxidantes. Como pode ser visto no figura 19, ele apresenta máximo de absorção em 531nm,

comprimento de onda utilizado para avaliar a ação das amostras. Na presença de sequestradores, deste radical, a intensidade da absorção em 531nm diminui e a diferença da absorbância, na ausência e na presença das amostras, nos fornece a porcentagem de inibição a ser relacionada nos gráficos dose-resposta apresentados.

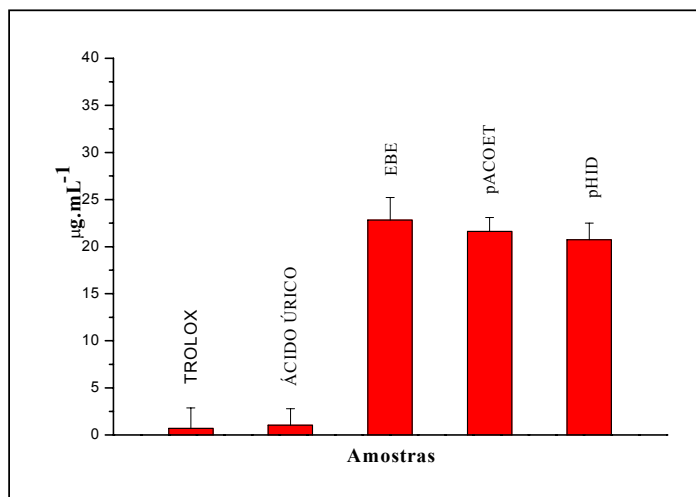


Figura 18: Valores de IC₅₀ na supressão do radical ABTS^{•+}. Tampão fosfato de sódio 5mM, pH 7,4 à 25 °C.

EBE – extrato bruto etanólico; **pACOET** – fração acetato de etila; **pHID** – fração hidroalcoólica. **n = 3**.

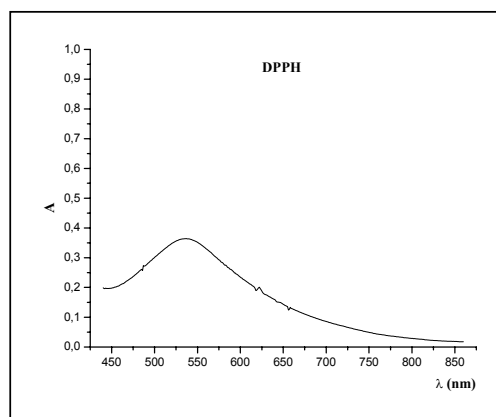


Figura 19: Espectro de absorção do DPPH.

Nas condições testadas, o trolox apresentou maior eficiência, enquanto o ácido úrico não foi capaz de atingir o IC₅₀, tendo sua inibição máxima com 27,32% (figura 20A). Em relação às amostras de *Agaricus blazei* Murril, também neste sistema, apresentaram perfil antioxidante e IC₅₀ semelhantes, com a fração acetato de etila mostrando um patamar

antioxidante pouco inferior. A fração hexânica não apresentou atividade antioxidante mensurável (figura 20B).

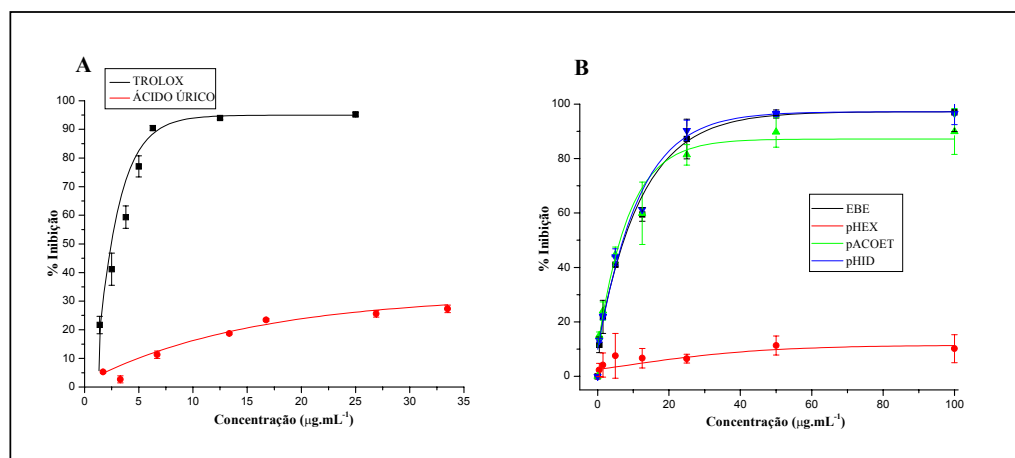


Figura 20: Ação sequestradora sobre o radical DPPH (60µM). Etanol (q.s.p. 1mL) à 25 °C. **A** – padrões; **B** – *A. blazei* Murril. **EBE** – extrato bruto etanólico; **pHEX** – fração hexano; **pACOET** – fração acetato de etila; **pHID** – fração hidroalcoólica. **n = 3**.

Comparando o IC₅₀ dos padrões e das amostras de *Agaricus blazei* Murril, vemos que o trolox apresentou menor valor de IC₅₀ (figura 21). Por outro lado, o padrão de ácido úrico não foi capaz de atingir o IC₅₀. O IC₅₀ das amostras ficou bem próximo do trolox, apesar de não serem metabólitos purificados.

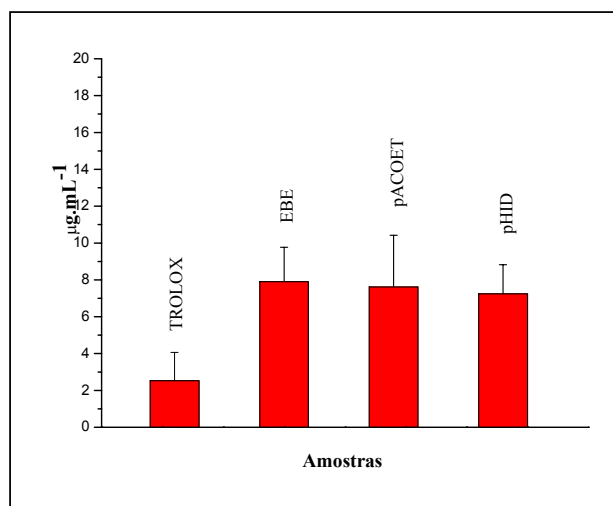


Figura 21: Valores de IC₅₀ na supressão do radical DPPH. Etanol (q.s.p. 1mL) à 25 °C. **EBE** – extrato bruto etanólico; **pACOET**- fração acetato de etila; **pHID** – fração hidroalcoólica. **n = 3**.

4.3.3 Sistema TNB/HOCl e TNB/H₂O₂

A. Atividade seqüestradora de HOCl

A ação das amostras, bem como dos padrões, sobre o ácido hipocloroso foram avaliadas através do ensaio de oxidação do TNB a DTNB (ácido 5-5'ditio(2-nitrobenzóico)), acompanhada através do desaparecimento do TNB monitorado pela queda da absorbância em 412nm (figura 22). Esta queda é comparada na ausência e na presença das amostras avaliadas, através do cálculo de porcentagem de inibição apresentado previamente (equação 2).

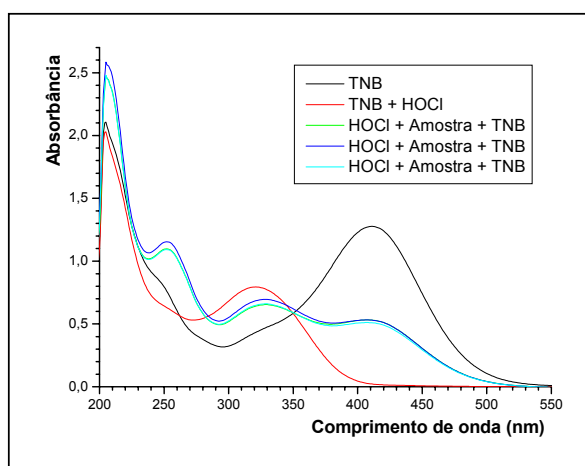


Figura 22: Oxidação do TNB 80 μ M pelo ácido hipocloroso 22 μ M, na ausência e na presença de padrão antioxidante. Tampão fosfato de sódio 5mM, pH 7,4 à 25 °C.

Estudos sobre o comportamento, deste sistema, foram realizados por Velloso (2005), e as condições, por ele estabelecidas, aqui utilizadas.

O ácido úrico apresentou o menor valor de IC₅₀, isso indicaria que este é um antioxidante mais eficiente do que o trolox no sistema TNB/HOCl. Porém, vemos que o trolox é capaz de alcançar um patamar de inibição maior que do ácido úrico (figura 23A). Já as amostras do *Agaricus blazei* Murril, não foram capazes de atingir o IC₅₀,

apresentando inibição máxima em torno de 27,78% para a fração hidroalcoólica. A fração hexânica não apresentou atividade antioxidante (figura 23B).

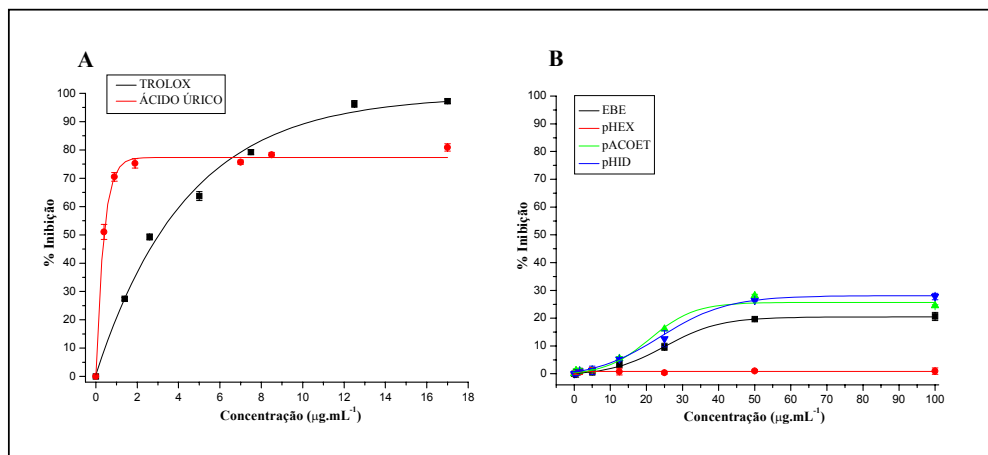


Figura 23: Sistema TNB (80µM) ação seqüestradora sobre o HOCl (22µM). **A** – padrões; **B** – *A. blazei* Murril. Tampão fosfato de sódio 5mM, pH 7,4 à 25 °C. **EBE** – extrato bruto etanólico; **pHEX** – fração hexano; **pACOET** – fração acetato de etila; **pHID** – fração hidroalcoólica. **n = 3**.

B. Atividade seqüestradora de H₂O₂

A ação das amostras sobre o peróxido de hidrogênio foi avaliada através do ensaio de oxidação do TNB a DTNB, acompanhada através do desaparecimento do TNB monitorado pela queda da absorbância em 412nm. Este sistema é semelhante ao TNB/HOCl, sendo que a cinética de oxidação do TNB pelo H₂O₂ é bem mais lenta que pelo HOCl. Estudos sobre o comportamento, deste sistema, foram realizados por Velloso (2005), e as condições, por ele estabelecidas, aqui utilizadas.

Nas condições avaliadas, nenhuma das amostras foi capaz de impedir a oxidação do TNB à DTNB, ou seja, não apresentaram atividade seqüestradora de H₂O₂.

4.3.4 Sistema radical superóxido

No sistema de ânion superóxido, adaptado do Kakkar (1984), esta espécie é gerada pela reação entre NADH e metassulfato de fenazina (PMS). O ânion superóxido produzido é revelado em solução pela reação com o sal de tetrazólio (NBT) gerando uma formazana, com máximo de absorbância em 560nm. Na presença de seqüestradores de ânion superóxido, a intensidade da absorbância torna-se menor devido à menor disponibilidade de $O_2^{\bullet-}$ para reagir com o NBT. Estudos sobre o comportamento, deste sistema, foram realizados por Velloso (2005), e as condições, por ele estabelecidas, aqui utilizadas.

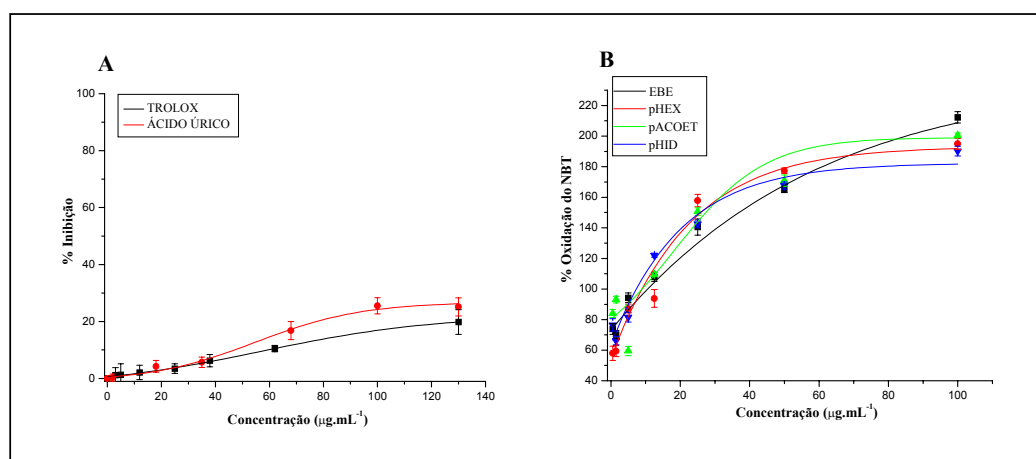


Figura 24: Ação seqüestradora sobre o $O_2^{\bullet-}$. **A** – padrões; **B** – *A. blazei* Murril. **EBE** – extrato bruto etanólico; **pHEX** – fração hexano; **pACOET** – fração acetato de etila; **pHID** – fração hidroalcoólica. **n = 3**.

Através da figura 24A observamos que ambos os padrões apresentaram uma baixa eficiência em promover o seqüestro do radical superóxido. Apesar disso, o ácido úrico mostrou-se pouco melhor seqüestrador de $O_2^{\bullet-}$ do que o trolox.

Observando a figura 24B, vemos que as amostras do *Agaricus blazei* Murril não foram capazes de promover o seqüestro de radical superóxido; muito pelo contrário, apresentaram um altíssimo potencial pró-oxidante. Interessante notar que, neste ensaio, a

fração hexâno, que nos outros sistemas não apresentou nenhuma atividade, desta vez teve atuação semelhante às outras amostras. Neste sistema, as amostras poderiam estar reagindo com o NBT e, assim, gerando a formazana, desta maneira, seria verificado um aumento na absorção em 560nm. Porém foi observado em ensaios exploratórios que as amostras não são capazes de promover este aumento de absorção ao serem incubadas com o NBT, nem quando estão na presença de NADH ou metassulfato de fenazina. Agora, quando as amostras são incubadas com NADH e metassulfato de fenazina e posteriormente adiciona-se o NBT um aumento intenso de absorção é observado em 560nm. Assim, podemos sugerir que o radical superóxido, gerado pela reação do NADH com o metassulfato de fenazina, pode estar interagindo com as amostras de maneira a potencializar a geração da formazana a partir do NBT.

4.4 Dosagem das enzimas peroxidase e polifenoloxidase

4.4.1 Sistema amostra/H₂O₂/Guaiacol (Dosagem de peroxidase)

Em tampão fosfato, pH 6,5, a 37°C, temos amostra (diferentes concentrações) e H₂O₂ 0,5mM. A reação é iniciada com a adição de guaiacol 2mM (substrato específico para peroxidase) e monitorada em 470nm por 1 minuto.

Neste ensaio, nenhuma das amostras foi capaz de oxidar o guaiacol na presença de H₂O₂, sugerindo que estas não contêm peroxidase. Porém, extrato de *Agaricus blazei* Murril, obtido por extração em tampão fosfato, pH 6,5, sem a presença de PVP (diferentemente do extrato bruto obtido segundo fluxograma do item 3.2.2), foi capaz de promover a oxidação do guaiacol. Este dado (não mostrado) nos leva a acreditar que o PVP

pode estar se ligando à enzima peroxidase e, desta maneira, removendo esta enzima durante o processo de pré-purificação.

4.4.2 Sistema amostra/Catecol (Dosagem de polifenoloxidase)

Em tampão fosfato, pH 6,5, a 37°C, temos amostra (diferentes concentrações). A reação é iniciada com a adição de Catecol 2mM (substrato específico para polifenoloxidase) e monitorada em 420nm por 1 minuto.

Tabela I: Purificação da polifenoloxidase do *Agaricus blazei* Murril; vf = 2mL; Tampão fosfato pH 6,50 à 37 °C. n=3.

Passos de purificação	[Protéica] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	v_0 ($1 \times 10^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$)	A.E. ($\text{s}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	Purificação
Extrato bruto (EB)	69,35	2,9029	41,86	1
Fração sulfato de amônio 70% (PPTSAL)	20,92	3,8994	186,4	4,5
Sephadex G25 (pG25)	8,38	12,029	1435,44	34,3

Observando a tabela 1, podemos perceber que em todas as amostras estava presente a enzima polifenoloxidase, pois houve oxidação do catecol e, conseqüente, aumento na absorção em 420nm. Assim, atestamos que esta classe de enzima não é “perdida” durante o processo de purificação parcial enzimática.

Podemos afirmar, ainda, que houve uma purificação inicial da enzima polifenoloxidase, pois a cada passo, a atividade específica foi aumentada, fato observado pelo aumento dos valores de A.E ($\text{s}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$).

5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Muitos antioxidantes combatem espécies reativas e radicais livres, porém, sua importância é relativa à qual espécie foi gerada, como, onde e qual o alvo desta espécie. *In vivo*, diferentes antioxidantes agem em diferentes sistemas e contra diferentes espécies reativas, sendo, algumas vezes, inerte a outras espécies. Portanto, no estudo da avaliação do potencial antioxidante das amostras deve-se utilizar concentrações semelhantes às disponíveis *in vivo*, testar a capacidade, desta amostra, frente a pelo menos uma espécie reativa de relevância biológica. É, ainda, necessário avaliar se a amostra atua sobre a ERO ou inibe sua formação ou, ainda, se ele age indiretamente regulando defesas antioxidantes endógenas (Velloso 2005).

Neste trabalho, fracionou-se, com solventes orgânicos, amostras de *Agaricus blazei* Murril e avaliou-se *in vitro* a possibilidade de ação direta destas amostras sobre diferentes espécies reativas modelos e geradas no organismo. Além disso, procurou-se purificar, parcialmente, enzimas (peroxidase e polifenoloxidase), que atuam diretamente sobre ERO, do *Agaricus blazei* Murril.

Pelos cromatogramas obtidos em CLAE-DAD, foi possível determinar a presença de no mínimo sete metabólitos no *Agaricus blazei* Murril, sendo que dois destes são, provavelmente, pertencentes à família dos flavonóides. Porém, os outros metabólitos devem ser algum outro tipo de composto aromático.

Usando CLAE-DEQ, verificamos a existência de biomoléculas, com potencial eletroativo promissor, no extrato bruto etanólico, nas frações acetato de etila e hidroalcoólica. Este potencial, antioxidante promissor, observado pelo CLAE-DEQ, foi confirmado em algumas das metodologias pré-estabelecidas.

Observou-se que, nos sistemas ABTS e DPPH, as amostras apresentaram capacidade antioxidante comparáveis à padrões conhecidos (trolox e ácido úrico), sendo que mostraram perfis de inibição semelhante entre elas, com exceção da fração hexânica,

que não foi capaz de promover o seqüestro destes radicais modelos. No sistema TNB/HOCl, as amostras apresentaram pequena atividade (não foi possível determinar o IC₅₀), sendo que suas atividades foram muito inferiores aos padrões. No sistema TNB/H₂O₂, nenhuma amostra apresentou capacidade de seqüestrar o H₂O₂.

Com relação ao sistema radical superóxido, as amostras foram incapazes de promover o seqüestro do radical O₂^{•-}, pelo contrário, neste sistema foi observado uma atividade pró-oxidante por parte das amostras.

As amostras, com exceção da fração hexânica, mostraram melhor atividade com os radicais exógenos ABTS e DPPH. Foi observado também, atividade razoável com HOCl e nenhuma atividade com H₂O₂, radicais endógenos. Já em relação ao radical endógeno superóxido, todas as amostras apresentaram atividade pró-oxidante.

As amostras protéicas não revelaram presença de peroxidase na cinética H₂O₂/Guaiacol, devido à presença de PVP. Ao passo que, na cinética com Catecol, mostraram a presença de polifenoxidase.

Perspectivas Futuras

Neste trabalho, avaliou-se *in vitro*, a possibilidade das frações orgânicas do *Agaricus blazei* Murril, em atuar diretamente sobre espécies reativas modelos e endógenas, e verificou-se que estas possuem grande potencial antioxidante. Através dos resultados obtidos pelo CLAE-DEQ, vemos que nas frações, estão presentes, no mínimo, três metabólitos com potencial eletroativo. Assim, seria interessante uma continuidade no processo de purificação destes metabólitos, através das técnicas cromatográficas, bem como a caracterização, utilizando para isto técnicas de Ressonância Magnética e Espectrofotometria de Massas.

Uma vez que, a pesquisa de produtos naturais é um campo fértil na descoberta de moléculas com diferentes atividades biológicas, existe a possibilidade da descoberta de novas biomoléculas, que podem implicar na obtenção de novos fármacos.

Devido à complexidade metabólica de um organismo vivo, a caracterização destas biomoléculas, como produto antioxidante, deve ser também avaliado, em sistemas *ex vivo* e *in vivo*. Estes sistemas podem fornecer um panorama mais completo da atuação destas biomoléculas.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, W.; CILENTO, G. **Chemical and biological generation of excited states**. New York: Academic Press, 1982. p. 280.

ARUOMA, O. I.; AKANMU, D.; CECCHINI, R.; HALLIWELL, B. Evaluation of the ability of the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril to scavenge reactive oxygen species. **Chem. Biol. Interact.**, v. 77, p. 303-314, 1991.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chem.**, v. 89, p. 27-36, 2005.

BABIOR, B. M. The respiratory burst of phagocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 73, p. 599-601, 1984.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 109, p. 33-44, 2000.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. In: PACKER, L.; GLAZER, A. N. (Ed.). **Methods Enzymol.** London: Academic Press, 1990. v. 186, p. 343-355.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr. Rev.**, v. 56, p. 317-333, 1998.

BRESTEL, E. P. Co-oxidation of luminol by hypochlorite and hydrogen peroxide implications for neutrophil chemiluminescence. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 126, p. 482-488, 1985.

BRUNETTI, I. L.; FARIA-OLIVEIRA, O. M. M. Sistemas quimiluminescentes com peroxidase (EC:1.11.1.7) e suas aplicações em análises clínicas. **Rev. Cienc. Farm.**, v. 16, p. 55-77, 1995.

CHAPLE, I. L. C. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v. 24, p. 287-296, 1997.

CHING, T.; JONG, J.; BAST, A. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to anti-asthmatic drugs. **Anal. Biochem.**, v. 218, p. 377-381, 1994.

CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 809-816, 2005.

SCHANAIDER, A. Radicais livres: “vilões” ainda em estudo. **Cienc. Hoje**, v. 27, n. 158, p. 60-62, 2000.

DAUGHERTY, A.; DUNN, J. L.; RATERI, D. I.; HEINECKE, J. W. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 437-444, 1994.

DURAN, N.; CADENAS, E. Antioxidant system involving the glutathione metabolic cycle associated to electroanalytical methods in the oxidative stress evaluation. **Rev. Chem. Interm.**, v. 8, p. 147, 1987.

EATON, J. W. Defenses against hypochlorous acid: parrying the neutrophil's rapier thrust. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 121, p. 197-198, 1993.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

HAKIME-SILVA, R. A. **Estudos químicos e enzimáticos do potencial antioxidante do extrato aquoso do cogumelo do sol, *Agaricus blazei* Murril.** 2004. f. 60.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization methodology and mechanism. **Biochem. Pharmacol.**, v. 49, p. 1341-1348, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radical in biology and medicine.** Oxford: Clarendon Press, 1989. v. 33, p. 543.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 246, p. 501-514, 1986.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **J. Lab. Clin. Med.**, v. 119, p. 568-620, 1992.

HARTREE, E. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HAZEL, L. J.; STOCKER, R. Oxidation of low density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. **Biochem. J.**, v. 290, p. 165-172, 1993.

HAZEL, L. J.; VAN DEN BERG, J. J. M.; STOCKER, R. Oxidation of low density lipoprotein with hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residue rather than lipide peroxidation. **Biochem. J.**, v. 302, p. 297-304, 1994.

HENDERSON, L. M.; CHAPPLE, J. B. NADPH oxidase of neutrophils. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1273, p. 87-107, 1996.

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; WOOD, K. S. **Vasodilatation: vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium.** New York: Raven, 1988. p. 427-436.

KAKKAR, P.; DAS, B.; VISWANATHAN, P. N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. **J. Biochem. Biophys.**, v. 21, p. 130-132, 1984.

KHALILL, N. M. **Interação Nicotina-Peroxidase (Mieloperoxidase e HRP): implicações no surto oxidativo de leucócitos polimorfonucleares nucleofílicos.** 2002. f. 120. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

LAPENNA, D.; CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: an update picture. **Gen. Pharmacol.**, v. 27, p. 1145-1147, 1996.

MACMIKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 323-350, 1997.

MATHY-HARTERT, M.; BOURGEOIS, E.; GRULKE, S.; DEBY-DUPONT, G.; CAUDRON, I.; DEBY, C.; LAMY, M.; SERTEYN, D. Purification of myeloperoxidase from equine polymorphonuclear leucocytes. **Can. J. Vet. Res.**, v. 62, p. 127-132, 1998.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: review. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 109, 1991.

O'BRIEN, P. J. Peroxidases. **Chem. Biol. Interac.**, v. 129, p. 113-139, 2000.

PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; EVANS, C. R. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-Azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid) radical cation dexolorization assay. **Methods Enzymol.**, v. 299, p. 379-389, 1999.

ERENO, D. Pequenos e poderosos. **Pesquisa FAPESP**, v. 100, p. 138-141, 2004.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RIMM, E. B.; KATAN, M. B.; ASCHERIO, A.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C. Relation between intake of flavonoids and risk of coronary heart disease in male health professionals. **Ann. Intern. Med.**, v. 125, p. 384-389, 1996.

SAUNDERS, B. C. Peroxidases and catalases. In: EICHHORN, G. L. (Ed.). **Inorg. Biochem.**, Amsterdam: Elsevier, 1973. p. 988-1021.

THOMAS, E. L.; GRISHAM, M. B.; JEFFERSON, M. M. Preparation and characterization of chloramines. **Methods Enzymol.**, v. 132, p. 569-585, 1986.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E. A. M.; CUNHA, D. F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M. V. M.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO-JR, A. A. Role of nutrients on lipid peroxidation and antioxidant defense system. **Med. Ribeirão Preto**, v. 31, p. 31-44, 1998.

VELLOSA, J. C. R. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais de plantas brasileiras e sua contribuição ao estudo de inibição da enzima mieloperoxidase.** 2005. f. 107. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

WASIL, M.; HALLIWELL, B.; MOORHOUSE, C. P. Scavenging of hypochlorous acid by tetracycline, rifampicin and some other antibiotics: a possible antioxidant action of rifampicin and tetracycline? **Biochem. Pharmacol.**, v. 37, p. 775-778, 1988.

WASIL, M.; HALLIWELL, B.; MOORHOUSE, C. P.; HUTCHINSON, D. C. S.; BAUM, H. Biologically significant scavenging of myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by some anti-inflammatory drugs. **Biochem. Pharmacol.**, v. 36, p. 3847-3850, 1987.

WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **New Engl. J. Med.**, v. 320, p. 365-376, 1989.

YEN, G. C.; LAI, H. H.; CHOU, H. Y. Nitric oxide scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. **Food Chem.**, v. 74, p. 471-478, 2001.

YILDIZ, D.; ERCAL, N.; ARMSTRONG, D. W. Nicotine enantiomers and oxidative stress. **Toxicology**, v. 130, n. 2/3, p. 155-65, 1998.

ZGLICZYNSKI, T. J. M.; STELMASZYNSKA, T.; DOMANSKA, J.; OSTROWISKI, W. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 235, p. 419-424, 1971.