

## AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS ANTES E APÓS A AÇÃO DE FUNGOS COMESTÍVEIS EM RESÍDUOS MADEIREIROS E AGROINDUSTRIAIS

Robérison Lúcio MARTINS<sup>1</sup>; Maria de Jesus Coutinho VAREJÃO<sup>2</sup>; Ceci CAMPOS-SALES<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq-INPA; <sup>2</sup>Orientadora COTI/INPA; <sup>3</sup>Co-orientadora COTI/INPA

### 1. Introdução

Os Vegetais, e conseqüentemente as madeiras, são materiais extremamente heterogêneos. Isto é, suas características e propriedades variam não apenas de espécie para espécie, mas também do meio em que uma espécie se desenvolve (Mallan 1995). A madeira é composta por duas grandes classes de substâncias: os componentes fundamentais e os componentes acidentais.

Os componentes fundamentais referem-se às substâncias com função estrutural nos vegetais e que, como a própria definição já indica, são fundamentais a todos os tipos de madeiras (e de vegetais). Por outro lado, os componentes acidentais (ou metabólitos secundários) consistem nas substâncias específicas existentes em cada espécie ou gênero. São substâncias intimamente ligadas ao meio em que o vegetal se desenvolve e à sua relação com o mesmo (Klock *et al.* 2005). A utilização de resíduos agrícolas e madeireiros como substratos em bioprocessos, além de ser economicamente viável, pode ajudar a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (Alvira *et al.* 2010). Esta escolha justifica-se exatamente por sua viabilidade econômica: o cultivo de fungos em substratos elaborados a partir de resíduos não só é barato como também gera lucro. Os fungos cultivados, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*, são fungos extremamente consumidos e com alto valor econômico, além de serem de fácil cultivo (Beltran-Garcia 1997). Para que o aproveitamento sustentável desses resíduos seja completo, é necessário um estudo do impacto do cultivo destes fungos no substrato, ou seja, é necessário prever que substâncias estes fungos consumirão e produzirão durante seu desenvolvimento e de que forma estas substâncias vão se apresentar no substrato residual, após o crescimento dos fungos. Esta linha de pesquisa, a qual o projeto está conectado, é necessária não apenas do ponto de vista biológico, mas também do tecnológico, visto que tais substâncias residuais podem ser úteis industrialmente, e do ponto de vista sustentável, já que o cultivo de um fungo em um determinado substrato pode tornar este mesmo substrato útil a outras áreas de pesquisa.

### 2. Material e Métodos

Os substratos compostos por resíduos agroindustriais e madeireiros suplementados com farinha de trigo ou de cupuaçu analisados foram produzidos e suplementados pelo Laboratório de Fungos Comestíveis, da Coordenação de Produtos Florestais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CPPF – INPA) e analisados no Laboratório de Química da Madeira do mesmo Instituto. Todas as amostras de substratos são compostas por resíduos agroindustriais (de *Euterpe oleracea*, o açaí) ou madeireiros (de *Anacardium humile* ou cajuí) suplementados com farinha de trigo ou farinha de cupuaçu além da presença de engaço de banana e carbonato de cálcio. Uma das amostras, o substrato residual do fungo *Pleurotus ostreatus* composto pela mistura de engaço de banana e resíduo madeireiro de cajuí suplementado com farinha de cupuaçu não foi analisada devido a pouca quantidade de amostra disponível. Os 23 substratos utilizados como amostra estão dispostos no Quadro 1.

**Quadro 1. Diferentes tipos de substratos suplementados e expostos aos fungos**

Substratos Iniciais	Fungos cultivados	
	<i>Lentinula edodes</i> (LED)	<i>Pleurotus ostreatus</i> (POS)
S.I.A. AÇA-FT	S.R. AÇA-FT-LED	S.R. AÇA-FT-POS
S.I.A. BAN-AÇA-FT	S.R. BAN-AÇA-FT-LED	S.R. BAN-AÇA-FT-POS
S.I.A. CAJ-FT	S.R. CAJ-FT-LED	S.R. CAJ-FT-POS
S.I.A. BAN-CAJ-FT	S.R. BAN-CAJ-FT-LED	S.R. BAN-CAJ-FT-POS
S.I.A. AÇA-FC	S.R. AÇA-FC-LED	S.R. AÇA-FC-POS
S.I.A. BAN-AÇA-FC	S.R. BAN-AÇA-FC-LED	S.R. BAN-AÇA-FC-POS
S.I.A. CAJ-FC	S.R. CAJ-FC-LED	S.R. CAJ-FC-POS
S.I.A. BAN-CAJ-FC	S.R. BAN-CAJ-FC-LED	

As metodologias qualitativas utilizadas são baseadas nos princípios descritos por Matos 1998, com modificações instituídas por Arruda 2010 e expostas no Roteiro Sequencial de Prospecção de Constituintes Químicos de Extratos de Plantas do Laboratório de Química da Madeira – CPPF/INPA enquanto que a metodologia quantitativa é baseada no método espectrofotométrico descrito por Reicher

*et al.* 1981 com modificações instituídas por Santos 2008. Todos os testes descritos foram realizados em duplicata.

**1. Obtenção dos Extratos para Testes Fitoquímicos:** Análise Qualitativa (Testes de 1.2 a 1.8, que indicam apenas a presença ou ausência das substâncias a serem determinadas, tais como Fenóis e Taninos ou Flavonóides), Semi-quantitativa (Teste 1.1, para Heterosídeos Cianogênicos, que se utiliza de padrões para um resultado semi-quantitativo, indicando uma faixa de concentração) e Quantitativa (Teste 2.0, para determinação da concentração específica de polifenóis e taninos)

Adicionou-se 50g de amostra a um Erlenmeyer de 250mL. Ao mesmo recipiente, adicionou-se 100mL de solução 70% de Etanol (Solvente Alcoólico). O recipiente com amostra + etanol a 70% foi levado à lavadora ultrassônica a 65 °C com exposição ao ultrassom. A cada 2 horas a solução alcoólica com amostra foi retirada e filtrada para renovação da solução de solvente. Quando a fase líquida da solução alcoólica com amostra mostrou-se incolor, considerou-se que a amostra estava livre de extrativos voláteis.

#### 1.1 Heterosídeos Cianogênicos

Misturou-se 5 g da amostra com 25 mL de água e adicionou-se 1 mL da solução de ácido sulfúrico 1N, em erlenmeyer com tampa. Prendeu-se a fita de papel de picrato de sódio saturado sem deixá-la tocar no líquido. Manteve-se a mistura sobre banho-maria durante 2 horas. A presença da cor vermelha-castanho no papel indica a presença de heterosídeos cianogênicos. Fez-se comparação com padrões de KCN (solução padrão de cianeto de potássio).

#### 1.2 Fenóis e taninos

Solução de cloreto férrico: Em tubo de ensaio adicionou-se 3 mL da solução extrativa e 3 gotas de solução de FeCl<sub>3</sub>, sob vigorosa agitação. A variação de cor vermelha indica a presença de fenóis, coloração azul presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e tonalidade verde e/ou precipitado escuro taninos flobafênicos (taninos condensados).

#### 1.3 Flavonóides

Separou-se porções de 3 a 4mL de cada um extratos das amostras em dois tubos de ensaio. Acidulou-se um deles a pH 3 e alcalinizou-se outro a pH 11. O surgimento de cor indica a presença de várias classes de substâncias, descritas no Quadro 2.

**Quadro 2. Relação entre cores apresentadas e substâncias presentes**

Substâncias	Cor em Meio	
	Ácido (pH = 3,0)	Alcalino (pH=11,0)
<b>Antocianinas e Antocianidinas</b>	Vermelha	Azul-Púrpura
<b>Flavonas, Flavonóis e Xantonas</b>	Vermelha	Amarela
<b>Chalconas e Auronas</b>	Vermelha	Vermelho-Púrpura
<b>Leucoantocianidinas</b>	Vermelha	Vermelho Alaranjado
<b>Flavanonóis</b>	Vermelha	Vermelho Alaranjado
<b>Catequinas</b>	Pardo-amarelada	Vermelho Alaranjado
<b>Flavanonas</b>	Pardo-amarelada	Vermelho Alaranjado

#### 1.4 Esteróides e Triterpenos

Extraíu-se o resíduo seco do béquer rotulado 3 vezes com aproximadamente 3mL de Clorofórmio. Filtrou-se o extrato clorofórmico em um pequeno funil, utilizando uma bola de algodão coberta com cerca de 10 decigramas de Sulfato de Sódio Anidro para um tubo de ensaio. Adicionou-se à solução filtrada no tubo de ensaio 1mL de Anidrido Acético e agitou-se suavemente. Adicionou-se 3 gotas de Ácido Sulfúrico Concentrado e agitou-se novamente. Surgimento de coloração azul seguida de verde permanente indica presença de Esteróides Livres enquanto surgimento de coloração parda até vermelha indica presença de Triterpenóides pentacíclicos livres.

#### 1.5 Saponinas

Tomou-se o resíduo insolúvel em clorofórmio filtrado do teste 1.4 e redissolveu-se o mesmo com 10mL de água destilada e filtrou-se para um tubo de ensaio. O tubo foi agitado fortemente por 3 minutos e observou-se surgimento ou não de espuma persistente e abundante, indicador da presença de Saponinas.

#### 1.6 Alcalóides (Reagentes Hager, Mayer e Dragendorff)

Separou-se alíquotas de 3-4 mL da solução-extrativa em tubos de ensaio identificados e duas porções de 10 mL em béqueres e deixados em banho-maria até a secura; manteve-se em dessecador. Concentrou-se o restante do extrato em banho-maria até a metade do volume e levou-se a pH=4,0 e efetuou-se a filtração. A 1/3 da solução aquosa obtida acima, juntou-se NH<sub>4</sub>OH até pH=11. Fez-se a extração com as bases orgânicas em três porções sucessivas de 30, 20 e 10 mL da mistura éter-clorofórmio (3:1), em um funil de decantação. Retirou-se a camada éter-clorofórmio e a solução aquosa ácida obtida tratou-se com

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro para eliminar excesso de água. Separou-se o filtrado em 3 tubos de ensaio. Adicionou-se a cada tubo, 3 gotas dos reagentes de precipitação de alcalóides Hager, Mayer e Dragendorff, respectivamente. Quando a formação de precipitado floculoso denso em pelo menos dois tubos é indicativo de alcalóides.

### 1.7 Antraquinonas

Separou-se 5mL da solução em um tubo de ensaio. Adicionou-se 2mL de solução 6N de Hidróxido de Amônia e agitou-se. Após a separação das duas fases, observou-se se havia aparecimento de cor vermelha na camada alcalina, indicando assim a presença de hidróxi-antraquinonas na solução.

### 1.8 Cumarinas

Para tubos de ensaio, transferiu-se 3mL de cada extrato etéreo, adicionou-se 2mL de hidróxido de sódio 1N, levou-se os tubos à câmara de luz ultravioleta em 365nm os quais foram deixados em exposição por 15 minutos. Fluorescência azul indica presença de cumarinas.

### 2 Determinação quantitativa de polifenóis e taninos por Espectrofotometria UV Visível:

Preparou-se as curvas de calibração de polifenóis e de material não tânico, utilizando-se solução padrão do extrato tânico de *Acacia mearnsii* De Wild a, respectivamente, 1000ppm e 5000ppm. Para leitura das amostras e determinação da concentração de polifenóis totais, utilizou-se 1g dos extratos das amostras e diluiu-se em água destilada para preparação de solução mãe, filtrando-se a mistura e levando-se a balão volumétrico de 1000mL. De cada solução mãe, retirou-se 1mL e transferiu-se para balão volumétrico de 50mL, onde o volume foi completado com 1mL de reagente de Folin-Denis, 10mL de carbonato de sódio e o restante de água destilada. Para determinação de material não-tânico, transferiu-se 5mL da solução mãe de cada amostra e tratou-se com 50mg de pó de pele levemente cromado, agitando a mistura por 60 minutos e, em seguida, filtrando-a. Deste filtrado, utilizou-se 1mL e levou-se para balão volumétrico de 50mL, onde o volume foi completado com 1mL de reagente de Folin-Denis, 10mL de carbonato de sódio e o restante de água destilada.

## 3. Resultados e Discussão

As amostras apresentaram resultados bastante consistentes com a literatura, com algumas exceções facilmente explicadas. Tais resultados estão expostos nas tabelas 3 e 4 (resultados para os testes qualitativos), e nas figuras 1 e 2 além de também na tabela 5 (resultados para os testes quantitativos).

Tabela 3. Resultados dos testes qualitativos para os substratos suplementados com Farinha de Trigo.

Amostra	Testes Qualitativos*									
	1.1	1.2	1.3a**	1.3b**	1.3c**	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8
Substratos Iniciais Autoclavados										
S.I.A. AÇA-FT	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
S.I.A. BAN-AÇA-FT	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
S.I.A. CAJ-FT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S.I.A. BAN-CAJ-FT	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Substratos Residuais para o fungo <i>Lentinula edodes</i>										
S.R. AÇA-FT-LED	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
S.R. BAN-AÇA-FT-LED	++	+	-	+	+	-	-	-	-	-
S.R. CAJ-FT-LED	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S.R. BAN-CAJ-FT-LED	++	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Substratos Residuais para o fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>										
S.R. AÇA-FT-POS	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
S.R. BAN-AÇA-FT-POS	++	-	+	+	+	-	+	-	-	-
S.R. CAJ-FT-POS	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
S.R. BAN-CAJ-FT-POS	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-
*Os números são relativos aos tópicos expostos na metodologia. Sendo assim, 1.1 corresponde ao teste relativo a Heterosídeos Cianogênicos, 1.2 equivale a determinação de Fenóis e Taninos e assim sucessivamente.										
**Substâncias derivadas dos flavanóides: a) Antocianidinas, antocianinas; b) leucoantocianidinas, catequinas e flavonas; c) flavanonas, flavanonóis e xantonas										

Tabela 4. Resultados dos testes qualitativos para os substratos suplementados com Farinha de Cupuaçu.

Amostra	Testes Qualitativos									
	1.1	1.2	1.3a*	1.3b*	1.3c*	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8
Substratos Iniciais Autoclavados										
S.I.A. AÇA-FC	++	-	+	+	+	-	-	-	-	-
S.I.A. BAN-AÇA-FC	++	-	+	+	+	-	-	-	-	-
S.I.A. CAJ-FC	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S.I.A. BAN-CAJ-FC	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Substratos Residuais para o fungo <i>Lentinula edodes</i>										
S.R. AÇA-FC-LED	++	-	+	+	+	-	-	-	-	-
S.R. BAN-AÇA-FC-LED	++	-	+	+	+	-	-	-	-	-
S.R. CAJ-FC-LED	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S.R. BAN-CAJ-FC-LED	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Substratos Residuais para o fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>										
S.R. AÇA-FC-POS	++	-	+	+	+	-	-	-	-	-
S.R. BAN-AÇA-FC-POS	++	-	+	+	+	-	-	-	-	-
S.R. CAJ-FC-POS	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*Os números são relativos aos tópicos expostos na metodologia. Sendo assim, 1.1 corresponde ao teste relativo a Heterosídeos Cianogênicos, 1.2 equivale a determinação de Fenóis e Taninos e assim sucessivamente.										
**Substâncias derivadas dos flavanóides: a) Antocianidinas, antocianinas; b) leucoantocianidinas, catequinas e flavonas; c) flavanonas, flavanonóis e xantonas										

Para Heterosídeos cianogênicos, todas as amostras mostraram-se positivas, o que se explica facilmente ao lembrarmos que tais substâncias estão intimamente ligadas ao mecanismo de defesa dos vegetais e são substâncias básicas e comuns a maioria destes (Hagglund 1964). Resultados mais fortemente positivos para os substratos que apresentam engaçó de banana em sua composição são explicados pela presença de altos níveis de concentração de carboidratos e potássio neste vegetal (Bohorquez 2001), precursores básicos dos Heterosídeos Cianogênicos. Resultados positivos para fenóis e taninos também estão intimamente ligados a presença da banana, que é rica em tais substâncias (Borges 2009) enquanto que resultados positivos para derivados de flavonóides (testes 1.3a, 1.3b e 1.3c) apresentam-se desta forma devido a presença do açaí, rico em substâncias pigmentosas e oxidantes (Schauss 2007).

Os substratos residuais para o fungo POS suplementados com farinha de trigo apresentaram resultados fracamente positivos para saponinas, podendo o mesmo ser explicado devido ao suplemento, que ao ser mais rico em nutrientes que a farinha de cupuaçu (Miranda 2006), oferece ao fungo uma fonte mais completa, tornando seu ataque mais “forte” (Alonso 2007). As saponinas, de importantes propriedades antifúngicas (Simões 1999), provavelmente foram uma forma de combate a este ataque.

Para alcalóides, apenas uma amostra mostrou-se (fracamente) positiva, o que a torna, provavelmente, uma anomalia, mas que pode ser facilmente explicada devido à presença de cajuí que tem níveis razoáveis de aminoácidos que podem atuar como precursores de alcalóides em sua composição (Oliveira 2002).

Para os testes quantitativos, os teores de polifenóis totais variaram de 0,09% até 0,21%, concentrações estas baixíssimas, que se mostram consistentes ao considerarmos que os resultados qualitativos para fenóis e taninos foram, no máximo, fracamente positivos. Os picos variaram de 0,16% a 0,21% nas amostras fracamente positivas, enquanto a maioria das amostras negativas no teste qualitativo apresentaram valores variando dos 0,09% aos 0,14%.

#### 4. Conclusão

O estudo destes substratos específicos permitiu um estudo impactual bastante relevante ao notar as diferenças entre padrões de toxicidade entre ambos os fungos relatados em substratos suplementados com duas fontes de nutriente diferentes. A partir dos resultados obtidos, nota-se claramente um maior aproveitamento das amostras suplementadas com farinha de cupuaçu, visto que estas apresentam menores positivos em casos de substâncias tóxicas. Isto ocorre, principalmente, devido à menor carga de nutrientes na farinha de cupuaçu, que atua limitando a ação do fungo no substrato, apenas permitindo sua sobrevivência e tornando o ataque do mesmo mais “fraco”. Além disso, as amostras residuais do fungo *Lentinula edodes* mostraram-se menos tóxicas que as do fungo *Pleurotus ostreatus* exatamente por este motivo: enquanto o primeiro metaboliza nutrientes em ambientes em que a relação C/N é menor (Alonso 2007), o primeiro necessita de mais, atacando mais fortemente o resíduo e ativando prováveis enzimas.

### 5. Referências Bibliográficas

- Alvira, P.; Tomás-Pejó, E.; Ballesteros, M.; Negro, M. J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*, 101: 4851-4861.
- Alonso, S.K. 2007. Isolamento e seleção de fungos causadores da podridão-branca da madeira em florestas de *Eucalyptus* spp. com potencial de degradação de cepas e raízes. *Rev. Árvore [online]*, 31: 145-155 ([http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-67622007000100016&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-67622007000100016&lng=en&nrm=iso)), acesso em 20/06/2013.
- Arruda, K.A.; 2010. Viabilidade potencial das cascas e madeiras de leguminosas. *Anais da XIX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA*, p.17-21.
- Beltran-Garcia, M.J.; Estarron-Espinosa, M.; Ogura, T. 1997. Volatile Compounds Secreted by the Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and Their Antibacterial Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 4049-4052.
- Bohorquez, N.C.; Borges, A.L. 2001. Valor Nutritivo e Usos Alternativas da Banana. *Artigo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*, Embrapa Mandioca e Fruticultura, 15pp.
- Borges, A.M.; Pereira, J.; Lucena, E.M.P. 2009. Caracterização da Farinha de Banana Verde. *Ciênc. Technol. Aliment.*, 29(2): 25-30.
- Hagglund, E. 1964. *Chemistry of wood*. Academic Press, New York, USA.
- Klock, U.; Muñiz, G.I.B.; Hernandez, J.A.; Andrade, A.S. 2005. *Química da Madeira*. Manual didático, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 85pp.
- Mallan, F.A. 1995. *Eucalyptus improvement for lumber production*. Seminário internacional de utilização da madeira de eucalipto para serraria. São Paulo, IPEF/IPT, Anais, São Paulo, 19pp.
- Miranda, M.Z. 2006. Trigo: germinação e posterior extrusão para obtenção de farinha integral extrusada de trigo germinado. *Artigo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*, Embrapa Trigo, 12pp.
- Oliveira, M.E.B. 2002. Aminoácidos livres majoritários no suco de caju: variação ao longo da safra. *Rev. Bras. Frutic. [online]*, 24: 133-137 ([http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-29452002000100029&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452002000100029&lng=en&nrm=iso)), acesso em 20/06/2013.
- Schauss A.G.; Wu X.; Prior R.L.; Ou B.; Huang D.; Owens J.; Agarwal A.; Jensen G.S.; Hart A.N. 2006. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* mart. (acai). *J Agric Food Chem*.
- Simões, C.M.O.; Falkenberg, M.B.; Santos, R.I. 2001. Introdução à análise fitoquímica. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmn, G.; Palazzo, J.C.M.; Auler, L.M.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, edição 5, Porto Alegre/Florianópolis, UFRGS e UFSC, p. 21-43.