

## APLICAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PARA A BIOPROSPECÇÃO DE MACROFUNGOS

GABRIEL CHAVIEL LHULLIER<sup>1</sup>; ANALICE BARCELLOS BALHEGO<sup>2</sup>, MIKAELE VALÉRIO TAVARES<sup>2</sup>, JANICE LUEHRING GIONGO<sup>2</sup>; LUÍZE GARCIA DE MELO<sup>2</sup>; RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – gabriellhullier@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – etentenchan123@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – mikaelevalerio14@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – janicegiongo@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - luizegarmel@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – rodvaucher@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Os macrofungos compreendem todas as espécies de fungos que se caracterizam por apresentarem estruturas de reprodução visíveis a olho nu, como por exemplo, cogumelos, orelhas-de-pau, puffballs e trufas falsas, que produzem esporos (MULLER et al., 2007). São incluídos em dois filos principais, em sua maioria: Ascomycota e Basidiomycota (MULLER et al., 2007). Esses organismos são importantes fontes de diversos compostos bioativos, como flavonoides, taninos, polissacarídeos, erinacinas, esteróides e alcaloides, encontrados em suas estruturas de reprodução e micélio (FRIEDMAN, 2015; GEBREYOHANNES et al., 2019a; PETRE, 2015; VAMANU, 2018; VOLCÃO et al., 2021a, 2021b). Estudos indicam que essas substâncias têm propriedades farmacológicas que incluem ação antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, antiparasitária, antiviral, anti-inflamatória e anticancerígena, tornando os macrofungos alvos promissores para pesquisas na área da saúde (FRIEDMAN et al., 2015; ALVES et al., 2013; MUSZYNSKA et al., 2018; VAMANU et al., 2018; VOLCÃO et al., 2021a, 2021b).

Extratos e compostos isolados de Basidiomicetos com atividade antifúngica também apresentam compostos de baixo peso molecular (como sesquiterpenos, terpenos, esteroides, ácidos orgânicos, acilciclopentenodionas e quinolinas) e alto peso molecular (como peptídeos e proteínas) (ALVES et al., 2013). Sendo o terpeno grifolina (de baixo peso molecular) descrito como maior atividade antifúngica (ROSA et al., 2003). A espécie *Hericium erinaceus* biossintetiza cerca de 70 metabólitos secundários diferentes (FRIEDMAN, 2015). Assim como seus compostos de erinacinas e polissacarídeos demonstraram atividades antimicrobianas sobre bactérias patogênicas resistentes e não resistentes a antibióticos (FRIEDMAN, 2015).

Já o gênero *Ganoderma* é reconhecido por sua diversa utilização como alimento funcional e agente terapêutico (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, 2023). Com mais de 428 espécies, sendo a *Ganoderma lucidum* a mais estudada, este fungo produz diversos metabólitos secundários e compostos bioativos, como polissacarídeos, fenóis e triterpenos, que são amplamente responsáveis por suas propriedades terapêuticas.

Sabe-se que a composição química dos extratos de macrofungos e o conteúdo de substâncias bioativas podem ser influenciados por vários fatores e métodos de extração incluindo o tipo de solvente e a temperatura utilizada para extração (ELBATRAWY et al., 2015; CÖR; KNEZ; KNEZ HRNČIČ, 2018), a quantidade de macrofungos, estruturas do basidiocarpo como o píleo e estipe (CHEN et al., 2010), maturidade do cogumelo (BARROS; BAPTISTA; FERREIRA,

2007) e localização geográfica do espécime de cogumelo coletado (BÁRBARA RIBEIRO et al., 2006). Além disso, o método de extração está estreitamente relacionado à ação inibitória dos extratos contra as cepas microbianas (CÔR; KNEZ; KNEZ HRNČIČ, 2018). Portanto, o presente trabalho busca aprimorar os processos extrativos, através da execução de diferentes métodos de extração desde o tratamento do extrato bruto até a etapa final de extração. Os objetivos deste estudo foram a coleta, identificação e extração de diferentes espécies de macrofungos.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Coleta, Identificação, Estabilização e Moagem

A realização da coleta *in situ*, onde realizou-se um caminhamento perimétrico - percorreu-se o perímetro da área de interesse, efetuando as coletas. As áreas vegetativas dos municípios de Capão do Leão e Pelotas eram caracterizadas por bosque de coníferas e árvores de pequeno porte, com predominância de espécies de *Pinus* spp. Já no Horto Botânico Irmão Teodoro Luís a área é descrita por tipos fisionômicos de vegetação de restinga, como mata arenosa e turfosa (PRADO, 2018). Após a coleta, foi realizada a identificação morfológica macroscópica com auxílio de guias de identificação e subsequente limpeza e armazenamento em envelopes de papel.

Após a coleta, os fungos foram submetidos ao processo de secagem em estufa a uma temperatura entre 40°C e 45°C, conforme preconizado por Volcão et al. (2021) com modificações. Esse procedimento teve o intuito de reduzir a atividade de água, impedindo reações de hidrólise e crescimento microbiano, devido à alta porcentagem de umidade presente nos cogumelos, como discutido por Alzand et al. (2019) e Marçal et al. (2021).

Os fragmentos de macrofungos secos foram reduzidos mecanicamente em um moinho de bolas e de facas. Esse processo foi realizado para obter o material de dimensões reduzidas, adequado para armazenagem e extração. As características do material vegetal e o princípio de funcionamento do moinho foram considerados.

### 2.2 Método de Extração

A seleção do solvente de extração foi baseada em critérios de segurança, toxicidade, seletividade e economia. A escolha do solvente apropriado foi fundamentada em uma revisão bibliográfica que mapeou os compostos de interesse e suas solubilidades como discutido em Ye Ouyang, (2021). Foram realizadas duas formas de extração, banho de ultrassom (SB-5200 DTDN Ultrasonic Cleaner) a 40°C por 120 minutos ou maceração dinâmica com aquecimento 40°C por 120 minutos e subsequente filtração à vácuo (Papel filtro - Whatman ® nº1) (SIMÕES et al., 2007; ROESLER et al., 2007). Os solventes utilizados foram água destilada esterilizada, hidroalcoólico 50% e clorofórmio, na proporção de 1:10 (10%).

Os extratos aquosos e hidroalcoólicos 50% foram então congelados a -20°C por 24 horas e, posteriormente, submetido a um processo de liofilização por 48 horas. Já o extrato de clorofórmio passou por um processo de remoção do solvente utilizando um rota-evaporador, mantido a 60°C e 60 rpm por 45 minutos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As espécies de macrofungos utilizadas neste estudo foram: *Pycnoporus sanguineus*, *Ganoderma aplanatum*, *Ganoderma sp.1*, *Amanita citrina* e *Xylaria*

*hypoxylon*. A avaliação do modo de moagem demonstrou que o processo foi eficaz em reduzir os fragmentos dos macrofungos a partículas menores, possibilitando a subsequente maceração de forma desejada. A escolha do solvente desempenhou um papel crucial na eficiência da extração. Ao adotar a proporção de 1:10 (50g:500mL), buscou-se otimizar o rendimento do extrato final suspenso em solvente. A proporção foi definida com base na futura remoção do solvente (liofilização e rota-evaporação). Onde essa abordagem alinha-se a estudos que discutem a influência do tempo e temperatura na extração de compostos de interesse. O método de extração foi escolhido com base nos solventes e nos compostos de interesse onde *Brum; Arruda; Regitano-D'Arce, (2009)* mostram que a metodologia influencia o produto da extração de acordo com o método e o solvente a serem utilizados.

Para os processos de armazenamento, a liofilização e a rota-evaporação foram fundamentais para remover o solvente e concentrar os compostos extraídos. A liofilização se destacou pela alta eficiência na remoção do solvente, contribuindo para a concentração dos compostos e possibilitando uma análise mais precisa.

O presente trabalho evidencia que o processo de extração, desde a coleta até a escolha cuidadosa de solventes, proporções e métodos de extração demonstrou-se crucial para alcançar rendimentos. No entanto, são necessárias futuras análises bioquímicas para averiguar a presença de metabólitos secundários de interesse nos extratos obtidos e posteriormente testes para a atividade antimicrobiana. ALZAND *et al.* (2019) evidencia que cogumelos contém uma matéria seca muito baixa, sendo esta entre 60 - 140 g/kg. Este resultado é apoiado pelo estudo de MARÇAL *et al.* (2021), a qual demonstra que cogumelos comestíveis apresentavam uma alta porcentagem de umidade (81,8 - 94,8%). A influência de fatores como tempo, temperatura, relação substância - solvente e granulometria foi avaliada para otimizar os processos extrativos (Silva *et al.*, 2019). A variabilidade do teor de umidade nos cogumelos depende da espécie do cogumelo, parâmetros de coleta, crescimento e condições de armazenamento (Furlani; Godoy, 2007).

#### 4. CONCLUSÕES

O presente trabalho de bioprospecção de macrofungos combinou diferentes métodos de extração com solventes a fim de obter compostos bioativos para posteriores análises bioquímicas e antimicrobianas. As técnicas contribuíram para obter o rendimento e concentração esperados. Este trabalho contribui para posteriores estudos biotecnológicos.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

YE, Z.; OUYANG, D. Previsão da solubilidade composta de moléculas pequenas em solventes orgânicos por algoritmos de aprendizado de máquina. *J Cheminform*, v. 13, p. 98, 2021. Acesso em: 20 set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13321-021-00575-3>.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F. DE .; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 849–854, 2009. Acesso em: 20 set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400005>

SILVA, R. W. V. DA et al. Uso da metodologia de superfície de resposta na otimização da extração de compostos fenólicos da casca dos frutos de *Hymenaea courbaril* L. (Jatobá). *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 22, p. e2018089, 2019. Acesso em: 20 set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.08918>

SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, E.; TEIXEIRA, A.; PEREIRA, C.; CRUZ, A.; MARTÍN-GIL, J.; OLIVEIRA, R.; MARTÍN-RAMOS, P. Chemical Constituents and Antimicrobial Activity of a *Ganoderma lucidum* (Curtis.) P. Karst. Aqueous Ammonia Extract. *Plants* 2023, 12, 2271. Acesso em: 20 set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants12122271>

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T.. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. *Food Science and Technology*, v. 27, n. 1, p. 154–157, jan. 2007. Acesso em: 20 set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000100027>

MARÇAL, S., SOUSA, A. S., TAOFIQ, O., ANTUNES, F., MORAIS, A. M. M. B., FREITAS, A. C., BARROS, L., FERREIRA, I. C. F. R., & PINTADO, M. (2021). Impact of postharvest preservation methods on nutritional value and bioactive properties of mushrooms. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 418-431. Acesso em: 20 set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.007>

VOLCÃO, L. M., FERNANDES, C. L. F., RIBEIRO, A. C., BRUM, R. L., ESLABÃO, C. F., BADIALE-FURLONG, E., RAMOS, D. F., BERNARDI, E., & SILVA JÚNIOR, F. M. R. DA. (2021). Bioactive extracts of *Russula xerampelina* and *Suillus granulatus* in the in vitro control of *Pseudomonas aeruginosa* phytopathogenic. *South African Journal of Botany*, 140, 218-225. Acesso em: 20 set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.03.043>

ALZAND, K., KUTAIBA, S., SILEMAN, M., BOFARIS, M., & UGIŞ, A. (2020). Chemical composition and nutritional value of edible wild growing mushrooms: A review. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 8, 31-46. Acesso em: 20 set. 2023. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/343813013\\_CHEMICAL\\_COMPOSITION\\_AND\\_NUTRITIONAL\\_VALUE\\_OF\\_EDIBLE\\_WILD\\_GROWING\\_MUSHROOMS\\_A\\_REVIEW](https://www.researchgate.net/publication/343813013_CHEMICAL_COMPOSITION_AND_NUTRITIONAL_VALUE_OF_EDIBLE_WILD_GROWING_MUSHROOMS_A_REVIEW)