



**Universidade Federal de Santa Catarina**  
Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Ecologia e Zoologia  
Laboratório de Ecofisiologia Respiratória

***Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.: defesas antioxidantes em diferentes  
estágios de diferenciação do basidioma**

**Thiago Pereira da Silva**

Florianópolis, novembro de 2009



**Universidade Federal de Santa Catarina**

Centro de Ciências Biológicas

Departamento de Ecologia e Zoologia

Laboratório de Ecofisiologia Respiratória

***Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.: defesas antioxidantes em diferentes  
estágios de diferenciação do basidioma**

**Thiago Pereira da Silva**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenadoria do Curso de Graduação em  
Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Santa Catarina como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.**

**Orientador: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho**

Florianópolis, novembro de 2009

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione S-transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ânion superóxido
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio singlete
MCP	Morte celular programada
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

## RESUMO

Os fungos passam grande parte do tempo no subsolo ou no interior de seus respectivos substratos e, estes ambientes não são ideais para dispersão de seus esporos na busca de novas fontes nutritivas. É através da formação de basidiomas que estes organismos encontraram uma forma eficaz de reprodução. Porém, a transição de algumas hifas, entre a forma filamentosa e a forma reprodutiva, requer uma atividade metabólica diferenciada, bem como um aumento na taxa respiratória. No entanto, esse consumo elevado de oxigênio causa um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo causar o acúmulo de danos oxidativos, resultando no envelhecimento e na morte em qualquer organismo aeróbico. Contudo, a utilização do oxigênio pelos organismos aeróbicos requer um sistema de defesa com a capacidade de neutralizar e reparar os danos causados pela oxidação, sendo denominado de sistema de defesa antioxidante. O objetivo, do presente trabalho, foi avaliar a eventual associação entre a senescência do basidioma e o sistema de defesa antioxidante, em cogumelos-ostra (*Pleurotus ostreatus* var. *florida*), em três diferentes estágios de diferenciação do basidioma. Para isso, foram avaliadas as atividades das enzimas catalase (CAT), glutationala peroxidase (GPx), glutationala redutase (GR), glutationala S-transferase (GST), bem como a concentração de tióis não proteicos e a determinação da lipoperoxidação (TBARS). Os resultados mostraram uma tendência para maior defesa do sistema antioxidante no estágio inicial, e uma menor defesa no estágio avançado, bem como uma maior atividade antioxidante e peroxidação lipídica na região do píleo em relação ao estipe. Os resultados sugerem que a menor capacidade antioxidante encontrada no estágio avançado poderia estar relacionada com uma diminuição programada das defesas antioxidantes, relacionada com o processo de senescência; de forma semelhante, a elevada capacidade antioxidante nas amostras de píleo poderia estar vinculada com o maior consumo de oxigênio associado com a formação dos basidiósporos.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Os cogumelos e o gênero <i>Pleurotus</i> .....	1
1.2 Respiração e nutrição dos fungos .....	2
1.3 Características do gênero <i>Pleurotus</i> .....	3
1.4 Espécies Reativas de Oxigênio .....	5
1.5 Sistema de defesa antioxidante .....	6
1.6 Espécies reativas de oxigênio em fungos .....	7
2. OBJETIVOS .....	9
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos .....	9
3. METODOLOGIA .....	10
3.1 Cultivo das Amostras .....	10
3.2 Preparação das Amostras .....	10
3.3 Análise das Defesas Antioxidantes e Marcadores de Estresse Oxidativo.....	11
3.3.1 Defesas Antioxidantes Enzimáticas .....	11
3.3.1.1 Catalase (CAT).....	11
3.3.1.2 Glutathiona Peroxidase (GPx).....	11
3.3.1.3 Glutathiona Redutase (GR).....	12
3.3.1.4 Glutathiona S-Transferase.....	12
3.3.2 Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas .....	13
3.3.2.1 Tióis não proteicos.....	13
3.3.3 Determinação dos Marcadores de Estresse Oxidativo.....	13
3.3.3.1 Lipoperoxidação tecidual (TBARS) .....	13
3.4 Análise estatística.....	13
4. RESULTADOS.....	15
4.1 Características amostrais.....	15
4.2 Determinações das Defesas Antioxidantes Enzimáticas .....	15
4.3 Determinações das Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas .....	17
4.4 Determinações dos Marcadores de Estresse Oxidativo .....	18
5. DISCUSSÃO .....	19
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Os cogumelos e o gênero *Pleurotus*

Cerca de 80 a 120 mil espécies de fungos estão descritas atualmente e mais de 100 mil sequências de rRNA fúngico estão depositadas no *GenBank* (um dos mais importantes banco de dados online sobre sequências de nucleotídeos). A estimativa da diversidade no planeta, normalmente utilizada, é de 1,5 milhão de espécies de fungos (Hawksworth, 1991). O filo Basidiomycota, ao qual pertence a família Pleurotaceae, apresenta uma enorme diversidade, possuindo mais de 30 mil espécies conhecidas (Hibbett *et al.*, 2007; Webster e Weber, 2007). O termo cogumelo se refere aos macrofungos com características estruturas relacionadas principalmente ao estágio sexual do ciclo reprodutivo em fungos do filo Basidiomycota. Outros termos utilizados para estruturas do estágio reprodutivo sexual são basidiomas, referindo-se ao basidioma dos basidiomicotas, e ascomas para os ascomicotas. Os organismos fúngicos são geralmente descritos como onipresentes, no entanto, a diferenciação da fase teleomorfa (estágio reprodutivo sexual) é um pouco mais seletiva, necessitando de mais nutrientes do que o necessário para a produção de esporos assexuados. Apesar da distribuição dos cogumelos ser mundial, seu desenvolvimento pode ser sazonal. A umidade abundante geralmente leva à formação de cogumelos e seu crescimento frequentemente ocorre após a chuva. No entanto, alguns são produzidos nos meses frios do inverno, embora outros se desenvolvam o ano inteiro (Miles e Chang, 1997).

O crescimento dos cogumelos deve-se, em parte, à expansão das hifas existentes, enquanto as novas hifas apicais servem para preencher os espaços gerados durante a expansão. As hifas que formam o basidioma maduro podem mostrar diferenciação considerável na sua estrutura e função. De forma geral, o ciclo de vida típico dos cogumelos do grupo dos basidiomicotas consiste em basidiomas que são geralmente construídos por hifas secundárias dicarióticas (dois núcleos haploides), e produzem inúmeros basídios na superfície das lamelas. O próximo estágio da maturação dos basídios envolve a união dos distintos núcleos sexuais (processo denominado cariogamia), seguido pela meiose. Normalmente, cada basídio forma 4 basidiósporos, cada um contendo um núcleo haploide, porém, em

muitos basidiomicotas ocorre uma mitose após a meiose, surgindo dois núcleos haploides idênticos em cada basidiósporo. Cada esporo pode germinar na forma de micélio haploide monocariótico, os quais são capazes de gerar novas hifas pela reprodução assexuada. Quando duas hifas de micélios homocarióticos compatíveis fundem seus citoplasmas, estágio denominado de plasmogamia, o micélio estará habilitado para formar o basidioma, dando continuidade ao ciclo reprodutivo (Webster e Weber, 2007).

Os fungos passam grande parte do tempo no subsolo ou no interior dos substratos, como por exemplo, a madeira em decomposição, e estes ambientes não são ideais para a dispersão dos esporos. Portanto, os cogumelos são importantes estruturas nas quais os esporos sexuais são produzidos e disseminados, aumentando a eficiência da dispersão e probabilidade de encontrar novas fontes de alimento. É através da reprodução sexual que a maior parte das variações é alcançada, produzindo progênes com atributos para as diferentes condições ambientais (Chang e Miles, 2004).

## **1.2 Respiração e nutrição dos fungos**

Respiração é o termo utilizado para qualquer oxidação transdutora de energia para a célula. Oxidação é a perda de elétrons do substrato, e associado com essa perda, está o ganho desses elétrons por outro substrato. Este segundo substrato passa ao estado reduzido. Assim, as duas reações oxidação e redução ocorrem juntas, um substrato perde elétrons sendo oxidado, e o outro ganha elétrons, sendo reduzido (Chang e Miles, 2004). Os fungos podem obter energia exclusivamente pelo metabolismo oxidativo com acceptor de elétrons exógeno, pela fermentação com acceptor endógeno, ou então, por ambas as estratégias, dependendo do ambiente. O oxidante normalmente utilizado pelos fungos é o próprio oxigênio. No entanto, há indícios que, sob baixas tensões de oxigênio, as mitocôndrias de alguns fungos podem realizar a desnitrificação utilizando o nitrato ou nitrito como aceptores terminais de elétrons na respiração, e reduzi-los a óxido nitroso em um processo associado com a formação de ATP (este sistema é bem caracterizado nas espécies *Fusarium oxysporum* e *Cylindrocarpon tonkinense*) (Carlile et al., 2001). Os cogumelos são organismos aeróbios e, às vezes, podem crescer lentamente em

concentrações muito baixas de oxigênio (Miles e Chang, 1997). O metabolismo respiratório resulta na conversão completa de compostos orgânicos em dióxido de carbono e água com a geração de energia pela fosforilação oxidativa, rendendo relativamente mais energia do que a fermentação. Além disso, o oxigênio também é necessário para as etapas metabólicas da biossíntese de esteróis, ácidos graxos insaturados, algumas vitaminas e para a degradação de compostos aromáticos (Carlile *et al.*, 2001).

O carbono é constituinte básico de proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e da parede celular polissacarídea, e todas estas substâncias precisam ser sintetizadas por processos anabólicos pelos fungos. Uma vez que os cogumelos são organismos aeróbicos, seu metabolismo exige oxigênio, e através da respiração quebram, por meio de enzimas, substratos tais como palhas e madeira, formando a partir deles, vários intermediários. Estes intermediários resultantes da ação das enzimas são captados por absorção nutritiva, constituindo a base para substâncias de reserva e síntese de compostos necessários para as atividades vitais do fungo e desenvolvimento do basidioma. As principais fontes de carbono são os polissacarídeos, lignina, glicose, manose, frutose, além de óleos e ácidos orgânicos. Na respiração parte da energia é transferida do substrato de carbono original para a formação de moléculas de trifosfato de adenosina (ATP), uma molécula que armazena energia em suas ligações químicas para futuras necessidades do organismo (Miles e Chang, 1997).

### **1.3 Características do gênero *Pleurotus***

Dentro da família Pleurotaceae, pertencente à ordem Agaricales (filo Basidiomycota) (Hibbett *et al.*, 2007), são encontrados dois gêneros, *Pleurotus* e *Hohenbuehelia* (Webster e Weber, 2007). *Pleurotus* vem do grego “pleuro” que significa formado lateralmente ou em posição lateral, referindo-se à posição lateral do estipe em relação ao píleo (Stamets e Chilton, 1983).

Cogumelos do gênero *Pleurotus*, comumente denominados cogumelos ostra, são amplamente cultivados no mundo todo, especialmente no Sudeste Asiático, Índia, Europa e África. O gênero representa um grupo de cogumelos comestíveis com sabor característico, elevado teor de proteínas, baixa quantidade de lipídios e

com propriedades terapêuticas. O cultivo desse grupo de cogumelos é relativamente simples, pois as espécies possuem um rápido ciclo de vida, baixo custo e tecnologia de produção (Mandee *et al.*, 2005).

A espécie *Pleurotus ostreatus* (Jacquin ex Fries) Kummer, conhecida comumente como “Cogumelo Ostra”, possui um píleo convexo, eventualmente plano, sua coloração varia entre marrom, branco e cinza, de acordo com a luminosidade e temperatura do cultivo; a massa do corpo é fina e branca, sendo a margem ocasionalmente ondulada; possui um basídio tetrapolar, produzindo quatro esporos haploides e diferenciação sexual fisiológica (heterotalismo); habita naturalmente uma gama de árvores em decomposição, mas pode ser parasita em alguns casos. Quando cultivado, apresenta um ciclo de produção curto, com menos de 30 dias desde o início de seu crescimento vegetativo até a primeira colheita, num total de três ou quatro ciclos de produção (Stamets, 2000). Vários subprodutos agrícolas podem ser utilizados como substrato para o cultivo dos cogumelos ostra, incluindo: folhas de bananeira, cascas de amendoim, trigo, palhas de milho, folhas e bagaço de cana-de-açúcar, farelo de arroz e uma variedade de resíduos lignocelulósicos (Mandee *et al.*, 2005; Webster e Weber, 2007).

Em matéria seca, a composição de *P. ostreatus* pode diferir conforme o tipo de substrato e condições ambientais. Os níveis de proteína bruta podem variar de 10 a 30%, dependendo das condições do armazenamento; 1 a 2% de lipídios totais; 4 a 20% de fibras, e cerca de 10% em elementos minerais (Stamets, 2000; Carlile *et al.*, 2001).

A madeira é uma excelente fonte de compostos de carbono, porém, outros nutrientes como o nitrogênio e o fósforo são relativamente escassos, levando os fungos, que vivem nos troncos de árvores em decomposição, a desenvolver meios especializados para adquirir estes compostos. Uma das estratégias utilizadas pelos fungos da espécie *Pleurotus ostreatus* consiste na predação de nematoides. As hifas exalam um metabólito com a capacidade de paralisar os nematoides e, rapidamente, invadem seu corpo através de orifícios, consumindo seus órgãos internos. Isto explica porque os nematoides nunca foram considerados patógenos desta espécie de fungo, ao contrário dos cogumelos da espécie *Agaricus bosporus*, que podem apresentar infestações devastadoras. Em cultivo controlado, esta escassez

nutricional é superada com suplementação do substrato utilizado (Stamets, 2000; Carlile *et al.*, 2001).

#### 1.4 Espécies Reativas de Oxigênio

O oxigênio representa aproximadamente 21% dos gases que compõem a atmosfera terrestre. A molécula de O<sub>2</sub> é um composto estável e reage com moléculas orgânicas muito lentamente, sendo indispensável para os organismos de metabolismo aeróbio. No entanto, os seres vivos possuem limites de tolerância para o oxigênio, e esta característica é claramente evidenciada em organismos anaeróbios expostos ao oxigênio ou aeróbios sob altas concentrações de oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 2007). Em 1956, Denham Harman sugeriu que as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas durante a respiração aeróbica causavam acúmulo de danos oxidativos, resultando no envelhecimento e na morte. Ele observou paralelos entre os efeitos do envelhecimento e das radiações ionizantes, incluindo mutagênese, câncer, e dano celular, e hipotetizou que a geração endógena de EROs ocorria *in vivo*, como um subproduto das reações de oxiredução enzimáticas (Beckman e Ames, 1998). Em 1969, Joe M. McCord e Irwin Fridovich isolaram, a partir de eritrócitos bovinos, a enzima superóxido dismutase (SOD), que acabou sendo a primeira evidência *in vivo* da geração do ânion superóxido, e para a subsequente elucidação das defesas antioxidantes e do significado biológico das EROs. Enzimas semelhantes logo foram encontradas em uma diversa gama de bactérias, porém, eram significativamente escassas nos organismos anaeróbios. A utilização da SOD como uma ferramenta para localizar os sítios celulares de geração do ânion superóxido conduziu à formulação da teoria dos radicais livres, na qual as mitocôndrias são a principal fonte de oxidantes endógenos (Beckman e Ames, 1998). Foi proposto, na virada do século, que o consumo de energia *per se* era responsável pela senescência (Pearl, 1928). A percepção de que o consumo de energia pela mitocôndria pode resultar na produção do ânion superóxido ligada à teoria dos radicais livres sugere que um rápido ritmo de respiração associada à maior geração de EROs, acelera o envelhecimento (Beckman e Ames, 1998; Imlay, 2003).

Por definição, radical livre é qualquer espécie química capaz de existir de forma independente, e que contenha em sua estrutura elétrons desemparelhados (Halliwell, 1993). A terminologia espécies reativas de oxigênio (EROs) inclui as espécies radicalares (radicais livres) e as não radicalares que, embora não possuam elétrons desemparelhados, são reativas em decorrência de sua instabilidade. (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A geração celular das EROs não radicalares, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e radicalares, como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical peroxil ( $ROO^{\bullet}$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), e radical hidroxila ( $^{\bullet}OH$ ), está inseparavelmente ligada ao envolvimento de  $O_2$  nas reações metabólicas de redução/oxidação (oxidação de substratos orgânicos durante a respiração, suporte de reações imunes e de defesas), bem como ativação de  $O_2$  por fatores externos (Belozerskaya e Gessler, 2007).

O ânion superóxido, como um produto intermediário, também é gerado em reações com envolvimento de xantina oxidase, monooxigenases microsossomais, lipoxigenases, e, como resultado de auto-oxidação de tióis, flavinas, quinonas, e catecolaminas, bem como redução de xenobióticos (Belozerskaya e Gessler, 2007). O oxigênio é reduzido de forma tetravalente até formar  $H_2O$ , através das reações enzimáticas que ocorrem na cadeia transportadora de elétrons na crista mitocondrial. No entanto, estima-se que, em condições normais, cerca de 2% do oxigênio consumido pela mitocôndria seja convertido em radicais superóxido, antes que seja dismutado pela superóxido dismutase e outras reações (Halliwell e Gutteridge, 1999; Hoffmann *et al.*, 2004; Belozerskaya e Gessler, 2007).

## 1.5 Sistema de defesa antioxidante

As EROs têm um grande potencial reativo, reagindo com várias moléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Os principais prejuízos oxidativos em peptídeos incluem a perda de grupamentos sulfidríla (ocasionando erros de dobramento, inativação catalítica e perda de funções específicas, como ligação a metais e aminoácidos sulfurados), formação de grupamentos carbonila, sulfóxidos de metionina, nitrotirosina, formação de pontes com produtos de peroxidação lipídica e glicoxidação (Salvador e Henriques, 2004). No entanto, a utilização do oxigênio

pelos organismos aeróbios requer um sistema de defesa com a capacidade de neutralizar e reparar os danos causados pela oxidação, sendo denominado de sistema de defesa antioxidante (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Este sistema consiste no conjunto de substâncias enzimáticas e não enzimáticas. As enzimas constituem a primeira linha de defesa e incluem principalmente, a superóxido dismutase (SOD) responsável pela dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  no citoplasma e na mitocôndria. A catalase (CAT), com distribuição intra e extracelular, dismutando o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . A glutaciona peroxidase (GPx), que contém selênio, e está envolvida na redução de vários peróxidos, especialmente peróxidos de lipídeos de membrana. A glutaciona redutase (GR) responsável pela regeneração de glutaciona oxidada (GSSG) em glutaciona reduzida (GSH) utilizando o NADPH como co-fator doador de ânions de hidrogênio. Ainda há enzimas detoxificadoras, atuando na segunda fase da biotransformação, como a glutaciona-S-transferase (GST), a qual age detoxificando agentes alquilantes, incluindo herbicidas, pesticidas e outros xenobióticos, através da catalização da reação de conjugação da glutaciona em sua forma reduzida (Beckman e Ames, 1998; Halliwell e Gutteridge, 1999).

Além dos antioxidantes enzimáticos, moléculas doadoras de elétrons com baixo peso molecular possuem a capacidade de captar EROs via auto-oxidação, como o tripeptídeo GSH, um tiol não proteico. Além de compostos como vitaminas (C, E, A, B<sub>2</sub>), carotenoides (beta-caroteno, licopeno e luteína) entre outros (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O estado em que o balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes é perturbado resultando em um aumento da taxa de oxidação pode ser definido como estresse oxidativo (Sies, 1985; Dubost *et al.*, 2007).

## **1.6 Espécies reativas de oxigênio em fungos**

As espécies reativas de oxigênio possuem um importante papel fisiológico no desenvolvimento dos fungos. A deficiência em  $O_2^{\bullet-}$  prejudica o processo sexual e germinação de ascósporos nos ascomicetos *Podospora anserina* e *Neurospora crassa*. Já o  $H_2O_2$  está envolvido em vários processos como crescimento, diferenciação e proliferação, atuando como molécula sinalizadora. Na espécie

*Aspergillus nidulans*, por exemplo,  $H_2O_2$  influencia a atividade de genes, incluindo os genes da defesa antioxidante, induz a diferenciação de escleródios em *Sclerotium rolfsii*, ativação de queratogênese em *Neurospora crassa*, sendo importante em inúmeros processos fisiológicos. O peróxido de hidrogênio, no entanto, é capaz de reagir com metais de diversas valências, por exemplo, com  $Fe^{2+}$  e  $Cu^+$  (reação de Fenton) ou com  $O_2^{\bullet-}$  (reação Haber-Weiss) formando o radical de extrema reatividade,  $\bullet OH$ . O tempo de vida do  $\bullet OH$  é muito breve (cerca de um bilionésimo de segundo), agindo muito rapidamente, sendo capaz de reagir virtualmente com todas as moléculas biológicas, oxidando DNA, proteínas e lipídios (Belozerskaya e Gessler, 2007).

Radiações ionizantes (raios  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e ultravioletas aumentam a geração de EROs em células fúngicas. Já a luz visível, aumenta a geração intracelular de  $^1O_2$  que reage com biomoléculas como ácidos graxos e bases de DNA, formando  $H_2O_2$  e hidroperóxidos. No entanto, o  $^1O_2$  é importante na estimulação do desenvolvimento de esporos, formação de conídios e síntese de carotenoides em *N. crassa*. Além disso, alterações no pH do meio, temperatura, osmolaridade, pressão parcial de oxigênio, concentrações de substratos, secagem, danos mecânicos, e outros fatores externos que influenciam o crescimento e desenvolvimento do microrganismo, induzem a geração de EROs dentro da célula fúngica. Enzimas envolvidas na regulação do desenvolvimento de eucariotos como NADPH-oxidase, glioxal oxidase, e óxido nítrico sintase também são responsáveis pela geração de EROs (Belozerskaya e Gessler, 2007).

Portanto, a geração de espécies reativas de oxigênio nas células fúngicas está envolvida com oxigênio nos processos metabólicos, função de enzimas específicas e fatores externos. Por um lado, participa de processos fisiológicos importantes no desenvolvimento dos organismos e, por outro, causa danos celulares, atribuindo ao sistema de defesa antioxidante a função de manter uma estabilidade celular vital.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a eventual associação entre a senescência do basidioma e o sistema antioxidante em cogumelos-ostra (*Pleurotus ostreatus* var. *florida*).

### **2.2 Objetivos específicos**

Verificar as diferenças, em duas regiões distintas do basidioma, das defesas antioxidantes enzimáticas (Catalase, Glutathione Peroxidase, Glutathione Redutase e Glutathione S-Transferase), não enzimáticas (Glutathione Reduzida) e indicadores de estresse oxidativo (Lipoperoxidação tecidual), em três diferentes estágios da diferenciação do basidioma do *Pleurotus ostreatus* var. *Florida*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Cultivo das Amostras

As amostras do cogumelo *Pleurotus ostreatus* var. *florida* (Figura 1) foram gentilmente cedidas pela professora Dra. Margarida Matos de Mendonça do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e, foram cultivados em sua empresa, Fungi Brasilis, localizada na cidade de Biguaçu, estado de Santa Catarina, Brasil.

O substrato utilizado para o cultivo foi constituído de serragem de eucalipto suplementada com farelos e grãos de cereais. A temperatura de incubação foi de 24°C e a temperatura de frutificação foi de 20°C. Os cogumelos colhidos permaneceram em câmara fria a 5°C, durante duas horas, até a preparação das amostras.



**Figura 1:** Cogumelos *P. ostreatus* var. *florida* nos estágios pequeno, médio e grande, respectivamente.

#### 3.2 Preparação das Amostras

Foi retirada uma porção do píleo e uma porção do estipe de cada cogumelo, totalizando quatro cogumelos para cada um dos três estágios do desenvolvimento. As porções, de 0,1 g de massa, foram imediatamente introduzidas em tubos de

ensaio contendo 0,4 ml de ácido tricloroacético (TCA, 12%), homogeneizadas utilizando-se um homogeneizador (Tissue Tearor Model 985370, Biospec Products Inc.) a 25.000 rpm durante 20 segundos e centrifugadas a 12.000 rpm por 3 minutos para subsequente análise da GSH. Para as demais análises, porções de 0,2 g de massa foram imediatamente introduzidas em tubos de ensaio contendo 1,8 ml de tampão Fosfato 20 mM, pH 7,4, 0,1% de Triton e 150 mM NaCl, contendo inibidores de proteases, homogeneizadas, nos mesmos parâmetros acima citados, e centrifugadas a 12.000 rpm durante 3 minutos. Em seguida, foi retirada uma alíquota para análise da lipoperoxidação lipídica (TBARS), armazenando o restante do homogenato a - 20° C para análises posteriores.

### **3.3 Análise das Defesas Antioxidantes e Marcadores de Estresse Oxidativo**

#### **3.3.1 Defesas Antioxidantes Enzimáticas**

##### **3.3.1.1 Catalase (CAT)**

O ensaio utilizado para avaliar a atividade da enzima catalase se baseia na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio, solução fresca de 10 mM em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 preparada no dia da análise, onde em 2 mL desta solução em cubeta adicionou-se 20 µL do homogenato da amostra e procedeu-se a leitura da absorbância a 240 nm, durante 30 segundos. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas e os valores expressos em  $\text{mmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de trama hifal (Aebi, 1984).

##### **3.3.1.2 Glutathione Peroxidase (GPx)**

Para a determinação da enzima glutathione peroxidase foi utilizado o método de Flohé e Gunzler. A GPx é a enzima que catalisa a redução de peróxido de hidrogênio, utilizando a GSH como substrato, produzindo GSSG (Jones *et al.*, 1981; Epp *et al.*, 1983). Utilizou-se 10 µl do homogenato da amostra e 10 µl de tert-butilhidroperóxido (t-BuOOH) adicionados em 1 ml de um meio de reação. Este meio de reação (50 ml) é composto de 25 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, 8,6 mg de

NADPH, 10 ml de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) 5 mM pH 7,0, 15 ml de água destilada, 24 mg de GSH, 3,8 µl de GR 5U. O método baseia-se em dismutar o tBuOOH pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisada pela GPx. No entanto, a medida consiste na oxidação (diminuição da absorbância) do NADPH verificado na absorbância a 340 nm, já que o NADPH é utilizado na regeneração de GSH pela GR. Portanto, a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH catalisada pela GPx presente na amostra. Os valores foram expressos em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de trama hifal (Flohe e Gunzler, 1984).

### **3.3.1.3 Glutathione Redutase (GR)**

Foi utilizado o método descrito por Calberg e Mannervick, baseado na taxa de oxidação do NADPH devido à formação de glutathione reduzida, a partir da GSSG, pela ação da GR, enzima presente na amostra, em um meio de reação (50 ml) contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 8,6 mg de NADPH; 32,7 mg de glutathione oxidada, 10 ml de DPTA 5 mM pH 7,0 e 15 ml de água destilada, com verificação da absorbância a 340 nm. Os valores da atividade foram analisados em duplicata e expressos em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de trama hifal (Calberg e Mannervik, 1985).

### **3.3.1.4 Glutathione S-Transferase**

A atividade da GST foi avaliada pelo método descrito por Habig e colaboradores, verificação da absorbância a 340 nm. 10 µl da amostra eram adicionados a um meio contendo 10 µl de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB), 10 µl de GSH 0,1 M e 970 µl de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, na cubeta de referência utilizou-se 980 µl de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, 10 µl de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB) e 10 µl de GSH 0,1 M. Este método de avaliação tem como princípio o uso de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato, para que a enzima presente na amostra conjugue a GSH ao CDNB formando um cromóforo detectável em absorbância a 340 nm. A monitoração da atividade foi feita durante 60 s. As análises foram feitas em duplicatas com expressão dos valores em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de trama hifal (Habig *et al.*, 1976).

### **3.3.2 Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas**

#### **3.3.2.1 Tióis não proteicos**

A concentração dos tióis não proteicos foi determinada através do método descrito por Beutler e colaboradores, sendo que a glutathiona reduzida (GSH) representa a maior parte destes tióis nas células eucariontes (Belozerskaya e Gessler, 2007). O método foi utilizado para avaliar a concentração de tióis em extrato ácido (TCA 12%, 1:4, v:v). A adição de 0,2 ml de ácido 2-nitrobenzoico 2,5 mM (DTNB) nas cubetas contendo 1,9 ml de tampão Tris-HCL 0,2 M pH 8,0 e 0,1 ml da amostra, permitia, após cerca de 3 min e agitação da cubeta, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, possibilitando a mensuração da absorbância a 412 nm. Os valores, medidos em duplicata, foram expressos em  $\mu\text{mol ml}^{-1}$  (Beutler *et al.*, 1963).

### **3.3.3 Determinação dos Marcadores de Estresse Oxidativo**

#### **3.3.3.1 Lipoperoxidação tecidual (TBARS)**

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada em duplicata, por meio da detecção dos derivados de produtos da oxidação, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o malondialdeído, ou MDA. A alíquota de 0,1 ml do homogenato foi adicionada a 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 12% e agitadas em um “mixer”. Em seguida, incubadas em 0,9 ml de tampão Tris-HCl 60 mM 7,4 (0,1 mM DPTA) e 1 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73% durante 60 min a 100 °C. Após, o material foi resfriado durante 30 min e centrifugado (5 min a 10000 g). A absorbância do cromóforo de cor rósea, base de Schiff, foi medida a 535 nm e os valores foram expressos em  $\text{nmol g}^{-1}$  (Bird e Draper, 1984).

### **3.4 Análise estatística**

As comparações estatísticas, criação e edição dos gráficos foram realizadas através do programa GraphPad Prism v5.0, usando a ferramenta ANOVA (análise de variância), admitindo um nível mínimo de significância de  $p < 0,05$ , seguido pelo teste de post-hoc de Newman-Keuls.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características amostrais

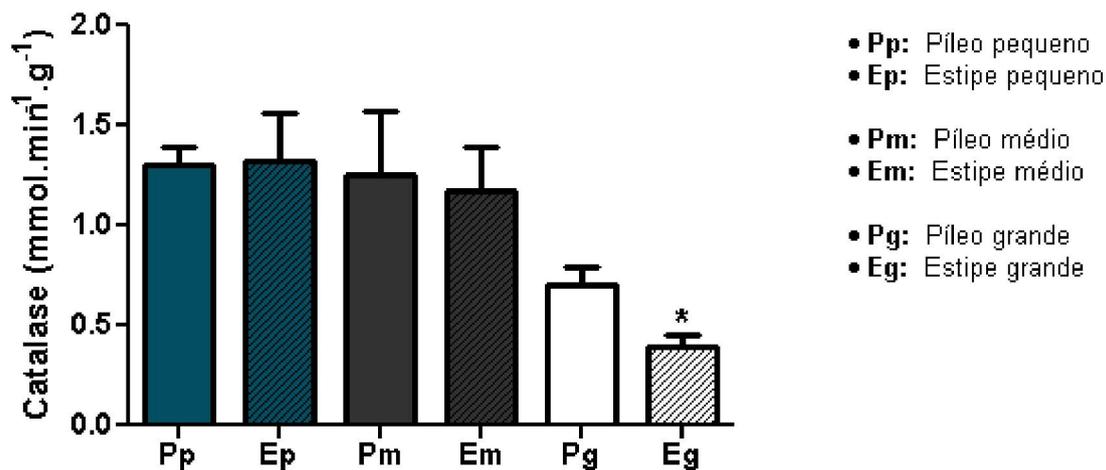
**Tabela 1** – Características dos estágios de desenvolvimento dos basidiomas - Pp (píleo pequeno); Ep (estipe pequeno); Pm (píleo médio); Em (estipe médio); Pg (píleo grande); Eg (estipe grande).

	<b>Amostras</b>	<b>Diâmetro do píleo (cm)</b>	<b>Média (cm)</b>
<b>Estágio inicial</b>	<b>Pp 1, Ep 1</b>	1,0 cm	1,0 cm
	<b>Pp 2, Ep 2</b>	1,0 cm	
	<b>Pp 3, Ep 3</b>	1,0 cm	
	<b>Pp 4, Ep 4</b>	1,0 cm	
<b>Estágio intermediário</b>	<b>Pm 1, Em 1</b>	2,5 cm	3,0 cm
	<b>Pm 2, Em 2</b>	3,5 cm	
	<b>Pm 3, Em 3</b>	2,5 cm	
	<b>Pm 4, Em 4</b>	3,5 cm	
<b>Estágio avançado</b>	<b>Pg 1, Eg 1</b>	5,5 cm	5,5 cm
	<b>Pg 2, Eg 2</b>	5,5 cm	
	<b>Pg 3, Eg 3</b>	6,0 cm	
	<b>Pg 4, Eg 4</b>	5,0 cm	

As amostras foram reunidas em três estágios do desenvolvimento, sendo 4 exemplares para cada estágio, de acordo com o diâmetro do píleo de cada cogumelo (Tabela 1), a partir do mesmo micélio.

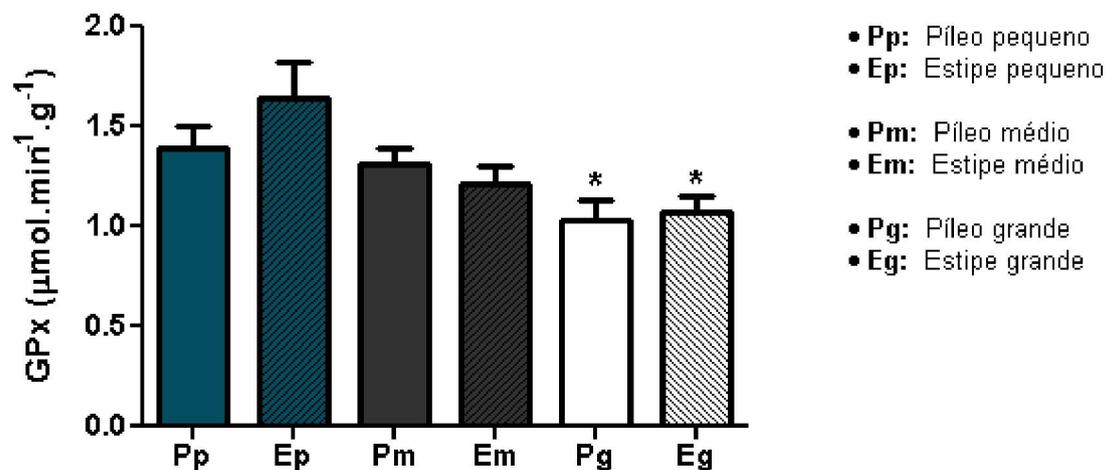
### 4.2 Determinações das Defesas Antioxidantes Enzimáticas

As determinações da atividade da enzima CAT demonstraram uma diferença significativa para o estipe no estágio grande (Eg) quando comparados, ambos píleo e estipe, aos estágios pequeno e médio. No entanto, não diferiu significativamente para o píleo do mesmo estágio (Eg) (Figura 2).



**Figura 2:** Atividade da enzima catalase (CAT) em diferentes estágios da diferenciação do basidioma de *Pleurotus ostreatus*. \*  $P < 0,05$  em relação a Pp, Ep, Pm e Em.

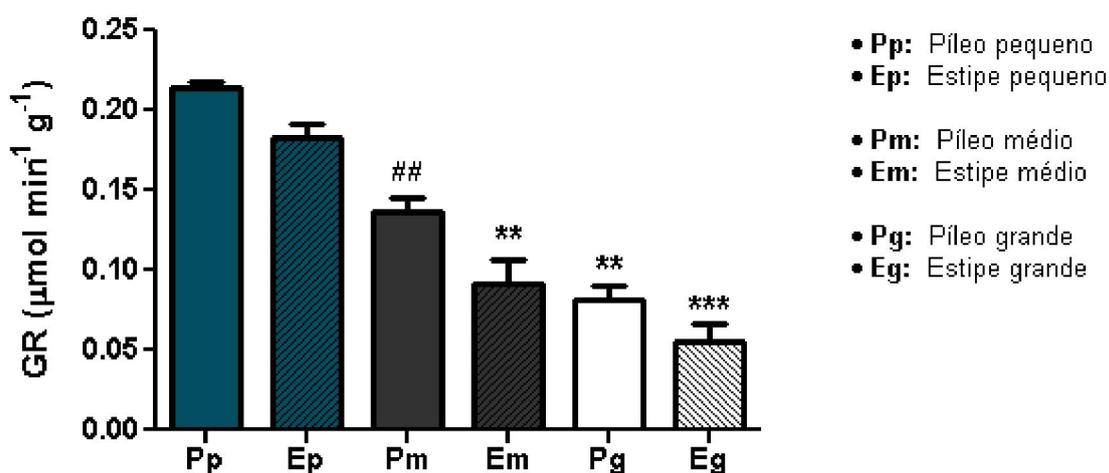
A atividade da enzima GPx apresentou uma significativa diminuição no estágio grande (Pg e Eg) em relação ao estipe do estágio pequeno (Ep) (Figura 3).



**Figura 3:** Atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) em diferentes estágios da diferenciação do basidioma de *Pleurotus ostreatus*. \*  $P < 0,05$  em relação à Ep.

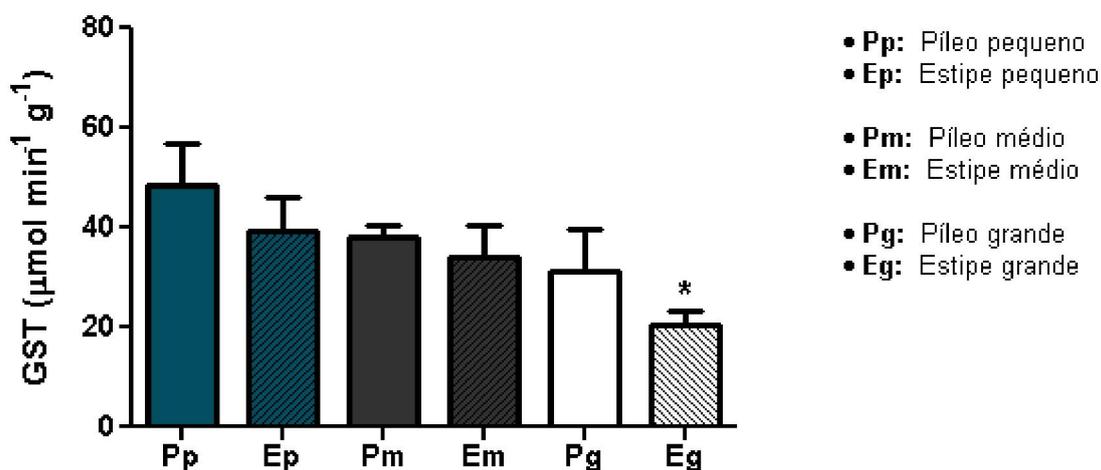
A determinação da atividade da enzima GR apresentou um perfil decrescente da enzima em relação aos estágios do desenvolvimento. Além disso, as amostras de estipe apresentaram uma tendência de diminuição da atividade da enzima em relação ao píleo em todos os estágios. As amostras de estipe e píleo do estágio grande (Pg e Eg) e estipe do estágio médio (Em) foram significativamente diferentes em relação estágio pequeno (Pp e Ep) e píleo do segundo estágio (Pm). Além da

significativa diferença do píleo no estágio médio (Pm) com todas as outras amostras (Figura 4).



**Figura 4:** Atividade da enzima glutathione redutase (GR) em diferentes estágios da diferenciação do basidioma de *Pleurotus ostreatus*. \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  em relação à Pp, Ep e Pm; ##  $P < 0,01$  em relação à Pp, Ep, Em, Pg e Eg.

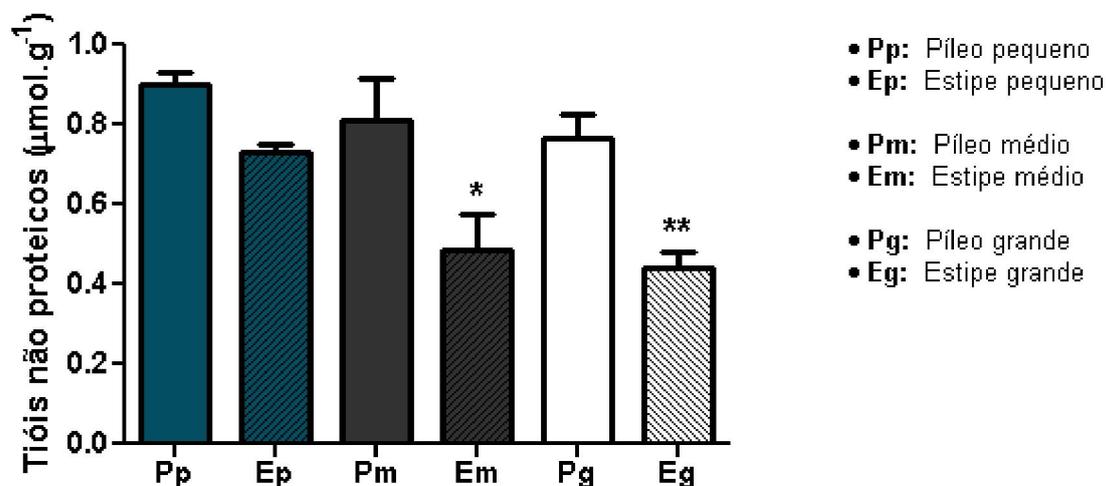
A atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) diferiu significativamente apenas entre a amostra do píleo no estágio pequeno (Pp) e a amostra do estipe no estágio grande (Eg) (Figura 5).



**Figura 5:** Atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) em diferentes estágios da diferenciação do basidioma de *Pleurotus ostreatus*. \*  $P < 0,05$  em relação à Pp (Newman-Keuls).

### 4.3 Determinações das Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas

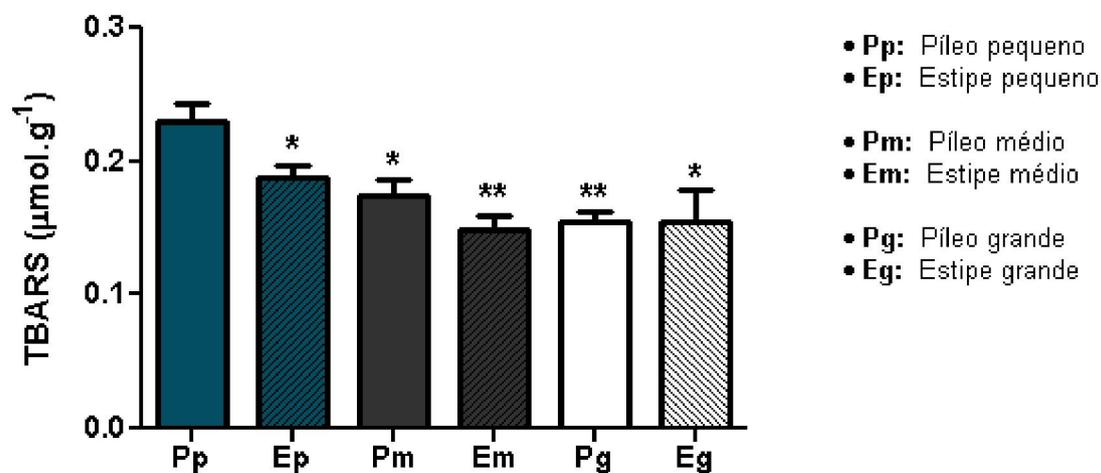
As concentrações de tióis não proteicos foram significativamente diferentes nas amostras do estipe no estágio médio (Em) e do estipe no estágio grande (Eg) em relação às outras amostras (Figura 6).



**Figura 6:** Concentração de tióis não proteicos em diferentes estágios da diferenciação do basidioma de *Pleurotus ostreatus*. \* P<0,05 e \*\* P<0,01 em relação à Pp, Ep, Pm (Newman-Keuls).

#### 4.4 Determinações dos Marcadores de Estresse Oxidativo

Os níveis de TBARS da amostra do píleo pequeno (Pp) diferiram significativamente do estipe do mesmo estágio (Ep), além do píleo e estipe nos estágios médio e grande (Figura 7).



**Figura 7:** Concentração de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), em diferentes estágios da diferenciação do basidioma de *Pleurotus ostreatus*. \* P<0,05 e \*\* P<0,01 em relação à Pp (Newman-Keuls).

## 5. DISCUSSÃO

O cogumelo se desenvolve a partir de um micélio na fase de primórdio do basidioma, passando para a fase de basidioma imaturo (sem basidiósporos) e finalmente o cogumelo maduro (esporulação). Este desenvolvimento, o qual não é interrompido pela colheita, inclui o alongamento do estipe, abertura e crescimento do píleo, expansão das lamelas (ou lâminas) e formação dos basidiósporos (Braaksma *et al.*, 1996). A senescência do cogumelo é um processo oxidativo que envolve a degradação das estruturas celulares, subcelulares e de macromoléculas, além da mobilização dos produtos de degradação para outras partes do fungo. De mesmo modo, alterações na permeabilidade da membrana e perda da capacidade de reter solutos têm sido associadas com o amadurecimento de frutas (Tao *et al.*, 2007). Os estágios relacionados no presente trabalho (Tabela 1), denominados de pequeno, médio e grande, podem ser interpretados como as fases: inicial (Pp e Ep), correspondendo a etapa de formação dos esporos; média (Pm e Em), fase correspondente ao início da disseminação dos esporos e; grande (Pg e Eg), na qual constitui os cogumelos que já estavam liberando os esporos (Chakraborty *et al.*, 2000).

Nos trabalhos realizados com leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, a senescência em cultura estacionária mostrou uma acumulação de danos oxidativos e uma diminuição das defesas antioxidantes. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) decresceu consideravelmente durante a senescência das células de leveduras. Estes resultados estão de acordo com a aceleração do envelhecimento em mutantes com deficiência da enzima superóxido dismutase (Grzelak *et al.*, 2001). O mesmo padrão parece ocorrer em plantas. A rígida regulação da senescência das flores torna evidente a existência de um controle de morte celular (Rubinstein, 2000). Há evidências indicando que as EROs contribuem para a morte celular programada (MCP), tanto em células vegetais como animais (Chakraborty *et al.*, 2007; Van Doorn e Woltering, 2008). Todavia, as flores representam estruturas de reprodução sexual para as plantas, assim como os cogumelos para seu respectivo micélio, talvez haja, até certo ponto, alguma semelhança no processo senescente entre ambos. Em plantas dos gêneros *Dianthus* e *Hemerocallis*, antioxidantes atrasaram visivelmente a senescência, em

contrapartida, no gênero *Iris*, estes compostos foram ineficazes (Van Doorn e Woltering, 2008). A MCP, em vegetais, pode depender da localização, tempo, e níveis de geração das EROs, no entanto, não pode ser eficaz enquanto as enzimas antioxidantes são mantidas em níveis suficientes para neutralização das EROs. Em pétalas de *Tulipa gesneriana*, a atividade das enzimas, ascorbato peroxidase e catalase, diminuíram nos estágios avançados da senescência, além disso, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou, portanto, esta relação apóia a noção de que as EROs e a MCP estão associadas (Azad *et al.*, 2008).

A catalase (CAT) é uma enzima capaz de diminuir os níveis primários de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, possui metais em seus centros catalisadores que reagem com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através de uma reação de dismutação, desempenhando um importante papel no sistema de defesa antioxidante (Belozerskaya e Gessler, 2007). Em *Hemerocallis* a atividade específica da única forma de CAT detectada em gel, diminuiu progressivamente a partir de aproximadamente 6 horas antes da abertura da flor. Quando a senescência foi induzida precocemente, sua atividade decresceu mais cedo (Rubinstein, 2000). A expressão da enzima catalase, em *Saccharomyces cerevisiae*, parece ser transitoriamente ativada durante o envelhecimento celular, sendo facilmente induzida por vários tipos de estresse (Jakubowski *et al.*, 2000; Grzelak *et al.*, 2001). Conforme observado nas determinações da CAT (Figura 2), a atividade da enzima não apresentou diferenças entre os estágios pequeno e médio, no entanto, foi observado uma atividade relativamente baixa no estágio grande, especialmente na amostra de estipe (Eg). Esta diminuição na atividade da CAT, observada nos estágios avançados (Pg e Eg), pode estar relacionada com a senescência do *P. ostreatus*.

Várias classes de peroxidases, como a glutathiona peroxidase, tioredoxinas, glutaredoxinas, peroxiredoxinas e sulfiredoxinas, foram encontradas tanto em eucariontes como procariontes. Estas peroxidases não contêm metais, mas possuem um ou mais resíduos de cisteína, que estão envolvidos na catálise (Belozerskaya e Gessler, 2007). A capacidade de certos grupos SH de interagir com EROs é determinada pelo seu grau de ionização e influência de resíduos dos aminoácidos vizinhos. Três genes que codificam a glutathiona peroxidase (GPx), homólogos a genes de mamíferos, foram inicialmente descobertos no genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, bem como enzimas similares no fungo *Cryptococcus*

*neoformans* (Belozerskaya e Gessler, 2007). Embora não apresente uma diferença significativa, pôde-se observar uma menor atividade da enzima GPx (Figura 3) no estágio grande (Pg e Eg) em relação aos outros estágios, assim como observado na atividade da CAT.

Diversos estudos têm indicado que a atividade da superóxido dismutase (SOD) diminui progressivamente na senescência das pétalas, na planta *Dianthus caryophyllus* (Bartoli *et al.*, 1996). Além disso, nesta espécie vegetal, o conteúdo total de glutathiona, ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol, além da atividade da enzima GR, parecem declinar durante o período de envelhecimento das pétalas (Bartoli *et al.*, 1996; Rubinstein, 2000). No presente trabalho, a atividade da GR (Figura 4) apresentou uma tendência inversamente proporcional ao tamanho dos cogumelos, ou seja, uma alta atividade nas amostras de indivíduos pequenos e uma menor atividade nas amostras de indivíduos maiores. Além disso, observou-se uma menor atividade no estipe em relação ao píleo em todos os estágios, embora seja estatisticamente significativa apenas no estágio médio. Este padrão foi acompanhado pela atividade da glutathiona S-transferase (GST) (Figura 5), onde apresentou uma menor atividade no estipe do estágio grande (Eg) e maior atividade no píleo do estágio pequeno (Pp). Uma das funções desta enzima é reparar compostos endógenos, como lipídios peroxidados (Chakrabarty *et al.*, 2007). Contudo, a atividade da GST (Figura 5) parece estar de acordo, até certo ponto, com a determinação da lipoperoxidação (TBARS) (Figura 7), onde as amostras do píleo no primeiro estágio (Pp) apresentaram valores mais elevados. A GST, além da função relacionada com a fase II da biotransformação de xenobióticos, participa na detoxificação de hidroperóxidos oriundos da lipoperoxidação (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Em *Agaricus bisporus* ocorre um aumento temporário da respiração, após a colheita de cogumelos imaturos. Isto se deve, provavelmente, a maior necessidade energética exigida pelos processos envolvidos na abertura do píleo, expansão das lamelas e maturação dos esporos. Braaksma e colaboradores observaram um pico de respiração no momento em que ocorre a quebra do véu em cogumelos colhidos no estágio imaturo (Braaksma *et al.*, 1996). No entanto, na espécie *P. ostreatus* a descarga de esporos começa em uma fase mais precoce, devido à ausência de um véu cobrindo as lâminas do basidioma (Philippoussis, 2009). De acordo com

Braaksma (1996), mais de 75% dos compostos energéticos, determinados em conteúdo de polifosfatos, são sintetizados antes da abertura do píleo, no desenvolvimento pós-colheita de *A. bisporus*. Portanto, a elevada atividade antioxidante nas amostras de píleo, principalmente no estágio inicial, poderia estar relacionada com a maior atividade metabólica, induzida pela colheita, nas amostras que ainda não liberaram os esporos (Pp), com a finalidade de garantir a disseminação dos esporos, após a separação entre cogumelo e micélio.

No entanto, as atividades metabólicas na senescência de cogumelos não colhidos, parecem distinguir das atividades metabólicas que ocorrem na senescência após a colheita. As determinações da atividade específica de enzimas, que representam diferentes vias ligadas ao metabolismo dos carboidratos, indicam que a glicólise e ciclo de Krebs são as principais vias do catabolismo de carboidratos, durante a fase da liberação dos esporos em *P. ostreatus* (Chakraborty *et al.*, 2003). Contudo, a elevada taxa de metabolismo, que ocorre durante a esporulação, em cogumelos ligados ao micélio, foi apoiada por uma menor taxa de glicogênese nesta fase. Concentrações de todos os açúcares importantes do basidioma, como manitol, glicose e trealose, diminuíram no basidioma maduro e trama lamelar. Isto indicou alta atividade catabólica, durante a fase de liberação dos esporos, no desenvolvimento de cogumelos pós-colheita (Chakraborty *et al.*, 2003). Em outro estudo com *A. bisporus in vivo*, as taxas respiratórias observadas contrastam com as determinações pós-colheita, observando-se um constante aumento em relação ao desenvolvimento do basidioma. Partindo do menor consumo de oxigênio, observado no primórdio, até o mais elevado, visualizado no estágio avançado (Hou e Wu, 1972), contrariando com as taxas respiratórias encontradas em cogumelos da mesma espécie, onde ocorre um pico respiratório na esporulação, quebra do véu, apuradas no desenvolvimento pós-colheita (Braaksma *et al.*, 1996). Os cogumelos, do presente estudo, foram armazenados em câmara fria após a colheita, o que reduz sua captação de oxigênio, porém, fica arriscado extrapolar uma taxa respiratória baseada em estudos com outras espécies, no entanto, sabe-se que as taxas respiratórias nas lamelas são efetivamente maiores em relação ao estipe, tanto *in vivo* como pós-colheita (Hou e Wu, 1972; Braaksma *et al.*, 1996).

A glutationa ( -glutamilcisteinilglicina reduzida) é o tiol não protéico mais difundido entre as células eucariontes, está presente na célula em sua forma

reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (Belozerskaya e Gessler, 2007). A GSH está associada com funções celulares básicas, bem como a manutenção da estrutura mitocondrial, integridade da membrana, diferenciação e desenvolvimento celular. Este tripeptídeo desempenha um papel fundamental na resposta a situações de estresse em vários fungos, sendo um importante antioxidante que reage com uma série EROs. Além disso, a resposta ao estresse oxidativo também envolve a biossíntese de enzimas associadas à GSH, como GST, GR e GPx (Pócsi *et al.*, 2004). Em estudos realizados com *Saccharomyces cerevisiae*, a GSH apresentou uma diminuição durante a senescência das células de leveduras (Grzelak *et al.*, 2001). Com relação às concentrações de tióis não proteicos (Figura 6), ficou evidente a maior quantidade nas amostras do píleo em relação ao estipe em todos os estágios. No entanto, as amostras Pg e Eg apresentaram menor concentração de tióis não proteicos em relação à fase inicial, seguindo a mesma tendência de diminuição da capacidade de defesa antioxidante com o avanço da senescência. Em um estudo com *Saccharomyces cerevisiae*, foi demonstrado que o nível de mRNA para GSH é aumentado pela exposição das células aos oxidantes, particularmente por agentes geradores do ânion superóxido (Stephen e Jamieson, 1996). A alta taxa respiratória encontrada na região laminar é, provavelmente, resultado do maior número de mitocôndrias por célula encontradas nesta região do basidioma (Braaksma *et al.*, 1996). Portanto, isto pode explicar a maior quantidade de tióis não proteicos nas amostras de píleo, visto que, uma maior geração do ânion superóxido estaria associada com o elevado número de mitocôndrias destas amostras. Um alto nível de redução da glutathiona é mantido pela GR e, portanto, está estreitamente relacionado com o estado redox celular. A concentração de glutathiona reduzida sob condições fisiológicas normais é de 10 a 100 vezes mais alta que a concentração na forma oxidada, por isso a glutathiona está presente em concentrações elevadas (Wilhelm Filho *et al.*, 2000), principalmente no estado reduzido em todos os organismos aeróbicos (Belozerskaya e Gessler, 2007). Os altos níveis de tióis não proteicos detectados nas amostras de píleo poderiam estar de acordo com a maior atividade da enzima GR nas mesmas amostras, juntamente com a maior taxa respiratória, quando comparadas com estipe em todos os estágios do basidioma.

A semelhança dos processos bioquímicos fundamentais entre organismos de diferentes grupos sugere que os mecanismos básicos da senescência também

podem ser comuns entre distintas espécies. Uma hipótese que tenta explicar a base mecânica do envelhecimento, postula que a acumulação dos danos macromoleculares, afetando funções fisiológicas, induzidos por EROs constitui um fator central no processo de senescência (Sohal, 2002). Assim, o dano oxidativo e os níveis de geração de EROs nas células seriam inversamente proporcionais ao tempo de vida máximo das espécies (Sohal e Weindruch, 1996). Apesar disso, as defesas antioxidantes não apresentam uma correlação clara com a expectativa de vida nos diferentes organismos (Sohal, 2002). Entretanto, o estado das defesas antioxidantes tem se mostrado associado com os níveis de atividades metabólicas em organismos termoconformistas (Wilhelm Filho *et al.*, 2000). Em mexilhões *Perna Perna*, o aumento das defesas antioxidantes parece estar relacionado com o aumento da temperatura, em determinados meses do ano, seguido pelo aumento do consumo de oxigênio e, conseqüentemente, uma elevação na geração de EROs (Wilhelm Filho *et al.*, 1993; Wilhelm Filho *et al.*, 2001).

Estudos demonstraram que a função respiratória é um fator chave e, contribui para a diminuição do tempo de vida do fungo *Podospora anserina*. Neste organismo, a senescência é sistematicamente associada com a instabilidade do DNA mitocondrial. Foi demonstrado, que a inativação do gene COX5, que codifica a subunidade V do complexo citocromo c oxidase, leva ao uso de uma via respiratória alternativa e, à diminuição da produção de EROs. Isto resulta em um elevado aumento na longevidade do fungo, associado com a estabilização do cromossomo mitocondrial. Além disso, a acumulação de várias moléculas, específicas do DNA mitocondrial e relacionadas com a senescência, não ocorre neste mutante nuclear. Estes resultados forneceram fortes evidências de uma relação direta entre o metabolismo mitocondrial e a longevidade em *Podospora anserina* (Dufour *et al.*, 2000).

Antes da colheita, o cogumelo é sustentado por nutrientes e água do micélio subjacente. Quando o cogumelo é colhido, ele se torna isolado, em termos nutritivos, adaptando seu metabolismo para sustentar o crescimento e produção do esporo. Esta adaptação está associada com a senescência (Burton *et al.*, 1994). Vários trabalhos indicam que há uma exportação de recursos do estipe para o píleo durante a senescência dos cogumelos (Burton *et al.*, 1994). Essa exportação deve-se, provavelmente, a importância da região do píleo para liberação dos esporos. Além

disso, trabalhos realizados por Hou e Wu, com *A. bisporus*, demonstraram que a região laminar possui valores de captação de oxigênio elevados quando comparados com o estipe (Hou e Wu, 1972). Trabalhos mais recentes indicam que a respiração na região laminar representa cerca de 70% da respiração de todo cogumelo nas observações feitas em *A. bisporus* (Braaksma *et al.*, 1996). Esta respiração é relativamente alta, uma vez que a massa da trama laminar é pequena quando comparada à massa de todo cogumelo. No entanto, é arriscado extrapolar os valores de respiração do cogumelo colhido para a situação *in vivo*, devido, principalmente, ao estresse gerado pela colheita do cogumelo (Braaksma *et al.*, 1996). Contudo, os resultados obtidos neste trabalho, demonstram uma tendência para maior atividade do sistema de defesa antioxidante nas amostras de píleo (as quais contêm a trama laminar) em relação às amostras de estipe, provavelmente, correspondendo à maior atividade respiratória nesta região do cogumelo.

Estudos sugerem que a síntese de fosfolipídios é bloqueada no início da senescência, além de evidências indicando que altos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógenos ajudariam a estimular o envelhecimento (Rubinstein, 2000). EROs, como o radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, têm um papel importante na peroxidação lipídica das membranas e, conseqüentemente, contribuem para a senescência. As mudanças na permeabilidade da membrana, durante a senescência, estão relacionadas com uma simultânea diminuição de lipídios de membrana (Tao *et al.*, 2007). No presente trabalho, as determinações de TBARS constataram uma maior peroxidação lipídica na amostra de píleo pequeno e, não se observou diferença entre todas as outras amostras. A elevada taxa respiratória na região laminar poderia justificar a maior peroxidação lipídica na amostra do píleo (Pp).

Trabalhos indicam uma acumulação de danos em proteínas e DNA na senescência replicativa de *Saccharomyces cerevisiae*. Este fenômeno está ligado à atenuação considerável das defesas antioxidantes, que ocorre durante o envelhecimento celular. No entanto, o acúmulo de danos oxidativos é devido, principalmente, à diminuição das defesas antioxidantes do que o aumento da formação de EROs durante a senescência replicativa de leveduras (Grzelak *et al.*, 2001; Grzelak *et al.*, 2006).

Em conclusão, estes dados supostamente indicam que a elevada taxa respiratória presente nas amostras de píleo, durante a etapa inicial de maturação dos esporos, seja responsável por uma maior produção de EROs e, conseqüentemente uma superior peroxidação lipídica, apesar da maior capacidade do sistema de defesa antioxidante deste estágio. No entanto, é necessário verificar outros marcadores de estresse oxidativo. Talvez esta maior produção de EROs, observada por uma maior lipoperoxidação, seja responsável pela maior atividade do sistema antioxidante nas amostras de píleo. Contudo, a diminuição das defesas antioxidantes, observada durante o desenvolvimento do basidioma, parece estar relacionada com a sua senescência.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. **Catalase in vitro**. *Methods in Enzymology* [S.I.], v. 105, p. 121-6, 1984.

AZAD, A. K.; ISHIKAWA, T.; ISHIKAWA, T.; SAWA, Y.; SHIBATA, H. **Intracellular energy depletion triggers programmed cell death during petal senescence in tulip**. *Journal of Experimental Botany* [S.I.], v. 59, n. 8, p. 2085-2095, May 1, 2008 2008.

BARTOLI, C. G.; SIMONTACCHI, M.; MONTALDI, E.; PUNTARULO, S. **Oxidative stress, antioxidant capacity and ethylene production during ageing of cut carnation (*Dianthus caryophyllus*) petals**. *Journal of Experimental Botany* [S.I.], v. 47, n. 4, p. 595-601, April 1, 1996 1996.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. **The free radical theory of aging matures**. *Physiological Reviews* [S.I.], v. 78, n. 2, p. 547-81, Apr 1998.

BELOZERSKAYA, T.; GESSLER, N. **Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: A review**. *Applied Biochemistry and Microbiology* [S.I.], v. 43, n. 5, p. 506-515, 2007.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. **Improved method for the determination of blood glutathione**. *The Journal of Laboratory Clinical Medicine* [S.I.], v. 61, p. 882-8, May 1963.

BIRD, R. P.; DRAPER, A. H. **Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination**. *Methods in Enzymology* [S.I.], v. 90, p. 105-110, 1984.

BRAAKSMA, A.; VAN DER MEER, P.; SCHAAP, D. J. **Polyphosphate accumulation in the senescing mushroom *Agaricus bisporus* Postharvest** *Biology and Technology* [S.I.], v. 8, n. 2, p. 121-127, 1996.

BURTON, K. S.; HAMMOND, J. B. W.; MINAMIDE, T. **Protease activity in *Agaricus bisporus* during periodic fruiting (flushing) and sporophore development**. *Current Microbiology* [S.I.], v. 28, n. 5, p. 275-278, 1994.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. **Glutathione reductase from rat liver**. *Methods Enzymology* [S.I.], v. 113, p. 484-490, 1985.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The fungi**. 2nd. ed. San Diego, Calif.: Academic Press, 2001.

CHAKRABARTY, D.; CHATTERJEE, J.; DATTA, S. **Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in chrysanthemum florets**. *Plant Growth Regulation* [S.I.], v. 53, n. 2, p. 107-115, 2007.

CHAKRABORTY, T. K.; DAS, N.; MUKHERJEE, M. **Evidences of high carbon catabolic enzyme activities during sporulation of *Pleurotus ostreatus* (Florida).** *Journal of Basic Microbiology* [S.I.], v. 43, n. 6, p. 462-467, 2003.

CHAKRABORTY, T. K.; DAS, N.; SENGUPTA, S.; MUKHERJEE, M. **Accumulation of a natural substrate of laccase in gills of *Pleurotus florida* during sporulation.** *Current Microbiology* [S.I.], v. 41, n. 3, p. 167-171, 2000.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. ***Mushrooms : cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact.*** 2nd. ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2004.

DUBOST, N. J.; OU, B.; BEELMAN, R. B. **Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity.** *Food Chemistry* [S.I.], v. 105, n. 2, p. 727-735, 2007.

DUFOUR, E.; BOULAY, J.; RINCHEVAL, V.; SAINSARD-CHANET, A. **A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 97, n. 8, p. 4138-4143, 2000.

EPP, O.; LADENSTEIN, R.; WENDEL, A. **The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution.** *European Journal of Biochemistry* [S.I.], v. 133, n. 1, p. 51-69, Jun 1 1983.

FLOHE, L.; GUNZLER, W. A. **Assays of glutathione peroxidase.** *Methods in Enzymology* [S.I.], v. 105, p. 114-21, 1984.

GRZELAK, A.; MACIERZYNSKA, E.; BARTOSZ, G. **Accumulation of oxidative damage during replicative aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Experimental Gerontology* [S.I.], v. 41, n. 9, p. 813-818, 2006.

GRZELAK, A.; SKIERSKI, J.; BARTOSZ, G. **Decreased antioxidant defense during replicative aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* studied using the 'baby machine' method.** *FEBS Letters* [S.I.], v. 492, n. 1-2, p. 123-126, 2001.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. **Glutathione S-transferase AA from rat liver.** *The Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 175, n. 2, p. 710-6, Aug 1976.

HALLIWELL, B. **The chemistry of free radicals.** *Toxicology and Industrial Health* [S.I.], v. 9, n. 1-2, p. 1-21, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. ***Free radicals in biology and medicine.*** 3rd. ed. Oxford: Clarendon Press ; Oxford University Press, 1999. (Oxford science publications).

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. ***Free radicals in biology and medicine.*** 4th. ed. Oxford ; New York: Oxford University Press, 2007.

HAWKSWORTH, D. L. **The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation.** *Mycological Research* [S.I.], v. 95, n. 6, p. 641-655, 1991.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F. *et al.* **A higher-level phylogenetic classification of the Fungi.** *Mycol Res* [S.I.], v. 111, n. Ep 5, p. 509-47, May 2007.

HOFFMANN, S.; SPITKOVSKY, D.; RADICELLA, J. P.; EPE, B.; WIESNER, R. J. **Reactive oxygen species derived from the mitochondrial respiratory chain are not responsible for the basal levels of oxidative base modifications observed in nuclear DNA of Mammalian cells.** *Free Radical Biology and Medicine* [S.I.], v. 36, n. 6, p. 765-73, Mar 15 2004.

HOU, H. H.; WU, L. C. **Respiratory changes in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*.** In: Mushroom Science IX, Taipei, Taiwan. 1972. p.37-49.

IMLAY, J. A. **Pathways of oxidative damage.** *Annu Rev Microbiol* [S.I.], v. 57, p. 395-418, 2003.

JAKUBOWSKI, W.; BILINSKI, T.; BARTOSZ, G. **Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Free Radical Biology and Medicine* [S.I.], v. 28, n. 5, p. 659-664, 2000.

JONES, D. P.; EKLOW, L.; THOR, H.; ORRENIUS, S. **Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* [S.I.], v. 210, n. 2, p. 505-16, Sep 1981.

MANDEEL, Q. A.; AL-LAITH, A. A.; MOHAMED, S. A. **Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) on various lignocellulosic wastes.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [S.I.], v. 21, n. 4, p. 601-607, 2005.

MILES, P. G.; CHANG, S. T. ***Mushroom biology. Concise basics and current developments.*** Singapore: World Scientific Publishing Company, 1997.

PEARL, R. ***The rate of living, being an account of some experimental studies on the biology of life duration.*** New York,: A.A. Knopf, 1928.

PHILIPPOUSSIS, A. N. **Production of Mushrooms Using Agro-Industrial Residues as Substrates,** 2009. p. 163-196.

PÓCSI, I.; PRADE, R. A.; PENNINGCKX, M. J. **Glutathione, Altruistic Metabolite in Fungi.** In: POOLE (Ed.). *Advances in Microbial Physiology.* Academic Press, 2004. p. 1-76.

RUBINSTEIN, B. **Regulation of cell death in flower petals.** *Plant Molecular Biology* [S.I.], v. 44, n. 3, p. 303-318, 2000.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas ULBRA, 2004.

SIES, H. **Oxidative stress: introductory remarks** *Oxidative Stress*. London: Academic Press, 1985.

SOHAL, R. S. **Oxidative stress hypothesis of aging**. *Free Radical Biology and Medicine* [S.I.], v. 33, n. 5, p. 573-574, 2002.

SOHAL, R. S.; WEINDRUCH, R. **Oxidative stress, caloric restriction, and aging**. *Science* [S.I.], v. 273, n. 5271, p. 59-63, Jul 5 1996.

STAMETS, P. **Growing gourmet and medicinal mushrooms**. 3rd. ed. Berkeley, Calif.: Ten Speed Press, 2000.

STAMETS, P.; CHILTON, J. S. **The mushroom cultivator : a practical guide to growing mushrooms at home**. Olympia, Wash: Agarikon Press ; Western distribution by Homestead Book Co., 1983.

STEPHEN, D. W. S.; JAMIESON, D. J. **Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae***. *FEMS Microbiology Letters* [S.I.], v. 141, n. 2-3, p. 207-212, 1996.

TAO, F.; ZHANG, M.; YU, H.-Q. **Effect of vacuum cooling on physiological changes in the antioxidant system of mushroom under different storage conditions**. *Journal of Food Engineering* [S.I.], v. 79, n. 4, p. 1302-1309, 2007.

VAN DOORN, W. G.; WOLTERING, E. J. **Physiology and molecular biology of petal senescence**. *Journal of Experimental Botany* [S.I.], v. 59, n. 3, p. 453-480, February 1, 2008 2008.

WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to fungi**. 3rd. ed. Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press, 2007.

WILHELM FILHO, D.; ALTHOFF, S. L.; DAFRÉ, A. L.; BOVERIS, A. **Antioxidant defenses, longevity and ecophysiology of South American bats**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* [S.I.], v. 146, n. 1-2, p. 214-220, 2000.

WILHELM FILHO, D.; GIULIVI, C.; BOVERIS, A. **Antioxidant defences in marine fish--I. Teleosts**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* [S.I.], v. 106, n. 2, p. 409-413, 1993.

WILHELM FILHO, D.; TRIBESS, T.; GÁSPARI, C.; CLAUDIO, F. D.; TORRES, M. A. *et al.* **Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*)**. *Aquaculture* [S.I.], v. 203, n. 1-2, p. 149-158, 2001.