

Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato obtido do fungo *Penicillium purpurogenum* advindo de ambiente marinho poluído do Maranhão
Total phenolics and antioxidant activity of the extract obtained from the fungus *Penicillium purpurogenum* from polluted marine environment of Maranhão
Actividad fenólica total y antioxidante del extracto obtenido del hongo *Penicillium purpurogenum* del ambiente marino contaminado de Maranhão

Recebido: 01/06/2020 | Revisado: 04/07/2020 | Aceito: 05/07/2020 | Publicado: 17/07/2020

Amanda Mara Teles

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5068-4696>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: damarateles@hotmail.com

Gustavo Oliveira Everton

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0457-914X>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: gustavooliveiraeverton@gmail.com

Adenilde Nascimento Mouchrek

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3270-1437>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: adenild@bol.com.br

Carla Junqueira Moragas Tellis

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9834-2874>

Fundação Oswaldo Cruz, Brasil

E-mail: carlamoragas@yahoo.com.br

Geusa Felipa de Barros Bezerra

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1016-8563>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: geusabezerra@gmail.com

Fernando Almeida de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0047-6159>

Universidade Estadual do Maranhão, Brasil

E-mail: fernandoalsouza@gmail.com

Ana Paula Silva de Azevedo-Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6404-0103>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: apsazevedo@yahoo.com.br

Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2783-362X>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: m.desterro.soares@gmail.com

Resumo

Este artigo objetiva avaliar os fenólicos totais e a atividade antioxidante do extrato preparado do fungo *Penicillium purpurogenum*, obtido de um ambiente marinho poluído de São Luís-MA. A pesquisa foi realizada na Laguna da Jansen localizada no Município de São Luís, Maranhão, Brasil. Foram realizadas 4 coletas do sedimento no período de maio a setembro de 2017, no período matutino. As amostras foram obtidas de uma profundidade de até 73,5 cm com auxílio de uma draga metálica. A identificação do fungo seguiu metodologias de isolamento e posterior preparo dos extratos com avaliação dos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu e atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH. A identificação confirmou a presença de *Penicillium purpurogenum*. Os extratos de *P. purpurogenum* variaram na quantificação de fenólicos totais de 791,00 mg EAT.g⁻¹ para extrato FR1 e 650,82 mg EAT.g⁻¹ para o FR2. Na atividade antioxidante, podemos verificar que o EC₅₀ encontrados no extrato FR1 foi de 22,59 µg mL⁻¹ e FR2 39,80 µg mL⁻¹. Concluindo que o extrato FR2 apresentou forte atividade antioxidante enquanto que FR1 apresentou-se muito forte pelo método do radical DPPH.

Palavras-chave: *Penicillium*; Antioxidante; Extrato.

Abstract

This article aims to evaluate the total phenolics and antioxidant activity of the prepared extract of the fungus *Penicillium purpurogenum*, obtained from a polluted marine environment of São Luís-MA. The research was carried out at Laguna da Jansen located in the Municipality of São Luís, Maranhão, Brazil. Four sediment collections were performed from May to September 2017, in the morning period. The samples were obtained from a depth of up to 73.5 cm with the aid of a metal dredger. The identification of the fungus followed methodologies of isolation and subsequent preparation of the extracts with evaluation of total phenolics by the Folin-Ciocalteu

method and antioxidant activity by the DPPH radical sequestration method. Identification confirmed the presence of *Penicillium purpurogenum*. The extracts of *P. purpurogenum* varied in the quantification of total phenolics of 791.00 mg EAT g⁻¹ for FR1 extract and 650.82 mg EAT g⁻¹ for FR2. In antioxidant activity, we could verify that the EC₅₀ found in the FR1 extract was 22.59 µg mL⁻¹ and FR2 39.80 µg mL⁻¹. Concluding that the EXTRACT FR2 showed strong antioxidant activity while FR1 was very strong by the DPPH radical method.

Keywords: *Penicillium*; Antioxidant; Extract.

Resumen

Este artículo tiene como objetivo evaluar la actividad fenólica total y antioxidante del extracto preparado del hongo *Penicillium purpurogenum*, obtenido de un ambiente marino contaminado de San Luis-MA. La investigación se llevó a cabo en Laguna da Jansen ubicada en el Municipio de San Luís, Maranhão, Brasil. De mayo a septiembre de 2017 se realizaron cuatro colecciones de sedimentos en el período matutino. Las muestras se obtuvieron a partir de una profundidad de hasta 73,5 cm con la ayuda de una draga de metal. La identificación del hongo siguió metodologías de aislamiento y posterior preparación de los extractos con evaluación de fenólicos totales por el método Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante por el método de secuestro radical de DPPH. La identificación confirmó la presencia de *Penicillium purpurogenum*. Los extractos de *P. purpurogenum* variaron en la cuantificación de fenólicos totales de 791.00 mg EAT.g⁻¹ para el extracto de FR1 y 650.82 mg EAT.g⁻¹ para FR2. En la actividad antioxidante, que pudimos comprobar que la CE₅₀ encontrada en el extracto de FR1 era de 22,59 µg de mL⁻¹ y FR2 39,80 µg mL⁻¹. Concluyendo que el extracto FR2 mostró una fuerte actividad antioxidante mientras que FR1 era muy fuerte por el método radical DPPH.

Palabras clave: *Penicillium*; Antioxidante; Extracto.

1. Introdução

Os fungos são capazes de produzir compostos orgânicos e químicos que tem função direta no seu crescimento, desenvolvimento e proteção com impacto em toxinas comumente conhecidas como micotoxinas sendo as mais conhecidas, incluindo aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas, ocratoxina, citocalasinas (Bräse et al., 2009).

A natureza forneceu a fonte para a maioria dos medicamentos em uso atualmente. O uso da medicina tradicional é generalizado e os compostos naturais ainda representam uma grande fonte de metabólitos secundários naturais que podem servir como indícios para o

desenvolvimento de novos medicamentos (Newman&Cragg, 2016). Mais de 70% da superfície do nosso planeta é coberta por oceanos, ele tem sido considerado uma rica fonte de compostos com novas estruturas e atividades biológicas. oferecendo o potencial para a produção de metabólitos, que podem ser diferentes dos microrganismos terrestres (Nett et al., 2009; Bérdy, 2012).

Devido à natureza complexa e ao sistema dinâmico do oceano, os microrganismos marinhos desenvolveram capacidades metabólicas e fisiológicas únicas que garantem sua sobrevivência em variações extremas de pressão, salinidade e temperatura. Estudos sobre as atividades biológicas de extratos de fungos em ambientes marinhos têm sido relatados por diversos trabalhos, com propriedades medicinais para uso de antimicrobianos (Tang et al., 2017), antioxidantes (Xu et al., 2018), anti-inflamatórios (Zhang et al., 2018) e anticancerígenos (Wong et al., 2018).

Diversos estudos estão sendo focados no potencial antioxidante devido a sua importância na indústria de alimentos e farmacêuticas. Antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações, quando comparada a um substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação desse substrato de maneira eficaz. O sistema de defesa antioxidante é formado por compostos enzimáticos e não-enzimáticos, presentes tanto no organismo como nos alimentos ingeridos (Rufino et al., 2006). Além dos antioxidantes produzidos no organismo, eles podem ser classificados em sintéticos e naturais. Os sintéticos são substâncias usadas nas indústrias, como: butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), o propilgalato (PG) e o terciobutilhidroxinona (TBHT) e os naturais tais como: α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos as quais são responsáveis pela remoção dessas espécies reativas (Sousa et al., 2007).

Estudos têm demonstrado que alguns dos antioxidantes sintéticos normalmente usados na indústria de alimentos para inibição das reações de oxidação lipídica têm mostrado potencial carcinogênico em experimentos com animais. Nesse contexto as procuras por substâncias antioxidantes naturais tem aumentado nas últimas décadas, em especial os produtos naturais extraídos de plantas medicinais (Vieira et al., 2010) Antioxidantes naturais são compostos fenólicos existentes nas plantas e atuam protegendo-as contra injúrias em seus tecidos, são apontados como responsáveis pela maior capacidade antioxidante incluindo principalmente os ácidos fenólicos e flavonoides, que conferem defesa contra o ataque de radicais livres (Sucupira et al., 2012).

Entre diversos tipos de substâncias naturais os extratos de plantas aromáticas e de microrganismos recebem atenção especial quanto potenciais agentes para a conservação de

alimentos, aplicação em fármacos e cosméticos. A importância de realizar estudos sobre metabolitos secundários não reside apenas na caracterização química, mas também na possibilidade de ligar o produto químico a conteúdos com determinadas funções bioativas. Os extratos tem sido foco de diversas pesquisas em função de suas propriedades biológicas em especial atividade antioxidante. (Teixeira et al., 2012). De acordo com a literatura (Souza et al., 2007) estudos mostram que componentes não voláteis (extratos), estão sendo estudados quanto à avaliação do seu potencial antioxidante. Desta forma, este estudo teve por objetivo avaliar os fenólicos totais e a ação antioxidante de dois extratos obtidos do fungo *Penicillium purpurogenum*, isolado de ambiente marinho poluído, pelo método de sequestro do radical DPPH.

2. Metodologia

2.1. Área do estudo

A pesquisa foi realizada na Laguna da Jansen localizada no município de São Luís, Maranhão, Brasil e cujas coordenadas geográficas são: 2°29'56"S 44°17'59"W. Encontra-se na região noroeste, há 4,0 km de distância do Centro Histórico – Patrimônio Histórico da Humanidade. Próximo a ela estão localizadas as praias de maior fluxo de banhistas, a Ponta D'Areia, Ponta do Farol, Marcela e Calhau

2.2. Coleta do sedimento

Foram realizadas 4 coletas de maio a setembro de 2017 todas realizadas no período matutino. Cada ponto de coleta foi devidamente georreferenciado com o auxílio de um GPS sendo suas coordenadas: Norte (Coordenada geográfica: 2°30'13"S 44°17'53"O), Sul (Coordenada geográfica: 2°29'35"S 44°17'52"O), Leste (Coordenada geográfica: 2°29'37"S 44°18'10" O) e Oeste (Coordenada geográfica: 2° 29'35"S 44°17'52"O). Todos os procedimentos em campo seguiram Instituto Nacional de Biodiversidad; Museo Nacional de Costa Rica (2009) e Santos (2009).

As amostras foram obtidas de uma profundidade de até 73,5 cm, foram coletadas usando uma draga metálica e transferidas para recipientes de plástico. Em seguida, foram colocadas em bolsa plástica zipada e transportadas até o Laboratório de Micologia do NIBA/DEPAT/CCBS/UFMA, onde foram processadas.

2.3. Isolamento de fungos no sedimento de ambiente marinho poluído

Para todas as análises microbiológicas foram utilizadas as técnicas descritas no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods APHA (2005). As amostras chegaram no laboratório e foram coletadas em tubos Falcon estéreis de 50 mL e preservadas em uma caixa de gelo e processadas em 4 horas. Resumidamente, 1,0 g da amostra foram suspensos em 4,5 mL de água destilada estéril, homogeneizada por vórtice por 1 min, 1,0 mL desta suspensão foram transferidos para 9,0 mL de água destilada estéril realizando diluições seriadas até 10^{-5} . As diluições ficaram em repouso por 30 minutos e alíquotas de 100 μL foram espalhadas no meio ágar batata acrescido de 3% de sal, suplementado com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de polimicina B para inibir bactérias Gram negativas. As placas foram incubadas estufa a 28°C por sete dias. As colônias com características do fungo *P. purpurogenum* foram transferidas para uma nova placa de Petri do meio ágar batata acrescido de 3% de sal para purificação.

2.4. Identificação do fungo purificado

Após os sete dias de incubação a 28°C foram observadas as características macroscópicas como: textura e coloração do anverso e reverso de cada colônia. Para as características microscópicas utilizou-se a técnica de microcultivo segundo McNelly&Ridell (1950) modificado, seguindo os protocolos já existentes do Laboratório de Micologia (NIBA/DEPAT/CCBS/UFMA) (Bezerra et al., 2014a. Bezerra et al., 2014b; Bezerra et al., 2014c) para assegurar a visualização das estruturas de frutificação de cada fungo. Com este achado microscópico somado às observações macroscópicas e, também, auxílio de atlas, literatura especializada, chaves taxonômicas, chegou-se à taxonomia do fungo. No qual foi depositado na Coleção de Fungos da Universidade Federal do Maranhão.

2.5. Preparação dos extratos do fungo

A linhagem do fungo foi primeiramente inoculada em placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) com 3% e incubado a 28°C por 7 dias até completo crescimento. Após este período, círculos superficiais de ágar contendo o micélio foram transferidos das colônias, com o auxílio de uma seringa plástica, para um balão de fundo redondo contendo 250 mL do meio de cultura original líquido do fungo (caldo Sabourad 3% de sal), onde foram deixados

para fermentação por 28 dias a 28°C com agitação a 150 rpm em mesa agitadora. O caldo fermentado (3 L) foi filtrado e separado a o caldo da biomassa micelial.

O caldo obtido neste procedimento foi adicionado a Etanol PA na proporção 1:3 e permaneceu sob agitação constante a 115 rpm por um período de 24 horas, sendo filtrado e concentrado em evaporador rotatório a 45°C. Com o objetivo de obter um extrato de média/alta polaridade dos metabólitos produzidos pelo fungo, o extrato concentrado obtido foi adicionado de acetato de etila e particionado, após 24 horas, em funil de separação de líquidos, resultando na obtenção de uma fase orgânica (AcOEt) e uma fase aquosa. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica, após concentração em evaporador rotatório, foi liofilizada, originando o extrato de AcOEt (FR1).

A biomassa micelial do fungo, após total remoção do meio de cultura original líquido por filtração a vácuo, foi acondicionado em frasco reagente âmbar contendo 250 mL etanol 70% e mantido sob agitação constante a 115 rpm por 24 horas. O extrato obtido foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida até remoção total do etanol. À parte aquosa remanescente, foi adicionado acetato de etila na proporção 1:3, que após separação em funil de separação e eliminação do solvente em evaporador rotatório e liofilização, levou a obtenção do extrato de AcOEt (FR2).

2.6. Determinação de compostos fenólicos totais

A determinação de fenólicos totais dos extratos de fungos (FR1 e FR2) ocorreu através do método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse ,2012). Para a determinação da curva padrão de ácido tânico foi preparada uma solução de 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a qual originou cinco diferentes diluições (10, 25, 50, 75, 100, 125 μg ácido tânico mL^{-1}). Em seguida, foram misturados, em tubos de ensaio, 0,5 mL a cada solução diluída com 2,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) e 2 mL de solução de carbonato de sódio 4% (m/v). Sendo essa mistura protegida da luz e pós 30 minutos, foi medida leitura da absorbância em espectrofotômetro a 760 nm, utilizando cubeta de quartzo. As absorbâncias lidas foram representadas graficamente em função da concentração de ácido tânico, através da equação de regressão e respectivo coeficientes.

Na determinação do teor de fenólicos totais nas amostras, foram retirados 0,5 mL de cada amostra extrato na concentração de 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram adicionados a 2,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) e 2,0 mL de solução de carbonato de sódio 4% (m/v). A mistura permaneceu em repouso ao abrigo da luz por aproximadamente 30 minutos. As leituras das absorbâncias a 760 nm foram realizadas com cubeta de quartzo, em espectrofotômetro. O

equipamento foi aferido utilizando etanol PA. Os ensaios foram realizados em duplicata. Tendo em vista que foram adicionados 0,1 g de amostra em 50 mL de solvente, tem-se, em 0,5 mL de solvente utilizado nas análises, 0,001 g de amostra, que estavam presentes em 50 mL de solução. O teor de fenólicos totais foi calculado utilizando a equação de regressão obtida com a criação da curva do ácido tânico e com os valores de absorbâncias lidos na Equação 1, prosseguindo com o cálculo do valor médio das triplicatas.

$$FT = \frac{X_{FT}}{0,001} \quad (01)$$

Onde: FT = teor de fenólicos totais em mg EAT g⁻¹; X_{FT} = valor de “x” da equação de regressão obtida pela curva do ácido tânico;

2.7. Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH

Este ensaio baseia-se na capacidade de sequestradora do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) do meio de reação pela ação dos antioxidantes presentes na amostra, de acordo com a metodologia descrita por Brand-Willians&Berset (1995).

Uma alíquota (0,5mL) da amostra nas concentrações 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 e 225 µg mL⁻¹, foram misturadas com 2,5 mL de solução de DPPH na concentração de 40 µg mL⁻¹. Procedeu-se da mesma forma para preparação da solução denominada controle, porém substituindo-se 0,5 mL da amostra por etanol. Para solução denominada branco foi utilizado solvente etanol PA. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, o grau de descoloração do radical DPPH foi medido através da leitura da absorbância em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. As absorbâncias obtidas foram convertidas em porcentagem de atividade antioxidante (AA%) através da Equação 2 (Mensor et al, 2001).

$$AA\% = 100 - \{ [(Absa - Absb) \times 100] \div Absc \} \quad (01)$$

Onde: AA%: atividade antioxidante em porcentagem; Absa: absorbância da amostra (extratos FR1 e FR2); Absb: absorbância do branco; Absc: absorbância do controle.

A concentração eficiente ou CE₅₀ representa a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais DPPH. Construiu-se uma curva exponencial de primeira ordem plotando-se na abscissa as concentrações das amostras (extratos) e na ordenada a porcentagem de DPPH reduzido. Os extratos são considerados ativos quando apresentarem CE₅₀ < 500 µg mL⁻¹ (Campos et al, 2003). O índice de atividade antioxidante (IA) é apropriado para a

comparação da força antioxidante entre extratos, calculado usando a formula abaixo (Scherer&Godoy, 2009).

$$IA = \frac{\text{A concentração final do radical } (\mu\text{g mL}^{-1})}{CE_{50}(\mu\text{g mL}^{-1})} \quad (03)$$

De acordo com a Equação 3 temos uma pobre atividade antioxidante quando IA for $< 0,5$ ele possui uma moderada atividade antioxidante quando IA estiver entre 0,5 e 1,0, forte atividade quando IA estiver entre 1,0 e 2,0 e muito forte quando IA for $> 2,0$.

3. Resultados e Discussão

3.1. Fenólicos totais

Os teores de compostos fenólicos totais encontrados nos extratos extracelular (FR1) e intracelular (FR2) encontram-se na Tabela 1, os quais foram calculados através da equação de regressão $y = 0,006x + 0,006$, ($R^2 = 0,999$).

Tabela 1. Teores de fenólicos totais nos extratos extracelular e intracelular de fungo.

Extrato	Fenólicos totais (mg EAT.g-1)
FR1	791,00
FR2	650,82

Onde: EAT: equivalente ácido tânico. Fonte: Autores.

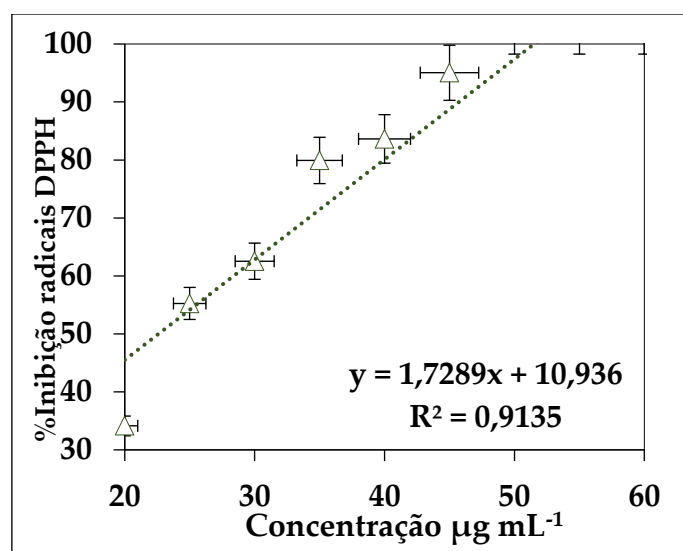
Os teores de fenólicos totais nos extrato do fungo variaram de 791,00 mg EAT g⁻¹ e para extrato extracelular 650,82 mg EAT g⁻¹ e para extrato intracelular como podemos observar na Tabela 2. A análise do teor de compostos fenólicos totais (FT) surge do interesse em determinar e quantificar os compostos bioativos presentes em extrato. Essa análise utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu que forma um complexo de coloração azul na presença de agentes redutores. No que diz respeito especificamente aos compostos fenólicos, pesquisas já reconhecem que essas substâncias são capazes de minimizar danos nas células e atuam como sequestradores de radicais livres e por isso, podem ser úteis para o tratamento de doenças degenerativas, doenças crônicas e cardiovasculares (Gazola, 2014).

A presença de compostos fenólicos em fungos demonstra uma ação redutora, que desempenha importante papel na adsorção ou neutralização de radicais livres. Assim como a presença destes podem estar diretamente relacionadas a atividades antimicrobianas e antioxidantes devido à facilidade em sequestrar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, por meio da sua configuração estrutural. Estes compostos são secretados por microrganismos como a literatura já descreve (Xu et al., 2018) e servem para manter o equilíbrio oxidativo, bem como protegendo a os microrganismos de mudanças bruscas que podem ocorrer no meio ambiente.

3.2. Atividade Antioxidante

Os resultados da atividade antioxidante do extrato FR1 determinado pelo teste DPPH, podem ser observados na Figura 1 onde estão apresentados os valores em porcentagem de atividade que foram obtidos a partir dos resultados das absorbâncias.

Figura 1. Curva percentual de inibição do radical versus a concentração do extrato FR1.



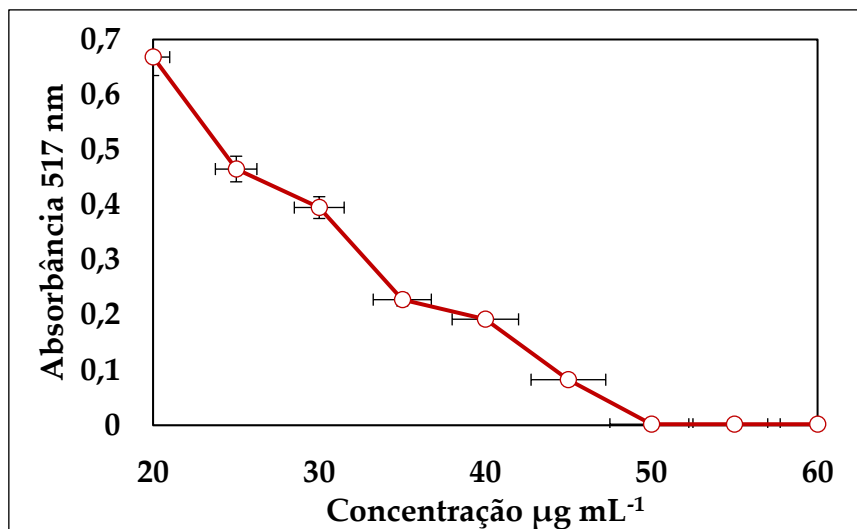
Fonte: Autores.

Em relação a Figura 1, a relação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração do extrato FR1 utilizado apresentou a equação da reta ($y = 1,7289x + 10,936$), com um $R^2=0,9135$ e os resultados demonstram que o percentual antioxidante aumenta proporcionalmente a concentração do extrato FR1, atingindo o valor de 103,43% de atividade antioxidante para a concentração de 60 µg mL⁻¹ fornecendo um CE₅₀ de 22,59 µg.mL⁻¹, que é a concentração de extrato necessária para atingir 50% de atividade antioxidante. De acordo com a Figura 1 o

extrato demonstrou possuir atividade antioxidante o que pode estar diretamente associada à presença e ao teor compostos fenólicos polares existentes.

Podemos observar ainda na Figura 2 que à medida que a concentração aumenta a absorvância diminui, porém, a concentração de $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ é o percentual máximo de atividade antioxidante porem verificamos que a partir da concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ verifica-se uma diminuição da absorvância mantendo a reação estável.

Figura 2. Curva de absorvância do extrato FR1 pelo método DPPH.

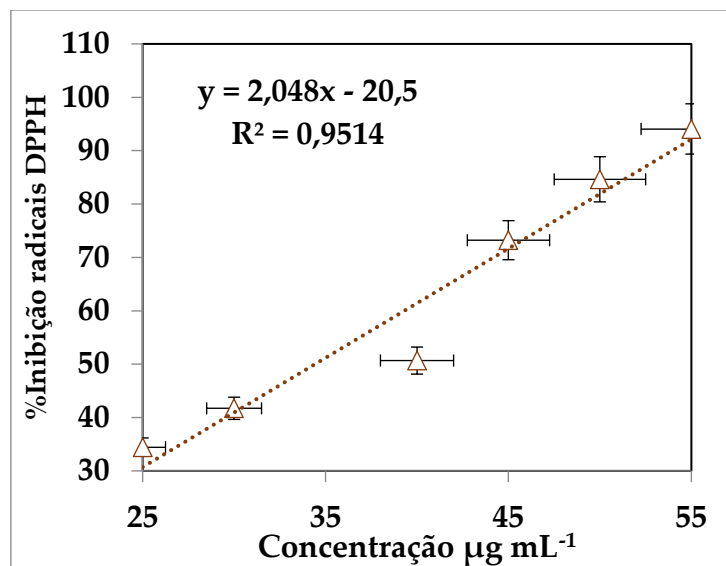


Fonte: Autores.

De acordo com a Figura 2 a atividade antioxidante aumenta com o aumento da concentração de extrato, podemos observar que na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ temos uma absorvância menor logo uma maior atividade antioxidante o que indica que se houver um aumento da concentração temos um aumento de dessa atividade.

O extrato FR2 apresentou atividade antioxidante, com percentual máximo de sequestro de radical DPPH de 96,14% na concentração de $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ como pode ser observado na Figura 3.

Figura 3. Curva percentual de inibição do radical versus a concentração do extrato FR2.



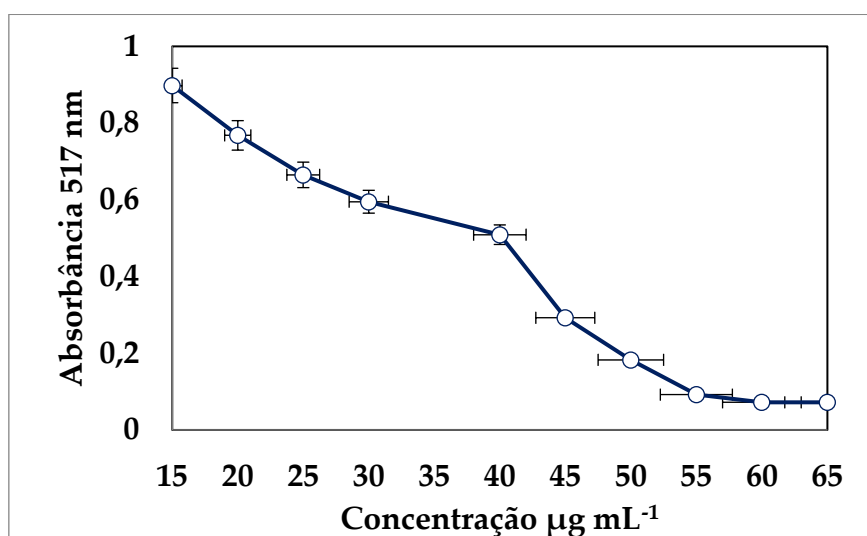
Fonte: Autores

Na Figura 3, à medida que a concentração aumenta a um aumento o radical tende a estabilidade. A porcentagem de atividade antioxidante indica qual é a capacidade da amostra em sequestrar o radical livre DPPH, sendo que a amostra que produzir um maior percentual de inibição é a mais eficiente.

A correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração do extrato etanoico (Figura 3) utilizado apresentou a equação da reta ($y = 2,048x - 20,5$), com um alta correlação dose-resposta ($R^2 = 0,9514$) fornecendo um CE_{50} de $39,80 \mu\text{g mL}^{-1}$. Segundo Campos et al (2003) que considera extrato ativo, ou seja, que possui capacidade sequestradora de radicais livres os que tem $CE_{50} < 500 \mu\text{g mL}^{-1}$, logo os extratos FR1 e FR2 são considerados ativos.

Podemos observar ainda na Figura 4 à medida que a concentração aumenta a absorvância diminui, atingindo a concentração de $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ do percentual máximo de atividade tornando estável a reação.

Figura 4. Curva de absorbância do extrato FR2 pelo método DPPH.



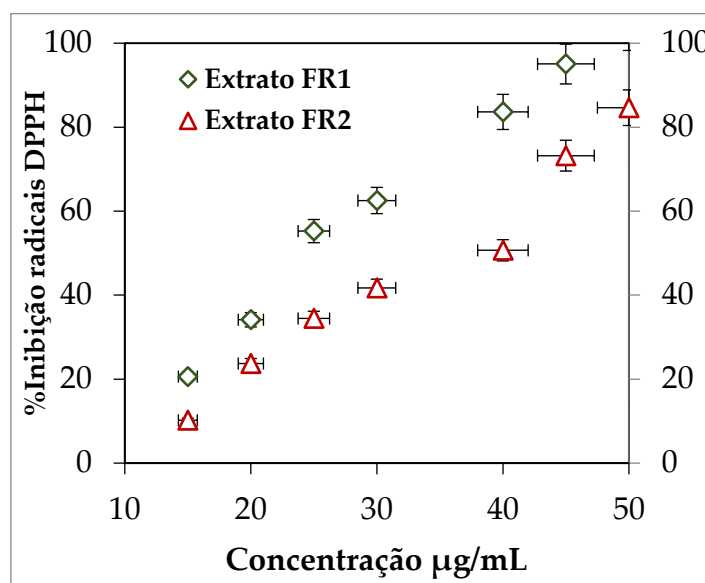
Fonte: Autores.

Como observado na Figura 4, a reação vai se estabilizando o que pode ser explicado pelo fato do radical livre DPPH possuir em sua estrutura um elétron desemparelhado, que faz com que ele seja muito reativo, agindo como um oxidante e retirando elétrons de compostos que possam estabilizá-lo. Por outro lado, moléculas que têm a capacidade de doar elétrons com maior facilidade (redutoras), reagem rapidamente com o DPPH, produzindo sua redução e promovendo sua estabilidade (Brito, 2014) o verificamos nos extratos FR1 e FR2 desempenhando um ótimo papel de doadores de elétrons.

A atividade antioxidante verificada nos extratos de fungo pode ser atribuída à presença de compostos fenólicos como foi observado na Tabela 1, que são moléculas reconhecidamente redutoras, pelo fato de apresentarem hidroxilas fenólicas em suas estruturas, podem doar hidrogênio com facilidade para os radicais livres e, dentre eles, o radical DPPH utilizado no experimento (Qaisar, et al., 2013).

Comparando os valores de atividade das amostras entre si (extratos FR1 e FR2) foi possível verificar que, para as concentrações testadas (20 a 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$), o extrato FR1 teve uma maior atividade, sendo que a o extrato FR2 obteve resultados próximos, como pode ser observado na Figura 5, sendo a atividade antioxidante ligada principalmente a presença de compostos com propriedades fenólicas.

Figura 5. Comparativo das curvas percentuais de inibição do radical versus a concentração do extrato FR1 e FR2.



Fonte: Autores

Os resultados obtidos ao determinar o teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu evidenciaram uma maior concentração dos polifenóis para o extrato FR1 assim como uma maior capacidade antioxidante quando comparados com o extrato FR2.

Podemos observar ainda que através da Figura 5 com as equações das retas obtidas, calculamos o CE_{50} , esses valores confirmam que entre os extratos que podem ser conferidos na Tabela 2, demonstram que o extrato FR1 apresentou o menor valor CE_{50} , conseqüentemente, maior atividade antioxidante em termos de sequestro do radical livre DPPH, corroborando com os resultados de compostos fenólicos totais.

Os valores de CE_{50} para os extratos FR1 possuem atividade melhor que o FR2 comparando com diferentes concentrações avaliadas, o que pode ser explicado pela presença de compostos fenólicos, flavonoides, triterpenos que são polares e doadores de elétrons, logo excelentes antioxidantes.

Na Tabela 2 também encontra-se expresso o índice de atividade antioxidante (IA) ele é utilizado para comparar força antioxidante entre extratos segundo Scherer e Godoy (2009), através desse índice eles determinam que a amostra possui: pobre atividade antioxidante quando IA for $< 0,5$ ele possui uma moderada atividade antioxidante quando IA estiver entre 0,5 e 1,0, forte atividade quando IA estiver entre 1,0 e 2,0 e muito forte quando IA for $> 2,0$.

Tabela 2. Concentração eficiente (CE₅₀) e índice da atividade antioxidante dos extratos.

Extrato	CE ₅₀	IA
FR1	22,59	2,65
FR2	39,80	1,38

Nota: IA = índice de atividade antioxidante; Fonte: Autores.

Através do IA podemos observar que o extrato FR1 apresenta-se com atividade antioxidante muito forte confirmando os resultados já encontrados nesta pesquisa, o extrato FR2 foi classificado como forte. O extrato FR2 com concentrações iguais a do FR1, atingiram valores maiores de absorbância e sua estabilização começou a ocorrer em concentrações mais elevadas comparados. Isso pode ser explicado pelo fato dos compostos com atividade presente nos extratos FR1 interagirem melhor com o radical livre DPPH. O extrato FR2 demonstrou interação com o radical DPPH numa reação mais lenta que pode ter ocorrido pelo baixo teor dos compostos fenólicos observado em concentrações menores. Em geral, após 30 minutos, a estabilidade da reação dos extratos com o radical livre DPPH foi estabelecida ou a taxa da reação diminuiu lentamente no caso de FR2.

4. Considerações Finais

Por fim, os resultados obtidos neste estudo nos teores de fenólicos totais para o extrato de *P. purpurogenum* variaram de 791,00 mg EAT.g⁻¹ para extrato FR1 e 650,82 mg EAT.g⁻¹ para o FR2. Podemos verificar que o EC₅₀ encontrados no extrato FR1 foi de 22,59 µg mL⁻¹ e FR2 39,80 µg mL⁻¹. Concluindo que o extrato FR2 apresentou forte atividade antioxidante enquanto que FR1 apresentou-se muito forte frente método do radical DPPH. Os resultados obtidos mostram o excelente potencial antioxidante advindo do extrato do fungo em estudo, sendo de interesse na aplicação para outras propriedades biológicas, baseado em seus resultados promissores.

Referências

Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *The Journal of antibiotics*, 65(8), 385-395.

Bezerra, G. F. D. B., de Almeida, F. C., Neto da Silva, M. A. C., Nascimento, A. C. B., Meireles Guerra, R. N., Viana, G. M. D. C., & Brandão Nascimento, M. D. D. S. (2014a). Respiratory allergy to airborne fungi in São Luís–MA: clinical aspects and levels of IgE in a structured asthma program. *Journal of Asthma*, *51*(10), 1028-1034.

Bezerra, G. F. D. B., Gomes, S. M., Silva, M. A. C. N. D., Santos, R. M. D., Muniz Filho, W. E., Viana, G. M. D. C., & Nascimento, M. D. D. S. B. (2014b). Diversity and dynamics of airborne fungi in São Luis, State of Maranhão, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *47*(1), 69-73.

Bezerra, G. F. B., da Silva, M. A. C. N., dos Santos, R. M., Haidar, D. M. C., Muniz Filho, W. E., Rosa, I. G., & Nascimento, M. D. D. S. B. (2014). Avaliação da resposta IgE para o entendimento do papel de fungos do ar na alergia respiratória em crianças. *Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia*, *2*(3), 119-124.

Brae, S., Endnas, A., Keck, J., & Nising, C. F. (2009). Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chem Rev*, *109*, 3903-3990.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, *28*(1), 25-30.

Brito, A., Ramirez, J. E., Areche, C., Sepúlveda, B., & Simirgiotis, M. J. (2014). HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. *Molecules*, *19*(11), 17400-17421.

Federation, W. E., & American Public Health Association. (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA*.

Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., Santos, T. C. D., Coube, C. S., & Leitão, S. G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy research*, *15*(2), 127-130.

Nett, M., Ikeda, H., & Moore, B. S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural product reports*, 26(11), 1362-1384.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*, 79(3), 629-661.

Qaisar, S., Bilal, R. M., Iqbal, W., Naureen, M., & Lee, S. (2013). Compressive sensing: From theory to applications, a survey. *Journal of Communications and networks*, 15(5), 443-456.

Rufino, M. D. S. M., Alves, R. E., de Brito, E. S., de Moraes, S. M., Sampaio, C. D. G., Pérez-Jimenez, J., & Saura-Calixto, F. D. (2007). Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.

Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food chemistry*, 112(3), 654-658.

Souza, T. J., Apel, M. A., Bordignon, S., Matzenbacher, N. I., Zuanazzi, J. Â. S., & Henriques, A. T. (2007). Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(3), 368-372.

Sucupira, N. R., da Silva, A. B., Pereira, G., & da Costa, J. N. (2012). Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. *Journal of Health Sciences*, 14(4).

Tang, M. C., Cui, X., He, X., Ding, Z., Zhu, T., Tang, Y., & Li, D. (2017). Late-stage terpene cyclization by an integral membrane cyclase in the biosynthesis of isoprenoid epoxyhexenone natural products. *Organic letters*, 19(19), 5376-5379.

Teixeira, M. L., Cardoso, M. G., Souza, P. E., Machado, S. M. F., Andrade, M. A., Gomes, M. S., & Andrade, J. (2012). Citrumelo Swingle: Caracterização química, atividade antioxidante e antifúngica dos óleos essenciais das cascas frescas e secas. *Magistra*, 24, 194-203.

Vieira, D. A., Santos, P. S., Haminiuk, C. W. I., & Plata-Oviedo, M. S. V. (2011). Evaluation of the antioxidant activity of the leaves of acerola, guabiroba and ora-pro-nobis. *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*.

Waterhouse, W. C. (2012). *Introduction to affine group schemes* (Vol. 66). Springer Science & Business Media.

Wong, J. H., Sze, S. C., Ng, T. B., Cheung, R. C. F., Tam, C., Zhang, K. Y., & Waye, M. M. Y. (2018). Apoptosis and anti-cancer drug discovery: the power of medicinal fungi and plants. *Current Medicinal Chemistry*, 25(40), 5613-5630.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Amanda Mara Teles – 12,5%

Gustavo Oliveira Everton– 12,5%

Adenilde Nascimento Mouchrek– 12,5%

Carla Junqueira Moragas Tellis– 12,5%

Geusa Felipa de Barros Bezerra– 12,5%

Fernando Almeida Souza– 12,5%

Ana Paula Silva de Azevedo-Santos– 12,5%

Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento – 12,5%