

Artigos Originais

PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Pleurotus ostreatus* (JACQ.FR.) KUMMER SOB INFLUÊNCIA DO EXTRATO AQUOSO DE *Ginkgo biloba* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

Damiana Maria Ferdinandi

Acadêmica do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá - CESUMAR; Bolsista pelo Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar - PROBIC. E-mail: damianaferdinandi@hotmail.com

Fábio Rogério Rosado

Coordenador do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá -CESUMAR. E-mail: fabiorosado@cesumar.br

RESUMO: Os cogumelos comestíveis e as plantas medicinais estão ganhando importância na atualidade pelos seus valores nutritivos e terapêuticos. O fungo Basidiomicete *Pleurotus ostreatus* é considerado de alta importância, porque, além da produção de exopolissacarídeos e biomassa, possui substâncias terapêuticas ativas. A planta medicinal *Ginkgo biloba* é oriunda da China e possui constituintes farmacológicos ativos presentes nas folhas, sementes e raízes que vêm sendo usados para a prevenção e tratamento de doenças. Foi avaliada a produção de biomassa de *Pleurotus ostreatus* em cultura submersa, o fungo foi inoculado em meio de cultura BD líquida em diferentes concentrações do extrato aquoso de *Ginkgo biloba*. Estes inóculos que contêm o fungo foram transferidos para erlenmeyers e submetidos à agitação a 150 rpm por 14 dias. Após determinação de biomassa, houve crescimento micelial e o extrato desta planta pode ser uma alternativa para estimular o crescimento do fungo e aplicá-lo na indústria Nutricêutica e em Processos Biotecnológicos.

PALAVRAS-CHAVE: Basidiomicetes; Biomassa; *Pleurotus ostreatus*.

PRODUCTION OF *Pleurotus ostreatus* (JACQ.FR.) KUMMER BIOMASS AFFECTED BY AQUEOUS EXTRACT OF *Ginkgo biloba* AT DIFFERENT CONCENTRATIONS

ABSTRACT: The importance of comestible mushrooms and medicinal herbs is currently on the increase owing to their nutrition and therapeutic properties. The basidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus* is highly important due to its active therapeutic compounds besides its production of exopolysaccharides and biomass. Hailing from China, the medicinal plant *Ginkgo biloba* has active pharmaceutical properties in leaves, seeds and roots which are used for the prevention and treatment of several diseases. Production of *Pleurotus ostreatus* products in a submerged culture has been evaluated. Fungus was inoculated in liquid BD medium at different concentrations of *Ginkgo biloba* aqueous extract. Inocula with fungus were transferred to Erlenmeyer flasks and stirred for 14 days at 150 rpm. Posterior to biomass determination, mycelial growth occurred and the plant extract may be an alternative to stimulate fungus growth. Its application in nutritional and biotechnological productions is highly appreciated.

KEY WORDS: Basidiomycetes; Bbiomassa; *Pleurotus ostreatus*.

INTRODUÇÃO

A importância dos cogumelos comestíveis está crescendo pelos avanços tecnológicos que melhoram sua qualidade, produtividade e custo de produção. (EIRA, 2004)

Na Antiguidade, os cogumelos comestíveis já eram usados como alimento de alto valor nutritivo e terapêutico. No entanto, na atualidade, estes cogumelos estão atraindo a atenção de pesquisadores pelas suas propriedades fitoterápicas (RODRIGUES et al., 2003).

Em aplicação medicinal, segundo Paccola-Souza e colaboradores (2004), o Basidiomicete *Lentinula edodes*, conhecido como *Shiitake*, contém atividades antimicrobiana, antitumoral, antiviral e anticolesterol.

Os *Pleurotus* possuem diversas atividades terapêuticas; estudos mostram grande capacidade de modular o sistema imunológico, atividade hipoglicêmica e antitrombótica; diminuem a pressão arterial e o colesterol sanguíneo; possuem ação antitumoral, antiinflamatória e antimicrobiana (WISBECK, 2003).

Segundo Dias e colaboradores (2003), o cogumelo *Pleurotus sajorajju* apresenta propriedades terapêuticas por serem úteis ao desenvolvimento de drogas antitumorais e apresentarem propriedades farmacêuticas. Então, essa espécie pode fazer com que as pessoas tenham o hábito de consumir cogumelos por serem saudáveis, saborosos e suaves.

O cogumelo *Pleurotus ostreatus*, comumente chamado de cogumelo ostra, *hiratake* ou *shimeji*, está distribuído pelo mundo todo, pertence à subdivisão dos Basidiomicetos e possuem alto valor nutricional (JOSE; JANARDAHANAN, 2000).

Quanto ao metabolismo, segundo Donini e colaboradores (2005), os fungos secretam exoenzimas no período de seu desenvolvimento degradando compostos para obtenção de carbono, nitrogênio, enxofre e outros nutrientes.

A utilização de diversos tipos de substratos, pelo fungo, depende da sua capacidade de secretar celulasas, hemicelulasas e lignases, liberando nutrientes para seu desenvolvimento (BUSWELL; CAI; CHANG, 1996 apud ROSSI; MONTEIRO; MACHADO, 2001).

Quando os fungos do gênero *Pleurotus*, são cultivados em meio líquido, têm a capacidade de produzir exopolissacarídeos (BURNS et al., 1994), além de sua biomassa fúngica que pode servir como inóculo para o cultivo de cogumelos em meio sólido (KAWAI et al., 1995). Também, a fermentação submersa tem vantagens, pois ocupa espaços reduzidos, diminui custos e chances de contaminação (RUBEL, 2006).

Em cultivo submerso de *Ganoderma lucidum* sob agitação, segundo Rubel (2006), o crescimento celular foi limitado e de aspecto particulado, mas a agitação do caldo de cultura incrementou a produção de EPS (exopolissacarídeos). Os autores Yang e Liau (1998) analisaram diferentes velocidades de rotação e relataram grau de agitação ótimo a 150 rpm, e a produção de exopolissacarídeos por *Ganoderma lucidum* foi máxima em cultivo submerso.

Segundo Kim e colaboradores (2003), a produção de exopolissacarídeos do fungo *Pecilomyces sinclairii* foi aumentada pelo alto nível de oxigênio dissolvido a uma alta taxa de aeração (3.5 v.v.m.) associada com alta densidade hifal. Um fator crítico, segundo estes autores, para a produção de biomassa micelial e EPS, foi a intensidade de agitação (250 ver. min⁻¹).

Portanto, a velocidade de agitação e aeração e incremento do meio de cultivo também são fatores importantes para a produção de biomassa e EPS.

Outro objeto de estudo são as plantas medicinais utilizadas com objetivos terapêuticos para várias doenças; estas plantas vêm sendo

usadas na cultura popular durante anos e, atualmente, é o interesse em estudos, porque algumas delas possuem constituintes farmacológicos importantes e saudáveis.

Destaca-se, então, a planta medicinal *Ginkgo biloba* pertencente à família *Ginkgoaceae* das mais antigas eras que em constituintes farmacológicos e anos e, atualmente, os cogumelos e *prev*, esta árvore robusta pode atingir 40 m de altura e é resistente a insetos e microrganismos que causam danos, assim como toxinas ambientais da civilização moderna (SCHULZ et al., 2002).

As ações desta planta se resumem a alguns benefícios como: vasorregulador, potencializador da cognição, aliviador de estresse e regulador de genes. Esta Gimnosperma possui dois componentes ativos principais: os flavonoides e terpenoides. Os flavonoides correspondem a 24% do EGB 761 que retiram os radicais livres, diminuem a viscosidade sanguínea e a fragilidade capilar; atuam no fator de relaxamento endotelial; têm propriedade antioxidante; provocam redução na rigidez dos eritrócitos e leucócitos; aumentam a biossíntese de prostaciclina. Os ginkgolídeos inibem o fator de agregação plaquetária (PAF) (NASSIS et al., 2001).

Atualmente, o grande interesse nessa planta está nos constituintes farmacológicos ativos presente nas folhas, sementes e raízes que vêm sendo utilizados para a cura de doenças simples, como asma e bronquite, e auxiliam no tratamento de Alzheimer.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de biomassa de *Pleurotus ostreatus* em cultura submersa, sob ação do extrato aquoso de *Ginkgo biloba*

2 METODOLOGIA

2.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foram folhas secas de *Ginkgo biloba* que foram adquiridas em estabelecimento comercial da cidade de Arapongas, Paraná.

2.2 INÓCULO

Os inóculos de *Pleurotus ostreatus* foram obtidos no Banco de Germoplasma do Cesumar - Centro Universitário de Maringá, em que a matriz desta linhagem foi inoculada em meio batata-dextrose-água (BDA) em placas de Petri e submetida a crescimento em estufa bacteriológica a 25°C.

2.3 PREPARO DE EXTRATO BRUTO DE GINKGO BILOBA

Para cada 100g de folhas secas de *Ginkgo biloba*, foram acrescentados 500 mL de água destilada em um balão volumétrico. Este conteúdo foi fervido por 30 min em uma manta térmica (Clevenger®) e depois foi filtrado em papel filtro, resultando 200 mL de extrato aquoso.

2.4 INÓCULOS DE *PLEUROTUS OSTRATUS* EM TUBOS DE ENSAIO CONTENDO DILUIÇÕES DE *GINKGO BILOBA*

Neste procedimento, obteve-se um total de 45 tubos de ensaio após três tratamentos.

O tratamento denominado "A" foi constituído de 15 tubos de ensaio e em cada um destes com um conteúdo de 5 mL de meio de cultura BD (dextrose-batata), acrescido de extrato aquoso de *Ginkgo*

biloba diluído a 10% (1000 µl do extrato bruto aquoso de *Ginkgo biloba* + de 9 mL de água destilada). Com o auxílio do pipetador automático, foram transferidos 500 µl desta diluição para os respectivos tubos de ensaio.

O tratamento "B" possuía 15 tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura BD, acrescido de extrato de *Ginkgo biloba* diluído (1000 µl da diluição do tratamento anterior +9 mL de água destilada). Com o pipetador automático, foram transferidos 500 µl para os respectivos tubos de ensaio.

O tratamento "C", denominado de "controle", possuía 15 tubos de ensaio com conteúdo de 5 mL de meio de cultura BD, sem extrato vegetal de *Ginkgo biloba*.

Todos os tubos de ensaio foram autoclavados a 121°C por 15 min.

Depois da esterilização, foi inoculado, em cada um dos tubos de ensaio, um disco de 9 mm do micélio fungo das placas de Petri, contendo o fungo *Pleurotus ostreatus*, previamente obtidas no Banco de Germoplasma. Todo este processo foi realizado em câmara de fluxo laminar a fim de diminuir a contaminação externa.

Os tubos inoculados foram armazenados em estufa bacteriológica a 25°C por 14 dias e foi observado o crescimento.

2.5 CULTIVO SUBMERSO EM ERLENMYERS SUBMETIDOS À AGITAÇÃO

Os tubos de ensaio que cresceram por 14 dias foram usados como inóculos para o cultivo submerso em erlenmyers (125 mL) por 14 dias, submetidos à agitação no Shaker ® a 150 rpm a temperatura de 37°C.

Foram usados 20 erlenmyers e foram obtidos três tratamentos; sete erlenmyers eram o tratamento "1"; sete para o tratamento "2" e seis erlenmyers para o "tratamento-controle".

Para o tratamento "1", cada erlenmyer continha 40 mL de meio de cultura BD com 5 mL de extrato aquoso bruto de *Ginkgo biloba* sem diluição.

Para o tratamento "2", cada erlenmyer apresentou conteúdo de 40 mL de BD com 5 mL de extrato aquoso de *Ginkgo biloba* diluído a 10%.

No tratamento-controle, cada erlenmyer apresentou conteúdo de 45 mL de BD.

Todos os erlenmyers foram autoclavados a 121°C por 15 min.

Em câmara de fluxo laminar, os conteúdos dos tubos de ensaio dos tratamentos "A", "B" e "controle" do procedimento anterior foram transferidos para erlenmyers, obedecendo à ordem: tubos de ensaio do tratamento "A" serviram de inóculo para o erlenmyers do tratamento "1"; tubos de ensaio do tratamento "B" serviram de inóculo para erlenmyers do tratamento "2". Tubos de ensaio do tratamento-controle serviram de inóculo para os erlenmyers do tratamento-controle.

Após este processo, os erlenmyers foram vedados com Parafilm e colocados no Shaker.

2.6. PRODUÇÃO DE BIOMASSA

Foi obtida uma média da quantidade de biomassa produzida após 14 dias de crescimento dos cultivos produzidos nos 20 erlenmyers. Para obtenção da biomassa, o conteúdo de cada frasco foi filtrado a vácuo com auxílio de papel filtro, que foi colocado sobre um funil de porcelana conectado à bomba a vácuo.

Os papéis filtro foram colocados na estufa a 40°C por 10 min para retirar qualquer umidade e para que esta não interferisse no peso seco do papel filtro. Em seguida, foram pesados em uma balança semi-analítica e depois os papéis foram dispostos no filtro de porcelana e procedeu-se à filtração. Os papéis, após a filtração, foram colocados na estufa de secagem e, no dia seguinte, foram submetidos à pesagem.

A diferença entre o peso inicial (peso do papel antes de filtrar) e o peso final (peso do papel após a filtração e posterior secagem) resulta no valor do peso seco da biomassa.

2.7. PARÂMETROS ESTATÍSTICOS

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente ao acaso. Cada tratamento foi repetido sete vezes e os dados foram submetidos à análise de Variância e as médias entre tratamentos comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise foi realizada com o auxílio do programa SISVAR da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento observado em erlenmyers sob agitação foi vigoroso no Tratamento 1 que continha extrato aquoso de *Ginkgo biloba* concentrado e inferior no controle que continha somente o caldo BD sem extrato vegetal.

Os resultados foram significativos, segundo o teste de Tukey, pois os dados que foram relacionados com o peso de biomassa fúngica indicam que houve estímulo no crescimento micelial nos tratamentos em que foram adicionados extrato de *Ginkgo biloba* sem diluição, ao passo que, no tratamento ao qual foi adicionado extrato aquoso de *Ginkgo biloba* diluído a 10%, houve crescimento, mas inferior ao Tratamento 1 (Tabela 1); (gráfico 1).

Tabela 1. Valores médios de Biomassa (g) de *Pleurotus ostreatus* cultivados em erlenmyers, contendo extrato aquoso de *Ginkgo biloba*, após 14 dias de crescimento.

Tratamentos	Biomassa (g)
Controle	0,05 c
Tratamento 1 com extrato de <i>G. biloba</i> sem diluição	0,142 a
Tratamento 2 com extrato de <i>G. biloba</i> diluído a 10%	0,078 b

* Médias seguidas de letras diferentes representam diferença estatística pelo Teste de Tukey a 5%

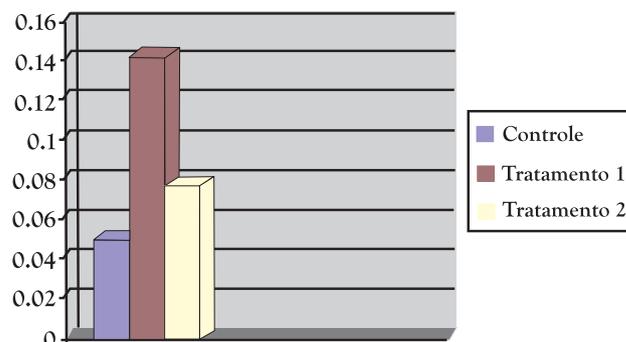


Figura 1. Valores médios de Biomassa (g) de *Pleurotus ostreatus* cultivados em erlenmyers contendo extrato aquoso de *Ginkgo biloba*, após 14 dias de crescimento

Este crescimento abundante pode ser pela adição de componentes presentes nas folhas da *G. biloba* que estimularam o metabolismo fúngico de *P. ostreatus*.

Segundo Murilho (2006), este crescimento é pelo enriquecimento do meio de cultivo, ao se adicionar extratos e, portanto, estas substâncias poderiam ser utilizadas como estimulantes para o desenvolvimento e na melhoria de produtos e processos Biotecnológicos envolvendo *Basidiomycetes*.

Como o meio de cultura BD (batata-dextrose) foi o meio pelo qual foi realizado todo o experimento, os fungos têm maior fonte de nutrientes e, em especial, dextrose (glicose). Os fungos de Gênero *Pleurotus* têm facilidade em se adaptar a diferentes substratos, convertendo-os em nutrientes para seu desenvolvimento, excretando componentes para o meio. Em experimentos conduzidos sob agitação, foi observado maior consumo de glicose (0,90 g/L) pelo fungo *Ganoderma lucidum* (RUBEL, 2006).

Donini e colaboradores (2005) concluíram que, nas linhagens de *Pleurotus* analisadas, foram encontradas médias maiores em todos os meios que foram adicionados à dextrose, mostrando sua importância no fator de crescimento.

Porém, a *Ginkgo biloba*, em meio BD, estimulou muito mais o crescimento por ter enriquecido este meio e por ter sido fonte de nutrientes, além da dextrose do meio de cultura onde os fungos estavam, provando que a *Ginkgo biloba* pode ser um importante estimulador de crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus*.

Além das propriedades farmacológicas desta planta, esta serve de substrato para o crescimento de fungos *Pleurotus* tornando-a uma alternativa para estimular o crescimento deste fungo e aplicá-lo na indústria nutricional.

REFERÊNCIAS

- BURNS, P. J. et al. Physiological studies of exopolysaccharides production from Basidiomycete *Pleurotus* sp. Florida **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, p. 566-572, 1994.
- DIAS, Eustáquio Souza et al. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, nov./dez. 2003.
- DONINI, L. P. et al. Desenvolvimento *IN VITRO* de *Pleurotus spp.* sob a influência de diferentes substratos e dextrose. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 331-338, jul./set. 2005.
- EIRA, Augusto Ferreira da. **Fungos comestíveis**. Caxias do Sul: Educs, 2004. p. 376-448.
- JOSE, Nayana; JANARDAHANAN, K. K. Antioxidant and antitumor activity of *Pleurotus florida*. **Current Science**, v. 79, n. 7, 2000.
- KAWAI, G. et al. Liquid culture induces early fruiting in Shiitake (*Lentinula edodes*). **Mushroom Science XVI**, p. 825-832, 1995.
- KIM, S. W. et al. Effect of aeration and agitation on the production of mycelial biomass and exopolysaccharides in an entomopathogenic fungus *Pacilomyces sinclairii*. **Letters in Applied Microbiology**, n. 36, p. 321-326, 2003.
- MURILHO, Josyane Mendes. **Efeito dos Extratos de Guaco (*Mikania glomerata* S.) e mil-folhas (*Achillea millefolium* L.) sobre o crescimento de *Pleurotus ostreatus* "florida" em cultura submersa**. 2006. Tese (Monografia de conclusão de curso de Ciências Biológicas) - Centro Universitário de Maringá, Maringá, 2006.
- NASSIS, Cristina de Zotti et al. *Ginkgo biloba*. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 58, n. 9, p. 690-696, 2001.
- PACCOLA-SOUZA et al. Antimutagenic action of *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* on *Aspergillus nidulans conidia*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 311-315, 2004.
- RODRIGUES, Suzimeire Baroni et al. Avaliação do potencial anti-mutagênico do Cogumelo do Sol (*Agaricus blazei*) no sistema *methG1* em *Aspergillus (= Emericella) nidulans*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 513-517, 2003.
- ROSSI, Ivan H.; MONTEIRO, Antonio C.; MACHADO, José O. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 36, n. 6, p. 887-891, jun. 2001.
- RUBEL, Rosália. **Produção de compostos bioativos de *Ganoderma Lucidum* por fermentação em estado sólido: avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica**. 2006. 172 f. Tese (Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- SCHULZ, Volker; HANSEL, Rudolf; TYLER, Vasro E. **Fitoterapia Racional**. 4. ed. Manole: São Paulo, 2002.
- WISBECK, Elizabeth. **Estudo do cultivo Submerso de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 para a Produção de Biomassa e de Exopolissacarídeos**. 2003. 196 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- YANG, F. C.; LIAU, C. B. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* submerged cultures. **Process Biochem.**, v. 33, n. 5, p. 547-553, 1998.