



## **Avaliação dos potenciais benefícios da ingestão do cogumelo *Agaricus blazei* para a microbiota endógena: análise de efeitos *in vivo* e *in vitro* sobre diferentes linhagens bacterianas.**

Evaluation of potential benefits of *Agaricus blazei* on endogenous microbiota: *in vivo* and *in vitro* effects in different bacterial strains

Wiliam César Bento Régis \*

Aline de Assis Rosa \*\*

Nathalia Cristina de Jesus Pereira \*\*\*

### **Resumo**

O *Agaricus blazei* é um basidiomiceto extensamente utilizado na alimentação humana por várias culturas, em virtude de suas propriedades, não apenas nutritivas, mas potencialmente medicinais. O presente trabalho objetivou analisar a atividade antimicrobiana *in vivo* e *in vitro* do cogumelo *Agaricus blazei*. As avaliações *in vivo* demonstraram a atividade antibacteriana do cogumelo, levando a uma redução significativa dos componentes microbianos encontrados nas fezes de ratos wistar. Os resultados *in vitro* também demonstraram que o cogumelo possui potencial antimicrobiano contra diferentes linhagens bacterianas de interesse médico. Contudo, apesar de seu amplo espectro de ação, não foram detectados efeitos sobre as principais linhagens da microbiota endógena. Esses achados demonstram a possível existência de uma ação seletiva a enteropatógenos, concomitante a um efeito protetor da microbiota endógena, que se constitui de extrema relevância para fortalecimento das barreiras contra infecções por agentes patogênicos. Isto sugere que o consumo do cogumelo seja promissor na profilaxia de afecções intestinais.

**Palavras chave:** *Agaricus blazei*. Atividade antimicrobiana. Microbiota endógena.

### **Abstract**

The *Agaricus blazei* is a mushroom widely used by various cultures mainly for medicinal purposes. This mushroom was traditionally used to treat many common diseases like atherosclerosis, hepatitis, hyperlipidemia, diabetes, dermatitis and cancer. The present study aimed to analyze *Agaricus blazei* antimicrobial activity. In order to evaluate *in vivo* activity of *Agaricus blazei* the fecal microbiota content of wistar rats was analyzed. In order to evaluate *Agaricus blazei* activity *in vitro* was analyzed the extracts effects against different bacteria's species of medical interest. The *in vivo* administration of mushroom leads to a significant reduction of microbial components when fecal contents (expressed in number of units formed colonies) are counted. However the number of anaerobic species was not affected like the aerobics species. The *in vitro* results also demonstrated that the mushroom has a good performance as bactericidal agent. However, despite its broad spectrum of action, no effect was observed against typical endogenous microbiota species. These findings suggest the possible existence of a selective action against enteropathogens and a concomitant effect of protection of endogenous microbiota. This could be useful for strengthening barriers against intestinal infection diseases'.

**Keywords:** *Agaricus blazei*. Antimicrobial. Endogenous microflora.

---

Artigo recebido em 08/11/2012. Aprovado em 10/12/2012

\* Professor Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Diretor de Pesquisa Desenvolvimento e sócio-diretor da Minasfungi do Brasil. Contato: wregis@pucminas.br

\*\* Especialista em Microbiologia pela Universidade Federal de Minas Gerais. Contato: alineassis5@yahoo.com.br

\*\*\* Graduada em Enfermagem pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Contato: nathaliacristinapereira@hotmail.com

## Introdução

O *Agaricus blazei* é um basidiomiceto, ou seja, um fungo pertencente ao filo *Basidiomycota*, à família *Agariaceae* e à ordem *Agariales*, nativo do Brasil e conhecido popularmente como cogumelo do sol, sendo extensamente utilizado na alimentação humana por várias culturas, em virtude de suas propriedades, não apenas nutritivas, mas potencialmente medicinais, que têm atraído o interesse de muitos pesquisadores (ELLERTSEN e HETLAND, 2009).

O *A.blazei* é composto por cerca de 90% de água, 2-4% de proteínas, 2-8% de gorduras, 1-55% de carboidratos e 3-32% de fibras. Constitui-se também de aminoácidos essenciais, importantes minerais e apresenta baixo teor calórico. Tem sido larga e freqüentemente utilizado na medicina popular, em virtude de suas inúmeras propriedades terapêuticas e a predominante inexistência de efeitos adversos decorrente de seu uso (FIRENZOULI, GORI, LOMBARDO, 2008).

Segundo Faccin *et al* (2007), o cogumelo é utilizado em casos de estresse psicológico e emocional, hipercolesterolemia, diabetes tipo II, através da redução da insulino-resistência verificada nessa patologia, distúrbios gástricos/digestivos e osteoporose, além de funcionar como agente anticancerígeno, antioxidante, imunomodulador e hipotensor.

Extratos provenientes de *A.blazei* também são ricos em polissacarídeos, como os  $\beta$ -glucans, os quais são presumivelmente responsáveis pela estimulação/modulação do sistema imune, através da indução da secreção de diversas citocinas, como IL-12, TNF-alfa e IFN-gama, bem como da ativação de neutrófilos, macrófagos, linfócitos, células NK e do sistema de complemento (HETLAND *et al*, 2008; ZHONG, TAI, YAMAMOTO, 2005).

Os fungos são organismos classificados como decompositores secundários. Logo, deparam-se em seu hábitat natural com inúmeros competidores e entre estes vários microorganismos. Dessa maneira pode-se esperar que existam inúmeras substâncias produzidas por estes fungos que possam atuar como potenciais antimicrobianos (ZHENG *et al*, 2010).

A produção de peptídeos antimicrobianos é uma característica universal do sistema de defesa não específico e está presente em uma grande variedade de seres vivos, como

bactérias, fungos, plantas e animais, cujas vias de indução são relativamente conservadas (HOFFMAN *et al*, 2000). Peptídeos não são as únicas moléculas de natureza antimicrobiana encontradas no reino *Fungi*. Sendo assim torna-se possível afirmar a possibilidade de que o basidiomiceto *Agaricus blazei* contenha princípios bioativos com potencial atividade antimicrobiana.

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho consistiu em promover uma avaliação da atividade antimicrobiana do *Agaricus blazei* em testes de antagonismo *in vitro* com diferentes cepas bacterianas, incluindo alguns enteropatógenos, bem como os efeitos da ingestão desse cogumelo na microbiota endógena por meio de experimentos *in vivo*.

## Metodologia

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Renal da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos sob um ciclo de claridade – escuridão sendo 12 horas de escuridão de 12 horas de claridade. Água e ração foram oferecidos ad libitum durante os sete dias do protocolo experimental *in vivo*. O preparo das amostras e análises *in vitro* foi realizado no Laboratório de Enzimologia e Físico-Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

**Preparação dos extratos de *Agaricus blazei*:** 1 g do cogumelo *Agaricus blazei* foi pesado e foram preparados 10 mL de solução final contendo 0 e 50% de etanol em tampão Tris 100mM pH 7,0. Após 1h de incubação a 25° C, os extratos foram centrifugados a 9000 rpm por 1 h em uma centrífuga SORVAL LC5C. Os extratos de metanol, etanol, propanol e butanol, após a centrifugação descrita acima, foram liofilizados por 18 h em um liofilizador LAB CONCO e resolubilizados em 1 mL de água.

- a. **Realização do teste de antagonismo *in vitro*:** bactérias reveladoras de referência foram inoculadas em meio líquido BHI e incubadas durante 24h a 37°C. Após incubação, 20 µl foram inoculados em 4 mL de Agar BHI semi-sólido. Placas contendo BHI sólido foram divididas em duas partes, identificadas como SA (Sem Álcool-0% Etanol) e CA (Com Álcool – 50%

Etanol). Foram aplicados 30 µl dos extratos em três aplicações de 10 µl. Após a secagem a placa foi coberta com o Agar BHI semi-sólido previamente inoculado com as bactérias reveladoras. As placas foram então incubadas por 24 h a 37 °C e procedeu-se a leitura da atividade inibitória.

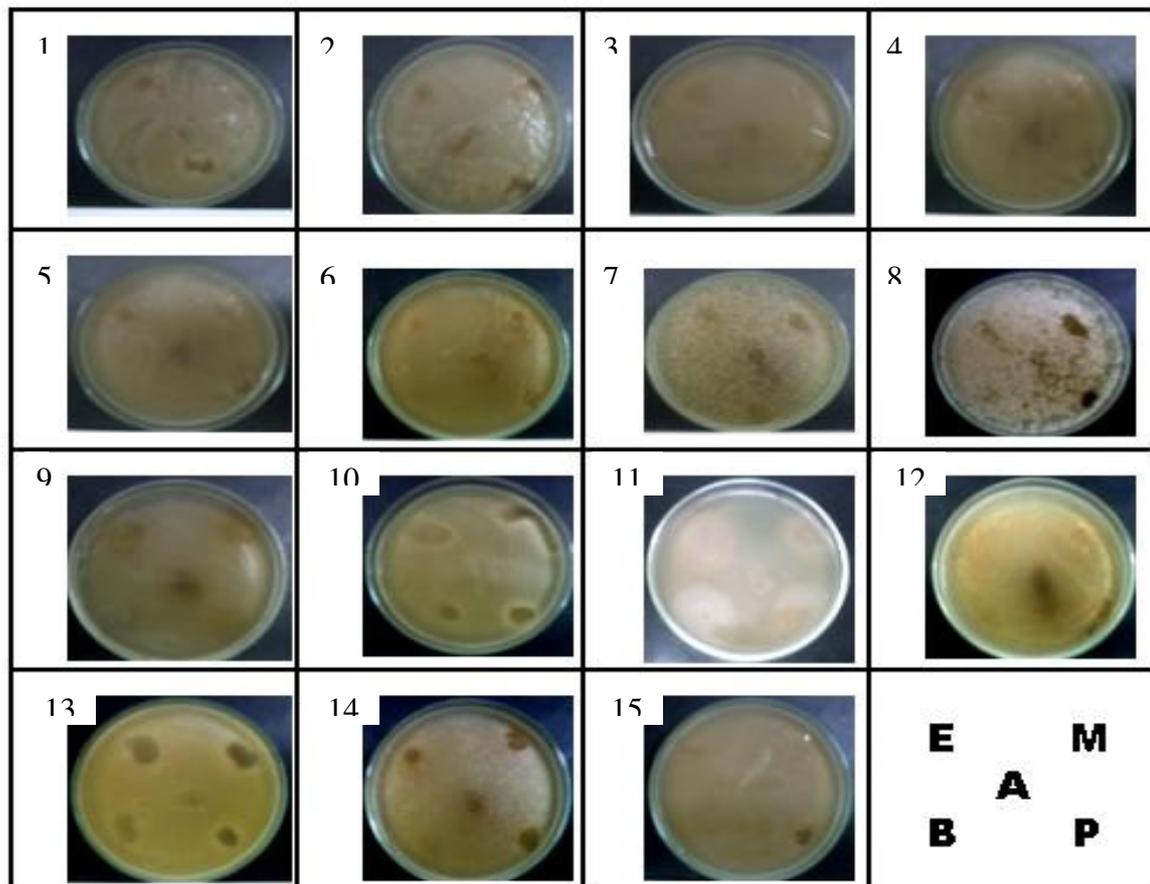
- b. Experimento *in vivo*:** foram utilizados quatorze ratos Wistar, saudáveis, machos procedentes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com peso variando entre 160 e 350 g. O protocolo com gentamicina foram realizados no Laboratório de Fisiologia Renal da UFMG e protocolados sob os aspectos éticos de pesquisa em animais da instituição. O experimento foi desenvolvido com quatro grupos distintos, incluindo o controle, que recebeu salina, e três grupos experimentais, que receberam chá de *Agaricus blazei*, Gentamicina e Gentamicina mais *Agaricus blazei*, com infusão de gavagem obedecendo-se 0,5% de volume de expansão em relação ao peso corporal. As fezes de todos os animais dos referidos grupos foram coletadas no primeiro, terceiro e sétimo dias do experimento. Para cada dia de coleta, foram realizadas três diluições seriadas das fezes de cada animal e subsequente plaqueamento dessas diluições nos meios seletivos McConkey, BHI e MRS. Em seguida, as placas foram incubadas a 37° C por 24 horas e, posteriormente, procedeu-se a contagem das colônias que cresceram em cada meio.

## Resultados e Discussão

### **Avaliação da atividade *in vitro* de diferentes extratos do cogumelo *Agaricus blazei*.**

Os extratos de *Agaricus blazei* apresentaram atividade antimicrobiana contra 12 das 15 linhagens testadas e os melhores halos de inibição foram obtidos no extrato utilizando-se o propanol na extração que foi capaz de inibir, em diferentes graus, a maioria das linhagens testadas. Contudo o extrato aquoso mostra-se mais apropriado para o consumo, sendo priorizado nos testes futuros.

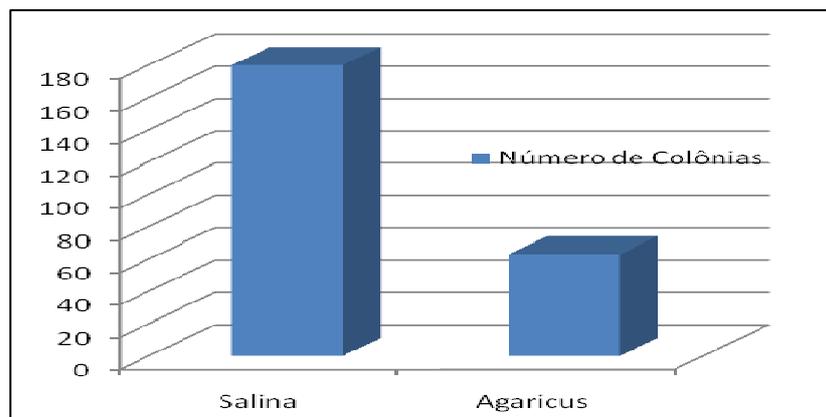
### Ensaio de atividade antimicrobiana *in vitro*



**Figura 01.** Ensaio de atividade antimicrobiana, no quarto experimento: Da esquerda para a direita, 1-*Salmonella choleraesuis*, 2-*Salmonella enteritidis*, 3-*Salmonella typhimurium*, 4-*Enterobacter aerogenes*(1), 5-*Enterobacter aerogenes*(2), 6-*Escherichia coli*, 7-*Shigella flexneri*, 8-*Bacillus cereus*, 9-*Listeria monocytogenes*, 10-*Micrococcus luteus*, 11-*Pseudomonas aeruginosa*, 12-*Klebsiella oxytoca*, 13-*Staphylococcus aureus*, 14-*Citrobacter freundii*, 15-*Proteus mirabilis*. Disposição dos extratos no experimento: A (extrato aquoso), M(metanol), E (etanol), P(propanol) e B(butanol). Extratos alcoólicos 50% (v/v) em Tris 0,617M, pH 6,8.

Fonte: Dados da pesquisa

**Efeito da adição de cogumelo *Agaricus blazei* na dieta sobre a população microbiana fecal de ratos wistar.**

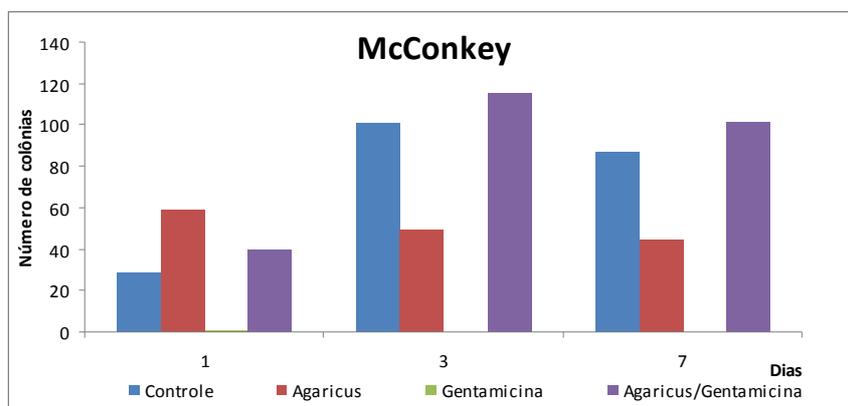


**Gráfico 01:** Avaliação da população bacteriana presente na microbiota fecal de ratos wistar. Grupo A (solução salina, via gavagem), Grupo B (*Agaricus blazei*, via gavagem). Média da contagem de colônias crescidas em meio BHI coletados em três diferentes dias do experimento (1º, 3º e 7º dia).

Fonte: Dados da pesquisa

A média de colônias detectadas nas fezes dos animais que receberam o cogumelo *A.blazei* foi cerca de 60 % inferior à detectada no grupo controle. Foram avaliados também parâmetros como a ingestão de alimentos e hídrica e não foi observada nenhuma alteração entre os dois grupos. No gráfico 01 estão apresentados apenas os dados para o meio inespecífico BHI. Como controle positivo deste modelo experimental foi utilizado um grupo que recebeu gentamicina (dado não mostrado) e que praticamente não apresentou contagem nas condições mostradas acima.

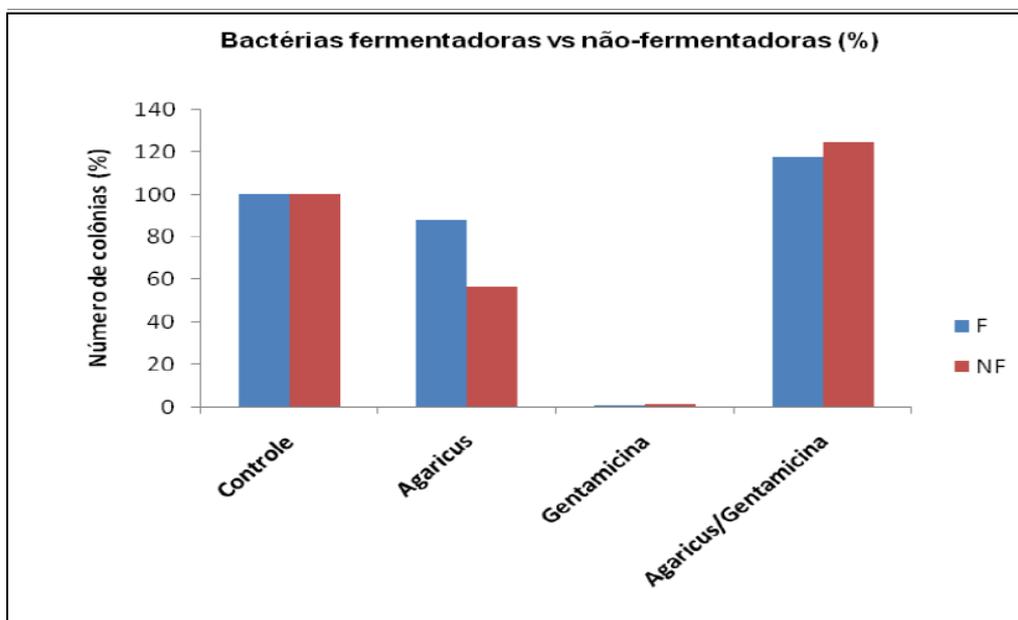
**Gráfico 02: Média de colônias expressas no meio seletivo e diferencial McConkey**



Fonte: Dados da pesquisa

À análise do gráfico 02, pode-se perceber a ocorrência de supressão de entetobactérias nos grupos Agaricus e Gentamicina. O grupo Agaricus produziu supressão tanto quando comparado ao controle (exceto no primeiro dia), quanto em relação a si mesmo ao longo do tempo. O grupo Gentamicina produziu supressão quase total desde o primeiro dia do experimento. O grupo Agaricus/Gentamicina, apresentou, paradoxalmente, progressivo aumento de colônias ao longo dos dias, o que pode indicar uma possível ocorrência de interação entre as moléculas de ambos os compostos, impedindo que exerçam sua função antimicrobiana. Curiosamente, esse efeito pode ser também seletivo para determinadas linhagens bacterianas (gráfico 03).

**Gráfico 03: Porcentagem de colônias fermentadoras e não fermentadoras em relação ao grupo controle.**



Fonte: Dados da pesquisa

Pôde-se observar maior supressão de bactérias incapazes de fermentar a lactose, em relação às fermentadoras, em todos os grupos de estudo, exceto no grupo Gentamicina, em que a supressão entre os dois grupos de bactérias foi similar, e no grupo Agaricus/Gentamicina, em que houve aumento do número de colônias dos dois grupos de bactérias, sugerindo que o *Agaricus blazei*, quando administrado isoladamente, possa, além de suprimir colônias não-fermentadoras, favorecer o

crescimento de bactérias fermentadoras, indicando uma possível atividade antimicrobiana preferencial sobre bactérias aeróbias.

Como os alimentos passam pelo processo digestivo, sofrendo diferentes ações e processamentos físico-químicos e enzimáticos, é de se esperar que compostos sejam ativados, mostrando assim atividade biológica relevante. O proposto nesse estudo foi a avaliação da ação antimicrobiana do *Agaricus blazei in vitro* e *in vivo*. As avaliações *in vivo* demonstraram a atividade antibacteriana do cogumelo, levando a uma redução significativa dos componentes microbianos fecais. Os resultados *in vitro* também demonstraram que o cogumelo possui potencial antimicrobiano. Contudo, apesar de seu amplo espectro de ação, não possui efeito sobre as principais linhagens da microbiota endógena. Esses achados demonstram a possível existência de uma ação seletiva a enteropatógenos, concomitante a um efeito protetor da microbiota endógena, que se constitui de extrema relevância para fortalecimento das barreiras contra infecções por agentes patogênicos, sugerindo que o consumo do cogumelo tem um potencial contra infecções intestinais .

O efeito profilático positivo do cogumelo também foi confirmado após ensaio *in vivo*, realizado por Bernardshaw *et al* (2005), que demonstraram redução da bacteremia e aumento do índice de sobrevivência de cobaias, quando extratos de *A.blazei* foram administrados oralmente vinte e quatro horas antes da injeção sistêmica de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo B.

## **Considerações Finais**

A análise das informações apresentadas permite confirmar o efeito antimicrobiano do *Agaricus blazei in vitro* e *in vivo*, demonstrando a necessidade de investimento em pesquisas que se destinem a isolar o princípio ativo, presente nesse basidiomiceto, responsável pela produção de atividade antibiótica.

Todavia, o desenvolvimento de novos estudos torna-se necessário, a fim de promover melhor quantificação e qualificação da supressão de enterobactérias causada pela administração do cogumelo em modelos animais.

Além disso, a criação de modelos experimentais distintos do utilizado contribuirão para elucidar a dinâmica de atuação do *Agaricus blazei in vivo*, bem como

de sua interação com outros compostos de relevância clínica, possibilitando o estabelecimento de critérios para otimizar os efeitos provenientes de seu consumo, estimulando a expansão de sua utilização na medicina alternativa.

## REFERÊNCIAS

BERNARDSHAW, S. *et al.* An Extract of the Mushroom *Agaricus blazei* MurriI Administered Orally Protects Against Systemic *Streptococcus pneumoniae* Infection in Mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, p.393-398, 2005.

ELLERTSEN, L.K; HETLAND, G. An Extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* MurriI can protect against allergy. **Clinical and Molecular Allergy**, vol 7 (6), 2009.

FACCIN, L.C. *et al.* Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p. 24-28, 2007.

FIRENZOULI, F; GORI, L.; LOMBARDO, G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* MurriI: review of literature and pharmaco-toxicological problems. **eCAM**, 5(1) p.3-15, 2008.

HETLAND, G. *et al.* Effects of the Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* MurriI on Immunity, Infection and Cancer. **Scandinavian Journal of Immunology**, 68, 363–370, 2008.

HOFFMANN, J. A.; KAFATOS, F. C.; JANEWAY, C. A.; EZEKOWITZ, R. A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, 284:1313-1318, 2000.

ZHENG, S. *et al.* Purification and characterization of an antibacterial protein from dried fruiting bodies of the wild mushroom *Clitocybe sinopica*. **ACTA Biochimica polonica**, v. 57, p.43-48, 2010.

ZHONG, M.; TAI, A.; YAMAMOTO, I. In vitro augmentation of Natural Killer activity and Interferon-gama production in murine spleen cells with *Agaricus blazei* fruiting body fractions. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 69 (12), 2466-2469, 2005.