



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

Jessica Maria Silva Sousa

**ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS AQUOSOS DE
COGUMELOS COMESTÍVEIS PRODUZIDOS NO BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos – UNICAMP – para a obtenção do
título de Mestre em Ciência de Alimentos

Prof.^a Dra. Helena Teixeira Godoy
ORIENTADORA

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por
Jessica Maria Silva Sousa, aprovada pela comissão julgadora em
___/___/___ e orientada pela Professora Dra. Helena Teixeira Godoy

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
LUCIANA P. MILLA – CRB8/8129- BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

So85a Sousa, Jessica Maria Silva
Análise de compostos fenólicos e avaliação da
atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos
aquosos de cogumelos comestíveis produzidos no Brasil /
Jessica Maria Silva Sousa. -- Campinas, SP: [s.n], 2012.

Orientador: Helena Teixeira Godoy.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Cogumelos. 2. Compostos fenólicos. 3. Atividade
antioxidante. 4. Atividade antimicrobiana. 5.
Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) I. Godoy,
Helena Teixeira. II. Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Analysis of phenolic compounds and evaluation of antioxidant
activity and antimicrobial activity of aqueous extracts of edible mushrooms
produced in Brazil

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Mushrooms

Phenolic compounds

Antioxidant activity

Antimicrobial activity

HPLC

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Helena Teixeira Godoy [Orientador]

Adriana Dillenburg Meinhart

Juliana Azevedo Lima Pallone

Severino Matias de Alencar

Stanislau Bogusz Junior

Data da defesa: 27/02/2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dra. Helena Teixeira Godoy

FEA – UNICAMP

Orientadora

Dra. Adriana Dillenburg Meinhart

FEA – UNICAMP

Membro

Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone

FEA - UNICAMP

Membro

Dr. Severino Matias de Alencar

FEA – ITAL

Membro

Dr. Stanislau Bogusz Junior

UFSJ

Membro

Dedico este trabalho
aos meus pais, Salete e Valder,
à minha irmã Larissa e ao meu namorado Jorge
pelo apoio durante toda essa etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, pelo acalento e pela certeza de sua presença em todos os momentos de minha vida, sobretudo nos mais difíceis.

Aos meus pais, Salete e Valder, por terem me dado a oportunidade de estar aqui e realizar este trabalho, pelos ensinamentos de toda uma vida e principalmente pelo amor infinito.

À minha irmã Larissa, pelas inúmeras conversas que me fizeram enxergar a vida de uma maneira diferente dando-me mais serenidade para enfrentar os momentos mais difíceis.

Ao Jorge, meu namorado, por sempre ter ficado ao meu lado, tornando os momentos mais difíceis menos penosos, fazendo-me rir, dando-me forças para terminar o que me propus a fazer e principalmente por todo o amor, carinho, compreensão e paciência gastos comigo.

À minha irmã Jessiane, à Nice, à minha prima, quase irmã, Thatiana pelo amor, carinho confiança e torcida para que no final desse tudo certo.

Ao Tio Valdir por toda ajuda quando cheguei à Campinas e por sempre me incentivar a seguir em frente e dar o meu melhor.

À minha orientadora, professora Helena, que me acolheu em seu laboratório com todo o carinho e atenção. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e principalmente pela amizade.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

À empresa ACM Cogumelos e em especial ao Sr. Paulo Tedrus que doou as amostras de cogumelos para a realização desta pesquisa e também pelas valiosas conversas a respeito dos cogumelos.

À banca examinadora pelas valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Sr. Dirceu e à Renata pelo profissionalismo e por toda ajuda prestada. O trabalho de vocês foi importantíssimo para realização deste projeto. Quero dizer, também, que conviver com vocês foi muito prazeroso e especial pra mim.

À Tayse pela ajuda no cromatógrafo, mas, sobretudo pela companhia em tantos momentos angustiantes, pelas conversas agradabilíssimas, pela amizade, pela paciência enfim por ter sido tão parceira minha em uma fase tão complicada.

À senhorita Polly por toda ajuda, por tantas dúvidas tiradas, pelas tantas conversas divertidíssimas que tivemos na salinha do cromatógrafo, pelas boas risadas que dei enquanto trabalhava, por me emprestar o ombro pra chorar quando eu pensava que nada mais ia dar certo, enfim pela amizade.

Ao Janclei e ao Cristiano pela PACIÊNCIA quando eu chegava perto com milhões de dúvidas. Sr. Janclei agradeço demais por sua amizade, por toda ajuda prestada e por todas as vezes que usou a frase: “- Caaaaalma menina, vai dar tudo certo!”. Crís muuuito obrigada, mesmo, por toda ajuda. Pude contar com você sempre que precisei.

Aos novatos do laboratório Wellington, Daniela e Elenice pelas agradáveis conversas e risadas que me proporcionaram nesse pouco tempo de convivência. Gostei muito de conhecer todos vocês.

Aos colegas de laboratório Milene e Vivian (Obrigada por toda ajuda com os antioxidantes), Marla, Dani Bio, Carlos, Selma, Larissa, Chico, Sabrina e Adriana por muitos momentos engraçados e divertidos por quais passei.

À Luciana Malta e Angélica por tudo que me ensinaram quando estava no Bioaromas. Muuuito Obrigada!

À Patrícia Sampaio pela amizade e torcida para que no final desse tudo certo.

À Silvana, Érica e Mirela pela amizade. Conviver com vocês em Campinas foi muito importante pra mim. Vocês foram responsáveis por momentos maravilhosos em minha vida.

Às minhas amigas Ádna, Marta, Giselle e Lara que, apesar da distância, muito me ajudaram com sua amizade, com seu carinho, com suas palavras de consolação em muitos momentos difíceis. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

“Só sei que nada sei, e o fato de saber isso, me coloca em vantagem sobre aqueles que acham
que sabem alguma coisa.”

(Sócrates)

Sê

“Se não puderes ser um pinheiro, no topo de uma colina,

Sê um arbusto no vale mas sê

O melhor arbusto à margem do regato.

Sê um ramo, se não puderes ser uma árvore.

Se não puderes ser um ramo, sê um pouco de relva

E dá alegria a algum caminho.

Se não puderes ser uma estrada,

Sê apenas uma senda,

Se não puderes ser o Sol, sê uma estrela.

Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...

Mas sê o melhor no que quer que sejas.”

(Pablo Neruda)

“É fazendo que se aprende a fazer aquilo que se deve aprender a fazer.”

(Aristóteles)

“Não supliques a extinção das dificuldades.

Procura meios de superá-las, assimilando-lhes as lições.

Nada existe sem razão de ser.

A Sabedoria do Senhor não deixa margem à inutilidade.”

(Emmanuel)

ÍNDICE

RESUMO GERAL.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVOS.....	9

REVISÃO DE LITERATURA

1. ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	12
2. COGUMELOS.....	13
2.1. Cultivo de Cogumelos.....	16
2.2. Panorama do Consumo e Produção de Cogumelos no Brasil.....	17
2.3. Importância Nutricional.....	18
2.4. Importância Funcional.....	19
3. COMPOSTOS FENÓLICOS.....	21
4. TÉCNICAS EMPREGADAS NA ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	25
5. ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES.....	26
6. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> ..	28
6.1. Atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila - DPPH [•]	30
6.2. Atividade sequestradora do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato) - ABTS ⁺	31
6.3. <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> – FRAP.....	32
6.4. <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> – ORAC.....	33
7. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	33
8. REFERÊNCIAS.....	35

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE EXTRATOS AQUOSOS DE COGUMELOS COMESTÍVEIS PRODUZIDOS NO BRASIL

RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	50
1. INTRODUÇÃO.....	52
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1. Amostras.....	53
2.2. Preparo dos extratos.....	54
2.3. Solventes e reagentes.....	54
2.4. Determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT).....	55
2.5. Atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila – DPPH.....	55
2.6. Atividade sequestradora do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato) - ABTS ⁺	56
2.7. <i>Ferric reducing antioxidant power</i> – FRAP.....	56
2.8. <i>Oxygen radical absorbance capacity</i> – ORAC.....	57
2.9. Análise estatística.....	58
2.10. Atividade antimicrobiana.....	58
<i>Microrganismos avaliados</i>	58
<i>Meios de cultura utilizados</i>	58
<i>Preparo do inoculo</i>	58
<i>Teste da concentração inibitória mínima (CIM)</i>	59
<i>Teste da concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM)</i>	59
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.1. Determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT).....	60
3.2. Atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila – DPPH.....	64
3.3. Atividade sequestradora do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato) - ABTS ⁺	69
3.4. <i>Ferric reducing antioxidant power</i> – FRAP.....	70

3.5. <i>Oxygen radical absorbance capacity</i> – ORAC.....	73
3.6. Correlação entre os teores de CFT, DPPH [•] , ABTS ^{•+} , FRAP e ORAC.....	75
3.7. Atividade Antimicrobiana.....	78
4. CONCLUSÃO.....	82
5. REFERÊNCIAS.....	83

ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM EXTRATOS AQUOSOS DE COGUMELOS COMESTÍVEIS PRODUZIDOS NO BRASIL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).

RESUMO.....	90
ABSTRACT.....	91
1. INTRODUÇÃO.....	92
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	93
2.1. Amostras.....	93
2.2. Preparo dos extratos.....	96
2.3. Reagentes.....	96
2.4. Instrumento.....	97
2.5. Condições cromatográficas.....	97
2.6. Parâmetros de desempenho analítico.....	97
2.7. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos.....	98
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	99
3.1. Parâmetros de desempenho analítico.....	99
3.2. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos.....	100
4. CONCLUSÃO.....	108
5. REFERÊNCIAS.....	108
6. ANEXOS.....	111
 CONCLUSÃO GERAL.....	 115
 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	 117

RESUMO GERAL

O aprofundamento do estudo relativo aos compostos naturais com propriedades antioxidantes e antimicrobianas em cogumelos torna-se extremamente relevante tendo em vista a possibilidade de esses compostos serem empregados nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos. No entanto, não foram encontrados relatos sobre o perfil fenólico de cogumelos comestíveis produzidos no Brasil assim como também não foram encontrados trabalhos que utilizassem quatro ensaios diferentes para avaliar o potencial antioxidante dos cogumelos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante e antimicrobiana de 4 espécies de cogumelos comestíveis (*A. bisporus*, *P. ostreatus*, *P. ostreatoroseus* e *L. edodes*) produzidas no Brasil. Os compostos fenólicos totais (CFT) foram determinados pelo método de Folin-Cioacaltea e a identificação e quantificação individual dos fenólicos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A atividade antioxidante foi avaliada por quatro métodos: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), ABTS⁺⁺ [2,2'-azino-bis(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato)], FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) e ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*). O potencial antimicrobiano dos extratos foi avaliado através da concentração mínima inibitória (CIM). Todos os resultados obtidos para as diferentes análises foram analisados levando em consideração o período de colheita, os diferentes processamentos, graus de maturação e substratos de cultivo. No ensaio com o radical DPPH[•] o cogumelo que apresentou maior atividade antioxidante foi o Champignon de Paris (fresco). Já no ensaio com o radical ABTS⁺⁺ e no ORAC os cogumelos que apresentaram maior ação antioxidante foram o Hiratake, o Shimeji (fresco), o Salmon e o Portobello. No ensaio FRAP o Portobello mostrou a maior atividade antioxidante. Os valores médios de CFT variaram entre 0,78 e 10,85 mg EAG/g de amostra liofilizada. Os cogumelos que apresentaram os maiores teores de CFT para o cultivo de verão e de inverno, respectivamente, foram o Hiratake com 10,09 mg EAG/g e 8,45 mg EAG/g, Salmon com 9,61 mg EAG/g e 9,45 mg EAG e Portobello com 9,07 mg EAG/g e 9,60 mg EAG. O processamento empregado ao cogumelo Champignon de Paris diminuiu consideravelmente o teor de CFT (de 7,04 mg EAG/g para 0,90 mg EAG/g - cultivo de verão) enquanto que no processo de secagem empregado ao cogumelo Shimeji não houve diminuição drástica no teor de CFT (de 8,83 mg EAG/g para 7,62 mg EAG/g - cultivo de

verão). O grau de maturação influenciou no teor final de CFT mostrando que o Shimeji, colhido em estágio imaturo, possui menor teor de CFT (8,83 mg EAG/g – cultivo de verão e 7,24 mg EAG/g – cultivo de inverno) em comparação ao Hiratake, colhido em estágio mais maturo. Correlações positivas entre os resultados de CFT e os métodos de atividade antioxidante foram encontradas, e essa correlação foi maior para o ensaio com o radical livre ABTS^{•+} e o ORAC ($r = 0,92$ e $r = 0,89$, respectivamente) do que para o ensaio FRAP ($r = 0,45$). Já entre o DPPH e os resultados de CFT foi encontrada baixa correlação negativa ($r = -0,14$). Dentre os compostos investigados por CLAE foram identificados e quantificados apenas os ácidos siríngico, *p*-cumárico e o trans-cinâmico, com predominância deste último. No ensaio antimicrobiano realizado verificou-se que o crescimento das leveduras *C. albicans*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. utilis* foi fortemente inibido pelos extratos aquosos dos cogumelos Shiitake (tora e composto), com CIMs variando entre 0,08 e 0,31 mg/mL. Estes resultados demonstram que os cogumelos comestíveis possuem grande potencial de utilização pela indústria farmacêutica e podem contribuir significativamente para uma boa condição de saúde devido à presença de antioxidantes.

Palavras-chaves: cogumelos, compostos fenólicos, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

ABSTRACT

The study of natural compounds with antioxidant and antimicrobial properties of mushrooms is extremely relevant to the use in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. However, no reports were found about the phenolic profile of edible mushrooms produced in Brazil as well as were not found papers describing the use four different tests to evaluate the antioxidant potential of mushrooms. Therefore, the aim of this study is evaluate the phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of four species of edible mushrooms (*A. bisporus*, *P. ostreatus*, *L. edodes* and *P. ostreatoroseus*) produced in Brazil. The total phenolic compounds (TPC) were determined by Folin-Cioacalteu and the individual identification and quantification of phenolic compounds was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant activity was evaluated by four methods: DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS^{•+} [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)], FRAP (Ferric Reducing antioxidant Power) and ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). The antimicrobial activity of extracts was evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC). All the results obtained for the different analyzes were analyzed taking into account the period of harvesting, different processing, maturation degrees and cultivation substrates. In the assay with DPPH, the mushroom with the highest antioxidant activity was *A. bisporus* white (fresh). In the assays with the radical ABTS^{•+} and ORAC, the mushrooms that showed the highest antioxidant activity were *P. ostreatus* (mature and fresh immature), *P. ostreatoroseus* and *A. bisporus* brown. In the FRAP assay the *A. bisporus* brown. showed the highest antioxidant activity. The average values of TPC ranged varied from 0.78 and 10.85 mg GAE/g lyophilized sample. The mushrooms with highest levels of TPC for the summer and winter cultivation, respectively, were *P. ostreatus* (mature) with 10.09 mg GAE/g and 8.45 mg GAE/g, *P. ostreatoroseus* with 9.61 mg GAE/g and 9, 45 mg GAE and *A. bisporus* brown with 9.07 mg GAE / g and 9.60 mg GAE. The processing used in the *A. bisporus* white has considerably reduced the content of TFC (from 7.04 mg GAE/g to 0.90 mg GAE/g - summer cultivation) while in the process of drying the mushroom used in the *P. ostreatus* (immature), no drastic decrease content of the TPC (from 8.83 mg of GAE/g to 7.62 mg GAE/g - summer cultivation). The maturation degree influenced the final content of the TPC showing *P. ostreatus*, harvested in an immature state, has a lower content of TPC (8.83 mg GAE/g - summer cultivation and 7.24 mg

GAE/g - winter cultivation) compared to *P. ostreatus*, collected in more mature stage. Positive correlations between the results of TPC and methods of antioxidant activity were founded, and this correlation was higher for the test with free radical ABTS^{•+} and ORAC ($r = 0.92$ and $r = 0.89$, respectively) than for the FRAP test ($r = 0.45$). Among the DPPH and the results of TFC was found low negative correlation ($r = -0.14$). Among the compounds investigated by HPLC were identified and quantified only the syringic, p-coumaric and trans-cinnamic acids, with predominance of the latter. In the assay antimicrobial it was found that the growth of yeasts *C. albicans*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. utilis* was strongly inhibited by aqueous extracts from the mushrooms *Lentinula edodes* (logs and compound), with MICs ranged varied from 0.08 to 0.31 mg / mL. These results demonstrate that edible mushrooms have great potential use by the pharmaceutical industry and can contribute significantly for a good health condition due to the presence of antioxidants.

INTRODUÇÃO GERAL

Ensaio clínicos e estudos epidemiológicos têm estabelecido uma correlação inversa entre dietas ricas em antioxidantes (compostos polifenólicos, vitaminas E e C e carotenóides) e a ocorrência de doenças como inflamações, problemas cardiovasculares, câncer e distúrbios relacionados ao envelhecimento (KAUR et al., 2001; ART et al., 2005; HUANG et al., 2005; SCALBERT et al., 2005 b; VITA, 2005; FINCO et al., 2009). Além disso, estima-se que aproximadamente 30 a 40% dos cânceres estão diretamente ligados à dieta inadequada e fatores relacionados tais como o modo de preparo dos alimentos e a presença de agentes cancerígenos em alguns alimentos (CZAPSKI, 2009).

Neste contexto, a indústria alimentícia vem apresentando grande quantidade de novos produtos à população, a qual, a cada ano, se mostra mais interessada na relação entre alimentação e saúde. Entre os alimentos que apresentam propriedades funcionais encontramos os cogumelos. O consumo destes, que tem sido parte da dieta humana por centenas de anos, principalmente pelas civilizações orientais, tem aumentado nos países ocidentais, inclusive no Brasil, envolvendo um número cada vez maior de espécies. Isto se deve a percepção de que os cogumelos possuem importantes atributos nutricionais e alto valor medicinal (MATTILA et al, 2001, MIYAJI & CÓLUS, 2001; FURLANI & GODOY, 2007). Além disso, seu cultivo possibilita reciclar economicamente diversos resíduos agrícolas e agroindustriais, sendo considerada uma atividade que não agride o meio ambiente (FAEMG, 2009).

A partir do trabalho realizado por Furlani e Godoy (2007) pode-se afirmar que o conteúdo de sólidos totais em cogumelos produzidos no Brasil está na faixa de 8 a 9,23%, o que confirma o alto teor de umidade dos produtos. Além disso, os cogumelos possuem como principal constituinte nutricional carboidratos apresentando um teor médio de 63,17%, em base seca. Em seguida destaca-se a proteína, com um valor médio de aproximadamente 23%, em base seca. Depois vem os lipídios com um teor médio de aproximadamente 5%, em base seca. Segundo Mattila et al. (2000) os cogumelos apresentam, ainda, teores significativos de vitaminas (tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, A e D₂) e minerais.

Além dessas características nutricionais os cogumelos influenciam em propriedades fisiológicas do corpo, como a biorregulação, manutenção da homeostasia, regulação do

biorrítmo, prevenção e melhora em doenças como câncer, derrame cerebral, doenças coronárias e produzem substâncias efetivas para a redução do colesterol e da pressão sanguínea, além de substâncias com ação antitrombótica e hipoglicêmica (ALETOR, 1995; WASSER & WEIS, 1999; MANZI & PIZZOFERRATO, 2000; MYAJI et al., 2006; SULLIVAN et al., 2006; LO & WASSER, 2011).

Nos últimos anos houve um aumento significativo na investigação das propriedades biológicas dos cogumelos, entre elas a atividade antioxidante e antimicrobiana. Na literatura são encontrados diversos trabalhos onde essas propriedades são atribuídas aos compostos fenólicos como podemos ver nos trabalhos de BAIS et al. (2002); PANIZZI et al. (2002); PUTTARAJU et al. (2006); ELMASTAS et al. (2007); KIM, et al. (2008); CONEAC et al. (2008); CHYE et al. (2008) e YALTIRAK et al. (2009).

Os estudos relacionados à atividade antioxidante são de grande importância frente ao estresse oxidativo que acarreta prejuízos às células como a oxidação de lipídios de membrana, proteínas, enzimas, carboidratos e DNA. Os radicais livres formados em excesso se acumulam e contribuem para a degeneração das células somáticas e indução de doenças crônico-degenerativas, especialmente associadas com o avanço da idade (HALLIWELL, 1994; FINKEL & HOLBROOK, 2000; LANGSETH, 2000; PIETTA, 2000; SCALBERT *et al.*, 2005 a; VALKON *et al.*, 2007). Embora a maioria dos organismos tenha sistemas de defesa antioxidante e reparo evoluídos para protegê-los, estes sistemas são insuficientes para impedir totalmente os danos provocados pelo estresse oxidativo (SIMIC, 1988), tornando necessária a ingestão de antioxidantes naturais pela dieta para que eles possam atuar em defesa dos organismos.

O estudo da atividade antimicrobiana também é muito importante devido à possibilidade de descoberta de novos agentes antimicrobianos uma vez que com o uso indiscriminado de antibióticos nos últimos anos surgiram cepas de microrganismos resistentes aos fármacos existentes no mercado. Na literatura é possível encontrar muitos trabalhos que relatam tais estudos com cogumelos (HIRASAWA et al., 1999; KITZBERGER, 2007; TURKOGLU et al., 2007; GOÉS, 2009; HEARST et al. 2009; OYETAYO, 2009; BENELLI, 2010).

Dessa forma, o aprofundamento do estudo relativo aos compostos naturais presentes em cogumelos comestíveis torna-se extremamente relevante tendo em vista a possibilidade destes compostos serem empregados nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de

cosméticos. No entanto, não foram encontrados relatos sobre o perfil fenólico de cogumelos comestíveis produzidos no Brasil assim como também não foram encontrados trabalhos que utilizassem quatro ensaios diferentes para avaliar o potencial antioxidante dos cogumelos. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante por quatro métodos distintos, quantificar o teor de compostos fenólicos totais e avaliar a atividade antimicrobiana de extratos aquosos de 4 espécies de cogumelos comestíveis (*A. bisporus*, *P. ostreatus*, *P. ostreatoroseus* e *L. edodes*) produzidos no Brasil levando em consideração os diferentes processamentos, grau de maturação e substrato de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALETOR, V. A., ALADETIMI, O. O. Compositional studies on edible tropical species of mushrooms. **Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 265-268, 1995.
- ART, I.C.W. & HOLLMAM, P.C.H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 317S-325S, 2005.
- BAIS, H. P., WALKER, T. S., STERMITZ, F. R., HUFBAUER, R. S. VIVANCO, J. M. Enantiomeric dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (±)-catechin; a rhizosecreted racemic mixture from *Centaurea maculosa* (spotted knapweed). **Plant Physiology**, v. 128, p. 1173-1177, 2002.
- BENELLI, P. Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em engenharia de alimentos do centro tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos, 2010.
- CHYE, F. Y., WONG, J. Y., LEE, J.-S. Nutritional Quality and Antioxidant Activity of Selected Edible Wild Mushrooms. **Food Science Technology Institute**. v. 14, n. 4, p. 375-384, 2008.
- CONEAC, G., GAFITANU, E., HĂDĂRUGĂ, D. I., HĂDĂRUGĂ, N. G., PÎNZARU, I. A., BANDUR, G., URSICA, L. PĂUNESCU, V., GRUIA, A. Flavonoid contents of própolis from the West side of Romania and correlation with the antioxidant activity. **Chemical Bulletin of "POLITEHNICA" University of Timisoara**, v. 53, p. 56-60, 2008.

- CZAPSKI, J. Cancer preventive properties of Cruciferous Vegetables. **Vegetable Crops Research Bulletin**, v. 70, p. 5-18, 2009.
- ELMASTAS, M., ISILDAK, O., TURKEKUL, I., TEMUR, N. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 337-345, 2007.
- FAEMG – Federação da Agricultura do Estado de Minas Gerais. **Orgânicos Cogumelos de Saúde – 2009**. Disponível em:
<http://www.faemg.org.br/News.aspx?Code=15114&ParentPath=News&ContentVersion=R> Acesso em 13 de Dezembro, 2011.
- FINCO, F. D. B. A., SILVA, I. G., RAMOS, F. Antioxidant activity and native fruits from Brazilian Savannah. **Free Radical Research**, v. 43, p. S27 -97, 2009.
- FINKEL, T. & HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 9, p. 239–247, 2000.
- FURLANI, R. P. Z. & GODOU, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 154-157, 2007.
- GÓES, V. F. F. Ação de extratos, óleos essenciais e frações isoladas de plantas medicinais sobre a formação do biofilme em *Candida spp.* Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção de grau de Doutor (a) em Biologia Buco-Dental, área de concentração em Microbiologia e Imunologia, 2009.
- HALLIWELL, B. Free radical and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.
- HEARST, R., NELSON, D., MCCOLLUM, G., MILLAR, B. C., MAEDA, Y., GOLDSMITH, C. E., ROONEY, P. J., LOUGHREY, A., RAO, J. R., MOORE, J. E. An examination of bacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 15, p. 5-7, 2009.
- HIRASAWA, M.; SHOUJI, N.; NETA, T.; FUKUSHIMA, K.; TAKADA, K., Three kinds of bacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom), **International Journal of Antimicrobial Agents**, n°11, p.151-157, 1999.

- HUANG, D., OU, B., PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.
- KAUR, C. & KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables- the millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36, p. 703-725, 2001.
- KIM, M-Y., SEGUIN, P., AHN, J-K., KIM, J-J., CHUN, S-C., KIM, E-H., SEO, S-H., KANG, E-Y., KIM, S-L., PARK, Y-J., RO, H-M., CHUNG, I-M. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7265-7270, 2008.
- KITZBERGER, C. S. G., J. SMÂNIA JR, A., PEDROSA, R. C., FERREIRA, S. R. S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 631-638, 2007.
- LANGSETH, L. **Antioxidants and their effects on health**. In: SCHMIDL, M. K., LABUZA, T. P. Essential of foods. Maryland: Aspen Publication, p. 303-317, 2000.
- LO, H. -C. & WASSER, S. P. Medicinal mushrooms for glycemic control in diabetes mellitus: History, current status, future perspectives, and unsolved problems (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 13, n. 5, p. 401-426, 2011
- MANZI, P. & PIZZOFERRATO, L. Beta-glucans in edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 68, p. 315-318, 2000.
- MATILA, P., KONKO, K., EUROLA, M., PIHLAVA, J. M., ASTOLA, J., VAHTERISTO, L., HIETANIEMI, V., KUMPULAINEN, J., VALTONEN, M. e PIIRONEN V. Contents of Vitamins, Mineral Elements, and Phenolic Compounds in Cultivated Mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n.5, p. 2343-2348, 2001.
- MATILA, P., SUONPÄÄ, K., & PIIRONEN, V. Functional properties of edible mushrooms. **Nutrition**, v.16, p. 694-696, 2000.
- MIYAJI, C. K. & CÔLUS, I. M. de S. Shiitake, um cogumelo mutagênico ou antimutagênico? **Semina: Ci. Biol. Saúde**, v. 22, p. 11-17, 2001.

- MIYAJI, C. K., POERSCH, A., RIBEIRO, L. R., EIRA, A. F., CÓLUS, J. M. Shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) extracts as a modulator of micronuclei induced in HEp-2 cells. **Toxicol in vitro**, v. 20, n. 8, p. 1555-1559, 2006.
- OYETAYO, V. O. Free radical scavenging and antimicrobial properties of extracts of wild mushrooms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 380-386, 2009.
- PANIZZI, L., CAPONI, C., CATALANO, S. CIONI, P. L., MORELLI, I. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 165-168, 2002.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.
- PUTTARAJU, N. G., VENKATESHAIAH, S. U., DHARMESH, S. M., URS, SHASHIREKHA, M. N., SOMASUNDARAM, R. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9764-9772, 2006.
- SCALBERT, A.; JOHNSON, I. T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 215S-217S, 2005 a.
- SCALBERT, A., MANACH, C., MORAND, C., RÉMÉSY, C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 287-306, 2005 b.
- SIMIC, M. G. Mechanisms of inhibition of free-radical processed in mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 202, p. 377-386, 1988.
- SULLIVAN, R., SMITH, J. E., ROWAN, N. J. Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice to Western medicine. **Perspectives in Biology and Medicine**. v. 49, n. 2, p. 159-170, 2006.
- TURKOGLU, A. DURU, M. E., MERCAN, N., KIVRAK, I., GEZER, K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. **Food Chemistry**, v. 101, p. 267-273, 2007.
- VALKON, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T. D., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

- VITA, J.A. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81 (suppl.), p. 292 S-297 S, 2005.
- WASSER, S.P. & WEIS, A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). **Internacional Journal Medicinal Mushrooms**, v.1, p. 31-62, 1999.
- YALTIRAK, T., ASLIM, B., OZTURK, S., ALLI, H. Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2052-2056, 2009.
- ZHANG Z., ELSOHL Y H.N., JACOB M.R., PASCO D.S., WALKER L.A., CLARK A.M. Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic proteases from *Tovomita krukovi*, **Planta Medica**, v. 68, p. 49-54, 2002.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Analisar a composição de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano de extratos aquosos de cogumelos comestíveis produzidos no Brasil.

Objetivos Específicos

Quantificar os compostos fenólicos totais através do método de Folin-Cicalteau.

Adaptar metodologia para análise de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em extratos aquosos de cogumelos comestíveis.

Determinar o potencial antioxidante *in vitro* dos extratos através de quatro métodos: DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP e ORAC.

Observar o efeito do substrato de cultivo (tora e composto), período de colheita (verão e inverno), grau de maturação e processamento (seco e conserva) dos cogumelos quanto aos fenólicos totais, composição individual de fenólicos e atividade antioxidante.

Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos contra as bactérias *Escherichia coli* ATCC 11775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388, *Bacillus subtilis* ATCC 5061, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida rugosa* CBS 12, *Candida tropicalis* CBS 94, *Candida glabrata* CBS 07 e *Candida utilis* CBS 5609.

REVISÃO DE LITERATURA

Jessica Maria Silva Sousa, Helena Teixeira Godoy

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP: 13083-862, Campinas, SP, Brasil

1. ALIMENTOS FUNCIONAIS

Alimento funcional é definido como qualquer alimento, natural ou preparado, que contenha uma ou mais substâncias, classificadas como nutrientes ou não nutrientes, capazes de atuar no metabolismo e na fisiologia humana, promovendo efeitos benéficos para a saúde, podendo retardar o estabelecimento de doenças crônico-degenerativas e melhorar a qualidade e a expectativa de vida das pessoas (SGARBIERI & PACHECO, 1999; PIMENTEL et al., 2005).

Os alimentos funcionais surgiram de uma necessidade, cada vez maior, de unir alimentação e saúde, tendo em vista uma população que envelhece com qualidade de vida. Dessa maneira, a baixa incidência de doenças em alguns povos chamou a atenção para a sua dieta. Os esquimós, com sua alimentação baseada em peixes e produtos do mar ricos em ácidos graxos poliinsaturados das famílias n-3 e n-6, têm baixo índice de problemas cardíacos, assim como os franceses, devido ao consumo de vinho tinto, o qual apresenta grande quantidade de compostos fenólicos. Os orientais devido ao consumo de soja, que contém fitoestrogênios, apresentam baixa incidência de câncer de mama. Nestes países, o costume de consumir frutas e verduras também resulta numa redução do risco de doenças coronarianas e de câncer, comprovada por dados epidemiológicos (ANJO, 2004).

Na década de 80 os japoneses iniciaram estudos com alimentos funcionais, relacionando a ingestão de alimentos de sua população com baixos índices epidemiológicos de câncer de mama, cólon e a alta longevidade. Em 1984, o Ministério da Educação Japonês criou um Departamento chamado “Análise Sistemática e Desenvolvimento das Funções dos Alimentos”, que financiou as pesquisas desta área. O país movimenta bilhões de dólares por ano com operações comerciais envolvendo alimentos funcionais. Dessa forma, pode-se dizer que os alimentos funcionais fazem parte de uma nova concepção lançada pelo Japão através de um programa de governo, que tinha como objetivo desenvolver alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava uma grande expectativa de vida (GOLDBERG, 1994; COLLI, 1998).

Neste contexto tem-se observado um crescente interesse da indústria de alimentos e profissionais da área de saúde pelos alimentos funcionais, assim como, devido à ampla divulgação pela imprensa em geral, da relação entre alimentação e saúde, a preocupação da sociedade ocidental com os alimentos tem aumentado de forma exponencial. Dessa

maneira, uma grande quantidade de novos produtos que supostamente proporcionam saúde tem sido apresentada pela indústria alimentícia diariamente (ANJO, 2004).

Existe uma ampla variedade de alimentos nutracêuticos ou funcionais e nas últimas décadas grande atenção tem sido dada aos cogumelos comestíveis. Vários estudos realizados por diversos pesquisadores em todo o mundo identificaram compostos bioativos em cogumelos e mostraram sua ação terapêutica contra muitas doenças. No entanto, apesar de os cogumelos compreenderem uma vasta fonte de compostos bioativos, são, ainda, pouco explorados (MIYAJI & CÓLUS, 2001; WASSER, 2002; LINDEQUIST et al., 2005; SULLIVAN et al., 2006; LO & WASSER, 2011; GUILLAMÓN et al. 2010).

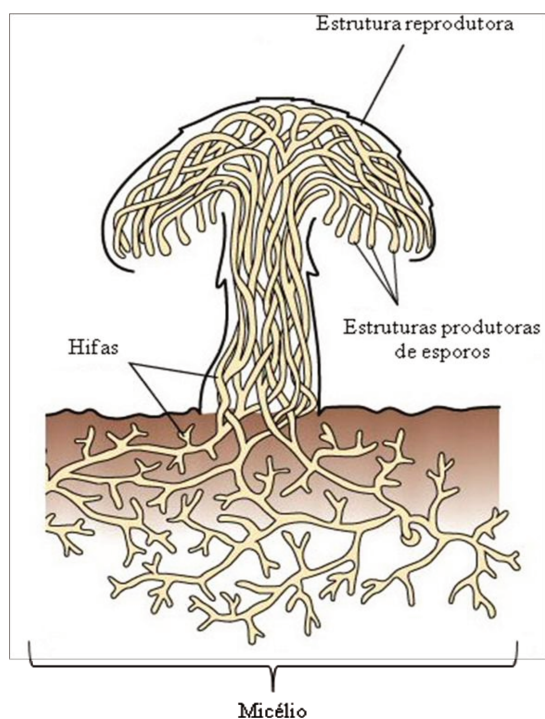
Na antiguidade eram feitas decocções em água quente de determinados cogumelos para obtenção de extratos que promoviam benefícios à saúde do corpo e da mente. Muitos destes extratos tornaram-se ingredientes importantes na medicina tradicional chinesa (SULLIVAN et al., 2006). Os efeitos da ingestão de cogumelos foram registrados no livro “*SHEN NUNG’S HERBAL*”, escrito há 2000 anos (AMAZONAS, 1999). De fato, os cogumelos têm sido descritos até hoje como alimentos terapêuticos, úteis na prevenção de doenças como hipertensão, hipercolesterolemia, câncer, na diminuição dos níveis de glicose no sangue e na prevenção ou redução das infecções causadas por bactérias, vírus, fungos, patógenos e parasitas (BREENE, 1990; MANZI et al., 2001).

2. COGUMELOS

Durante muito tempo os fungos foram considerados como vegetais, mas com o avanço das pesquisas e descobertas feitas a respeito de suas características foram agrupados em um reino próprio, o Reino Fungi. Os fungos possuem várias características que permitem sua diferenciação das plantas como: não realizar fotossíntese (não sintetizam clorofila) e obter matéria-prima para as funções vitais pela absorção da matéria orgânica dissolvida através de sua membrana plasmática. Além disso, os fungos possuem a parede das células composta principalmente por quitina (exceto alguns fungos aquáticos) e não armazenam amido como substância de reserva e sim o glicogênio (TORTORA et al., 2002; GUERREIRO, 2003).

Como todos os seres vivos, os fungos são constituídos de células, podendo ser unicelulares, quando formados por células isoladas, e pluricelulares, quando as células são

agrupadas em filamentos. Os filamentos dos fungos pluricelulares são denominados hifas (BONONI et al., 1999). As hifas podem ser simples ou ramificadas, septadas ou não e constituem o micélio dos fungos (URBEN, 2004). O micélio que se desenvolve no interior do substrato, funcionando também como elemento de sustentação e de absorção de nutrientes, é chamado de micélio vegetativo. O que se projeta na superfície e cresce acima do meio de cultivo é o micélio aéreo e este, quando se diferencia para sustentar seus órgãos de disseminação (corpos de frutificação ou propágulos), constitui o micélio reprodutivo (MOURA, 2008) (ver **Figura 1**).



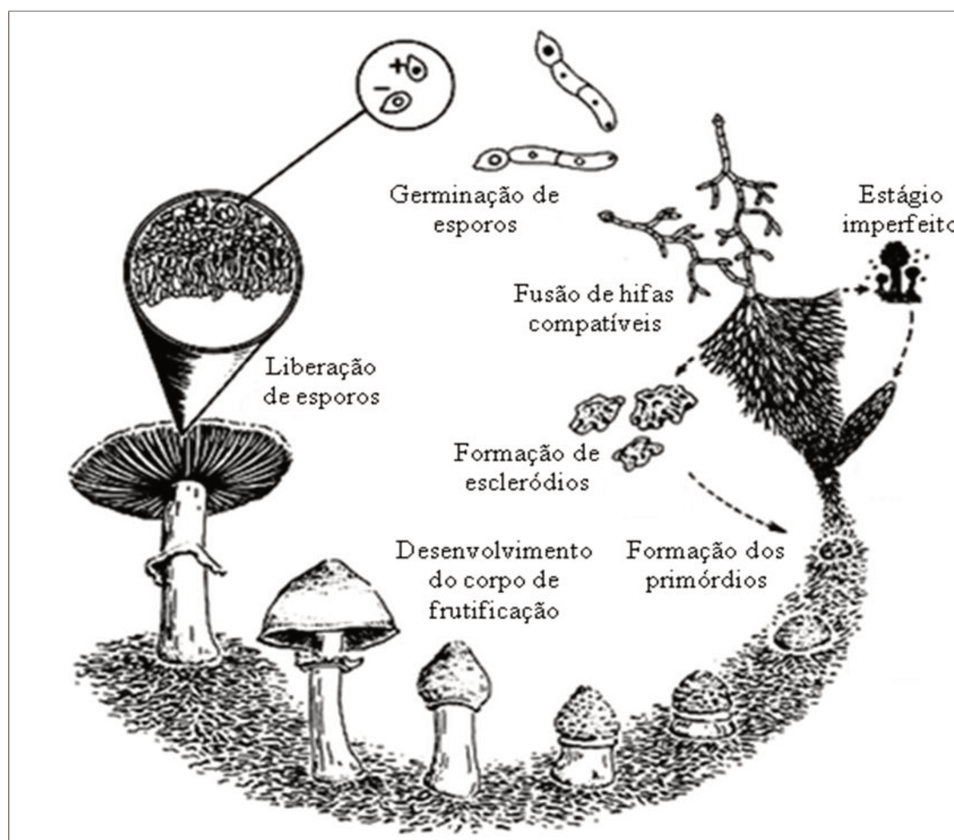
Fonte: CIENTIC (2012)

Figura 1. Constituição de um cogumelo

Os cogumelos são os corpos de frutificação de certos fungos e podem pertencer a dois grandes grupos: ascomicetos ou basidiomicetos. As estruturas carnudas estão presentes nos basidiomicetos mais que nos ascomicetos. O papel biológico do cogumelo para o fungo é a produção e disseminação dos esporos em número suficiente para assegurar a propagação da espécie em uma diversidade de condições ambientais (CHANG & MILES, 1989).

Na **Figura 2** podemos ver o ciclo de vida de um cogumelo, o qual é iniciado pelo encontro de duas hifas monocarióticas que se fundem e dão origem a um micélio secundário dicariótico, que se desenvolve até a formação do cogumelo. Nas lâminas,

estruturas que se localizam na superfície lamelar encontradas na parte inferior do chapéu dos cogumelos, são produzidos esporos que vão ser liberados para germinar e dar origem ao micélio primário (URBEN, 2004).



Fonte: RESUMOS (2012).

Figura 2. Ciclo de vida de um cogumelo.

A ordem fúngica Agaricales é uma das maiores e mais importantes pois apresenta o maior número de espécies comestíveis e também um grande número de espécies tóxicas e venenosas. Os Agaricales ocorrem em ampla variedade de habitats, que varia do Ártico aos Trópicos. Alguns produzem seus basidiocarpos no solo, sendo referidos como formas terrestres. Outros são formados em folhas mortas (foliícolas) ou em húmus (humícolas), em madeira (lignícolas), ou em fezes (coprófilos) e poucos crescem no basidiocarpo de outros macrofungos, sendo denominados fungícolas. Eles podem se desenvolver isoladamente, em grupos (acervados ou aglomerados); fasciculados; cespitosos ou em tufo e em círculos de fadas. Os vários habitats e substratos demonstram que a ordem Agaricales contém espécies parasitas, saprófitas e simbiotes. (URBEN, 2004).

Desde os tempos mais remotos, os cogumelos têm sido considerados como um tipo especial de alimento. Os gregos acreditavam que os cogumelos proviam força aos

guerreiros em batalha. Os faraós tinham os cogumelos como uma iguaria, e os romanos os consideravam como o "alimento dos deuses", sendo servido apenas em ocasiões festivas. Os chineses consideravam os cogumelos como uma comida saudável, o "elixir da vida". Os índios mexicanos usavam os cogumelos como alucinógenos em cerimônias religiosas e na feitiçaria, bem como para fins terapêuticos (CHANG & MILES, 1989).

Existem aproximadamente 45 mil espécies de cogumelos descritas na literatura. Destas, cerca de dois mil são conhecidas como comestíveis, mas somente pouco mais de 25 espécies são cultivadas e aceitas como alimento, das quais 10 espécies têm se tornado produto de larga comercialização (URBEN & SIQUEIRA, 2003).

2.1. Cultivo de Cogumelos

A primeira técnica utilizada pelos chineses para o cultivo de cogumelos consistia em encontrar troncos de árvores caídos pelas florestas e colocá-los próximo aos troncos frutificados que, por sua vez, eram expostos ao vento para capturar os esporos. Eventualmente, pedaços de cogumelos eram colocados dentro ou sobre os troncos (HERRERA, 2001). Na década de 60, o cultivo em toras com inoculação de sementes puras tornou-se muito utilizado. Anos depois, a serragem, o farelo de arroz e o farelo de trigo tornaram-se os principais substratos utilizados no cultivo de cogumelos. Já na década de 80, surgiu a técnica “Jun-Cao”, que utiliza gramíneas como substrato, unindo os benefícios sociais, ecológicos e econômicos e que, também, estabelece melhor equilíbrio ecológico entre plantas, fungos e animais uma vez que o substrato residual desta técnica pode ser usado como forragem protéica de alta qualidade podendo, assim, solucionar o problema de escassez de alimento para os animais (URBEN, 2004).

Os fungos produtores de corpos frutíferos comestíveis e medicinais são aptos para crescerem em uma grande variedade de resíduos agrícolas, sendo, portanto, imprescindível a seleção do substrato onde o micélio em questão desenvolva-se rapidamente e com vigor, visando maior produtividade do cogumelo (BUSWELL et al., 1996; SILVA et al., 2007; MOURA, 2008).

A escolha da tecnologia de cultivo e o preparo do substrato de cultivo dependem da espécie de cogumelo que se pretende cultivar, da disponibilidade e custo dos resíduos agroindustriais, além de outros insumos e matérias-primas (MOURA, 2008). Existe uma diversidade muito grande de compostos utilizados para o cultivo de cogumelos. Mas,

segundo Moura (2008) a formulação de um composto tem como regra geral a escolha de materiais volumosos e fibrosos, à base de palha, de capim ou outras plantas, geralmente muito ricos em carbono e pobres em nitrogênio e fósforo. Portanto, cada produtor de cogumelo ou grupo de produtores de uma mesma região escolhe um tipo de composto formado por produtos de fácil aquisição no local, em função da disponibilidade e custo do transporte (BONONI et al., 1999).

2.2. Panorama do Consumo e Produção de Cogumelos no Brasil

O cultivo de cogumelos vem crescendo devido a diversos fatores. Economicamente sua cultura permite a reciclagem de diversos resíduos agrícolas e agroindustriais. Sob o ponto de vista nutricional, devido ao alto valor protéico, o cultivo dos cogumelos tem sido apontado como uma alternativa para acrescentar a oferta de proteínas aos países com alto índice de desnutrição (CHANG & MILES, 1989). Além disso, a utilização de certas espécies, na forma de chá ou cápsula, como preventivo de algumas doenças (FURLANI, 2004) ou, ainda, pelo simples uso como um alimento funcional tem acelerado sua produção.

No entanto, o consumo no Brasil é, ainda, muito baixo uma vez que este produto possui um alto preço e o público consumidor encontra-se nas classes de maior poder aquisitivo. Em certos países o consumo de cogumelos pode chegar a uma média de 4 Kg/habitante/ano. Já no Brasil, o consumo ainda está distante de um potencial satisfatório, e é estimado em aproximadamente 70 g/habitante/ano (ROSA, 2007).

No Brasil, o alto valor de mercado dado aos cogumelos é justificado pela dificuldade de produção devido à tecnologia empregada, o pouco volume de produção que é consequência do uso de técnicas inadequadas e trabalhosas no cultivo e a importação de substratos para o cultivo de outras regiões. Segundo Eira (2000) a produtividade brasileira de *Agaricus bisporus* em Mogi das Cruzes, ainda é da ordem de 5 a 7 Kg de cogumelos frescos/100 g de substrato úmido (4 a 6 Kg de cogumelo fresco/m²). Na Europa, entretanto, em países como Holanda, Bélgica, Alemanha e França, a produtividade média desse cogumelo é de 30 Kg/100 g de substrato.

O maior obstáculo da produção da maioria das espécies no Brasil é o clima excessivamente quente na maior parte do ano, restringindo o aproveitamento da cultura ao uso de condições artificiais, em câmaras climatizadas, equipadas com ar condicionado. As exceções a este modelo existem como é o caso das espécies Shiitake e Cogumelo do Sol,

que, no Brasil, podem ser cultivadas sem a climatização artificial na maior parte do país (FAEMG, 2009).

Não existem estatísticas oficiais sobre a produção de cogumelos no Brasil. Mas, sabe-se que as áreas de produção estão concentradas no Estado de São Paulo, com destaque para a região de Mogi das Cruzes e nos estados como Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gerais e Rio de Janeiro. A região do Alto Tietê, em São Paulo, é a maior produtora nacional (FAEMG, 2004; NEVES & GRACIOLLI, 2008). Segundo FAEMG (2009) a produção brasileira deve girar em torno de 3 mil toneladas anuais ou 0,12% da produção mundial, sendo a maior parte de champignon. Já a produção mundial de cogumelos, no ano de 2007, foi de 4 milhões de toneladas com previsões de chegar a 18 milhões de toneladas por no ano de 2012 (SILVA & SANTANA, 2007).

Segundo Urban (2004) os cogumelos mais conhecidos no mundo são: o Reishi, Cogumelo do imperador ou Cogumelo Brilhante (*Ganoderma lucidium*), Cogumelo do Sol (*Agaricus blazei*), Shiitake (*Lentinula edodes*), Maitake (*Grifola frondosa*), Talo Veludo (*Flammulina velutipes*) e Tremella fusiformes. E no Brasil os cogumelos mais comercializados são: Champignon de Paris (*Agaricus bisporus*), Shiitake (*Lentinula edodes*), Shimeji, Cogumelo Ostra ou Hiratake (*Pleurotus ostreatus*) e Cogumelo do Sol, Cogumelo Princesa ou Cogumelo da Vida (*Agaricus blazei* ou *Agaricus brasiliensis*).

2.3. Importância Nutricional

Os cogumelos apresentam uma excelente composição nutricional que pode variar em função da espécie, da tecnologia e do composto utilizado no cultivo. No entanto, segundo Bado (1994) os cogumelos são, de um modo geral, constituídos de 90% de água, apresentam elevados teores em proteínas, vitaminas do complexo B (riboflavina, niacina e biotina), C, D e A (MATTLA *et al.*, 2000). São ricos em sais minerais (fósforo, potássio, cálcio, sódio e ferro) e fibras nutricionalmente valiosas de baixo valor calórico (30 cal/100 g de cogumelos desidratados).

Os cogumelos apresentam cerca de 3,5 a 4,0% em peso fresco e de 30 a 50% em peso seco de proteína. Possuem o dobro da proteína existente em alguns alimentos como o trigo e arroz, com exceção da soja e lentilha. Possuem todos os aminoácidos essenciais, os quais o organismo humano necessita para sua nutrição. Apresentam altas concentrações de isoleucina, leucina, lisina e histidina, que estão presentes na carne em baixos teores. O

percentual de metionina e cisteína, existentes nos cogumelos, são similares as proteínas dos vegetais (BADO, 1994). Segundo Novaes e Novaes (2005) comparando-se o teor protéico da carne bovina com algumas espécies *Agaricales*, observa-se que a carne bovina possui em torno de 14,8% de proteína em peso seco, ao passo que os fungos *Agaricales* apresentam 22,5%.

Os cogumelos apresentam uma baixa quantidade de lipídios, variando entre 1,1 e 8,3% em base seca (CHANG & MILES, 1989). A gordura bruta dos cogumelos é constituída por diversas classes de lipídeos, incluindo os ácidos graxos livres, mono, di e triglicerídeos, esteróis, terpenóides e fosfolipídeos, destacando-se a lecitina (NOVAES & NOVAES, 2005). Em geral, apresentam em sua composição baixo teor de ácidos graxos saturados e alta percentagem de insaturados, principalmente de ácidos graxos essenciais (URBEN, 2004).

Segundo FURLANI (2004) os carboidratos são os principais constituintes nutricionais dos cogumelos *Agaricus bisporus* (Champignon de Paris), *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Pleurotus ostreatus*. (Shimeji). No estudo realizado apresentaram um teor médio de 63,17%, em base seca. A parede celular dos fungos apresenta alta percentagem de carbono indicando uma riqueza em carboidratos (URBEN, 2004). Segundo Breene (1990) os carboidratos representam de 3 a 28% e as fibras de 3 a 32%, em base seca.

Estudos já identificaram e quantificaram vitaminas em diferentes cogumelos. No entanto, segundo Furlani (2004) os cogumelos não podem ser considerados fontes de vitaminas, mas, por outro lado, podem contribuir com o aporte das mesmas na dieta.

2.4. Importância Funcional

Somente nas últimas décadas os compostos bioativos, presentes nos diversos cogumelos existentes na natureza, sendo eles comestíveis ou não, medicinais, alucinógenos ou ainda venenosos, têm sido estudados de forma mais objetiva com relação às suas propriedades terapêuticas. Entre estas encontramos atividades: anti-hipertensiva, hipoglicêmica, antialérgica, antitumoral, antimicrobiana, antitrombocítica, hipocolesterômica, antiinflamatória e antioxidativa (ALETOR, 1995; WASSER & WEIS, 1999; MANZI & PIZZOFERRATO, 2000; URBEN, 2004; MYAJI et al., 2006; PUTTARAJU et al. (2006); SULLIVAN et al., 2006; ELMASTAS et al. (2007); YALTIRAK et al. (2009); LO & WASSER, 2011).

Os mecanismos de ação das substâncias bioativas presentes nos cogumelos ainda não estão completamente esclarecidos na literatura, mas evidências científicas sugerem que essas substâncias são capazes de modular a carcinogênese nos estágios de iniciação, promoção e progressão, promovendo benefícios aos portadores de diversos tipos de câncer, principalmente através da estimulação do sistema imunológico (FORTES & NOVAES, 2006).

Nos cogumelos os compostos bioativos mais estudados são os polissacarídeos. No entanto, outros grupos de compostos bioativos estão presentes como, por exemplo, os compostos fenólicos, terpenos, ácidos graxos poliinsaturados e fibras.

De grande relevância para a medicina moderna, os cogumelos representam uma boa fonte de polissacarídeos com propriedades antitumorais e imunoestimulantes. Além de atuarem como antivirais e antioxidantes. Muitos, se não todos, basidiomicetos possuem polissacarídeos biologicamente ativos em corpos de frutificação e micélio cultivado em caldo de cultura (WASSER, 2002; DA CUNHA & FEITOSA, 2009).

As fibras dietéticas estão contidas nos cogumelos em proporções que variam de 10 a 50% com base em peso seco e possuem ação física desfavorável na absorção de substâncias tóxicas, nocivas e carcinogênicas (NOVAES & NOVAES, 2005). Os efeitos do uso das fibras são a redução dos níveis de colesterol sanguíneo e diminuição dos riscos de desenvolvimento de câncer colorretal, decorrentes de três fatores: capacidade de retenção de substâncias tóxicas ingeridas ou produzidas no trato gastrointestinal durante processos digestivos; redução do tempo do trânsito intestinal, promovendo uma rápida eliminação do bolo fecal, com redução do tempo de contato do tecido intestinal com substâncias mutagênicas e carcinogênicas e formação de substâncias protetoras pela fermentação bacteriana dos compostos provenientes da dieta alimentar (ANJO, 2004; NOVAES & NOVAES, 2005).

Apesar dos cogumelos apresentarem quantidades reduzidas de gorduras totais, possuem alta porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), principalmente de ácidos graxos essenciais, e baixos teores de ácidos graxos saturados e colesterol (BORCHERS et al., 1999; URBEN, 2004). Os ácidos graxos poliinsaturados encontram-se relacionados com a prevenção de doenças cardiovasculares, através da redução dos níveis de triglicerídeos e colesterol sanguíneo, aumentando a fluidez sanguínea e reduzindo a pressão arterial (MACHADO & SANTIAGO, 2001).

Os terpenos são precursores de algumas vitaminas como A, K e E. Segundo Anjo (2004) encontram-se nos alimentos verdes, na soja e nos grãos existindo relatos da determinação de β -caroteno em cogumelos (ELMASTAS et al., 2007; CHYE et al., 2008). Os terpenos apresentam atividade antioxidante e interação com os radicais livres por divisão de sua extensa cadeia carbônica em membranas lipídicas. Alguns terpenos têm relação com a redução do risco de câncer, o que foi comprovado em estudos *in vivo* (ANJO, 2004).

Os compostos fenólicos parecem ser os principais componentes responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos das espécies de cogumelos (ELMASTAS et al., 2007; CHYE et al., 2008). A capacidade antioxidante de compostos fenólicos especialmente ácido gálico, catequina, ácido caféico, rutina, quercetina, ácido tânico e ácido protocatecúico, em muitos cogumelos é bem conhecida (YALTIRAK et al., 2009; KIM, et al., 2008; PUTTARAJU, et al., 2006). Os teores destes compostos podem estar relacionados às condições de estresse no crescimento dos cogumelos que poderiam estimular o metabolismo secundário (HELENO et al., 2010). Além de suas propriedades antioxidantes medidas principalmente pelas interações receptor-ligante também foram descritas ações antiproliferativas, de regulação do ciclo celular e de indução da apoptose celular (FARIA et al., 2006).

Outra propriedade que tem sido atribuída aos compostos fenólicos é a sua atividade antimicrobiana, no entanto, existem muitas divergências entre os resultados obtidos pelos pesquisadores. Por outro lado, pode-se afirmar que essas diferenças se devem a fatores como o uso de diferentes metodologias, microrganismos empregados, meios de cultivo, diferenças entre os extratos e diferenças nas concentrações do extrato investigado. Bais et al. (2002) e Shimamura et al. (2007) atribuem à catequina atividade antimicrobiana. No trabalho de Coneac et al. (2008) atribui-se essa atividade à rutina e ao ácido caféico. Da mesma forma, Akiyama et al. (2001) e Panizzi et al. (2002) atribuíram ao ácido gálico essa propriedade.

3. COMPOSTOS FENÓLICOS

Quimicamente os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um ou mais grupos hidroxila (OH) ligados a um anel aromático, podendo ter diferentes

grupos substituintes, como carboxilas, metoxilas, estruturas cíclicas não-aromáticas, entre outras (NYCHAS, 1995; LEE et al. 2005). É essa estrutura que confere aos compostos fenólicos o poder antioxidante. Destacam-se como fenólicos os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como alguns dos fenólicos mais comuns de fonte natural (ANGELO & JORGE, 2007).

Entre os seres vivos, apenas os vegetais e os microrganismos são capazes de sintetizar compostos fenólicos (SIQUEIRA et al. 1991). Eles são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (NACZK et al., 2004).

Os fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (BRAVO, 1998).

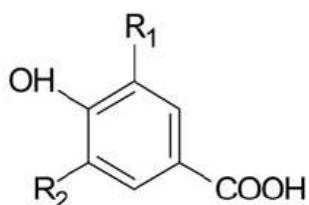
A diversidade estrutural dos compostos fenólicos deve-se à grande variedade de combinações que acontece na natureza e os compostos resultantes são chamados de polifenóis. Estas combinações fenólicas podem ser categorizadas em várias classes: fenólicos simples (C_6), benzoquinonas; ácidos hidroxibenzóicos (C_6-C_1); acetofenol, ácidos fenilacéticos (C_6-C_2); ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides (C_6-C_3); nafitoquinonas (C_6-C_4); xantonas ($C_6-C_1-C_6$); estilbenos, antoquinonas ($C_6-C_2-C_6$); flavonóides, isoflavonóides ($C_6-C_3-C_6$); lignanas, neolignanas (C_6-C_3)₂; biflavonóides ($C_6-C_3-C_6$)₂; ligninas (C_6-C_3)_n e taninos condensados ($C_6-C_3-C_6$)_n (ANGELO & JORGE, 2007).

Os compostos fenólicos possuem importantes propriedades biológicas e farmacológicas. A bioatividade destes compostos pode estar relacionada à sua capacidade de quelar metais, inibir lipoxigenase e sequestrar radicais livres e assim inibir os processos da oxidação em certos sistemas, mas isso não significa que eles possam proteger as células e os tecidos de todos os tipos de danos oxidativos. Esses compostos podem apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições (DECKER, 1997).

Os antioxidantes fenólicos interagem, preferencialmente, com o radical peroxil por ser este mais prevalente na etapa da autooxidação e por possuir menor energia do que outros radicais, fato que favorece a abstração do seu hidrogênio (DECKER, 1998). O radical fenoxil resultante, embora relativamente estável, pode interferir na reação de propagação ao reagir com um radical peroxil. O composto formado, por ação da luz ultravioleta e

temperaturas elevadas, poderá originar novos radicais, comprometendo a eficiência do antioxidante, que é determinada pelos grupos funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático, bem como, pelo tamanho da cadeia desses grupos (SHAHIDI, et al., 1992; JADHAV et al., 1995).

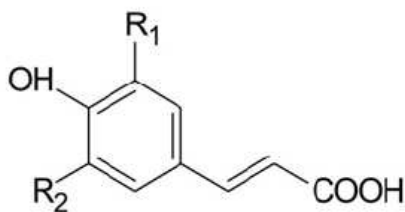
Os ácidos fenólicos são derivados dos ácidos hidroxibenzóico e do ácido hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos possuem sete átomos e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza que incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecúico, vanílico e sirínico. Já os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com três carbonos, sendo os ácidos caféico ferúlico e *p*-cumárico, os mais comuns (BRAVO, 1998; SOARES, 2002; BALASUNDRAM et al., 2006) (Figura 4 e 5).



Ácido *p*-hidroxibenzóico: R1 = R2 = H
 Ácido gálico: R1 = R2 = OH
 Ácido protocatecúico: R1 = OH, R2 = H
 Ácido vanílico: R1 = OCH3, R2 = H
 Ácido sirínico: R1 = R2 = OCH3

Fonte: ANGELO & JORGE (2007)

Figura 3. Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos



Ácido caféico: R1 = OH, R2 = H
 Ácido ferrúlico: R1 = OCH3, R2 = H
 Ácido *p*-cumárico: R1 = R2 = H

Fonte: ANGELO & JORGE (2007)

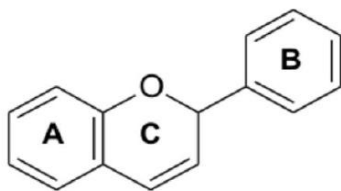
Figura 4. Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos.

Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob sua forma natural, podem também se ligar entre si ou com outros compostos. A combinação mais importante destes ácidos ocorre com o ácido caféico, o qual, associado a um álcool-ácido cíclico, denominado ácido quínico, origina o ácido clorogênico (SOARES, 2002).

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e dos seus ésteres depende do número de grupos hidroxilo existentes na molécula. A presença do grupo carboxilato, um aceptor

de densidade eletrônica por efeito mesomérico, confere aos derivados hidroxilados do ácido benzóico uma menor tendência para se comportarem como doadores de prótons, comparativamente aos derivados hidroxilados do ácido cinâmico (RICE-EVANS et al., 1996). Além disso, os derivados do ácido cinâmico possuem uma dupla ligação, que participa da estabilidade do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido benzóico não apresentam essa característica (WANASUNDARA et al., 1994).

O grupo dos flavonóides é formado, entre outros, pelas flavonas, flavanonas, flavanóis, catequinas e antocianinas. São compostos largamente distribuídos no reino vegetal, de baixo peso molecular constituídos de dois anéis benzênicos com pontes de três carbonos condensadas num oxigênio formando um anel intermediário (Figura 3) (GERMAN & DILLARD, 2000; RIBEIRO & SERAVALLI, 2004; ANGELO & JORGE, 2007).



Fonte: ANGELO & JORGE (2007)

Figura 5. Estrutura química base dos flavonóides.

Também podem ocorrer polímeros de fenólicos nos tecidos vegetais, este grupo compreende os taninos e as ligninas. Os taninos compreendem um grupo numeroso de produtos naturais, cuja estrutura complexa e variada não está bem esclarecida. Pelo menos dois tipos de estruturas são encontradas em taninos: estruturas condensadas não-hidrolisáveis formadas por produtos que contêm núcleos flavonoídicos e estruturas hidrolisáveis que contêm ésteres do ácido gálico ou seus derivados com açúcares (BOBBIO & BOBBIO, 1995). As ligninas são polímeros complexos de grande rigidez e resistência mecânica, e sua hidrólise alcalina libera uma grande variedade de derivados dos ácidos benzóicos e cinâmicos (SOARES, 2002).

4. TÉCNICAS EMPREGADAS NA ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A análise de compostos fenólicos é complicada, pois, além de englobarem uma gama enorme de substâncias, são, na maioria das vezes, muito reativos e susceptíveis à ação de enzimas. Além disso, a análise de fenólicos é influenciada pela natureza do composto, o método de extração utilizado, o tamanho das partículas da amostra, o tempo, as condições de estocagem e a presença de interferentes tais como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas (SHAHIDI & NACZK, 1995; KING & YOUNG, 1999).

Ainda não se desenvolveu um método satisfatório para a extração de todos ou de uma classe específica de fenólicos presentes nos alimentos. A extração dos fenólicos depende em grande parte da polaridade do solvente utilizado, do grau de polimerização dos fenólicos e suas interações com outros constituintes dos alimentos. Os solventes mais utilizados para a extração destes compostos são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Vários métodos espectrofotométricos para quantificação de compostos fenólicos em alimentos têm sido desenvolvidos. Esses métodos são baseados em diferentes princípios e são usados para quantificar fenólicos totais, determinar um composto específico ou uma classe de fenólicos (ANGELO & JORGE, 2007).

O método de Folin-Ciocalteu é bastante empregado na quantificação total de compostos fenólicos apesar de todas as interferências deste ensaio, uma vez que o método não é seletivo, pois o reagente (mistura de ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico) também reage com outros compostos não fenólicos como o ácido ascórbico, alguns açúcares, aminoácidos e Cu (I) levando a uma supervalorização do conteúdo de fenólicos (GEORGE et al., 2005; PRIOR et al., 2005). Dessa forma, o método deve ser utilizado apenas como um indicativo do teor de fenólicos presentes em uma amostra, servindo como uma triagem para análises posteriores de medição da atividade antioxidante. Além disso, por este método não é possível a identificação individual dos compostos na amostra. Neste ensaio o reagente, que possui coloração amarela (forma oxidada), reage com os compostos fenólicos, sob condições alcalinas, ocasionando a dissociação dos fenólicos com a formação de ânions fenolatos que, por sua vez, reduzem o reagente formando o complexo azul de molibdênio (forma reduzida) (GONÇALVES, 2008). O número de grupos hidroxilas ou de grupos potencialmente oxidáveis controla a quantidade de cor formada

(SHAHIDI & NACZK, 1995). Portanto, o método é baseado em uma reação colorimétrica, que pode ser avaliada por espectrofotometria à 760 nm, onde a intensidade da coloração da solução, contendo o reagente e o extrato que se quer analisar, permite a quantificação das substâncias redutoras.

Para a determinação de compostos fenólicos individualmente em diferentes matrizes são empregadas técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de ultra-eficiência (UPLC) e eletroforese capilar (EC). Para a determinação de compostos fenólicos em cogumelos a técnica por CLAE é a mais utilizada como pode ser conferido nos trabalhos de Puttaraju et al. (2006), Kim et al. (2008), Ribeiro et al. (2008), Yaltirak et al. (2009), Chen et al. (2010) entre outros.

A cromatografia acoplada a diferentes sistemas de detecção como a espectrofotometria, a fluorimetria e a espectrometria de massas, a qual fornece vantagens na confirmação de identidade dos compostos, tem se tornado imprescindível na elucidação dos mecanismos de interação entre os compostos fenólicos e desses com outras moléculas, como ácidos orgânicos, alcoóis e aldeídos (FACCO, 2006).

5. ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

O estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes e se dá quando ocorre uma produção descontrolada de radicais livres ou uma deficiência nos mecanismos de defesa, acarretando em prejuízos à célula, como a indução à oxidação de lipídios de membrana, proteínas, enzimas, carboidratos e DNA (HALLIWELL, 1994; FINKEL & HOLBROOK, 2000; LANGSETH, 2000; PIETTA, 2000; VALKON et al., 2007). O dano causado a esses componentes celulares se acumula, com o passar dos anos, e contribui para a degeneração de células somáticas e indução de doenças crônico-degenerativas, especialmente associadas com o avanço da idade, destacando-se câncer, aterosclerose, doenças inflamatórias, mal de Parkinson, Mal de Alzheimer e catarata (LANGSETH, 2000; SCALBERT et al., 2005).

Os radicais livres são moléculas ou átomos contendo um ou mais elétrons não-pareados em seu orbital, livres para se ligarem a qualquer outro elétron. O não emparelhamento de elétrons na última camada de valência torna esses átomos ou moléculas

altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativos, capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora de elétrons (MACHLIN & BENDICH, 1987; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os radicais livres podem ser gerados por fontes exógenas ou endógenas. As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem tabagismo, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (SOARES, 2002). Por fontes endógenas, originam-se de processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo, tais como: redução de flavinas e tióis; resultado da atividade de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases; presença de metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de elétrons. Esta geração de radicais livres envolve várias organelas celulares, como mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, núcleo, retículo endoplasmático e membranas (MACHLIN & BENDICH, 1987).

O termo coletivo Espécie Reativa de Oxigênio/Nitrogênio é usado para identificar radicais e alguns não radicais que se apresentam como agentes oxidantes e/ou que são facilmente convertidos em radicais (HALLIWELL, 1996). Tanto as espécies reativas de oxigênio (ERO) quanto as espécies reativas de nitrogênio (ERN) são produzidas para ajudar na manutenção da homeostase celular ou regulação de reações de redução e oxidação em tecidos saudáveis. Estas espécies têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar os agentes infecciosos, na formação de ATP através de ADP na mitocôndria, regulação do crescimento celular e produção de oxigenases (lipoxigenase e cicloxigenase) para formação de prostaglandinas e leucotrienos. Algumas espécies reativas biologicamente importantes são apresentadas na **Tabela 1**. Por outro lado, quando a produção desses radicais é exacerbada, tornam-se prejudiciais ao organismo que, por sua vez, dispõe de um sistema antioxidante que tenta controlar e restabelecer o equilíbrio (DEVASAGAYAM et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2007). No entanto, as defesas naturais são insuficientes para evitar todos os danos causados pelos radicais livres sendo relevante a ingestão de alimentos contendo fitoquímicos com capacidade antioxidante (FINCO et al., 2009).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: com atividade enzimática e sem atividade enzimática. Na primeira classe, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio

como, por exemplo, a superóxido dismutase, catalase, glutatona e peroxidase. Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Exemplos de antioxidantes não enzimáticos são: albumina, glutatona, ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, ácido úrico, bilirrubina e flavonóides (PRIOR & CAO, 1999; MOREIRA & MANCINI-FILHO, 2004; VASCONCELOS et al., 2007). A capacidade antioxidante no interior de uma célula é atribuída, principalmente, ao sistema enzimático de defesa, enquanto que no plasma a capacidade antioxidante é relacionada com moléculas de baixo peso molecular, algumas provenientes da dieta, como as vitaminas, os compostos fenólicos e os carotenóides e outras consideradas produtos de vias metabólicas, como urato e glutatona (FREI et al., 1989; GHISELLI et al., 2000).

De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes, podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando complexos que podem reagir com outro radical livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da autoxidação por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, seqüestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radicalares, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (ADEGOKE et al, 1998).

Várias fontes de antioxidantes naturais são conhecidas, entre elas encontramos os cogumelos, que segundo Ferreira et al., (2009) são ricos em compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides) e tocoferóis que reagem com radicais livres produzindo produtos intermediários relativamente estáveis.

6. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

A medida de capacidade antioxidante reflete a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes em um extrato ou amostra biológica proporcionando, desta forma, uma análise de parâmetros integrados. A capacidade antioxidante pode ser considerada um marcador sensível e confiável para detectar mudanças no estresse oxidativo *in vivo*, fornecendo ajuda na elucidação de fatores fisiológicos e nutricionais importantes para a

saúde, e ainda, suprimindo informações sobre absorção e biodisponibilidade de compostos antioxidantes (GHISELLI et al., 2000).

Tabela 1. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de interesse biológico

Espécies Reativas	Símbolo	Reatividade / Observações
Espécies reativas de oxigênio		
Ânion-radical superóxido	$O_2^{\bullet -}$	Gerado continuamente por diversos processos celulares (na mitocôndria, no microssomo, através de enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase).
Radical hidroxila	$\bullet OH$	É o mais reativo e mais lesivo radical conhecido e para o qual, uma vez formado, o organismo humano não dispõe de mecanismo de defesa.
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Formado em nosso corpo por grande número de reações e na presença de metal de transição forma $\bullet OH$
Radicais peroxila e alcóxila	$ROO\bullet$ $RO\bullet$	Reativo e formado a partir de lipídios, proteínas, DNA, açúcares etc. durante o dano oxidativo.
Hidroperóxido orgânico	$ROOH$	Reage com íons metálicos transitórios para produzir mais espécies reativas.
Oxigênio singleto	1O_2	Altamente reativo, formado durante a fotossensibilização e reações químicas.
Ozônio	O_3	Apresenta-se como um poluente atmosférico podendo reagir com várias moléculas e formar 1O_2 . É extremamente danoso ao pulmão, oxidando rapidamente proteínas, DNA e lipídeos.
Espécies reativas de Nitrogênio		
Óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio	$NO\bullet$	Sintetizado nos organismos vivos pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Radical abundante que age em uma variedade de processos biológicos, incluindo relaxação muscular, neurotransmissão e regulação imune. Pode render oxidantes potentes durante estados patológicos. Quando exposto ao ar, reage com o oxigênio para formar $NO_2^{\bullet}$ que reage rapidamente com $O_2^{\bullet -}$ e produz o intermediário $ONOO^{\bullet}$.
Peroxinitrito	$ONOO^{\bullet}$	Altamente reativo, formado a partir de $NO\bullet$ e superóxido.
Ácido peroxinitroso	$ONOOH$	Forma protonada do $ONOO^{\bullet}$
Dióxido de nitrogênio	$NO_2^{\bullet}$	Formado a partir da exposição de $NO\bullet$ ao ar ou da protonação de peroxinitrito. Potente iniciador da peroxidação lipídica em fluidos biológicos.

Fonte: (DEVASAGAYAM et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2007)

Frente à diversidade da estrutura química dos compostos antioxidantes e de seus mecanismos de ação, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante de diferentes amostras (CAETANO, 2009). Os diversos testes propostos na literatura variam quanto ao tipo de radicais gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para sua detecção e quantificação. Estes testes são chamados ensaios de captação. Em todos esses ensaios, um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, normalmente para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais de ESR (“Electron Spin Resonance” ou Ressonância do Spin Eletrônico) ou outra mudança mensurável. A presença de antioxidantes altera esses sinais, o que permite sua análise quantitativa (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Baseado nas reações químicas envolvidas, os principais métodos usados para medir a capacidade antioxidante podem ser divididos em duas categorias: (1) baseados na reação de transferência de elétrons, representados pelo método de Folin-Ciocalteu e FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) e seqüestro de radicais livres, que simulam as espécies

reativas de oxigênio, tais como o DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e o ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis (3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato) e (2) baseados na reação de transferência de átomos de hidrogênio, representado pelo ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) e sistema β-caroteno/ácido linoléico (ARNAO, 2000; HUANG et al., 2005).

As metodologias para a determinação da capacidade antioxidante são numerosas e podem estar sujeitas a interferências, por isso, atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio usado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente o potencial de uma amostra (HUANG et al., 2005; PRIOR et al., 2005).

6.1. Atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil - DPPH

Este é um método bastante utilizado e tecnicamente rápido que se baseia na capacidade de antioxidantes sequestrarem radicais livres, no caso o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazida (DPPH[•]) conhecido como sendo um radical livre estável, mas sensível à luz, oxigênio, pH e o tipo de solvente usado, de cor púrpura e com banda de absorção em solução metanólica centrada em 517 nm. Este, após receber um átomo de hidrogênio dos compostos antioxidantes é reduzido adquirindo coloração amarela (**Figura 6**). Desta forma, é possível medir a descoloração do radical espectrofotometricamente e estimar o poder antioxidante de uma amostra (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; MOLYNEUX, 2004; SCHERER & GODOY, 2009).

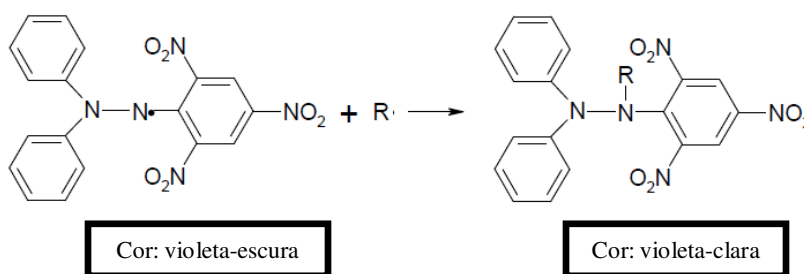


Figura 6. Estabilização do radical livre DPPH (RUFINO et al., 2007a)

Os resultados desse ensaio têm sido apresentados de muitas maneiras tais como porcentagem de inibição do radical DPPH[•], porcentagem de DPPH[•] residual, atividade antiradical, capacidade antioxidante equivalente de ácido ascórbico ou de algum

antioxidante natural como ácido gálico ou sintético como o trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico). Mas, a maioria dos estudos expressa os resultados como o valor IC 50, definido como a quantidade necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH[•] em 50% (SCHERER & GODOY, 2009).

Apesar do método do DPPH[•] ser muito utilizado, a falta de padronização dos resultados torna difícil comparar a força antioxidante de diferentes extratos e compostos puros. Scherer e Godoy (2009) propuseram em seu trabalho um índice universal de atividade antioxidante para o ensaio DPPH[•], que no seu cálculo considera a massa de DPPH[•] e a massa dos compostos testados na reação gerando uma constante para cada composto, independente da concentração de DPPH[•] e da amostra usada.

Além da falta de padronização dos resultados é importante considerar o fato de o radical DPPH[•] sofrer descoloração não apenas por ação do antioxidante presente no ensaio, mas também pela ação da luz, calor ou até mesmo a perda de estabilidade do próprio radical, bem como por reações não relacionadas ao efeito antioxidante. Outro importante fator, que deve ser levado em consideração, é o impedimento estérico à sua molécula, por parte dos antioxidantes de cadeia longa. Assim, moléculas pequenas possuem maior acesso ao radical, o que pode gerar controvérsia sobre a real maior ação antioxidante destas frente a outros antioxidantes com estruturas moleculares maiores (BOGUSZ JUNIOR, 2010)

6.2. Atividade sequestradora do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) - ABTS⁺⁺

Neste método, que utiliza o radical cromóforo monocatiônico 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) gerado pela oxidação do ABTS⁺⁺ com persulfato de potássio, ocorre a abstração do hidrogênio, doador de elétrons, da substância antioxidante pelo radical, promovendo a supressão da cor da solução. O grau deste descoloramento é usado para avaliar a atividade antioxidante (CAETANO, 2009). É, portanto, uma reação colorimétrica onde a solução que contém o radical, o persulfato de potássio e o extrato a ser testado contendo antioxidantes, passa da cor verde-escuro para a cor verde-claro (ver **Figura 7**).

O ensaio TEAC apresenta vantagens sobre o ensaio DPPH, como o fato da cor dos extratos não interferir na análise, ou seja, amostras muito escuras podem apresentar atividade antioxidante menor no ensaio do DPPH do que no ensaio TEAC. Isso porque no

ensaio TEAC a absorbância é medida a 734 nm. Além disso, o tempo de reação é menor quando comparado ao DPPH (TEOW et al., 2007).

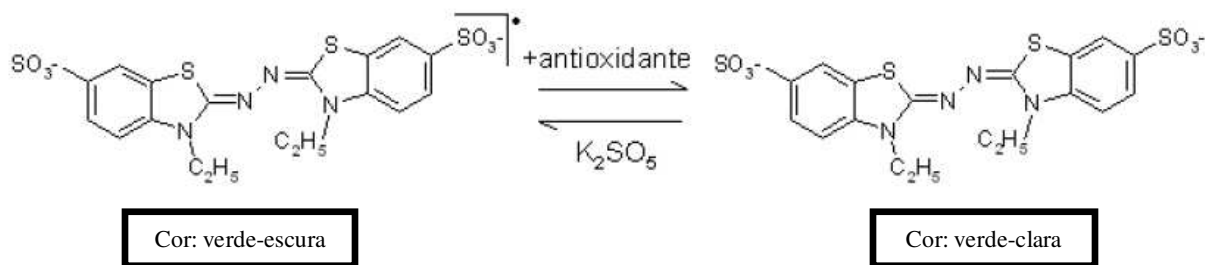


Figura 7. Estabilização do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. (RUFINO et al., 2007b).

6.3. Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP

Este método baseia-se na habilidade dos antioxidantes presentes na amostra reduzirem, em pH baixo, o complexo Fe^{3+} /tripiridiltriazina (TPTZ), para Fe^{2+} , de intensa cor azul e absorção máxima a 593 nm (**Figura 8**) (BENZIE e STRAIN, 1996). Essa habilidade define sua força antioxidante. O parâmetro de quantificação usado nesse método é a mudança de cor medida espectrofotometricamente. É, portanto, uma reação colorimétrica e o grau da coloração permite a avaliação do potencial antioxidante.

Este ensaio possui limitações que são: nem todo redutor que é hábil para reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} é antioxidante; nem todo antioxidante tem a habilidade específica para reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} (VASCONCELOS et al. 2007).

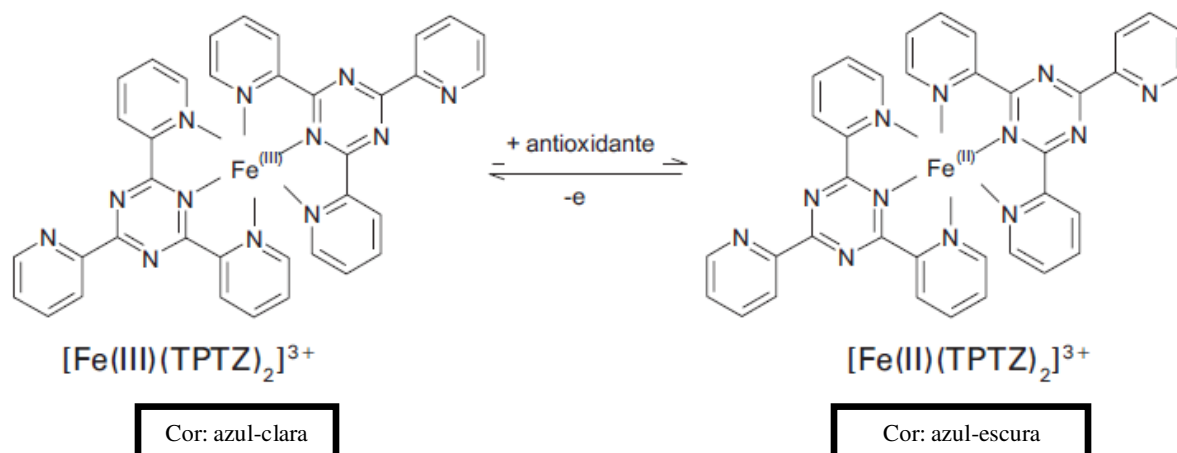


Figura 8. Redução do complexo Fe^{3+} /tripiridiltriazina (TPTZ) (RUFINO et al., 2006).

6.4. Oxygen Radical Absorbance Capacity – ORAC

Devido à complexidade experimental e as limitações existentes em se monitorar a cinética da reação de auto-oxidação surgiu a necessidade de desenvolvimento de um método mais conveniente para se avaliar a capacidade antioxidante de uma amostra que culminou no ensaio ORAC (OU et al., 2001).

Este método verifica a capacidade sequestradora de um antioxidante frente à formação de um radical peroxila que é formado após o 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) sofrer decomposição térmica a 37°C. Os radicais peroxila formados degradam a estrutura química da fluoresceína sódica, levando a perda da conformação inicial com o consequente decréscimo da emissão de fluorescência (OU et al., 2001).

7. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os produtos naturais são importantes fontes de substâncias bioativas. Existem vários registros históricos sobre a utilização das plantas para tratamento de doenças desde 4.000 a.C. O primeiro registro médico depositado no Museu da Pensilvânia é datado de 2.100 a.C. e inclui uma coleção de fórmulas de trinta diferentes drogas de origem vegetal, animal ou mineral (HELFAND & COWEN, 1990). Há 3000 anos, os médicos chineses usavam fungos para o tratamento de feridas infeccionadas. Assim o faziam também os índios norte-americanos e os médicos indianos recomendavam a ingestão de certos fungos para a cura de diarreias (TAVARES, 1985).

Em 1929 Alexander Fleming publicou um trabalho relatando as propriedades bactericidas de um microfungo presente no ar, identificado na época, como *Penicillium rubrum*. A partir daí a penicilina foi isolada e produzida em larga escala. Cogitou-se o fim das infecções causadas por bactérias, mas logo descobriram microrganismos produtores das penicilases (DE CARVALHO, 2007).

Com todas essas descobertas e, posteriormente, com o uso indiscriminado dos antibióticos que contribuiu para o surgimento de microrganismos resistentes tornando vários fármacos ineficazes, assim como o aumento mundial de doenças infectocontagiosas, principalmente em pacientes imunocomprometidos, tornou-se necessário a investigação de novas substâncias com propriedades antimicrobianas.

A resistência a drogas de patógenos humanos e animais é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos

como em desenvolvimento (DUARTE, 2006). Baquero e Blázquez (1997) relataram o perigo do retorno a uma era pré-antibiótico, particularmente considerando que nenhuma nova classe de antibiótico foi descoberta nos últimos anos, apesar das intensas pesquisas das indústrias farmacêuticas.

Alguns estudos consideram os cogumelos uma fonte de antibióticos naturais. Metabólitos secundários liberados pelos micélios combatem bactérias e vírus, enquanto que exsudados de micélio de cogumelos são ativos contra os protozoários que causam malária (SMÂNIA, 2003).

Vários métodos de avaliação da atividade antimicrobiana são descritos na literatura, cada um com sensibilidade diferente o que vai influenciar no resultado final, assim como a escolha dos microorganismos utilizados no ensaio que de preferência devem ser adquiridos de coleções de cultura como as da ATCC (American Type Culture Collection) para que assim seja possível a comparação com outras pesquisas (DE OLIVEIRA, 2010).

Existem vários testes para análise de sensibilidade microbiana. Entre os mais utilizados pode-se citar os métodos da difusão do disco, microdiluição em caldo, entre outros. Os laboratórios de pesquisa têm utilizado, preferencialmente, a análise da concentração inibitória mínima (CIM) uma vez que este teste, além de avaliar a atividade antimicrobiana, possibilita a determinação da mínima concentração necessária para inibir o crescimento dos microorganismos (NCCLS, 2003).

As diferenças com respeito às técnicas empregadas para investigação da ação de compostos e uma grande variação encontrada na composição química de alguns extratos podem resultar em dados de difícil comparação entre as pesquisas. Não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibições superiores (DUARTE, 2006).

Para iniciar uma pesquisa pode-se fazer uma triagem qualitativa dos extratos dos quais se deseja determinar a atividade antimicrobiana, sendo o método de difusão em ágar o mais utilizado para esse fim. Esta técnica possui elevada sensibilidade, pois a presença de uma “zona clara” indica crescimento microbiano inibido. Outras vantagens desta técnica são a necessidade de pequenas quantidades de amostra e a economia na utilização de apenas uma placa de Petri para testar cinco extratos (JOHANN, 2003; VIEIRA, 2005).

Entretanto, deve-se ressaltar que o resultado desta técnica tem apenas caráter qualitativo e que não é recomendada qualquer comparação quantitativa, como caracterizar uma substância como mais ativa em virtude do tamanho do halo de inibição formado (JOHANN, 2003).

Os extratos que apresentarem atividade antimicrobiana no método de triagem devem ser submetidos a testes quantitativos, como o método da concentração inibitória mínima (CIM), que pode ser determinada através de três técnicas: diluição em caldo, diluição em ágar e microdiluição em caldo de cultivo, que se baseiam no emprego de uma série de diluições do extrato para uma mesma concentração de microorganismo (VIEIRA, 2005).

A técnica de microdiluição em caldo de cultivo é a mais usada e consiste na adição de diferentes concentrações do extrato em uma série de orifícios em placas de microdiluição contendo uma suspensão padronizada do microrganismo a ser testado. A menor diluição de extrato onde o microrganismo não apresenta crescimento é a concentração inibitória mínima (CIM). A partir das diluições do extrato que não apresentaram crescimento, pode-se repicar para placa de ágar ou cultura em caldo e verificar a concentração mínima bactericida (CMB) ou a concentração mínima fungicida (CMF) que é a concentração de extrato que, além de inibir seu crescimento, também inativa o microrganismo (VIEIRA, 2005).

8. REFERÊNCIAS

- ADEGOKE, G. O., VIJAY, K. M., GOPALA, K. A. G., VARADARAJ, M. C., SAMBAIAH, K., LOKESH, B. R. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **Journal Food Science Technology**, v. 35, n. 4, p. 283-389, 1998.
- AKIYAMA, H., FUJII, K., YAMASAKI, O., OONO, T., IWATSUKI, K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 487-491, 2001.
- AMAZONAS, M. A. de A. Curso Cultivo de Cogumelos Comestíveis e Medicinais. In: **Importância do Uso de Cogumelos: Aspectos Nutricionais e Medicinais, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Apostila)**, p. 169, 1999.
- ANGELO, P. M. & JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

- ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p. 419-421, 2000.
- BADO, L. C. **Produccion de hongos Comestibles**. In: Valor Nutritivo y Toxicologia de los Hongos. San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México, p.108, 1994.
- BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.
- BAQUERO, F. & BLÁZQUEZ, J. Evolution of antibiotic resistance, v. 12, p. 482-487, 1997.
- BAIS, H. P., WALKER, T. S., STERMITZ, F. R., HUFBAUER, R. S. VIVANCO, J. M. Enantiomeric dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (±)-catechin; a rhizosecreted racemic mixture from *Centaurea maculosa* (spotted knapweed). **Plant Physiology**, v. 128, p. 1173-1177, 2002.
- BENZIE, I. F. F. & STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 292, p. 70-76, 1996.
- BOBBIO, P. A., BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2ª Ed. 1995.
- BOGUSZ JUNIOR, S. Caracterização química da fração volátil e estudo do potencial antioxidante em pimentas do gênero *Capsicum*. Tese de Doutorado Apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2010.
- BONONI, V. L.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R.; TRUFEM, S. F. B. S. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São. Paulo: Ícone, 2ª Ed., p. 206, 1999.
- BORCHERS, A.T., STERN, J.S., HACKMAN, R.M., KEEN, C.L., GERSHWIN, M. E. Mushroom, tumors, and immunity. **PSEBM**, v. 221, n. 4, p. 281-293, 1999.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BRSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, v. 28, p. 25-30, 1995.

- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- BREENE, W. M. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 53, n. 10, p. 883-894, 1990.
- BUSWELL, J. A., CAI, Y., CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and lactase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, v.128, p 81-88, 1996.
- CAETANO, A. C. da S. **Potencial antioxidante de extratos de resíduos de acerolas (Malpighia Emarginata D. C.) em diferentes sistemas modelos e na estabilidade oxidativa do óleo de soja**. Dissertação de Mestrado Apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRP), 2009.
- CHANG, S.T.; MILES, P.G. **Edible mushrooms and their cultivation**. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1989.
- CHEN, X-H., XIA, L-X., ZHOU, H-B., QIU, G-Z., Chemical composition and antioxidant activities of *Russula griseocarnosa* SP. nov. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 58, p. 6966-6971, 2010.
- CHYE, F. Y., WONG, J. Y., LEE, J.-S. Nutritional Quality and Antioxidant Activity of Selected Edible Wild Mushrooms. **Food Science Technology Institute**. v. 14, n. 4, p. 375-384, 2008.
- CIENTIC – Ciências naturais e TIC. Acesso em 6 de Fevereiro, 2012.
Disponível em: http://www.cientic.com/tema_fungo_img2.html
- COLLI, C. Nutracêutico é uma nova concepção de alimento. **Notícias SBAN**, v. 1, p. 1-2, 1998.
- CONEAC, G., GAFITANU, E., HĂDĂRUGĂ, D. I., HĂDĂRUGĂ, N. G., PÎNZARU, I. A., BANDUR, G., URSICA, L. PĂUNESCU, V., GRUIA, A. Flavonoid contents of própolis from the West side of Romania and correlation with the antioxidant activity. **Chemical Bulletin of “POLITEHNICA” University of Timisoara**, v. 53, p. 56-60, 2008.
- DA CUNHA, P. L. R., FEITOSA, R. C. M. DE P., FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: Uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

- DE CARVALHO, M. P. Avaliação da atividade antimicrobiana dos basidiomicetos *Lentinula edodes*, *Lentinus crinitus*, *Amauroderma* sp. e *Pyrenopeziza sanguineus*. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola e Ambiente, na área de microbiologia industrial da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.
- DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, v.55, p. 396–407, 1997.
- DECKER, E. A. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of food to maximize oxidative stability. **Trends Food Sci Technol**, v. 9, n. 8, p. 241-248, 1998.
- DE OLIVEIRA, D. A. Caracterização Fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) das variedades Merlot e Syrah. Dissertação de mestrado apresentada ao curso de pós-graduação em engenharia de alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos, 2010.
- DEVASAGAYAM, T. P. A., TILAK, J. C., BOLOOR, K. K., SANE, K. S., GHASKADBI, S. S., LELE, R. D. Free radical and antioxidant in human health: current status and future prospects. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 52, 2004.
- DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Construindo a história dos produtos naturais. **Multiciência**, v.7, 2006.
- EIRA, A. F. **Cultivo de cogumelos (compostagem e ambiente)**. In: Anais da III Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico. Mogi das Cruzes, p. 83-95, 2000.
- ELMASTAS, M., ISILDAK, O., TURKEKUL, I., TEMUR, N. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 337-345, 2007.
- FACCO, E. M. P. Compostos funcionais no processamento de vinhos. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos, 2006.
- FAEMG – Federação da Agricultura do Estado de Minas Gerais. **Cogumelos: Mercado e Comercialização - 2004**. Acesso em 13 de Dezembro, 2011.
- Disponível em:

- <http://www.faemg.org.br/Content.aspx?Code=353&ParentPath=None&ContentVersion=C>
- FAEMG – Federação da Agricultura do Estado de Minas Gerais. **Orgânicos Cogumelos de Saúde – 2009**. Acesso em 13 de Dezembro, 2011.
- Disponível em:
- <http://www.faemg.org.br/News.aspx?Code=15114&ParentPath=News&ContentVersion=R>
- FARIA, A., CALHAU, C., FREITAS, V., MATEUS, N. Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2392-2397, 2006.
- FERREIRA, I. C. F. R., BARROS, L., ABREU, R. M. V. Antioxidants in wild mushrooms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 1543–1560, 2009.
- FINCO, F. D. B. A., SILVA, I. G., RAMOS, F. Antioxidant activity and native fruits from Brazilian Savannah. **Free Radical Research**, v. 43, p. S27-97, 2009.
- FINKEL, T. & HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 9, p. 239-247, 2000.
- FORTES, R. C., NOVAES, M. R. C. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos Agaricales e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 363-371, 2006.
- FREI, B., ENGLAND, L., AMES, B. N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 86, p. 6377-6381, 1989.
- FURLANI, R. P. Z. **Valor nutricional de cogumelos cultivados no Brasil**. Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-graduação do Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas/ UNICAMP, 2004.
- GEORGE, S., BRAT, P., ALTER, P., & AMIOT, M. J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1370–1373, 2005.
- GERMAN, B. & DILARD, C. J. Phytochemicals: nutraceutical and human health. **Reviews – Journal Science Food Agricultural**, v. 80, p. 1744-1756, 2000.
- GHISELLI, A., SERAFINI, M., NATELLA, F., SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 29, n. 11, p. 1106-1114, 2000.
- GOLDBERG, I. (Ed) **Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals**. New York: Chapman & Hall, 1994.

- GONÇALVES, A. E. S. S. Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C. **Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Departamento de Ciências de Alimentos na área de Bromatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**, 2008.
- GUERREIRO, R. T. **Glossário Ilustrado de Fungos: Termos e Conceitos Aplicados a Micologia**, Rio Grande do Sul. UFRGS 2ª Edição, 2003.
- GUILLAMÓN, E., GARCÍA-LAFUENTE, A., LOZANO, M., D'ARRIGO, M., ROSTAGNO, M. A., VILLARES, A., MARTÍNEZ, J. A. Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. **Fitoterapia**, v.81, p. 715-723, 2010.
- HALLIWELL, B. Free radical and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.
- HALLIWELL, B. Oxidative Stress, Nutrition and health: experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radical Research**, v. 25, n. 1, p. 57-74, 1996.
- HALLIWELL, B. GUTTERIDGE, J. M. C. The chemistry of free radicals and related reactives species. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ª Ed., Oxford: Clarenton Press, p.36-104, 1999.
- HALLIWELL, B. GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3ª Ed., Oxford University Press: Oxford, 2002; 4ª Ed., 2007.
- HELENO, S. A., BARROS, L., SOUSA, M. J., MARTINS, A., FERREIRA, I. C. F. R. Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 119, p.1443-1450, 2010.
- HELFAND, W. H. & COWEN, D. L. **Pharmacy – an illustrated history**, Harry N. Abrams, New York, 1990.
- HERRERA, O. M. **Produção, economicidade e parâmetros energéticos do cogumelo Agaricus blazei: Um enfoque de cadeia produtiva**. Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp, São Paulo, 2001.
- HUANG, D., OU, B., PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

- JADHAV, S. J. NIMBALKAR, S. S. KULKARNI, A. D. MADHAVI, D. L. **Lipid oxidation in biological and foods systems**. In: MADHAVI, D. L. DESHPANDE, S. S., SALUNKHE, D. K., editores. Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives. New York: Marcel Dekker, p. 62, 1995.
- JOHANN, S. Atividade antimicrobiana de flavonóides polimetoxilados isolados de frutos cítricos. Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, para a obtenção do título de Mestre, da Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.
- KIM, M-Y., SEGUIN, P., AHN, J-K., KIM, J-J., CHUN, S-C., KIM, E-H., SEO, S-H., KANG, E-Y., KIM, S-L., PARK, Y-J., RO, H-M., CHUNG, I-M. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7265-7270, 2008.
- KING, A. & YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal American Dietetic Association**, v. 50, n. 2, p. 213-8, 1999.
- LANGSETH, L. **Antioxidants and their effects on health**. In: SCHMIDL, M. K., LABUZA, T. P. Essential of foods. Maryland: Aspen Publication, p. 303-317, 2000.
- LEE, S. J., UMANO, K. SHIBAMOTO, T., LEE, K. G. Identification of volatile components in Basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005).
- LINDEQUIST, U., NIEDERMEYER, T. H. J., JULICH, W. -D. The pharmacological potential of mushrooms. **eCAM**, v. 2, p. 285-299, 2005.
- LO, H. -C., WASSER, S. P. Medicinal mushrooms for glycemic control in diabetes mellitus: History, current status, future perspectives, and unsolved problems (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.13, n. 5, p. 401-426, 2011.
- MACHADO, F. M. S.; SANTIAGO, V. R. - Os benefícios do consumo de alimentos funcionais. In: TORRES, E. A. F., MACHADO, F. M. S. Alimentos em questão: uma abordagem técnica para as dúvidas mais comuns. São Paulo: Ponto Crítico, p. 35-43, 2001.
- MACHLIN, L.J., BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB Journal**, Bethesda, v.1, n.6, p.441-445, 1987.

- MANZI, P., AGUZZI, A., PIZZOFERRATO, L. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. **Food Chemistry**, v. 73, p. 321–325, 2001.
- MATTLA, P., SUONPÄÄ, K., & PIIRONEN, V. Functional properties of edible mushrooms. **Nutrition**, v.16, p. 694–696, 2000.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal Science Technologie**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.
- MOURA, P. L.C. – **Determinação de elementos essenciais e tóxicos em cogumelos comestíveis por análise por ativação com nêutrons** – Dissertação de Mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações pelo IPEN, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo/USP, 2008.
- MOREIRA, A. V. B. & MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos e especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 411-424, 2004.
- MIYAJI, C. K. & CÓLUS, I. M. deS. Shiitake, um cogumelo mutagênico ou antimutagênico? **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 22, p. 11-17, 2001.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.
- NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; **Approved Standard - Six Edition. NCCLS documento M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4)**. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898 US, 2003.
- NEVES, C. F. Q. & GRACIOLLI, L. A. Caracterização da produção em toros do cogumelo comestível *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler na região oeste do Estado de São Paulo. **Acta Scientiarum**, v. 30, n. 4, p. 487-494, 2008.
- NYCHAS, G. J. E. Natural antimicrobials from plants. In: GOULD, G. W. (Ed.) *New methods of food preservation*. Londres: Blackie Academic & Professional, p. 59-87, 1995.
- NOVAES, M. R. C. G. & NOVAES, L.C.G. Fármaco-nutrientes em cogumelos comestíveis Agaricales e outros basidiomicetos. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 20, n. 3, p. 181-187, 2005.

- OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.49, p. 4619-4626, 2001
- PANIZZI, L., CAPONI, C., CATALANO, S. CIONI, P. L., MORELLI, I. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 165-168, 2002.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.
- PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos Funcionais: Introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2005.
- PRIOR, R. L. & CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n.11/12, p. 1173-1181, 1999.
- PRIOR, R. L., WU, X., SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.
- PUTTARAJU, N. G., VENKATESHAIAH, S. U., DHARMESH, S. M., URS, SHASHIREKHA, M. N., SOMASUNDARAM, R. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9764-9772, 2006.
- RESUMOS - 2^o Ano by:Félix. Acesso em 6 de Fevereiro, 2012
Disponível em <http://resumosfelix.blogspot.com/2008/08/fungos.html>
- RIBEIRO, B., LOPES, R., ANDRADE, P. B., SEABRA, R. M., GONÇALVES, BAPTISTA, P., QUELHAS, I., VALENTÃO, P. Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. **Food Chemistry**, v. 110, p. 47-56, 2008.
- RIBEIRO, E. P. & SERAVALLI, E. A. G. *Química de Alimentos*. São Paulo, Editora Edgar Blucher: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 20, p. 933–956, 1996.

- ROSA, L. H. **Dossiê Técnico – Colheita e processamento de cogumelos comestíveis e medicinais para comercialização**. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais / CETEC, 2007.
- RUFINO, M. do S. M., ALVES, R. E., de BRITO, E. S., de MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. de G. PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Comunicado Técnico on line 125**, ISSN 1679-6535, 2006.
- RUFINO, M. do S. M., ALVES, R. E., de BRITO, E. S., de MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. de G. PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico on line 127**, ISSN 1679-6535, 2007a.
- RUFINO, M. do S. M., ALVES, R. E., de BRITO, E. S., de MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. de G. PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}. **Comunicado Técnico on line 128**, ISSN 1679-6535, 2007b.
- SCALBERT, A., MANACH, C., MORAND, C., RÉMÉSY, C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 287-306, 2005.
- SCHERER, R. & GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil method. *Food Chemistry*, v. 112, p. 654-658, 2009.
- SGARBIERI, V.C. & PACHECO, M. T.B. Revisão: alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 2, n. 1-2, p. 7-19, 1999.
- SHAHIDI, F. JANITHA, P. K. WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.
- SHAHIDI, F. & NACZK, M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. **Lancaster: Technomic**, 1995.
- SHIMAMURA, T., ZHAO, W. –H., HU, Z. –Q., Mechanism of action and potential for use of tea catechin as na antiinfective agent. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 57-62, 2007.
- SILVA, E.G., DIAS, E. S., SIQUEIRA, F.G., SCHWAN, R. F. Análise química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, n. 1, 2007.

- SILVA, J. de C. & SANTANA, C. de C. Cultivo de cogumelos em toras de eucalipto. **Revista da Madeira**, n. 101, 2007
- SIQUEIRA, J. O., NAIR, M. G., HAMMESRSCHIMIDT, R., SAFIR, G. R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. **Critical Review Plant Science**, v. 10, n. 1, p. 63-121, 1991.
- SMÂNIA, E.F.A. Esteróis e triterpenos isolados de espécies de ganoderma karsten e sua atividade antimicrobiana. Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-graduação em Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p. 71-81, 2002.
- SULLIVAN, R. SMITH, J.E., ROWAN, N. J. Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice into western medicine. **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 49, n. 2, p. 159-170, 2006.
- TAVARES, W. Pequena história sobre os antimicrobianos. **Arquivos Brasileiros de Medicina**. v. 59, p. 153-158, 1985.
- TEOW, C., C; TRUONG, V.; MCFEETERS, R., F; THOMPSON, R., L; PECOTA, K., V.; YENCHO, G. C. Antioxidant activities, phenolic and B-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. **Food Chemistry**, v. 103, p. 829-838. 2007.
- TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. Microbiologia. 6 ed. Editora Artmed, 1^a reimpressão, 2002.
- URBEN, A. F. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. 2 ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 20-41, 2004.
- URBEN, A. F. & SIQUEIRA, P. **Cogumelos e suas delícias**. Brasília, D. F., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Distrito Federal, Brasília, 2003.
- VALKON, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T. D., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.
- VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio,

- antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
- VIEIRA, G. R. T. Otimização das condições de cultivo de *Polyporus tricholoma* Mont. Visando a produção de substâncias antibacterianas. Florianópolis: UFSC, 2005. Dissertação apresentada ao programa de pós – graduação em Biotecnologia do departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.
- WANASUNDARA, U. AMAROWICZ, R. SHAHIDI, F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 6, p. 1285-1290, 1994.
- WASSER S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 60, p. 258-274, 2002.
- WASSER, S.P. & WEIS, A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). **Internacional Journal Medicinal Mushrooms**, v.1, p. 31-62, 1999.
- YALTIRAK, T., ASLIM, B., OZTURK, S., ALLI, H. Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2052-2056, 2009.

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE EXTRATOS AQUOSOS DE COGUMELOS COMESTÍVEIS PRODUZIDOS NO BRASIL

Jessica Maria Silva Sousa¹, Helena Teixeira Godoy¹

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP: 13083-862, Campinas, SP, Brasil.

Manuscrito em preparação a ser submetido para publicação no periódico Ciência e Tecnologia de Alimentos (ISSN 0101-2061).

RESUMO

Os cogumelos têm sido considerados ricas fontes de compostos bioativos com propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Muitas pesquisas relacionam essas propriedades à presença de compostos fenólicos. O estudo dessas propriedades é de grande importância frente ao estresse oxidativo e à possibilidade de descoberta de novos agentes antimicrobianos. Estudos sobre a capacidade antioxidante e antimicrobiana de cogumelos produzidos no Brasil são escassos e contraditórios. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante por quatro métodos distintos: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), ABTS⁺⁺ (2,2'-azino-bis (3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) e ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), quantificar os compostos fenólicos totais (CFT) pelo método de Folin-Cioacalfeu e avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos através da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos de quatro espécies de cogumelos comestíveis, *A. bisporus* (branco e marrom), *P. ostreatus*, *P. ostreatoroseus* e *L. edodes*, produzidos no Brasil. A avaliação dos resultados obtidos para as diferentes análises levou em consideração o período de colheita, os diferentes processamentos, graus de maturação e substratos de cultivo. No ensaio com o radical DPPH^{*} o cogumelo que apresentou maior atividade antioxidante foi o Champignon de Paris (fresco). Já no ensaio com o radical ABTS⁺⁺ e no ORAC os cogumelos que apresentaram maior ação antioxidante foram o Hiratake, o Shimeji (fresco), o Salmon e o Portobello. No ensaio FRAP o Portobello mostrou a maior atividade antioxidante. Os valores médios de CFT variaram entre 0,78 e 10,85 mg EAG/g de amostra liofilizada. Os cogumelos que apresentaram os maiores teores de CFT para o cultivo de verão e de inverno, respectivamente, foram o Hiratake com 10,09 mg EAG/g e 8,45 mg EAG/g, o Salmon com 9,61 mg EAG/g e 9,45 mg EAG e o Portobello com 9,07 mg EAG/g e 9,60 mg EAG. O processamento empregado ao cogumelo Champignon de Paris diminuiu consideravelmente o teor de CFT (de 7,04 mg EAG/g para 0,90 mg EAG/g - cultivo de verão) enquanto que no processo de secagem empregado ao cogumelo Shimeji não houve diminuição drástica no teor de CFT (de 8,83 mg EAG/g para 7,62 mg EAG/g - cultivo de verão). O grau de maturação influenciou no teor final de CFT mostrando que o Shimeji, colhido em estágio imaturo, possui menor teor de CFT (8,83 mg EAG/g – cultivo de verão e 7,24 mg EAG/g – cultivo de inverno) em comparação ao Hiratake, colhido em estágio mais maturo.

Correlações positivas entre os resultados de CFT e os métodos de atividade antioxidante foram encontradas, e essa correlação foi maior para o ensaio com o radical livre ABTS^{•+} e o ORAC ($r = 0,92$ e $r = 0,89$, respectivamente) do que para o ensaio FRAP ($r = 0,45$). Já entre o DPPH e os resultados de CFT foi encontrada baixa correlação negativa ($r = -0,14$). No ensaio antimicrobiano realizado verificou-se que o crescimento das leveduras *C. albicans*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. utilis* foi fortemente inibido pelos extratos aquosos dos cogumelos Shiitake (tora e composto), com CIMs variando entre 0,08 e 0,31 mg/mL, mostrando seu potencial de utilização pela indústria farmacêutica. Estes resultados demonstram que os cogumelos comestíveis possuem grande potencial de utilização pela indústria farmacêutica e podem contribuir significativamente para uma boa condição de saúde devido à presença de antioxidantes.

Palavras-chaves: cogumelos, compostos fenólicos, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The mushrooms have been considered rich sources of bioactive compounds with antioxidant and antimicrobial properties. A lot of researches relate these properties to the presence of phenolic compounds. The study of these properties is very important to the oxidative stress and the possibility of discovery of new antimicrobial agents. The study of antioxidant and antimicrobial activities of mushroom produced in Brazil are scarce and contradictory. This work aimed to evaluate the antioxidant capacity of four different methods: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), ABTS⁺ (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) and ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), quantify the total phenolic compounds (TPC) by the Folin-Cioacalteu and evaluate the antimicrobial potential of extracts by minimum inhibitory concentration (MIC) of extracts of four species of edible mushrooms, *A. bisporus* (white e brown), *P. ostreatus*, *P. ostreatoroseus* e *L. edodes*, produced in Brazil. The evaluation of the results obtained from different analyzes took into account the period of harvesting, different processing, degrees of maturation and cultivation substrates. In the assay with the radical DPPH[•] the mushroom with the highest antioxidant activity was *A. bisporus* white (fresh). In the assays with the radical ABTS⁺ and ORAC, the mushrooms that showed the highest antioxidant activity were the *P. ostreatus* (mature and fresh immature), the *P. ostreatoroseus* and the *A. bisporus* brown. In the FRAP assay *A. bisporus* brown showed the highest antioxidant activity. The average values of TPC ranged varied from 0.78 to 10.85 mg of GAE/g of lyophilized sample. The mushrooms with highest levels of TPC for the summer and winter cultivation, respectively, were the *P. ostreatus* (mature) with 10.09 mg GAE/g and 8.45 mg GAE/g, the *P. ostreatoroseus* with 9.61 mg GAE /g and 9,45 mg GAE, the *A. bisporus* brown with 9.07 mg GAE/g and 9.60 mg GAE. The processing used in the *A. bisporus* white has considerably reduced the content of TPC (from 7.04 mg GAE/g to 0.90 mg GAE/g - summer cultivation) while in the process of drying applied in the *P. ostreatus* (immature) mushroom had no drastic decrease content of the TPC (from 8.83 mg GAE/g to 7.62 mg GAE/g - summer cultivation). The maturation degree affected the final content of the TPC showing *P. ostreatus*, harvested in an immature state, has a lower content of TPC (8.83 mg GAE/g - summer cultivation and 7.24 mg GAE/g - winter cultivation) compared to *P. ostreatus* (mature). Positive correlations between the TPC

results and methods of antioxidant activity were found, this correlation was higher for the test with free radical ABTS⁺ and ORAC ($r = 0.92$ and $r = 0.89$, respectively) than the assay FRAP ($r = 0.45$). The DPPH[•] and the results of TPC was founded low negative correlation ($r = -0.14$). In the essay antimicrobial performed it was found that the growth of yeasts *C. albicans*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. utilis* was strongly inhibited by aqueous extracts of *L. edodes* mushrooms (logs and compost), with MICs ranged varied from 0.08 and 0.31 mg/mL, showing their potential use by the pharmaceutical industry. These results demonstrate that edible mushrooms have great potential use by the pharmaceutical industry and can contribute significantly for a good health condition due to the presence of antioxidants.

Key-words: mushrooms, phenolic compounds, antioxidant activity and antimicrobial activity.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a pesquisa por compostos bioativos naturais capazes de agir como antioxidantes e antimicrobianos tem aumentado enormemente. As razões para isto são o aumento do conhecimento a respeito das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas durante o processo oxidativo, assim como devido às restrições colocadas ao uso de antioxidantes sintéticos como o BHA (2- e 3-*terc*-butil-4-metoxifenol) e o BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol) e, também, devido ao aumento da resistência microbiana a muitos antibióticos sintéticos (OYETAYO, 2009).

Extratos de cogumelos têm recebido atenção com base em seus registros de promoção da saúde. Os cogumelos produzem uma ampla gama de metabólitos secundários com alto valor terapêutico (DEMAIN, 1999; OYETAYO, 2009). A literatura atual apresenta muitos relatos sobre a atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de cogumelos (KITZBERGER et al., 2007; HIRASAWA et al., 1999; YALTIRAK et al., 2009; HEARST et al., 2009, entre outros).

Os estudos relacionados à atividade antioxidante são de extrema necessidade frente ao estresse oxidativo que sempre ocorre em nossos organismos. Esse estresse oxidativo, que nada mais é do que o desequilíbrio entre o sistema antioxidante e pró-oxidante devido a uma produção descontrolada de radicais livres ou uma deficiência nos mecanismos de defesa acarreta em prejuízos à célula como oxidação de lipídios de membrana, proteínas, enzimas, carboidratos e DNA, que se acumulam com o passar dos anos contribuindo para a degeneração das células somáticas e indução de doenças crônico-degenerativas, especialmente associadas com o avanço da idade (HALLIWELL, 1994; FINKEL & HOLBROOK, 2000; LANGSETH, 2000; PIETTA, 2000; SCALBERT *et al.*, 2005; VALKON *et al.*, 2007). A maioria dos organismos teve seus sistemas de defesa antioxidante e reparo evoluídos para protegê-los contra danos oxidativos. No entanto, as defesas naturais são insuficientes para impedir todos os danos sendo necessária a obtenção de antioxidantes pela dieta.

Desde a descoberta e exploração dos antibióticos no século 20, a toxicidade seletiva de tais agentes tem assegurado a sua utilização generalizada, eficaz no combate às infecções. No entanto, esse uso indiscriminado resultou no surgimento e disseminação de patógenos resistentes a muitas drogas. Esta resistência em medicina e agricultura é agora

reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um dos emergentes problemas em saúde pública (HEARST, 2009). Como consequência, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais tem ganhado importância e hoje é considerada fundamental.

Estudos sobre a capacidade antioxidante e antimicrobiana de cogumelos produzidos no Brasil são escassos e contraditórios. Sabendo que as metodologias para determinação da capacidade antioxidante são numerosas e podem estar sujeitas a interferências, preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, pois nenhum ensaio usado isoladamente é capaz de refletir exatamente o potencial de uma amostra (HUANG et al., 2005; PRIOR et al., 2005). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antioxidante por quatro métodos distintos, correlacionando-o aos compostos fenólicos totais de extratos aquosos de cogumelos produzidos no Brasil, levando em consideração os diferentes processamentos, grau de maturação e substrato de cultivo. A avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos também foi objeto de estudo neste trabalho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

As amostras de Champignon de Paris (*Agaricus bisporus* branco), Portobello (*Agaricus bisporus* marrom), Salmon (*Pleurotus ostreatoroseus*), Shimeji (*Pleurotus ostreatus*), Hiratake (*Pleurotus ostreatus*) e Shiitake (*Lentinula edodes*) foram fornecidas por uma empresa localizada na região de Campinas – SP, Brasil, em dois períodos distintos, Fevereiro de 2011 (Verão) e Junho de 2011 (Inverno). Foram obtidos 3 lotes, com 600 gramas cada um, de cada amostra para cada um dos períodos de cultivo. Uma vez coletadas, as amostras foram congeladas, liofilizadas, trituradas em um moinho analítico da marca Ika (modelo A11 Basic Mill), acondicionadas em embalagens de polipropileno e armazenadas em freezer até o momento das análises. Na **Tabela 1** podem ser observados os dados da amostragem realizada.

Tabela 1. Dados da amostragem realizada

Amostra	Forma de comercialização	Substrato de cultivo*
<i>Agaricus bisporus</i> branco (Champignon de Paris)	Fresco	Composto
<i>Agaricus bisporus</i> marrom (Champignon de Paris)	Conserva	Composto
<i>Agaricus bisporus</i> branco (Portobello)	Fresco	Composto
<i>Pleurotus ostreatus</i> ** (Shimeji)	Fresco	Composto
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Shimeji)	Seco (ao sol)	Composto
<i>Pleurotus ostreatus</i> ** (Hiratake)	Fresco	Composto
<i>Pleurotus ostreatoroseus</i> (Salmon)	Fresco	Composto
<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake)	Fresco	Tora de eucalipto
<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake)	Fresco	Composto à base de serragem e resíduos da agroindústria

*Não foram obtidas maiores informações sobre a composição dos substratos de cultivo.

**Os cogumelos Shimeji e Hiratake são ambos *Pleurotus ostreatus*, diferindo apenas no estágio de maturação, isto é, enquanto o Hiratake é colhido com o chapéu aberto (maduro) o Shimeji é colhido com o chapéu fechado (imaduro)

2.2. Preparo dos Extratos

A extração dos compostos fenólicos foi realizada com base nos trabalhos de Puttaraju et al. (2006), Lee et al. (2007) e Ribeiro et al. (2008).

Para cada 1g de cogumelo liofilizado e moído foi adicionado 10 mL de H₂O destilada. Essa mistura foi agitada durante 15 minutos e em seguida centrifugada por 15 minutos à 5000 g sob uma temperatura de 20°C. Depois disso uma filtração foi realizada e o filtrado obtido foi considerado como extrato aquoso de cogumelo e mantido à 4° C até o momento das análises.

2.3 Solventes e Reagentes

O reagente Folin Ciocalteu foi fornecido pela Dinâmica (Brasil); o padrão ácido gálico, o padrão Trolox (Ác. 6-idroxi-2,5,7,8-Tetrametilcromano-2-Carboxílico), o ABTS (2,2-Azino-Bis-(Ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), o AAPH (Dicloridrato de 2,2-Azobis (2-Metilpropionamida)), o TPTZ ((2,4,6-Tri (2-pyridil)-5-triazina) e o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazina, D-9132) foram fornecidos pela Sigma (St Louis, MO, USA); o carbonato de sódio anidro, o persulfato de potássio, acetato de sódio, o ácido clorídrico, o fosfato de potássio bibásico, o fosfato de potássio monobásico, a fluoresceína sódica e os solventes etanol e metanol (grau analítico) foram fornecidos pela Synth (Brasil).

2.4. Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT)

A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com o método proposto por Singleton et al. (1999) com algumas modificações.

Em ambiente escuro foram adicionados em tubos de ensaio 0,5 mL do extrato aquoso de cogumelo. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu 10% e após 5 minutos 2,0 mL e uma solução de Na₂CO₃ 7,5%. Os tubos foram agitados e incubados por 2 horas no escuro. Depois deste tempo foi feita a leitura de absorbância à 760 nm. Um branco foi conduzido sob as mesmas condições, substituindo o extrato pela mesma quantidade de água. Uma curva padrão com ácido gálico foi elaborada da mesma maneira como foi descrito para as amostras com as concentrações dentro dos tubos e reação variando entre 1 a 7 µg/mL, sendo os resultados obtidos expressos em mg equivalente de ácido gálico por grama de amostra em base seca. Cada amostra foi analisada em triplicata.

2.5. Atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila - DPPH

Este ensaio foi realizado conforme Scherer e Godoy (2009), que desenvolveram uma metodologia que permite avaliar, por meio de um índice, a capacidade sequestrante de diferentes amostras frente a compostos radicais, obtendo dessa forma uma comparação direta.

Em tubos de ensaio foram adicionados 0,1 mL dos extratos em diferentes concentrações que variaram para cada amostra e 3,9 mL de uma solução metanólica de DPPH (0,1242mM ou 31,6 µg/mL). Os tubos foram agitados e incubados por 90 minutos. Depois desse tempo foi realizada a leitura de absorbância à 517 nm. O ácido gálico foi usado como composto de referência. Cada amostra foi analisada em triplicata.

Para o cálculo da atividade antioxidante cada absorbância foi transformada em % Inibição através da fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = [(A_{\text{Branco}} - A_{\text{Extr.}}) / A_{\text{Branco}}] \times 100$$

Em seguida, gráficos (% Inibição X [] em µg/mL do extrato) foram construídos e assim foi possível calcular o IC₅₀, que é a concentração do extrato necessária para inibir a solução inicial de DPPH em 50%.

A partir dos valores IC 50% obtidos para cada extrato foi calculado o índice de atividade antioxidante (IAA) através da seguinte fórmula:

$$(IAA) = [\quad] \text{ da solução de DPPH } (\mu\text{g/mL}) / \text{IC } 50\% (\mu\text{g/mL})$$

Da mesma forma que Scherer e Godoy (2009) foi considerado neste estudo IAA < 0,5 como pobre atividade antioxidante, IAA entre 0,5 e 1 como moderada atividade antioxidante, IAA entre 1 e 2 como forte atividade antioxidante e IAA > 2 como muito forte atividade antioxidante.

2.6. Atividade sequestradora do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato) - ABTS⁺⁺

Este ensaio foi realizado conforme o método proposto por Re et al., (1999) com algumas modificações.

Em tubos de ensaio foram adicionados 30 μL do extrato. Em seguida, foram adicionados 3 mL da solução do radical ABTS⁺⁺. Os tubos foram agitados e após 6 minutos foi feita a leitura de absorbância à 734 nm. Um tubo controle foi conduzido sob as mesmas condições, substituindo o extrato pela mesma quantidade de água. Uma curva padrão com trolox, um análogo da vitamina E, foi elaborada da mesma maneira como foi descrito para as amostras com as concentrações variando entre 0 e 20 μM , sendo os resultados obtidos expressos em μg equivalente de trolox por grama de amostra em base seca. Cada amostra foi analisada em triplicata.

A solução do radical cátion ABTS⁺⁺ foi preparada de 12 a 16 horas antes do ensaio e obtida pela mistura de uma solução aquosa de ABTS na concentração de 7 mM com uma outra solução de persulfato de potássio na concentração de 140 mM. Após o período de aproximadamente 16 horas, a solução do radical ABTS⁺⁺ foi diluída em etanol até que a absorbância atingisse valor entre 0,68 e 0,72 à 734 nm.

2.7. Ferric Reducing Antioxidant Power – FRAP

O ensaio foi realizado conforme método proposto por Benzie e Strain (1996), com modificações.

Em tubos de ensaio foram adicionados 90 μL do extrato. Em seguida, foram adicionados 270 μL de H₂O destilada e 2700 μL do reagente FRAP. Os tubos foram agitados e logo depois deixados em banho-maria à 37°C por 15 minutos. Passado esse

tempo os tubos foram retirados do banho e após 5 minutos a leitura de absorbância foi feita à 593 nm no escuro. Um branco foi conduzido sob as mesmas condições, substituindo o extrato pela mesma quantidade de água. Uma curva padrão com ácido gálico foi elaborada da mesma maneira como foi descrito para as amostras com as concentrações nos tubos de reação variando entre 6 e 33 µg/mL sendo os resultados obtidos expressos em mg equivalente de ácido gálico por grama de amostra em base seca. Cada amostra foi analisada em triplicata.

O reagente FRAP foi obtido a partir da combinação das seguintes soluções: tampão acetato (0,3 M), TPTZ (10 mM) em uma solução de HCl (40 mM) e cloreto férrico (20 mM). A proporção das soluções utilizadas foi de 10:1:1, respectivamente.

2.8. Oxygen Radical Absorbance Capacity – ORAC

Os ensaios foram realizados conforme o método descrito por Dávalos et al. (2004) com algumas modificações.

O sistema de reação foi montado misturando-se 20 µL de extrato ou diferentes concentrações de trolox ou H₂O (para o branco), 120 µL de Fluoresceína (0,4 µg/mL) e 60 µL do radical AAPH (2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride) na concentração de 108 mg/mL. O tampão fosfato de potássio (pH 7,4; 75 mM) foi utilizado como solvente. Cada amostra foi analisada em triplicata.

O experimento foi realizado no leitor de fluorescência (Fluorímetro Novo Star, BMG Labtechnologies) em microplacas de 96 poços de cor preta. A leitura foi realizada a cada 1 minuto, durante 80 minutos, com emissão à 520 nm e excitação à 485 nm e temperatura controlada à 37°C.

Para os cálculos foi utilizada a equação da área sob a curva (*AUC*):

$$AUC = 1 + f_2/f_1 + f_3/f_1 + f_4/f_1 + \dots + f_n/f_1$$

Onde: *AUC* = Área sob a curva, *f*₁ = leitura da fluorescência no tempo 1 minuto, *f*₂ = leitura da fluorescência no tempo 2 minutos e *f*_{*n*} = leitura da fluorescência no tempo de 80 minutos.

O *AUC* foi calculado para todas as amostras, diferentes concentrações do Trolox e para o branco. O *AUC* do branco foi subtraído do *AUC* de todas as amostras e diferentes concentrações de Trolox.

Foi construída uma curva padrão de Trolox onde o eixo Y referia-se ao *AUC* e o eixo X à concentração (μM) do padrão nos poços da placa. A partir daí substituiu-se o *AUC* de cada amostra na curva padrão. Dessa forma, o resultado final foi expresso em $\mu\text{M TE/g}$ de extrato.

2.9. Análise Estatística

O tratamento estatístico dos dados foi realizado através da Análise de Variância (ANOVA), e os valores encontrados foram comparados pelo Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança. Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* Statistica 7.0 (Statsoft, USA).

2.10. Atividade Antimicrobiana

Microrganismos avaliados

Os microrganismos utilizados no ensaio foram *Escherichia coli* ATCC 11775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388, *Bacillus subtilis* ATCC 5061, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida rugosa* CBS 12, *Candida tropicalis* CBS 94, *Candida glabrata* CBS 07 e *Candida utilis* CBS 5609. Obtidas da coleção de cultura de células do laboratório de microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (Unicamp, Brazil).

Meios de cultura utilizados

As bactérias foram mantidas em meio Nutriente Agar (Merck) e as leveduras em meio Agar Sabouraud Dextrose (Merck). Para os testes de atividade antimicrobiana foi utilizado o meio RPMI-1640 (Cultilab) para as leveduras e o Caldo Mueller-Hinton (Difco) para as bactérias.

Preparo do inóculo

Os inóculos foram preparados transferindo-se células cultivadas a 37°C por 24 horas, a partir dos tubos de manutenção, para frasco contendo solução salina (Synth) 0,85%, esterilizada. A concentração da suspensão inicial de células foi padronizada para uma densidade óptica correspondente a D.O. 0,5 da escala de Mc Farland , em

espectrofotômetro, ou seja, equivalente a uma absorbância entre 0,08-0,1 a 625 nm, para as bactérias ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e a 530 nm para as leveduras ($5,0 \times 10^6$ UFC/mL). Em seguida as suspensões de células foram diluídas adequadamente nos meios de cultura, de modo a proporcionar um inóculo correspondente a $5,0 \times 10^5$ UFC/mL (bactérias) e $2,5 \times 10^3$ (leveduras), para os testes de determinação da atividade antimicrobiana.

Teste da concentração inibitória mínima (CIM)

Em uma microplaca de 96 compartimentos (8 linhas A-H/1-12 colunas) foram depositados 100 µL dos meios de cultura, sendo a coluna 12 utilizada para os controles do microrganismo e de esterilidade do meio de cultura. Na coluna 1 – linha A foram acrescentados 50 µL da solução da amostra a ser testada (extrato de cogumelo), de concentração conhecida (uma solução diferente para cada número ou coluna), sendo estes referentes ao controle de esterilidade das amostras. Em seguida, 100 µL das mesmas amostras foram adicionados na linha B, o conteúdo dos compartimentos homogeneizados com o meio e transferidos para o compartimento da linha seguinte (C), repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente das amostras. Os 100 µL finais foram desprezados. Em seguida, foram adicionados 100 µL do inóculo do microrganismo a ser avaliado e as placas foram incubadas a 36 °C por 24 h (CLSI, 2002; CLSI, 2005). Após este período, nas placas referentes aos testes com as bactérias foram adicionados 50 µL de uma solução aquosa de TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) (Merck) a 0,1% e as placas reincubadas por 3 h na mesma temperatura. A CIM foi considerada a menor concentração de extrato capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha (crescimento microbiano). Para as leveduras, a avaliação do crescimento foi determinada pela mudança de coloração do meio RPMI-1640 de rosa para amarelo (Duarte et al., 2005). Os testes foram realizados em triplicata.

Teste da concentração mínima bactericida/fungicida (CMB/CMF)

A CMB/CMF foi determinada através de plaqueamento por superfície de uma alíquota de 10 µL do material do compartimento correspondente à CIM em concentrações anteriores a este, em meio de cultura específico. As placas foram incubadas a 36 °C por 3 dias para bactérias e 5 dias para leveduras. A CBM e MFC foram definidas como a concentração

capaz de não promover nenhum crescimento microbiano em meio de cultura sólido específico (CLSI 2002, 2005). Os experimentos foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT)

O teor de compostos fenólicos totais (CFT) nos extratos aquosos dos cogumelos são apresentados na **Tabela 2**. É importante dizer que estes resultados são estimativos do teor de fenólicos totais em equivalente de ácido gálico, já que os diferentes compostos fenólicos podem contribuir de forma diferente na reação química. Além disso, vale ressaltar que outros compostos não fenólicos como o ácido ascórbico e açúcares redutores podem interferir nesta análise levando a uma superestimação do teor de compostos fenólicos totais (GEORGE et al., 2005; PRIOR et al., 2005).

Foi possível verificar diferenças estatisticamente significativas entre os lotes de um mesmo cogumelo pertencentes a um mesmo período de colheita. Isso pode ser explicado devido a vários fatores que alteram a composição química dos cogumelos como as condições de cultivo (temperatura, luminosidade, umidade, entre outros) e a composição do substrato utilizado. Este último fator é muito importante, pois se sabe que os cogumelos vão sendo colhidos de um mesmo saco, contendo substrato de cultivo, até que o micélio mude sua firmeza e cor, ou seja, os últimos cogumelos que surgem no saco de cultivo não encontram, durante seu crescimento, a mesma disponibilidade inicial de nutrientes gerando com isso condições de estresse que podem ser refletidas na composição química dos cogumelos (URBEN, 2004; OEI & NIEUWENHUIJZEN, 2006).

Os valores médios de CFT variaram entre 0,78 e 10,85 mg EAG/g de amostra seca. O cogumelo Champignon de Paris (conserva), em média, apresentou o menor teor de compostos fenólicos totais (0,90 mg EAG/g no verão e 1,12 mg EAG/g no inverno), o que já era esperado pois o mesmo foi submetido às condições de processamento como a lavagem, cozimento, branqueamento, entre outras, que podem ter contribuído para a degradação dos compostos. Os cogumelos que apresentaram os maiores teores de CFT foram o Hiratake seguido do Salmon e do Portobello (10,09 mg EAG/g, 9,61 mg EAG/g e 9,07 mg EAG/g para o cultivo de verão e 8,45 mg EAG/g, 9,45 mg EAG/g e 9,60 mg EAG/g para o cultivo de inverno, respectivamente).

O grau de maturação dos cogumelos foi um fator importante que interferiu significativamente em sua composição química, como foi possível observar o Shimeji (fresco) apresentou um teor de CFT menor que o Hiratake (8,83 mg EAG/g para o cultivo de verão e 7,24 mg EAG/g para o cultivo de inverno). Ambos são *Pleurotus ostreatus* e diferem apenas pelo estágio de maturação, ou seja, chamam-se Shimeji os cogumelos colhidos antes dos chapéus se abrirem e chamam-se Hiratake os cogumelos colhidos quando os chapéus já estão completamente abertos.

O efeito do processo de secagem no cogumelo Shimeji foi avaliado. Foi possível observar que no cultivo de verão houve diferença estatisticamente significativa entre os cogumelos secos e frescos. No entanto, no cultivo de inverno essa diferença não foi observada.

O efeito do substrato nos teores de CFT do cogumelo Shiitake também foi observado. No cultivo de verão o Shiitake produzido em tora de eucalipto apresentou, em média, teor de CFT maior que o Shiitake produzido em composto à base de serragem (6,86 mg EAG/g e 5,78 mg EAG/g, respectivamente). No entanto, no cultivo de inverno o Shiitake produzido em composto à base de serragem apresentou, em média, teor maior que o Shiitake produzido em tora de eucalipto (6,96 mg EAG/g e 6,10 mg EAG/g, respectivamente).

Com relação ao efeito dos períodos de cultivo (verão ou inverno) verificou-se que os cogumelos Champignon de Paris (fresco e em conserva), Portobello e Shiitake (de composto) tiveram os teores de CFT aumentados no período de inverno. Os cogumelos Shimeji (seco) e Salmon mantiveram seus teores constantes. Já os cogumelos Shimeji (fresco), Hiratake e Shiitake (de tora), tiveram seus teores de CFT diminuídos no período de inverno.

Valores inferiores aos do presente trabalho foram encontrados por Pauli (2010), o qual utilizou extratos metanólicos nos ensaios. Para o cogumelo Champignon de Paris fresco foi encontrado em média um valor de 6 mg EAG/g de amostra em base seca, enquanto que neste trabalho foi encontrado um valor de 7,04 mg EAG/g no período do verão e 8,25 mg EAG/g no período do inverno. Diferenças maiores foram observadas para os cogumelos Shiitake e Salmon onde no referido trabalho foram encontrados valores de 3,04 mg EAG/g e 5,9 mg EAG/g, respectivamente. Enquanto que no presente trabalho os valores médios encontrados para o Shiitake produzido em tora de eucalipto foram de 6,86

mg EAG/g no cultivo de verão e 6,10 mg EAG/g no cultivo de inverno e para o Shiitake de composto os valores, em média, foram de 5,78 mg EAG/g no cultivo de verão e 6,96 mg EAG/g no cultivo de inverno. Já para o cogumelo Salmon foi encontrado um valor médio de 9,61 mg EAG/g no cultivo de verão e 9,45 mg EAG/g no cultivo de inverno.

No trabalho de Puttaraju et al. (2006) 23 espécies de cogumelos crescidas naturalmente em diferentes locais geográficos da Índia foram estudadas. A extração dos compostos fenólicos foi realizada com dois solventes: água e metanol, da mesma forma que no presente trabalho com pequenas modificações. O conteúdo de CFT estimado para todas as espécies, nos extratos aquosos, foram superiores aos encontrados nos extratos metanólicos. Os teores variaram entre 2 e 37 mg EAG/g de cogumelo seco para os extratos aquosos e entre 0,7 e 11,2 mg EAG/g de cogumelo seco para os extratos metanólicos.

Cheung et al. (2003) analisaram os corpos de frutificação de dois fungos: *Lentinus edodes* (Shiitake) e *Volvariella volvacea*, obtidos de um mercado local na China. Para a extração dos compostos fenólicos foi realizado um fracionamento em ascendente polaridade com quatro diferentes solventes (éter de petróleo, acetato de etila, metanol e água). Nos extratos metanólicos foi onde se encontraram os maiores teores de CFT, expressos como mg de EAG/g de cogumelo seco. Para o cogumelo Shiitake foi encontrado nos extratos de éter de petróleo, acetato de etila, metanol e água 0,44 mg EAG/g, 0,03 mg EAG/g, 4,79 mg EAG/g, e 1,33 mg EAG/g, respectivamente. Esses valores foram bem inferiores aos encontrado no presente estudo, o qual obteve teores de CFT variando entre 5,78 e 6,96 mg EAG/g.

Barros et al. (2009) analisaram dezesseis espécies de cogumelos do nordeste de Portugal, entre elas o *Agaricus bisporus* (Champignon de Paris), e para isso utilizaram uma mistura de acetona e água para extrair os compostos fenólicos. Os valores de CFT obtidos variaram entre 1,75 e 20,32 mg EAG/g, sendo que o Champignon de Paris apresentou 4,49 mgEAG/g, valor inferior ao encontrado, em média, no presente trabalho que foi de 7,04 mgEAG/g do período de verão e 8,25 mgEAG/g do período de inverno.

Tabela 2. Teor de compostos fenólicos totais (CFT) para as diferentes amostras de cogumelos.

CFT (mg Equivalente em ácido gálico / g de cogumelo liofilizado)*			
Cogumelos	Lotes	Verão	Inverno
<i>Agaricus bisporus</i> branco (Champignon de Paris) FRESCO	1	7,92 ± 0,08 ^a	8,36 ± 0,04 ^a
	2	6,65 ± 0,05 ^b	8,16 ± 0,06 ^b
	3	6,56 ± 0,10 ^b	8,22 ± 0,02 ^b
	Média	7,04 ± 0,66 ^{b, C-s}	8,25 ± 0,10 ^{a, D, C-s}
<i>Agaricus bisporus</i> branco (Champignon de Paris) CONSERVA	1	0,78 ± 0,01 ^c	1,32 ± 0,01 ^a
	2	0,83 ± 0,01 ^b	1,12 ± 0,01 ^b
	3	1,11 ± 0,01 ^a	0,91 ± 0,01 ^c
	Média	0,90 ± 0,16 ^{b, E-t}	1,12 ± 0,18 ^{a, G-t}
<i>Agaricus bisporus</i> marrom (Portobello) FRESCO	1	7,96 ± 0,05 ^b	9,71 ± 0,03 ^b
	2	9,72 ± 0,12 ^a	10,62 ± 0,05 ^a
	3	9,51 ± 0,08 ^a	8,47 ± 0,11 ^c
	Média	9,07 ± 0,83 ^{a, B}	9,60 ± 0,94 ^{a, A}
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Shimeji) FRESCO	1	9,25 ± 0,05 ^a	7,72 ± 0,12 ^b
	2	9,19 ± 0,03 ^a	8,15 ± 0,01 ^a
	3	8,06 ± 0,07 ^b	5,86 ± 0,03 ^c
	Média	8,83 ± 0,58 ^{a, B-u, x}	7,24 ± 1,05 ^{b, D, E-u, x}
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Shimeji) SECO	1	7,77 ± 0,02 ^a	8,20 ± 0,08 ^a
	2	7,65 ± 0,06 ^a	8,09 ± 0,09 ^a
	3	7,43 ± 0,07 ^b	6,89 ± 0,03 ^b
	Média	7,62 ± 0,16 ^{a, C-v}	7,73 ± 0,64 ^{a, C, D, E-u}
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Hiratake) FRESCO	1	10,43 ± 0,03 ^b	8,24 ± 0,14 ^b
	2	10,85 ± 0,15 ^a	8,07 ± 0,03 ^b
	3	8,99 ± 0,08 ^c	9,05 ± 0,06 ^a
	Média	10,09 ± 0,85 ^{a, A-w}	8,45 ± 0,46 ^{b, B, C-w}
<i>Pleurotus ostreatoroseus</i> (Salmon) FRESCO	1	10,53 ± 0,05 ^a	7,63 ± 0,09 ^c
	2	8,71 ± 0,13 ^c	10,15 ± 0,14 ^b
	3	9,59 ± 0,02 ^b	10,58 ± 0,24 ^a
	Média	9,61 ± 0,79 ^{a, A, B}	9,45 ± 1,39 ^{a, A, B}
<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake Fresco) TORA	1	7,07 ± 0,02 ^a	6,25 ± 0,11 ^b
	2	6,38 ± 0,07 ^b	5,55 ± 0,03 ^c
	3	7,14 ± 0,10 ^a	6,49 ± 0,09 ^a
	Média	6,86 ± 0,37 ^{a, C-y}	6,10 ± 0,43 ^{b, F-z}
<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake Fresco) COMPOSTO	1	5,34 ± 0,06 ^b	7,20 ± 0,03 ^b
	2	5,21 ± 0,09 ^b	7,41 ± 0,06 ^a
	3	6,77 ± 0,08 ^a	6,25 ± 0,04 ^c
	Média	5,78 ± 0,75 ^{b, D-z}	6,96 ± 0,54 ^{a, E, F-y}

*Resultados expressos em base seca como média ± desvio padrão de análises realizadas em triplicata.

Médias de cada lote (n = 3) seguidas pela mesma letra minúscula, nas colunas, para um mesmo cogumelo e para um mesmo período de cultivo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n=9) seguidas pela mesma letra minúscula (negrito e itálico), nas linhas, para um mesmo cogumelo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra maiúscula, nas colunas, para um mesmo período de cultivo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (s,t), nas colunas, para os cogumelos Champignon de Paris fresco e Champignon de Paris em conserva não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (u,v), nas colunas, para os cogumelos Shimeji branco fresco e Shimeji branco seco não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (w, x), nas colunas, para os cogumelos Shimeji branco fresco e Hiratake fresco não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (y, z), nas colunas, para os cogumelos Shiitake de tora e Shiitake de composto não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

3.2. Atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila - DPPH^{*}

Para o cálculo do IC 50, foi necessário obter uma curva em escala linear para cada extrato analisado. Portanto, para todos os extratos foi obtida uma curva com no mínimo cinco pontos, onde a concentração variou de acordo com cada amostra. Os coeficientes de determinação (r^2) obtidos foram $\geq 0,99$. A partir do valor IC 50 obtido foi possível obter o valor do IAA (Índice de Atividade Antioxidante). A **Tabela 3** mostra os resultados obtidos para cada lote, nas diferentes épocas de colheita (verão e inverno), a variação existente entre um mesmo cogumelo colhido em períodos diferentes, bem como a variação entre os cogumelos estudados.

O ensaio de sequestro do radical livre DPPH^{*} é um dos mais utilizados para medir a capacidade antioxidante *in vitro*, no entanto existe grande dificuldade em se comparar os resultados aqui obtidos aos encontrados na literatura devido às diferenças existentes entre as metodologias executadas, assim como devido às diferentes formas de expressão dos resultados. Além disso, o método de extração dos compostos fenólicos, a espécie de cogumelo analisada, as condições climáticas às quais os cogumelos foram submetidos e o local onde cresceram interferem enormemente nos resultados finais.

Para partir de um parâmetro de comparação a capacidade antioxidante, pelo método de sequestro do radical DPPH^{*}, do padrão ácido gálico foi testada. O valor IC 50 encontrado foi 1,09 $\mu\text{g/mL}$ e o índice de atividade antioxidante foi 28,86, o que de acordo com Scherer e Godoy (2009) é considerado como uma atividade antioxidante muito forte. A solução padrão foi preparada com água para que assim fosse possível comparar o resultado obtido aos das amostras.

Os valores de IC 50 encontrados para as amostras variaram entre 266 $\mu\text{g/mL}$ e 2021 $\mu\text{g/mL}$. As amostras que, em média, apresentaram os menores valores de IC 50 foram Portobello e Champignon de Paris fresco do cultivo de inverno (451 $\mu\text{g/mL}$ e 521 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). As amostras que, em média, apresentaram maiores valores IC 50 foram Shimeji branco seco, Shimeji branco fresco e Hiratake do período de inverno (1780 $\mu\text{g/mL}$, 1708 $\mu\text{g/mL}$ e 1295 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

O efeito do processo de secagem no cogumelo Shimeji foi avaliado. No cultivo de verão o Shimeji seco mostrou um valor de IC 50 maior que no cogumelo fresco enquanto que no cultivo de inverno não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de IC 50 encontrados.

O grau de maturação entre os cogumelos Shimeji (fresco) e Hiratake (fresco) foi avaliado. Lembrando que ambos são *Pleurotus ostreatus*, a única diferença entre eles é o estágio de maturação, que no Hiratake está mais avançado que no Shimeji. Foi observado que tanto no cultivo de verão como no cultivo de inverno o Hiratake mostrou valor de IC 50 menor que o Shimeji, ou seja, melhor atividade antioxidante.

O substrato utilizado no cultivo dos cogumelos Shiitake não interferiu na atividade antioxidante pelo método do DPPH[•], pois não houve diferenças estatisticamente significativas entre os cogumelos Shiitake (de tora e de composto).

Os índices de atividade antioxidante encontrados variaram entre 0,02 e 0,12. Os cogumelos que, em média, apresentaram os maiores valores foram o Portobello e o Champignon de Paris fresco do cultivo de inverno, assim como para o valor IC 50 (0,08 e 0,06, respectivamente), o que de acordo com Scherer e Godoy (2009) é considerado como baixa capacidade antioxidante. Comparando com o padrão ácido gálico podemos dizer que a capacidade antioxidante pelo método de seqüestro do radical DPPH[•] foi muito baixa. No entanto, é preciso lembrar que no preparo da solução padrão a quantidade pesada refere-se ao composto puro, enquanto que no caso das amostras o que é pesado, na verdade, é o cogumelo liofilizado e moído. Além disso, o ácido gálico possui uma estrutura química muito simples o que acaba facilitando a reação com o DPPH[•]. Já no caso das amostras pode ocorrer um impedimento estérico à molécula do DPPH[•], uma vez que é possível a existência de antioxidantes com estruturas moleculares maiores.

Para a amostra Champignon de Paris em conserva não foi possível calcular o valor IC 50 pois nem a concentração máxima possível de extrato (2500 µg/mL) utilizada, nos tubos de reação, apresentou 50% de inibição. Esse resultado está de acordo com o resultado obtido na análise de fenóis totais, a qual apresentou os menores valores de fenóis totais.

No trabalho de Cheung et al. (2003) os resultados obtidos para o ensaio de capacidade antioxidante pelo método de seqüestro do radical DPPH[•] foram expressos em porcentagem de seqüestro do radical, onde para diferentes concentrações (µg/mL) foi obtida uma porcentagem de sequestro do DPPH[•]. Em geral, a atividade sequestradora dos extratos aquosos foi significativamente maior que dos extratos metanólicos para o cogumelo *Lentinus edodes* (Shiitake) nas concentrações testadas que foram 1000 µg/mL, 1500 µg/mL, 3000 µg/mL, 6000 µg/mL e 9000 µg/mL. As % de inibição obtidas para cada concentração a partir de 1500 µg/mL foram 38,3%, 45,1%, 55,4% e 40,4% para os extratos

aquosos e 3,39%, 11,5%, 25,8% e 29,4% para os extratos metanólicos. Os resultados obtidos no presente estudo foram melhores que os resultados obtidos no trabalho referenciado, pois a concentração necessária para obter 50% de inibição variou entre 737,17 e 832,67 µg/mL, ou seja, foi necessária uma concentração bem menor para obter o mesmo grau de inibição.

Chye et al. (2008) analisou o potencial antioxidante de cinco espécies de cogumelos. As espécies foram identificadas como *Pleurotus sp.*, *Hygrocybe sp.*, *Hygrophorus sp.*, *Schizophyllum commune* e *Polyporus tenuiculus*. De cada cogumelo foram obtidos dois extratos, um com éter de petróleo e outro com metanol. Os autores concluíram que as espécies de cogumelos mostraram apreciável atividade de seqüestro dos radicais DPPH[•], sendo o extrato de éter de petróleo do *Pleurotus sp.* o que apresentou maior % de inibição (83,04 %) para a concentração de 20 mg/mL (20.000 µg/mL). Essa capacidade de seqüestro do radical livre DPPH[•] foi duas vezes maior do que *Hygrocybe sp.* na mesma concentração e até mesmo maior do que o antioxidante sintético, BHT (67,32 %). Diferentemente desse resultado, no presente trabalho, foi considerado que os cogumelos *Pleurotus ostreatus* mostraram fraca capacidade de seqüestro do radical DPPH[•] quando comparada ao padrão fenólico utilizado, o ácido gálico. Enquanto foi preciso cerca de 1200 µg de cogumelo liofilizado e moído/mL para obter aproximadamente 50 % de inibição do radical o padrão fenólico precisou de uma concentração de apenas 1,09 µg/mL. No entanto, é bom deixar claro que as metodologias utilizadas nos ensaios diferem entre si, assim como o processo de extração. Além disso, os cogumelos foram colhidos em lugares muito distintos com condições de crescimento muito diferenciadas. Outro fato importante é que os padrões utilizados na comparação foram diferentes.

No trabalho de Barros et al. (2009) 16 espécies de cogumelos foram analisadas. Os valores IC 50 variaram entre 660 e 20.240 µg/mL para as amostras, sendo o valor encontrado para o Champignon de Paris de 9.610 µg/mL. Esse resultado não está de acordo ao encontrado no presente trabalho que obteve o valor médio de 943,08 µg/mL para o período de verão e 521,68 µg/mL para o período de inverno.

Ribeiro et al. (2006) avaliaram a capacidade seqüestradora de radicais DPPH[•] de extratos aquosos, obtidos de forma semelhante ao do presente trabalho, de 28 espécies comestíveis de cogumelos silvestres coletados no nordeste de Portugal. O efeito sequestrador das espécies foram dependentes da concentração e, tiveram como resultado

um poder redutor > 5% na concentração de 150 µg/mL. As espécies analisadas mostraram potencial antioxidante muito baixo da mesma forma que no presente trabalho.

Ribeiro et al. (2008) analisaram extratos aquosos obtidos de outras quatro espécies comestíveis de cogumelos silvestres (*Russula cyanoxantha*, *Amanita rubescens*, *Suillus granulatus* e *Boletus edulis*). Neste trabalho os teores de ácidos orgânicos e alcalóides foram quantificados e os autores sugeriram que estes compostos podem ter contribuído de forma significativa para a atividade antioxidante, pois as espécies estudadas se mostraram ricas em ácidos orgânicos e os cogumelos que apresentaram maior atividade também apresentaram maior quantidade de alcalóides. No entanto, os autores afirmam que os teores de ácidos orgânicos, compostos fenólicos e alcalóides são insuficientes para justificar o potencial antioxidante das espécies. Como resultados tiveram valores de IC 25% variando entre 77,4 e 936 µg/mL e a % de inibição, para os extratos na concentração de 500 µg/mL, variando entre 6,3 e 94,9%.

Chen et al. (2010) avaliaram a capacidade antioxidante de extratos metanólicos do píleo e da estipe do cogumelo *Russula griseocarnosa* e observou que até a concentração de 20.000 µg/mL o extrato obtido do píleo apresentou capacidade de sequestro do radical DPPH• maior que o extrato obtido da estipe. Na concentração de 30.000 µg/mL a porcentagem de inibição foi 84,4% para o píleo e 85,8% para a estipe. Contudo, a capacidade de sequestro do radical DPPH• para o BHT na concentração de 800 µg/mL foi 75,9%. Os autores conferem essa capacidade antioxidante encontrada ao conteúdo de fenóis e flavonóides.

Yaltirak et al. (2009) avaliaram a capacidade antioxidante do extrato etanólico do cogumelo *Russula delica* Fr. e encontraram 26% de inibição para a concentração de 10 mg/mL (10.000 µg/mL), menor que o BHA (80%), BHT (76%) e α-tocoferol (77%) na mesma concentração. O efeito de sequestro de radicais aumentou com o aumento da concentração. O valor IC 50% encontrado para o extrato analisado foi 44 mg/mL (44.000 µg/mL), para o BHA, BHT e α-tocoferol foi ≤ 0,1 mg/mL (100 µg/mL). ELMASTAS et al. (2007) relataram que para esse mesmo cogumelo foi encontrado valor IC 50% de 0,05 mg/mL (50 µg/mL).

Tabela 3. Atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH[•]) para as diferentes amostras de cogumelos

Cogumelos	Lotes	IC 50% (µg/mL)*		IAA*	
		Verão	Inverno	Verão	Inverno
<i>Agaricus bisporus</i> branco (Champignon de Paris) FRESCO	1	577 ± 21 ^c	577 ± 21 ^a	0,055 ± 0,002 ^a	0,055 ± 0,002 ^c
	2	1466 ± 34 ^a	510 ± 12 ^b	0,022 ± 0,001 ^c	0,062 ± 0,002 ^b
	3	785 ± 38 ^b	477,21 ± 5,55 ^b	0,040 ± 0,002 ^b	0,066 ± 0,001 ^a
	Média	943 ± 403^{a, B, C}	521 ± 45^{b, D, E}	0,039 ± 0,015^{b, B}	0,061 ± 0,005^{a, B}
<i>Agaricus bisporus</i> marrom (Portobello) FRESCO	1	629 ± 7 ^a	436 ± 4 ^b	0,050 ± 0,001 ^b	0,072 ± 0,001 ^b
	2	617 ± 21 ^a	266 ± 2 ^c	0,051 ± 0,002 ^b	0,119 ± 0,001 ^a
	3	484 ± 7 ^b	650 ± 12 ^a	0,065 ± 0,001 ^a	0,049 ± 0,001 ^c
	Média	577 ± 70^{a, D}	451 ± 166^{a, E}	0,056 ± 0,007^{b, A}	0,080 ± 0,031^{a, A}
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Shimeji) FRESCO	1	1516 ± 85 ^a	1517 ± 8 ^c	0,021 ± 0,001 ^a	0,021 ± 0,001 ^a
	2	1649 ± 46 ^a	1949 ± 7 ^a	0,019 ± 0,001 ^a	0,016 ± 0,001 ^c
	3	1525 ± 52 ^a	1656 ± 22 ^b	0,021 ± 0,001 ^a	0,019 ± 0,001 ^b
	Média	1563 ± 84^{a, A - v, w}	1708 ± 191^{a, A - u, w}	0,020 ± 0,001^{a, D, E - u, x}	0,019 ± 0,002^{a, E, F - u, x}
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Shimeji) SECO	1	1684 ± 8 ^b	1667 ± 5 ^b	0,019 ± 0,001 ^a	0,019 ± 0,001 ^a
	2	1683 ± 23 ^b	1698 ± 12 ^b	0,019 ± 0,003 ^a	0,019 ± 0,001 ^a
	3	2021 ± 102 ^a	1974 ± 115 ^a	0,016 ± 0,001 ^b	0,016 ± 0,001 ^b
	Média	1796 ± 176^{a, A - u}	1780 ± 157^{a, A - u}	0,018 ± 0,002^{a, E - v}	0,018 ± 0,001^{a, F - u}
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Hiratake) FRESCO	1	1006 ± 32 ^b	1156 ± 27 ^b	0,031 ± 0,001 ^a	0,027 ± 0,001 ^a
	2	1074 ± 37 ^b	1604 ± 9 ^a	0,029 ± 0,001 ^a	0,020 ± 0,001 ^b
	3	1324 ± 16 ^a	1125 ± 16 ^b	0,024 ± 0,001 ^b	0,028 ± 0,001 ^a
	Média	1135 ± 147^{a, B - x}	1295 ± 232^{a, B - x}	0,028 ± 0,003^{a, C, D - w}	0,025 ± 0,004^{a, D, E, F - w}
<i>Pleurotus ostreatoroseus</i> (Salmon) FRESCO	1	899 ± 15 ^b	1194 ± 18 ^a	0,035 ± 0,001 ^a	0,026 ± 0,001 ^c
	2	975 ± 4 ^a	704 ± 10 ^c	0,032 ± 0,001 ^b	0,045 ± 0,001 ^a
	3	889 ± 8 ^b	783 ± 30 ^b	0,036 ± 0,001 ^a	0,040 ± 0,002 ^b
	Média	921 ± 41^{a, B, C}	894 ± 228^{a, C}	0,034 ± 0,002^{a, B, C}	0,037 ± 0,008^{a, C, D, E}
<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake fresco) TORA	1	658 ± 9 ^c	775 ± 20 ^b	0,048 ± 0,001 ^a	0,041 ± 0,001 ^a
	2	807 ± 1 ^b	743 ± 10 ^b	0,039 ± 0,001 ^b	0,043 ± 0,001 ^a
	3	854 ± 9 ^a	863 ± 5 ^a	0,037 ± 0,004 ^c	0,037 ± 0,002 ^b
	Média	773 ± 89^{a, C, D - y}	793 ± 54^{a, C - y}	0,041 ± 0,005^{a, B - y}	0,040 ± 0,003^{a, C, D - y}
<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake fresco) COMPOSTO	1	792 ± 12 ^b	701 ± 5 ^b	0,040 ± 0,001 ^b	0,045 ± 0,001 ^b
	2	1003 ± 6 ^a	493 ± 5 ^c	0,031 ± 0,001 ^c	0,064 ± 0,001 ^a
	3	701 ± 23 ^c	1016 ± 4 ^a	0,045 ± 0,002 ^a	0,031 ± 0,001 ^c
	Média	832 ± 134^{a, C, D - y}	737 ± 228^{a, C, D - y}	0,039 ± 0,006^{a, B - y}	0,047 ± 0,014^{a, B, C - y}

*Resultados expressos em base seca como média ± desvio padrão de análises realizadas em triplicata.

Médias de cada lote (n = 3) seguidas pela mesma letra minúscula, nas colunas, para um mesmo cogumelo e para um mesmo período de cultivo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n=9) seguidas pela mesma letra minúscula (negrito e itálico), nas linhas, para um mesmo cogumelo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra maiúscula, nas colunas, para um mesmo período de cultivo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (u,v), nas colunas, para os cogumelos Shimeji branco fresco e Shimeji branco seco não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (w, x), nas colunas, para os cogumelos Shimeji branco fresco e Hiratake fresco não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (y), nas colunas, para os cogumelos Shiitake de tora e Shiitake de composto não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

3.3. Atividade sequestradora do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato) - ABTS^{•+}

Os resultados obtidos para cada lote, nas diferentes épocas de colheita (verão e inverno), a variação existente entre um mesmo cogumelo colhido em períodos diferentes, bem como a variação entre os cogumelos estudados são apresentados na **Tabela 4**. É importante salientar que estes resultados são estimativos da capacidade antioxidante em equivalente de Trolox, um antioxidante sintético análogo da vitamina E, pois é sabido que os diferentes compostos fenólicos contribuem de uma maneira diferente na reação química envolvida. Os valores obtidos para as amostras analisadas variaram de 1,69 a 113,98 $\mu\text{M ET/g}$ de cogumelo seco para os lotes do cultivo de verão e de 6,33 a 119,14 $\mu\text{M ET/g}$ de cogumelo seco para os lotes do cultivo de inverno.

Os cogumelos que, em média, apresentaram melhores resultados foram Hiratake (105 $\mu\text{M ET/g}$ - cultivo de verão e 98,46 $\mu\text{M ET/g}$ – cultivo de inverno) e Salmon (98,21 $\mu\text{M ET/g}$ e 103,03 $\mu\text{M ET/g}$) seguidos do Shimeji fresco (88,55 $\mu\text{M ET/g}$ e 87,19 $\mu\text{M ET/g}$), Shimeji seco (84,69 $\mu\text{M ET/g}$ e 85,44 $\mu\text{M ET/g}$) e Portobello (76,22 $\mu\text{M ET/g}$ e 89,84 $\mu\text{M ET/g}$). Já o Champignon de Paris em conserva apresentou o valor mais baixo 4,36 $\mu\text{M ET/g}$ (verão) e 7,40 $\mu\text{M ET/g}$ (inverno).

É possível observar que estes resultados estão de acordo aos encontrados no ensaio de quantificação dos compostos fenólicos totais, pois os cogumelos que apresentaram maior teor em CFT também apresentaram melhor habilidade no sequestro do radical livre ABTS^{•+}, assim como o cogumelo que apresentou menor teor CFT também apresentou menor atividade antioxidante neste ensaio. Outro fato observado é que estatisticamente, em média, os extratos dos cogumelos do cultivo de verão apresentaram a mesma ou menor atividade antioxidante que os extratos dos cogumelos do cultivo de inverno. Também é possível dizer que o cogumelo Hiratake, com grau de maturação mais avançado, mostrou melhor atividade antioxidante que o Shimeji, colhido num estágio mais imaturo.

As influências dos processamentos empregados no Champignon de Paris e no Shimeji foram observadas. O Champignon de Paris em conserva mostrou menor atividade antioxidante do que o mesmo cogumelo fresco. O Shimeji seco ao sol do cultivo de verão mostrou menor atividade antioxidante do que o mesmo cogumelo fresco. No entanto, os cogumelos do período de inverno não mostraram diferenças estatisticamente significativas.

O substrato de cultivo influenciou na atividade antioxidante. O cogumelo Shiitake cultivado em tora mostrou maior atividade antioxidante do que o Shiitake cultivado em composto no período de verão. Já no período de inverno não houve diferenças estatisticamente significativas entre eles.

Não foram encontrados na literatura muitos trabalhos envolvendo cogumelos e o ensaio de avaliação da capacidade de seqüestro do radical livre ABTS⁺. Os poucos trabalhos encontrados utilizaram metodologias de análise e extração muito diferentes da encontrada no presente trabalho, além disso, as espécies analisadas são diferentes assim como as condições de cultivo tornando difícil a comparação dos resultados. Como exemplo cito o trabalho de Lo e Cheung (2005) onde extratos de um cogumelo seco (*Agrocybe aegerita* var. *Alba*) foi estudado. A extração foi feita com metanol em um Soxhlet por 24 horas, depois disso o metanol foi removido sob pressão reduzida e o resíduo redissolvido em água destilada e, seqüencialmente, extraído com diclorometano, acetato de etila e saturado de água butanol, usando partição líquido-líquido. Os solventes foram removidos e quatro frações obtidas. A fração de acetato de etila foi a que apresentou maior valor (0,254 mM ET/mg = 254.000 µM ET/g) seguida da fração butanol (0,163 mM ET/mg = 163.000 µM ET/g) e diclorometano (0,162 mM ET/mg = 162.000 µM ET/g). As frações extrato cru metanólico e aquoso apresentaram os menores valores (0,096 mM ET/mg = 96.000 µM ET/g e 0,063 mM ET/mg = 63.000 µM ET/g, respectivamente). Resultado muito diferente dos encontrado no presente trabalho.

3.4. Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP

Os resultados obtidos nesta análise são apresentados na **Tabela 5**. Assim como para a análise de CFT, aqui os valores encontrados são estimativas do poder antioxidante de redução do ferro em equivalente de ácido gálico. E é importante lembrar que os vários compostos fenólicos agem de maneira diferente na reação. Além disso, outros compostos redutores podem interferir na reação.

Os valores obtidos variaram de 0,15 a 2,70 mg EAG/g de amostra seca, para o cultivo de verão, e de 0,24 a 5,55 mg EAG/g de amostra seca, para o cultivo de inverno. Os cogumelos que, em média, apresentaram melhores resultados foram o Portobello com 2,36 mg EAG/g no cultivo de verão e 4,09 mg EAG/g no cultivo de inverno, seguido do Champignon de Paris fresco (1,65 mg EAG/g – verão; 2,96 mg EAG/g - inverno) e Shiitake

Tabela 4. Atividade sequestradora do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato) - ABTS⁺⁺ para as diferentes amostras de cogumelos

μM Equivalente em trolox / g de cogumelo ^a			
Cogumelos	Lotes	Verão	Inverno
<i>Agaricus bisporus</i> branco (Champignon de Paris) FRESCO	1	53,78 ± 0,28 ^a	64,63 ± 0,98 ^c
	2	49,58 ± 0,7 ^a	71,90 ± 1,41 ^b
	3	51,70 ± 2,98 ^a	77,27 ± 0,56 ^a
	Média	51,69 ± 2,38^{b, E-s}	71,27 ± 5,57^{a, C-s}
<i>Agaricus bisporus</i> branco (Champignon de Paris) CONSERVA	1	1,69 ± 0,11 ^c	7,96 ± 0,37 ^a
	2	3,95 ± 0,23 ^b	7,91 ± 0,29 ^a
	3	7,44 ± 0,33 ^a	6,33 ± 0,32 ^b
	Média	4,36 ± 2,52^{b, F-t}	7,40 ± 0,85^{a, D-t}
<i>Agaricus bisporus</i> marrom (Portobello) FRESCO	1	60,74 ± 0,91 ^c	88,24 ± 0,33 ^b
	2	81,84 ± 0,98 ^b	100,68 ± 1,61 ^a
	3	86,08 ± 0,75 ^a	80,61 ± 0,59 ^c
	Média	76,22 ± 11,78^{b, C}	89,84 ± 8,81^{a, A, B}
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Shimeji) FRESCO	1	84,76 ± 0,53 ^b	101,15 ± 0,59 ^a
	2	90,20 ± 0,21 ^a	88,72 ± 0,76 ^b
	3	90,696 ± 1,00 ^a	71,69 ± 0,86 ^c
	Média	88,55 ± 2,91^{a, B, C-u, x}	87,19 ± 12,82^{a, B-u, x}
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Shimeji) SECO	1	88,58 ± 0,44 ^a	85,54 ± 0,64 ^b
	2	80,73 ± 3,18 ^b	91,33 ± 0,32 ^a
	3	84,76 ± 1,70 ^{a, b}	79,46 ± 0,65 ^c
	Média	84,69 ± 3,85^{a, C-v}	85,44 ± 5,16^{a, B-u}
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Hiratake) FRESCO	1	94,51 ± 0,65 ^c	95,22 ± 0,86 ^b
	2	113,30 ± 1,07 ^a	93,45 ± 0,53 ^b
	3	108,40 ± 1,13 ^b	106,70 ± 1,85 ^a
	Média	105,40 ± 8,48^{a, A-w}	98,46 ± 6,32^{a, A, B-w}
<i>Pleurotus ostreatoroseus</i> (Salmon) FRESCO	1	91,90 ± 1,85 ^b	77,98 ± 0,53 ^c
	2	89,42 ± 1,80 ^b	119,14 ± 1,50 ^a
	3	113,98 ± 1,66 ^a	111,98 ± 1,07 ^b
	Média	98,21 ± 11,47^{a, A, B}	103,03 ± 19,07^{a, A}
<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake fresco) TORA	1	55,71 ± 0,78 ^b	63,24 ± 0,71 ^a
	2	56,46 ± 2,99 ^b	56,60 ± 1,12 ^b
	3	87,96 ± 0,86 ^a	62,63 ± 0,33 ^a
	Média	66,71 ± 16,02^{a, D-y}	60,83 ± 3,25^{a, C-y}
<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake fresco) COMPOSTO	1	52,83 ± 2,06 ^b	62,82 ± 0,24 ^a
	2	47,84 ± 0,37 ^c	53,78 ± 0,14 ^c
	3	59,19 ± 0,08 ^a	60,04 ± 0,22 ^b
	Média	53,29 ± 5,04^{b, E-z}	58,88 ± 4,02^{a, C-y}

^aResultados expressos em base seca como média ± desvio padrão de análises realizadas em triplicata.

Médias de cada lote (n = 3) seguidas pela mesma letra minúscula, nas colunas, para um mesmo cogumelo e para um mesmo período de cultivo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n=9) seguidas pela mesma letra minúscula (negrito e itálico), nas linhas, para um mesmo cogumelo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra maiúscula, nas colunas, para um mesmo período de cultivo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (s,t), nas colunas, para os cogumelos Champignon de Paris fresco e Champignon de Paris em conserva não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (u,v), nas colunas, para os cogumelos Shimeji branco fresco e Shimeji branco seco não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (w, x), nas colunas, para os cogumelos Shimeji branco fresco e Hiratake fresco não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (y, z), nas colunas, para os cogumelos Shiitake de tora e Shiitake de composto não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

produzido em composto à base de serragem (1,87 mg EAG/g no cultivo de verão e 2,18 mg EAG/g no cultivo de inverno). O Champignon de Paris em conserva apresentou, em média, o pior valor 0,21 mg EAG/g (verão) e 0,32 mg EAG/g (inverno).

Pode-se afirmar que, em média, os cogumelos Champignon de Paris (fresco e em conserva), Portobello, Salmon e Shiitake (produzido em tora de eucalipto) mostraram diferenças estatísticas entre o cultivo de verão e inverno, apresentando os melhores resultados os cogumelos do cultivo de inverno. Os demais cogumelos não mostraram diferenças estatísticas significativas entre os dois cultivos.

O processamento empregado nos cogumelos Champignon de Paris influenciou na atividade antioxidante final, sendo que os cogumelos frescos apresentaram, em média, atividade antioxidante maior que os cogumelos em conserva para os dois períodos de cultivo (verão e inverno). No caso do cogumelo Shimeji não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas, nos dois períodos de cultivo, entre o cogumelo seco e o fresco.

O grau de maturação mais avançado do cogumelo Hiratake implicou, em média, em uma maior atividade antioxidante em comparação ao cogumelo Shimeji (estágio menos avançado e ainda com o chapéu fechado) para os dois períodos de cultivo.

O substrato de cultivo também influenciou na atividade antioxidante final, sendo que o Shiitake produzido em composto mostrou, em média, maior atividade antioxidante em relação ao Shiitake produzido em tora de eucalipto nos dois períodos de cultivo.

Alvarez-Parrilla et al. (2007) estudaram três cogumelos comestíveis do Norte do México (*Agaricus sp.*, *Boletus sp.* e *Macrolepiota sp.*) e duas espécies comerciais (*Agaricus bisporus* branca e Portobello – *Agaricus bisporus* marrom) e determinaram a atividade antioxidante pelo ensaio FRAP encontrando 10,01 mM Fe^{2+} /100 g de peso seco para a espécie comercial Champignon e 20,03 mM Fe^{2+} /100 g de peso seco para a espécie selvagem. Os valores obtidos são equivalentes de Fe^{2+} , diferente do presente estudo, no qual foi utilizado o ácido gálico como padrão. A forma de expressão dos resultados também foi diferente, o que dificulta ainda mais a comparação dos resultados. Além disso, os autores fizeram as determinações após 30 minutos de reação afirmando que a redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} , na presença de extratos de cogumelos, segue um mecanismo cinético lento e até mesmo depois de trinta minutos a reação não é totalmente completada. Já no presente estudo o tempo de reação utilizado foi de 15 minutos.

Lakshmi et al. (2004) determinaram a atividade antioxidante de vários cogumelos Indianos com o método FRAP, entretanto, os resultados encontrados foram expressos em equivalente de trolox ou de ácido ascórbico não sendo possível a comparação dos resultados.

3.5. Oxygen Radical Absorbance Capacity – ORAC

Não foi encontrado na literatura trabalhos com a matriz cogumelo envolvendo este ensaio de capacidade antioxidante. Neste ensaio a presença de antioxidantes nas amostras resulta na inibição dos danos causados pelos radicais livres ao composto fluorescente. O efeito protetor de um antioxidante é medido pela área de decaimento da fluorescência (AUC) da amostra comparada com a área do branco em que não há presença de antioxidantes (OU et al., 2002). Foram construídas curvas do padrão trolox para a quantificação dos resultados que são apresentados na **Tabela 6**.

Os extratos de cogumelo que apresentaram, em média, os melhores resultados foram o Salmon (223,59 $\mu\text{M ET/g}$ no cultivo de verão e 215 $\mu\text{M ET/g}$ no cultivo de inverno), Hiratake (214,89 $\mu\text{M ET/g}$ e 277,14 $\mu\text{M ET/g}$) e Portobello (202,91 $\mu\text{M ET/g}$ e 250,30 $\mu\text{M ET/g}$).

Assim como para todas as outras análises o Champignon de Paris em conserva apresentou o pior resultado (22,32 $\mu\text{M ET/g}$ e 25,16 $\mu\text{M ET/g}$). Como já mencionado anteriormente este resultado já era esperado, pois essa amostra foi submetida a processos de industrialização, o que pode ter ocasionado a degradação dos compostos fenólicos.

Os cogumelos Champignon de Paris fresco, Portobello e Hiratake, em média, mostraram diferenças estatísticas significativas entre o período de verão e inverno, sendo que a maior atividade antioxidante foi encontrada nos cogumelos cultivados no período de inverno. Os cogumelos Champignon de Paris (em conserva), Salmon e Shiitake de composto não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os dois períodos de cultivo. Os demais cogumelos (Shimeji fresco e Shiitake produzido em tora de eucalipto) mostraram melhor atividade antioxidante no cultivo de verão.

O processamento empregado ao cogumelo Champignon de Paris influenciou na atividade antioxidante final, sendo que os cogumelos frescos apresentaram, em média, atividade antioxidante maior que os cogumelos em conserva para os dois períodos de cultivo. No caso do cogumelo Shimeji cultivado no período de verão foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre o cogumelo fresco e o seco, sendo que o cogumelo fresco mostrou maior

Tabela 5. Capacidade redutora do complexo Fe^{3+} -TPTZ à Fe^{2+} -TPTZ para as diferentes amostras de cogumelos

FRAP (mg Equivalente em ácido gálico/g de cogumelo)*			
Cogumelos	Lotes	Verão	Inverno
<i>Agaricus bisporus</i> branco (Champignon de Paris) FRESCO	1	2,00 ± 0,05 ^a	2,75 ± 0,03 ^b
	2	1,53 ± 0,04 ^b	3,07 ± 0,04 ^a
	3	1,41 ± 0,02 ^c	3,06 ± 0,12 ^a
	Média	1,65 ± 0,27 ^{b, B, C - s}	2,96 ± 0,17 ^{a, B - s}
<i>Agaricus bisporus</i> branco (Champignon de Paris) CONSERVA	1	0,16 ± 0,01 ^b	0,38 ± 0,01 ^a
	2	0,15 ± 0,01 ^b	0,35 ± 0,01 ^b
	3	0,33 ± 0,01 ^a	0,24 ± 0,01 ^c
	Média	0,21 ± 0,09 ^{b, E - t}	0,32 ± 0,06 ^{a, F - t}
<i>Agaricus bisporus</i> marrom (Portobello) FRESCO	1	1,97 ± 0,02 ^c	3,95 ± 0,03 ^b
	2	2,40 ± 0,03 ^b	5,55 ± 0,08 ^a
	3	2,70 ± 0,02 ^a	2,76 ± 0,01 ^c
	Média	2,36 ± 0,32 ^{b, A}	4,09 ± 1,21 ^{a, A}
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Shimeji) FRESCO	1	0,73 ± 0,02 ^c	0,92 ± 0,03 ^a
	2	0,98 ± 0,01 ^a	0,87 ± 0,01 ^a
	3	0,88 ± 0,02 ^b	0,65 ± 0,01 ^b
	Média	0,86 ± 0,11 ^{a, D - u, x}	0,81 ± 0,13 ^{a, E, F - u, x}
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Shimeji) SECO	1	0,85 ± 0,01 ^a	0,83 ± 0,01 ^b
	2	0,86 ± 0,01 ^a	0,97 ± 0,02 ^a
	3	0,77 ± 0,01 ^b	0,79 ± 0,01 ^c
	Média	0,83 ± 0,05 ^{a, D - u}	0,86 ± 0,09 ^{a, E, F - u}
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Hiratake) FRESCO	1	1,01 ± 0,04 ^a	1,11 ± 0,02 ^a
	2	1,05 ± 0,01 ^a	0,93 ± 0,03 ^b
	3	0,87 ± 0,02 ^b	1,07 ± 0,01 ^a
	Média	1,05 ± 0,01 ^{a, D - w}	1,04 ± 0,08 ^{a, E - w}
<i>Pleurotus ostreatoroseus</i> (Salmon) FRESCO	1	1,08 ± 0,03 ^a	0,99 ± 0,03 ^c
	2	0,98 ± 0,02 ^b	1,74 ± 0,04 ^a
	3	1,12 ± 0,03 ^a	1,35 ± 0,04 ^b
	Média	1,05 ± 0,02 ^{b, D}	1,36 ± 0,33 ^{a, D, E}
<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake Fresco) TORA	1	1,52 ± 0,03 ^b	1,84 ± 0,04 ^a
	2	1,37 ± 0,02 ^c	1,82 ± 0,03 ^a
	3	1,62 ± 0,01 ^a	1,61 ± 0,01 ^b
	Média	1,05 ± 0,02 ^{b, C - z}	1,76 ± 0,12 ^{a, C, D - z}
<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake Fresco) COMPOSTO	1	1,74 ± 0,04 ^b	2,00 ± 0,04 ^b
	2	1,54 ± 0,04 ^c	2,82 ± 0,10 ^a
	3	2,35 ± 0,03 ^a	1,71 ± 0,04 ^c
	Média	1,05 ± 0,02 ^{a, B - y}	2,18 ± 0,50 ^{a, C - y}

*Resultados expressos em base seca como média ± desvio padrão de análises realizadas em triplicata.

Médias de cada lote (n = 3) seguidas pela mesma letra minúscula, nas colunas, para um mesmo cogumelo e para um mesmo período de cultivo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n=9) seguidas pela mesma letra minúscula (negrito e itálico), nas linhas, para um mesmo cogumelo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra maiúscula, nas colunas, para um mesmo período de cultivo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (s,t), nas colunas, para os cogumelos Champignon de Paris fresco e Champignon de Paris em conserva não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (u,v), nas colunas, para os cogumelos Shimeji branco fresco e Shimeji branco seco não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (w, x), nas colunas, para os cogumelos Shimeji branco fresco e Hiratake fresco não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (y, z), nas colunas, para os cogumelos Shiitake de tora e Shiitake de composto não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

atividade antioxidante. Já no cultivo de inverno não foi possível verificar diferenças estatisticamente significativas.

O grau de maturação mais avançado do cogumelo *Hiratake* fresco implicou, em média, em uma maior atividade antioxidante em comparação ao cogumelo *Shimeji* fresco (estágio menos avançado) nos dois períodos de cultivo.

O substrato de cultivo também influenciou na atividade antioxidante final, sendo que o *Shiitake* produzido em tora de eucalipto mostrou, em média, maior atividade antioxidante em relação ao *Shiitake* produzido em composto no cultivo de verão. Já no cultivo de inverno não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre os dois cogumelos.

3.6. Correlação entre os teores de CFT, TEAC, FRAP e ORAC

Tem sido relatado que a atividade antioxidante de materiais vegetais é bem correlacionada com seus compostos fenólicos. Dessa forma, é importante considerar o efeito do conteúdo total de fenólicos na atividade antioxidante dos extratos de cogumelos (CHEUNG et al., 2003). É extremamente difícil comparar ensaios diferentes que medem a capacidade antioxidante de uma amostra, uma vez que eles diferem entre si em termos de substrato, sonda, condições de reação e método de quantificação (HUANG et al., 2005).

Partindo das **Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5** onde encontramos os resultados, obtidos para compostos fenólicos totais (CFT), capacidade de sequestro do radical livre DPPH[•] (IC 50 e IAA), capacidade de sequestro do radical livre ABTS^{•+}, capacidade redutora do complexo Fe³⁺ -TPTZ à Fe²⁺ -TPTZ (FRAP) e atividade antioxidante pelo método ORAC respectivamente, aplicou-se um teste de correlação, no qual, utilizou-se todos os valores de cada lote das amostras. Os índices de correlação obtidos (r), entre as análises realizadas, estão apresentados na **Tabela 7**.

O ensaio de quantificação dos compostos fenólicos totais mostrou alta correlação com o ensaio de atividade seqüestradora do radical livre ABTS^{•+} (r = 0,92) e com o ensaio de atividade antioxidante pelo método ORAC (r = 0,89). Também foi possível observar alta correlação entre o ensaio de capacidade redutora do complexo Fe³⁺ -TPTZ à Fe²⁺ -TPTZ e o índice de atividade antioxidante (IAA) (0,95). Entre os ensaios de atividade seqüestradora do radical cátion ABTS^{•+} e o ensaio de atividade antioxidante pelo método ORAC observou-se, também alta correlação (r = 0,89). O IC 50 mostrou alta correlação negativa

Tabela 6. Atividade antioxidante pelo método ORAC para as diferentes amostras de cogumelos.

ORAC (μM equivalente em trolox /g de cogumelo)*			
Cogumelos	Lotes	Verão	Inverno
<i>Agaricus bisporus</i> branco (Champignon de Paris) FRESCO	1	174,27 $\pm$ 5,08 ^a	178,38 $\pm$ 7,46 ^b
	2	157,89 $\pm$ 4,88 ^b	199,34 $\pm$ 7,28 ^a
	3	149,31 $\pm$ 7,92 ^b	186,01 $\pm$ 9,34 ^{a,b}
	Média	160,49 $\pm$ 12,20 ^{b, D - s}	187,91 $\pm$ 11,55 ^{a, C, D - s}
<i>Agaricus bisporus</i> branco (Champignon de Paris) CONSERVA	1	18,52 $\pm$ 2,62 ^b	31,84 $\pm$ 2,41 ^a
	2	21,82 $\pm$ 0,75 ^{a,b}	22,06 $\pm$ 1,41 ^b
	3	26,63 $\pm$ 2,08 ^a	21,57 $\pm$ 1,41 ^b
	Média	22,32 $\pm$ 3,93 ^{a, F - t}	25,16 $\pm$ 5,26 ^{a, F - t}
<i>Agaricus bisporus</i> marrom (Portobello) FRESCO	1	164,16 $\pm$ 2,45 ^c	275,19 $\pm$ 5,13 ^b
	2	250,98 $\pm$ 4,87 ^a	285,49 $\pm$ 2,65 ^a
	3	193,60 $\pm$ 6,17 ^b	190,22 $\pm$ 2,84 ^c
	Média	202,91 $\pm$ 38,46 ^{b, A, B}	250,30 $\pm$ 45,40 ^{a, A, B}
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Shimeji) FRESCO	1	186,12 $\pm$ 8,58 ^b	175,88 $\pm$ 0,15 ^b
	2	213,23 $\pm$ 6,91 ^a	190,87 $\pm$ 2,20 ^a
	3	175,21 $\pm$ 9,76 ^b	113,53 $\pm$ 1,77 ^c
	Média	191,52 $\pm$ 18,48 ^{a, B, C - u, x}	160,09 $\pm$ 35,55 ^{b, D, E - u, x}
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Shimeji) SECO	1	172,31 $\pm$ 7,97 ^a	164,90 $\pm$ 5,22 ^b
	2	172,73 $\pm$ 3,38 ^a	175,30 $\pm$ 4,73 ^{a,b}
	3	152,53 $\pm$ 8,86 ^b	183,17 $\pm$ 6,17 ^a
	Média	165,86 $\pm$ 11,76 ^{a, C, D - v}	174,46 $\pm$ 9,21 ^{a, C, D - u}
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Hiratake) FRESCO	1	198,36 $\pm$ 3,04 ^b	227,53 $\pm$ 1,66 ^b
	2	202,25 $\pm$ 2,29 ^b	299,39 $\pm$ 9,90 ^a
	3	244,05 $\pm$ 6,16 ^a	304,49 $\pm$ 7,40 ^a
	Média	214,89 $\pm$ 22,24 ^{b, A, B - w}	277,14 $\pm$ 37,79 ^{a, A - w}
<i>Pleurotus ostreatoroseus</i> (Salmon) FRESCO	1	222,2 $\pm$ 4,91 ^b	170,31 $\pm$ 9,24 ^c
	2	204,65 $\pm$ 7,38 ^b	276,47 $\pm$ 9,98 ^a
	3	243,91 $\pm$ 8,52 ^a	198,21 $\pm$ 7,84 ^b
	Média	223,59 $\pm$ 18,11 ^{a, A}	215,00 $\pm$ 48,31 ^{a, B, C}
<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake Fresco) TORA	1	135,67 $\pm$ 9,14 ^b	134,39 $\pm$ 7,46 ^a
	2	139,27 $\pm$ 9,79 ^b	117,48 $\pm$ 6,49 ^b
	3	172,84 $\pm$ 5,65 ^a	134,93 $\pm$ 3,48 ^a
	Média	149,26 $\pm$ 19,19 ^{a, D - y}	128,94 $\pm$ 10,06 ^{b, E - y}
<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake Fresco) COMPOSTO	1	122,79 $\pm$ 3,31 ^a	116,70 $\pm$ 6,94 ^b
	2	116,53 $\pm$ 3,08 ^{a,b}	135,67 $\pm$ 7,13 ^a
	3	110,21 $\pm$ 3,66 ^b	97,02 $\pm$ 6,40 ^c
	Média	116,51 $\pm$ 6,18 ^{a, E - z}	116,46 $\pm$ 17,75 ^{a, E - y}

*Resultados expressos em base seca como média $\pm$ desvio padrão de análises realizadas em triplicata.

Médias de cada lote (n = 3) seguidas pela mesma letra minúscula, nas colunas, para um mesmo cogumelo e para um mesmo período de cultivo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n=9) seguidas pela mesma letra minúscula (negrito e itálico), nas linhas, para um mesmo cogumelo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra maiúscula, nas colunas, para um mesmo período de cultivo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (s,t), nas colunas, para os cogumelos Champignon de Paris fresco e Champignon de Paris em conserva não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (u,v), nas colunas, para os cogumelos Shimeji branco fresco e Shimeji branco seco não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (w, x), nas colunas, para os cogumelos Shimeji branco fresco e Hiratake fresco não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra (y, z), nas colunas, para os cogumelos Shiitake de tora e Shiitake de composto não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

($r = -0,86$) com o IAA e com o FRAP ($r = -0,76$), no entanto com o ORAC mostrou a mais baixa correlação ($-0,04$).

Os resultados obtidos no ensaio de atividade seqüestradora do radical livre ABTS^{•+} e os IAA obtidos no ensaio com o radical DPPH[•] apresentaram baixa correlação negativa ($r = -0,13$) apesar dos dois métodos apresentarem o mesmo mecanismo de reação. Isto pode ser explicado pelo fato de se utilizar radicais diferentes e tempos de reação diferentes (SILVA et al., 2007). Além disso, a forma de expressão dos resultados pode ser preponderante. De acordo com SILVA et al. (2007) se os resultados obtidos no ensaio com o radical DPPH[•] tivessem sido expressos em equivalente de trolox (mesmo padrão utilizado na análise TEAC) uma comparação mais objetiva poderia ter sido possível.

Os índices de correlação obtidos, entre as diferentes análises de atividade antioxidante, por diferentes pesquisadores podem divergir bastante. Chye et al. (2008) encontrou forte correlação negativa ($r = -0,978$) entre a atividade de seqüestro do radical DPPH[•] e o conteúdo de fenóis totais. Em seu estudo, a amostra que apresentou menor teor de compostos fenólicos totais exibiu a maior atividade antioxidante. Este fato foi justificado pela presença de outros compostos, além dos fenólicos, com atividade antioxidante. Cheung, et al. (2003) encontraram forte e positiva correlação ($r = 0,99$) entre a atividade de seqüestro do radical DPPH[•] e o conteúdo de fenóis totais nos extratos do cogumelo *L. edodes*.

Thaipong et al. (2006) estimaram a atividade antioxidante total de extratos obtidos de frutos de goiaba, pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC, e verificaram que FRAP foi a técnica mais reprodutível e aquela que apresentou uma elevada correlação com os teores de ácido ascórbico e grupos fenólicos. Alvarez-Parrilla et al. (2007) também encontraram boa correlação ($r = 0,97$) entre CFT e FRAP. No presente trabalho, diferentemente dos referenciados, a análise de CFT e FRAP não mostraram boa correlação ($r = 0,45$).

A partir do teste de correlação aplicado é possível concluir que nem sempre os resultados obtidos nas análises de atividade antioxidante seguirão necessariamente o mesmo padrão dos valores obtidos para análise de compostos fenólicos totais, podendo haver discordâncias entre os resultados, assim como entre as análises de atividade antioxidante, pois as mesmas podem apresentar diferentes mecanismos de ação, diferentes

tempos de reação, diferentes padrões de referência e diferentes formas de expressão dos resultados, tornando a comparação difícil.

Tabela 7. Correlação entre os resultados obtidos nas análises de CFT, DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP e ORAC.

	CFT	DPPH (IAA)	ABTS ^{•+}	FRAP	ORAC
DPPH (IAA)	0,24	-	-	-	-
ABTS^{•+}	0,92	- 0,13	-	-	-
FRAP	0,45	0,95	0,24	-	-
ORAC	0,89	0,18	0,89	0,42	-
DPPH[•] (IC 50)	- 0,14	- 0,86	0,24	- 0,76	- 0,04

3.7. Atividade Antimicrobiana

Os resultados obtidos para este teste são apresentados na **Tabela 8**.

O crescimento das bactérias *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388), *Bacillus subtilis* (ATCC 5061), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708) não foi inibido pelos extratos de praticamente todos os cogumelos, considerando uma MIC máxima de 10 mg/mL, com exceção ao extrato do Shiitake de tora do período de inverno que apresentou uma leve inibição ao crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. Já o crescimento das leveduras *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida rugosa* (CBS 12), *Candida tropicalis* (CBS 94), *Candida glabrata* (CBS 07) e *Candida utilis* (CBS 5609) foi inibido pelos extratos dos cogumelos Shiitake de tora e Shiitake de composto com as concentrações mínimas inibitórias (CIMs) variando entre 0,08 e 0,31 mg/mL.

Não foi possível determinar a concentração mínima inibitória dos extratos dos cogumelos Champignon de Paris e Portobello, pois os mesmos apresentavam coloração escura, provavelmente devido ao escurecimento enzimático, impedindo a visualização da mudança de cor no meio de cultura. Dessa forma, realizou-se a determinação da concentração mínima bactericida e fungicida, a qual resultou em concentrações maiores que 10 mg/mL.

Os resultados obtidos para os extratos dos cogumelos Shiitake foram bastante interessantes, apresentando CIMs muito baixas contra as leveduras *Candida spp.* Esses fungos fazem parte da microbiota residente da cavidade bucal, sendo comumente considerados microrganismos comensais inofensivos. No entanto, sob determinadas circunstâncias, podem superar as defesas do hospedeiro e agir como oportunistas,

produzindo diversas manifestações clínicas superficiais ou ainda podem estar associados a outras doenças (GOÉS, 2009). Outro fator que deve ser levado em consideração é que comparadas às infecções bacterianas, poucas drogas estão disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas. Isto se deve à natureza eucariótica das células fúngicas e a dificuldade em identificar alvos únicos não compartilhados com hospedeiros humanos (ONYEWU et al., 2003).

Os tratamentos existentes atualmente são efetivos contra as infecções, mas linhagens e espécies resistentes de *Candida* estão emergindo e novos tratamentos para infecções sistêmicas necessitam ser desenvolvidos. Os azóis utilizados no combate às infecções fúngicas apresentam o inconveniente de serem, muitas vezes, fungistáticos e não fungicidas, o que provavelmente contribui para o desenvolvimento de resistência nos isolados clínicos de pacientes imunocomprometidos (GOÉS, 2009).

Pesquisas anteriores já demonstraram a capacidade antimicrobiana de substâncias obtidas do cogumelo Shiitake. Em estudo realizado por Di Piero (2003) foi testada a atividade antibiótica contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* utilizando cortinelina, composto isolado de *Lentinus edodes* (Shiitake) e outro composto antibacteriano formado por um álcool β -fenetil e lentinamicina isolado a partir de cultura líquida de micélio. Em outro estudo Hirasawa et al. (1999) realizaram extrações no Shiitake desidratado em água a 4°C e fracionaram com os solventes clorofórmio, acetato de etila e água. Os extratos clorofórmicos apresentaram atividade bactericida contra células vegetativas e células de resistência de *Streptococcus mutans*, o principal agente causador de cáries dentárias e contra *Prevotella intermédia*, provocador de doença periodontal em adultos. Neste trabalho Hirasawa et al. (1999) afirmaram que os principais componentes dos extratos clorofórmico e aquoso podem ser lentionina e lentinan, respectivamente.

Em estudo realizado por Kitzberger et al. (2007) foram testados extratos do cogumelo Shiitake obtidos por extração super crítica e extração líquido-líquido com solventes orgânicos contra a levedura *Candida albicans*. Ocorreu inibição do crescimento somente na maior concentração testada do extrato (2 mg/mL), indicando que possivelmente este microrganismo seja resistente a ação antifúngica destes extratos. O mesmo não ocorreu no presente estudo, no qual se obteve CIMs, dos extratos aquosos de Shiitake testados, variando entre 0,08 e 0,31 mg/mL contra cinco diferentes espécies de *Candida spp.*

Hearst et al. (2009) realizaram um estudo microbiológico que avaliou as propriedades antibacteriana e antifúngica dos cogumelos Shiitake e ostra (*Pleurotus ostreatus*) adquiridos em um supermercado local na Irlanda. Foram 39 microrganismos testados sendo 29 bactérias e 10 fungos. Extratos aquosos de ambos os cogumelos foram testados e o extrato do cogumelo Shiitake demonstrou atividade contra 33 dos 39 microrganismos testados enquanto que o extrato do cogumelo ostra apresentou atividade contra apenas 3 dos 39 microrganismos testados (*Bacillus cereus* NCTC 7464, *Bacillus subtilis* NCTC 10400 e *Pseudomonas sp* 1). Diferentemente, no presente trabalho, o extrato do cogumelo *Pleurotus ostreatus* não mostrou atividade contra *Bacillus subtilis* e o extrato do cogumelo Shiitake (de tora) mostrou baixa atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* e alta atividade contra a levedura *Candida albicans*, a qual não foi inibida pelo extrato do trabalho refecenciado.

Turkoglu et al. (2007) encontraram atividade antimicrobiana, contra *Candida albicans* e *Bacillus subtilis*, no extrato do cogumelo *Laetiporus sulphureus*, coletado na Turquia. Oyetayo (2009) também encontrou atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, nos extratos etanólicos de 4 espécies de cogumelos selvagens da Nigéria. Os extratos mostraram boa atividade e a CIM variou entre 12,5 e 100 mg/mL. Melhor resultado foi obtido no presente trabalho, pois a CIM encontrada para os extratos do cogumelo Shiitake contra a levedura *Candida albicans* foram mais baixas.

Tabela 8. Atividade antimicrobiana encontrada para os extratos aquosos de cogumelos

Concentração mínima inibitória, concentração mínima bactericida, concentração mínima fungicida (mg/mL)																
Microrganismos	Extratos aquosos de cogumelos															
	Champignon de Paris fresco		Portobello		Shimeji fresco		Shimeji seco		Hiratake		Salmon		Shiitake de tora		Shiitake de composto	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	**	**	**	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	9	*	*
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	**	**	**	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 13388	**	**	**	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	**	**	**	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	7	*	*
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 5061	**	**	**	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	7	*	*
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	***	***	***	***	*	*	*	*	*	*	*	*	0,08	0,16	0,16	0,02
<i>Candida rugosa</i> CBS 12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,31	0,31	0,16	0,16
<i>Candida tropicalis</i> CBS 94	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	*	*	*	*
<i>Candida glabrata</i> CBS 07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,16	0,16	0,08	0,08
<i>Candida utilis</i> CBS 5609	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,31	0,31	0,31	0,31

* Concentração mínima inibitória (MIC) > 10mg/mL; ** Concentração mínima bactericida (MBC) > 10mg/mL; *** Concentração mínima fungicida (MFC) > 10mg/mL; n.d. = não determinado.

4. CONCLUSÃO

Os extratos aquosos dos cogumelos Champignon de Paris fresco (*Agaricus bisporus* branco), Portobello fresco (*Agaricus bisporus* marrom), Shimeji fresco e seco (*Pleurotus ostreatus*), Hiratake fresco (*Pleurotus ostreatus*), Salmon fresco (*Pleurotus ostreatoroseus*) e Shiitake (*Lentinula edodes*), cultivado em tora de eucalipto e em composto à base de serragem, mostraram atividade antioxidante para os quatro métodos empregados. No entanto, a capacidade antioxidante dos extratos de cogumelos comestíveis estudados não foi tão alta como a encontrada em outros alimentos, mas, ainda assim, podem contribuir significativamente para uma boa condição de saúde.

Na análise com o radical DPPH[•] o Portobello e o Champignon de Paris fresco apresentaram os menores valores de IC₅₀, indicando maior ação antioxidante por esta metodologia. Na análise com o radical ABTS^{•+} e no ORAC os cogumelos que apresentaram maior ação antioxidante foram o Hiratake e o Salmon. Na análise FRAP os cogumelos que apresentaram maior atividade antioxidante foram o Champignon de Paris fresco, Portobello e Shiitake cultivado em composto.

O grau de maturação mais avançado do cogumelo Hiratake, em relação ao Shimeji fresco, implicou em uma maior atividade antioxidante em todos os métodos empregados.

Nesta investigação, os extratos aquosos obtidos a partir dos cogumelos Salmon, Hiratake e Portobello apresentaram os maiores teores de CFT.

O processamento empregado ao cogumelo Champignon de Paris diminuiu consideravelmente o teor de CFT enquanto que no processo de secagem empregado ao cogumelo Shimeji não houve diminuição drástica no teor de CFT.

O estágio maturo dos cogumelos *P. ostreatus* implicou em um maior teor de CFT em relação ao estágio imaturo.

Correlações positivas entre os resultados de CFT e os métodos de atividade antioxidante foram encontradas, e essa correlação foi maior para o ensaio com o radical livre ABTS^{•+} e o ORAC do que para o ensaio FRAP. Já entre o DPPH e os resultados de CFT foi encontrada baixa correlação negativa.

Os extratos aquosos dos cogumelos Shiitake apresentaram excelente atividade antimicrobiana contra as leveduras *C. albicans*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. utilis* mostrando seu potencial de utilização pela indústria farmacêutica.

5. REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-PARRILLA, E., DE LA ROSA, L. A., MARTÍNEZ, N. R., GONZÁLEZ AGUIAR, G. A. Total phenols and antioxidant activity of commercial and wild mushrooms from Chihuahua, Mexico. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 5, n. 5, p. 329-334, 2007.
- BARROS, L., DUEÑAS, M., FERREIRA, I. C. F. R., BAPTISTA, P., SANTOS-BUELGA, C. Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1076-1079, 2009.
- BENZIE, I. F. F. & STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 292, p. 70-76, 1996.
- DÁVALOS, A., GÓMEZ-CORDOVÉS, C., BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluoresein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 48-54, 2004.
- DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 52, n. 4, p. 455-463, 1999.
- DI PIERO, R.M. Pontencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (shiitake) e *Agaricus blazei* (cogumelo-do-sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos. Tese de doutorado apresentada ao curso de Pós-graduação da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” de Piracicaba, Universidade de São Paulo, 2003.
- ELMASTAS, M., ISILDAK, O., TURKEKUL, I., TEMUR, N. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 337-345, 2007.
- CHEN, X. –H., XIA, L. –X., ZHOU. H. –B., QIU, G. –Z. Chemical composition and antioxidant activities of *Russula griseocarnosa* sp. nov. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6966-6971, 2010.
- CHEUNG, L. M., CHEUNG, P. C. K., OOI, V. E. C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, v. 81, p. 249-255, 2003.

- CHYE, F. Y., WONG, J. Y., LEE, J.-S. Nutritional quality and antioxidant activity of selected edible wild mushrooms. **Food Science and Technology International**, v. 14 , p. 375-384, 2008.
- CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica – 2ª Edição, M27-A2, v.22, n.15, 2002.
- CLSI. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico – 6ª Edição, M7-A6, v.23, n.2, 2005.
- DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELENA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, n. 2, p. 305-311, 2005.
- FINKEL, T. & HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 9, p. 239–247, 2000.
- GEORGE, S., BRAT, P., ALTER, P., & AMIOT, M. J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1370–1373, 2005.
- GÓES, V. F. F. Ação de extratos, óleos essenciais e frações isoladas de plantas medicinais sobre a formação do biofilme em *Candida spp.* Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção de grau de Doutor (a) em Biologia Buco-Dental, área de concentração em Microbiologia e Imunologia, 2009.
- HALLIWELL, B. Free radical and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.
- HEARST, R., NELSON, D., MCCOLLUM, G., MILLAR, B. C., MAEDA, Y., GOLDSMITH, C. E., ROONEY, P. J., LOUGHREY, A., RAO, J. R., MOORE, J. E. An examination of bacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 15, p. 5-7, 2009.
- HIRASAWA, M.; SHOUJI, N.; NETA, T.; FUKUSHIMA, K.; TAKADA, K., Three kinds of bacterial substances from *Lentinula edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom), International Journal of Antimicrobial Agents, n°11, p.151-157, 1999.
- HUANG, D., OU, B., PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

- KITZBERGER, C. S. G., J. SMÂNIA JR, A., PEDROSA, R. C., FERREIRA, S. R. S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 631-638, 2007.
- LAKSHMI, B., TILAK, J. C., ADHIKARI, S., DECASAGAYAM, T. P. A., JANARDHANAN, K. K. Avaluation of antioxidant activity of selected indian mushrooms. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, p. 179-185, 2004.
- LANGSETH, L. **Antioxidants and their effects on health**. In: SCHMIDL, M. K., LABUZA, T. P. Essential of foods. Maryland: Aspen Publication, p. 303-317, 2000.
- LEE, Y-L., YEN, M-T., MAU, J-L. Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizigus marmoreus*. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1-9, 2007.
- LO, K. M., PETER, CHEUNG, P. C. K. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. **Food Chemistry**, v. 89, p. 533-539, 2005.
- OEI, P. & NIEUWENHUIJZEN, B. V. O cultivo de cogumelos em pequena escala pleuroto, shiitake e orelha-de-pau. **Agrodok 40**. ISBN Agromisa: 90-8573-049-X, ISBN CTA: 92-9081-321-0, 2006.
- OYETAYO, V. O. Free radical scavenging and antimicrobial properties of extracts of wild mushrooms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 380-386, 2009.
- ONYEWU, C., BLANKENSHIP, J.R., DEL POETA, M., HEITMAN, T., Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcinairin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemother**, v. 47, p. 956-64, 2003.
- OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.49, p. 4619-4626, 2001
- PAULI, P. A de. Avaliação da composição química, compostos bioativos e atividade antioxidante em cogumelos comestíveis. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos, 2010.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

- PRIOR, R. L., WU, X., SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.
- PUTTARAJU, N. G., VENKATESHAIAH, S. U., DHARMESH, S. M., URS, S. M. N., SOMASUNDARAM, R. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9764-9772, 2006.
- RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., & RICA-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, p. 1231–1237, 1999.
- RIBEIRO, B., RANGEL, J., VALENTÃO, P., BAPTISTA, P., SEABRA, R. M., ANDRADE, P. B. Contents of carboxylic acids and two pheolics and antioxidant activity of dried Portuguese wild edible mushrooms. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8530-8537, 2006.
- RIBEIRO, B., LOPES, R., ANDRADE, P. B., SEABRA, R. M., GONÇALVES, BAPTISTA, P., QUELHAS, I., VALENTÃO, P. Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. **Food Chemistry**, v. 110, p. 47-56, 2008.
- SCALBERT, A., MANACH, C., MORAND, C., RÉMÉSY, C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 287-306, 2005.
- SCHERER, R. & GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil method. **Food Chemistry**, v. 112, p. 654-658, 2009.
- SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazônia region. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1012-1018. 2007.
- SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of Total Phenols and Others Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, vol. 299, p. 152, 1999.
- THAIPONG, K., BOONPRAKOB, U., CROSBY, K., CISNEROZEVALLOS, L., BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 669 – 675. 2006.

- TURKOGLU, A. DURU, M. E., MERCAN, N., KIVRAK, I., GEZER, K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. **Food Chemistry**, v. 101, p. 267-273, 2007.
- URBEN, A. F. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. 2 ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 20-41, 2004.
- YALTIRAK, T., ASLIM, B., OZTURK, S., ALLI, H. Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2052-2056, 2009.

**COMPOSIÇÃO FENÓLICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE COGUMELOS
COMESTÍVEIS PRODUZIDOS NO BRASIL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIÊNCIA**

Jessica Maria Silva Sousa¹, Helena Teixeira Godoy¹

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de
Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil

Manuscrito em preparação a ser submetido para publicação no periódico Ciência e
Tecnologia de Alimentos (ISSN 0101-2061).

RESUMO

O interesse na investigação dos compostos fenólicos tem crescido bastante nos últimos tempos. Estudos recentes apontam que estes compostos previnem doenças relacionadas ao envelhecimento devido as suas propriedades antioxidantes. Este trabalho analisa a composição fenólica de extratos aquosos de cogumelos comestíveis Champignon de Paris (*Agaricus bisporus* branco), Portobello (*Agaricus bisporus* marrom), Salmon (*Pleurotus ostreatoroseus*), Shimeji (*Pleurotus ostreatus*), Hiratake (*Pleurotus ostreatus*) e Shiitake (*Lentinula edodes*) produzidos no Brasil. Os compostos fenólicos investigados foram ácido 3,4-dihidroxibenzóico, ácido *p*-hidroxibenzóico, catequina, ácido caféico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido ferrúlico e ácido trans-cinâmico. O método cromatográfico empregado mostrou boa linearidade e repetibilidade. Os limites de detecção variaram entre 0,025 e 0,5 mg/L e os limites de quantificação variaram entre 0,075 e 1,5 mg/L. Os valores de recuperação encontrados na matriz para os compostos fenólicos investigados variaram entre 60% a 99%. O ácido 3,4-dihidroxibenzóico apresentou baixa recuperação (entre 21 a 30%), pois se encontrava em uma região do cromatograma com muitos interferentes. Dentre os compostos investigados por CLAE foram identificados e quantificados nas amostras de cogumelos apenas os ácidos siríngico, *p*-cumárico e o trans-cinâmico, com predominância deste último. O cogumelo Salmon apresentou os três compostos; os cogumelos Shimeji (fresco e seco) e Hiratake apresentaram o ácido *p*-cumárico e o ácido trans-cinâmico; já os cogumelos Champignon de Paris, Portobello e Shiitake (cultivado em tora de eucalipto e em composto à base de serragem) apresentaram apenas o ácido trans-cinâmico. Estes resultados demonstram que os cogumelos comestíveis produzidos no Brasil podem contribuir para uma boa condição de saúde devido à presença desses compostos fenólicos.

Palavras-chave: compostos fenólicos, cogumelos e CLAE.

ABSTRACT

The interest in the investigation of phenolic compounds has grown in recent years. Recent studies indicate that these compounds prevent age-related diseases due to their antioxidant properties. This work analyzes the phenolic composition of aqueous extracts of edible mushrooms *Agaricus bisporus* white, *Agaricus bisporus* brown, *Pleurotus ostreatoroseus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes* produced in Brazil. The phenolic compounds investigated were 3,4-dihydroxybenzoic acid, p-hydroxybenzoic acid, catechin acid, caffeic acid, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and trans-cinnamic acid. The chromatographic method used showed good linearity and repeatability. The limits of detection ranged of 0.025 to 0.5 mg/L and the limits of quantification ranged of 0.075 to 1.5 mg/L. The recovery values for the phenolic compounds ranged of 60% to 99%. The 3,4-dihydroxybenzoic acid showed a low recovery because was in a chromatogram region with so many interferents. Among the compounds investigated were identified and quantified, in mg/kg mushroom lyophilisate, the syringic acid, the p-coumaric acid and the trans-cinnamic acid, with predominance of the latter. The mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* had the three compounds; the mushrooms *Pleurotus ostreatus* had the p-coumaric acid and trans-cinnamic acid; the *Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes* had only the trans-cinnamic acid. These results demonstrate that edible mushrooms can contribute for a good health condition due to the presence of antioxidants.

Keywords: phenolic compounds, mushrooms and HPLC.

1. INTRODUÇÃO

O consumo de cogumelos comestíveis tem aumentado devido ao reconhecimento de suas propriedades bioativas que trazem benefícios à saúde. A natureza química dos compostos que fazem parte de sua composição são responsáveis pelas suas propriedades bioativas. Os cogumelos acumulam uma variedade de metabólitos secundários, incluindo compostos fenólicos, policetídeos, terpenos e esteróides (SUN et al., 2007).

Os fenólicos são compostos que possuem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxila e podem variar de moléculas simples (ácidos fenólicos, fenilpropanóides, flavonóides) a compostos altamente polimerizados (ligninas, melaninas, taninos) (BRAVO, 1998). Particularmente, os ácidos fenólicos podem ser subdivididos em dois grupos: ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxibenzóicos incluem *p*-hidroxibenzóico, protocatecúico, vanílico, sirínico e ácido gálico. Eles estão comumente presentes na forma ligada e, tipicamente, compõem estruturas complexas como ligninas e taninos hidrolizáveis. Eles, também, podem ser encontrados ligados a derivados de açúcares e ácidos orgânicos em alimentos vegetais. Os ácidos hidroxicinâmicos incluem o *p*-cumárico, o caféico, o ferrúlico e o sinápico. Em fontes naturais eles são principalmente encontrados esterificados com pequenas moléculas como o ácido quínico ou o ácido tartárico, bem como ligados a componentes estruturais da parede celular como celulose, lignina e proteínas através de ligações ésteres (LIU, 2004).

A análise destes compostos é difícil, pois, além de englobarem uma gama muito grande de substâncias, são, na maioria das vezes, muito reativos e susceptíveis à ação de enzimas. Além disso, a análise de fenólicos é influenciada pela natureza do composto, o método de extração utilizado, tamanho da amostra, tempo e as condições de estocagem e a presença de interferentes tais como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas (SHAHIDI & NACZK, 1995; KING & YOUNG, 1999).

Não há um método único satisfatório para a extração de todos ou de uma classe específica de fenólicos presentes nos alimentos. A solubilidade dos fenólicos nos solventes varia de acordo com o solvente utilizado, o grau de polimerização dos fenólicos e suas interações com outros constituintes dos alimentos. Os solventes mais utilizados para a extração destes compostos são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Na revisão de literatura apresentada na **Tabela 1** foram encontrados diversos trabalhos que relatam a identificação e/ou quantificação de diferentes compostos fenólicos em cogumelos selvagens e/ou cultivados da Índia, Portugal, Turquia, China e Coréia. É possível verificar uma enorme variedade de metodologias de extração de compostos fenólicos que podem influenciar nos resultados de análises de atividade antioxidante e antimicrobiana, assim como na identificação e quantificação desses compostos.

Os compostos fenólicos pertencem a um grupo de componentes não essenciais da dieta que têm sido associados à inibição de doenças como aterosclerose e câncer (PUTTARAJU et al. 2006). Algumas evidências sugerem que a ação biológica destes compostos está relacionada ao seu potencial antioxidante. Esse potencial pode estar relacionado à sua habilidade de quelar metais, inibir lipoxigenase e sequestrar radicais livres (DECKER, 1997).

Dessa forma, torna-se extremamente relevante estudar os compostos fenólicos presentes em cogumelos. No entanto, não foram encontrados relatos sobre o perfil fenólico de cogumelos comestíveis produzidos no Brasil. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo investigar o perfil fenólico de extratos aquosos de 4 espécies de cogumelos comestíveis (*Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus ostreatoroseus* e *Lentinula edodes*) produzidas no Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras

As amostras de Champignon de Paris (*Agaricus bisporus* branco), Portobello (*Agaricus bisporus* marrom), Salmon (*Pleurotus ostreatoroseus*), Shimeji (*Pleurotus ostreatus*), Hiratake (*Pleurotus ostreatus*) e Shiitake (*Lentinula edodes*) foram fornecidas por uma empresa localizada na região de Campinas – SP, Brasil, em dois períodos distintos, Fevereiro de 2011 (Verão) e Junho de 2011 (Inverno). Foram obtidos 3 lotes, com 600 gramas cada um, de cada amostra para cada um dos períodos de cultivo. Uma vez coletadas, as amostras foram congeladas, liofilizadas, trituradas em um moinho analítico da marca Ika (modelo A11 Basic Mill), acondicionadas em embalagens de polipropileno e armazenadas em freezer até o momento das análises. Na **Tabela 2** podem ser observados dados da amostragem realizada.

Tabela 1. Extração, instrumentação e condições cromatográficas para análise de compostos fenólicos presentes em diferentes espécies cogumelos.

Pesquisadores	Cogumelos	Extração	Instrumento e condições cromatográficas (HPLC)	Compostos fenólicos encontrados
Puttaraju et al., 2006	23 espécies crescidas naturalmente na Índia	1g amostra seca em pó + 10 mL H ₂ O ou Metanol → 15 min Agitação → 15 min Centrifugação (2000 g) → Sobrenadante = Extrato → 4°C até análise	Shimpak C ₁₈ (4,6 mm x 250 mm) DAD (280 nm e 320 nm) Isocrática → H ₂ O/Ác. acético/Metanol (80:5:15) (v/v/v) → 1mL/min	Ác. tânico (0,02 – 15,54 mg/g) e Ác. gálico (0,04 - 12,85 mg/g) Ác. gentísico (0,01 - 4,89mg/g), Ác. protocatecúico (0,01 - 18,48 mg/g) e Ác. cumárico (0,02 – 3,70 mg/g). Foram encontrados, também, Ác. vanílico, Ác. siríngico, Ác. caféico, Ác. ferrúlico e Ác. cinâmico.
Barros et al., 2009	16 espécies coletadas no nordeste de Portugal	3g amostra seca em pó + 50 mL Acetona: H ₂ O (80:20) → 6 h Mistura -20°C → 15 min ultrassom → 10 min Centrifugação (4000 g) → Filtração → Reextração do resíduo 3 adicionais da mistura Acetona: H ₂ O (80:20) → Extratos combinados → Evaporados a 30° C. Fase aquosa lavada com n-hexano → extração liq-liq com éter dietílico (3 x 50 mL) e acetato etila (3 x 50 mL) → Fases orgânicas evaporadas a 30°C → redissolvidos em H ₂ O : Metanol (80:20) → Filtração	Spherisorb C ₁₈ (3µm, 150 mm x 4,6 mm i. d.) Termostato 25°C DAD (280 nm) Termostato 25°C. Gradiente → (A) Ác. Acético em H ₂ O 2,5%, (B) Ác. Acético 2,5% : Acetonitrila (90: 10) e (C) Acetonitrila 100% → 0,5 mL/min	Ác. protocatecúico (33,47 - 342,7 mg/Kg), Ác. p-hidroxibenzóico (14 – 70 mg/Kg), Ác. p-cumárico (3,75 – 48,67 mg/Kg) e Ác. cinâmico (8,72 – 68,37 mg/Kg). Foram encontrados isômeros do ácido vanílico.
Vaz et al., 2011	17 espécies (diferentes do trabalho de Barros et al., 2009) coletadas no nordeste de Portugal	Idem ao Barros et al. (2009)	Aqua C ₁₈ (3µm, 150 mm x 4,6 mm i. d.) Termostato 30°C DAD (280 nm) Gradiente → Idem ao Barros et al. (2009)	Ác. protocatecúico (1,02 – 67,62 mg/Kg), Ác. p-hidroxibenzóico (2,04 – 41,92 mg/Kg), Ác. p-cumárico (8,65 – 79,34 mg/Kg) e Ác. cinâmico (0,43 – 46,04 mg/Kg)
Ribeiro et al., 2006	28 cogumelos coletados no nordeste de Portugal	10g amostra seca em pó + 500 mL H ₂ O fervente → 30 min Agitação → Filtração → Liofilização → Dessecador no escuro à temperatura ambiente	Spherisorb ODS2 (25 x 0,46 cm; 5 µm) DAD (280 nm para o ácido p-hidroxybenzóico e 350 nm para quercetina) Gradiente → (A) H ₂ O : Ácido fórmico (19:1) (B) Metanol → 0,9 mL/min	Ác. p-hidroxibenzóico (35,5 – 490 mg/Kg) e Quercetina (2 – 15,9 mg/Kg)
Ribeiro et al., 2007	<i>Fistulina hepática</i> coletados na região de Bragança no nordeste de Portugal.	Idem ao Ribeiro et al. (2006)	Spherisorb ODS2 (25 x 0,46 cm; 5 µm) DAD (250 nm para o ácido elágico, 320 nm para o ácido caféico e p-cumárico e 350 nm para hiperosídeo e quercetina) Gradiente → (A) H ₂ O : Ácido fórmico (19:1) (B) Metanol → 0,9 mL/min	Ác. caféico (99 – 139,7 mg/Kg), Ác. p-cumárico (94,8 – 162,3 mg/Kg), hiperosídeo (não quantificado), Ác. elágico (171,1 – 284,6 mg/Kg) e quercetina (não quantificado).

Continuação da Tabela 1

Pesquisadores	Cogumelos	Extração	Instrumento e condições cromatográficas (HPLC)	Compostos fenólicos encontrados
Ribeiro et al., 2008	4 espécies comestíveis de cogumelos silvestres coletados de pomares na região de Bragança no nordeste de Portugal.	Idem ao Ribeiro et al. (2006)	Spherisorb ODS2 (25 x 0,46 cm; 5 µm) DAD (280 nm para o ácido p-hidroxibenzoico) Gradiente → (A) H ₂ O : Ácido fórmico (19:1) (B) Metanol → 0,9 mL/min	Ác. p-hidroxibenzoico (13,6 - 70 mg/Kg) Outros compostos fenólicos com absorção máxima por volta de 260 nm foram detectados em todas as amostras analisadas, mas não foi possível identificá-los.
Yaltirak et al., 2009	<i>Russula delica</i> Fr.produzido na Turquia.	25g amostra seca em pó + Etanol → Soxhlet apparatus 60 °C por 3h → extrato filtrado → rota evaporador 75°C → estocado 4°C	Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5µm) DAD (278 nm) Isocrática → Ác. acético 3% / Metanol → 0,8 mL/min	Catequina (5,3 mg/L), Rutina (0,46 mg/L), Ác. caféico (0,11 mg/L) e Ác. gálico (0,05 mg/L).
Valentão et al., 2005	<i>Cantharellus cibarius</i> (Coletados na região de Bragança em Portugal)	~1g amostra seca + 5 x 50 mL Metanol → Misturadas → Filtração → Rota evaporador 40°C	Spherisorb ODS2 (25 x 0,46 cm; 5 µm) DAD (280 nm para hidroxitirosol e tirosol e 320 nm para ácidos fenólicos e 350 para flavonóides) Gradiente → (A) H ₂ O: Ác fórmico (19:1) e (B) Metanol → 0,9 mL/min.	Ác. 3- e 4-o-caffeoylquinic, Ác. caféico, Ác. p-cumárico e Rutina. Os níveis encontrados foram muito baixos (~20 mg/Kg).
Chen et al., 2010	<i>Russula griseocarnosa</i> coletadas no sul da China	5 g amostra seca em pó + 30 mL Acetonitrila e 6 mL de ácido hidrocloreídrico 0,1 N → agitação 2h à temperatura ambiente → filtração	Hypersil BDS-C ₁₈ (4,6 x 200 mm, 5µm) Detector SPM-M10AVP (273 nm) Gradiente → (A) Metanol e (B) Fosfato 0,1% → 1mL/min	De trinta compostos fenólicos investigados apenas três foram identificados e quantificados: Ác. protocatecúico, Ác. caféico e Quercetina (marjoritário 95,82 mg/Kg).
Kim et al., 2008	5 espécies comestíveis compradas em um mercado na Coreia e 5 espécies medicinais coletadas em uma fazenda na Coreia	2 g amostra seca em pó + 10 mL acetonitrila e 2 mL de ácido hidrocloreídrico 0,1 N → 2h agitação à temp. ambiente → filtração → extrato liofilizado → residuo redissolvido em 10 mL de solução aquosa de metanol 80% → filtração	ODS AM-303 (250 mm x 4,6 mm i. d. 5 µm) DAD (280 nm) Gradiente → (A) H ₂ O destilada com 0,1% ácido acético e (B) acetonitrila 0,1% ác acético glacial → 1 mL/min	Catequina (3 – 22 mg/Kg) , Naringina (8 – 38 mg/Kg), Miricetina (19 – 26 mg/Kg), Quercetina (24 – 52 mg/Kg), Bichanin A (3 mg/Kg), Formononetin (1 mg/Kg), Hesperetin (3 mg/Kg), Kaempferol (7 – 53 mg/Kg), Ác. gálico (5 – 21 mg/Kg), Pirogalol (15 – 464 mg/Kg), Ác. homogentísico (15 – 51 mg/Kg), Ác. 5-sulfosalicílico (15 – 53 mg/Kg), Ác. protocatecúico (14 – 96 mg/Kg), Ác. gentísico (53 mg/Kg), Ác. p-hidroxibenzoico (6 – 263 mg/Kg), Ác. clorogênico (19 – 26 mg/Kg), Ác. vanílico (5 mg/Kg), Ác. caféico (13 – 18 mg/Kg), Ác. siríngico (5 – 22 mg/Kg), Vanilina (5 mg/Kg), Ác. cinâmico (1 mg/Kg), Ác. p-cumárico (37 mg/Kg), Ác. ferrúlico (9 – 22 mg/Kg), Ác. veratrico (12 mg/Kg), Ác. benzoico (348 – 490 mg/Kg), Ác. o-cumárico (1 mg/Kg) e Resveratrol (1 -12 mg/Kg).

Tabela 2. Amostras, formas de comercialização e substrato utilizado no cultivo.

Amostra	Forma de comercialização	Substrato de cultivo*
<i>Agaricus bisporus</i> branco (Champignon de Paris)	Fresco	Composto
<i>Agaricus bisporus</i> branco (Portobello)	Fresco	Composto
<i>Pleurotus ostreatus</i> ** (Shimeji)	Fresco	Composto
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Shimeji)	Seco (ao sol)	Composto
<i>Pleurotus ostreatus</i> ** (Hiratake)	Fresco	Composto
<i>Pleurotus ostreatoroseus</i> (Salmon)	Fresco	Composto
<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake)	Fresco	Tora de eucalipto
<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake)	Fresco	Composto à base de serragem e resíduos da agroindústria

*Não foram obtidas maiores informações sobre a composição dos substratos de cultivo.

**Os cogumelos Shimeji e Hiratake são ambos *Pleurotus ostreatus*, diferindo apenas no estágio de maturação, isto é, enquanto o Hiratake é colhido com o chapéu aberto (maturo) o Shimeji é colhido com o chapéu fechado (imaturo).

2.2. Preparo dos extratos

A extração dos compostos fenólicos foi realizada com base nos trabalhos de Puttaraju et al. (2006), Lee et al. (2007) e Ribeiro et al. (2008).

Para cada 1g de cogumelo seco e moído foi adicionado 10 mL de H₂O destilada. Essa mistura foi agitada durante 15 minutos e em seguida centrifugada por 15 minutos à 5000 g sob uma temperatura de 20°C. Depois disso uma filtração foi realizada e o filtrado obtido foi considerado como extrato e mantido à 4°C até o momento das análises.

2.3. Reagentes

Utilizou-se acetonitrila grau cromatográfico (J. T. Baker SOLUSORB® solven, USA) e ácido fórmico (ECIBRA, Brasil). A água utilizada para preparar a fase móvel foi purificada usando o sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis foram filtradas com filtros MILLIPORE com poros de 0,45 µm de diâmetro.

Os padrões de ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxibenzóico, ácido p-hidroxibenzóico, catequina, ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico e ácido trans-cinâmico foram obtidos da SIGMA. Já o padrão de ácido sirínico foi obtido da CHEM SERVICE. As soluções estoques foram preparadas em metanol grau cromatográfico (J. T. Baker SOLUSORB® solven, USA), em concentrações que variaram para cada composto fenólico.

2.4. Instrumento

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido HP (Hewlett Packard) série 1100, equipado com degaseificador, bomba quaternária, injetor automático com capacidade de 1 a 100 µL e detector de arranjo de diodos (UV – VIS). A coluna analítica utilizada foi uma Agilent Eclipse XDB - C₁₈ (4,6 x 250 mm, 5 µm). Para a análise dos dados utilizou-se um sistema de software HP-Chemstation acoplado ao cromatógrafo.

2.5. Condições cromatográficas

O método cromatográfico utilizado foi baseado na metodologia desenvolvida e validada por Facco (2006).

A fase móvel utilizada para separação dos compostos fenólicos constituiu-se de (A) água ultrapura : ácido fórmico (996 mL : 4 mL) e (B) acetonitrila : ácido fórmico (996 mL : 4 mL) em gradiente descrito na **Tabela 3**, a uma vazão de 0,7 mL/min, temperatura da coluna a 35°C, e volume de injeção de 100 µL, com tempo de corrida de 50 min, mantendo-se 10 min de re-equilíbrio do sistema antes da próxima injeção. A detecção foi realizada em detector de arranjo de diodos (DAD) operando à 280 nm.

Tabela 3. Gradiente da fase móvel

Solventes	Tempo (min)						
	0	10	25	38	40	45	50
% A	95	91	83	70	40	10	95
% B	5	9	17	30	60	90	5

A- água milli Q : ácido fórmico (996 mL : 4 mL) e B - acetonitrila : ácido fórmico (996 mL : 4 mL)

2.6. Parâmetros de desempenho analítico

Os parâmetros de desempenho analítico testados para o método cromatográfico adaptado aos extratos aquosos de cogumelos foram: linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade, precisão intermediária e recuperação.

A faixa de linearidade do método cromatográfico, realizada em solvente, foi verificada apenas para os compostos fenólicos encontrados nas amostras (ácido sirínico, ácido *p*-cumárico e ácido trans-cinâmico), sendo as curvas de calibração construídas com, no mínimo, 6 pontos, cada um em triplicata.

Para a determinação do limite de detecção foram realizadas sucessivas diluições dos compostos fenólicos (ácido 3,4 – dihidroxibenzóico, ácido *p*-hidroxibenzóico, catequina,

ácido caféico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico e ácido trans-cinâmico) em concentrações conhecidas adicionadas à matriz *Lentinula edodes* (Shiitake), até que se obtivesse um sinal como sendo três vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento ($\text{sinal/ruído} \geq 3$), o valor da concentração de cada composto fenólico correspondente a estes sinais foram considerados como menor quantidade detectável (ANVISA, 2003). O limite de quantificação foi considerado como sendo três vezes o valor do limite de detecção.

A avaliação da precisão foi realizada através da repetibilidade (precisão intra-corrida) e da precisão intermediária (precisão inter-corridas) do método para os compostos fenólicos encontrados nas matrizes. A determinação foi feita no cogumelo *Lentinula edodes* (Shiitake), cultivado em composto à base de serragem e resíduos da agroindústria, enriquecido com padrões. Para a avaliação da repetibilidade foram realizadas 9 determinações contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações (2,5 mg/L, 4,5 mg/L e 6,5 mg/L), com três réplicas cada, em um mesmo dia. Para a avaliação da precisão intermediária o mesmo procedimento foi adotado, sendo realizado em três diferentes dias (ANVISA, 2003).

A avaliação da exatidão foi feita através de testes de recuperação dos padrões de compostos fenólicos adicionados ao cogumelo, liofilizado e transformado em pó, Shiitake (*Lentinula edodes*) cultivado em composto à base de serragem e resíduos da agroindústria. Para essa determinação analisou-se inicialmente o teor de compostos fenólicos naturalmente presentes na matriz. Posteriormente, adicionou-se o pool de padrões ao pó de cogumelo que foi submetido à extração normalmente. Foram realizadas 9 determinações em três níveis de concentração (2,5 mg/L, 4,5 mg/L e 6,5 mg/L), com três réplicas cada nível. O cálculo de recuperação foi feito de acordo com ANVISA (2003), através da seguinte equação:

$$\text{Recuperação} = \frac{(\text{Concentração média experimental})}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \%$$

2.7. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

A identificação foi feita através da comparação entre os cromatogramas das amostras e o cromatograma do pool de padrões. Essa comparação foi realizada com base nos tempos de retenção, espectro de absorção e co-cromatografia.

A quantificação dos compostos fenólicos encontrados nas amostras de cogumelos foi realizada através de curvas de padronização externa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Parâmetros de desempenho analítico

Para dar início ao processo experimental foi utilizada uma metodologia de separação de compostos fenólicos desenvolvida por Facco (2006).

Para avaliação da linearidade, foram construídas curvas de calibração em um intervalo linear apenas para os compostos encontrados nos diferentes cogumelos aqui analisados. A faixa linear obtida para os compostos fenólicos identificados nas amostras ficou entre 0,5 - 6,5 mg/L para o ácido sirínico e ácido p-cumárico e entre 0,5 – 7,5 mg/L para o ácido trans-cinâmico e conferiam resultados satisfatórios com coeficientes de determinação (r^2) maiores que 0,99, como é possível ver na **Tabela 4**.

Tabela 4. Equação da curva, coeficiente de determinação (r^2) e linearidade dos compostos fenólicos encontrados nas amostras de cogumelos

Compostos	Equação da curva	r^2	Linearidade (mg/L)
Ácido sirínico	$Y = 513,89X - 105,35$	0,9904	0,5 – 6,5
Ácido p-cumárico	$Y = 919,96X - 390,45$	0,9933	0,5 – 6,5
Ácido trans-cinâmico	$Y = 1657X - 464,37$	0,9906	0,5 – 7,5

Os limites de quantificação e detecção determinados para todos os compostos fenólicos investigados na metodologia empregada neste trabalho são apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Limite de quantificação (LD) e limite de detecção (LQ) para os compostos fenólicos analisados.

Compostos	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
Ácido 3,4-Dihidroxibenzóico	0,5	1,5
p -hidroxibenzóico	0,5	1,5
Catequina	0,5	1,5
Ácido caféico	0,25	0,75
Sirínico	0,125	0,375
Ácido p -cumárico	0,0625	0,1875
Ácido ferrúlico	0,25	0,75
Ácido trans-cinâmico	0,025	0,075

A precisão foi avaliada pelos coeficientes de variação (CV %) calculados para o tempo de retenção e área dos compostos. Foi considerado aceitável coeficientes de variação menores do que 10 % (RIBANI et al., 2004). Como pode-se observar nas **Tabelas 6 e 7** os CV% encontrados para os três níveis de concentração analisados variaram entre 0,3 e 1,7% para o tempo de retenção e entre 0,81 e 6,97% para a área.

Os valores de recuperação encontrados nos 3 níveis de concentração analisados são apresentados na **Tabela 8**. De acordo com Ribani et al. (2004) dependendo da complexidade analítica e da amostra, o intervalo de recuperação pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$. Neste estudo os valores de recuperação variaram de 62,3 a 89,3% para o ácido *p*-hidroxibenzóico, de 69,1 a 87,4% para a catequina, de 63,8 a 77% para o ácido caféico, de 76,3 a 99,7% para o ácido siríngico, de 60,1 a 67,4% para o ácido *p*-cumárico, de 68,9% e 74,2% para o ácido ferrúlico e 76,3% a 84% para o ácido trans-cinâmico. Somente para o ácido 3,4-dihidroxibenzóico as taxas de recuperação foram muito baixas variando entre 21,2 e 29,3%. Provavelmente essa baixa taxa de recuperação se deu devido à dificuldade encontrada para identificar esse ácido fenólico no cromatograma, uma vez que ele se encontrava em uma região com muitos interferentes.

3.2. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

A seleção dos padrões utilizados na investigação dos compostos fenólicos foi realizada a partir dos resultados obtidos em pesquisas científicas, que empregaram diferentes extratos de cogumelos das mais variadas espécies encontradas em países como Índia, Portugal, Turquia, China e Coréia, uma vez que não foram encontrados trabalhos relatando o perfil fenólico dos cogumelos comestíveis produzidos no Brasil (ver **Tabela 1**).

No presente trabalho, após criteriosa investigação e comparação de espectros e tempos de retenção foi possível, dentre os oito compostos investigados, identificar nos extratos aquosos de cogumelos três compostos fenólicos (ácido siríngico, ácido *p*-cumárico e ácido trans-cinâmico). Nota-se que dentre as amostras estudadas, o cogumelo *P. ostreatoroseus* (Salmon) foi o único que apresentou os três compostos juntos e os cogumelos *P. ostreatus* (Shimeji fresco/seco e Hiratake) os únicos que apresentaram dois compostos, muito embora não tenha sido possível quantificar o ácido *p*-cumárico no Hiratake, pois os teores se encontravam abaixo do limite de quantificação. Nos demais cogumelos *A. bisporus* branco (Champignon de Paris), *A. bisporus* marrom (Portobello)

Tabela 6. Resultados da avaliação da repetibilidade do método. Média (n = 3), desvio padrão e coeficiente de variação (CV%).

Compostos	Nível	Repetibilidade									
		Tempo (min)			Média ± Desvio Padrão	CV%	Área			Média ± Desvio Padrão	CV%
Ácido siringico	1	17,5	17,3	17,1	17,3 ± 0,2	1,2	746,8	729,9	717,0	731,2 ± 15	2,0
	2	17,1	17,1	17,3	17,2 ± 0,1	0,4	1493,2	1526,6	1510,5	1510,1 ± 16,7	1,1
	3	17,3	17,3	17,6	17,4 ± 0,2	1,0	2522,0	2495,0	2320,4	2445,8 ± 109,4	4,5
Ácido p-cumárico	1	22,5	22,3	22,4	22,4 ± 0,1	0,3	1399,0	1273,4	1335,6	1336,0 ± 62,8	4,7
	2	22,4	22,3	22,4	22,4 ± 0,1	0,3	2466,8	2439,6	2428,1	2444,8 ± 19,9	0,8
	3	22,1	22,4	22,3	22,3 ± 0,2	0,8	3954,1	3873,6	3464,6	3764,1 ± 262,5	7,0
Ácido trans-cinâmico	1	40,1	39,0	40,3	39,8 ± 0,7	1,7	3541,6	3346,4	3326,4	3404,8 ± 118,9	3,5
	2	40,0	40,0	40,2	40,1 ± 0,1	0,3	5004,4	4789,1	4659,8	4817,7 ± 174,1	3,6
	3	39,4	40,1	39,6	39,7 ± 0,4	0,9	7814,2	7789,3	7593,7	7732,4 ± 120,7	1,6

Nível 1 = 2,5 mg/L, Nível 2 = 4,5 mg/L, Nível 3 = 6,5 mg/L

Tabela 7. Resultados da avaliação da precisão intermediária do método. Média (n = 9), desvio padrão e coeficiente de variação (CV%).

Compostos	Nível	Precisão intermediária									
		Tempo (min)			Média ± Desvio Padrão	C. V. (%)*	Área			Média ± Desvio Padrão	C. V. (%)*
Ácido siringico	1	17,5	17,3	17,1	17,3 ± 0,1	0,7	746,8	729,9	717,0	702,0 ± 38,7	5,5
	1	17,2	17,3	17,4			698,6	676,5	657,1		
	1	17,2	17,2	17,2			761,5	670,8	659,7		
	2	17,1	17,1	17,3	17,2 ± 0,0	0,3	1493,2	1526,6	1510,5	1583,4 ± 96,0	6,1
	2	17,2	17,1	17,2			1730,8	1694,2	1504,1		
	2	17,1	17,2	17,1			1690,1	1590,5	1510,6		
	3	17,3	17,3	17,6	17,2 ± 0,2	0,9	2522,0	2495,0	2320,4	2470,6 ± 80,7	3,3
	3	17,1	17,1	17,1			2551,3	2579,4	2498,8		
	3	17,2	17,1	17,2			2434,1	2423,8	2410,7		
Ácido p-cumárico	1	22,5	22,3	22,4	22,3 ± 0,1	0,5	1399,0	1273,4	1335,6	1327,3 ± 57,5	4,3
	1	22,2	22,2	22,4			1422,0	1243,6	1322,5		
	1	22,2	22,2	22,2			1353,1	1296,3	1300,1		
	2	22,4	22,3	22,4	22,2 ± 0,1	0,6	2466,8	2439,6	2428,1	2513,8 ± 129,0	5,1
	2	22,2	22,0	22,2			2663,2	2409,5	2448,0		
	2	22,1	22,2	22,1			2785,1	2546,4	2437,5		
	3	22,1	22,4	22,3	22,2 ± 0,1	0,6	3954,1	3873,6	3464,6	3794,4 ± 155,9	4,1
	3	22,1	22,1	22,1			3914,9	3784,4	3897,6		
	3	22,2	22,1	22,3			3872,7	3727,8	3660,4		
Ácido trans-cinâmico	1	40,1	39,0	40,3	39,7 ± 0,4	1,0	3541,6	3346,4	3326,4	3303,4 ± 148,6	4,5
	1	39,7	40,0	39,7			3365,7	3401,8	3379,2		
	1	39,4	39,4	39,4			3103,9	3141,1	3124,6		
	2	40,0	40,0	40,2	39,8 ± 0,3	0,8	5004,4	4789,1	4659,8	5065,8 ± 241,2	4,8
	2	39,7	39,5	40,1			5137,8	5097,7	5037,0		
	2	39,4	39,6	39,4			5490,0	5229,1	5147,3		
	3	39,4	40,1	39,6	39,6 ± 0,3	0,7	7814,2	7789,3	7593,7	7570,6 ± 332,3	4,4
	3	39,4	39,4	39,5			7946,6	7841,3	7699,9		
	3	39,6	39,4	40,0			7209,1	7186,2	7054,8		

* Coeficiente de variação.

Nível 1 = 2,5 mg/L, Nível 2 = 4,5 mg/L, Nível 3 = 6,5 mg/L

Tabela 8. Valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração estudado e para todos os compostos fenólicos analisados.

Compostos Fenólicos	Nível	Recuperação*			Média ± Desvio Padrão	C.V. (%)**
Ácido 3,4 - dihidroxibenzóico	1	25,2	29,7	29,3	28,1 ± 2,5	9,0
	2	26,5	21,7	21,2	23,1 ± 3,0	12,8
	3	24,9	23,8	23,2	23,9 ± 0,9	3,7
Ácido p-hidroxibenzóico	1	79,7	77,6	62,3	73,2 ± 9,5	13,0
	2	81,6	68,3	67,3	72,4 ± 8,0	11,0
	3	89,3	83,5	82,4	85,1 ± 3,7	4,4
Catequina	1	76,6	87,4	74,0	79,3 ± 7,1	9,0
	2	77,7	69,1	72,7	73,2 ± 4,3	5,9
	3	78,7	74,3	73,0	75,3 ± 3,0	3,9
Ácido caféico	1	74,9	63,9	63,8	67,5 ± 6,4	9,5
	2	75,9	64,2	63,9	68,0 ± 6,8	10,0
	3	77,0	73,8	67,3	72,7 ± 4,9	6,8
Ácido siríngico	1	89,3	76,3	80,0	81,9 ± 6,7	8,2
	2	96,5	85,5	81,1	87,7 ± 7,9	9,1
	3	99,7	95,0	89,7	94,8 ± 5,0	5,3
Ácido p-cumárico	1	60,7	66,3	63,0	63,3 ± 2,8	4,5
	2	62,2	61,1	60,1	61,1 ± 1,0	1,7
	3	67,4	62,3	63,4	64,4 ± 2,7	4,2
Ácido ferrúlico	1	71,9	71,3	68,9	70,7 ± 1,6	2,2
	2	72,4	69,5	70,2	70,7 ± 1,6	2,2
	3	74,2	72,7	70,1	72,3 ± 2,1	2,9
Ácido trans-cinâmico	1	78,8	78,7	76,3	77,9 ± 1,4	1,8
	2	82,9	80,9	82,1	82,0 ± 1,0	1,2
	3	84,0	81,7	83,0	82,9 ± 1,2	1,4

* Réplicas da recuperação para cada nível de cada composto investigado.

** Coeficiente de variação

Nível 1 = 2,5 mg/L, Nível 2 = 4,5 mg/L, Nível 3 = 6,5 mg/L

e *Lentinula edodes* (Shiitake) foi identificado o ácido trans-cinâmico. No entanto, neste último cogumelo não foi possível fazer a quantificação, pois as concentrações se encontravam abaixo do limite de quantificação.

Na **Figura 1** são apresentados os cromatogramas obtidos para o pool de padrões e para uma amostra do cogumelo Salmon (*Pleurotus ostreatoroseus*).

Os resultados de quantificação obtidos são apresentados na **Tabela 9**. Pode-se observar uma grande variação do teor dos compostos fenólicos entre os três lotes analisados para cada tipo de cogumelo, assim como entre as duas diferentes épocas de colheita (verão e inverno). Essa grande variação pode ser justificada pelos inúmeros fatores que interferem na composição química dos cogumelos como as condições de cultivo (época de cultivo e coleta, temperatura, clima, luminosidade, umidade etc), grau de maturação, cepa e substrato de cultivo, mesmo sendo uma cultura com condições de cultivo muito controladas.

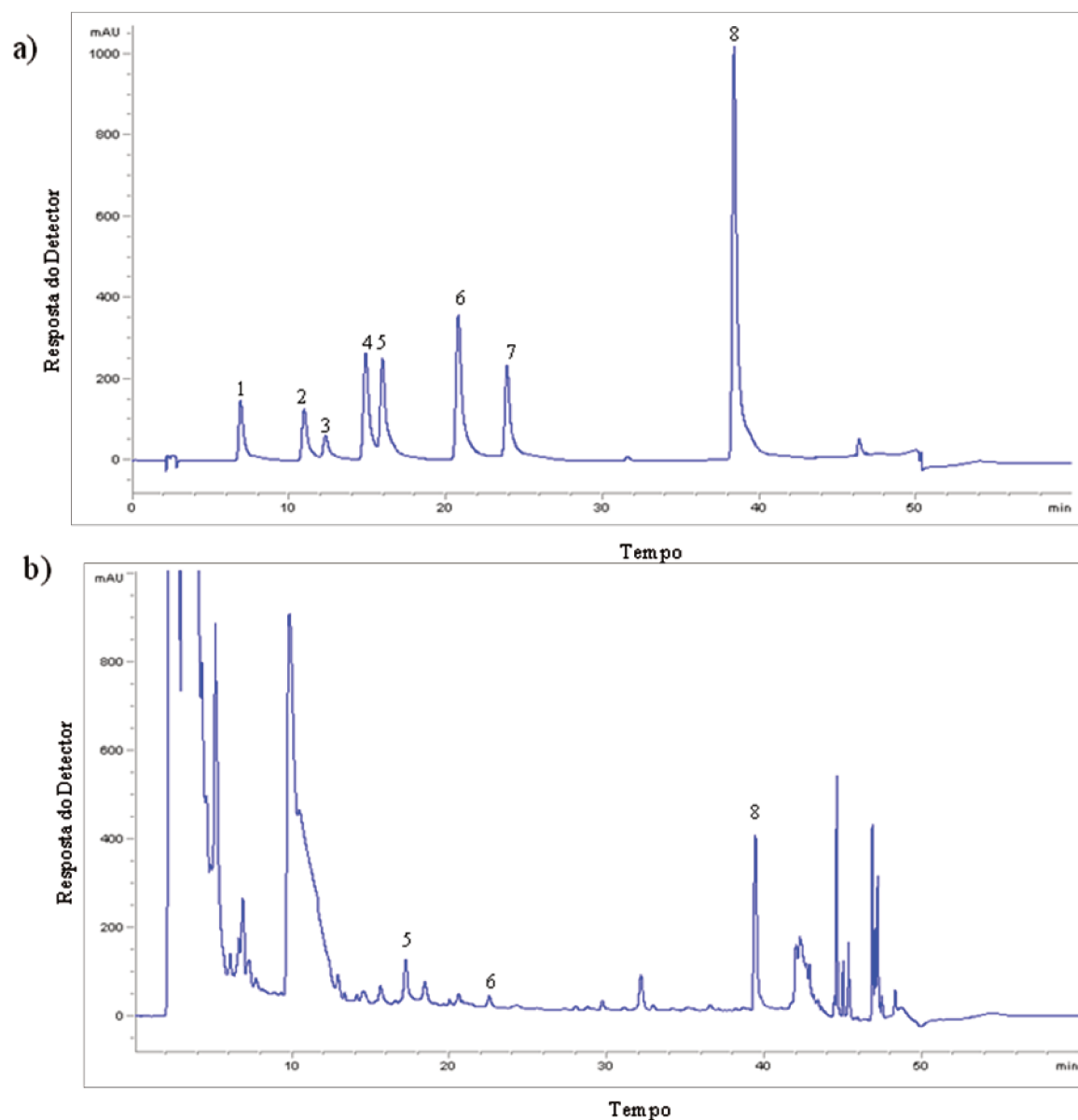


Figura 1. a) Cromatograma de separação dos padrões de compostos fenólicos obtido segundo as condições cromatográficas utilizadas no presente estudo. b) Cromatograma obtido para o extrato aquoso do cogumelo Salmon. (1) Ácido 3,4-dihidroxibenzóico, (2) Ácido p-hidroxibenzóico, (3) Catequina, (4) Ácido caféico, (5) Ácido siríngico, (6) Ácido p-cumárico, (7) Ácido ferrúlico e (8) Ácido trans-cinâmico.

Os resultados de quantificação obtidos são apresentados na **Tabela 9**. Pode-se observar uma grande variação do teor dos compostos fenólicos entre os três lotes analisados para cada tipo de cogumelo, assim como entre as duas diferentes épocas de colheita (verão e inverno). Essa enorme variação pode ser justificada pelos inúmeros fatores que interferem na composição química dos cogumelos como as condições de cultivo (época de cultivo e coleta, temperatura, clima, luminosidade, umidade etc), grau de maturação, cepa e substrato de cultivo, mesmo sendo uma cultura com condições de cultivo muito controladas.

Tabela 9. Concentração dos compostos fenólicos presente nos extratos de cogumelos obtidos e analisados segundo as condições estabelecidas neste estudo

[] Compostos fenólicos (mg/Kg de cogumelo)						
Lote	Ácido Siríngico		Ácido p-cumárico		Ácido trans-cinâmico	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno
1	1	nd	nd	nd	12,93 ± 0,63 ^b	24,20 ± 1,34 ^b
	2	nd	nd	nd	5,83 ± 0,41 ^c	25,85 ± 0,64 ^b
	3	nd	nd	nd	25,15 ± 1,88 ^a	77,19 ± 0,95 ^a
	Média	nd	nd	nd	14,63 ± 8,52 ^{b,B}	42,41 ± 26,11 ^{a,A}
2	1	nd	nd	nd	12,41 ± 0,56 ^a	6,10 ± 0,41 ^c
	2	nd	nd	nd	10,16 ± 0,63 ^b	10,71 ± 0,10 ^b
	3	nd	nd	nd	5,51 ± 0,21 ^c	39,67 ± 0,21 ^a
	Média	nd	nd	nd	9,36 ± 3,08 ^{a,B}	18,83 ± 15,76 ^{a,B}
3	1	nd	nd	7,34 ± 0,02 ^b	13,87 ± 0,49 ^a	5,61 ± 0,03 ^b
	2	nd	nd	7,35 ± 0,03 ^b	10,16 ± 0,41 ^b	5,63 ± 0,03 ^b
	3	nd	nd	19,02 ± 0,37 ^a	7,35 ± 0,02 ^c	15,95 ± 0,59 ^a
	Média	nd	nd	11,23 ± 5,85 ^{a,A}	10,45 ± 2,85 ^{a,A}	9,06 ± 5,18 ^{b,B}
4	1	nd	nd	19,56 ± 0,70 ^b	10,60 ± 0,38 ^a	27,33 ± 0,70 ^a
	2	nd	nd	8,48 ± 0,50 ^b	8,46 ± 0,32 ^b	8,21 ± 0,46 ^c
	3	nd	nd	10,49 ± 0,11 ^a	15,46 ± 0,25 ^c	9,85 ± 0,53 ^b
	Média	nd	nd	12,84 ± 5,13 ^{a,A}	11,51 ± 3,12 ^{a,A}	15,13 ± 9,19 ^{a,B}
5	1	nd	nd	nq	nq	8,38 ± 0,60 ^a
	2	nd	nd	nq	nq	5,60 ± 0,02 ^c
	3	nd	nd	nq	nq	6,89 ± 0,04 ^b
	Média	nd	nd	nq	nq	6,96 ± 1,24 ^{a,B}
6	1	48,44 ± 1,29 ^a	27,06 ± 1,17 ^c	9,2 ± 0,32 ^a	7,4 ± 0,04 ^b	34,86 ± 0,12 ^b
	2	18,37 ± 0,17 ^c	36,55 ± 0,50 ^a	7,3 ± 0,01 ^b	26,7 ± 0,94 ^a	24,11 ± 0,31 ^c
	3	22,17 ± 0,61 ^b	30,48 ± 1,81 ^b	7,3 ± 0,01 ^b	7,3 ± 0,01 ^b	72,28 ± 4,55 ^a
	Média	29,66 ± 14,20 ^a	31,36 ± 4,31 ^a	8,0 ± 1,00 ^{a,A}	13,84 ± 9,69 ^{a,A}	43,75 ± 22,02 ^{b,A}
7	1	nd	nd	nd	nd	nq
	2	nd	nd	nd	nd	nq
	3	nd	nd	nd	nd	nq
	Média	nd	nd	nd	nd	nq
8	1	nd	nd	nd	nd	nq
	2	nd	nd	nd	nd	nq
	3	nd	nd	nd	nd	nq
	Média	nd	nd	nd	nd	nq

Resultados expressos em base seca como média ± desvio padrão.

Médias de cada lote (n = 3) seguidas pela mesma letra para um mesmo cogumelo e para um mesmo período (verão ou inverno) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes por período (verão ou inverno) (n = 9) seguidas pela mesma letra, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

1 = Champignon de Paris fresco (*Agaricus bisporus* branco), 2 = Portobello (*Agaricus bisporus* marrom), 3 = Shimeji branco fresco (*Pleurotus ostreatus*), 4 = Shimeji branco seco (*Pleurotus ostreatus*), 5 = Hiratake (*Pleurotus ostreatus*), 6 = Salmon (*Pleurotus ostreatoroseus*), 7 = Shiitake de tora (*Lentinula edodes*), 8 = Shiitake de composto (*Lentinula edodes*), nd = não detectado, nq = não quantificado.

Os teores de compostos fenólicos encontrados variaram entre 18,37 e 48,44 mg/Kg de cogumelo seco para o ácido siríntrico, encontrado apenas no cogumelo Salmon, entre 7,3 e 26,7 mg/Kg de cogumelo seco para o ácido *p*-cumárico e entre 5,51 e 75,83 mg/Kg de cogumelo seco para o ácido trans-cinâmico. Em média, o cogumelo Salmon apresentou 29,66 mg/Kg (cultivo de verão) e 31,36 mg/Kg (cultivo de inverno) de ácido siríntrico. Os cogumelos Shimeji fresco e Shimeji seco, nos quais foi possível a quantificação do ácido *p*-cumárico mostraram, em média, teores estatisticamente iguais. O cogumelo que apresentou maior teor de ácido trans-cinâmico foi o Salmon com 43,75 mg/Kg no cultivo de verão e 62,84 mg/Kg no cultivo de inverno. Já o Hiratake apresentou o menor teor com 6,96 mg/Kg no cultivo de verão e 6,43 mg/Kg no cultivo de inverno. O efeito do grau de maturação nos cogumelos da espécie *Pleurotus ostreatus* foi observado e pode-se perceber que o cogumelo colhido em estágio maduro (Hiratake) apresentou menores teores dos ácidos *p*-cumárico e trans-cinâmico em comparação aos cogumelos colhidos em estágio imaturo (Shimeji).

Puttaraju et al. (2006) analisaram extratos aquosos, obtidos de forma semelhante ao presente estudo, de 23 espécies de cogumelos crescidas naturalmente na Índia e encontraram um teor de ácido cumárico variando entre 20 e 3.700 mg/Kg em base seca, valor este bem maior ao encontrado no presente estudo. Além disso, identificaram e quantificaram o ácido protocatecúico (ou ácido 3,4 – dihidroxibenzóico) com teores variando entre 10 e 18.480 mg/Kg, resultado distinto do presente estudo, no qual não foi possível a identificação deste composto, provavelmente por este ácido fenólico estar localizado em uma região do cromatograma com muitos interferentes. Barros et al. (2009) também quantificaram o ácido protocatecúico (33,47 - 342,7 mg/Kg) e o ácido *p*-cumárico (3,75 - 48,67 mg/Kg) em espécies de cogumelos coletadas em Portugal, sendo que os teores foram inferiores aos encontrados por Puttaraju (2006).

Ribeiro et al. (2006) estudaram extratos aquosos de 28 cogumelos, coletados em Portugal, e identificaram o ácido *p*-hidroxibenzóico (35,5 – 490 mg/Kg), ao contrário do presente estudo que não o identificou nas amostras de cogumelos cultivadas no Brasil.

Vaz et al. (2001) analisaram 17 espécies de cogumelos coletadas no nordeste de Portugal e, também, identificaram o ácido *p*-hidroxibenzóico (2,04 – 41,92 mg/Kg). Além desse composto fenólico identificaram o ácido protocatecúico (1,02 – 67,62 mg/Kg), o ácido *p*-cumárico (8,65 – 79,34 mg/Kg) e o ácido cinâmico (0,43 – 46,04 mg/Kg).

Resultado diferente do presente trabalho, no qual os ácidos protocatecúico e p-hidroxibenzóico não foram identificados. Além disso, os teores encontrados por Vaz et al. (2001) para o ácido *p*-cumárico foram maiores. Já os teores para o ácido cinâmico foram menores que o do presente trabalho. No entanto, é importante lembrar que as espécies estudadas são distintas, crescidas em condições diferentes e que diferentes processos de extração dos compostos fenólicos foram empregados.

Diferentemente do presente estudo Barros et al. (2009) identificaram o ácido p-hidroxibenzóico (25,59 mg/Kg) e o ácido *p*-cumárico (8,72 mg/Kg) no cogumelo *Agaricus bisporus* (Champignon de Paris). Por outro lado, o ácido cinâmico foi encontrado em teores inferiores (8,72 mg/Kg) ao do presente estudo que encontrou um teor de 14,63 mg/Kg no período de verão e 42,41 mg/Kg no período de inverno.

Mattila et al. (2001) também estudaram extratos do cogumelo *Agaricus bisporus* obtidos com o emprego de hidrólise e encontraram além do ácido p-hidroxibenzóico (0,51 mg/Kg) e do ácido trans-cinâmico (2,69 mg/Kg), o ácido protocatecúico (< 0,3 mg/Kg) e o ácido caféico (0,82 mg/Kg). Os teores encontrados para o ácido trans-cinâmico, também, foram inferiores aos encontrados no presente trabalho. Além disso, os ácidos p-hidroxibenzóico, protocatecúico e caféico não foram identificados nas amostras de Champignon de Paris produzidas no Brasil. Kim et al. (2008) analisaram esta mesma espécie, na qual, também, foi possível a identificação do ác. protocatecúico (32 mg/Kg). O ácido cinâmico foi investigado, mas não foi identificado, o que diferiu da presente pesquisa uma vez que só foi identificado e quantificado o ácido trans-cinâmico. No entanto, é possível verificar no cromatograma obtido para esta espécie (em anexo) a presença de outros picos que infelizmente não puderam ser identificados pela falta de padrões. Todas estas divergências entre os resultados pode se dar devido às diferentes formas de extração, emprego ou não de hidrólise e também pelos cogumelos terem crescido em condições bastante diferentes.

Mattila et al. (2001) analisaram, também, amostras de *Agaricus bisporus* marrom (Portobello) e *Lentinus edodes* (Shiitake) e identificaram o ácido trans-cinâmico (0,15 mg/Kg e 0,16 mg/Kg, respectivamente) da mesma forma que no presente trabalho, sendo que em quantidades inferiores. No entanto, ao contrário do presente trabalho identificaram e quantificaram o ácido p-hidroxibenzóico (6,45 mg/Kg e 7,90 mg/Kg, respectivamente), o

ácido protocatecúico (1,06 mg/Kg e 1,39 mg/Kg, respectivamente) e o ácido caféico (0,71 mg/Kg e < 0,5 mg/Kg).

4. CONCLUSÃO

Dentre os oito compostos fenólicos investigados três foram identificados (ácido siríngico, ácido p-cumárico e ácido trans-cinâmico) nos extratos aquosos dos cogumelos produzidos no Brasil, com predominância do ácido trans-cinâmico.

O estágio imaturo dos cogumelos *Pleurotus ostreatus* implicou em um maior teor dos ácidos p-cumárico e trans-cinâmico em relação aos cogumelos colhidos em estágio maturo.

Os cogumelos comestíveis produzidos no Brasil podem contribuir significativamente para uma boa condição de saúde devido à presença de compostos fenólicos.

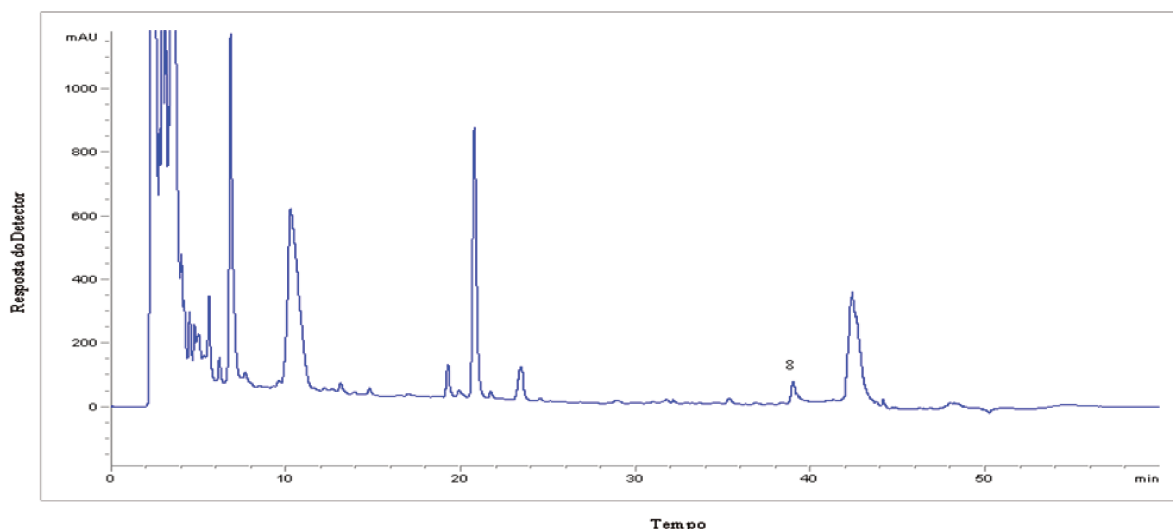
5. REFERÊNCIAS

- ANVISA, Resolução nº 899, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos anexo, 2003.
- BARROS, L., DUEÑAS, M., FERREIRA, I. C. F. R., BAPTISTA, P., SANTOS-BUELGA, C. Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1076-1079, 2009.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317-333, 1998.
- CHEN, X. -H., XIA, L. -X., ZHOU, H. -B., QIU, G. -Z. Chemical composition and antioxidant activities of *Russula griseocarnosa* sp. nov. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6966-6971, 2010.
- DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants. **Nutrition Reviews**, v. 55, p. 396-407, 1997.
- FACCO, E. M. P. Compostos funcionais no processamento de vinhos. Tese apresentada ao Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos, 2006.

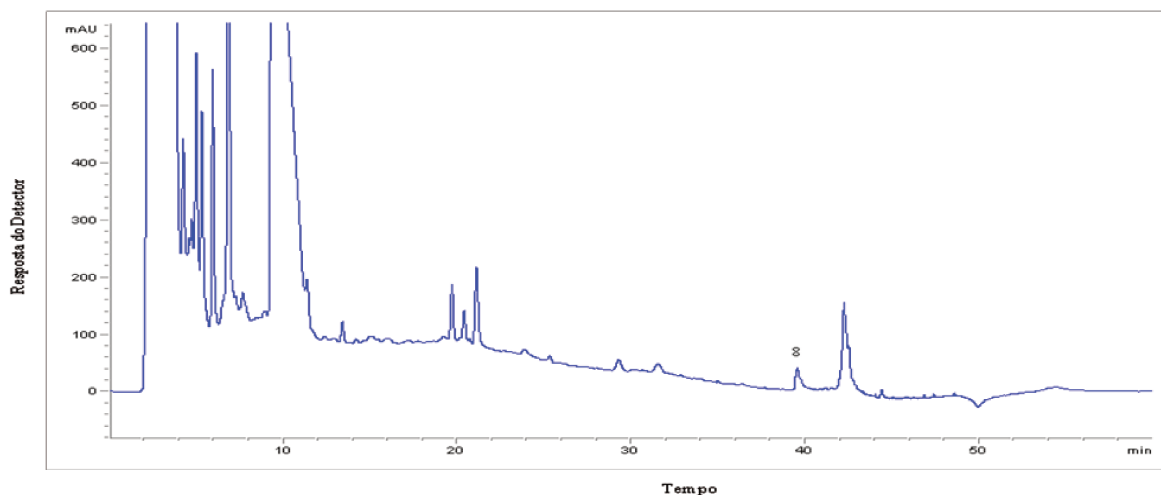
- KIM, M. –Y. SEGUIN, P., AHN, J. –K., KIM, J. –J., CHUN, S. –C. KIM, E. –H. SEO, S. –H., KANG, E. –Y., KIM, S. –L., PARK, Y. –J., RO, H. –M. CHUNG, I. –M. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7265-7270, 2008.
- KING, A. & YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal American Dietetic Association**, v. 50, n. 2, p. 213-8, 1999.
- LEE, Y.-L., YEN, M. –T., MAU, J. –L. Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizygus marmoreus*. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1-9, 2007.
- LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in câncer prevention: mechanism of action. **Journal Nutrition**. v. 134, p. 3479S-3485S, 2004.
- MATTILA, P., KÖNKÖ, K., EUROLA, M., PIHLAVA, J-M., ASTOLA, J., VAHTERISTO, L., HIETANIEMI, V., KUMPULAINEN, J., VALTONEN, M., PIIRONEN, V. Contents of vitamins, mineral elements, and phenolic compounds in cultivated mushrooms. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2343-2348, 2001.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.
- PUTTARAJU, N. G., VENKATESHAIAH, S. U., DHARMESH, S. M., URS, S. M. N., SOMASUNDARAM, R. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9764-9772, 2006.
- RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO L. F. C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RIBEIRO, B., RANGEL, J., VALENTÃO, P., BAPTISTA, P., SEABRA, R. M., ANDRADE, P. B. Contents of carboxylic acids and two pheolics and antioxidant activity of dried Portuguese wild edible mushrooms. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8530-8537, 2006.
- RIBEIRO, B., VALENTÃO, P., BAPTISTA, P., SEABRA, R. M. ANDRADE, P. B. Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1005-1813, 2007.
- RIBEIRO, B., LOPES, R., ANDRADE, P. B., SEABRA, R. M., GONÇALVES, R. F., BAPTISTA, P. QUELHAS, I., VALENTÃO, P. Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. **Food Chemistry**, v. 110, p. 47-56, 2008.

- SHAHIDI, F. & NACZK, M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. **Lancaster: Technomic**, 1995.
- SUN, T., TANG, J., POWERS, J. R. Antioxidant activity and quality of asparagus affected by microwave-circulated water combination and conventional sterilization. *Food Chemistry*, v. 100, p. 813-819, 2007.
- VALENTÃO, P., ANDRADE, P. B., RANGEL, J., RIBEIRO, B., SILVA, B. M. BAPTISTA, P., SEABRA, R. M. Effect of the conservation procedure on the contents of phenolic compounds and organic acids in Chanterelle (*Cantharellus cibarius*) mushroom. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4925-4931, 2005.
- VAZ, J. A., BARROS, L., MARTINS, A., MORAIS, J. S., VASCONCELOS, M. H., FERREIRA, I. C. F. R. Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. **Food Science and Technology**. v. 44, p. 343-346, 2011.
- YALTIRAK, T. ASLIM, B., OZTURK, S., ALLI, H. Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2052-2056, 2009.

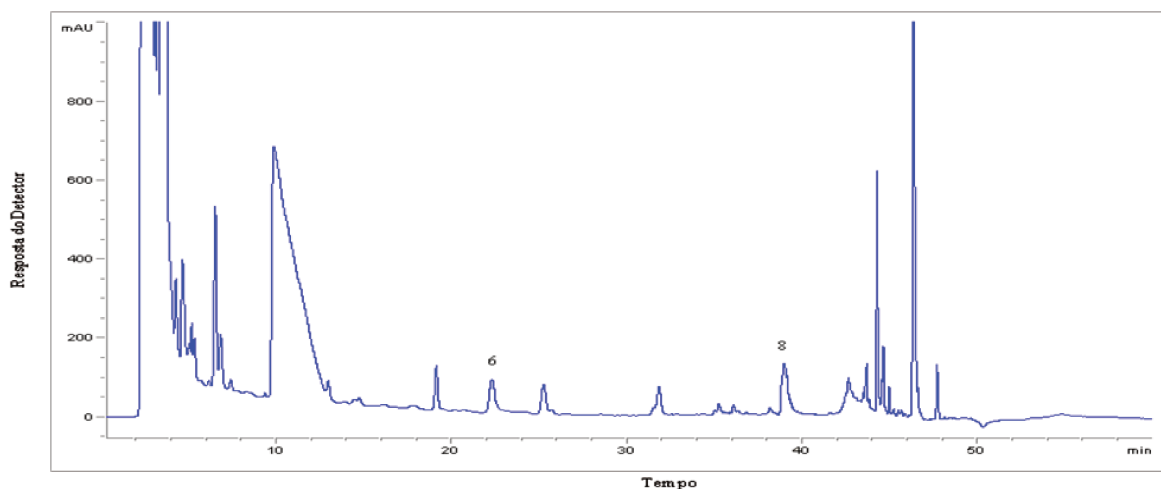
6. ANEXOS



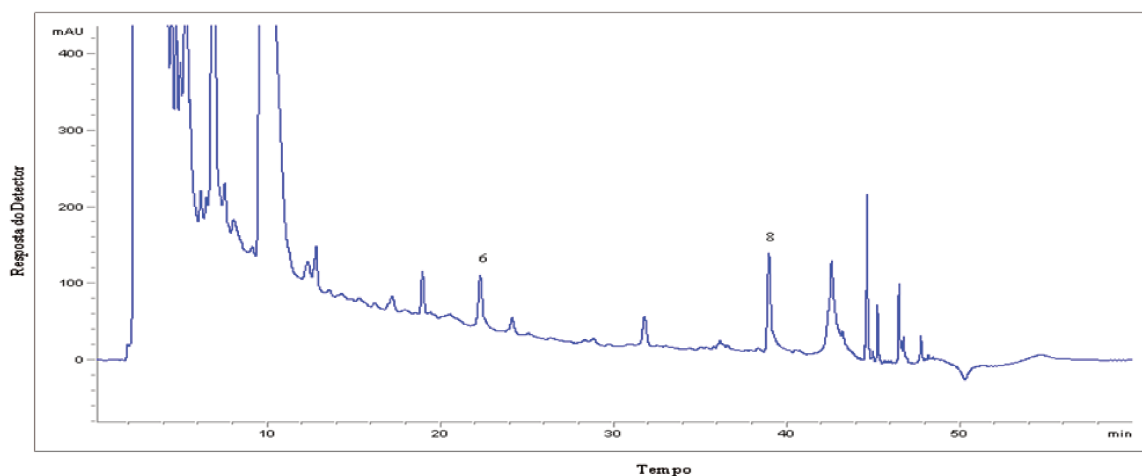
Anexo 1 - Cromatograma obtido através da análise do extrato aquoso do cogumelo Champignon de Paris fresco sob as condições estabelecidas neste trabalho: Fase móvel → (A) Água ultrapura : Ácido Fórmico (996 mL : 4 mL) e (B) Acetonitrila : Ácido Fórmico (996 mL : 4 mL) em gradiente (0 min - 95% A e 5% B; 10 min - 91% A e 9% B; 25 min - 83% A e 17% B; 38 min - 70% A e 30% B; 40 min - 40% A e 60% B; 45 min - 10% A e 90% B; 50 min - 95% A e 5% B), a uma vazão de 0,7 mL/min, temperatura da coluna a 35 °C, e volume de injeção de 100 µL, com tempo de corrida de 50 min, mantendo-se 10 min de re-equilíbrio do sistema antes da próxima injeção. A detecção foi realizada em detector de arranjo de diodos (DAD) à 280 nm. (8) Ácido trans-cinâmico.



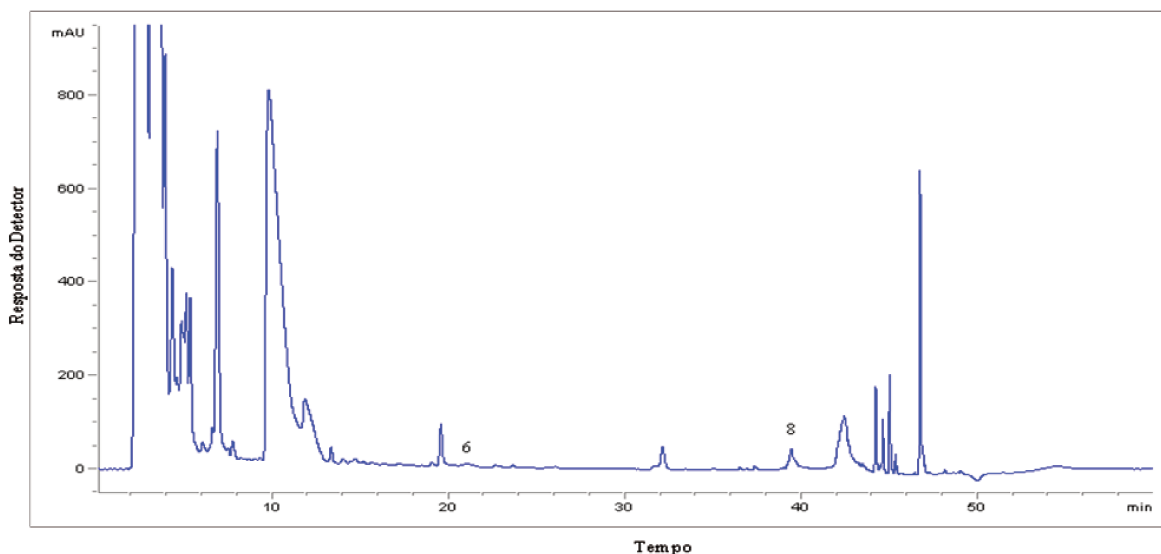
Anexo 2 - Cromatograma obtido através da análise do extrato aquoso do cogumelo Portobello fresco sob as condições estabelecidas neste trabalho: Fase móvel → (A) Água ultrapura : Ácido Fórmico (996 mL : 4 mL) e (B) Acetonitrila : Ácido Fórmico (996 mL : 4 mL) em gradiente (0 min - 95% A e 5% B; 10 min - 91% A e 9% B; 25 min - 83% A e 17% B; 38 min - 70% A e 30% B; 40 min - 40% A e 60% B; 45 min - 10% A e 90% B; 50 min - 95% A e 5% B), a uma vazão de 0,7 mL/min, temperatura da coluna a 35 °C, e volume de injeção de 100 µL, com tempo de corrida de 50 min, mantendo-se 10 min de re-equilíbrio do sistema antes da próxima injeção. A detecção foi realizada em detector de arranjo de diodos (DAD) à 280 nm. (8) Ácido trans-cinâmico.



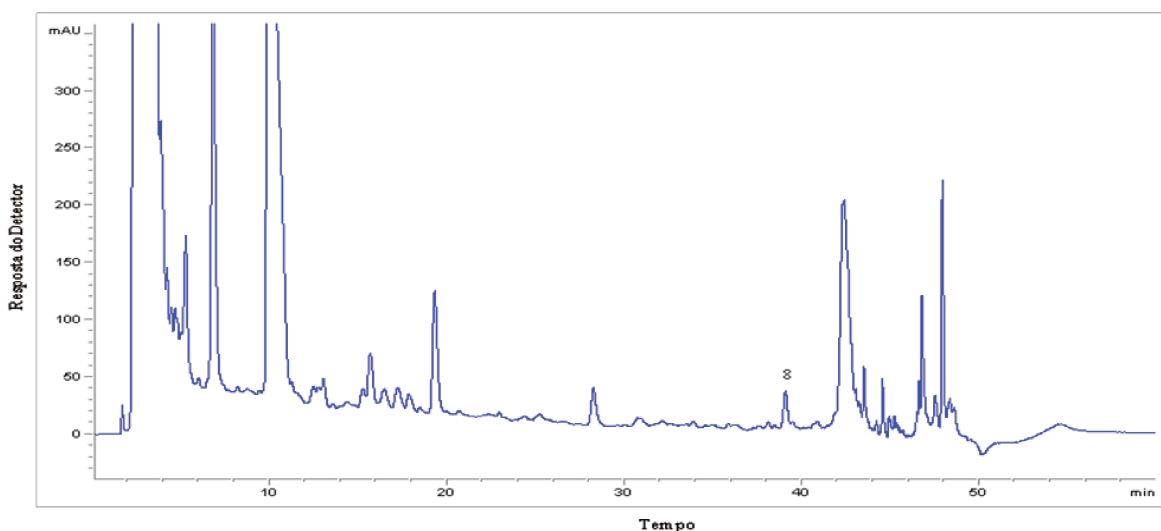
Anexo 3 - Cromatograma obtido através da análise do extrato aquoso do cogumelo Shimeji fresco sob as condições estabelecidas neste trabalho: Fase móvel → (A) Água ultrapura : Ácido Fórmico (996 mL : 4 mL) e (B) Acetonitrila : Ácido Fórmico (996 mL : 4 mL) em gradiente (0 min - 95% A e 5% B; 10 min - 91% A e 9% B; 25 min - 83% A e 17% B; 38 min - 70% A e 30% B; 40 min - 40% A e 60% B; 45 min - 10% A e 90% B; 50 min - 95% A e 5% B), a uma vazão de 0,7 mL/min, temperatura da coluna a 35 °C, e volume de injeção de 100 µL, com tempo de corrida de 50 min, mantendo-se 10 min de re-equilíbrio do sistema antes da próxima injeção. A detecção foi realizada em detector de arranjo de diodos (DAD) à 280 nm. (6) Ácido p-cumárico, (8) Ácido trans-cinâmico.



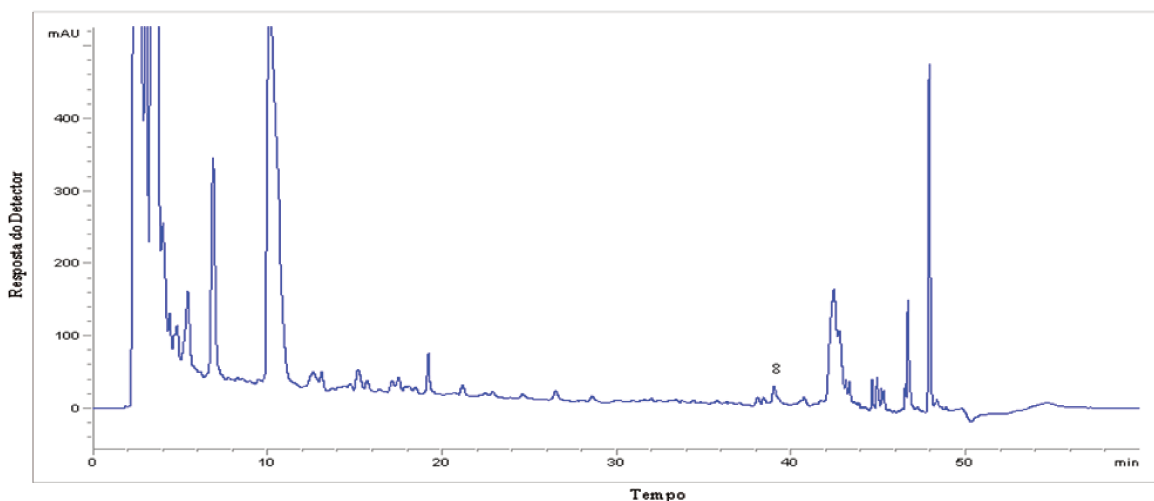
Anexo 4 - Cromatograma obtido através da análise do extrato aquoso do cogumelo Shimeji seco sob as condições estabelecidas neste trabalho: Fase móvel → (A) Água ultrapura : Ácido Fórmico (996 mL : 4 mL) e (B) Acetonitrila : Ácido Fórmico (996 mL : 4 mL) em gradiente (0 min - 95% A e 5% B; 10 min - 91% A e 9% B; 25 min - 83% A e 17% B; 38 min - 70% A e 30% B; 40 min - 40% A e 60% B; 45 min - 10% A e 90% B; 50 min - 95% A e 5% B), a uma vazão de 0,7 mL/min, temperatura da coluna a 35 °C, e volume de injeção de 100 µL, com tempo de corrida de 50 min, mantendo-se 10 min de re-equilíbrio do sistema antes da próxima injeção. A detecção foi realizada em detector de arranjo de diodos (DAD) à 280 nm. (6) Ácido p-cumárico, (8) Ácido trans-cinâmico.



Anexo 5 - Cromatograma obtido através da análise do extrato aquoso do cogumelo Hiratake fresco sob as condições estabelecidas neste trabalho: Fase móvel → (A) Água ultrapura : Ácido Fórmico (996 mL : 4 mL) e (B) Acetonitrila : Ácido Fórmico (996 mL : 4 mL) em gradiente (0 min - 95% A e 5% B; 10 min - 91% A e 9% B; 25 min - 83% A e 17% B; 38 min - 70% A e 30% B; 40 min - 40% A e 60% B; 45 min - 10% A e 90% B; 50 min - 95% A e 5% B), a uma vazão de 0,7 mL/min, temperatura da coluna a 35 °C, e volume de injeção de 100 µL, com tempo de corrida de 50 min, mantendo-se 10 min de re-equilíbrio do sistema antes da próxima injeção. A detecção foi realizada em detector de arranjo de diodos (DAD) à 280 nm. (6) Ácido p-cumárico, (8) Ácido trans-cinâmico.



Anexo 6 - Cromatograma obtido através da análise do extrato aquoso do cogumelo Shiitake, cultivado em tora de eucalipto, sob as condições estabelecidas neste trabalho: Fase móvel → (A) Água ultrapura : Ácido Fórmico (996 mL : 4 mL) e (B) Acetonitrila : Ácido Fórmico (996 mL : 4 mL) em gradiente (0 min - 95% A e 5% B; 10 min - 91% A e 9% B; 25 min - 83% A e 17% B; 38 min - 70% A e 30% B; 40 min - 40% A e 60% B; 45 min - 10% A e 90% B; 50 min - 95% A e 5% B), a uma vazão de 0,7 mL/min, temperatura da coluna a 35 °C, e volume de injeção de 100 µL, com tempo de corrida de 50 min, mantendo-se 10 min de re-equilíbrio do sistema antes da próxima injeção. A detecção foi realizada em detector de arranjo de diodos (DAD) à 280 nm. (8) Ácido trans-cinâmico.



Anexo 7 - Cromatograma obtido através da análise do extrato aquoso do cogumelo Shiitake, cultivado em composto à base de serragem e resíduos da agroindústria, sob as condições estabelecidas neste trabalho: Fase móvel → (A) Água ultrapura : Ácido Fórmico (996 mL : 4 mL) e (B) Acetonitrila : Ácido Fórmico (996 mL : 4 mL) em gradiente (0 min - 95% A e 5% B; 10 min - 91% A e 9% B; 25 min - 83% A e 17% B; 38 min - 70% A e 30% B; 40 min - 40% A e 60% B; 45 min - 10% A e 90% B; 50 min - 95% A e 5% B), a uma vazão de 0,7 mL/min, temperatura da coluna a 35 °C, e volume de injeção de 100 µL, com tempo de corrida de 50 min, mantendo-se 10 min de re-equilíbrio do sistema antes da próxima injeção. A detecção foi realizada em detector de arranjo de diodos (DAD) à 280 nm.. (8) Ácido trans-cinâmico.

CONCLUSÃO GERAL

Os extratos aquosos dos cogumelos Champignon de Paris fresco (*Agaricus bisporus* branco), Portobello fresco (*Agaricus bisporus* marrom), Shimeji fresco e seco (*Pleurotus ostreatus*), Hiratake fresco (*Pleurotus ostreatus*), Salmon fresco (*Pleurotus ostreatoroseus*) e Shiitake (*Lentinula edodes*), cultivado em tora de eucalipto e em composto à base de serragem, mostraram atividade antioxidante para os quatro métodos empregados. No entanto, a capacidade antioxidante dos extratos de cogumelos comestíveis estudados não foi tão alta como a encontrada em outros alimentos, mas, ainda assim, podem contribuir significativamente para uma boa condição de saúde.

Na análise com o radical DPPH[•] o Portobello e o Champignon de Paris fresco apresentaram os menores valores de IC 50, indicando maior ação antioxidante por esta metodologia. Na análise com o radical ABTS^{•+} e no ORAC os cogumelos que apresentaram maior ação antioxidante foram o Hiratake e o Salmon. Na análise FRAP os cogumelos que apresentaram maior atividade antioxidante foram o Champignon de Paris fresco, Portobello e Shiitake cultivado em composto.

O grau de maturação mais avançado do cogumelo Hiratake, em relação ao Shimeji fresco, implicou em uma maior atividade antioxidante em todos os métodos empregados.

Nesta investigação, os extratos aquosos obtidos a partir dos cogumelos Salmon, Hiratake e Portobello apresentaram os maiores teores de CFT.

O processamento empregado ao cogumelo Champignon de Paris diminuiu consideravelmente o teor de CFT enquanto que no processo de secagem empregado ao cogumelo Shimeji não houve diminuição drástica no teor de CFT.

O estágio maturo dos cogumelos *P. ostreatus* implicou em um maior teor de CFT em relação ao estágio imaturo.

Correlações positivas entre os resultados de CFT e os métodos de atividade antioxidante foram encontradas, e essa correlação foi maior para o ensaio com o radical livre ABTS^{•+} e o ORAC do que para o ensaio FRAP. Já entre o DPPH e os resultados de CFT foi encontrada baixa correlação negativa.

Dentre os oito compostos fenólicos investigados, três foram identificados (ácido siríngico, ácido p-cumárico e ácido trans-cinâmico) nos extratos dos cogumelos, com predominância do ácido trans-cinâmico.

O estágio imaturo dos cogumelos *P. ostreatus* implicou em um maior teor dos ácidos *p*-cumárico e trans-cinâmico em relação aos cogumelos colhidos em estágio maturo.

Os extratos aquosos dos cogumelos Shiitake apresentaram excelente atividade antimicrobiana contra as leveduras *C. albicans*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. utilis* mostrando seu potencial de utilização pela indústria farmacêutica.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar condições para extração de compostos fenólicos em cogumelos através de superfície de resposta.
- Empregar outros métodos de avaliação do potencial antioxidante que incluam radicais livres gerados nos organismos vivos.
- Aprofundar o estudo da composição fenólica dos cogumelos comestíveis, produzidos no Brasil, empregando técnicas complementares de identificação como a espectrometria de massas.
- Realizar ensaios biológicos com o objetivo de avaliar a atividade anticâncer, antimutagênica, antiinflamatória, antioxidante e hipocolesterômica de extratos de cogumelos comestíveis produzidos no Brasil.