

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABIANE BACH

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NUTRICIONAL, ANTIOXIDANTE E
ANTIBACTERIANO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS**

CURITIBA

2017

FABIANE BACH

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NUTRICIONAL, ANTIOXIDANTE
E ANTIBACTERIANO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS**

Tese de Doutorado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Alimentos ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk

Co-orientadora: Dr^a. Cristiane Vieira Helm

CURITIBA

2017

B118a

Bach, Fabiane

Avaliação do potencial nutricional, antioxidante e antibacteriano de cogumelos comestíveis / Fabiane Bach. – Curitiba, 2017.

135 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2017.

Orientador: Charles Windson Isidoro Haminiuk.

Coorientadora: Cristiane Vieira Helm.

1. Cromatografia líquida de ultra-eficiência. 2. Compostos fenólicos totais. 3. Perfil de aminoácidos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Haminiuk, Charles Windson Isidoro. III. Helm, Cristiane Vieira. IV. Título.

CDD: 613.2




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor TECNOLOGIA
Programa de Pós Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS
Código CAPES: 40001016019P6

TERMO DE APROVAÇÃO

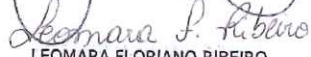
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **FABIANE BACH**, intitulada: "**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NUTRICIONAL, ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVADO** no rito de defesa.

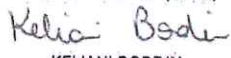
A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

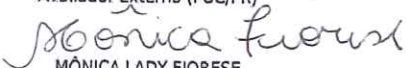
Curitiba, 31 de Julho de 2017.


CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ACÁCIO ANTONIO FERREIRA ZIELINSKI
Avaliador Externo (UEPG)


LEOMARA FLORIANO RIBEIRO
Avaliador Externo (UFPR)


KELIANI BORDIN
Avaliador Externo (PUC/PR)


MÔNICA LADY FIORESE
Avaliador Externo (UNIOESTE)

Dedico este trabalho àqueles que tudo fizeram

Para que eu me tornasse quem sou,

E para que chegasse onde estou:

Flavio, Tere, Felipe e Rudi!

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por estar sempre presente e me permitir vida e saúde para a realização desse trabalho.

Ao meu pai Flavio, meu herói, que todos os dias dá o exemplo de como ser o melhor ser humano que existe nesse mundo!

À minha mãe, Teresinha, uma guerreira, meu exemplo de força e superação!

Ao meu irmão, Felipe, por me orgulhar de suas conquistas e ser tão dedicado em tudo o que faz!

Ao meu noivo, Rudimar, por todo o apoio, amor, amizade, conselhos, compreensão.... enfim, por ser meu porto seguro!

Ao Prof. Dr. Charles W. I. Haminiuk, pela orientação e confiança em mim depositada e também pela compreensão nos momentos mais difíceis.

À Dr^a. Cristiane V. Helm pela co-orientação, apoio, compreensão e confiança no meu trabalho.

Ao Dr. Acácio A. F. Zielinski e à prof. Dr^a. Giselle M. Maciel, pelos conhecimentos repassados.

Aos doutores membros da banca, por aceitarem participar da avaliação do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da UFPR.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudo concedida.

À EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), UFPR (Universidade Federal do Paraná) e UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) pela infraestrutura disponibilizada para a realização do trabalho.

Aos colaboradores da Embrapa: Daiane, Dayanne, Edson, Fabrício, Janayna, Marianne e Tiélidy por todo auxílio e esclarecimento.

Às técnicas de laboratório Andréa, Patrícia e Sheila, pela amizade e colaboração na realização desse trabalho.

Às minhas queridas companheiras de laboratório: Aline, Bruna, Dayanne e Tamires, pela amizade, conversas e gargalhadas que facilitaram o trabalho.

Aos meus amigos engenheiros Alessandra, Ana Paula, Elaine, Fernanda, Manoela, Marcelo e Thaísa, por estarem sempre dispostos a ajudar e compartilhar os momentos bons e ruins!

Às minhas amigas de longa data: Camila, Crissie, Laís e Luana por permanecerem ao meu lado!

Aos demais colegas do programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, pelos momentos de descontração e trocas de experiências.

Aos produtores de cogumelos comestíveis, Vânia (Campina Grande do Sul/PR), Shigueaki (Cornélio Procópio/PR) e Youko (Piedade/SP), por fornecerem algumas amostras que foram analisadas nesse trabalho.

A todos aqueles cujos nomes não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Muito obrigada!

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

RESUMO GERAL

O consumo de cogumelos pela população mundial ocorre há milhares de anos, entretanto, atualmente, ainda não representa uma parcela significativa na dieta humana. Muitas espécies de cogumelos comestíveis são desconhecidas ou apresentam lacunas nas informações referentes ao seu potencial nutricional e nutracêutico. Os cogumelos são nutricionalmente equilibrados e possuem compostos biologicamente ativos que podem apresentar efeitos benéficos à saúde, como potencial antioxidante, antibacteriano, anti-inflamatório, antimutagênico, anticâncer, neuroprotetivo, hepatoprotetivo entre outros. As β -glucanas, polissacarídeos que constituem a fração solúvel das fibras alimentares dos cogumelos, são conhecidas por apresentarem atividade biológica. Além delas, os compostos provenientes do metabolismo secundário desses fungos, como os compostos fenólicos, também apresentam bioatividade (**Capítulo 1**). Devido a existência de lacunas no estudo do potencial nutricional e presença de compostos bioativos, em algumas espécies de cogumelos comestíveis, esta pesquisa teve por objetivo avaliar a composição físico-química e nutricional de sete espécies de cogumelos comestíveis comercializados no Brasil, otimizar a extração dos compostos fenólicos totais e estimar as atividades antioxidante e antibacteriana dos extratos fenólicos. Os cogumelos analisados foram: *Agaricus bisporus* (Champignon e Portobelo), *A. brasiliensis*, *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus djamor*, *P. eryngii*, *P. ostreatus* (“Ostra” branca e “Ostra” preta). No **Capítulo 2** as amostras foram analisadas quanto a sua composição centesimal, mineral, aminoacídica e fração das fibras solúveis (α e β -glucanas). Os resultados obtidos foram comparados com os padrões de ingestão dietética recomendada (RDA) e tratados utilizando a Análise de Componente Principal. Todos os cogumelos avaliados podem ser considerados como fonte potencial e alternativa de fibra alimentar (24,4 a 46,62%) e proteína (16,47 a 36,96%), contendo todos os aminoácidos essenciais à dieta humana, além de apresentar conteúdo de β -glucanas variando 1,58 a 16,91 mg/g de matéria seca (MS) e baixos teores de lipídeos (1,40 a 2,08%) e sódio (<66 mg/100 g MS). No **Capítulo 3**, realizou-se a otimização e modelagem da extração dos compostos fenólicos totais (CFT) de cada cogumelo. Os CFT variaram de 4,91 a 13,16 mg ácido gálico equivalente (GAE)/g MS. A partir do extrato fenólico otimizado, foram determinados os flavonoides totais (0,24 a 2,05 mg catequina equivalente (CE)/g MS), a atividade antioxidante pelos ensaios de ABTS (28,85 a 128,60 μ mol trolox equivalente (TE)/g), DPPH (8,67 a 50,64 μ mol TE/g) e FRAP (8,09 a 48,26 μ mol TE/g), a determinação de compostos fenólicos por CLUE e a avaliação da atividade antibacteriana. Foram identificados 17 compostos nos extratos: os ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, gentísico, siríngico, vanílico, p-cumárico, ferúlico, clorogênico, cafeico, e trans-ciâmico; os flavonoides quercetina e campferol; e também os compostos catecol, vanilina e ácidos fumárico e benzoico. A atividade antimicrobiana foi testada usando as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*, pelo método de microdiluição. Todos os extratos fenólicos de cogumelos foram efetivos na inibição do crescimento das bactérias Gram-positivas (MIC \leq 200 mg/mL), enquanto que para as bactérias Gram-negativas 66,7% dos extratos apresentaram atividade nas concentrações testadas. No **Capítulo 4**, realizou-se um estudo complementar para verificar a influência exercida pelo meio de cultivo [*Quercus acutissima* (QA) e substrato axênico (SA)] sobre a composição físico-química do *L. edodes*. Os cogumelos produzidos em SA apresentaram aproximadamente 26% a mais de lipídeos se comparado ao cogumelo produzido em QA, 19% a mais de proteína, 5,3% a mais de carboidratos totais e 3,3% a mais de fibras solúveis. Em contrapartida, os *L. edodes* produzidos em QA apresentaram maior conteúdo de fibra alimentar (17% a mais) e β -glucanas (24% a mais).

Palavras-chave: bioatividade, cromatografia líquida de ultra-eficiência, compostos fenólicos totais, perfil de aminoácidos, β -glucanas.

ABSTRACT

The mushrooms's consumption by the world population occurs for thousands of years, however, currently, it does not yet represent a significant part of the human diet. Many species of edible mushrooms are unknown or lack information on their nutritional and nutraceutical potential. The mushrooms are nutritionally balanced and have biologically active compounds which can have beneficial effects on health as antioxidant potential, antibacterial, anti-inflammatory, antimutagenic, anticancer, neuroprotective, hepatoprotective among other potentials. The β -glucans, are polysaccharides of the soluble fiber fraction of mushrooms and They are known to have biological activity. Besides them, compounds from the secondary metabolism of these fungi, such as phenolic compounds, also present bioactivity (**Chapter 1**). Due to the existence of gaps in the study of the nutritional potential and the presence of bioactive compounds in some edible mushroom species, this study aimed to evaluate the physicochemical and nutritional composition of seven species of edible mushrooms marketed in Brazil, to optimize the extraction of total phenolic compounds and to estimate the antioxidant and antibacterial activities of phenolic extracts. The mushrooms analyzed were: *Agaricus bisporus* (Champignon and Portobelo), *A. brasiliensis*, *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus djamor*, *P. eryngii*, *Pleurotus ostreatus* (white and black "Oyster"). In the **Chapter 2** the samples were analyzed for their centesimal composition, mineral, amino acid composition and fraction of soluble fibers (α and β -glucans). The results obtained were compared with the recommended dietary intake (RDA) standards and treated using Principal Component Analysis. All the evaluated mushrooms can be considered as a potential and alternative source of dietary fiber (24.4 to 46.62%) and protein (16.47 to 36.96%), containing all the essential amino acids in the human diet, besides presenting content of β -glucans ranging from 1.58 to 16.91 mg/g dry matter (DM) and low lipid (1.40 to 2.08%) and sodium contents (<66 mg/100 g MS). In the **Chapter 3**, the optimization and modeling of the total phenolic compounds extraction (TPC) of each mushroom was performed. The TPC ranged from 4.91 to 13.16 mg gallic acid equivalent (GAE)/g DM. From the optimized phenolic extract, were determined the total flavonoids (from 0.24 to 2.05 mg CE/g DM), the antioxidant activity by the ABTS assays (28.85 to 128.60 μ mol TE/g), DPPH (8.67 to 50.64 μ mol TE/g) and FRAP (8.09 to 48.26 μ mol TE/g). Determination of phenolic compounds by UPLC and the evaluation of antibacterial activity also were performed. Seventeen compounds were identified in phenolic extracts: gallic, p-hydroxybenzoic, protocatechuic, gentisic, syringic, vanillic, p-coumaric, ferulic, chlorogenic, caffeic and trans-cinnamic acids; the flavonoids quercetin and kaempferol; and also the compounds catechol, vanillin, fumaric acid and benzoic acid. The antimicrobial activity was tested using the bacteria *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*, by microdilution method. All phenolic extracts of mushrooms were effective in inhibiting the growth of Gram-positive bacteria (MIC \leq 200 mg/mL), while for Gram-negative bacteria 66.7% of the extracts presented activity at the concentrations tested. In the **Chapter 4**, a complementary study was carried out to verify the influence exerted by the culture medium (*Quercus acutissima* (QA) and axenic substrate (SA)) on the physicochemical composition of the *L. edodes*. The mushrooms produced in SA presented approximately 26% more lipids compared to the mushroom produced in QA, 19% more protein, 5.3% more total carbohydrates and 3.3% more soluble fiber. On the other hand, the *L. edodes* produced in QA presented higher dietary fibre content (17% more) and β -glucans (24% more).

Keywords: bioactivity; ultra-high performance liquid chromatography; total phenolic compounds; amino acid profile, β -glucans.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	ESTRUTURA MORFOLÓGICA DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DO COGUMELO.....	21
FIGURA 2 -	ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DOS FLAVONOIDES.....	34
FIGURA 3 -	PRODUÇÃO DO RADICAL CÁTION ABTS PELA ADIÇÃO DE PERSULFATO DE POTÁSSIO.....	45
FIGURA 4 -	FORMAÇÃO DO COMPLEXO FE^{2+} - TPTZ A PARTIR DO COMPLEXO FE^{3+} - TPTZ POR AÇÃO ANTIOXIDANTE.....	48
FIGURA 5 -	MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO.....	50
FIGURA 6 -	MÉTODO DE DIFUSÃO EM POÇOS.....	51
FIGURA 7 -	MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM MICROPLACA DE 96 POÇOS.....	51
FIGURA 8 -	COGUMELOS COMESTÍVEIS ANALISADOS.....	57
FIGURA 9 -	EVOLUÇÃO DA VARIÂNCIA CAPTURADA (%) VALOR (A) E VARIÂNCIA ACUMULADA CAPTURADA (B) EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE COMPONENTE PRINCIPAL DOS COGUMELOS.....	69
FIGURA 10 -	ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS REALIZADA COM DIFERENTES AMOSTRAS DE COGUMELOS COMESTÍVEIS: PC5 X PC6.....	70
FIGURA 11 -	DENSIDADE APARENTE DA MADEIRA E CASCA DE QA (<i>Q. ACUTÍSSIMA</i>), E DO SUBSTRATO AXÊNICO (SA) NO TEMPO INICIAL E FINAL (SEM INÓCULO DE <i>L. EDODES</i> E APÓS A SEGUNDA COLHEITA DO COGUMELO, <i>RESPECTIVAMENTE</i>).....	102
FIGURA 12 -	COMPOSIÇÃO DE ÁGUA E MATÉRIA SECA (MS) DA MADEIRA E CASCA DE QA (<i>Q. ACUTÍSSIMA</i>) E DO SA (SUBSTRATO AXÊNICO) NO TEMPO INICIAL E FINAL (SEM INÓCULO DE <i>L. EDODES</i> E APÓS A SEGUNDA COLHEITA DO COGUMELO, <i>RESPECTIVAMENTE</i>).....	103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	COMPOSTOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE COGUMELOS POR TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.....	31
TABELA 2 -	DERIVADOS DOS ÁCIDOS CINÂMICO E BENZOICO.....	33
TABELA 3 -	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS QUANTIFICADOS EM COGUMELOS.....	38
TABELA 4 -	MÉTODOS (<i>IN VITRO</i>) MAIS UTILIZADOS PARA AVALIAR A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM COGUMELOS NOS ÚLTIMOS ANOS.....	46
TABELA 5 -	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NOVE COGUMELOS COMESTÍVEIS.....	62
TABELA 6 -	CONTRIBUIÇÃO DO CONSUMO DE 100 g (MS) DE COGUMELOS PARA A INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA (ADR) DE ADULTOS DO SEXO MASCULINO (♂) E DO SEXO FEMININO (♀).....	64
TABELA 7 -	PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE NOVE COGUMELOS COMESTÍVEIS.....	67
TABELA 8 -	ESCORE QUÍMICO DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS DE NOVE COGUMELOS COMESTÍVEIS	68
TABELA 9 -	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS OBTIDOS POR PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN.....	81
TABELA 10 -	EFEITOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS (TEMPERATURA, RAZÃO SÓLIDO-LÍQUIDO E CONCENTRAÇÃO DO SOLVENTE) NA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	82
TABELA 11 -	VALORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT), REAIS E PREDITOS PELO MODELO, FLAVONOIDES TOTAIS (FT) DOS EXTRATOS OBTIDOS NAS MELHORES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO.....	85
TABELA 12 -	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS OBTIDOS NAS MELHORES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO.....	87
TABELA 13 -	COMPOSTOS FENÓLICOS E NÃO-FENÓLICOS DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (CLUE)	

	EM NOVE COGUMELOS COMESTÍVEIS.....	89
TABELA 14 -	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA PARA OS EXTRATOS FENÓLICOS OTIMIZADOS DE COGUMELOS COMESTÍVEIS, AVALIADO PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO.....	91
TABELA 15 -	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ELEMENTAR (CHNSO) DA <i>QUERCUS ACUTÍSSIMA</i> (QA) E DO SUBSTRATO AXÊNICO (SA).....	104
TABELA 16 -	BALANÇO GLOBAL E PARCIAL DE MASSA PARA OS CONSTITUINTES DA <i>QUERCUS ACUTÍSSIMA</i> (QA) E DO SUBSTRATO AXÊNICO (SA): TEMPO INICIAL E TEMPO FINAL (SEM INÓCULO DE <i>L. EDODES</i> E APÓS A SEGUNDA COLHEITA DO COGUMELO, RESPECTIVAMENTE).....	105
TABELA 17 -	COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS <i>L. EDODES</i> PRODUZIDOS EM <i>QUERCUS ACUTÍSSIMA</i> (QA) E EM SUBSTRATO AXÊNICO (SA).....	108

LISTA DE SIGLAS

AA	Aminoácidos
ABTS	2,2' – azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemicals</i>
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo diodo
CLUE-DAD	Cromatografia líquida de ultra-eficiência com detector de arranjo diodo
CFT	Compostos fenólicos totais
CE	Catequina equivalente
DPPH	1,1- difenil-2-picrilhidrazil
FAOSTAT	<i>Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database</i>
FRAP	Potencial antioxidante de redução do ferro
FT	Flavonoides totais
GAE	Ácido gálico equivalente
MH	Mueller-Hingon
MIC	Concentração mínima inibitória
MS	Matéria seca
NPN	Nitrogênio não proteico
PC	Componente principal
PCA	Análise de componentes principais
RDA	Ingestão diária recomendada
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RSM	Metodologia de superfície de resposta
TE	Trolox equivalente
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina
TROLOX	6 -hidroxi - 2,5,7,8 -tetrametilcromano - 2-carboxílico
UV-Vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS	18
CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA	19
1 REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1 COGUMELOS.....	20
1.1.1 Generalidades e consumo	20
1.1.2 Definição	22
1.1.3 Composição química e substâncias ativas	22
1.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E VALOR NUTRICIONAL DOS COGUMELOS	23
1.3 CARACTERÍSTICAS BIOATIVAS, FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICAS DOS COGUMELOS	25
1.4 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DOS COGUMELOS	27
1.4.1 Compostos fenólicos em cogumelo.....	29
1.4.2 Extração e quantificação de compostos fenólicos.....	34
1.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COGUMELOS	48
1.5.1 Método de difusão em disco	49
1.5.2 Método de difusão em poços	50
1.5.2 Método de microdiluição em caldo ou ágar	50
1.5.3 Método de macrodiluição de caldo	52
CAPÍTULO 2: COGUMELOS COMESTÍVEIS: UMA FONTE POTENCIAL DE AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS, GLUCANAS E MINERAIS	53
RESUMO	54
2.1 INTRODUÇÃO	55
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.2.1 Cogumelos	56
2.2.2 Composição química	56
2.2.3 Análise de minerais	58
2.2.4 Determinação de glucanas	58
2.2.5 Perfil de aminoácidos (AA)	59
2.2.6 Análise estatística.....	59
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60

2.3.1 Composição química e glucanas	60
2.3.2 Comparação dos dados da composição química e bioquímica com a ingestão diária recomendada (RDA)	63
2.3.3 Perfil de aminoácidos (AA)	65
2.3.4 Qualidade proteica e escore químico de AA	66
2.3.5 Análise das componentes principais (PCA) dos dados	69
2.4 CONCLUSÕES	71
CAPÍTULO 3: OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE COGUMELOS E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E ANTIMICROBIANAS IN VITRO	72
RESUMO	73
3.1 INTRODUÇÃO	74
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	75
3.2.1 Cogumelos	75
3.2.2 Otimização da extração dos Compostos Fenólicos Totais (CFT).....	766
3.2.3 Determinação dos CFT e dos Flavonoides Totais (FT)	76
3.2.4 Ensaios antioxidantes (<i>in vitro</i>) dos extratos fenólicos otimizados de cogumelos	76
3.2.5 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE-DAD)	77
3.2.6 Atividade antibacteriana (<i>in vitro</i>)	78
3.2.7 Análise de dados	79
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
3.3.1 Otimização da extração dos Compostos Fenólicos Totais (CFT).....	80
3.3.2 Compostos Fenólicos Totais e poder antioxidante.....	86
3.3.3 Atividade antibacteriana (<i>in vitro</i>)	90
3.4 CONCLUSÕES	94
CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS SUBSTRATOS DE CULTIVO E INFLUÊNCIA EXERCIDA NA QUALIDADE NUTRICIONAL DO <i>Lentinula edodes</i>	95
RESUMO	96
4.1 INTRODUÇÃO	97
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	98
4.2.1 Amostras	98
4.2.2 Caracterização dos materiais de cultivo do <i>L. edodes</i>	99
4.2.3 Cálculos para a determinação do consumo de nutrientes na tora de QA e no SA, pelo cogumelo <i>L. edodes</i>	100
4.2.4 Caracterização do corpo de frutificação do <i>L. edodes</i> cultivado em QA e em SA.....	100

4.2.5 Análise de minerais dos cogumelos <i>L. edodes</i>	101
3.2.6 Análise estatística.....	101
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	102
4.3.1 Composição físico-química da <i>Quercus acutissima</i> (QA) e do substrato axênico (SA)	102
4.3.2 Composição química e mineral dos cogumelos cultivados nos diferentes meios de cultivo.....	106
4.4 CONCLUSÕES.....	110
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	111
REFERÊNCIAS.....	113

INTRODUÇÃO

Os cogumelos são corpos de frutificação de fungos conhecidos e utilizados como alimento e/ou medicamento há milhões de anos. Entretanto, o consumo de cogumelos ainda não representa uma parcela significativa na dieta humana. Alguns apresentam compostos altamente tóxicos, enquanto outros são muito apreciados pelo paladar. Estima-se que existam mais de 140.000 espécies de cogumelos distribuídos em todo o planeta, porém menos de 10% do total são conhecidos e um percentual muito inferior a este é estudado. Aproximadamente 25 espécies de cogumelos são utilizadas na alimentação humana e poucos são comercialmente cultivados.

Segundo dados da *Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database* (FAOSTAT) (2011/2012), os maiores produtores mundiais de cogumelos são a China, os Estados Unidos e a Itália, seguidos pela Austrália, Canadá, Espanha, França, Polônia, Holanda, Irlanda e Japão. O Brasil se encontra no grupo de países que menos produzem cogumelos no mundo. Os cogumelos podem ser cultivados utilizando diversos substratos, incluindo os resíduos agroindustriais. O espaço requerido para a produção de cogumelos não é grande, e a área territorial pode ser improdutiva e/ou de terreno acidentado, o que torna essa prática rentável, podendo ser uma alternativa para pequenas propriedades rurais.

O consumo de cogumelos no Brasil é considerado baixo, quando comparado a outros países como China, Japão, Coreia, França, Portugal. No Brasil, os cogumelos são produzidos e consumidos principalmente nas regiões Sudeste e Sul, sendo que os cogumelos mais consumidos são o *Agaricus bisporus* (Champignon), o *Lentinula edodes* (Shiitake) e cogumelos do gênero *Pleurotus ostreatus* (Shimeji).

Os cogumelos comestíveis possuem as três propriedades inerentes aos alimentos: nutrição, sabor e funções fisiológicas. Nutricionalmente os cogumelos são ricos em proteínas, fibras alimentares, vitaminas e minerais; apresentam baixo teor de gordura total, mas com uma elevada proporção de ácidos graxos insaturados, e não possuem colesterol. Em relação ao sabor, apresentam substâncias aromatizantes de alimentos por possuírem compostos voláteis e também compostos solúveis em água que realçam o sabor. A terceira propriedade (fisiológica) é favorecida pela presença de substâncias ativas, como os polissacarídeos, peptídeo-glucanas, substâncias quitinosas, terpenos, esteróis e compostos fenólicos, que auxiliam no funcionamento fisiológico do organismo humano e podem ser capazes de promover a saúde.

Recentemente houve um acentuado aumento no interesse em estudar os cogumelos, não somente como alimento e fonte de nutrientes, mas também como uma fonte de compostos biologicamente ativos e de valor medicinal. Mais de 100 funções medicinais podem ser atribuídas aos fungos e cogumelos medicinais, entre elas as funções antitumoral, imunomoduladora, antioxidante, eliminação de radicais, cardiovascular, anti-hipercolesterolemia, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antiviral, hepato-protetora, e efeitos anti-diabetes.

Estas funções medicinais são atribuídas aos compostos biologicamente ativos dos cogumelos. Dentre esses compostos, destacam-se os compostos fenólicos que exibem uma vasta gama de atividades biológicas, principalmente àquelas relacionadas às propriedades antioxidantes. Os antioxidantes podem apresentar grande vantagem para a melhoria da qualidade de vida, podendo prevenir o aparecimento de doenças degenerativas. Os ácidos fenólicos e os flavonoides são os compostos fenólicos mais estudados nos cogumelos.

Os cogumelos também podem ser uma fonte alternativa de novos compostos antimicrobianos, principalmente metabólitos secundários como os compostos fenólicos já citados, terpenos, esteróides, antraquinonas, derivados do ácido benzoico e quinolonas, mas também de alguns metabólitos primários como ácido oxálico, peptídeos e proteínas.

Tendo em vista que os cogumelos comestíveis são alimentos saudáveis, fonte de proteínas, fibras e de diversos nutrientes essenciais ao ser humano e que ainda apresentam compostos bioativos em sua constituição, que podem auxiliar o sistema imunológico e promover a saúde, justificam-se os estudos que visam ampliar os conhecimentos relacionados à composição dos cogumelos produzidos e comercializados no Brasil, a fim de contribuir para o estabelecimento de políticas de produção, armazenamento, avaliação do estado nutricional, formulação de dietas terapêuticas e das relações entre dieta, saúde e doença.

Este trabalho de pesquisa teve por objetivo avaliar a composição físico-química e nutricional de sete espécies de cogumelos comestíveis comercializados no Brasil, otimizar a extração dos compostos fenólicos totais e estimar as atividades antioxidante e antibacteriana dos extratos fenólicos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição físico-química e nutricional de sete espécies de cogumelos comestíveis comercializados no Brasil, otimizar a extração dos compostos fenólicos totais e estimar as atividades antioxidante e antibacteriana dos extratos fenólicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição centesimal dos cogumelos *Agaricus bisporus* (Paris e Portobelo), *Agaricus brasiliensis*, *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus djamor*, *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus ostreatus* (“Ostra” branca e preta);
- Analisar a composição de macro e microminerais destes cogumelos;
- Quantificar os aminoácidos essenciais e não essenciais, e determinar o escore químico aminoacídico dos cogumelos estudados;
- Otimizar a extração dos Compostos Fenólicos Totais (CFT) das sete espécies de cogumelos estudadas;
- Mensurar os CFT e os Flavonoides Totais (FT) presentes nos cogumelos, por método espectrofotométrico;
- Estimar a atividade antioxidante, *in vitro*, por meio das metodologias de DPPH, ABTS e FRAP, para os extratos fenólicos otimizados;
- Separar e quantificar, por cromatografia líquida de ultra-eficiência (CLUE), os compostos fenólicos presentes nos extratos;
- Verificar o efeito antibacteriano, *in vitro*, dos extratos fenólicos otimizados;
- Avaliar a composição dos meios de cultivo *Quercus acutíssima* e substrato axênico, utilizados na produção de *L. edodes*;
- Averiguar a influência dos meios de cultivo sobre a composição físico-química do *L. edodes*.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DA LITERATURA

Cogumelos comestíveis:

propriedades nutricionais, antioxidantes e antibacteriana

1.1 COGUMELOS

1.1.1 Generalidades e consumo

Os cogumelos são organismos que fazem parte do Reino Fungi há aproximadamente 300 milhões de anos (Chang e Miles, 2004). São chamados de fungos superiores ou macroscópicos (macromicetos), que pertencem a Filo Basidiomycota e alguns deles à Ascomycota (MORADALI et al., 2007; MAITY et al., 2014). Segundo Bononi et al. (1999), os cogumelos cultivados no Brasil são do Filo Basidiomycota. Os fungos são heterotróficos, isto é, são incapazes de sintetizar matéria orgânica, pois são desprovidos de clorofila em suas células e, portanto, não realizam fotossíntese. No entanto, ao contrário dos animais, não digerem o alimento, apenas o absorvem (CHANG; MILES, 2004; TOMA; ISMAEL; ABDULLA, 2013).

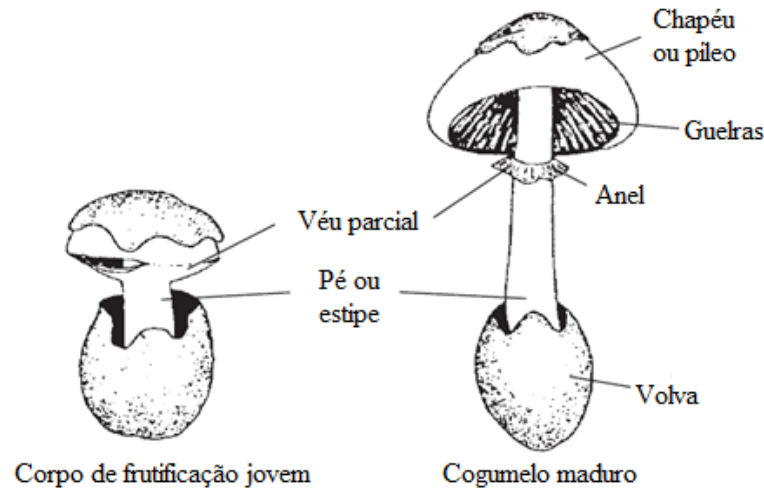
A classificação dos cogumelos se dá de acordo com a maneira pela qual obtêm nutrientes da natureza para sobreviver, podem ser classificados em: saprófitas, parasitas e simbióticos (micorrizas). Os saprófitas obtêm nutrientes a partir de materiais orgânicos mortos; os parasitas obtêm alimento de plantas e animais vivos, causando danos para eles; e simbióticos vivem em uma associação fisiológica estreita com plantas hospedeiras e animais, formando uma parceria, onde cada um aproveita de alguns benefícios vitais do outro (CHANG, 2008; ZENG et al., 2012).

O tempo de vida dos corpos de frutificação das diversas espécies de cogumelos varia de 10 a 15 dias em média (CHANG, 2008; KALACĚ, 2009). A estrutura morfológica dos cogumelos é constituída pelo corpo de frutificação (basidiocarpo) que apresenta cinco partes distintas (Figura 1), são elas:

1. Chapéu ou píleo: estrutura importante do cogumelo, pois na superfície inferior encontram-se os esporos reprodutores aderidos ao himênio.
2. Parte inferior do chapéu: apresenta guelras, lamelas, tubos ou poros e pregas ou pseudolâminas.
3. Anel: nem sempre existente, trata-se do resto de um véu que cobre a parte inferior do chapéu do cogumelo no estado jovem.
4. Pé ou estipe: pode adquirir diferentes formas, cor e consistência.
5. Volva: pode não existir, pois não faz parte do estipe. Assim como o anel, trata-se do resto de um véu que cobre a parte inferior do chapéu do cogumelo no

estado jovem, podendo ou não, formar uma volva que envolve a base do pé (EMBRAPA, 2004; HUFFMAN et al., 2008).

FIGURA 1 - ESTRUTURA MORFOLÓGICA DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DO COGUMELO.



FONTE: Adaptada de HUFFMAN et al. (2008).

Segundo Soares et al. (2013), existem cerca de 140.000 espécies de cogumelos. Alguns são altamente tóxicos, como é o caso dos cogumelos da espécie *Amanitaceae*. Aproximadamente 3.000 espécies de cogumelos são potencialmente comestíveis, 100 podem ser economicamente cultivados, porém apenas 25 delas são normalmente utilizadas na alimentação humana e um número ainda menor tem sido comercialmente cultivado (CHANG; WASSER, 2012; SUDHEEP; SRIDHAR, 2014; VALVERDE; HERNÁNDEZ-PEREZ; PAREDES-LÓPEZ, 2015).

O consumo de cogumelos foi datado há milhares de anos, principalmente em países orientais, porém ainda não representam uma parcela significativa da dieta humana (HELENO et al., 2012; REIS et al., 2012a). Mundialmente os cogumelos mais populares são: *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus spp*, *Auricularia auricula*, *Flammulina velutipes* e *Volvariella volvace* (REIS et al., 2012a; VALVERDE; HERNÁNDEZ-PEREZ; PAREDES-LÓPEZ, 2015). No Brasil, as principais espécies cultivadas e consumidas são *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus spp*. (cogumelo ostra) e *Agaricus brasiliensis* (FURLANI; GODOY, 2008; DIAS, 2010).

1.1.2 Definição

Cogumelos comestíveis são os corpos de frutificação que não apresentam compostos tóxicos intrínsecos, como os ciclo-peptídeos, mono-metil-hidrazina, coprina, muscarina, muscimol (ácido ibotênico), psilocina, psilocibina entre outros (HUFFMAN et al., 2008; CARVALHO et al., 2014). Segundo a RDC N° 272 de 22 de setembro de 2005, cogumelo comestível é definido como:

“o produto obtido de espécie(s) de fungo(s) comestível(is), tradicionalmente utilizada(s) como alimento. Pode ser dessecado, inteiro, fragmentado, moído ou em conserva, submetido a processo de secagem e ou defumação e ou cocção e ou salga e ou fermentação ou outro processo tecnológico considerado seguro para a produção de alimentos”.

O desenvolvimento contínuo das técnicas de cultivo, colheita e processamento pós-colheita de diversas espécies de cogumelos comestíveis vem contribuindo para a produção em maior escala, a distribuição, a conservação e a aceitação dos cogumelos comestíveis (PALACIOS et al., 2011). Em muitos países o consumo de cogumelos está aumentando, pois além de serem um alimento nutritivo e sensorialmente atrativo, muitas espécies apresentam benefícios funcionais devido à presença de compostos com propriedades biologicamente ativas, comprovados por diversos estudos (HELENO et al., 2012; PREETI et al., 2012; GUO et al., 2014; WANG et al., 2014; ATTARAT; PHERMTHAI, 2015; ZHU et al., 2015).

1.1.3 Composição química e substâncias ativas

A composição química dos cogumelos comestíveis determina seu valor nutricional e suas propriedades sensoriais. Os cogumelos possuem composição nutricional balanceada (RASHIDI; YANG, 2016), são pouco calóricos e apresentam baixos teores de lipídeos. Por outro lado, representam uma excelente fonte de proteínas, aminoácidos essenciais e fibras alimentares. Contam ainda com a presença de carboidratos, minerais e vitaminas (VILLARES; MATEO-VIVARACHO; GUILLAMÓN, 2012; DEEPALAKSHMI; MIRUNALINI, 2014; KADNIKOVA et al., 2015; ROSLI; MAIHIZA; RAUSHAN, 2015; TEKLIT, 2015).

Além dos macro e micronutrientes supracitados, os cogumelos veem sendo pesquisados como agentes terapêuticos, e vários compostos com propriedades biologicamente

ativas foram identificados apresentando benefícios de promoção da saúde humana. Dentre eles, destacam-se os compostos fenólicos, os polissacarídeos, as glicoproteínas, os aminoácidos essenciais, os ácidos graxos insaturados, os terpenos e os esteróis (LIM; YIM, 2012; VILLARES; MATEO-VIVARACHO; GUILLAMÓN, 2012; KOZARSKI et al., 2014; GRÜNDEMANN; GARCIA-KÄUFER; SAUER, 2015; BOONSONG; KLAYPRADIT; WILAI PUN, 2016).

Os cogumelos contêm biomoléculas que podem contribuir para o bem estar e mitigar ameaças e agressões que tornam o corpo humano vulnerável a diversas doenças potencialmente fatais, incluindo doenças cardiovasculares, câncer, distúrbios metabólicos - *diabesity* (semelhante a diabetes tipo 2) e desordens neuro-degenerativas (VIKINESWARY; CHANG, 2013). Apresentam ainda funções terapêuticas como tônico para os nervos, ação antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, antialérgica e hepatoprotetora além da prevenção de certas doenças, como a hipertensão, hipercolesterolemia e hiperlipidemia (LIM; YIM, 2012; GAŞECKA et al., 2016; SUN et al., 2017).

1.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E VALOR NUTRICIONAL DOS COGUMELOS

A composição química dos cogumelos pode variar de acordo com a espécie, a origem geográfica, o substrato de cultivo, as condições ambientais, a idade e a parte do corpo de frutificação analisada (SUDHEEP; SRIDHAR, 2014; SUN et al., 2017). A maior parcela do corpo de frutificação dos cogumelos é composta por água (entre 85 a 95%), o que os torna muito perecíveis, além do fato de apresentarem rápida maturação morfológica. A matéria seca do corpo de frutificação dos cogumelos representa de 5 a 15% da sua massa *in natura* (SYNYTSYA et al., 2009; XIAO et al., 2011).

De acordo com dados coletados de diversas espécies de cogumelos por Kalač (2009) e Wang et al. (2014), o percentual de proteína pode variar de 12,0 a 56,3%, em base seca. A proteína presente nos cogumelos contém os dez aminoácidos essenciais (fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano, valina, histidina e arginina) que não podem ser sintetizados pelo corpo humano e, portanto, deve ser fornecido pela dieta (PHAT; MOON; LEE, 2016). Sua qualidade pode ser comparada à proteína animal; mas a quantidade proteica é inferior às encontradas em carnes. Quando comparado ao leite e a outros alimentos (maioria dos cereais e vegetais), os cogumelos apresentam maior teor de proteína (BARROS et al., 2007a; CHANG, 2008; CHANG; WASSER, 2012; AKBARIRAD; KAZEMEINI; SHARIATY, 2013).

O sabor umami característico de alguns produtos alimentícios também está presente nos cogumelos. As substâncias aromatizantes que estão associadas a este sabor são os aminoácidos livres (ácido glutâmico e aspártico) e os nucleotídeos 5-monofosfato purina inosina (IMP) e 5-monofosfato de guanosina (GMP) (PHAT; MOON; LEE, 2016).

O conteúdo de carboidratos pode variar de 13 a 65%, em base seca, os quais podem ou não ser digestíveis. A maior parte dos carboidratos encontrados em cogumelos não é digestível, como os oligo e os polissacarídeos. Dentre os polissacarídeos mais abundantes estão: quitina, α e β -glucana, manana, xilana e galactana. Os carboidratos digestíveis são a glicose, o manitol, o arabitól, a trealose, o inositol e o glicogênio (CHEUNG, 2008; SYNITSYA et al., 2009; WANG et al., 2014).

Os cogumelos comestíveis podem ainda ser considerados uma fonte de fibra alimentar, uma vez que o seu conteúdo pode variar de 4 a 55%, em base seca (VILLARES; MATEO-VIVARACHO; GUILLAMÓN, 2012). A parede celular dos cogumelos contém uma mistura de componentes fibrilares, como a quitina, oligo e polissacarídeos como a manana e as glucanas. Esses componentes não são digeríveis pelo organismo humano e podem ser considerados uma fonte de fibra alimentar (CHEUNG, 2013; MUKHOPADHYAY; GUHA, 2015). A variação no teor de fibras dos cogumelos pode estar relacionada principalmente a fatores genéticos, que determinarão a quantidade e a variedade de sacarídeos presentes nas paredes celulares dos fungos (ROP *et al.*, 2009).

Os principais polissacarídeos encontrados nos cogumelos são as β -glucanas, que compõem aproximadamente 50% da parede celular dos fungos (VALVERDE; HERNÁNDEZ-PÉREZ; PAREDES-LÓPEZ, 2015). A concentração de β -glucanas varia em função da espécie (*Lentinula edodes* e gênero *Pleurotus* são as fontes mais importantes), condições de crescimento (razão C/N, presença de compostos fenólicos e pH do meio) e maturação do corpo de frutificação (ROP; MLCEK; JURIKOVA, 2009).

Em relação à presença de lipídeos, os cogumelos apresentam baixos teores dos mesmos, variando de 2 a 10%, em matéria seca, conforme Kalač (2009) e Cheung (2008). Alimentos com baixo teor lipídico são importantes para dietas saudáveis e com restrição de calorias. Além disso, a maior concentração de ácidos graxos encontrados nos cogumelos é insaturada, entre eles os essenciais linoleico e linolênico (COHEN et al., 2014; KAYODE et al., 2015; MUKHOPADHYAY e GUHA, 2015).

A presença de vitaminas em cogumelos é de grande importância nutricional, uma vez que essas têm funções essenciais no organismo humano. De acordo com Wang et al. (2014) e Deepalakshmi e Mirunalini (2014), os cogumelos contém várias vitaminas, incluindo a

tiamina, riboflavina, niacina, biotina, tocoferol, além das vitaminas C e ergosterol (precursor da vitamina D). Ainda em 1986, Bano e Rajarathnam (BANO; RAJARATHNAM, 1986) avaliaram as vitaminas B1, B2, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico e a vitamina C de quatro espécies de *Pleurotus*, e verificaram que esses cogumelos poderiam ser considerados boa fonte de vitamina B2 e ácido fólico.

Os cogumelos também são ricos em sais minerais (6 a 12%, em base seca), sendo que os que se apresentam em maiores quantidades são, em ordem decrescente, o potássio, o fósforo, o enxofre, o magnésio, o cálcio e o sódio (KALACĚ, 2009, 2013). Em relação aos efeitos benéficos nutricionais dos cogumelos, os seguintes fatos devem ser observados:

- Apresentam um baixo nível de energia, o que auxilia na redução de peso;
- Contém níveis significativos de purina, o que é benéfico para a dieta de pessoas que sofrem de doenças metabólicas (por exemplo, gota, reumatismo).
- Tem um baixo nível de glicose, e maior de manitol, o que é especialmente vantajoso para diabéticos, e
- Possuem concentração muito baixa de sódio, o que é benéfico para a dieta de pessoas que sofrem de hipertensão (CHANG; WASSER, 2012).

Para Ribeiro et al. (2009) e Bernas̃ et al. (2006), os cogumelos deveriam ser considerados como “alimento dietético”, uma vez que apresentam elevado teor proteico e reduzido valor calórico, recorrente a baixa concentração de lipídeos em sua constituição. Segundo Cheung (2008), uma porção de 100 g de cogumelos comestíveis frescos fornece entre 1,4 a 4,4 % da necessidade de energia diária (2.500 kcal) para um adulto de 70 kg do sexo masculino que faça atividade física moderada.

1.3 CARACTERÍSTICAS BIOATIVAS, FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICAS DOS COGUMELOS

Tradicionalmente os cogumelos têm sido utilizados como agentes medicinais. Recentemente houve um acentuado aumento no interesse em estudar os cogumelos, não somente como alimento e fonte de nutrientes, mas também como uma fonte de compostos biologicamente ativos (funcionais) e de valor medicinal (CHANG, 2008; WASSER, 2010; VILLARES; MATEO-VIVARACHO; GUILLAMÓN, 2012). As espécies de cogumelos que apresentam propriedades medicinais e ao mesmo tempo são consideradas seguras se aproximam de 700 (CHANG; WASSER, 2012).

Segundo a Portaria Nº. 398 de 30 de abril de 1999, do Ministério da Saúde, a alegação de propriedade funcional em um alimento é “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano”. Esta Portaria ainda define a alegação da propriedade de saúde como “aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde”.

Na literatura encontra-se ainda o termo “nutracêutico”, designado em 1979 por Stephen DeFellce, que é definido como uma substância que pode ser considerada um alimento ou parte de um alimento que proporciona benefícios médicos ou de saúde como a prevenção e tratamento da doença. São comercializados em formas concentradas como comprimidos, cápsulas e pós como uma única substâncias ou combinações de diversas substâncias (BARROS et al., 2008a; DEV et al., 2011; MAJAZ et al., 2012). A definição da terminologia “alimento nutracêutico” é aceita na comunidade de ciência e nutrição, porém não está incorporada em lei ou regulamento do Brasil e nem dos Estados Unidos.

Atualmente os cogumelos são reconhecidos como alimentos nutracêuticos ou funcionais, uma vez provado que eles têm efeitos benéficos e nutricionais sobre uma ou mais funções do corpo, melhorando a saúde, o bem-estar e diminuindo o risco de doença (ALVES et al., 2012; MIRCEA et al., 2015). Os benefícios funcionais estão interligados à presença de compostos com propriedades biologicamente ativas, como os compostos fenólicos, os polissacarídeos, as glicoproteínas, terpenos e esteroides (JAYAKUMAR; THOMAS; GERALDINE, 2009; TSAI et al., 2009; HELENO et al., 2012; LIM; YIM, 2012; PREETI et al., 2012). Esses compostos podem ser extraídos tanto do micélio, quanto dos corpos de frutificação dos cogumelos, e representam um componente importante da indústria de biotecnologia (MORADALI et al., 2007; CHANG, 2008). O teor de compostos bioativos depende da espécie, tipo de substrato nutritivo, condições climáticas, idade do micélio, condições de processamento e preservação. Todos esses fatores levam a uma ampla variabilidade no potencial biológico (MIRCEA et al., 2015).

Segundo Chang e Wasser (2012), os polissacarídeos dos cogumelos podem impedir a oncogênese, mostrar atividade antitumoral direta contra vários tumores sinérgicos e impedir a metástase tumoral. Sua atividade é especialmente benéfica quando usado em conjunto com a quimioterapia.

Os compostos fenólicos são uma das principais classes de metabolitos secundários que tem uma vasta variedade de estruturas e funções (SRIVIDYA; VENKATESH; VISHNUVARTHAN, 2010; HAMINIUK et al., 2012). São comumente encontrados em

alimentos de origem vegetal, mas também estão presentes em fungos. A pronunciada correlação entre os fenólicos totais e a capacidade antioxidante sugere que a quantidade desses compostos pode ser o principal contribuinte para a atividade antioxidante dos cogumelos (JAYAKUMAR et al., 2011; WANG et al., 2014).

Os compostos fenólicos estão entre as mais potentes substâncias bioativas e úteis terapêuticamente, proporcionando benefícios à saúde associados com a redução do risco de doenças crônicas e degenerativas. Muitos dos seus efeitos biológicos têm sido atribuídos à captura/eliminação de radicais livres, quelação de metais e inibição da peroxidação lipídica, que são responsáveis pelos danos oxidativos de lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. O éster fenetílico do ácido cafeico tem mostrado alguns resultados promissores em células cancerosas das mamas (CHEUNG; CHEUNG; OOI, 2003; BARROS et al., 2009; JAYAKUMAR et al., 2011; CHANG; WASSER, 2012).

1.4 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DOS COGUMELOS

A oxidação pode ser definida como uma reação química envolvendo a transferência de elétrons entre moléculas ou uma espécie rica em elétrons com um agente oxidante (o qual é submetido a uma redução simultânea). Esta transferência de elétrons entre as entidades podem dar origem aos radicais livres (CRAFT et al., 2012). Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares que contém um ou mais elétrons desemparelhados em orbitais atômicos ou moleculares. Estes elétrons não emparelhados fornecem um considerável grau de reatividade para o radical livre. Os radicais derivados de oxigênio representam a classe mais importante de espécies de radicais gerados em sistemas vivos (VALKO et al., 2007; GAŞECKA et al., 2016).

A oxidação é essencial para muitos organismos vivos, pois produz a energia que alimenta os processos biológicos. Os radicais livres são produzidos normalmente no metabolismo natural de células aeróbias, principalmente na forma de espécies reativas de oxigênio (ROS). Dessa forma, o corpo humano gera certa quantidade dessas espécies reativas de oxigênio durante as reações bioquímicas. No entanto, a produção excessiva de radicais livres causa danos às macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, ácidos graxos poli-insaturados e carboidratos, e está relacionada ao envelhecimento e algumas doenças crônicas, degenerativas e carcinogêneas (VALKO et al., 2006; BADARINATH et al., 2010; LIU et al., 2014a; GAŞECKA et al., 2016).

O estresse oxidativo tem sido ligado a mais de cem condições de doenças humanas (YIM et al., 2012), e pode ser definido como o estado em que o equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes é alterado resultando em um aumento da taxa de oxidação. As espécies nocivas reativas mais comuns existentes no corpo são os radicais peroxil (ROO•), hidroxil (HO•), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), superóxido (O₂⁻), oxigênio singlete (¹O₂) e peroxinitrito (ONOO⁻). Os radicais livres ou espécies de oxigênio/nitrogênio reativo podem causar uma série de doenças degenerativas, esclerose múltipla, aterosclerose, doença de Parkinson, Alzheimer, doenças cardíacas, câncer e envelhecimento precoce (VALKO et al., 2006; DUBOST; OU; BEELMAN, 2007; HAMINIUK et al., 2012; SKINNER; HUNTER, 2013; ANJANA et al., 2016).

Embora quase todos os organismos possuam mecanismos de defesa antioxidante (químico e enzimático) e sistemas de reparo que evoluíram para protegê-los contra o dano oxidativo, estes sistemas não são suficientes para impedir inteiramente tais danos (YANG; LIN; MAU, 2002; CRAFT et al., 2012). Portanto, é necessário enriquecer a dieta com alimentos e/ou suplementos antioxidantes para auxiliar o corpo humano a reduzir os danos oxidativo (GONZÁLEZ-PALMA et al., 2016; RADZKI et al., 2016).

Antioxidantes são moléculas capazes de inativar radicais livres e sua ação, fornecendo um papel importante no sistema de defesa do corpo contra as espécies de ROS. Os compostos fenólicos são considerados antioxidantes naturais, encontrados principalmente em frutas e vegetais (HAMINIUK et al., 2012), mas os cogumelos também produzem tais compostos, que são provenientes do seu metabolismo secundário (HELENO et al., 2015; RADZKI et al., 2016). O consumo desses alimentos tem demonstrado uma relação inversa à incidência de doenças crônicas degenerativas e os efeitos do envelhecimento. Muitos benefícios potenciais têm sido atribuídos ao uso de antioxidantes na forma de ingestão dietética ou suplementação (DUBOST; OU; BEELMAN, 2007; SRIVIDYA; VENKATESH; VISHNUVARTHAN, 2010; ZENG et al., 2012).

Uma abordagem interessante, porém pouco elucidada, é a identificação e definição da relação entre a estrutura dos compostos fenólicos e sua atividade antioxidante. Em sistemas reais, essa relação será altamente dependente das condições do sistema, tais como substratos, temperatura, luz, pressão de oxigênio, características físicas relativas, polaridade, e presença de metais (SHAHIDI; ZHONG, 2011; CRAFT et al., 2012). Alguns estudos têm determinado relações generalizadas entre as estruturas de fenólicos e sua relativa atividade antioxidante em sistemas não reais. Hoelz et al. (2010) analisaram quinze compostos fenólicos, em relação à sua característica estrutural e às suas atividades antioxidantes. O estudo foi capaz de

demonstrar que os melhores antioxidantes são os compostos que contêm grupos doadores de elétrons diretamente ligados a um anel aromático.

Outro estudo examinou o potencial antioxidante de uma variedade representativa de fenólicos antioxidantes utilizando o ensaio de capacidade antioxidante equivalente da vitamina C (ACEVC). Os resultados foram comparados com as características estruturais dos compostos fenólicos. O estudo determinou os seguintes padrões: a atividade antioxidante, em geral, aumentou com o aumento do número de anéis dos compostos fenólicos (ou seja, os polifenóis são geralmente mais eficazes que os monofenóis); os derivados do ácido cinâmico mostraram maior atividade antioxidante do que os derivados do ácido benzoico; a substituição de açúcares em flavonoides prejudicou a atividade antioxidante (especula-se ser devido a impedimento estérico); e a atividade antioxidante de flavonoides aumentou de forma linear com o aumento de grupos hidroxila (OH) livre em torno da sua estrutura (KIM; LEE, 2004; CRAFT et al., 2012).

O ácido ascórbico e os compostos fenólicos são conhecidos como antioxidantes hidrofílicos, enquanto os carotenoides são conhecidos como antioxidantes lipofílicos (THAIPONG et al., 2006). Inicialmente, os antioxidantes mais estudados em cogumelos foram as vitaminas E, C e os carotenoides. Atualmente, tem-se dado muita atenção aos compostos fenólicos (DUBOST; OU; BEELMAN, 2007). Os compostos fenólicos exibem uma vasta gama de propriedades fisiológicas, tais como antialérgicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antioxidantes, antitrombóticos, efeitos hepato-protetores, cardioprotetores e vasodilatadores (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; HOELZ et al., 2010).

1.4.1 Compostos fenólicos em cogumelo

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados durante o desenvolvimento normal de alguns organismos e também em resposta a diferentes situações de estresse, tais como infecções, fermentos e radiação ultravioleta (UV) (NACZK; SHAHIDI, 2004; HAMINIUK et al., 2012). Devido à sua ampla distribuição na natureza, estes compostos constituem uma parcela essencial da dieta humana (KALILI; VILLIERS, 2011). A estrutura dos compostos fenólicos caracteriza-se pela presença de, no mínimo, um anel aromático (fenol) com um ou mais grupos funcionais OH ligados. Podem variar desde uma molécula fenólica simples até um polímero complexo de alta massa molecular (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; IGNAT; VOLFF; POPA, 2011).

Compreendem uma ampla variedade de substâncias, classificadas principalmente de acordo com a quantidade de anéis fenólicos que os constitui (HAMINIUK et al., 2012). Os principais grupos de compostos fenólicos são os flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos e lignanas (HAMINIUK et al., 2012; GAŞECKA et al., 2016). Dentre eles, os mais comumente encontrados em cogumelos comestíveis são os ácidos fenólicos e os flavonoides. Um levantamento bibliográfico dos ácidos fenólicos e flavonoides identificados em diversas espécies de cogumelos está apresentado na Tabela 1.

1.4.1.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são os principais compostos fenólicos dos cogumelos. Quimicamente, estes compostos têm pelo menos um anel aromático no qual pelo menos um hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila (-OH) (HELENO et al., 2015), conforme Tabela 2. Constituem aproximadamente um terço dos fenóis dietéticos, que podem estar presentes nas plantas, nas formas livre ou ligados. Os ácidos fenólicos são sintetizados a partir dos aminoácidos L-fenilalanina ou L-tirosina pela via shikimato. Esses aminoácidos são os principais precursores da maioria dos produtos fenólicos naturais (HELENO et al., 2015).

Os ácidos fenólicos são subdivididos em dois grupos principais: os ácidos hidroxiciâmicos e os hidroxibenzoicos, ambos derivados de moléculas não fenólicas de ácido cinâmico e benzoico, respectivamente (HELENO et al., 2015). O primeiro grupo é composto pelos ácidos cafeico, clorogênico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico.

O segundo grupo é formado pelos ácidos protocatecuico, gálico, vanílico, gentísico, *p*-hidrozibenzoico e siríngico (IGNAT; VOLF; POPA, 2011; SKINNER; HUNTER, 2013). Diferentemente dos demais compostos fenólicos, os ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinâmico apresentam um carácter ácido devido à presença de um grupo carboxílico (COOH) na molécula.

TABELA 1 – COMPOSTOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE COGUMELOS POR TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.
(Continua)

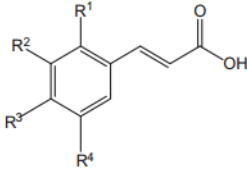
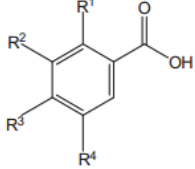
Compostos fenólicos	Cogumelos	Fonte
Ácido gálico	<i>Boletus edulis</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Auricularia auricula-judae</i> , <i>Agaricus bisporus</i> (Paris), <i>Russula delica</i> , <i>Morchella esculenta</i> , <i>Lentinula edodes</i> , <i>Hericium erinaceus</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> .	(OKE; ASLIM, 2011; REIS et al., 2012b; FERNANDES et al., 2014; ÖZYÜREK et al., 2014; YILDIZ et al., 2015; YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Ácido gentísico	<i>P. eryngii</i> .	(GAŞECKA et al., 2016)
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>P. eryngii</i> , <i>Calvatia excipuliformis</i> , <i>Agaricus blazei</i> , <i>L. edodes</i> , <i>A. auricula-judae</i> , <i>Cordyceps militaris</i> , <i>Chroogomphus rutilus</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>M. esculenta</i> , <i>Lactarius índigo</i> , <i>Amanita flavoconia</i> , <i>Strobilomyces floccopus</i> , <i>Amanita pantherina</i> , <i>B. edulis</i> , <i>Agaricus arvensis</i> .	(OKE; ASLIM, 2011; REIS et al., 2012b, 2013; CARNEIRO et al., 2013; ÇAYAN et al., 2014; LIN et al., 2014; NOWACKA et al., 2014; YILDIZ et al., 2015; GAŞECKA et al., 2016; YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Ácido ácido <i>p</i> -anísico	<i>P. eryngii</i> .	(LIN et al., 2014)
Ácido protocatecuico	<i>P. ostreatus</i> , <i>P. eryngii</i> , <i>Armillaria mellea</i> , <i>B. edulis</i> , <i>Lactarius volemus</i> , <i>L. edodes</i> , <i>G. lucidum</i> , <i>M. esculenta</i> , <i>H. erinaceus</i> , <i>A. flavoconia</i> , <i>Russula emética</i> , <i>S. floccopus</i> , <i>A. pantherina</i> , <i>A. arvensis</i> , <i>Boletus frostii</i> , <i>Ramaria flava</i> , <i>Lycoperdon perlatum</i> , <i>Sarcodon imbricatus</i> , <i>Hypomyces lactiflorum</i> .	(REIS et al., 2012b; NOWACKA et al., 2014; ÖZYÜREK et al., 2014; YILDIZ et al., 2015; GAŞECKA et al., 2016; YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Ácido vanílico	<i>P. ostreatus</i> , <i>P. eryngii</i> , <i>Craterellus cornucopiodes</i> , <i>L. edodes</i> , <i>B. edulis</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Hericium erinaceus</i> , <i>R. flava</i> .	(CARNEIRO et al., 2013; LIN et al., 2014; NOWACKA et al., 2014; ÖZYÜREK et al., 2014; YILDIZ et al., 2015; GAŞECKA et al., 2016; YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Ácido sinápico	<i>A. auricula-judae</i> , <i>P. eryngii</i> , <i>S. floccopus</i> , <i>B. edulis</i> , <i>A. arvensis</i> , <i>Amanita virosa</i> , <i>B. frostii</i> , <i>R. flava</i> , <i>L. perlatum</i>	(OKE; ASLIM, 2011; LIN et al., 2014; YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Ácido cinâmico	<i>P. eryngii</i> , <i>A. auricula-judae</i> , <i>A. bisporus</i> (Paris), <i>A. bisporus</i> (Portobelo), <i>P. ostreatus</i> , <i>L. edodes</i> , <i>C. militaris</i> , <i>R. emética</i> , <i>S. floccopus</i> , <i>B. edulis</i> .	(OKE; ASLIM, 2011; REIS et al., 2012b, 2013; YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Vanilina	<i>P. eryngii</i> , <i>A. auricula-judae</i> .	(OKE; ASLIM, 2011)
Ácido salicílico	<i>Calvatia excipuliformis</i> .	(NOWACKA et al., 2014)
Ácido siríngico	<i>P. eryngii</i> , <i>A. auricula-judae</i> , <i>G. lucidum</i> , <i>L. edodes</i> , <i>H. erinaceus</i> .	(OKE; ASLIM, 2011; LIN et al., 2014; YILDIZ et al., 2015)
Ácido ferrúlico	<i>P. ostreatus</i> , <i>P. eryngii</i> , <i>M. esculenta</i> , <i>H. erinaceus</i> , <i>A. flavoconia</i> , <i>R. emética</i> , <i>A. arvensis</i> , <i>B. frostii</i> .	(OKE; ASLIM, 2011; YILDIZ et al., 2015; GAŞECKA et al., 2016; YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Ácido clorogênico	<i>P. eryngii</i> , <i>G. lucidum</i> , <i>M. esculenta</i> , <i>L. índigo</i> , <i>A. pantherina</i> , <i>B. frostii</i> , <i>S. imbricatus</i> , <i>Boletus luridus</i> .	(LIN et al., 2014; YILDIZ et al., 2015; YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Ácido <i>p</i> -cumárico	<i>P. ostreatus</i> , <i>P. eryngii</i> , <i>Craterellus cornucopiodes</i> , <i>A. blazei</i> , <i>Amanita ovoidea</i> , <i>A. auricula-judae</i> , <i>A. bisporus</i> (Paris), <i>B. edulis</i> , <i>G. lucidum</i> , <i>M. esculenta</i> , <i>L. edodes</i> , <i>H. erinaceus</i> .	(OKE; ASLIM, 2011; REIS et al., 2012b; CARNEIRO et al., 2013; DOĞAN, 2013; FERNANDES et al., 2014; NOWACKA et al., 2014; YILDIZ et al., 2015; GAŞECKA et al., 2016)

TABELA 1 – COMPOSTOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE COGUMELOS POR TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.
(Conclusão)

Ácido <i>o</i> -cumárico	<i>L. indigo</i> .	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Ácido cinâmico	<i>A. blazei, L. edodes, Amanita ovoidea, B. edulis, R. delica, P. eryngii, A. flavoconia</i> .	(CARNEIRO et al., 2013; DOĞAN, 2013; FERNANDES et al., 2014; LIN et al., 2014; YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Ácido trans-cinâmico	<i>P. ostreatus, P. eryngii, G. lucidum, L. edodes</i> .	(YILDIZ et al., 2015; GAŞECKA et al., 2016)
Ácido cafeico	<i>Pholiota mutabilis, P. eryngii, A. auricula-judae, A. flavoconia, S. floccopus, A. pantherina, B. edulis, A. arvensis, B. frostii, R. flava, G. lucidum, B. luridus</i> .	(OKE; ASLIM, 2011; NOWACKA et al., 2014; YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Ácido rosmarínico	<i>B. edulis, L. volemus, A. auricula-judae</i> .	(OKE; ASLIM, 2011; ÖZYÜREK et al., 2014)
Naringina	<i>P. ostreatus, P. eryngii</i> .	(GAŞECKA et al., 2016)
Rutina	<i>B. edulis, L. volemus, P. eryngii, G. lucidum, L. edodes, H. erinaceus</i> .	(LIN et al., 2014; ÖZYÜREK et al., 2014; YILDIZ et al., 2015)
Quercetina	<i>B. edulis, P. eryngii, M. esculenta, H. erinaceus, L. índigo, A. flavoconia, Cortinarius alboviolaceus, S. imbricatus, B. luridus</i> .	(LIN et al., 2014; ÖZYÜREK et al., 2014; YILDIZ et al., 2015; YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Naringenina	<i>B. edulis, L. volemus</i> .	(ÖZYÜREK et al., 2014)
Hesperidina	<i>B. edulis, L. volemus, P. eryngii</i> .	(LIN et al., 2014; ÖZYÜREK et al., 2014)
Campferol	<i>B. edulis, L. índigo, G. lucidum, Flammulina velutipes</i> .	(ÖZYÜREK et al., 2014; HU et al., 2016; YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Apigenina	<i>B. edulis, L. volemus</i> .	(ÖZYÜREK et al., 2014)
Catequina	<i>P. eryngii, A. auricula-judae, G. lucidum, R. emética, B. frostii, R. flava, G. lucidum, C. alboviolaceus, S. imbricatus, B. luridus, H. lactiflorum</i> .	(OKE; ASLIM, 2011; LIN et al., 2014; YILDIZ et al., 2015; YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Epicatequina	<i>P. eryngii, M. esculenta, A. pantherina, F. velutipes</i> .	(LIN et al., 2014; YILDIZ et al., 2015; HU et al., 2016; YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Miricetina	<i>P. eryngii, L. índigo, A. flavoconia, R. emética, A. virosa, B. frostii, C. alboviolaceus, S. imbricatus</i> .	(LIN et al., 2014; YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Isoramnetina	<i>B. frostii, R. flava, L. perlatum</i> .	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Formononetina	<i>F. velutipes</i>	(HU et al., 2016)
Apigenina	<i>F. velutipes</i>	(HU et al., 2016)
Arbutina	<i>F. velutipes</i>	(HU et al., 2016)

FONTE: O autor (2017).

TABELA 2 – DERIVADOS DOS ÁCIDOS CINÂMICO E BENZOICO.

Substituição	Derivados do ácido cinâmico	Derivados do ácido benzoico
		
R ¹ = OH	Ácido o-cumárico	-
R ³ = OH	Ácido p-cumárico	Ácido p-hidroxibenzoico
R ³ = R ⁴ = OH	Ácido cafeico	Ácido protocatecuico
R ² = OCH ₃ , R ³ = OH	Ácido ferúlico	Ácido vanílico
R ² = R ³ = OCH ₃	-	Ácido verátrico
R ² = R ³ = R ⁴ = OH	-	Ácido gálico
R ¹ = R ⁴ = OH	-	Ácido gentísico
R ² = R ⁴ = OCH ₃ , R ³ = OH	Ácido sinápico	Ácido siríngico
R ¹ = OH, R ⁴ = HSO ₃	-	Ácido 5-sulfosalicílico
R ² = R ³ = OH	Ácido 3,4 ou 5-cafeoilquínico*	-

FONTE: HELENO et al., (2015).

NOTA: *O grupo carboxílico é esterificado com ácido quínico.

Os ácidos fenólicos são frequentemente incluídos na dieta humana e têm sido amplamente estudados devido às suas bioatividades, tais como propriedades antioxidantes, antitumorais, propriedades antimicrobianas, entre outras. Em particular, os cogumelos são uma fonte dessas moléculas na dieta (HELENO et al., 2015). Os principais ácidos fenólicos encontrados em cogumelos comestíveis são os ácidos gálico, protocatecuico, homogentísico, vanílico, p-cumárico, p-hidroxibenzoico, gentísico, cinâmico, cafeico, ferúlico, clorogênico e pirogálico. Estes ácidos foram quantificados por técnicas de cromatografia por diversos autores (KIM et al., 2008; PALACIOS et al., 2011; VAZ et al., 2011a; LIU et al., 2012a, 2013a; CARNEIRO et al., 2013; DOĞAN, 2013; REIS et al., 2013).

1.4.1.2 Flavonoides

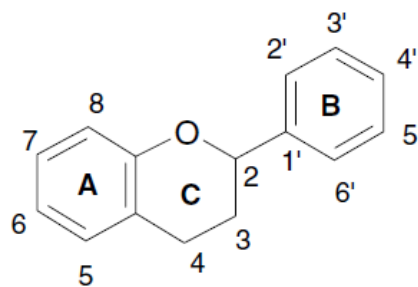
Os flavonoides constituem o maior grupo de fenólicos em plantas e o segundo maior em cogumelos (atrás apenas dos ácidos fenólicos), sendo responsável por mais da metade dos oito mil compostos fenólicos naturais. Apresentam quinze átomos de carbono, dispostos em uma configuração C6-C3-C6. A estrutura química dos flavonoides consiste em dois anéis aromáticos (A e B), unidos por três carbonos, geralmente sob a forma de um anel heterocíclico (C), conforme Figura 2 (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; STALIKAS, 2007; IGNAT; VOLFF; POPA, 2011).

Variações nos padrões de substituição do anel C resultam em uma maior classe de flavonoides: os flavonóis, as flavanonas, as isoflavanos, os flavanóis (flavan-3-ols), as

flavonas e as antocianinas (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; HAMINIUK et al., 2012).

Substituições nos anéis A e B dão origem aos diferentes compostos em cada classe dos flavonoides. Estas substituições podem incluir a oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação, e sulfatação (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Quando há uma ou mais moléculas de açúcar ligado a um flavonoide (glicosilação), este é chamado de flavonoide glicosídeo. Quando não possuem molécula (s) de açúcar (es) em sua estrutura são chamados de agliconas (HAMINIUK et al., 2012).

FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DOS FLAVONOIDES.



FONTE: BALASUNDRAM; SUNDRAM e SAMMAN (2006).

Os flavonoides são importantes antioxidantes, pois apresentam elevado potencial redox, o que lhes permite atuar como agentes de redução, doadores de hidrogênio, e supressores de oxigênio singlete. Além disso, eles possuem um potencial quelante de metal. São compostos fenólicos bioativos que se consumidos regularmente por seres humanos, contribuem com a prevenção da incidência de doenças como o câncer e doenças cardíacas (IGNAT; VOLFF; POPA, 2011).

Os principais flavonóis são a quercetina, caempferol, miricetina e rutina; as principais flavanonas são a hesperitina e a naringenina; as flavonas mais conhecidas são apigenina e luteolina; os flavanóis são catequina e epicatequina e por fim, as antocianinas mais importantes são cianidina, pelargonidina, peonidina, delphinidina, malvidina e petunidina (SKINNER; HUNTER, 2013).

1.4.2 Extração e quantificação de compostos fenólicos

Os ensaios utilizados para a análise de compostos fenólicos podem ser classificados como aqueles que determinam o conteúdo de fenólicos totais, ou aqueles que quantificam individualmente um composto fenólico e/ou um grupo específico ou classe de compostos

fenólicos. No entanto, para serem analisados, os compostos fenólicos necessitam primeiramente ser extraídos da sua fonte (NACZK; SHAHIDI, 2004).

1.4.2.1 Extração

A extração é um passo fundamental para a obtenção de antioxidantes com um rendimento aceitável. Utiliza-se com maior frequência a extração por solvente, devido a viabilidade econômica (YASOUBI et al., 2007). A eficácia de um processo de extração é influenciada independentemente e/ou de forma interativa por diversos fatores, tais como a natureza e concentração do solvente, a proporção sólido-solvente, a temperatura de extração, a agitação e o pH do meio, o tamanho das partículas e o tempo de extração. Para alcançar a máxima extração, recomenda-se que vários parâmetros sejam testados (HAMINIUK et al., 2012).

Para a obtenção de dados estatisticamente confiáveis e eficazes, recomenda-se a elaboração de um planejamento experimental capaz de analisar e fornecer modelos empíricos, relacionar as respostas e as variáveis independentes, e apontar possíveis interações entre os fatores estudados, bem como otimizar esses fatores que podem influenciar os resultados dos processos que estão sendo realizados.

A extração de compostos fenólicos deveria ser feita, preferencialmente, de amostras frescas, no entanto, devido à sazonalidade e perecibilidade de diversas matrizes alimentícias, muitos pesquisadores têm empregado os processos de conservação como congelamento e secagem para preservar o material por mais tempo. Nos últimos anos, a liofilização tem sido amplamente utilizada como método de desidratação de amostras (HAMINIUK et al., 2012).

Os extratos obtidos do elemento a ser analisado são sempre uma mistura de diferentes classes de compostos fenólicos que são solúveis no solvente utilizado. A solubilidade dos compostos fenólicos é governada pelo tipo de solvente, grau de polimerização desses compostos, bem como a interação desses compostos com outros constituintes alimentares e a formação de complexos insolúveis. Portanto, não há um procedimento completamente satisfatório ou uniforme que seja adequado para a extração de todos os compostos fenólicos ou de uma classe específica de fenólicos de uma matriz. Geralmente são utilizados os solventes: metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila e suas combinações para a extração de compostos fenólicos (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Segundo Haminiuk et al. (2012), a extração de compostos fenólicos com fluido supercrítico ganhou notoriedade a partir da última década, sendo o dióxido de carbono (CO₂)

o fluido mais utilizado. Apresenta como vantagem ser uma técnica mais seletiva, menos tóxica e que previne o processo oxidativo durante o processamento. Além disso, o produto obtido é ausente de solvente. As desvantagens dessa técnica recaem sobre o alto custo dos equipamentos envolvidos e a utilização de altas pressões.

1.4.2.2 Quantificação de Compostos Fenólicos Totais (CFC)

Os métodos utilizados na análise dos compostos fenólicos podem ser classificados em: determinação de compostos fenólicos totais (métodos espectrofotométricos) e/ou quantificação individual e/ou de um grupo ou classe de compostos fenólicos (métodos cromatográficos).

A) Métodos espectrofotométricos

Historicamente, a principal técnica para quantificar os compostos fenólicos totais de uma amostra é realizada pelo método colorimétrico que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu, proposto por Otto Folin e Vintila Ciocalteu em 1927 (SINGLETON; ROSSI, 1965; ROBBINS, 2003; HAMINIUK et al., 2012). Folin-Ciocalteu é um reagente oxidante a base de dois ácidos: fosfomolibidênico e fosfotungístico. Este reagente interage com os compostos redutores da amostra, sendo reduzido a uma mistura de óxido de tungstênio e molibdênio, de coloração azul. A absorbância é lida no comprimento de onda de 765 nm, onde a intensidade da absorção de luz neste comprimento de onda é proporcional à concentração de fenóis. Reações colorimétricas são amplamente utilizadas no método de espectrofotometria de UV/VIS, que é fácil de executar, rápido e aplicável na utilização laboratorial de rotina, além de apresentar baixo custo (HAMINIUK et al., 2012; BLAINSKI; LOPES; DE MELLO, 2013).

O método de Folin-Ciocalteu foi desenvolvido a fim de melhorar o método de Folin-Denis. Este foi elaborado para determinar indiretamente a concentração de proteína total através da medição do teor de tirosina e triptofano. O princípio de ambos os métodos se baseiam na reação entre o agente oxidante e a tirosina/triptofano, resultando na formação de cor azul proporcional à concentração de proteína. A principal diferença entre o Folin-Ciocalteu e o Folin-Denis é o percentual de molibdato (Mo) utilizado para preparar o reagente. O reagente Folin-Ciocalteu tem maior quantidade de Mo para evitar a formação de um precipitado branco observado nos ensaios de Folin-Denis. O método Folin-Ciocalteu é

mais sensível e reprodutível do que o método de Folin-Denis (SÁNCHEZ-RANGEL et al., 2013).

Tendo em vista a complexidade e a diversidade estrutural dos compostos fenólicos naturais, bem como a possibilidade de interferência de outras substâncias redutoras (como açúcares, aminoácidos e ácido ascórbico), nenhum dos métodos colorimétricos de determinação de compostos fenólicos totais é específico. Outra interferência ocorre em compostos fenólicos com mais do que um grupo hidroxila, onde se espera o dobro da produção de cor molar, no entanto, efeitos estéricos ou substituições no anel aromático podem modificar a resposta esperada, uma vez que os grupos hidroxilo não estão acessíveis para o reagente cromóforo. Além disso, a identificação de compostos fenólicos individuais não é possível com estes métodos (ROBBINS, 2003; PALACIOS et al., 2011; BLAINSKI; LOPES; DE MELLO, 2013).

A principal metodologia para quantificar os flavonoides em uma amostra de cogumelos comestíveis está baseada no ensaio colorimétrico empregando o reagente cloreto de alumínio (AlCl_3). É uma metodologia simples e eficiente para a quantificação do conteúdo total de flavonoides. Nesta metodologia, o extrato de cogumelo comestível é adicionado em uma solução de AlCl_3 , podendo previamente ter sido misturada com nitrito de sódio (NaNO_2). Após um curto período de tempo, a absorvância é medida e comparada com um padrão de flavonoides (catequina, quercetina ou rutina). A desvantagem deste método é que apenas fornece uma estimativa do teor total de flavonoides, não separando e quantificando os compostos individuais (IGNAT; VOLFF; POPA, 2011; HAMINIUK et al., 2012; GAN; NURUL AMIRA; ASMAH, 2013).

Um levantamento da literatura indicando a quantificação dos fenólicos e dos flavonoides totais em cogumelos comestíveis pelo método colorimétrico de Folin Ciocalteu é apresentado na Tabela 3.

B) Métodos cromatográficos

Na década de 1960 a técnica de cromatografia gasosa (CG) foi utilizada para analisar flavonoides. Após a introdução das técnicas de cromatografia líquida, as análises em CG tornaram-se menos proeminentes, tendo em vista que esta é uma técnica mais trabalhosa e apresenta baixos limites de detecção dos compostos fenólicos (RIJKE et al., 2006).

Técnicas de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ou CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) estão sendo mais amplamente utilizadas, tanto para separar como para quantificar os compostos fenólicos (KALILI; VILLIERS, 2011). A

TABELA 3 – COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS QUANTIFICADOS EM COGUMELOS.

(Continua)

Cogumelo comestível		Fenólicos totais	Flavonoides totais	Fonte
Nome comum	Nome científico			
Champignon	<i>Agaricus bisporus</i>	4,49 mg GAE/g extrato	1,73 mg QE/g extrato	(BARROS et al., 2008b)
Champignon	<i>Agaricus bisporus</i>	23,34 mg GAE/g extrato	-	(Reis et al. 2012a)
Champignon	<i>Agaricus bisporus</i>	4,21 – 4,64 mg GAE/g MS	-	(SMOLSKAITĖ; VENSKUTONIS; TALOU, 2015)
Portobelo	<i>Agaricus bisporus</i>	6,33 – 7,90 mg GAE/g ES	0,97 – 1,52 mg EC/g ES	(MIRCEA et al., 2015)
Portobelo	<i>Agaricus bisporus</i>	37,33 mg GAE/g extrato	-	(Reis et al. 2012a)
Cogumelo do sol	<i>Agaricus blazei</i>	31,98 mg GAE/100 g MS	-	(CARNEIRO et al., 2013)
Cogumelo do cavalo	<i>Agaricus arvensis</i>	2,72 mg GAE/g extrato	1,65 mg QE/g extrato	(BARROS et al., 2008b)
Cogumelo do cavalo	<i>Agaricus arvensis</i>	118,8 mg GAE/kg MS	-	(BARROS et al., 2009)
Cogumelo do cavalo	<i>Agaricus arvensis</i>	59,78 mg GAE/100g MU	16,04 mg CE/100g MU	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Rosa-dos-prados	<i>Agaricus campestris</i>	14,60 mg GAE/g extrato	1,90 mg CE/g extrato	(WOLDEGIORGIS et al., 2014)
Cogumelo madeira	<i>Agaricus silvícula</i>	6,40 mg GAE/g extrato	3,40 mg QE/g extrato	(BARROS et al., 2008b)
Verruga amarela ou mancha amarela	<i>Amanita flavoconia</i>	30,31 mg GAE/100g MU	8,89 mg CE/100g MU	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
-	<i>Amanita pantherina</i>	65,40 mg GAE/100g MU	18,34 mg CE/100g MU	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Anjo-destruidor-Europeu	<i>Amanita virosa</i>	37,44 mg GAE/100g MU	7,25 mg CE/100g MU	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Orelha de pau ou orelha-de-Judeu	<i>Auricularia polytricha</i>	6,03 mg GAE/g MS	6,95 mg QE/g MS	(WONG et al., 2013)
Tortulho, Míscaro ou Boleto-doce	<i>Boletus edulis</i>	55,60 mg GAE/100g MU	23,66 mg CE/100g MU	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Boleto maçã	<i>Boletus frostii</i>	75,80 mg GAE/100g MU	12,30 mg CE/100g MU	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Boleto pálido	<i>Boletus luridus</i>	120,98 mg GAE/100g MU	14,35 mg CE/100g MU	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
-	<i>Cortinarius alboviolaceus</i>	45,36 mg GAE/100g MU	6,47 mg CE/100g MU	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Enokitake, talo veludo ou pé-de-veludo	<i>Flammulina velutipes</i>	0,90 mg GAE/g MS	0,20 mg QE/g MS	(WONG et al., 2013)
Casco de cavalo ou fungo pavio	<i>Fomes fomentarius</i>	8,58 mg GAE/g ES	1,20 mg CE/g ES	(MIRCEA et al., 2015)
Língzhī, reishi ou yeongji	<i>Ganoderma lucidum</i>	117,49 mg GAE/100g MU	12,77 mg CE/100g MU	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)

TABELA 3 – COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS QUANTIFICADOS EM COGUMELOS.

(Continuação)

Língzhī, reishi ou yeongji	<i>Ganoderma lucidum</i>	20,40 mg GAE/g MS	-	(YILDIZ et al., 2015)
Maitake	<i>Grifola frondosa</i>	4,17 mg GAE/g MS	-	(DUBOST; OU; BEELMAN, 2007)
Dente de farinha	<i>Hydnellum ferrugineum</i>	6,92-13,31 mg GAE/g MS	-	(SMOLSKAITĖ; VENSKUTONIS; TALOU, 2015)
-	<i>Hygrophorus sordidus</i>	36,95 mg GAE/100g MU	7,09 mg CE/100g MU	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Cogumelo lagosta	<i>Hypomyces lactiflorum</i>	36,44 mg GAE/100g MU	13,19 mg CE/100g MU	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
-	<i>Hypsizygus tessulatus</i>	5,65 mg GAE/ g extrato	2,50 mg QE/g extrato	(CHOWDHURY; KUBRA; AHMED, 2015)
-	<i>Hypsizygus tessulatus</i>	3,14 mg GAE/g MS	1,04 mg QE/g MS	(WONG et al., 2013)
-	<i>Hypsizygus tessulatus</i>	36,45 g GAE/100 g ES	-	(MONIRA et al., 2012)
-	<i>Inonotus hispidus</i>	4,79-41,27 mg GAE/g MS	-	(SMOLSKAITĖ; VENSKUTONIS; TALOU, 2015)
Cogumelo de leite azul	<i>Lactarius indigo</i>	56,50 mg GAE/100g MU	12,27 mg CE/100g MU	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Frango das madeiras	<i>Laetiporus sulphureus</i>	3,39 mg GAE/g extrato	0,44 mg CE/g extrato	(WOLDEGIORGIS et al., 2014)
Shiitake	<i>Lentinus edodes</i>	10,66 mg GAE/g extrato	4,76 mg QE/g extrato	(CHOWDHURY; KUBRA; AHMED, 2015)
Shiitake	<i>Lentinus edodes</i>	3,45 mg GAE/ g extrato	1,50 mg CE/g extrato	(WOLDEGIORGIS et al., 2014)
Shiitake	<i>Lentinus edodes</i>	8,10 mg GAE/100g MS	-	(CARNEIRO et al., 2013)
-	<i>Lepista nuda</i>	7,7 mg GAE/g MS	-	(ELMASTAS et al., 2007)
Funil gigante	<i>Leucopaxillus giganteus</i>	6,29 mg GAE/g extrato	-	(BARROS et al., 2007b)
Puffball	<i>Lycoperdon perlatum</i>	72,71 mg GAE/100g MU	13,36 mg CE/100g MU	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Morel, Pantorra	<i>Morchella esculenta</i>	25,01 mg GAE/g MS	-	(YILDIZ et al., 2015)
Fungo de veludo	<i>Phaeolus schweinitzii</i>	7,07-31,88 mg GAE/g MS	-	(SMOLSKAITĖ; VENSKUTONIS; TALOU, 2015)
Ostra cor de rosa	<i>Pleurotus djamor</i>	18,88 mg TAE/g micélio	-	(MISHRA et al., 2013)
Cogumelo Ostra Rei	<i>Pleurotus eryngii</i>	21,67 mg TAE/g micélio	-	(MISHRA et al., 2013)
Cogumelo Ostra Rei	<i>Pleurotus eryngii</i>	3,57 mg GAE/g MS	0,48 mg QE/g MS	(WONG et al., 2013)
Cogumelo Ostra Rei	<i>Pleurotus eryngii</i>	7,14 mg GAE/g extrato	-	(Reis et al. 2012a)
Shimeji, Cogumelo ostra, Hiratake	<i>Pleurotus ostreatus</i>	1,58-11,36 mg GAE/g MS	0 - 0,26 mg QE/g MS	(GONZÁLEZ-PALMA et al., 2016)
Shimeji, Cogumelo ostra, Hiratake	<i>Pleurotus ostreatus</i>	2,03-2,51 mg GAE/g MS	-	(YILMAZ et al., 2016)
Shimeji, Cogumelo ostra, Hiratake	<i>Pleurotus ostreatus</i>	3,20 mg GAE/g extrato	0,00 mg QE/g extrato	(CHOWDHURY; KUBRA; AHMED, 2015)
Shimeji, Cogumelo ostra, Hiratake	<i>Pleurotus ostreatus</i>	5,47 – 6,17 mg GAE/g ES	2,45 – 2,62 mg CE/g ES	(MIRCEA et al., 2015)

TABELA 3 – COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS QUANTIFICADOS EM COGUMELOS.

(Conclusão)

Shimeji, Cogumelo ostra, Hiratake	<i>Pleurotus ostreatus</i>	4,47 mg GAE/g extrato	0,64 mg CE/g extrato	(WOLDEGIORGIS et al., 2014)
-	<i>Pleurotus florida</i>	3,72 mg GAE/g MS	0,17 mg QE/g MS	(WONG et al., 2013)
-	<i>Pleurotus porrigens</i>	4,97 mg GAE/g MS	-	(LIM; YIM, 2012)
-	<i>Polyporus squamosus</i>	13,9 mg GAE/g MS	-	(ELMASTAS et al., 2007)
-	<i>Ramaria flava</i>	53,75 mg GAE/100g MU	34,57 mg CE/100g MU	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Milk-white brittlegill	<i>Russula delica</i>	26,0 mg GAE/g MS	-	(ELMASTAS et al., 2007)
Deslumbrante	<i>Russula emética</i>	46,47 mg GAE/100g MU	9,47 mg CE/100g MU	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
Ouriço ardido	<i>Sarcodon Imbricatus</i>	3,76 mg GAE/g extrato	-	(BARROS et al., 2007b)
Ouriço ardido	<i>Sarcodon imbricatus</i>	116,91 mg GAE/100g MU	44,85 mg CE/100g MU	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
-	<i>Schizophyllum commune</i>	6,36 mg GAE/g amostra	-	Yim et al., 2013
Velho homem das madeiras	<i>Strobilomyces floccopus</i>	307,01 mg GAE/100g MU	303,53 mg CE/100g MU	(YAHIA; GUTIÉRREZ-OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
-	<i>Suillus luteus</i>	8,16 mg GAE/g MS	3,96 mg CE/g MS	(JAWORSKA et al., 2014)
-	<i>Termitomyces clypeatus</i>	10,50 mg GAE/g extrato	0,55 g CE/g extrato	(WOLDEGIORGIS et al., 2014)
-	<i>Termitomyces microcarpus</i>	9,39 mg GAE/g extrato	0,17 mg CE/g extrato	(WOLDEGIORGIS et al., 2014)
-	<i>Verpa cônica</i>	17,2 mg GAE/g MS	-	(ELMASTAS et al., 2007)
-	<i>Xerocomus chrysenteron</i>	4,96 – 6,56 mg GAE/g MS	-	(SMOLSKAITĖ; VENSKUTONIS; TALOU, 2015)

FONTE: O autor (2017).

NOTA: GAE – Ácido gálico equivalente; TAE – Ácido tânico equivalente; CE – Catequina equivalente; QE – Quercetina equivalente; MS – matéria seca; MU – matéria úmida; ES – extrato seco.

CLAE de fase reversa (RP-CLAE) é o principal método utilizado para a separação de compostos fenólicos de materiais alimentícios, em que a fase estacionária é apolar e a fase móvel é polar. A fase estacionária é geralmente constituída por cadeias alquila hidrófobas, onde existem três comprimentos de cadeia comuns: C4, C8 e C18. As colunas C18 são amplamente utilizadas para separar os compostos fenólicos (HAMINIUK et al., 2012).

As fases móveis comumente utilizadas para a separação e caracterização dos compostos fenólicos são o metanol e a acetonitrila, podendo ser utilizados também o propanol, butanol, acetato de etila e tetrahidrofurano. Geralmente um ácido é adicionado ao solvente aquoso ou orgânico, sendo o ácido acético o mais utilizado (ROBBINS, 2003).

Os compostos fenólicos são comumente detectados utilizando detectores de espectrofotometria UV-visível, fluorescência e detector eletroquímico. Outros métodos com técnicas de detecção de compostos fenólicos combinadas vêm sendo utilizados, como é o caso da técnica com detector de arranjo de diodos (DAD UV), UV-fluorescência, UV-espectrometria de massa, utilização de detector eletroquímico (RIJKE et al., 2006). A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrometria de massa (CLAE-MS) tem sido comumente utilizada para a caracterização estrutural de compostos fenólicos (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Puttaraju et al. (2006) utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, com detector de arranjo de diodos para analisar ácidos fenólicos presentes em extratos aquosos e metanólicos de cogumelos. Kim et al. (2008), Vaz et al. (2011) e Barros et al. (2009) também analisaram compostos fenólicos de cogumelos com sistema CLAE e detector de arranjo de diodos. Nowacka et al. (2014) identificaram alguns ácidos fenólicos em 19 cogumelos da Polônia, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e espectrometria de massa por ionização por eletro-spray (LC-ESI-MS/MS). Recentemente, Gąsecka et al. (2016) determinaram os compostos fenólicos do *P. ostreatus* e *P. eryngii* por meio de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), com detector de arranjo de fotodiodos.

Diversas outras técnicas vêm sendo testadas e utilizadas para a separação e quantificação de compostos fenólicos. A cromatografia gasosa continua sendo empregada, porém, em menor escala que a cromatografia líquida. Outras técnicas menos utilizadas e que podem ser citadas são a eletroforese capilar e cromatografia de camada delgada (RIJKE et al., 2006).

1.4.2.3 Avaliação da atividade antioxidante

Vários métodos são utilizados para avaliar as propriedades antioxidantes de amostras provenientes de diversas fontes alimentícias, cada um tendo o seu alvo específico dentro da matriz e todos eles com vantagens e desvantagens. Não há um método que pode fornecer resultados inequívocos, e a melhor solução é a utilização de vários métodos (HAMINIUK et al., 2012; ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

A capacidade antioxidante é avaliada principalmente através de testes químicos (*in vitro*) (HAMINIUK et al., 2012) e suas atividades são determinadas por técnicas espectrofotométricas e expressa em termos de "poder antioxidante". Progressivamente, as técnicas eletroquímicas têm sido desenvolvidas e testadas como uma ferramenta alternativa para a avaliação de diferentes extratos de alimentos (KHATUN et al., 2015).

Várias pesquisas vêm comprovando a atividade antioxidante em diversos cogumelos comestíveis como em *Agaricus bisporus* (GAN; NURUL AMIRA; ASMAH, 2013; TSAI; MAU; HUANG, 2014; SMOLSKAITÉ; VENSKUTONIS; TALOU, 2015), *A. brasiliensis* (GAN; NURUL AMIRA; ASMAH, 2013), *Pleurotus ostreatus* (WOLDEGIORGIS et al., 2014; GAŞECKA et al., 2016; YILMAZ et al., 2016), *P. eryngii* (GAŞECKA et al., 2016), *P. florida*, *P. pulmonarius* e *P. citrinopileatus* (KHATUN et al., 2015) *P. sajor-caju* e *P. eous*, *Volvarella volvacea* e *Auricularia auricular* (BOONSONG; KLAYPRADIT; WILAI PUN, 2016), *Auricularia cornea* (REN et al., 2014), *Lentinus edodes* (REN et al., 2014; WOLDEGIORGIS et al., 2014; BOONSONG; KLAYPRADIT; WILAI PUN, 2016), *Suillus luteus* (JAWORSKA et al., 2014), *Hericium erinaceum* (REN et al., 2014), *Xerocomus chrysenteron* (SMOLSKAITÉ; VENSKUTONIS; TALOU, 2015), entre outros.

A atividade antioxidante não deve ser concluída com base em um único modelo de teste antioxidante, devendo ser realizados diversos procedimentos de ensaios *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante com as amostras de interesse. Além disso, os modelos de testes antioxidantes variam em diferentes aspectos, os resultados são expressos em unidades distintas, o que dificulta a comparação direta de um método com outro (HAMINIUK et al., 2012; ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

A atividade antioxidante utilizando métodos químicos é avaliada por meio de métodos de transferência de átomo de hidrogênio ou por métodos de transferência de elétrons. Os métodos mais utilizados, que avaliam a transferência de átomo de hidrogênio são: o ABTS ((2,2'-azino-bis-)3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico), o ORAC (capacidade de absorção de radical oxigênio), o TRAP (potencial antioxidante reativo total) e a capacidade de inibição

da peroxidação lipídica. Enquanto que os métodos que avaliam a transferência de elétrons são: o DPPH• (1,1-difenil-2-picrilidrazil), o FRAP (potencial antioxidante de redução do ferro) e o TEAC (capacidade antioxidante equivalente em Trolox) (HAMINIUK et al., 2012). Três dessas metodologias serão abordadas aqui: ABTS, DPPH e FRAP. Todas essas metodologias foram utilizadas para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos fenólicos dos cogumelos.

A) Metodologia do ABTS ((2,2'-azino-bis-)3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)

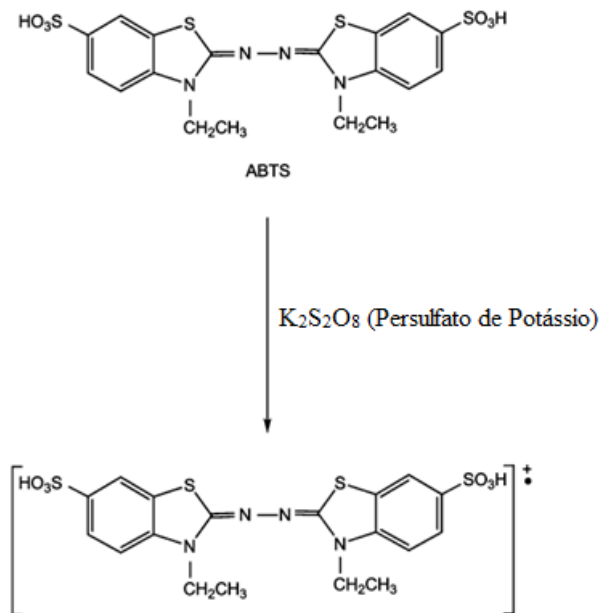
A metodologia ABTS tem sido amplamente utilizada para avaliar a atividade antioxidante em alimentos e bebidas, devido a sua aplicabilidade em fases aquosa e lipídica (MOON; SHIBAMOTO, 2009; ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). O ABTS apresenta elevada solubilidade em água e estabilidade química. É um ensaio colorimétrico, com máxima absorção a 342 nm, cujos radicais ABTS descolorem na presença de antioxidantes (ANTOLOVICH et al., 2002; CAROCHO; FERREIRA, 2013). O ensaio original de ABTS foi baseado na ativação de meta-mioglobina por peróxido de hidrogênio na presença de ABTS e a amostra era adicionada ao meio antes da formação do radical (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006). Na versão modificada por Re et al. (1999) deste ensaio, um radical cátion estável de ABTS é formado pela oxidação química do ABTS com persulfato de potássio (como mostrado na Figura 3), antes da adição da amostra antioxidante. Esta solução apresenta uma absorção cromófora azul esverdeada com máxima absorbância em 645, 734 e 815 nm. A atividade antioxidante dos produtos naturais, incluindo os carotenoides, compostos fenólicos, e alguns antioxidantes do plasma, é determinada pela descoloração do ABTS. A absorção da reação entre o ABTS e uma solução antioxidante é comparada com a absorção do padrão Trolox, e os resultados são expressos em termos de capacidade antioxidante em Trolox equivalente (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

B) Metodologia DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil)

O método DPPH foi relatado primeiramente por Marsden Blois em 1958; mais tarde, em 1995, Brand-Williams, Cuvelier e Berset revisaram o método original, tornando o DPPH um método popular para estimar a capacidade antioxidante (NOIPA et al., 2011). O método DPPH é amplamente utilizado devido à sua estabilidade, simplicidade e seu sistema simples de reação, que envolve somente a reação direta entre o radical e um antioxidante. A molécula de DPPH é um radical livre de nitrogênio orgânico, estável a temperatura ambiente que apresenta um elétron livre descentralizado na molécula, de modo que esta não dimeriza, como

seria o caso da maioria dos outros radicais livres. A descentralização do elétron também dá origem à cor violeta forte, caracterizado por uma banda de absorção monitorada entre 515-520 nm. Quando uma solução metanólica de DPPH reage com um antioxidante, o DPPH é reduzido, alterando sua cor violeta para amarelo claro e uma redução na absorbância é observada. Os fatores que influenciam a atividade de eliminação do radical DPPH são: o solvente no qual o DPPH é solubilizado, o pH, a concentração da amostra e tempo de reação (BADARINATH et al., 2010; NOIPA et al., 2011; ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

FIGURA 3 - PRODUÇÃO DO RADICAL CÁTION ABTS PELA ADIÇÃO DE PERSULFATO DE POTÁSSIO.



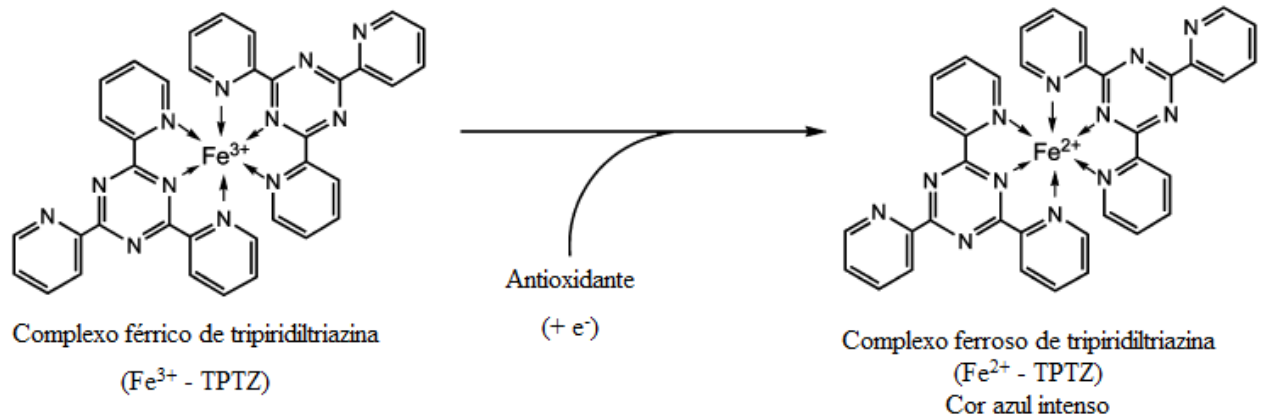
FONTE: MOON e SHIBAMOTO (2009).

C) Metodologia FRAP (potencial antioxidante de redução do ferro)

O ensaio FRAP foi originalmente aplicado ao plasma, mas agora é comumente utilizado em um grande número de matrizes. É caracterizado pela redução do complexo entre o Fe³⁺ e a tripiridiltriazina (Fe³⁺ - TPTZ), para Fe²⁺ - TPTZ, conforme a Figura 4. Esta redução ocorre em contato com antioxidantes em meio ácido, alterando a cor da solução de amarelo para azul intenso, analisado por meio de um espectrofotômetro, com máxima absorbância em 593 nm. Os resultados podem ser expressos como micromolar de Fe²⁺ equivalente, ou em relação a um antioxidante padrão, como por exemplo, o Trolox (PÉREZ-

JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006; MOON; SHIBAMOTO, 2009; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

FIGURA 4 - FORMAÇÃO DO COMPLEXO Fe^{2+} - TPTZ A PARTIR DO COMPLEXO Fe^{3+} - TPTZ POR AÇÃO ANTIOXIDANTE.



FONTE: MOON e SHIBAMOTO (2009).

A Tabela 4 apresenta um levantamento bibliográfico que aponta os testes antioxidantes *in vitro*, supracitados, que vem sendo utilizado pelos autores nos últimos anos para avaliar a capacidade antioxidante em cogumelos comestíveis e não comestíveis.

TABELA 4 - MÉTODOS (*IN VITRO*) MAIS UTILIZADOS PARA AVALIAR A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM COGUMELOS NOS ÚLTIMOS ANOS.

(Continua)

Ano	Cogumelos	Métodos antioxidantes (<i>in vitro</i>)			Autores
		ABTS	DPPH	FRAP	
2017	<i>Lactarius indigo</i> , <i>Amanita flavoconia</i> , <i>Russula emetica</i> , <i>Strobilomyces floccopus</i> , <i>Hygrophorus sordidus</i> , <i>Amanita pantherina</i> , <i>Boletus edulis</i> , <i>Agaricus arvensis</i> , <i>Amanita virosa</i> , <i>Boletus frostii</i> , <i>Ramaria flava</i> , <i>Lycoperdon perlatum</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Cortinarius alboviolaceus</i> , <i>Sarcodon imbricatus</i> , <i>Boletus luridus</i> , <i>Hypomyces lactiflorum</i>		X	X	(YAHIA; GUTIÉRREZ- OROZCO; MORENO-PÉREZ, 2017)
2016	<i>Pleurotus ostreatus</i>	X	X	X	(GONZÁLEZ-PALMA et al., 2016)
2016	<i>Flammulina velutipes</i>	X	X	X	(HU et al., 2016)
2016	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Lentinula edodes</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i>		X	X	(RADZKI et al., 2016)
2016	<i>Pleurotus sajor-caju</i>		X		(RASHIDI; YANG, 2016)
2016	<i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Ganoderma applanatum</i> , <i>Tricholoma matsutake</i>		X	X	(SHANG et al., 2016)
2016	<i>Pleurotus ostreatus</i>			X	(YILMAZ et al., 2016)
2015	<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Hypsizyguis tessulatus</i> , <i>Lentinula edodes</i>		X		(CHOWDHURY; KUBRA; AHMED, 2015)
2015	<i>Pleurotus ostreatus</i>	X	X		(HAN et al., 2015)
2015	<i>Phaeolus schweinitzii</i> , <i>Inonotus hispidus</i> , <i>Tricholoma columbetta</i> , <i>Tricholoma caligatum</i> , <i>Xerocomus chrysenteron</i> , <i>Hydnellum ferrugineum</i>	X	X	X	(SMOLSKAITÉ; VENSUKUTONIS; TALOU, 2015)
2015	<i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Morchella esculenta</i> , <i>Lentinula edodes</i> , <i>Hericium erinaceus</i>		X	X	(YILDIZ et al., 2015)
2015	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i>	X	X	X	(JAWORSKA et al., 2015)
2015	<i>Agaricus bisporus</i> (Portobelo), <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Fomes fomentarius</i>	X	X		(MIRCEA et al., 2015)
2015	<i>Lentinula edodes</i>	X	X	X	(MISHRA; PAL; BHATT, 2015)
2015	<i>Pleurotus ostreatus</i>	X	X		(STEFAN; VAMANU; ANGELESCU, 2015)
2014	<i>Ganoderma carnosum</i> , <i>Ganoderma lingzhi</i> , <i>Ganoderma australe</i> , <i>Postia stiptica</i> , <i>Phlebia tremellosa</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Inonotus andersonii</i> , <i>Inonotus sp.</i> <i>Heterobasidion linzhiense</i> , <i>Heterobasidion linzhiense</i> , <i>Phellinus gilvus</i> , <i>Phellinus conchatus</i> , <i>Inocybe sp.</i> , <i>Collybia peronata</i> , <i>Lactarius hatsudake</i> , <i>Lenzites botulina</i> , <i>Panellus sp.</i> , <i>Rigidoporus sp.</i> , <i>Tricholoma caligatum</i>	X	X		(BANG et al., 2014)
2014	<i>Chroogomphus rutilus</i>	X	X		(ÇAYAN et al., 2014)
2014	<i>Boletus edulis</i> , <i>Russula delica</i>		X		(FERNANDES et al., 2014)
2014	<i>Antrodia salmonela</i>		X		(HSEU et al., 2014)
2014	<i>Suillus luteus</i>	X	X	X	(JAWORSKA et al., 2014)
2014	<i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus sapidus</i>		X		(JEENA et al., 2014)

TABELA 4 - MÉTODOS (*IN VITRO*) MAIS UTILIZADOS PARA AVALIAR A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM COGUMELOS NOS ÚLTIMOS ANOS.

(Conclusão)

2014	<i>Jinqian</i>	X	X		(LIU et al., 2014b)
2014	<i>Agaricus albertii</i> , <i>Agaricus urinascens</i> , <i>Pleurotus eryngii</i>		X		(REIS et al., 2014)
2014	<i>Auricularia cornea</i> , <i>Calvatia gigantea</i> , <i>Hericium coralloides</i> , <i>Pleurotus australis</i> , <i>Hericium erinaceum</i> , <i>Lentinula edodes</i>		X		(REN et al., 2014)
2014	<i>Afrocantharellus splendens</i> , <i>Afrocantharellus symoensii</i> , <i>Cantharellus tomentosus</i> , <i>Cantharellus congolensis</i> , <i>Cantharellus cyanoxanthus</i> , <i>Cantharellus rufopunctatus</i> , <i>Cantharellus pseudocibarius</i>		X		(TIBUHWA, 2014)
2013	<i>Agaricus balzei</i> , <i>Lentinus edodes</i>	X	X	X	(CARNEIRO et al., 2013)
2013	<i>Amanita ovoidea</i>		X		(DOĞAN, 2013)
2013	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Agaricus brasiliensis</i>		X	X	(GAN; NURUL AMIRA; ASMAH, 2013)
2013	<i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Lactarius sanguifluus</i> , <i>Lactarius semisanguifluus</i> , <i>Russula delica</i> , <i>Suillus bellinii</i>		X	X	(KALOGEROPOULOS et al., 2013)
2013 (a)	<i>Agaricus bisporus</i>		X		(LIU et al., 2013a)
2013 (b)	<i>Ramaria flava</i>		X		(LIU et al., 2013b)
2013	<i>Pleurotus eryngii</i>		X		(MISHRA et al., 2013)
2013	<i>Cordyceps militaris</i>		X		(REIS et al., 2013)
2013	<i>Coprinus comatus</i>		X		(STOJKOVIĆ et al., 2013)
2013	<i>Pleurotus ostreatus</i>		X		(VIEIRA et al., 2013)
2013	<i>Hypsizygus tessulatus</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Pleurotus florida</i> , <i>Auricularia polytricha</i> , <i>Flammulina velutipes</i>		X		(WONG et al., 2013)
2013	<i>Schizophyllum commune</i>	X	X	X	(YIM; CHYE; RAO, 2013)
2012	<i>Agrocybe cylindracea</i> , <i>Amanita ceciliae</i> , <i>Amillaria mellea</i> , <i>Boletus reticulatus</i> , <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Chlorophyllum rhacodes</i> , <i>Coprinus comatus</i> , <i>Flanulina velutipes</i> , <i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Lactarius salmonicolor</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Polyporus squamosus</i> , <i>Rhizopogon roseolus</i> , <i>Russula anthracina</i> , <i>Suillus collinitus</i> , <i>Tricholoma myomyces</i>		X		(AKATA; ERGONUL; KALYONCU, 2012)
2012	<i>Coprinopsis atramentaria</i> , <i>Lactarius bertillonii</i> , <i>Lactarius vellereus</i> , <i>Rhodotus palmatus</i> , <i>Xerocomus chrysenteron</i>		X		(HELENO et al., 2012)
2012	<i>Pleurotus ostreatus</i>	X	X	X	(LIM; YIM, 2012)
2012	<i>Agaricus bisporus</i>		X		(LIU; WANG, 2012)
2012	<i>Clitocybe maxima</i> , <i>Catathelasma ventricosum</i> , <i>Stropharia rugoso-annulata</i> , <i>Craterellus cornucopioides</i> , <i>Laccaria amethystea</i>		X		(LIU et al., 2012a)
2012	<i>Hypsizygus tessulatus</i>		X		(MONIRA et al., 2012)
2012	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Lentinula edodes</i>		X		(REIS et al., 2012b)
2012	<i>Pleurotus porrigens</i>	X	X	X	(YIM et al., 2012)

FONTE: O autor (2017).

1.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COGUMELOS

O desenvolvimento de antibióticos tem sido uma das realizações científicas mais importantes dos últimos setenta anos. Estes compostos agem de várias maneiras, interferindo nos processos metabólicos ou nas estruturas do organismo. O mecanismo de ação está relacionado principalmente com interferências na síntese da parede celular, modificação da permeabilidade da membrana plasmática, interferências na replicação cromossômica ou na síntese proteica (ALVES et al., 2012).

As plantas medicinais têm sido usadas durante séculos como remédios para doenças humanas e oferecem uma nova fonte de composto químico biologicamente ativo como agente antimicrobiano (DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010). Os produtos naturais ainda são uma das principais fontes de novas moléculas de drogas antimicrobianas. São derivados de bactérias procarióticas, microrganismos eucarióticos, plantas e vários organismos animais. Os produtos microbianos e vegetais ocupam a maior parte dos compostos antimicrobianos descobertos até agora. Recentemente, muitos pesquisadores têm se concentrado na investigação de extratos vegetais e microbianos, óleos essenciais, metabólitos secundários puros e novas moléculas sintetizadas como agentes antimicrobianos potenciais (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Os cogumelos podem ser uma fonte de antibióticos naturais, devido à presença de compostos com pesos moleculares diferentes, que apresentam atividade antimicrobiana. Os compostos de baixo peso molecular, que apresentam essa atividade, são principalmente metabólitos secundários tais como sesquiterpenos e outros terpenos, esteroides, antraquinona e derivados de ácido benzoico e quinolinas, mas também metabólitos primários tais como ácido oxálico. Já os compostos de alto peso molecular com atividade antimicrobiana incluem, principalmente, peptídeos e proteínas (ALVES et al., 2012).

A atividade antimicrobiana pode ser determinada por meio de testes de susceptibilidade antimicrobiana. Esses testes podem ser usados para descoberta de fármacos, epidemiologia e predição de resultados terapêuticos (DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). É possível utilizar uma variedade de métodos de laboratório para avaliar ou pesquisar a atividade antimicrobiana *in vitro* de um extrato ou de um composto puro. Os métodos mais conhecidos e básicos são os métodos de difusão em disco ou poço e de diluição em caldo ou ágar. Os métodos de difusão não são apropriados para determinar a Concentração Mínima Inibitória (MIC), enquanto os métodos de diluição fornecem essa informação. O valor de MIC é definido como a concentração mais baixa do

agente antimicrobiano de interesse que inibe o crescimento visível do microrganismo testado e é usualmente expresso em mg/mL ou mg/L (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

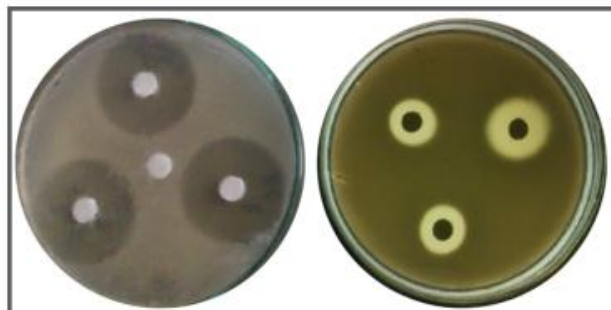
1.5.1 Método de difusão em disco

O método de difusão em disco de ágar foi desenvolvido em 1940 e é amplamente utilizado para ensaios de atividade antimicrobiana de diferentes fontes de extratos. Neste procedimento, os discos de papéis de filtro esterilizados (por filtração) de 6 mm (Whatmann Nº 1), são saturados com extrato de interesse na concentração desejada para o teste (DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Os discos contendo o extrato devem ser secos em câmara de fluxo laminar para posteriormente serem colocados na superfície de um meio de ágar sólido adequado (Mueller Hinton, ágar de soja Trypton ou ágar Nutriente), conforme Figura 5. O meio sólido deve ter sido previamente inoculado com o micro-organismo a ser testado, em concentração padrão de inóculo igual a 1×10^8 UFC/mL, que corresponde padrão de turvação McFarland 0,5 (DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010).

As placas de Petri são então incubadas durante 24 h a 37°C (bactérias) e 48 h a 25°C (fungos) (DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010). Geralmente, o agente antimicrobiano difunde para dentro do ágar e inibe a germinação e crescimento do microrganismo testado (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Em seguida, o diâmetro da zona de inibição de crescimento é medido para o milímetro inteiro mais próximo no ponto em que há uma redução proeminente de crescimento de 80% (DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010).

FIGURA 5 – MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO.



FONTE: BALOUIRI, SADIKI e IBNSOUDA (2016).

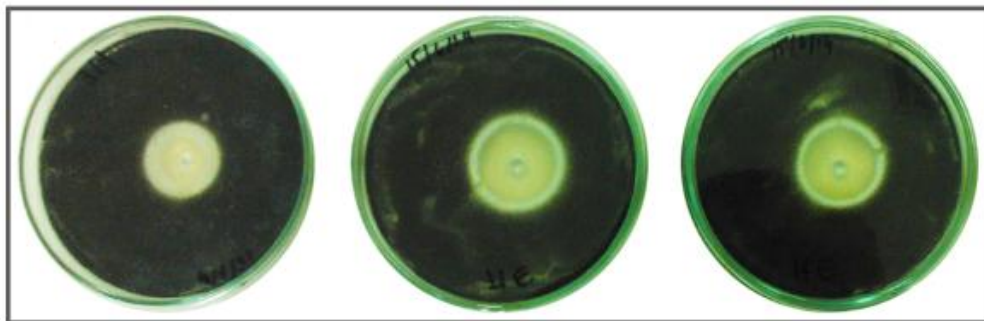
No entanto, uma vez que a inibição do crescimento bacteriano não significa a morte bacteriana, este método não pode distinguir efeitos bactericidas e bacteriostáticos. Além disso, o método de difusão em disco de ágar não é apropriado para determinar a MIC, uma vez que é

um método qualitativo, impossível quantificar a quantidade do agente antimicrobiano difundido no meio de ágar (ARASOGLU; DERMAN; MANSUROGLU, 2016; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

1.5.2 Método de difusão em poços

De forma semelhante ao procedimento utilizado no método de difusão em disco, a superfície da placa de ágar é inoculada espalhando um volume do inóculo microbiano sobre toda a superfície do ágar. Em seguida, realiza-se uma perfuração no meio, com diâmetro variando de 6 a 8 mm, com uma broca de cortiça estéril. Um volume fixo (20 – 100 µL) do agente antimicrobiano com concentração conhecida deve ser introduzido no poço. Em seguida, a placa deve ser incubada sob condições adequadas dependendo do micro-organismo de teste. O agente antimicrobiano difunde no meio de ágar e inibe o crescimento da estirpe microbiana testada, conforme Figura 6. A medição do raio de inibição deve ser realizada conforme citado no item 1.5.1 (DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

FIGURA 6 – MÉTODO DE DIFUSÃO EM POÇOS.



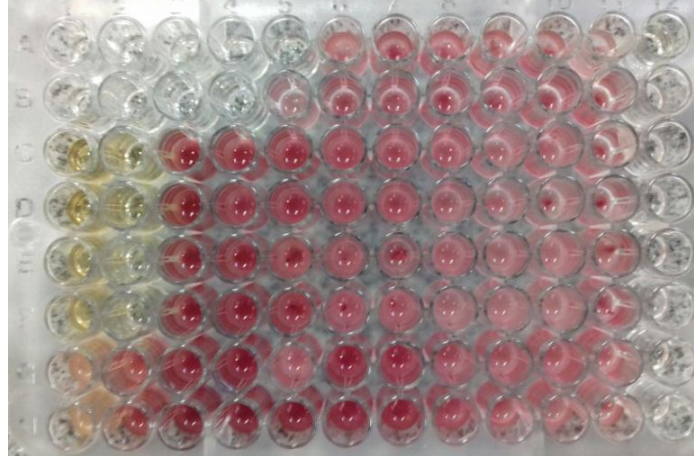
FONTE: BALOUIRI, SADIKI e IBNSOUDA (2016).

1.5.2 Método de microdiluição em caldo ou ágar

O método de microdiluição em caldo fornece uma técnica potencialmente útil para determinar a MIC de um grande número de amostras de teste. A MIC é importante nos laboratórios de diagnóstico para confirmar a resistência de microrganismos a um agente antimicrobiano e também para monitorar a atividade de um novo agente antimicrobiano (DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010).

O caldo Mueller Hinton é frequentemente utilizado como meio de crescimento/diluyente nos poços da microplaca de 96 poços antes (Figura 7) de transferir um volume igual da solução de estudo para o primeiro poço de cada fileira da placa. Diluições em série são feitas a partir do primeiro poço a fim de obter uma gama de concentrações do extrato estudado (DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010).

FIGURA 7 – MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM MICROPLACA DE 96 POÇOS.



FONTE: O autor (2017).

Em seguida, cada poço é inoculado com um inóculo microbiano preparado no mesmo meio, após diluição de suspensão microbiana padronizada ajustada a 0,5 escala de McFarland (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Alguns investigadores utilizam cultura microbiana com uma densidade óptica de 0,4 a 620 nm. A microplaca é então incubada a 37°C durante 24 h (DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010).

Após incubação, as placas são examinadas quanto a alterações na turbidez como um indicador de crescimento. O primeiro poço que aparece claro é tomado para ser a MIC do agente antimicrobiano testado. Essa alteração pode ser identificada utilizando um equipamento leitor de microplacas (espectrofotômetro) ou reagentes corantes. O emprego de espectrofotômetro requer a utilização usual de absorvância igual a 620 nm com controle negativo como “branco”. Os indicadores de crescimento microbiano (corantes) mais utilizados são os sais de tetrazólio ou o corante azul Alamar (resazurina) (DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

As principais vantagens deste método são a determinação da MIC, a reprodutibilidade, a economia de reagentes e a minimização do espaço necessário para a realização das análises (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

1.5.3 Método de macrodiluição de caldo

O princípio básico deste ensaio é o mesmo que o ensaio de microdiluição de caldo. Mas o teste é realizado em um tubo de ensaio. No ensaio de macrodiluição, é preparado um conjunto de tubos de ensaio com diferentes concentrações de extrato de planta com o mesmo volume. Os tubos são inoculados com micro-organismos de teste de concentrações padrão conforme discutido acima. Após incubação, os tubos são examinados quanto a alterações na turbidez como um indicador de crescimento. A MIC do extrato de planta ou do fitoquímico de ensaio pode ser determinada utilizando os métodos acima discutidos (DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010).

As principais desvantagens deste método quando comparado ao de microdiluição são as tarefas tediosas manuais, o risco de erros na preparação de soluções antimicrobianas para cada teste e a quantidade comparativamente grande de reagentes e espaço requerido (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Os capítulos 2, 3 e 4 apresentam os resultados obtidos dos estudos da composição físico-química, nutricional e de compostos biologicamente ativos presentes em sete espécies de cogumelos comestíveis comercializados no território brasileiro.

CAPÍTULO 2

COGUMELOS COMESTÍVEIS: UMA FONTE POTENCIAL DE AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS, GLUCANAS E MINERAIS

O conteúdo desse capítulo foi aceito para publicação na revista *International Journal of Food Science and Technology*.

RESUMO

Os principais componentes químicos e bioquímicos de nove cogumelos comestíveis foram avaliados neste estudo. Um método enzimático foi utilizado para determinar os conteúdos de α - e β -glucanas e os perfis de aminoácidos (AA) foram avaliados por RP-HPLC-DAD. Foi avaliada a dose diária recomendada (RDA) dos nutrientes. Finalmente, a análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para agrupar os cogumelos de acordo com seus AA, glucanas e composição química. Todos os cogumelos avaliados podem ser considerados como fonte potencial e alternativa de fibra alimentar (24,4 a 46,62%) e proteína (16,47 a 36,96%) na dieta, com baixo teor de gordura (1,40 a 2,08%). Fósforo, potássio, ferro, cobre e zinco foram os principais minerais encontrados nos cogumelos, enquanto que a concentração de sódio foi desprezível. Todos os AA essenciais foram detectados nos cogumelos, com *Pleurotus ostreatus* (cogumelo “Ostra” preta) representando a principal fonte de aminoácidos essenciais entre as amostras. O conteúdo de β -glucanas variou de 1,58 a 16,91 mg/g de matéria seca entre os cogumelos e o *Pleurotus eryngii* apresentou a maior quantidade desse componente. *P. ostreatus* (cogumelo “Ostra” preta) e *P. eryngii* também foram agrupados devido a semelhanças em seus teores de fósforo e arginina.

Palavras-chave: β -glucanas, aminoácidos essenciais, PCA, conteúdo mineral, baixo conteúdo de sódio.

2.1 INTRODUÇÃO

Embora existam aproximadamente 3.000 espécies de cogumelos comestíveis na natureza, apenas cerca de 25 são amplamente aceitos como alimento e poucos são comercialmente cultivados (Valverde *et al.*, 2015). Em muitos países, os cogumelos comestíveis são pouco consumidos pela população, apesar de representarem uma das maiores fontes alimentares e nutricionais (WANI; BODHA; WANI, 2010; DEEPALAKSHMI; MIRUNALINI, 2014).

Os cogumelos possuem uma composição nutricional balanceada (RASHIDI; YANG, 2016) e são considerados como fonte atrativa e alternativa de proteína de alta qualidade, com aminoácidos essenciais (AA) e não essenciais. Neste contexto, os AA desempenham um papel importante na estrutura das células, tecidos e órgãos, tornando-se, portanto, essencial para o crescimento e reparação celular (ALAM *et al.*, 2008; WANI; BODHA; WANI, 2010; MUKHOPADHYAY; GUHA, 2015; TEKLIT, 2015). Além disso, os cogumelos são uma excelente fonte de carboidratos, fibra dietética, ácidos graxos insaturados, vitaminas e minerais (DEEPALAKSHMI; MIRUNALINI, 2014; KADNIKOVA *et al.*, 2015; ROSLI; MAIHIZA; RAUSHAN, 2015; TEKLIT, 2015).

Além de ser uma excelente fonte de nutrientes, os cogumelos são considerados alimentos funcionais e podem proporcionar benefícios para a saúde por apresentar compostos bioativos como β -glucanas, peptídeos, substâncias quitinosas, terpenos, esteróis e compostos fenólicos (WANI; BODHA; WANI, 2010; DEEPALAKSHMI; MIRUNALINI, 2014). As β -glucanas são polissacarídeos constituintes da parede celular dos cogumelos, que resistem às enzimas gastrointestinais, auxiliando no aumento do volume das fezes e mobilidade intestinal. Acredita-se também que este polissacarídeo é capaz de diminuir a absorção de substâncias químicas tóxicas e nocivas, levando a uma menor incidência de câncer (CHEUNG, 2013; ROSLI; MAIHIZA; RAUSHAN, 2015; RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2015).

A informação sobre o conteúdo nutricional dos alimentos contribui para o estabelecimento de políticas de produção, armazenamento, avaliação do estado nutricional, formulação de dietas terapêuticas e as relações entre dieta, saúde e doença (Caire-juvera *et al.*, 2013). Neste contexto, este trabalho apresenta a composição e a qualidade nutricional de nove cogumelos comestíveis dos gêneros *Agaricus*, *Flammulina*, *Lentinula* e *Pleurotus*, a fim de ampliar o conhecimento dos benefícios e vantagens da inserção desses cogumelos à dieta humana.

Os objetivos deste estudo foram: (I) analisar a concentração de α - e β -glucanas, (II) avaliar o perfil de aminoácidos individuais das amostras por cromatografia líquida, (III) determinar a composição mineral e (IV) agrupar as nove amostras de cogumelos comestíveis de acordo com sua composição química, mineral e de aminoácidos, usando a análise de componentes principais (PCA).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Cogumelos

As amostras de cogumelos comestíveis (corpos de frutificação de nove cogumelos distintos) foram analisadas em laboratórios da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Florestas) em Colombo-PR/Brasil. As espécies selecionadas para este estudo foram: *Agaricus bisporus* (Champignon), *A. bisporus* (Portobelo), *A. brasiliensis*, *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus djamor*, *P. eryngii*, *P. ostreatus* (cogumelo “Ostra” branca) e *P. ostreatus* (cogumelo “Ostra” preta), conforme Figura 8. Com exceção do *A. brasiliensis*, que foi fornecido por um produtor de cogumelos de Piedade, São Paulo, Brasil, os demais cogumelos foram adquiridos no comércio de Curitiba, Paraná, Brasil. Um total de 2,0 kg de cada cogumelo foi comprado para a realização das análises.

2.2.2 Composição química

Os cogumelos (amostras frescas), após serem triturados e homogeneizados em um misturador, foram utilizados para as análises, exceto para a determinação do teor de lipídios. As amostras para a determinação de lipídeos foram liofilizadas (a -50°C e 150 mm Hg por 96 horas), devido ao elevado teor de umidade do produto original. O teor de umidade foi determinado por diferença de peso antes de depois da secagem em estufa a 105°C até massa constante, segundo AOAC (*Association of Official Analytical Chemicals*), método nº 925.09 (AOAC, 2005). O resíduo mineral fixo (cinzas) foi quantificado após incineração das amostras em mufla, a 550°C por 5 h, conforme o método nº 923.03 (AOAC, 2005). O conteúdo lipídico foi determinado pelo método de extração de Soxhlet, utilizando éter etílico como solvente de extração. O teor de proteína foi determinado pelo método nº 920.87, (AOAC, 2005) e o nitrogênio convertido em proteína, multiplicando o conteúdo de nitrogênio

FIGURA 8 – COGUMELOS COMESTÍVEIS ANALISADOS.



Agaricus bisporus
(Champignon)



Agaricus bisporus
(Portobello)



Agaricus brasiliensis



Flammulina velutipes



Lentinula edodes



Pleurotus djamor



Pleurotus eryngii



Pleurotus ostreatus
(Cogumelo "Ostra" branco)



Pleurotus ostreatus
(Cogumelo "Ostra" preto)

FONTE: O autor (2017).

por um fator de 4,38, considerando que os cogumelos apresentam uma alta proporção de compostos nitrogenados não-proteicos (NPN), como a quitina, de acordo com Reis et al., (2012a) e Rashidi e Yang (2016). A fibra alimentar total foi determinada como frações solúveis e insolúveis, de acordo com o método enzimático-gravimétrico, utilizando o método nº 991.43, (AOAC, 2005). O teor de carboidratos totais, incluindo a fibra alimentar, foi calculado por diferença (isto é, 100 g de produto menos a soma de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em matéria seca (MS).

2.2.3 Análise de minerais

Os minerais foram quantificados utilizando amostras liofilizadas dos cogumelos de acordo com o método descrito por Silva (1999), Sarruge e Haag (1974). Os macro minerais foram determinados após digestão com ácido nitro-perclórico (NOGUEIRA; SOUZA, 2005). Os teores de sódio e de potássio nos digestatos foram determinados espectrofotometricamente utilizando fotômetro de chama (SILVA, 1999). O cálcio e o magnésio foram quantificados com o auxílio da espectroscopia de absorção atômica (SARRUGE; HAAG, 1974). O fósforo foi determinado em espectrofotômetro UV/VIS a 660 nm após a produção de ácido fosfomolibdico de cor azul, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de fósforo na amostra (NOGUEIRA; SOUZA, 2005). As concentrações de manganês, ferro, cobre e zinco foram determinadas de acordo com Silva (1999) em um espectrômetro de absorção atômica, nos comprimentos de onda de 279,5, 248,3, 324,7 e 213,9 nm, respectivamente. Cada análise mineral foi realizada em triplicado e os resultados foram expressos MS.

2.2.4 Determinação de glucanas

A quantificação de glucanas nos cogumelos foi realizada por um método colorimétrico-enzimático utilizando um kit enzimático para determinação de β -glucanas em leveduras - Enzymatic Yeast β -Glucan Assay Kit® - (Megazyme®-IDA Business Park, Bray, Co. Wicklow, A98 YV29 Irlanda). As glucanas totais e as α -glucanas foram quantificadas em triplicata, e a diferença foi considerada como a fração de β -glucanas. Os resultados foram expressos em miligramas de β -glucanas por grama de MS.

2.2.5 Perfil de aminoácidos (AA)

O perfil de aminoácidos foi determinado de acordo com Hagen, Frost e Augustin (1989) e White, Hart e Fry (1986). A cromatografia em fase reversa foi realizada utilizando um volume de injeção de 30 μ L e vazão igual a 1,0 mL/min, em um cromatógrafo líquido de alta performance (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão). A separação foi realizada utilizando uma coluna Luna® C18 com dimensões de 4,6 mm x 150 mm, 5,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA, EUA) a 58°C e os aminoácidos foram detectados a 254 nm com um detector de DAD. O eluente A utilizado foi um tampão de acetado de sódio 0.14 N, acetonitrila (razão 1,2:10 mL de acetonitrila:acetado de sódio) e trietilamina (razão 1:2000 de trietilamina:acetado de sódio). O eluente B utilizado foi uma solução 6:4 de acetonitrila e água ultrapura. A quantificação realizada por adição de ácido α -aminobutírico como padrão interno. O limite de quantificação do método foi de 0,01%. Os resultados foram expressos em gramas de AA por 100 g de MS.

2.2.6 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foram realizados utilizando o software Statistica versão 10.0 e os dados foram considerados significativos em $p \leq 0,05$. Essas ferramentas estatísticas foram utilizadas para separar os valores médios dos parâmetros analisados. O software Origin Pro 8.0 (Origin Lab., Northampton, MA, EUA) foi usado para construir matrizes de dados. Os dados foram processados no Matlab versão 7.1 (Mathworks Inc.) utilizando o pacote PLS-toolbox 1.5 (Eigenvector Research Inc.) para análise quimiométrica. A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados para algumas variáveis (denominadas componentes principais (PCs)), que descrevem a maior variância dos dados analisados. A técnica fornece um resumo das semelhanças e diferenças entre amostras quanto à concentração dos compostos de interesse (LU et al., 2010; FRIZON et al., 2015).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Composição química e glucanas

Aproximadamente 90% do corpo de frutificação do cogumelo é constituído de água. Os sólidos totais (cerca de 10%) foram compostos de proteínas, fibras alimentares, carboidratos, lipídeos e minerais. O teor de umidade foi maior em *A. bisporus* (Champignon - 92,99%), seguido por *A. bisporus* (Portobelo - 91,94%), *A. brasiliensis* (91,38%), *P. djamor* (91,63%), *P. ostreatus* (cogumelo “Ostra” branca - 90,65%), *F. velutipes* (89,92%), *P. eryngii* (89,52%), *L. edodes* (88,46%) e *P. ostreatus* (cogumelo “Ostra” preta - 88,19%).

A fração sólida dos cogumelos é composta principalmente por carboidratos (principalmente fibras alimentares) e proteínas (Tabela 5). A quantidade de proteínas (% MS) presente nos cogumelos variou de 16,47% em *P. eryngii* a 36,96% em *P. ostreatus* (“Ostra” preta). Valores semelhantes foram relatados por Cohen et al. (2014), Ulziijargal e Mau (2011). De acordo com Raya et al. (2014), os teores de proteína dos cogumelos podem variar de acordo com vários fatores, como a estirpe/espécie de cogumelo, a composição do meio de crescimento, o tempo de colheita, a técnica de manejo e as condições dos substratos.

Os carboidratos encontrados nos cogumelos são principalmente polissacarídeos que constituem a parede celular. As paredes celulares contêm uma mistura de componentes fibrilares que incluem quitina e os polissacarídeos β -D-glucanas e mananas. Estes componentes são carboidratos não digeríveis que são resistentes às enzimas humanas e podem ser considerados como uma fonte de fibra alimentar (CHEUNG, 2013; MUKHOPADHYAY; GUHA, 2015). As amostras de cogumelos avaliadas neste trabalho podem ser consideradas como uma grande fonte de fibra alimentar, apresentando valores de 4 a 8 vezes superiores aos definidos pela WHO/FAO/UNU (2007) para alimentos ricos em fibras. O teor de fibra alimentar variou de 24,47% para *A. bisporus* (Portobelo) a 46,62% para *P. ostreatus* (“Ostra” branca). Em geral, os cogumelos dos gêneros *Pleurotus* e *Lentinula* apresentaram maiores níveis de fibra alimentar que os gêneros *Agaricus* e *Flammulina* (Tabela 5). Esta variação no teor de fibras pode estar relacionada principalmente com fatores genéticos, que irão determinar a quantidade e o tipo de sacarídeos presentes nas paredes celulares dos fungos (ROP; MLCEK; JURIKOVA, 2009).

Os principais polissacarídeos encontrados nos cogumelos são as β -glucanas, que compõem aproximadamente 50% da parede celular dos fungos (VALVERDE;

HERNÁNDEZ-PÉREZ; PAREDES-LÓPEZ, 2015). A concentração de β -glucanas varia em função da espécie (*L. edodes* e gênero *Pleurotus* são as fontes mais importantes), condições de crescimento (razão C/N, presença de compostos fenólicos e pH do meio) e maturação do corpo frutífero (ROP; MLCEK; JURIKOVA, 2009).

A quantidade de β -glucanas nas amostras variou de 1,58 a 16,91 mg/g (*A. bisporus* - Portobelo e *P. eryngii*, respectivamente) (Tabela 5). Conforme observado para o teor de fibra alimentar total, a quantidade de β -glucanas foi maior para os cogumelos dos gêneros *Pleurotus*, *Lentinula* e *Flammulina*. As β -glucanas são um dos principais componentes da parede celular fúngica e reconhecidos como potentes estimuladores imunológicos em células humanas. Enquanto o Lentinan é a substância ativa no *L. edodes*, o Pleuran é o principal polissacarídeo ativo no gênero *Pleurotus* (ROP; MLCEK; JURIKOVA, 2009). São conhecidos por serem os compostos ativos das β -glucanas, que são eficazes no tratamento de várias doenças crônicas. Estudos recentes, realizados com β -glucanas, relatam um grande potencial antitumoral, efeitos radio-protetores, imuno potencializadores, atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, além de diminuir o índice glicêmico pós prandial e os níveis de colesterol LDL no plasma sanguíneo (MIRA; GRAF; CÂNDIDO, 2009; CHA et al., 2012; REN; PERERA; HEMAR, 2012; BAE et al., 2013; PILLAI; DEVI, 2013; MAITY et al., 2014; SMIDERLE et al., 2014).

A concentração máxima de lipídeos nos cogumelos foi de 2,08% na amostra de *A. bisporus* (Champignon). Reis et al. (2012a) encontraram 2,18% de lipídios em *A. bisporus* (Champignon) e 1,73% para *F. velutipes*. Alimentos com baixo teor lipídico são importantes para dietas saudáveis e com restrição de calorias.

O conteúdo de cinzas das amostras variou de 6,93 (*P. eryngii*) a 11,85% (*A. bisporus* - Champignon). O potássio, o fósforo e o magnésio foram os minerais mais abundantes encontrados nos cogumelos estudados (Tabela 5), e estes resultados estão de acordo com Ayaz et al. (2011), que estudou onze amostras de basidiomicetos. O teor de sódio nos cogumelos foi exíguo. Com base na classificação WHO/FAO/UNU (2007), o *P. djamor* pode ser considerado uma fonte de alimentos que não contém sódio, pois apresentou menos de 5 mg em 100 g de produto desidratado. Além disso, o *P. ostreatus*, o *F. velutipes*, o *L. edodes* e o *A. brasiliensis* podem ser classificados como alimentos de muito baixo conteúdo de sódio (<40 mg) e o *A. bisporus* com baixo teor de sódio (< 80 mg). Estes resultados destacam os cogumelos comestíveis como um alimento saudável e opção nutritiva em dietas para indivíduos hipertensos.

TABELA 5 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NOVE COGUMELOS COMESTÍVEIS.

Compostos analisados	<i>A. bisporus</i> (Champignon)	<i>A. bisporus</i> (Portobelo)	<i>A. brasiliensis</i>	<i>F. velutipes</i>	<i>L. edodes</i>	<i>P. djamor</i>	<i>P. eryngii</i>	<i>P. ostreatus</i> ("Ostra" branca)	<i>P. ostreatus</i> ("Ostra" preta)	
Cinzas (% MS)	11,85 ^f ±0,04	10,73 ^e ±0,05	9,34 ^d ±0,26	8,52 ^{bc} ±0,14	8,82 ^c ±0,12	8,17 ^b ±0,27	6,93 ^a ±0,16	6,99 ^a ±0,17	8,12 ^b ±0,09	
Lipídeos (% MS)	2,08 ^c ±0,14	1,94 ^{abc} ±0,02	1,43 ^a ±0,27	1,97 ^{abc} ±0,18	1,40 ^a ±0,07	1,40 ^a ±0,17	1,74 ^{abc} ±0,13	1,40 ^a ±0,07	1,59 ^{ab} ±0,19	
Proteínas (% MS)	26,99 ^d ±0,46	29,78 ^e ±0,62	33,39 ^f ±0,15	19,01 ^b ±0,71	18,87 ^b ±0,39	22,54 ^c ±0,19	16,47 ^a ±0,42	22,54 ^c ±0,20	36,96 ^g ±0,44	
Carboidratos totais* (% MS)	59,08 ^c ±0,64	57,55 ^{bc} ±0,69	55,84 ^b ±0,68	70,50 ^e ±1,03	70,91 ^e ±0,58	67,89 ^d ±0,63	74,86 ^f ±0,71	69,07 ^{de} ±0,44	53,33 ^a ±0,67	
Fibra alimentar (% MS)	Solúvel	6,99 ^{de} ±0,15	3,59 ^a ±0,30	7,78 ^c ±0,47	4,97 ^{bc} ±0,12	4,45 ^{abc} ±0,37	5,42 ^c ±0,47	4,18 ^{ab} ±0,24	6,51 ^d ±0,39	5,14 ^{bc} ±0,41
	Insolúvel	22,44 ^{ab} ±0,57	20,88 ^a ±1,54	26,19 ^c ±1,25	27,17 ^{cd} ±1,37	37,44 ^e ±0,41	29,87 ^d ±1,42	24,85 ^{bc} ±1,30	40,11 ^e ±0,62	27,58 ^{cd} ±0,04
	Total	29,43 ^{bc} ±0,77	24,47 ^a ±1,80	33,97 ^{de} ±1,29	32,14 ^{cd} ±1,06	41,89 ^f ±0,57	35,30 ^e ±1,44	29,04 ^b ±1,73	46,62 ^g ±0,92	32,72 ^{de} ±0,44
Glucanas (mg/g MS)	α	1,25 ^f ±0,03	0,41 ^c ±0,01	1,71 ^h ±0,04	0,33 ^b ±0,01	0,80 ^e ±0,01	0,41 ^c ±0,02	1,63 ^g ±0,05	0,56 ^d ±0,01	0,07 ^a ±0,01
	β	5,88 ^{bc} ±0,19	1,58 ^a ±0,02	5,25 ^b ±0,33	12,36 ^e ±0,46	11,63 ^d ±0,25	12,48 ^e ±0,14	16,91 ^f ±0,15	12,63 ^e ±0,05	5,98 ^c ±0,09
	Total	7,13 ^c ±0,21	2,00 ^a ±0,01	6,98 ^c ±0,32	12,69 ^{de} ±0,48	12,42 ^d ±0,25	14,96 ^f ±0,15	18,54 ^g ±0,16	13,19 ^e ±0,06	6,05 ^b ±0,08
	Fósforo	1075,00 ^d ±46,67	1073,00 ^d ±4,24	1327,00 ^e ±55,15	908,00 ^c ±8,49	774,00 ^{bc} ±19,80	617,00 ^a ±32,53	787,00 ^{bc} ±1,41	699,00 ^{ab} ±41,01	1540,00 ^f ±67,88
Macrominerais (mg/100g MS)	Potássio	3620,00 ^f ±198,00	3480,00 ^{ef} ±113,14	2000,00 ^a ±169,71	2550,00 ^{bc} ±98,99	2050,00 ^{ab} ±155,56	2790,00 ^{cd} ±14,14	1860,00 ^a ±113,14	3060,00 ^{de} ±28,28	2690,00 ^{cd} ±127,28
	Cálcio	20,00 ^{bc} ±3,54	17,50 ^{bc} ±3,54	28,75 ^c ±5,30	3,75 ^a ±1,77	16,25 ^b ±1,77	15,00 ^{ab} ±3,54	10,00 ^{ab} ±0,00	8,75 ^{ab} ±1,77	15,00 ^{ab} ±3,54
	Magnésio	117,50 ^a ±0,00	117,50 ^a ±0,00	115,00 ^a ±7,07	152,50 ^{bc} ±7,07	155,00 ^{bc} ±3,54	175,00 ^d ±0,00	117,50 ^a ±0,00	148,75 ^b ±1,77	168,75 ^{cd} ±8,84
	Sódio	66,00 ^d ±1,41	56,00 ^d ±7,07	7,00 ^{ab} ±1,41	12,00 ^{bc} ±0,00	10,50 ^{abc} ±0,71	N.D.	8,00 ^{ab} ±2,83b	21,00 ^c ±0,00	20,00 ^c ±1,41
Microminerais (mg/100g MS)	Manganês	0,40 ^a ±0,14	0,90 ^{ab} ±0,00	1,25 ^{bc} ±0,07	1,00 ^{bc} ±0,00	1,90 ^d ±0,28	2,00 ^d ±0,14	1,00 ^{bc} ±0,14	1,05 ^{bc} ±0,07	1,50 ^{cd} ±0,14
	Ferro	4,30 ^b ±0,28	4,30 ^b ±0,00	18,60 ^g ±0,42	11,35 ^d ±0,35	3,40 ^{ab} ±0,28	15,40 ^e ±0,42	2,55 ^a ±0,21	17,40 ^f ±0,14	7,90 ^c ±0,28
	Cobre	3,30 ^c ±0,00	5,95 ^f ±0,21	18,00 ^g ±0,00	0,30 ^a ±0,00	0,55 ^{ab} ±0,07	1,80 ^c ±0,14	0,80 ^b ±0,00	2,45 ^d ±0,07	3,15 ^e ±0,21
	Zinco	6,95 ^a ±0,21	7,15 ^a ±0,07	9,40 ^c ±0,14	6,60 ^a ±0,14	8,00 ^b ±0,00	16,00 ^f ±0,28	9,55 ^{cd} ±0,07	10,05 ^d ±0,21	12,45 ^e ±0,07

FONTE: O autor (2017).

NOTA: * Conteúdo de carboidratos totais obtido por diferença; MS – matéria seca; N.D. – não detectado; Médias seguidas por uma mesma letra na mesma linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Uma diferença importante foi observada na composição química dos cogumelos *P. ostreatus*. Enquanto o *P. ostreatus* (“Ostra” preta) foi nutricionalmente mais rico do que *P. ostreatus* (“Ostra” branca), principalmente em relação ao conteúdo de proteínas e composição de aminoácidos essenciais (Tabela 7), o *P. ostreatus* (“Ostra” branca) apresentou maior teor de fibra alimentar e maior composição de α e β -glucanas (Tabela 5).

2.3.2 Comparação dos dados da composição química e bioquímica com a ingestão diária recomendada (RDA)

Os dados obtidos a partir da análise da composição química dos cogumelos comestíveis foram comparados com a ingestão diária recomendada (RDA), consultado no Conselho de Alimentação e Nutrição (FNB) do Instituto Americano de Medicina da Academia Nacional (TRUMBO et al., 2002). A contribuição nutricional que os cogumelos comestíveis desidratados proporcionam à RDA em seres humanos é apresentada na Tabela 6. O consumo de 100 g de qualquer um dos cogumelos desidratados avaliados satisfaz a ingestão diária de fibra alimentar para mulheres (25 g) e aproximadamente 80% do valor recomendado para homens (38 g).

Os cogumelos satisfazem 41 e 55% da ingestão proteica diária recomendada para homens e mulheres, respectivamente. Com exceção do *P. djamor* e do *P. ostreatus*, o consumo diário de 100 g de cogumelos supriria as necessidades diárias de um adulto para o fósforo (700 mg). A necessidade de cobre (900 μ g) também seria satisfeita pela maioria dos cogumelos estudados. As necessidades diárias de ingestão de zinco para mulheres (8 mg) seriam fornecidas com o consumo de 100 g (MS) de *A. brasiliensis*, *L. edodes* ou *Pleurotus* spp. Na verdade, a ingestão de 100 g de *A. brasiliensis* contribuiria sozinho com as necessidades diárias de fósforo, ferro, cobre e zinco, simultaneamente. No entanto, nenhum dos cogumelos avaliados pode ser considerado uma fonte apropriada de cálcio. A ingestão adequada de minerais é essencial porque desempenham um papel importante nas respostas metabólicas, na formação óssea saudável, na transmissão de impulsos nervosos e na regulação do sal e da água em sistemas biológicos (MALLIKARJUNA et al., 2013).

TABELA 6 - CONTRIBUIÇÃO DO CONSUMO DE 100 G (MS) DE COGUMELOS PARA A INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA (RDA) PARA ADULTOS DO SEXO MASCULINO (♂) E DO SEXO FEMININO (♀).

RDA			<i>A. bisporus</i> (Champignon)	<i>A. bisporus</i> (Portobelo)	<i>A.</i> <i>brasilensis</i>	<i>F.</i> <i>velutipes</i>	<i>L.</i> <i>edodes</i>	<i>P.</i> <i>djamor</i>	<i>P.</i> <i>eryngii</i>	<i>P. ostreatus</i> ("Ostra" branca)	<i>P. ostreatus</i> ("Ostra" preta)
Contribuição (%) para a ingestão diária recomendada											
Carboidratos	♂♀	130 *	22,80	25,44	16,57	29,51	22,32	25,05	35,25	17,28	15,88
Fibra alimentar total	♂	38 *	77,45	64,39	89,39	84,58	110,24	92,89	76,42	122,68	86,11
	♀	25 *	117,72	97,88	135,88	128,56	167,56	141,2	116,16	186,48	130,88
Proteína	♂	56 *	48,20	53,18	59,63	33,95	33,70	40,25	29,41	40,25	66,00
	♀	46 *	58,67	64,74	72,59	41,33	41,02	49,00	35,80	49,00	80,35
K	♂♀	4.7 *	77,02	74,04	42,55	54,26	43,62	59,36	39,57	65,11	57,23
Na	♂♀	1.5 *	4,40	3,73	0,47	0,80	0,70	N.D	0,53	1,40	1,33
P	♂♀	700 **	153,57	153,29	189,57	129,71	110,57	88,14	112,43	99,86	220,00
Ca	♂♀	1000 **	2,00	1,75	2,88	0,38	1,63	1,50	1,00	0,88	1,50
Mg	♂	420 **	27,98	27,98	27,38	36,31	36,90	41,67	27,98	35,42	40,18
	♀	310 **	37,90	37,90	37,10	49,19	50,00	56,45	37,90	47,98	54,44
Mn	♂	2.3 **	17,39	39,13	54,35	43,48	82,61	86,96	43,48	45,65	65,22
	♀	1.8 **	22,22	50,00	69,44	55,56	105,56	111,11	55,56	58,33	83,33
Fe	♂	8 **	53,75	53,75	232,50	140,63	42,50	192,50	31,88	217,50	98,75
	♀	18 **	23,89	23,89	103,33	63,06	18,89	85,56	14,17	96,67	43,89
Zn	♂	11 **	63,18	65,00	85,45	60,00	72,73	145,45	86,82	91,36	113,18
	♀	8 **	86,88	89,38	117,50	82,50	100,00	200,00	119,38	125,63	155,63
Cu	♂♀	900 ***	366,67	661,11	2000,00	33,33	61,11	200,00	88,89	272,22	350,00

FONTE: O autor (2017). Adaptado de PADOVANI e AMAYA-FARFÁN (2006) e FAO/WHO (2001).

NOTA: * gramas (g); **miligramas (mg); *** microgramas (µg). Ingestão diária recomendada (RDA), Potássio (K), Sódio (Na), Fósforo (P), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Manganês (Mn), Ferro (Fe), Zinco (Zn) e Cobre (Cu). ♂ - homens; ♀ - mulheres; ♂♀ - homens e mulheres.

2.3.3 Perfil de aminoácidos (AA)

As concentrações de AA (g AA /100 g de MS) dos nove cogumelos comestíveis são mostradas na Tabela 7. A concentração máxima e mínima de AA totais foi encontrada em *P. ostreatus* (“Ostra” preta) e *P. eryngii*, de 37,99 e 16,36 g/100 g MS, respectivamente. Conseqüentemente, observou-se uma tendência semelhante com os resultados das proteínas. O *P. ostreatus* (“Ostra” preta) apresentou maiores quantidades de 13 dos 18 AA quantificados em todas as amostras de cogumelos. Além disso, 8 dos 10 AA essenciais foram encontrados em concentrações mais elevadas neste cogumelo, quando comparados aos outros pesquisados neste trabalho. A variação na concentração de AA essencial em todas as amostras de cogumelos (g/100 g de MS) foi: arginina (1,17 a 2,58), fenilalanina (0,73 a 1,41), histidina (0,41 a 1,05), isoleucina (0,61 a 1,27), leucina (0,87 a 1,9), metionina (0,29 a 0,62), treonina (0,84 a 1,73), triptofano (0,19 a 0,56) e valina (0,87 a 1,85).

As concentrações de ácido glutâmico e aspártico variaram de 2,21 a 8,14 g/100 g MS e de 1,35 a 3,92 g/100 g MS. Valores semelhantes foram relatados por Kayode et al. (2015), Raya et al. (2014) e Liu et al. (2012b). Os ácidos glutâmico e aspártico, que são AA não essenciais, foram os AA proeminentes em todos os cogumelos. Isso pode estar relacionado ao fato de que estes dois AA são precursores de outros AA (AKINDAHUNSI; OYETAYO, 2006). Os ácidos glutâmico e aspártico estão associados ao sabor umami característico de alguns alimentos, incluindo os cogumelos. Além deles, os 5'-nucleotídeos, inosina 5'-monofosfato e guanosina 5'-monofosfato são também responsáveis pelo sabor umami (PHAT; MOON; LEE, 2016).

Somente a taurina (ácido 2-aminoetanosulfônico), um aminoácido livre e não essencial (RIPPS; SHEN, 2012) não foi detectado em nenhum dos cogumelos estudados. A concentração de triptofano, um AA essencial, foi a menor em todas as espécies de cogumelos analisadas (0,19 a 0,56 mg/100 g MS). Estes resultados estão de acordo com os resultados de Mukhopadhyay e Guha (2015).

A fenilalanina, a tirosina e o triptofano, presentes nos cogumelos estudados, são AA aromáticos essenciais, com funções no cérebro como precursores de neurotransmissores, como serotonina e catecolaminas (adrenalina, noradrenalina, dopamina). O triptofano é o precursor da vitamina B3 (niacina) e um dos AA que estimulam a secreção de insulina e do hormônio do crescimento (KUBE, 2010).

Em nosso estudo, todos os AA considerados essenciais para a nutrição humana foram encontrados nas amostras de cogumelos, conforme mostrado na Tabela 7. Estes AA não são sintetizados pelo corpo humano e devem ser adquiridos em dietas que incluem principalmente proteína animal (GALANTE; ARAÚJO, 2014). Assim, o consumo de cogumelos contribui para a obtenção destes AA, particularmente em dietas vegetarianas onde o consumo de produtos de origem animal é limitado.

Os cogumelos que apresentaram maiores concentrações de aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) foram o *A. bisporus* (Champignon e Portobelo), o *P. ostreatus* (“Ostra” preta) e o *L. edodes* (Tabela 7). Os AA sulfurados contribuem substancialmente para a manutenção e integridade dos sistemas celulares, influenciando o estado redox celular e a capacidade celular para remover compostos tóxicos, radicais livres e espécies reativas de oxigênio (TOWNSEND; TEW; TAPIERO, 2004).

2.3.4 Qualidade proteica e escore químico de AA

O principal parâmetro da qualidade das proteínas alimentares é o conteúdo e a disponibilidade de AA essenciais (CAIRE-JUVERA; VÁZQUEZ-ORTIZ; GRIJALVA-HARO, 2013; TEKLIT, 2015). A concentração de AA nos alimentos pode ser utilizada para calcular o escore químico destes compostos. Este escore fornece uma maneira de prever quão eficientemente a proteína irá satisfazer as necessidades de AA de um indivíduo (CAIRE-JUVERA; VÁZQUEZ-ORTIZ; GRIJALVA-HARO, 2013). A proporção mais baixa de AA presente numa determinada fonte de proteína indica o AA limitante (MONTROYA-MARTÍNEZ et al., 2016). Em nosso estudo, esta informação foi obtida considerando a razão de miligramas de AA existentes em um grama de proteína e a quantidade de referência (mg/g de proteína) para cada AA essencial, fornecido pela WHO/FAO/UNU (2007).

A Tabela 8 mostra o escore químico de AA para os cogumelos comestíveis estudados. A valina foi o AA limitante para o *A. brasiliensis*, enquanto que para os outros cogumelos a leucina foi a AA limitante (Tabela 8). Uma diferença nos aminoácidos limitantes mais frequentes de origem animal e vegetal é normalmente observada (MONTROYA-MARTÍNEZ et al., 2016). Portanto, é possível avaliar o uso de cogumelos comestíveis como complemento aos vegetais para se adequar a um perfil de AA ideal para ingestão diária.

TABELA 7 – PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE NOVE COGUMELOS COMESTÍVEIS.

Aminoácidos	<i>A. bisporus</i> (Champignon)	<i>A. bisporus</i> (Portobelo)	<i>A. bisporus</i>	<i>F. velutipes</i>	<i>L. edodes</i>	<i>P. djamor</i>	<i>P. eryngii</i>	<i>P. ostreatus</i> ("Ostra" branca)	<i>P. ostreatus</i> ("Ostra" preta)
Gramas de aminoácidos em 100 gramas de cogumelo liofilizado									
Arginina*	1,41 ^b ±0,00	1,76 ^c ±0,03	2,04 ^d ±0,06	1,17 ^a ±0,03	1,38 ^b ±0,01	1,64 ^c ±0,02	1,95 ^d ±0,01	1,41 ^b ±0,03	2,58 ^c ±0,03
Fenilalanina*	1,21 ^d ±0,02	1,32 ^e ±0,01	1,21 ^d ±0,05	1,02 ^c ±0,01	0,91 ^b ±0,00	0,94 ^b ±0,00	0,73 ^a ±0,01	1,05 ^c ±0,01	1,41 ^f ±0,01
Histidina*	0,69 ^{cd} ±0,02	0,77 ^d ±0,02	0,91 ^e ±0,09	0,58 ^{bc} ±0,02	0,52 ^{ab} ±0,01	0,59 ^{bc} ±0,00	0,41 ^a ±0,01	0,69 ^{cd} ±0,01	1,05 ^f ±0,01
Isoleucina*	1,26 ^d ±0,05	1,21 ^d ±0,01	0,94 ^c ±0,02	0,77 ^c ±0,03	0,88 ^c ±0,01	0,88 ^c ±0,01	0,61 ^a ±0,03	0,85 ^{bc} ±0,01	1,27 ^d ±0,02
Leucina*	1,87 ^d ±0,02	2,02 ^{de} ±0,05	2,37 ^f ±0,08	1,10 ^b ±0,08	1,28 ^{bc} ±0,04	1,46 ^c ±0,02	0,87 ^a ±0,04	1,41 ^c ±0,01	2,09 ^e ±0,02
Lisina*	1,52 ^{de} ±0,03	1,69 ^{ef} ±0,03	1,92 ^f ±0,18	1,43 ^{cd} ±0,00	1,14 ^b ±0,02	1,22 ^{bc} ±0,01	0,87 ^a ±0,04	1,23 ^{bc} ±0,01	1,74 ^{ef} ±0,03
Metionina*	0,59 ^d ±0,03	0,62 ^d ±0,01	0,50 ^c ±0,01	0,34 ^{ab} ±0,03	0,37 ^b ±0,02	0,45 ^c ±0,02	0,29 ^a ±0,01	0,37 ^b ±0,01	0,62 ^d ±0,02
Treonina*	1,50 ^d ±0,00	1,50 ^d ±0,01	1,46 ^d ±0,10	1,01 ^b ±0,01	1,11 ^b ±0,02	1,14 ^b ±0,01	0,84 ^a ±0,02	1,29 ^c ±0,04	1,73 ^e ±0,03
Triptofano*	0,50 ^c ±0,03	0,56 ^c ±0,05	0,55 ^c ±0,01	0,26 ^{ab} ±0,01	0,30 ^b ±0,01	0,30 ^b ±0,01	0,19 ^a ±0,00	0,24 ^{ab} ±0,01	0,32 ^b ±0,02
Valina*	1,58 ^e ±0,05	1,58 ^e ±0,00	1,09 ^b ±0,05	1,08 ^b ±0,01	1,20 ^c ±0,01	1,21 ^c ±0,02	0,87 ^a ±0,01	1,36 ^d ±0,01	1,85 ^f ±0,02
Ácido aspártico	2,59 ^d ±0,06	2,47 ^{cd} ±0,28	2,65 ^d ±0,07	1,56 ^a ±0,12	1,73 ^{ab} ±0,02	2,04 ^{bc} ±0,07	1,35 ^a ±0,01	2,52 ^d ±0,09	3,92 ^e ±0,01
Ácido glutâmico	4,50 ^d ±0,02	4,43 ^d ±0,21	5,73 ^e ±0,13	3,49 ^c ±0,08	2,93 ^b ±0,02	3,86 ^c ±0,04	2,21 ^a ±0,03	5,98 ^e ±0,18	8,14 ^f ±0,06
Alanina	3,28 ^f ±0,02	3,05 ^e ±0,05	2,10 ^{cd} ±0,13	1,47 ^b ±0,04	1,40 ^{ab} ±0,02	1,89 ^c ±0,02	1,22 ^a ±0,05	2,27 ^d ±0,04	3,55 ^e ±0,02
Cistina	0,90 ^{cd} ±0,01	0,82 ^{bc} ±0,00	0,45 ^a ±0,06	0,80 ^{bc} ±0,00	1,21 ^f ±0,11	1,03 ^{def} ±0,04	0,63 ^{ab} ±0,01	0,95 ^{cde} ±0,03	1,13 ^{ef} ±0,07
Glicina	1,96 ^c ±0,02	2,20 ^d ±0,08	2,70 ^e ±0,02	1,30 ^a ±0,07	1,53 ^b ±0,01	1,65 ^b ±0,01	1,22 ^a ±0,01	1,55 ^b ±0,00	2,08 ^{cd} ±0,05
Prolina	1,45 ^e ±0,03	1,60 ^f ±0,04	1,87 ^g ±0,04	0,73 ^b ±0,02	0,98 ^c ±0,01	1,06 ^c ±0,01	0,61 ^a ±0,01	0,97 ^c ±0,01	1,32 ^d ±0,00
Serina	1,33 ^c ±0,02	1,41 ^c ±0,02	1,46 ^c ±0,10	0,94 ^{ab} ±0,01	1,08 ^b ±0,01	1,35 ^c ±0,01	0,84 ^a ±0,00	1,38 ^c ±0,01	1,85 ^d ±0,05
Taurina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Tirosina	1,01 ^{de} ±0,01	1,03 ^e ±0,01	0,77 ^{bc} ±0,07	0,98 ^{de} ±0,03	0,81 ^c ±0,01	0,71 ^{ab} ±0,00	0,63 ^a ±0,01	0,92 ^d ±0,01	1,33 ^f ±0,01
Aminoácidos totais	29,15	30,05	30,72	19,99	20,78	23,42	16,36	26,44	37,99

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Médias seguidas por uma mesma letra na mesma linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). N.D. não detectado. * Aminoácidos essenciais.

TABELA 8 – ESCORE QUÍMICO DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS DE NOVE COGUMELOS COMESTÍVEIS.

Aminoácidos	Composição de referência ¹ (mg aminoácido/g proteína)	<i>A. bisporus</i>	<i>A. bisporus</i>	<i>A.</i>	<i>F.</i>	<i>L.</i>	<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. ostreatus</i>
		(Champignon)	(Portobelo)	<i>brasiliensis</i>	<i>velutipes</i>	<i>edodes</i>	<i>djamor</i>	<i>eryngii</i>	("Ostra branca)	("Ostra" preta)
		(mg aminoácido/g de proteína da amostra)/Composição de referência ¹								
Histidina	15	1,71	1,73	1,81	2,04	1,84	1,75	1,68	2,04	1,89
Isoleucina	30	1,55	1,36	0,94	1,34	1,56	1,30	1,23	1,26	1,15
Leucina	59	1,17	1,15	1,20	0,98	1,15	1,10	0,90	1,06	0,96
Lisina	45	1,25	1,26	1,28	1,67	1,34	1,20	1,17	1,21	1,04
Metionina + Cistina	22	2,50	2,20	1,30	2,71	3,82	2,99	2,53	2,66	2,16
Fenilalanina + Tirosina	38	2,16	2,08	1,55	2,76	2,41	1,93	2,18	2,31	1,95
Treonina	23	2,42	2,19	1,90	2,30	2,56	2,19	2,23	2,49	2,03
Triptofano	6	3,09	3,15	2,73	2,25	2,64	2,19	1,91	1,80	1,44
Valina	39	1,50	1,36	0,84	1,45	1,63	1,38	1,36	1,55	1,28

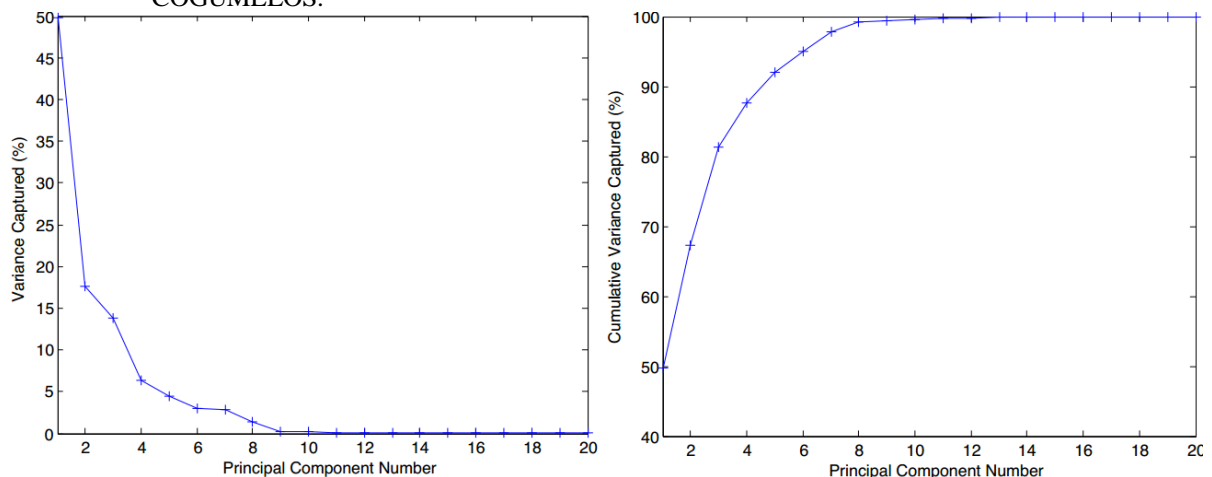
FONTE: O autor (2017).

NOTA: 1 – WHO/FAO/UNU (2007).

2.3.5 Análise das componentes principais (PCA) dos dados

Os resultados obtidos para AA, minerais, glucanas e composição centesimal foram usados para a PCA. Com a finalidade de eliminar problemas com a heterogeneidade das amostras devido à alta amplitude entre os dados de amostragem, foi utilizado um pré-processamento auto-escalonado (*leave-one-out*). A primeira componente principal (PC1) explicou 49,78% da variação dos compostos analisados, enquanto a PC2, PC3, PC4, PC5 e PC6 explicaram 17,58%, 13,87%, 6,34%, 4,44% e 2,97%, respectivamente, da variação dos dados de AA, glucanas, minerais e análises físico-químicas, como mostrado na Figura 9. Apesar do PC1 ter explicado quase toda a variação na composição de cogumelos comestíveis, as PC2 - PC6 também foram utilizadas por apresentarem informações significativas.

FIGURA 9 - EVOLUÇÃO DA VARIÂNCIA CAPTURADA (%) VALOR (A) E VARIÂNCIA ACUMULADA CAPTURADA (B) EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE COMPONENTE PRINCIPAL DOS COGUMELOS.

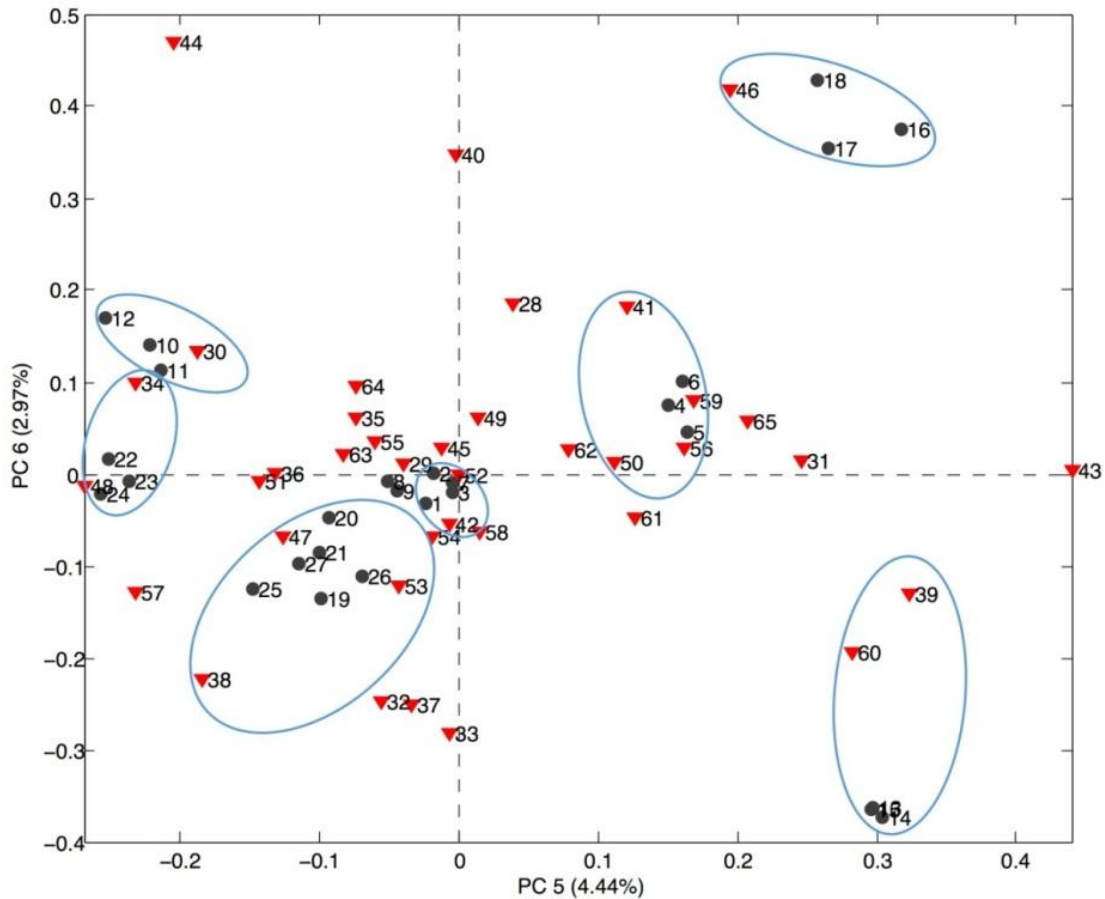


FONTE: O autor (2017).

Observou-se uma tendência de agrupamento das espécies de cogumelos nas amostras. O *P. ostreatus* (“Ostra” preta) e o *P. eryngii* (amostras 19, 20, 21 e 25, 26, 27, respectivamente) apresentaram maiores concentrações de P e arginina (38 e 53, respectivamente), o *P. ostreatus* (“Ostra” branca, amostras 22, 23, 24) e o *P. djamor* (amostras 16, 17, 18) apresentaram maiores concentrações de fibra (34) e Zn (46), respectivamente. O *A. bisporus* (Champignon e Portobelo, amostras 1, 2, 3 e 4, 5, 6, respectivamente) apresentaram maiores concentrações de Na (42), Mg (41), glicina (50) e arginina (56). O *F. velutipes* (amostras 10, 11 e 12) e o *L. edodes* (amostras 13, 14 e 15)

apresentaram maior concentração de lipídeos (30), Ca (39) e cistina (60), respectivamente (Figura 10).

FIGURA 10 - ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS REALIZADA COM DIFERENTES AMOSTRAS DE COGUMELOS COMESTÍVEIS: PC5 X PC6.



FONTE: O autor (2017).

NOTA: *A. bisporus* (Champignon, 1 – 3); *A. bisporus* (Portobelo, 4 – 6); *A. brasiliensis* (7 – 9); *F. velutipes* (10 – 12); *L. edodes* (13 – 15); *P. djamor* (16 – 18); *P. eryngii* (19 – 21), *P. ostreatus* (“Ostra” branca, 22 – 24); *P. ostreatus* (“Ostra” preta, 25 – 27); Carboidratos (28); Proteína (29); Lipídeos (30); Cinzas (31); Fibra total (32); Fibra insolúvel (33); Fibra solúvel (34); Glucanas totais (35); β -glucanas (36); α -glucanas (37); P (38); Ca (39), K (40), Mg (41); Na (42); Mn (43); Fe (44); Cu (45); Zn (46); Ácido aspártico (47); Ácido glutâmico (48); Serina (49); Glicina (50); Histidina (51); Taurina (52); Arginina (53); Treonina (54) Alanina (55); Prolina (56); Tirosina (57); Valina (58); Metionina (59); Cistina (60); Isoleucina (61); Leucina (62); Fenilalanina (63); Lisina (64); Triptofano (65).

2.4 CONCLUSÕES

Os cogumelos comestíveis mostraram altos níveis de fibra alimentar e proteína, com *Pleurotus* spp., *L. edodes* e *F. velutipes* apresentando os maiores valores de fibra alimentar e β -glucanas. Todos os cogumelos avaliados podem ser uma opção saudável para aqueles que procuram alimentos com baixo teor de lipídios e sódio. Os aminoácidos essenciais estavam presentes em todos os cogumelos comestíveis. Além disso, alguns AA essenciais foram detectados em altas concentrações. O cogumelo *P. ostreatus* (“Ostra” preta) apresentou o maior teor de proteínas e as maiores concentrações de AA essenciais. A análise de componentes principais mostrou que somente *P. ostreatus* (“Ostra” preta) e *P. eryngii* poderiam ser agrupados devido a similaridades nos seus teores de fósforo e arginina. Os demais cogumelos diferiram uns dos outros de acordo com as proporções de alguns dos constituintes analisados. Os cogumelos estudados provaram ser uma alternativa alimentar saudável que deve ser incorporada na dieta humana devido ao seu excelente e importante perfil nutricional e potenciais benefícios para a saúde.

CAPÍTULO 3

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE COGUMELOS E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E ANTIMICROBIANAS *IN VITRO*

RESUMO

O objetivo deste estudo foi otimizar a extração dos compostos fenólicos totais (CFT) de nove cogumelos comestíveis e avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana (*in vitro*) dos extratos, além de determinar os principais compostos por CLUE-DAD. A otimização dos parâmetros de extração foi realizada utilizando um planejamento Box-Behnken em conjunto com a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) para avaliar os efeitos da temperatura, razão sólido-líquido e concentração do solvente utilizado. A atividade antioxidante dos extratos fenólicos otimizados foi determinada pelos ensaios de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) e FRAP (ferric reducing antioxidant power). A atividade antimicrobiana foi testada com as bactérias *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*, utilizando o método de microdiluição. O conteúdo de CFT variou de 5,57 a 13,16 mg GAE/g e o de flavonoides totais de 0,24 a 2,05 mg CE/g de matéria seca (MS). A atividade antioxidante dos extratos apresentou valores entre: 8,67 a 50,64 $\mu\text{mol TE/g}$ (DPPH); 34,57 a 128,60 $\mu\text{mol TE/g}$ (ABTS) e 8,09 a 48,26 $\mu\text{mol TE/g MS}$ (FRAP). Foram identificados os seguintes ácidos fenólicos: gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, gentísico, siríngico, vanílico, *p*-cumárico, clorogênico, ferúlico, cafeico, e trans-ciâmico. Os flavonoides quercetina e campferol também foram determinados, além dos compostos, catecol, vanilina, ácido fumárico e ácido benzoico. Todos os extratos apresentaram atividade antibacteriana para as cepas Gram-positivas ($\text{MIC} \leq 200 \text{ mg/mL}$) e apenas três extratos (*Flamullina velutipes*, *P. djamor* e *P. ostreatus* ("Ostra" branca)) não inibiram o crescimento das bactérias Gram-negativas nas concentrações testadas.

Palavras-chave: CLUE-DAD, ácidos fenólicos, flavonoides, DPPH, FRAP, ABTS, otimização.

3.1 INTRODUÇÃO

Diferentes espécies de cogumelos têm sido apontadas como fonte de compostos bioativos, além de apresentarem um importante valor nutricional (BARROS et al., 2009; REIS et al., 2012b; CARNEIRO et al., 2013; KALAČ, 2013). Durante seu cultivo os cogumelos produzem metabólitos secundários (por exemplo, os compostos fenólicos) que apresentam propriedades benéficas à saúde como: potencial antioxidante e efeito antimicrobiano, efeito anti-inflamatório, antimutagênico, antialérgico, vasodilatador e cardioprotetor (ESTRADA et al., 2009; HELENO et al., 2012; ALVES et al., 2013; NEDELKOSKA et al., 2013). Os efeitos reportados estão associados principalmente às propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos devido às reações redox, que os permitem atuarem como doadores de átomos de hidrogênio ou como agentes redutores (AHMAD et al., 2014).

Além da atividade antioxidante, os cogumelos tem demonstrado possuir atividade antimicrobiana, devido à presença de biomoléculas que compõem seus corpos de frutificação e que apresentam peso molecular distinto (ALVES et al., 2012; ERJAVEC et al., 2016). Alguns peptídeos, proteínas e polissacarídeos foram alvo de vasta pesquisa e desenvolvimento, contra bactérias e fungos, nos últimos anos. O interesse científico sobre os metabólitos secundários dos cogumelos também tem aumentado, na busca de encontrar novos agentes antimicrobianos, capazes de substituir os medicamentos atualmente utilizados, que apresentem algum padrão de resistência aos micro-organismos (ALVES et al., 2012; SHARMA et al., 2014).

Muitos pesquisadores vêm testando extratos obtidos de cogumelos contra cepas de bactérias e fungos (CHOWDHURI; KUBRA; AHMED, 2015; NEDELKOSKA et al., 2013; OYETAYO, 2009; TAOFIQ et al., 2016). Segundo o levantamento bibliográfico realizado por Alves et al. (2012), a maioria dos extratos de cogumelos estudados apresentam maior atividade antibacteriana contra cepas Gram-positivas do que contra as cepas Gram-negativas.

O primeiro procedimento para a utilização de fitoquímicos na preparação de suplementos dietéticos ou nutracêuticos, ingredientes alimentares, produtos farmacêuticos e cosméticos é a extração dos compostos bioativos das matérias-primas (DAI; MUMPER, 2010). Os extratos contendo compostos antioxidantes vêm tornando-se uma nova fonte para a indústria alimentar, a fim de substituir os antioxidantes sintéticos (por exemplo, o BHA e

BHT) e para complementar os produtos industrializados com compostos bioativos (ZIELINSKI; HAMINIUK; BETA, 2016).

Dentre os métodos de extração de compostos fenólicos mais comumente utilizados encontram-se os que utilizam solventes como: etanol, acetona, metanol, ou uma mistura desses com água (YASOUBI et al., 2007; GARCIA-SALAS et al., 2010). No entanto, para aplicação em alimentos, a extração de fenólicos é preferencialmente feita com etanol por ser considerado um produto pouco tóxico, verde, biocompatível e mais economicamente viável (ILAIYARAJA et al., 2015).

A extração dos compostos fenólicos pode ser influenciada por inúmeras variáveis de processo, como temperatura, tempo, concentração do solvente, proporção sólido-líquido, agitação, tamanho de partícula, pH, entre outras. Dessa forma, as condições de extração podem não ser as mesmas quando se tem matrizes alimentícias, espécies e até mesmo variedades distintas, fazendo-se necessário uma otimização do processo de extração, a fim de alcançar o potencial máximo de extração. A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma ferramenta útil para otimizar processos químicos e bioquímicos. É uma técnica matemática e estatística eficaz para a análise de adequação de modelos empíricos, as relações entre a resposta e as variáveis independentes, e as interações entre fatores, bem como fatores de otimização que podem influenciar os resultados do processo (LIM; YIM, 2012).

Os objetivos deste estudo foram i) otimizar pela RSM a extração dos compostos fenólicos de nove cogumelos comestíveis; e ii) avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* dos extratos otimizados, e determinar os principais compostos fenólicos individuais por CLUE-DAD.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Cogumelos

Os corpos de frutificação (aproximadamente 3,0 kg) dos cogumelos comestíveis, comercialmente disponíveis, foram adquiridos nos estados do Paraná e São Paulo, Brasil. Foram estudados os seguintes cogumelos: *Agaricus bisporus* (Champignon e Portobelo), *Agaricus brasiliensis*, *Lentinula edodes*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus djamor*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* (“Ostra” preta e “Ostra” branca). Os cogumelos inteiros foram congelados, liofilizados e triturados individualmente até partículas inferiores a 32 Mesh (0,5

mm). O material em pó foi embalado a vácuo e armazenado, sob proteção de luz, até o momento das análises.

3.2.2 Otimização da extração dos Compostos Fenólicos Totais (CFT)

A otimização dos parâmetros de extração dos CFT de cada cogumelo, foi realizada utilizando um planejamento Box-Behnken (BOX; BEHNKEN, 1960) com 15 experimentos (Tabela 9). Os fatores (variáveis independentes) avaliados para a extração foram: temperatura (X1), razão sólido-líquido (X2) e concentração do etanol (X3), em três níveis de variação. O tempo de extração foi pré-estabelecido em 2 horas (testes preliminares realizados com tempos de 1, 2, 4, 8, 12, 18 e 24 horas), com agitação contínua de 100 rpm. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 1075,20 x g por 15 min. e o sobrenadante foi analisado.

3.2.3 Determinação dos CFT e dos Flavonoides Totais (FT)

Os CFT dos extratos foram determinados de acordo com o procedimento que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu, conforme Singleton e Rossi (1965), com pequenas modificações. A absorbância foi medida a 725 nm e os valores obtidos foram comparados com uma curva de calibração de ácido gálico (0 a 100 mg/L). Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente (GAE) por g de cogumelo seco (mg GAE/g MS).

A determinação dos FT foi realizada por meio de análise colorimétrica, empregando cloreto de alumínio, conforme Jia et al. (1999), com pequenas modificações. A absorbância foi mediada a 510 nm e comparada com uma curva de calibração de catequina (0 a 400 mg/L). Os resultados foram expressos em mg de catequina equivalente (CE) por g de matéria seca (mg CE/g MS). Todas as determinações foram realizadas em três repetições.

3.2.4 Ensaio antioxidantes (*in vitro*) dos extratos fenólicos otimizados de cogumelos

A atividade antioxidante via eliminação de radicais livres foi determinada pelo ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), conforme Brand-Williams et al. (1995), com pequenas modificações. Primeiramente, 0,1 mL do extrato (obtido na seção 3.2.2) foram adicionados a 3,9 mL da solução metanólica de DPPH (6×10^{-5} mol/L). A mistura foi deixada

reagindo no escuro por 30 minutos. Em seguida, a absorbância foi medida a 515 nm, em espectrofotômetro (UV/VIS Shimadzu-1800).

O ensaio de potencial antioxidante total dos extratos de cogumelo foi realizado utilizando o método potencial antioxidante de redução do ferro (FRAP) segundo a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), com pequenas modificações. O reagente FRAP foi preparado pela mistura de tampão acetato (0,3 mol/L), TPTZ (10×10^{-3} mol/L) solubilizado em HCl (40×10^{-3} mol/L) e cloreto férrico (40×10^{-3} mol/L), na proporção 10:1:1, respectivamente. Então, 3,0 mL do reagente FRAP foram adicionados a 0,1 mL do extrato etanólico de cada cogumelo. A mistura foi mantida a temperatura ambiente, no escuro. Após 30 minutos foi realizada a medida da absorbância, em espectrofotômetro (UV/VIS Shimadzu-1800), no comprimento de onda de 593 nm.

A atividade sequestradora do radical ABTS (2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) dos extratos dos cogumelos foi determinada conforme Re et al. (1999). Um volume de 88 µL de persulfato de potássio (140 mmol/L) foi adicionado a 5 mL de ABTS (7 mmol/L). Ambos os reagentes foram solubilizados em solução tampão de acetato de sódio 20 mmol/L. A mistura foi armazenada em frasco âmbar, no escuro e a temperatura ambiente, durante 16 h. A solução tampão foi utilizada para ajustar a absorbância da solução ABTS em $0,700 \pm 0,050$ no comprimento de onda de 734 nm, em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu-1800. Em seguida 30 µL do extrato hidro etanólico otimizado diluído (1:2 – extrato:água deionizada) dos cogumelos comestíveis foram adicionados a 3 mL da solução ABTS. A mistura permaneceu no escuro, durante 2 h à temperatura ambiente. A absorbância da amostra foi medida a 734 nm, em espectrofotômetro.

As determinações da atividade antioxidante pelos métodos de DPPH, FRAP e ABTS foram realizadas em três repetições. Os resultados foram comparados com uma curva padrão (Trolox 0-2500 µmol/L) e expressos em µmol de Trolox equivalente por g de cogumelo seco (TE µmol/g MS).

3.2.5 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE-DAD)

Os compostos fenólicos e não-fenólicos foram determinados de acordo com o método proposto por Gasic et al., (2014), com pequenas alterações. Primeiramente, os extratos de cogumelos foram filtrados através de um filtro de seringa de nylon de 0,22 µm e 0,5 µL da amostra foram injetados em um cromatógrafo líquido de ultra eficiência (CLUE). O

CLUE Acquity H-Class (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um sistema de bomba quaternária Waters, um auto-amostrador (Milford, MA, Estados Unidos) e um detector de matriz de diodo Aquad (Waters, Milford, MA, EUA) foi utilizado. Utilizou-se uma coluna Acquity BEH C18 (50 mm x 2,1 mm) com partículas de 1,7 µm (Waters, Milford, MA, EUA) a 30°C.

A fase móvel “A” consistiu num sistema solvente de água: ácido fórmico (99,9: 0,1 v/v), enquanto a fase móvel “B” foi metanol: ácido fórmico (99,9: 0,1 v/v), com fluxo de 0,5 mL/min. O gradiente linear foi programado como se segue: 0-8 min, 0-20% B; 8-15 min, 20-100% B; 15-18 min 100-0% B, seguido por eluição isocrática com 0% B até 20 min. O monitoramento dos cromatogramas foi realizado a 280, 290 e 370 nm, uma vez que a maioria dos compostos fenólicos exibem absorções máximas próximas destes comprimentos de onda.

A determinação dos compostos fenólicos e não-fenólicos foram realizadas comparando-se o tempo de retenção e os espectros com curvas-padrão de ácido gálico, ácido protocatecuico, 1,2-dihidroxibenzeno, ácido gentísico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido trans-cinâmico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido vanílico, vanilina, quercetina, campferol, ácido fumárico e ácido benzoico.

3.2.6 Atividade antibacteriana (*in vitro*)

3.2.6.1 Micro-organismos testados

As atividades antimicrobianas dos extratos otimizados de cogumelos foram testadas contra 4 bactérias: 2 Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923e *Bacillus cereus* ATCC 11778) e 2 Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enteritidis* ATCC 13076). Os micro-organismos foram fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Curitiba (*E. coli* e *S. aureus*), pelo Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (*B. cereus*) e pelo Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (*S. enteritidis*).

3.2.6.2 Preparo da suspensão bacteriana

As suspensões bacterianas foram preparadas de acordo com o protocolo descrito por Wiegand, Hilpert e Hancock (2008). A turvação da suspensão inicial foi ajustada por

comparação com o padrão 0,5 McFarland. A suspensão inicial continha cerca de 1×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Em seguida, foram preparadas diluições, em solução salina a 0,9%, de 1:100 a partir da suspensão bacteriana inicial.

3.2.6.3 Método de microdiluição

A atividade antimicrobiana foi testada determinando a concentração mínima inibitória (MIC), utilizando o método de microdiluição de acordo com o protocolo descrito por Wiegand, Hilpert e Hancock (2008). Os extratos otimizados (obtidos na seção 4.2.2) foram liofilizados e reidratados com água estéril para serem testados.

As placas de 96 poços foram preparadas por meio da distribuição de 50 μ L de caldo nutriente Mueller-Hinton (MH) para bactérias. Adicionou-se um volume de 50 μ L a partir da solução de reserva de extrato otimizado de todos os cogumelos (concentração = 400 mg/mL) na primeira fila da placa e depois realizaram-se diluições (1:1) em série, dos extratos em caldo MH. A faixa de concentração obtida para os extratos foi de 200 a 0,39 mg/mL. Em seguida, foram adicionados 50 μ L da suspensão bacteriana em caldo MH (aproximadamente de 1×10^5 UFC/mL) ao conteúdo dos poços. As microplacas foram incubadas a 37°C de 18 a 20 horas.

A MIC foi definida como a menor concentração dos extratos testados que impediram o crescimento microbiano. O cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio foi utilizado para avaliar a mudança de coloração do meio (incolor para rosa), indicando o crescimento bacteriano. Cada placa teste incluía um controle de crescimento e um controle de esterilidade. O antibiótico utilizado como referência foi a amoxicilina (concentração inicial de 64 mg/L). Todas as determinações foram feitas em duplicatas.

3.2.7 Análise de dados

A análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foram realizados utilizando o programa Statistica versão 10.0 para avaliar as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os valores médios de cada variável analisada.

Um modelo polinomial de segunda ordem foi usado para expressar a extração dos CFT, como uma função de variáveis independentes, conforme Equação 1.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Equação 1}$$

Onde: Y é a resposta prevista, β_0 , β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes de regressão para os termos intercepto, linear, quadrático e interação, respectivamente. X_i , e X_j são os níveis das variáveis independentes (BRUNS; SCARMINO; BARROS NETO, 2006).

As condições otimizadas das variáveis independentes foram testadas experimentalmente a fim de validar os modelos e verificar o poder de previsão dos mesmos em comparar os dados previstos teóricos aos dados experimentais. Após a determinação das condições ótimas de extração, novos extratos foram obtidos com o objetivo de avaliar a atividade antioxidante pelos métodos de DPPH, ABTS e FRAP. O perfil fenólico e a atividade antimicrobiana também foram determinados.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Otimização da extração dos Compostos Fenólicos Totais (CFT)

A metodologia de superfície de resposta (MSR) destaca-se como uma importante ferramenta capaz de encontrar a adequação de vários modelos matemáticos para descrever o processo de extração em associação com diferentes efeitos. No estudo realizado por Zou et al. (2015) foi otimizada a extração de polissacarídeos antioxidantes do cogumelo comestível *Auricularia auricula*, variando a razão sólida: líquido, a temperatura e o tempo de extração. Ye et al. (2014) trabalharam com as variáveis concentração de etanol, tempo e razão sólido-líquido para otimizar a extração de compostos fenólicos da fruta desengordurada de *Idesia polycarpa*.

Foi realizada uma otimização com base nos compostos fenólicos totais (CFT) para cada cogumelo (Tabela 9). Todos os modelos determinados por análise de regressão múltipla mostraram significância ($p < 0,01$) e não apresentaram falta de ajuste ($p > 0,05$) (Tabela 10). A adequação dos modelos foi superior a 93,8% de todas as variâncias nos dados com R^2 ajustado maior que 0,88. Portanto, a influência de cada efeito na extração variou de acordo com o cogumelo utilizado. Para as espécies *Agaricus*, todos os efeitos lineares [temperatura (X1), razão sólido-líquido (X2) e concentração de solvente (X3)] tiveram efeito

TABELA 9 – COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS OBTIDOS POR PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN.

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão sólido-líquido	Concentração do solvente (%)	Compostos Fenólicos Totais mg GAE/g MS								
				<i>A bisporus</i> (Champignon)	<i>A bisporus</i> (Portobelo)	<i>A. brasiliensis</i>	<i>F. velutipes</i>	<i>L. edodes</i>	<i>P. djamor</i>	<i>P. eryngii</i>	<i>P. ostreatus</i> (“Ostra” preta)	<i>P. ostreatus</i> (“Ostra” branca)
1	25	30	50	5,80±0,04	5,88±0,04	9,45±0,10	5,78±0,03	3,91±0,05	5,13±0,01	3,74±0,02	6,57±0,02	4,10±0,02
2	55	30	50	7,42±0,12	7,78±0,05	9,86±0,07	2,04±0,02	3,88±0,04	6,10±0,10	4,62±0,06	7,14±0,11	4,90±0,07
3	25	70	50	5,70±0,06	9,74±0,12	11,38±0,19	6,42±0,06	4,36±0,08	5,71±0,13	4,42±0,08	6,23±0,04	5,22±0,12
4	55	70	50	8,17±0,14	9,25±0,02	13,22±0,10	5,17±0,06	4,40±0,04	6,20±0,04	4,80±0,04	7,86±0,32	5,75±0,07
5	25	50	25	6,35±0,03	4,89±0,04	10,00±0,06	7,52±0,05	5,59±0,05	7,31±0,13	5,27±0,04	9,39±0,17	6,99±0,09
6	55	50	25	6,19±0,10	6,63±0,03	9,38±0,08	5,52±0,08	3,95±0,05	6,21±0,08	5,38±0,11	7,95±0,04	5,85±0,01
7	25	50	75	7,20±0,07	8,55±0,05	11,42±0,34	5,79±0,01	3,69±0,07	4,96±0,05	3,66±0,05	7,13±0,11	4,10±0,05
8	55	50	75	8,51±0,16	9,67±0,09	12,13±0,26	4,56±0,05	3,78±0,02	5,40±0,04	4,09±0,08	7,77±0,06	4,36±0,07
9	40	30	25	4,81±0,02	5,49±0,01	8,39±0,09	6,35±0,17	4,66±0,02	6,00±0,03	4,73±0,02	7,94±0,06	5,83±0,02
10	40	70	25	6,31±0,08	6,71±0,04	10,70±0,56	6,34±0,03	5,19±0,02	6,70±0,08	5,70±0,06	9,31±0,30	6,82±0,14
11	40	30	75	7,16±0,10	8,08±0,05	9,86±0,21	6,09±0,03	3,29±0,03	4,56±0,09	3,70±0,11	6,35±0,01	3,90±0,02
12	40	70	75	8,09±0,13	9,60±0,02	12,66±0,12	6,24±0,04	3,74±0,11	5,15±0,12	3,84±0,19	7,54±0,02	4,18±0,11
13	40	50	50	7,04±0,15	7,93±0,04	11,50±0,14	6,01±0,04	4,03±0,04	5,39±0,05	4,60±0,07	7,40±0,18	5,18±0,10
14	40	50	50	7,24±0,08	7,93±0,14	11,68±0,42	6,24±0,04	4,21±0,04	5,58±0,10	4,34±0,07	6,98±0,18	5,26±0,03
15	40	50	50	6,94±0,07	8,09±0,05	11,62±0,15	6,15±0,06	4,12±0,02	5,56±0,09	4,51±0,08	7,58±0,00	5,24±0,03

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Resultado expressso como média ± desvio padrão. MS – matéria seca. GAE – Ácido gálico equivalente.

TABELA 10 – EFEITOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS (TEMPERATURA, RAZÃO SÓLIDO-LÍQUIDO E CONCENTRAÇÃO DO SOLVENTE) NA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.

(Continua)

Cogumelos (Fenólicos Totais)	Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t-valor	p-valor	-95% confiança	+95% confiança
<i>A. bisporus</i> (Champignon)	<i>Constante</i>	7,07	0,13	56,43	<0,001	6,78	7,35
	X_1	0,29	0,17	1,74	0,12	-0,09	0,67
	X_2	0,39	0,12	3,29	0,01	0,12	0,66
	X_2^2	-0,38	0,17	-2,24	0,06	-0,78	0,01
	X_3	0,91	0,12	7,80	<0,001	0,64	1,18
	$X_1X_2^2$	0,73	0,23	3,13	0,01	0,19	1,27
	X_1X_3	0,37	0,17	2,23	0,06	-0,01	0,75
	R^2	0,938					
	R^2 Ajustado	0,893					
	<i>P-valor (modelo)</i>	<0,001					
<i>P-valor (lack of fit)</i>	0,153						
<i>A. bisporus</i> (Portobelo)	<i>Constante</i>	8,09	0,11	75,66	<0,001	7,84	8,33
	X_1	0,53	0,10	5,34	<0,001	0,30	0,76
	X_2	0,69	0,14	4,86	0,001	0,36	1,01
	X_3	1,52	0,10	15,23	<0,001	1,29	1,75
	X_3^2	-0,63	0,15	-4,33	0,003	-0,97	-0,30
	X_1X_2	-0,60	0,14	-4,23	0,003	-0,92	-0,27
	$X_1^2X_2$	0,65	0,20	3,23	0,01	0,19	1,11
	R^2	0,981					
	R^2 Ajustado	0,966					
	<i>P-valor (modelo)</i>	<0,001					
<i>P-valor (lack of fit)</i>	0,08						
<i>A. brasiliensis</i>	<i>Constante</i>	11,51	0,15	77,31	<0,001	11,16	11,86
	X_1	0,02	0,15	0,15	0,88	-0,34	0,39
	X_2	1,30	0,11	11,87	<0,001	1,04	1,56
	X_2^2	-0,47	0,16	-2,90	0,02	-0,85	-0,09
	X_3	0,95	0,11	8,66	<0,001	0,69	1,21
	X_3^2	-0,71	0,16	-4,42	0,003	-1,10	-0,33
	X_1X_2	0,36	0,15	2,31	0,05	-0,01	0,72
	$X_1X_2^2$	0,54	0,22	2,46	0,04	0,02	1,06
	R^2	0,974					
	R^2 Ajustado	0,948					
<i>P-valor (modelo)</i>	<0,001						
<i>P-valor (lack of fit)</i>	0,06						
<i>F. velutipes</i>	<i>Constante</i>	6,14	0,20	31,36	<0,001	5,63	6,64
	X_1	-1,03	0,12	-8,57	<0,001	-1,34	-0,72
	X_1^2	-0,85	0,18	-4,79	0,005	-1,30	-0,39
	X_2	0,04	0,17	0,22	0,84	-0,40	0,47
	X_2^2	-0,44	0,18	-2,48	0,06	-0,89	0,02
	X_3	-0,09	0,17	-0,54	0,61	-0,53	0,34
	X_3^2	0,56	0,18	3,16	0,03	0,10	1,01
	X_1X_2	0,62	0,17	3,68	0,01	0,19	1,06
	$X_1^2X_2$	0,91	0,24	3,78	0,01	0,29	1,52
	$X_1^2X_3$	-0,58	0,24	-2,42	0,06	-1,20	0,04
	R^2	0,972					
	R^2 Ajustado	0,922					
	<i>P-valor (modelo)</i>	<0,001					
<i>P-valor (lack of fit)</i>	0,07						
<i>L. edodes</i>	<i>Constante</i>	4,13	0,02	192,95	<0,001	4,08	4,18

TABELA 10 – EFEITOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS (TEMPERATURA, RAZÃO SÓLIDO-LÍQUIDO E CONCENTRAÇÃO DO SOLVENTE) NA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.

		(Continuação)					
	X_1	-0,39	0,03	-13,69	<0,001	-0,45	-0,32
	X_2	0,25	0,02	12,27	<0,001	0,20	0,29
	X_3	-0,71	0,03	-24,94	<0,001	-0,77	-0,64
	X_3^2	0,11	0,03	3,70	0,008	0,04	0,18
	$X_1X_2^2$	0,39	0,04	9,70	<0,001	0,29	0,48
	X_1X_3	0,43	0,03	15,29	<0,001	0,37	0,50
	$X_1^2X_3$	0,19	0,04	4,73	0,002	0,09	0,28
	R^2	0,995					
	R^2 Ajustado	0,991					
	P -valor (modelo)	<0,001					
	P -valor (lack of fit)	0,962					
	P -valor (lack of fit)	0,237					
<i>P. djamor</i>	Constante	5,61	0,08	72,70	<0,001	5,43	5,79
	X_1	-0,17	0,10	-1,62	0,14	-0,40	0,07
	X_1^2	0,27	0,11	2,52	0,04	0,02	0,51
	X_2	0,25	0,07	3,41	0,009	0,08	0,41
	X_3	-0,77	0,07	-10,65	<0,001	-0,94	-0,60
	$X_1X_2^2$	0,53	0,14	3,67	0,006	0,20	0,86
	X_1X_3	0,38	0,10	3,76	0,006	0,15	0,62
	R^2	0,953					
	R^2 Ajustado	0,917					
	P -valor (modelo)	<0,001					
P -valor (lack of fit)	0,853						
<i>P. eryngii</i>	Constante	4,49	0,04	104,56	<0,001	4,40	4,59
	X_1	0,22	0,06	3,82	0,003	0,09	0,36
	X_2	0,25	0,06	4,18	0,002	0,11	0,38
	X_3	-0,72	0,06	-12,29	<0,001	-0,85	-0,59
	X_2X_3	-0,21	0,08	-2,52	0,03	-0,39	-0,02
	R^2	0,949					
	R^2 Ajustado	0,929					
	P -valor (modelo)	<0,001					
	P -valor (lack of fit)	0,412					
	<i>P. ostreatus</i> ("Ostra" preta)	Constante	7,29	0,15	48,23	<0,001	6,92
X_1		-0,20	0,16	-1,27	0,25	-0,58	0,18
X_2		0,64	0,16	4,08	0,007	0,26	1,03
X_2^2		-0,32	0,16	-1,94	0,10	-0,72	0,08
X_3		-0,73	0,11	-6,52	<0,001	-1,00	-0,45
X_3^2		0,79	0,16	4,85	0,003	0,39	1,19
$X_1X_2^2$		0,75	0,22	3,37	0,02	0,21	1,29
$X_1^2X_2$		-0,54	0,22	-2,45	0,05	-1,09	<0,001
X_1X_3		0,52	0,16	3,31	0,02	0,14	0,91
R^2		0,949					
R^2 Ajustado		0,882					
P -valor (modelo)		<0,001					
P -valor (lack of fit)		0,538					
<i>P. ostreatus</i> ("Ostra" branca)	Constante	5,20	0,06	86,18	<0,001	5,05	5,34
	X_1	-0,22	0,06	-3,49	0,01	-0,37	-0,07
	X_2	0,40	0,04	9,11	<0,001	0,30	0,51
	X_2^2	-0,18	0,07	-2,82	0,03	-0,34	-0,02
	X_3	-1,12	0,04	-25,21	<0,001	-1,23	-1,01
	X_3^2	0,15	0,07	2,31	0,06	-0,01	0,31
	$X_1X_2^2$	0,55	0,09	6,19	<0,001	0,33	0,77

TABELA 10 – EFEITOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS (TEMPERATURA, RAZÃO SÓLIDO-LÍQUIDO E CONCENTRAÇÃO DO SOLVENTE) NA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.

	(Conclusão)					
X_1X_3	0,35	0,06	5,61	0,001	0,20	0,51
X_2X_3	-0,18	0,06	-2,79	0,03	-0,33	-0,02
R^2	0,993					
R^2 Ajustado	0,983					
P -valor (modelo)	<0,001					
P -valor (lack of fit)	0,069					

FONTE: O autor (2017).

significativamente positivo, enquanto que para as espécies *Lentinula* e *Flammulina*, a temperatura (X1) e a concentração de solvente (X3) mostraram um efeito significativamente negativo na extração dos CFT. Para os cogumelos *P. djamor* e *P. ostreatus* (“Ostra” preta e branca), esses efeitos também foram negativos, mas somente a concentração de solvente (X3) apresentou-se significativo para a extração dos CFT. Já para o *P. eryngii*, os efeitos lineares foram todos significativos, sendo a temperatura (X1) e razão sólido-líquido (X2) efeitos positivos e a concentração de solvente (X3) efeito negativo.

Os efeitos quadráticos e de interação (linear x linear e linear x quadrática) tiveram influência diferente para cada cogumelo. Por exemplo, para *A. bisporus* (Champignon) e o *P. ostreatus* (“Ostra” branca) o coeficiente de regressão quadrática da razão sólido-líquido (X2) teve um efeito significativamente negativo, enquanto que a interação da temperatura (X1) vs. a concentração de solvente (X3) e a temperatura (X1) vs. efeito quadrático da razão sólido-líquido (X2) mostraram-se significativamente positivos.

Após a modelagem da extração, o ponto ótimo foi determinado utilizando a função desejabilidade (d), sendo $d = 1$ para todos os cogumelos, exceto para o cogumelo *P. djamor* ($d = 0,969$). Os valores ótimos de temperatura, razão sólido-líquido e concentração do solvente utilizado, são mostrados na Tabela 11. A concentração do solvente e a temperatura ótima obtida para a extração de CFT variaram entre o menor e o maior nível testados, enquanto que a proporção sólido-líquido foi mais efetiva nos níveis superiores.

De acordo com Zielinski et al. (2016) as misturas entre água e álcoois têm sido mais eficientes na extração de compostos fenólicos em comparação com o sistema de solvente monocomponente. O metanol e o etanol são os principais álcoois utilizados na extração, embora o etanol tenha vantagens em relação à sua segurança para o consumo humano.

A temperatura influencia na redução da tensão superficial dos solventes, o que ajuda a alcançar as matrizes da amostra, ocorrendo um aumento da solubilidade do analito, o que acelera a taxa de transferência de massa, melhorando a taxa de extração

TABELA 11 – VALORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT), REAIS E PREDITOS PELO MODELO E FLAVONOIDES TOTAIS (FT) DOS EXTRATOS OBTIDOS NAS MELHORES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO.

Cogumelos	Condições ótimas para extração dos CFT			CFT Otimizados (mg GAE/g MS)				FT (mg CE/g MS)
	Temperatura (°C)	Razão sólido- líquido	Concentração do solvente (%)	Observado	Predito	-95% Pred	+95% Pred	
<i>A. bisporus</i> (Champignon)	55	1:70	75	9,53 ^c ±0,16	9,37	8,33	10,42	1,88 ^b ±0,08
<i>A. bisporus</i> (Portobelo)	55	1:70	75	9,97 ^b ±0,21	10,24	9,35	11,13	2,05 ^a ±0,05
<i>A. brasiliensis</i>	55	1:70	75	13,16 ^a ±0,06	13,50	12,48	14,53	1,68 ^c ±0,05
<i>F. velutipes</i>	25	1:60,34	25	8,38 ^d ±0,13	7,58	6,43	8,73	0,43 ^e ±0,01
<i>L. edodes</i>	25	1:59	25	5,66 ^t ±0,10	5,60	5,41	5,77	1,45 ^d ±0,05
<i>P. djamor</i>	25	1:53,57	25	7,56 ^e ±0,11	7,22	6,60	7,85	0,42 ^e ±0,03
<i>P. eryngii</i>	55	1:70	25	5,57 ^t ±0,03	5,89	5,41	6,38	0,37 ^e ±0,01
<i>P. ostreatus</i> (“Ostra” preta)	25	1:53,57	25	9,48 ^c ±0,05	9,49	8,46	10,52	0,34 ^{et} ±0,03
<i>P. ostreatus</i> (“Ostra” branca)	25	1:60,34	25	7,17 ^e ±0,02	7,12	6,71	7,53	0,24 ^t ±0,04

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Médias seguidas por uma mesma letra em uma mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$). MS – matéria seca. GAE – Equivalente em ácido gálico. CE – Catequina equivalente.

(DAI; MUMPER, 2010). No entanto, Ye et al. (2014) relatam que bio-macromoléculas como os compostos fenólicos, podem ser degradados caso seja utilizado tratamentos prolongados em condições de alta temperatura, diminuindo assim o rendimento dessas moléculas nos extratos. A força motriz durante a transferência de massa é o gradiente de concentração entre o sólido e o volume do líquido, o que é maior quando se utiliza uma razão solvente-sólido mais elevado (PINELO et al., 2005).

3.3.2 Compostos Fenólicos Totais e poder antioxidante

Os compostos fenólicos são compostos aromáticos hidroxilados que possuem um ou mais anéis aromáticos, com um ou mais grupos hidroxila. Essas hidroxilas são responsáveis pela característica antioxidante desses compostos, pois apresentam a capacidade de eliminar radicais livres (LIU et al., 2013a).

A concentração de CFT para os nove cogumelos avaliados variou entre 5,57 e 13,16 mg GAE/g MS e o conteúdo de flavonoides totais (FT) de 0,24 a 2,05 mg CE/g MS, representando de 3,35% a 25,62% dos CFT dos cogumelos. O *A. brasiliensis* apresentou o maior nível de compostos fenólicos ($p \leq 0,05$), enquanto que o menor foi encontrado para *P. eryngii*. Keleş et al. (2011) quantificaram os CFT de 24 cogumelos e encontraram valores que variaram de 0,42 a 12,78 mg GAE/g (MS). Observou-se que mesmo os cogumelos analisados sendo da mesma espécie, apresentaram importantes variações na concentração de CFT, FT e atividade antioxidante. Essa variação pode estar correlacionada à subespécie/variedade, coloração do corpo de frutificação e maturação do corpo frutífero dos cogumelos (KIM et al., 2009a; ROP; MLCEK; JURIKOVA, 2009).

A atividade antioxidante dos cogumelos foi avaliada pelos métodos de DPPH, ABTS e FRAP (Tabela 12). Ambos os métodos de eliminação radical são populares para a determinação da capacidade antioxidante de produtos alimentícios, devido aos procedimentos simples, rápidos, sensíveis e reprodutíveis (OLIVEIRA et al., 2016). O extrato de *A. brasiliensis* apresentou maior nível de atividade antioxidante para a eliminação de radicais livres avaliadas pelos métodos DPPH e ABTS, enquanto o *A. bisporus* (Portobelo) apresentou o maior nível para o FRAP. Usando a correlação de Pearson é possível observar que os CFT possuem boa correlação com a atividade antioxidante, sendo estas também significativas, medida pelos métodos ABTS ($r = 0,952$), DPPH ($r = 0,850$) e FRAP ($r = 0,712$), indicando

que quanto maior a quantidade de CFT no extrato fenólico de cogumelo, maior a resposta de atividade antioxidante.

O ensaio de DPPH variou de 8,67 a 50,64 $\mu\text{mol TE/g}$; o ABTS de 34,57 a 128,60 $\mu\text{mol TE/g}$ e o FRAP de 8,09 a 48,26 $\mu\text{mol TE/g MS}$. Apesar dos extratos avaliados em cada ensaio serem os mesmos, os mecanismos de ação envolvidos nos métodos são diferentes. Entretanto, os ensaios antioxidantes DPPH vs. ABTS e DPPH vs. FRAP apresentaram correlação significativa ($r>0,853$, $p<0,05$). As moléculas de DPPH e ABTS são dois radicais livres estáveis e coloridos, que são receptores tanto de um átomo de hidrogênio como de um elétron para se tornar uma molécula diamagnética estável. Ao receberem um átomo de hidrogênio ou um elétron de um agente antioxidante, como os compostos fenólicos, a forma reduzida do radical é gerada, seguida pela perda de cor (MUJIC et al., 2010; ZIELINSKI; HAMINIUK; BETA, 2016). Enquanto isso, o FRAP é caracterizado somente pela capacidade de transferência de elétrons, que resulta na redução de íons ferro (Fe^{3+} para Fe^{2+}) na presença de compostos antioxidantes (CRAFT et al., 2012).

TABELA 12 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS OBTIDOS NAS MELHORES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO.

Cogumelos	Atividade antioxidante ($\mu\text{mol TE/g MS}$)		
	DPPH	ABTS	FRAP
<i>A. bisporus</i> (Champignon)	34,35 ^c ±0,21	74,06 ^c ±1,73	40,84 ^c ±0,63
<i>A. bisporus</i> (Portobelo)	40,00 ^b ±0,40	74,41 ^c ±2,23	48,26 ^a ±0,15
<i>A. brasiliensis</i>	50,64 ^a ±0,37	128,60 ^a ±2,02	43,25 ^b ±0,26
<i>F. velutipes</i>	13,12 ^g ±0,20	50,44 ^e ±1,48	14,66 ^f ±0,65
<i>L. edodes</i>	21,44 ^e ±0,51	34,57 ^f ±2,77	26,77 ^d ±0,16
<i>P. djamor</i>	19,35 ^f ±0,08	58,44 ^d ±2,49	14,53 ^f ±0,40
<i>P. eryngii</i>	9,57 ^h ±0,40	40,29 ^f ±1,98	8,09 ^g ±0,19
<i>P. ostreatus</i> (“Ostra” preta)	23,07 ^d ±0,06	86,92 ^b ±0,18	21,29 ^e ±0,79
<i>P. ostreatus</i> (“Ostra” branca)	8,67 ^h ±0,00	38,36 ^f ±2,74	8,65 ^g ±0,31

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Médias seguidas por uma mesma letra em uma mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p\leq 0,05$). MS – matéria seca. TE – Trolox equivalente.

Os ácidos fenólicos são classificados em hidroxicinâmicos e hidroxibenzoicos (DAI; MUMPER, 2010; HELENO et al., 2015). Segundo Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) os derivados de ácidos hidroxicinâmicos são melhores antioxidantes dos que os ácidos hidroxibenzoicos, por apresentarem dupla ligação na molécula ($-\text{HC}=\text{CHCOOH}$) que participa da estabilização do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado.

Entre os derivados do ácido hidroxicinâmico identificados nos cogumelos, estão os ácidos p-cumárico (4-hidroxicinâmico) (de 2,18 a 24,47 $\mu\text{g/g}$), ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-

metoxi-t-cinâmico) (de 17,82 a 752,54 µg/g), trans-ciâmico (de 1,46 a 11,14 µg/g) e clorogênico (11,41 µg/g somente em *P. djamor*). Além dos ácidos fenólicos foram encontrados os compostos fenólicos catecol (1,2-dihidroxibenzeno) (de 97,55 a 236,35 µg/g) e vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído) (de 1,56 a 2,10 µg/g). Os derivados de ácido hidroxibenzoicos determinados nos cogumelos foram os ácidos gálico (3,4,5-trihidroxibenzoico) (de 77,78 a 491,89 µg/g), p-hidroxibenzoico (4-hidroxibenzoico) (de 9,86 a 332,76 µg/g), protocatecuico (3,4-dihidroxibenzoico) (de 10,89 a 22,75 µg/g), gentísico (2,5-dihidroxibenzoico) (27,73 µg/g somente em *A. brasiliensis*), siríngico (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico) (de 9,27 a 32,51 µg/g), vanílico (de 1,18 a 33,87 µg/g) (Tabela 13).

O ácido gálico apresentou uma correlação significativa ($p < 0,05$) com os CFT ($r = 0,975$) e com os métodos antioxidantes de DPPH ($r = 0,962$) e ABTS ($r = 0,976$). Com o ensaio FRAP, o ácido gálico apresentou boa correlação, porém não significativa ($r = 0,777$).

O maior nível de ácido gálico foi obtido para o *A. brasiliensis*. O ácido gálico é uma molécula planar, constituída por um anel aromático, três grupos hidroxilas fenólicos e um grupo ácido carboxílico. Os três grupos hidroxila estão ligados ao anel aromático numa posição orto um em relação ao outro proporcionando esta atividade antioxidante (VELIKA; KRON, 2012; BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015). Galato et al. (2001) demonstraram, através do estudo de oito compostos fenólicos e análogos, que a atividade antioxidante de uma molécula aumenta com o aumento do número de grupos hidroxila ligados ao anel aromático. Descobriu-se que o ácido gálico exibia a maior capacidade antioxidante entre os vários polifenóis. Deste modo, verificou-se que vários fatores, tais como o número e a posição do grupo hidroxila, a presença de outros grupos funcionais e a sua posição em relação aos grupos hidroxila, afetam a atividade antioxidante e anti-radical (BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015).

Outro ácido derivado do ácido benzoico a apresentar importante correlação com os métodos antioxidantes e com os CFT foi o p-hidroxibenzoico [CFT ($r = 0,807$), DPPH ($r = 0,708$), ABTS ($r = 0,885$)]. A sua atividade antioxidante é devido à posição da hidroxila na molécula, que apresenta dois grupos metoxi adjacentes ao grupo OH, aumentando substancialmente a disponibilidade do hidrogênio para reação (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Os ácidos mono-hidroxibenzoicos mostraram uma maior atividade antioxidante na posição orto e para em comparação com a posição meta em termos de capacidade de doação de hidrogênio contra o radical superóxido (VELIKA; KRON, 2012).

TABELA 13 – COMPOSTOS FENÓLICOS E NÃO-FENÓLICOS DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (CLUE) EM NOVE COGUMELOS COMESTÍVEIS.

Compostos analisados	<i>A. bisporus</i> (Champignon)	<i>A. bisporus</i> (Portobelo)	<i>A. brasiliensis</i>	<i>F. velutipes</i>	<i>L. edodes</i>	<i>P. djamor</i>	<i>P. eryngii</i>	<i>P. ostreatus</i> ("Ostra" preta)	<i>P. ostreatus</i> ("Ostra" branca)	
Compostos Fenólicos (µg/g MS)	1	259,54 ^c ±3,20	282,97 ^b ±0,11	491,89 ^a ±1,59	N.D.	148,92 ^d ±3,09	N.D.	77,78 ^e ±0,31	N.D.	
	2	N.D.	N.D.	N.D.	10,89 ^c ±0,17	N.D.	22,75 ^a ±0,64	17,70 ^b ±0,83	N.D.	
	3	236,35 ^a ±1,33	159,73 ^b ±1,05	148,83 ^c ±0,81	97,55 ^e ±1,51	N.D.	157,61 ^b ±0,62	108,51 ^d ±1,39	N.D.	
	4	N.D.	N.D.	27,73±1,10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	5	9,86 ^e ±0,65	57,12 ^c ±1,20	332,76 ^a ±2,98	N.D.	11,56 ^d ±0,42	27,96 ^d ±0,16	21,74 ^d ±0,20	96,69 ^b ±3,24	
	6	N.D.	N.D.	11,14 ^a ±0,50	N.D.	4,15 ^c ±0,02	1,46 ^d ±0,26	N.D.	8,60 ^b ±0,40	3,90 ^c ±0,12
	7	N.D.	N.D.	24,47 ^a ±0,64	N.D.	N.D.	2,18 ^c ±0,08	N.D.	17,69 ^b ±0,21	18,95 ^b ±0,33
	8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	9,27 ^b ±0,84	32,51 ^a ±1,16
	9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	11,41±0,18	N.D.	ND	N.D.
	10	N.D.	N.D.	752,54 ^a ±1,90	N.D.	N.D.	17,82 ^c ±1,57	N.D.	49,97 ^b ±1,68	N.D.
	11	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	63,25±0,82	N.D.
	12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,18±0,13	N.D.	N.D.	N.D.	33,87±0,55
	13	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,56 ^b ±0,06	2,10 ^a ±0,04	N.D.	N.D.	N.D.
	14	N.D.	N.D.	4,15 ^a ±0,18	N.D.	4,76 ^a ±0,52	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	15	N.D.	N.D.	4,50 ^p ±0,05	N.D.	3,81 ^c ±0,20	N.D.	N.D.	4,59 ^b ±0,34	15,28 ^a ±0,13
Total	505,75	499,82	1798,01	108,44	175,94	243,29	225,73	250,06	104,51	
Compostos Não-Fenólicos (µg/g MS)	16	2824,05 ^c ±14,10	2475,41 ^d ±19,56	3232,50 ^b ±30,90	2184,54 ^e ±5,34	1301,76 ^a ±2,29	1846,23 ^f ±23,41	3251,27 ^b ±4,11	1758,94 ^g ±19,49	3594,27 ^a ±12,72
	17	215,34 ^{ab} ±0,84	220,57 ^a ±3,19	204,99 ^b ±1,05	61,09 ^c ±0,84	91,74 ^d ±7,84	61,73 ^c ±0,86	ND	125,30 ^c ±5,56	136,60 ^c ±5,35
	Total	3039,39	2695,98	3437,49	2245,63	1393,50	1907,96	3251,27	1884,24	3730,87

FONTE: O autor (2017).

NOTA: 1 – Ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico), 2 – Ácido protocatecuico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico), 3 – Catecol (1,2-dihidroxibenzeno), 4 – Ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico), 5 – Ácido *p*-hidroxibenzoico (ácido 4-hidroxibenzoico), 6 – Ácido trans-cinâmico, 7 – Ácido *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico), 8 - Ácido siríngico (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico), 9 - Ácido clorogênico, 10 – Ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxi-t-cinâmico), 11 – Ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinâmico), 12 – Ácido vanílico (Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico), 13 – Vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído), 14 – Quercetina, 15 – Campferol, 16 – Ácido fumárico. 17 – Ácido benzoico. ND – não detectado. Médias seguidas por uma mesma letra em uma mesma linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MS – matéria seca.

O ácido ferúlico mostrou ótima correlação com os CFT ($r = 0,954$) e com os ensaios de atividade antioxidante: DPPH ($r = 0,997$), ABTS ($r = 0,930$) e FRAP ($r = 0,982$). Este ácido vem sendo estudado há muitos anos, e apresenta atividade antioxidante para óleos, inibindo a iniciação da formação de hidroperóxidos, independente da temperatura, aproximadamente na mesma proporção que o α -tocoferol (KIKUZAKI et al., 2002).

Os extratos naturais podem ser mais benéficos que os compostos bioativos isolados, uma vez que a interação sinérgica dos compostos pode aumentar as propriedades dos componentes individuais. Além disso, o uso de extratos naturais pode ser benéfico considerando que os níveis máximos legais para aditivos alimentares sintéticos são estabelecidos com base em vários parâmetros toxicológicos que geralmente não são aplicáveis a compostos que ocorrem naturalmente (OLIVEIRA et al., 2016).

A quercetina e o campferol foram os únicos flavonoides determinados nos cogumelos. A concentração de quercetina variou de 4,15 a 4,76 $\mu\text{g/g}$, enquanto o campferol variou de 3,81 a 15,28 $\mu\text{g/g}$. Os valores de quercetina são semelhantes aos obtidos por Ribeiro et al. (2006) que estudaram nove espécies de cogumelos e verificaram a presença de quercetina no *Suillus leteus* e *S. granulatus*. A concentração de campferol foi inferior às obtidas por Kim et al. (2008) ao estudar os compostos fenólicos de *Sparassis crispa*, *Ganoderma lucidum* e *Inonotus obliquus*, porém os mesmos pesquisadores não detectaram campferol nos cogumelos da mesma espécie relatadas no presente trabalho.

O ácido fumárico (não-fenólico), um ácido orgânico, apresentou a maior concentração, variando de 1301,76 a 3594,27 $\mu\text{g/g}$ (*L. edodes* e *P. ostreatus* - “Ostra” branca, respectivamente) dentre todos os compostos identificados. Autores encontraram teores com uma ampla variação na concentração desse composto (0-28200 $\mu\text{g/g dm}$) para diferentes espécies de cogumelos (RIBEIRO et al., 2006, 2008; CARVAJAL et al., 2012; STOJKOVIC et al., 2013).

3.3.3 Atividade antibacteriana (*in vitro*)

A Tabela 14 apresenta a concentração mínima inibitória (MIC) do extrato fenólico otimizado de nove cogumelos comestíveis frente a bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*).

O antibiótico utilizado como padrão (Amoxicilina) foi efetivo na inibição de todas as bactérias testadas nas seguintes concentrações: 4,0 mg/L (*B. cereus*), 0,25 mg/L (*S. aureus*),

1,0 mg/L (*S. enteritidis*) e 12,5 mg/L (*E. coli*). A efetividade dos extratos fenólicos foi maior contra os micro-organismos Gram positivos (*B. cereus* e *S. aureus*), o que também foi observado por (OYETAYO, 2009) ao estudar a atividade antibacteriana de *L. subnudus* contra as bactérias *B. cereus*, *S. aureus* e *S. typhinurium*. O extrato de *L. edodes* apresentou a maior atividade antibacteriana, fornecendo o menor valor de MIC, para todas as bactérias testadas (Tabela 14). A MIC do *L. edodes* para *S. aureus* foi igual a 1,56 mg/mL, semelhante ao MIC encontrado por Taofiq et al., (2016) para a mesma bactéria, de 2,5 mg/mL. Nedelkoska et al. (2013) obtiveram a MIC variando entre 5 a 50 mg/L ao avaliar a atividade antibacteriana de seis cogumelos.

TABELA 14 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA PARA OS EXTRATOS FENÓLICOS OTIMIZADOS DE COGUMELOS COMESTÍVEIS, AVALIADO PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO.

Micro-organismos testados	Gram-positivos		Gram-negativos	
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. coli</i>
<i>A. bisporus</i> (Champignon)	100	100	100	200
<i>A. bisporus</i> (Portobelo)	50,00	200	200	200
<i>A. brasiliensis</i>	50,00	100	200	200
<i>F. velutipes</i>	25,00	50,00	-	-
<i>L. edodes</i>	12,50	1,56	100	100
<i>P. djamor</i>	100	100	-	-
<i>P. eryngii</i>	200	200	200	200
<i>P. ostreatus</i> (“Ostra” preta)	25,00	100	100	200
<i>P. ostreatus</i> (“Ostra” branca)	25,00	100	-	-

FONTE: O autor (2017).

NOTA: MIC – Concentração Mínima Inibitória. (-) MIC não encontrado para as concentrações testadas.

As bactérias Gram-negativas (*S. enteritidis* e *E. coli*) foram menos sensíveis aos agentes antibacterianos intrínsecos dos cogumelos, necessitando maior concentração desses para que houvesse inibição do seu crescimento. O *F. velutipes*, o *P. djamor* e o *P. ostreatus* (“Ostra” branca), não apresentaram atividade antibacteriana para as bactérias Gram-negativas, nas concentrações testadas (Tabela 14). Nedelkoska et al. (2013) verificaram que o extrato metanólico (até 50 mg/mL) de *F. velutipes* também não inibiu a *E. coli*., enquanto os cogumelos da espécie *Agaricus* e *Lentinula* apresentaram atividade inibitória para *E. coli* com MIC de 200 e 100 mg/mL, respectivamente. Owaid, Al-Saeedi e Al-Assaffii (2015) constataram que o filtrado do micélio (50% v/v) de *P. ostreatus* (“Ostra” branca e preta) não inibiu o crescimento da *E. coli* ATCC 25922.

Segundo Oliveira et al. (2016), é possível que a maior resistência das bactérias Gram-negativas aos agentes antimicrobianos, esteja relacionada à sua sofisticada barreira de permeabilidade em comparação com a membrana celular mais simples das bactérias Gram-

positivas. A membrana celular de espécies Gram-negativas apresenta uma barreira de lipopolissacarídeo externa adicional que restringe a penetração da maioria das moléculas, enquanto são permeáveis aos nutrientes. Esta barreira de permeabilidade eficiente tem sido responsabilizada pela incapacidade da indústria farmacêutica de produzir novas classes de compostos de amplo espectro que são igualmente ativos contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

O efeito inibitório dos compostos fenólicos pode ser explicado pela sua interação com as proteínas da membrana bacteriana por meio da ligação de hidrogênio, o que pode resultar em alterações na sua permeabilidade, causando destruição celular ou coagulação do seu conteúdo. A literatura informa que a atividade antimicrobiana de extratos de plantas pode estar relacionada às condições de cultivo da planta, uma vez que os componentes ativos, geralmente substâncias fenólicas, são sintetizados como resposta ao estresse, como ataques de micro-organismos ou radiação UV forte (OLIVEIRA et al., 2016).

Observou-se que os cogumelos *F. velutipes*, o *P. djamor* e o *P. ostreatus* (“Ostra” branca) apresentaram baixas concentrações de compostos fenólicos (Tabela 11) e não continham ácido gálico, que pode ser um dos potenciais agentes antibacterianos presente nos cogumelos. Segundo Borges et al. (2013), o ácido gálico produz alterações irreversíveis nas propriedades da membrana bacteriana através de alterações de hidrofobicidade, diminuição da carga superficial negativa e ocorrência de ruptura ou formação de poros nas membranas celulares com consequente vazamento de constituintes intracelulares essenciais. Essas conclusões foram obtidas após a avaliação do mecanismo de ação do ácido gálico em *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa*.

Segundo Maddox, Laur e Tian (2010), diversos compostos fenólicos mostraram possuir propriedades antimicrobianas contra *Xylella fastidiosa*, uma bactéria Gram-negativa. Entre esses compostos, os que apresentaram maior poder de inibição foram os ácidos cafeico e gálico, além dos flavonoides naringenina, quercetina, catequina e resveratrol. Dos compostos fenólicos citados por Maddox, Laur e Tian (2010), somente o ácido gálico, o ácido cafeico e a quercetina foram identificados em alguns cogumelos. No entanto, os cogumelos que não apresentaram atividade antibacteriana (*F. velutipes*, *P. djamor* e *P. ostreatus* - “Ostra” branca), foram os únicos que não continham estes fenólicos (Tabela 13). Esta verificação sugere que a inibição das bactérias Gram-positivas pode estar relacionada à presença dos ácidos gálico, cafeico e a quercetina determinadas nos demais cogumelos.

A quercetina mostrou forte efeito antibacteriano contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*, no estudo realizado por Abd-Allah, Awad e Abdelmohsen (2015), além de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas. A atividade antibacteriana dos flavonoides é determinada pelas suas características estruturais, principalmente pela posição dos grupos hidroxila livres no anel aromático B. A quercetina possui dois grupos hidroxilas no anel B, localizados nas posições 3' e 4'. Um composto semelhante, o morin, também possui duas hidroxilas no anel B, porém nas posições 2' e 4'. Este composto apresentou atividade antibacteriana ligeiramente superior a quercetina, porém ambos inibiram o crescimento das bactérias *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* (WOŹNICKA et al., 2013).

Além dos compostos fenólicos supracitados, o ácido *p*-cumárico foi estudado isoladamente por Lou et al. (2012) contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e foi considerado antibacteriano contra todas as bactérias patógenas com MIC variando de 10 a 80 µg/mL. O ácido mostrou ter mecanismo duplo de atividade antibacteriana: rompendo as membranas celulares bacterianas e ligando-se ao DNA genômico para inibir as funções celulares, conduzindo à morte celular. Esse ácido foi identificado nos extratos fenólicos otimizados de *A. brasiliensis*, *P. ostreatus* (“Ostra” branca e preta) e no *P. djamor* e pode ter contribuído para a atividade antibacteriana apresentada por esses cogumelos, principalmente contra as bactérias Gram-positivas.

O ácido *p*-hidroxibenzoico (4-hidroxibenzoico) é apontado como agente portador de atividade antimicrobiana contra várias bactérias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas (MANUJA et al., 2013). A inibição de *E. coli* (O157:H7 e ATCC 25922) não foi observada por Cueva et al. (2010) a uma concentração de 500 µg/mL, porém, o *S. aureus* apresentou inibição ao ácido 4-hidroxibenzoico nesta mesma concentração. Dos extratos fenólicos estudados, apenas o *F. velutipes* e *P. ostreatus* (“Ostra” branca) não continham o ácido *p*-hidroxibenzoico.

A atividade antibacteriana do ácido benzoico foi estudada por (CUEVA et al., 2010), que verificou um princípio de inibição do *S. aureus* por este composto em concentração de 500 µg/mL. Esse ácido foi identificado em todos os cogumelos estudados, com exceção do *P. eryngii*, em concentrações de até 220,57 µg/g de *A. bisporus* (Portobelo). Deve-se destacar que além da presença dos compostos já citados os cogumelos apresentavam os demais compostos fenólicos mostrados na Tabela 13, que contribuíram individualmente e/ou possivelmente também de forma sinérgica (ABD-ALLAH; AWAD; ABDELMOHSEN, 2015) para a inibição das bactérias testadas.

3.4 CONCLUSÕES

O planejamento Box-Behnken em conjunto com a metodologia de superfície de resposta e análise de regressão múltipla, sugeriram modelos matemáticos com adequação superior a 88% dos dados sem apresentar falta de ajuste ($p \leq 0,05$). Os nove extratos fenólicos otimizados obtidos nas melhores condições do planejamento, apresentaram importante atividade antioxidante avaliada pelos ensaios de ABTS, DPPH e FRAP. Foi possível identificar 15 compostos fenólicos e 2 não-fenólicos pela técnica de CLUE-DAD. Dos compostos fenólicos, os ácidos gálico e ferúlico apresentaram ótima correlação com os CFT e com a atividade antioxidante determinada por ABTS, DPPH e FRAP. Todos os extratos fenólicos otimizados inibiram o crescimento das bactérias Gram-positivas nas concentrações igual ou abaixo de 200 mg/mL. Seis deles (66,7%) também foram efetivos contra as cepas Gram-negativas nas concentrações testadas. O cogumelos *A. brasiliensis* apresentou a maior concentração de CFT, a maior atividade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH e ABTS, além de possuir a maior variedade de compostos fenólicos identificados por CLUE-DAD.

CAPÍTULO 4

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS SUBSTRATOS DE CULTIVO E
INFLUÊNCIA EXERCIDA NA QUALIDADE NUTRICIONAL DO
*Lentinula edodes***

RESUMO

O *Lentinula edodes* (Shiitake) é um cogumelo comestível, com considerável potencial nutricional além de excelente aroma e sabor. Sua composição nutricional pode sofrer alterações influenciadas pelo método de cultivo. Tradicionalmente é produzido em toras de madeira, porém essa prática vem sendo substituída pelo cultivo em substratos axênicos (SA), elaborados com materiais distintos que são armazenados em sacos plásticos. Esse trabalho teve por objetivo avaliar a composição nutricional dos cogumelos *L. edodes* cultivados em *Quercus acutissima* (QA) e em SA, correlacionando sua composição físico-química com os meios onde foram cultivados. Para isso, os meios de cultivo foram analisados quanto a sua densidade, teor de umidade, cinzas, extrativos, lignina (solúvel e insolúvel) e holocelulose (celulose + hemicelulose) antes da inoculação do *L. edodes* e após a segunda colheita consecutiva desse cogumelo. Os cogumelos foram caracterizados em relação ao seu teor de umidade, proteína, cinzas, lipídeos, carboidratos, fibra alimentar (solúvel e insolúvel), α e β -glucanas e composição mineral. Os resultados obtidos demonstraram que a composição do meio de cultivo influenciou na composição nutricional do cogumelo *L. edodes*. O cogumelo cultivado em SA apresentou teor proteico superior, em 18,72%, quando comparado ao cogumelo cultivado em QA; 26,24% a mais de lipídios; 3,30% a mais de fibras solúveis e 5,3% superior em carboidratos totais. O SA continha inicialmente, menor teor de lignina, holocelulose e proporção C/N, quando comparado à QA.

Palavras-chave: Shiitake, carvalho, produção de cogumelos, β -glucanas, fibra alimentar, proteína.

4.1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos comestíveis fornecem proteínas de alta qualidade e apresentam maior produtividade e eficiência biológica que a proteína animal. São ricos em fibras alimentares, minerais e vitaminas e têm baixos teores de lipídeos e alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados (JONATHAN; NWOKOLO; EKPO, 2013). Por apresentarem elevado teor proteico e reduzido teor lipídico, os cogumelos são excelentes alimentos para serem utilizados em dietas de baixa caloria (RIBEIRO et al., 2009).

A produção de cogumelos comestíveis no Brasil ainda é pequena e se restringe majoritariamente às regiões sudeste e sul devido às condições climáticas favoráveis. As espécies mais cultivadas e consumidas são de origem europeia e asiática, como o *Agaricus bisporus* (Champignon de Paris), *Lentinula edodes* (Shiitake) e cogumelos do gênero *Pleurotus* (Shimeji). Dentre as espécies de cogumelos comestíveis produzidos mundialmente, o *L. edodes*, de origem asiática, ocupa o segundo lugar, ficando atrás apenas do *A. bisporus* (PICCININ; PIERO; PASCHOLATI, 2010; GAITÁN-HERNÁNDEZ et al., 2011).

O interesse comercial no cogumelo *L. edodes* tem aumentado nos últimos anos, principalmente devido ao seu alto valor no mercado internacional, ocorrido não somente devido ao seu considerável potencial nutricional por apresentar elevado teor proteico e de fibra alimentar e baixo teor lipídico, além de excelente aroma e sabor, mas também por causa das suas propriedades medicinais (GAITÁN-HERNÁNDEZ et al., 2011).

O *L. edodes* é um fungo lignocelulolítico provido de um sistema enzimático que o torna capaz de utilizar fontes complexas de carbono, como a celulose, hemicelulose e lignina (ANDRADE et al., 2009). A composição química dos cogumelos é diretamente influenciada pela composição química do substrato no qual o fungo foi cultivado, fator que permite o acúmulo de determinados macro e micronutrientes (BENTO; CASARIL, 2012).

Tradicionalmente, o *L. edodes* é cultivado em troncos de árvores como o eucalipto, carvalho, mangueira e abacateiro. A espécie *Quercus acutissima* (QA), conhecida como “carvalho dente de serra” ou “carvalho japonês”, é nativa do leste da Ásia, amplamente distribuída na China e tem importância ecológica e comercial significativa. É comumente cultivada na América do Norte. A QA fornece excelente material para construção e produção de carvão vegetal, podendo ser empregada também no cultivo de fungos comestíveis (ZHANG et al., 2013).

Atualmente o método de cultivo de cogumelo em toras de árvores tem sido substituído pelo cultivo em substratos axênicos (SA) preparados sob condições controladas e armazenados no interior de sacos plásticos (cultivo *bag-log*) (SÁNCHEZ, 2004; PICCININ; PIERO; PASCHOLATI, 2010). Os SA podem ser elaborados a partir de diversos resíduos florestais e/ou agroindustriais disponíveis na região onde os cogumelos são cultivados (ANDRADE et al., 2013).

No Brasil, o resíduo florestal mais utilizado é do gênero *Eucalyptus*, mesmo não sendo nativo do país (ANDRADE et al., 2013). Já os resíduos agroindustriais que vem ganhando espaço na elaboração de substrato são: bagaço de cana de açúcar e palha ou sabugo de milho. Além disso, a suplementação do substrato com farelo de trigo, arroz, soja, mandioca, aveia ou milho, aumenta a disponibilidade de nutrientes, proporcionando melhor desenvolvimento micelial (REGINA et al., 2009; JUNIOR; PACCOLA-MEIRELLES, 2010; GAITÁN-HERNÁNDEZ et al., 2011). Um mix balanceado desses resíduos são dispostos em sacos plásticos e esterilizados (SA) para evitar a contaminação do meio de cultivo. As principais vantagens deste método são o curto período de tempo para completar um ciclo de cultivo e o maior rendimento (SÁNCHEZ, 2004).

O objetivo desse estudo foi avaliar a composição nutricional dos cogumelos *L. edodes* cultivados em QA e em SA e correlacionar sua composição química com os meios onde foram cultivados.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Amostras

O cogumelo *Lentinula edodes* (Shiitake) produzido em *Quercus acutíssima* (QA), bem como as toras dessa madeira, também conhecida como “carvalho dente de serra” ou “carvalho japonês” foram fornecidos por um produtor do município de Campina Grande do Sul – PR, Brasil. O *L. edodes* produzido em substrato axênico (SA), bem como esse substrato elaborado com pó de serra (40%) e cepilho de eucalipto (43%), farelo de trigo (12%), gérmen de milho (4%) e calcário (1%), foram fornecidos por um produtor do município de Cornélio Procopio – PR, Brasil.

As madeiras (toras) de QA e os SA foram analisados em dois momentos: sem a presença do inóculo fúngico (tempo inicial) e após a segunda frutificação e colheita do *L.*

edodes (tempo final). Foram analisados os *L. edodes* obtidos após a segunda frutificação realizada em ambos os métodos de cultivo.

As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Produtos Não-Madeiráveis, Laboratório de Tecnologia de Produtos Madeiráveis e Laboratório de Solos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Florestas), Colombo-PR, Brasil.

4.2.2 Caracterização dos materiais de cultivo do *L. edodes*

A densidade aparente da QA e do SA (tempo inicial e final) foram determinadas utilizando a Equação 2. A massa de uma porção da QA e do SA foi obtida em balança de precisão e o volume dessa porção foi mensurado pela adaptação da metodologia descrita por Machado e Pereira (2010) e Gutkoski et al. (2005).

$$\rho_s = \frac{m_s}{v_s} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde ρ_s é a densidade, m_s é a massa e v_s é o volume da QA ou do SA.

A umidade de ambos os materiais foi determinada por secagem em estufa a 105°C até peso constante. O resíduo mineral fixo (cinzas) foi obtido por incineração da madeira em mufla, a 550°C, até peso constante. Os materiais extrativos da madeira foram quantificados segundo a NBR 14853 (ABNT, 2010a). O teor de lignina insolúvel foi determinado conforme NBR 7989 (ABNT, 2010b) e os percentuais de lignina solúvel em ácido foram obtidos por meio da medida de absorvância na região ultravioleta (205 nm) em espectrofotômetro, segundo Dence (1992). A fração de holocelulose (celulose + hemicelulose) foi calculada por diferença, considerando 100 g de matéria seca, menos a soma dos demais constituintes em matéria seca (MS). A constituição elementar de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e enxofre (S), foi determinada pelo equipamento CHNS, marca Elementar, modelo vario MACRO cube. O teor de oxigênio (O) foi obtido por diferença, considerando 100 g menos a soma dos demais elementos (CHNS). As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.3 Cálculos para a determinação do consumo de nutrientes na tora de QA e no SA, pelo cogumelo *L. edodes*

Para a determinação da perda de biomassa, tanto da QA quanto do SA, após 2 ciclos de frutificação do cogumelo *L. edodes*, empregou-se a Equação 3 (Balanço Global de Massa):

$$M_i = M_f + M_c \quad (\text{Equação 3})$$

Onde M_i e M_f são as massas nos tempos inicial e final da tora de carvalho ou do substrato, respectivamente; e M_c é a massa consumida pelo cogumelo.

A determinação do consumo individual dos macro e microcomponentes da tora de QA e do SA, pelo cogumelo *L. edodes*, foi realizada utilizando a Equação 4 (Balanço Parcial de Massa):

$$M_i * x_{ni} = M_f * x_{nf} + M_c * x_{nc} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde x_{ni} e x_{nf} são as frações “x” do nutriente “n” nos tempos inicial e final, respectivamente, presentes no material de cultivo do cogumelo; e x_{nc} é a fração do nutriente “n” consumido pelo *L. edodes* ao final do segundo ciclo de cultivo em uma mesma tora de QA ou SA.

4.2.4 Caracterização do corpo de frutificação do *L. edodes* cultivado em QA e em SA

A caracterização físico-química do cogumelo foi realizada com o material fresco (*in natura*), após serem triturados e homogeneizados em um misturador foram utilizados para as análises, exceto para a determinação do teor de lipídios. As amostras para a determinação de lipídeos foram liofilizadas (a -50°C e 150 mm Hg por 96 horas), devido ao elevado teor de umidade do produto original. O teor de umidade foi determinado por diferença de peso antes de depois da secagem em estufa a 105°C até massa constante, segundo AOAC (*Association of Official Analytical Chemicals*), método nº 925.09 (AOAC, 2005). O resíduo mineral fixo (cinzas) foi quantificado após incineração das amostras em mufla, a 550°C por 5 h, conforme o método nº 923.03 (AOAC, 2005). O conteúdo lipídico foi determinado pelo método de extração de Soxhlet, utilizando éter etílico como solvente de extração. O teor de proteína foi determinado pelo método nº 920.87, (AOAC, 2005) e o nitrogênio convertido em proteína, multiplicando o conteúdo de nitrogênio por um fator de 4,38, considerando que os cogumelos

apresentam uma alta proporção de compostos nitrogenados não-proteicos (NPN), como a quitina, de acordo com Reis et al., (2012a) e Rashidi e Yang (2016). A fibra alimentar total foi determinada como frações solúveis e insolúveis, de acordo com o método enzimático-gravimétrico, utilizando o método nº 991.43, (AOAC, 2005). O teor de carboidratos totais, incluindo a fibra alimentar, foi calculado por diferença (isto é, 100 g de produto menos a soma de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em matéria seca (MS).

4.2.5 Análise de minerais dos cogumelos *L. edodes*

Os minerais foram quantificados utilizando amostras liofilizadas dos cogumelos de acordo com o método descrito por Silva (1999), Sarruge e Haag (1974). Os macrominerais foram determinados após digestão com ácido nitro-perclórico (NOGUEIRA; SOUZA, 2005). Os teores de sódio e de potássio nos digestatos foram determinados espectrofotometricamente utilizando fotômetro de chama (SILVA, 1999). O cálcio e o magnésio foram quantificados com o auxílio da espectroscopia de absorção atômica (SARRUGE; HAAG, 1974). O fósforo foi determinado em espectrofotômetro UV/VIS a 660 nm após a produção de ácido fosfomolibdico de cor azul, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de fósforo na amostra (NOGUEIRA; SOUZA, 2005). A concentração de manganês, ferro, cobre e zinco foram determinadas de acordo com Silva (1999) em um espectrômetro de absorção atômica, nos comprimentos de onda de 279,5, 248,3, 324,7 e 213,9 nm, respectivamente. Cada análise mineral foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos MS.

3.2.6 Análise estatística

Realizou-se a análise de variância (ANOVA), teste de Tukey e o teste T de Student, utilizando o programa STATISTICA versão 10.0. Foram avaliadas as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) para as médias dos parâmetros analisados nos cogumelos e nos meios de cultivo.

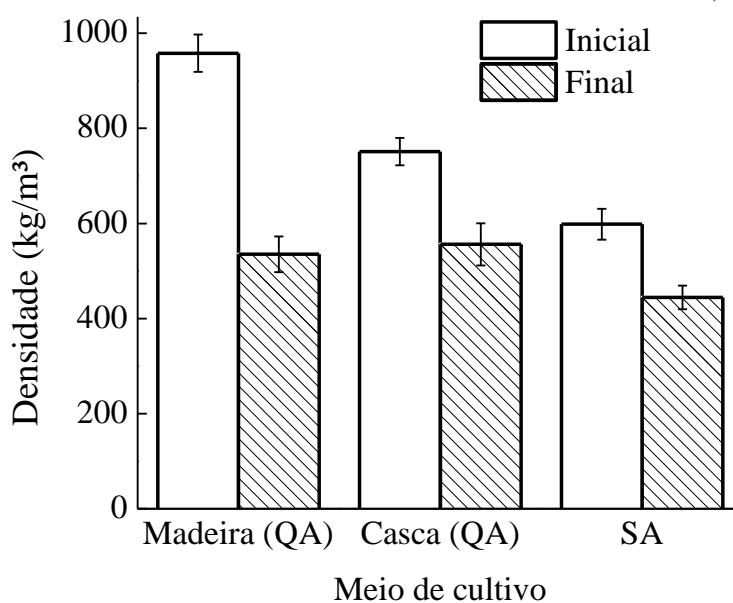
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Composição físico-química da *Quercus acutíssima* (QA) e do substrato axênico (SA)

Os resultados obtidos na caracterização físico-química da QA e do SA no tempo inicial e final (sem o inóculo do *L. edodes* e após a segunda colheita do *L. edodes*, respectivamente), utilizados na produção dos cogumelos, são apresentados nas Figuras 11 e 12 e nas Tabelas 15 e 16.

A densidade aparente da madeira e casca da QA e do SA diminuiu significativamente após dois ciclos de produção de cogumelos em 42,65%, 29,51% e 25,77%, respectivamente (Figura 11). A análise estatística foi realizada comparando os tempos inicial e final de cada método de cultivo. Esse comportamento deve-se ao fato do *L. edodes* ser um fungo lignocelulolítico capaz de produzir enzimas que degradam a lignina, a celulose e a hemicelulose, convertendo-as em moléculas menores que foram absorvidas e utilizadas para o desenvolvimento do corpo de frutificação (GOMES-DA-COSTA; COIMBRA; DA SILVA, 2008). Andrade et al. (2009) também estudaram a redução da densidade da madeira de três clones de eucalipto durante o cultivo de *L. edodes* ao longo de 12 meses e constataram diminuição da densidade da madeira em todos os clones avaliados.

FIGURA 11 – DENSIDADE APARENTE DA MADEIRA E CASCA DE QA (*Q. ACUTÍSSIMA*), E DO SUBSTRATO AXÊNICO (SA) NO TEMPO INICIAL E FINAL (SEM INÓCULO DE *L. EDODES* E APÓS A SEGUNDA COLHEITA DO COGUMELO, RESPECTIVAMENTE).



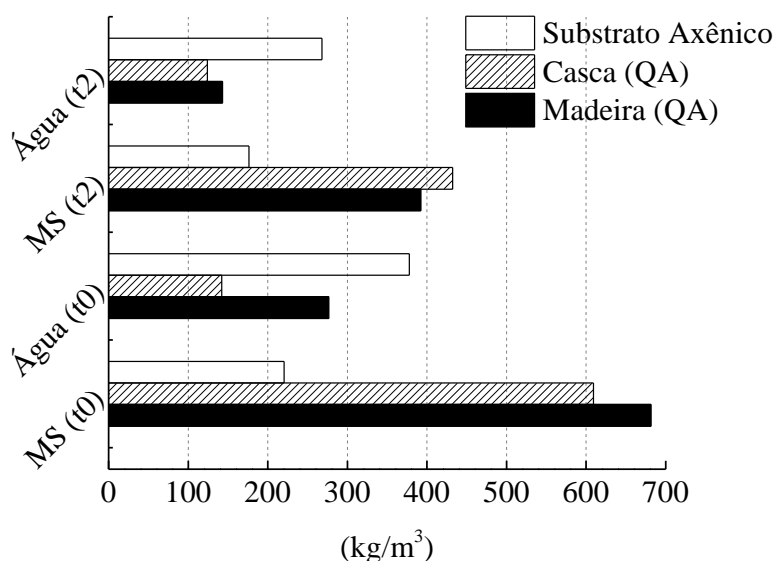
FONTE: O autor (2017).

A umidade e a matéria orgânica seca diminuíram tanto na madeira e na casca de QA quanto no SA, após dois ciclos consecutivos de produção de *L. edodes*, conforme apresentado na Figura 12. Verificou-se por meio do balanço global e parcial de massa (Equações 3 e 4) que a redução da umidade na madeira (QA), casca (QA) e SA foi de 48,28%, 12,83% e 29,05%, respectivamente (Tabela 16). A redução da matéria seca (MS) representou 42,46%, 29,04% e 20,02% na madeira (QA), casca (QA) e SA, respectivamente (Tabela 16). Tanto a redução de umidade quanto a redução de MS do meio de cultivo do *L. edodes*, indicou que o cogumelo utilizou os compostos líquidos e sólidos para seu desenvolvimento.

A Tabela 15 apresenta os resultados das análises realizadas na madeira (QA), casca (QA) e SA. A Tabela 16 foi elaborada realizando balanço de massa global e parcial (Equações 4.2 e 4.3) para todos os compostos analisados, em 1,00 m³ de material.

Os teores de cinzas da madeira e da casca de QA nos tempos inicial e final não apresentaram diferença significativa (Tabela 15), indicando que se manteve a proporcionalidade de minerais, matéria orgânica e água ao longo do cultivo do *L. edodes*. O oposto foi observado no substrato, onde o teor de cinzas nos tempos inicial e final foi significativamente diferente. O cultivo do *L. edodes* em SA ocasionou uma concentração da MS e dos minerais devido ao menor consumo desses, quando comparado à madeira e à casca de QA (Figura 12).

FIGURA 12 – COMPOSIÇÃO DE ÁGUA E MATÉRIA SECA (MS) DA MADEIRA E CASCA DE QA (*Q. ACUTÍSSIMA*) E DO SA (SUBSTRATO AXÊNICO) NO TEMPO INICIAL E FINAL (SEM INÓCULO DE *L. EDODES* E APÓS A SEGUNDA COLHEITA DO COGUMELO, RESPECTIVAMENTE).



FONTE: O autor (2017).

TABELA 15 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ELEMENTAR (CHNSO) DA *QUERCUS ACUTÍSSIMA* (QA) E DO SUBSTRATO AXÊNICO (SA).

Análises	Madeira (QA)		Casca (QA)		SA		
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	
Cinzas*	0,71 ^d ±0,01	0,63 ^d ±0,03	2,42 ^c ±0,03	2,20 ^c ±0,03	4,93 ^a ±0,01	4,11 ^b ±0,11	
Extrativos*	1,53 ^{de} ±0,11	1,04 ^e ±0,01	2,63 ^c ±0,09	1,87 ^{cd} ±0,09	5,13 ^a ±0,24	3,98 ^b ±0,32	
Lignina*	Insolúvel	31,35 ^c ±0,36	28,52 ^d ±1,07	38,57 ^c ±0,01	33,76 ^b ±1,40	28,74 ^d ±0,17	25,83 ^e ±0,15
	Solúvel	1,88 ^c ±0,04	1,87 ^c ±0,02	2,05 ^b ±0,21	1,72 ^d ±0,09	1,89 ^c ±0,01	2,23 ^a ±0,03
	Total	33,23 ^c ±0,40	30,39 ^e ±1,09	40,62 ^a ±0,22	35,48 ^b ±1,49	30,63 ^d ±0,18	28,06 ^f ±0,18
Holocelulose*	64,53 ^b ±0,52	67,94 ^a ±1,13	54,70 ^f ±0,34	60,45 ^d ±1,59	59,31 ^e ±0,43	63,85 ^c ±0,61	
Carbono (C)*	45,92 ^c ±0,09	45,91 ^c ±0,10	47,91 ^a ±0,04	43,02 ^e ±0,01	47,11 ^b ±0,09	45,38 ^d ±0,06	
Oxigênio (O)*	46,55 ^c ±0,13	46,88 ^b ±0,13	45,08 ^d ±0,10	50,38 ^a ±0,10	44,67 ^e ±0,08	46,81 ^b ±0,12	
Hidrogênio (H)*	7,24 ^a ±0,14	6,89 ^b ±0,04	6,52 ^c ±0,05	6,27 ^d ±0,08	7,41 ^a ±0,01	7,00 ^b ±0,05	
Nitrogênio (N)*	0,24 ^d ±0,01	0,32 ^e ±0,01	0,48 ^b ±0,02	0,32 ^c ±0,01	0,76 ^a ±0,03	0,75 ^a ±0,01	
Enxofre (S)*	0,05 ^a ±0,01	N.D.	0,01 ^b ±0,00	0,01 ^b ±0,01	0,05 ^a ±0,01	0,06 ^a ±0,00	
Relação C/N*	191,33	143,47	99,81	134,44	61,99	60,51	

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Letras diferentes em uma mesma linha representam médias com diferença significativa ($p \leq 0,05$).

*Média expressa em % MS \pm desvio padrão. ND - Não detectado.

Os extrativos da madeira e da casca de QA (1,04 a 2,63%) apresentaram-se similares aos valores obtidos por Silvério et al. (2006) que estudou madeiras de eucalipto. Os extrativos referem-se às substâncias de baixa ou média massa molecular, como ácidos e ésteres graxos, álcoois de cadeia longa, esteroides, compostos fenólicos e glicosídeos que podem ser solubilizados em solventes orgânicos (SILVÉRIO et al., 2006). Os extrativos do SA foram mais expressivos (5,23 e 3,98%), pois além de ser elaborado com madeira de eucalipto, o substrato contém em sua constituição, farelo de trigo e gérmen de milho, o que aumenta o teor de compostos lipofílicos que são extraídos com a solução de tolueno:etanol (2:1). Becerra et al. (2002) também encontraram teores mais elevados de extrativos (1,34 a 7,77%) em sua pesquisa com madeira chilena da família *Podocarpaceae*.

Alguns elementos (holocelulose, C e O, por exemplo) apresentaram maior concentração no final do cultivo (Tabela 15). Esse resultado sugere um maior consumo de água e de determinados nutrientes pelo *L. edodes*, ocasionando o acúmulo de moléculas menos utilizadas pelo fungo para seu crescimento. Por meio do balanço de massa global e parcial, foi possível comprovar que houve o consumo de todos os constituinte da QA e do SA. A lignina total apresentou redução de 47,36%, 48,03% e 26,73% para a madeira, casca e SA, respectivamente (Tabela 16). Seguindo o mesmo padrão, a holocelulose (celulose + hemicelulose) também diminuiu após o segundo ciclo de produção de cogumelos em 10,84%, 21,58% e 13,90%. Esses polímeros são hidrolisados por enzimas produzidas pelo *L. edodes*, como lacases, manganês peroxidase e lignina peroxidase (REGINA et al., 2008), e

TABELA 16 – BALANÇO GLOBAL E PARCIAL DE MASSA PARA OS CONSTITUINTES DA *QUERCUS ACUTÍSSIMA* (QA) E DO SUBSTRATO AXÊNICO (SA): TEMPO INICIAL E TEMPO FINAL (SEM INÓCULO DE *L. EDODES* E APÓS A SEGUNDA COLHEITA DO *COGUMELO*, RESPECTIVAMENTE).

	Madeira QA (kg/m ³)			Casca QA (kg/m ³)			SA (kg/m ³)			
	Tempo inicial	Tempo final	Consumida	Tempo inicial	Tempo final	Consumida	Tempo inicial	Tempo final	Consumida	
Água	276,56	143,03	133,53	142,22	123,97	18,25	377,85	268,08	109,77	
Matéria seca	681,40	392,06	289,34	609,07	432,20	176,87	220,58	176,43	44,15	
Cinzas*	4,87±0,07	2,48±0,12	2,38±0,19	12,48±0,17	9,50±0,21	2,98±0,38	10,87±0,03	7,24±0,02	3,63±0,05	
Extrativos*	10,42±0,75	4,06±0,06	6,36±0,81	15,99±0,52	8,06±0,20	7,92±0,72	11,31±0,53	7,02±0,56	4,29±1,09	
Lignina*	Insolúvel	313,59±2,44	111,81±4,18	101,78±6,62	234,93±0,05	145,91±6,05	89,02±6,10	63,40±0,37	45,57±0,26	17,83±0,63
	Solúvel	12,78±0,30	7,34±0,06	5,44±0,36	12,52±1,27	7,43±0,37	5,08±1,64	4,17±0,02	3,94±0,05	0,23±0,07
	Total	226,37±2,74	119,15±4,24	107,22±6,98	247,45±1,32	153,35±6,42	94,10±7,74	67,56±0,39	49,50±0,31	18,06±0,70
Holocelulose*	439,71±3,56	392,06±4,42	173,34±7,98	333,16±2,01	261,26±6,83	71,90±8,84	130,83±0,97	112,65±0,89	18,18±1,86	
Carbono*	312,90±0,58	179,99±0,41	132,90±0,99	291,77±0,22	185,93±0,04	105,84±0,26	103,92±0,20	80,06±0,10	23,82±0,30	
Oxigênio*	317,16±0,62	183,79±0,50	133,37±1,12	274,64±0,62	217,74±0,39	56,85±1,01	98,54±0,17	82,59±0,08	15,95±0,25	
Hidrogênio*	49,33±0,94	27,03±0,14	22,30±1,08	39,74±0,31	27,09±0,35	12,65±0,66	16,34±0,02	12,35±0,09	3,99±0,11	
Nitrogênio*	1,66±0,08	1,24±0,05	0,42±0,13	2,92±0,12	1,38±0,04	1,54±0,16	1,67±0,06	1,32±0,02	0,35±0,08	
Enxofre*	0,36±0,06	N.D.	0,36±0,06	0,05±0,01	N.D.	0,05±0,01	0,12±0,02	0,10±0,01	0,02±0,03	

FONTE: O autor (2017).

NOTA: *Resultados expressos como média ± desvio padrão. N.D. - Não detectado.

convertidos em nutrientes utilizados para seu crescimento (GOMES-DA-COSTA; COIMBRA; DA SILVA, 2008).

A composição elementar (CHNSO) da QA (Tabela 15) apresentou similaridade à composição da madeira de mesma espécie estudada por Lee et al. (2008). Na Tabela 16 pode-se observar que todos os constituintes elementares (CHNSO) apresentaram redução de massa, tanto na madeira quanto no substrato, após a segunda produção de *L. edodes*. Esse resultado corrobora as demais análises que mostraram a redução na massa de macromoléculas como holocelulose, lignina e extrativos.

Verifica-se que o teor de nitrogênio inicialmente presente no SA foi aproximadamente 68,42% superior ao encontrado na madeira de QA e 36,84% ao da casca de QA (Tabela 15). A razão C/N dos materiais de cultivo do *L. edodes* no tempo inicial foi de 61,99, 191,33 e 143,47 para o SA, a madeira de QA e a casca de QA. Para Cheung (2005), a razão C/N para o crescimento micelial vegetativo deve ser de 25, enquanto que para a fase de produção essa razão deve ser de 40. WANG et al. (2013) sugerem um intervalo na razão de C/N de 25 a 40 para o crescimento micelial vegetativo e C/N entre 40 e 73 no estágio reprodutivo.

A elevada proporção de C/N da QA é normal segundo as especificações da *United States Department of Agriculture* (USDA, 2016). Andrade et al. (2011) aponta que para o eucalipto essa relação também é alta (aproximadamente 200/1). A razão C/N inicial da casca e da madeira de QA foi de 2,3 a 3 vezes superior à encontrada no SA. Possivelmente a maior biodisponibilidade de N no SA facilitou a obtenção e incorporação do mesmo pelo *L. edodes*, resultando em maior quantidade proteica do cogumelo cultivado neste substrato (Tabela 17). Özçelik e Peksen (2007) e Philippoussis et al. (2007) comprovaram que a taxa de crescimento e a eficiência biológica do *L. edodes* está relacionada à biodisponibilidade de nitrogênio. Citam ainda que o nitrogênio tem sido reconhecido como um fator limitante para o crescimento desse cogumelo.

4.3.2 Composição química e mineral dos cogumelos cultivados nos diferentes meios de cultivo

Os *L. edodes in natura*, produzidos em toras de *Quercus acutissima* (QA) e em substrato axênico (SA), apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) em seu percentual médio de umidade, quantificado em 87,57% e 90,29%, respectivamente. Possivelmente o

maior teor de água existente no SA (Tabela 16) proporcionou maior umidade no cogumelo produzido por este método, quando comparado ao produzido na tora de QA.

A composição química e bioquímica dos cogumelos é apresentada na Tabela 17. Os principais componentes dos corpos de frutificação dos cogumelos são os carboidratos totais, as fibras alimentares (solúvel e insolúvel) e as proteínas.

O teor de fibra alimentar total (insolúvel e solúvel) apresentou-se elevado, tanto para o cogumelo produzido em QA (46,74%) como naquele cultivado no SA (39,17%). A fibra alimentar insolúvel representou 83% do total de fibra do *L. edodes* produzido em SA e 86,2% do cogumelo produzido em QA. Reguła e Siwulski (2007) analisaram *L. edodes* cultivado em SA e obtiveram resultado semelhante para o teor de fibra alimentar total, porém a fração de fibra insolúvel apresentou-se superior a encontrada nessa pesquisa. Segundo Vetter (2007) a quitina é o principal polissacarídeo que constitui a fração de fibra alimentar insolúvel, além de celulose, lignina e algumas hemiceluloses. A fração de fibra solúvel é composta de β -glucanas, mananas, gomas e algumas hemiceluloses (SARMENTO; BERNAUD; RODRIGUES, 2013; FINIMUNDY et al., 2014; MUKHOPADHYAY; GUHA, 2015). Vale ressaltar que o consumo de alimentos com elevado teor de fibras reflete em efeitos benéficos à saúde do indivíduo, reduzindo a incidência de doenças devido ao aumento do volume das fezes e redução do tempo de transito intestinal. O consumo de alimentos com elevado teor de fibras estimula o desenvolvimento da flora intestinal e reduz a absorção de gorduras e açúcares, reduzindo dessa forma o nível de colesterol e glicemia no sangue (DHINGRA et al., 2012).

Segundo Rop; Mlcek e Jurikova (2009), a variação no teor de fibras pode estar relacionada principalmente com fatores genéticos, que irão determinar a quantidade e o tipo de sacarídeos presentes nas paredes celulares fúngicas. No entanto, como os cogumelos aqui analisados pertencem a uma mesma espécie (*L. edodes*), acredita-se que o maior teor de fibra insolúvel do *L. edodes* produzido em QA seja consequência das condições menos favoráveis na obtenção de nutrientes, isto porque a estrutura da madeira de QA é mais resistente que os compostos que formam o SA (pó de serra e cepilho de eucalipto, farelo de trigo, germen de milho e calcário). Dessa forma, o *L. edodes* produzido na QA teria sido mais exigido quanto a sua resistência, produção e secreção enzimática (lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase) para a obtenção de nutrientes (CHEN, 2005; ALEXANDRINO et al., 2007; REGINA et al., 2008) se comparado ao *L. edodes* produzido em SA, onde os nutrientes encontravam-se mais disponíveis para serem absorvidos.

TABELA 17 – COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS *L. EDODES* PRODUZIDOS EM *QUERCUS ACUTÍSSIMA* (QA) E EM SUBSTRATO AXÊNICO (SA).

Análises	<i>L. edodes</i> (QA)	<i>L. edodes</i> (SA)
Proteínas (% MS)	14,45 ^b ± 0,14	18,00 ^a ± 0,58
Lipídeos (% MS)	2,08 ^b ± 0,16	2,82 ^a ± 0,29
Cinzas (% MS)	7,64 ^a ± 0,04	7,38 ^b ± 0,08
Carboidratos totais (% MS)	75,83 ^a ± 2,66	71,80 ^b ± 5,40
Fibra alimentar (% MS)	Insolúvel	40,97 ^a ± 1,85
	Solúvel	6,45 ^a ± 0,47
	Total	47,42 ^a ± 2,32
Glucanas (mg/g MS)	α	4,45 ^a ± 0,09
	β	21,82 ^a ± 0,21
	Total	26,28 ^a ± 0,28
Macrominerais (mg/100g MS)	Fósforo	330 ^b ± 2,83
	Potássio	1950 ^a ± 98,99
	Cálcio	12,50 ^a ± 0,10
	Magnésio	108,80 ^b ± 1,77
Microminerais (mg/100g MS)	Ferro	4,20 ^a ± 0,00
	Manganês	3,00 ^a ± 0,57
	Cobre	0,45 ^a ± 0,07
	Zinco	3,65 ^b ± 0,07
	Sódio	4,00 ^b ± 1,41

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra em uma linha não diferem significativamente entre si pelo teste T de Student ($p \leq 0,05$). MS – matéria seca.

Como observado para o teor de fibras alimentares, o conteúdo de glucanas foi maior para o *L. edodes* produzido em QA. O conteúdo de β-glucanas variou de 16,64 a 21,82 mg/g MS do *L. edodes* produzido em SA para o produzido em QA, respectivamente. Os principais polissacarídeos encontrados nos cogumelos são as β-glucanas, que compõem aproximadamente 50% da parede celular dos fungos (VALVERDE; HERNÁNDEZ-PEREZ; PAREDES-LÓPEZ, 2015). A concentração de β-glucanas varia em função da espécie (*L. edodes* e gênero *Pleurotus* são as fontes mais importantes), condições de crescimento (razão C/N, presença de compostos fenólicos e pH do meio) e maturação do corpo frutífero (ROP; MLCEK; JURIKOVA, 2009).

Em relação aos carboidratos, Wang et al. (2014) apresentaram em seu levantamento bibliográfico, teores de carboidratos em cogumelos que variou, em matéria seca, de 12,80% (*L. crocipodium*) a 64,60% (*S. aspratus*). Esta variação é ampla, pois pode ser expresso como a soma dos carboidratos totais (mono, di, oligo e polissacarídeos), estando incluso aqui a fração de fibras alimentares (polissacarídeos solúveis e insolúveis), ou ainda representar apenas os compostos mais simples (ribose, xilose, manose, glicose, trealose), quando a análise de fibras alimentares for realizada e apresentada separadamente (KIM et al., 2009b; ULZIJARGAL; MAU, 2011; VAZ et al., 2011b). Na presente pesquisa, o conteúdo total de carboidratos (Tabela 17), compreende desde os carboidratos mais simples, até os mais

complexos (polissacarídeos). O teor de carboidratos foi significativamente ($p \leq 0,05$) diferente entre os cogumelos, sendo que o produzido em tora de carvalho apresentou maior quantidade (75,83%) desses compostos quando comparado ao cogumelo produzido em SA (71,80%).

O conteúdo proteico dos cogumelos comestíveis é expressivo e importante para a sua qualidade nutricional. Os cogumelos aqui estudados apresentaram teores de 14,45% e 18,00% (MS) quando cultivados em QA e AS respectivamente. Esses teores diferem entre si ($p \leq 0,05$), podendo, esta diferença, estar relacionada ao estágio de desenvolvimento do cogumelo ou a disponibilidade de N presente no meio de cultivo (COLAK; FAIZ; SESLI, 2009; COHEN et al., 2014). Deve-se ressaltar que os cogumelos pertencem à mesma espécie (*L. edodes*), foram colhidos na mesma época do ano e são os produtos da segunda frutificação.

Os cogumelos apresentaram baixo teor de lipídeos: 2,08% e 2,82% (MS), fator relevante para o aspecto nutricional desse alimento, tendo em vista que o valor calórico dos *L. edodes* se mantém inferior a muitos produtos que apresentam os mesmos conteúdos proteicos (produtos cárneos e de laticínio). Esses valores são similares aos citados na literatura para essa espécie de cogumelo (1,70% a 2,89%) (REGUŁA; SIWULSKI, 2007; DEV et al., 2011; REIS et al., 2012a; WANG et al., 2014).

O teor mineral (cinzas) do *L. edodes* produzido em QA e SA foi de 7,64% e 7,38% (MS), respectivamente. Reguła e Siwulski (2007) e Gaitán-Hernández e Mata (2004) quantificaram um teor mineral de 6,73% e 7,49%, respectivamente, para o *L. edodes*, similar ao encontrado nesta pesquisa. Ainda em relação ao teor mineral, verificou-se que o elemento que apresentou destaque foi o potássio em ambos em ambos os cogumelos (Tabela 17). Com exceção dos teores de ferro e manganês, que foram encontrados em maior concentração no cogumelo cultivado em QA, os demais minerais tiveram valores mais expressivos no *L. edodes* cultivado em SA. Isso pode estar associado à biodisponibilidade desses componentes no meio de cultivo, tendo em vista que o SA além de material lenhoso, também é composto por farelo de trigo e gérmen de milho. Esses últimos contêm, em sua constituição, todos os minerais (EL-SHARNOUBY; ALEID; AL-OTAIBI, 2012) que fazem parte da composição dos cogumelos estudados. Gaitán-Hernández e Mata (2004) quantificaram o teor de macro e micro minerais de *L. edodes* produzidos em palha de trigo e encontraram teores Mg, Ca, Na, Cu, Fe, Zn ligeiramente superiores aos quantificados nos cogumelos produzidos na tora de QA e no SA aqui estudados. Em contrapartida, Mallikarjuna et al. (2013) analisaram *L. edodes* cultivado em SA a base de pó de serra e encontraram teores de Na, Ca, Zn e Cu superiores aos quantificados nesse estudo.

4.4 CONCLUSÕES

O estudo da composição química do corpo de frutificação do *L. edodes* produzido por dois métodos de cultivo permitiu concluir que a composição físico-química do meio de cultivo influencia na composição nutricional do cogumelo. Os teores de umidade, proteínas, lipídeos, minerais, fibras alimentares insolúveis, glucanas totais e fração de α e β -glucanas dos *L. edodes* cultivados em tora *Quercus acutíssima* (QA) e em substrato axênico (SA), foram diferentes. O cogumelo cultivado em SA apresentou maior umidade do que o cultivado em QA, sendo que essa característica também foi observada nos meios de cultivo, indicando uma correlação positiva entre essa variável e o método de produção. Constatou-se uma correlação inversamente proporcional entre a relação C/N do meio de cultivo e o teor proteico do cogumelo. A densidade da QA e do SA diminuíram, devido ao consumo dos constituintes de sua composição, como lignina, holocelulose (celulose + hemicelulose), extrativos e minerais. Verificou-se também que os componentes elementares (C, H, N, S e O) dos meios de cultivo apresentaram menor massa após dois ciclos de produção de *L. edodes*, corroborando assim o indicativo de consumo da matéria orgânica de ambos os métodos de cultivo. Devido a maior praticidade, facilidade, menor custo e produção de cogumelos com maiores teores de proteínas, recomenda-se a utilização de substratos axênicos no cultivo de *L. edodes*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os cogumelos comestíveis estudados neste trabalho apresentaram excelente perfil nutricional, sendo fonte saudável de obtenção de proteínas, aminoácidos essenciais e fibras alimentares. O cogumelo *P. ostreatus* (“Ostra” preta) destacou-se devido ao seu conteúdo proteico, significativamente superior aos demais cogumelos analisados. O perfil aminoacídico deste cogumelo também se sobressaiu por apresentar maiores níveis em 13 dos 18 aminoácidos identificados e quantificados nas amostras. Foi verificado que a composição do meio de cultivo tem influência sobre a composição química e bioquímica dos cogumelos. O meio de cultivo com maior proporção de C/N produziu cogumelos com menor conteúdo proteico, lipídico e de macrominerais. Em contrapartida os cogumelos apresentaram maior conteúdo de ferro, manganês, fibras alimentares totais e insolúveis.

Em relação aos compostos bioativos, o *A. brasiliensis* apresentou maior concentração de compostos fenólicos totais (CFT) e o *A. bisporus* (Portobelo) a maior quantidade de flavonoides totais. A análise do extrato fenólico otimizado, utilizando um cromatógrafo líquido de ultra-eficiência (CLUE-DAD), permitiu identificar e quantificar os seguintes compostos ácidos: gálico, protocatecuico, gentísico, *p*-hidroxibenzoico, trans-cinâmico, *p*-cumárico, siríngico, clorogênico, ferúlico, cafeico, vanílico, benzoico e fumárico, além dos compostos catecol, vanilina, quercetina e campferol. A quantidade total desses compostos, somadas para cada cogumelo, foi maior para o *A. brasiliensis*, quando comparado aos demais.

A atividade antioxidante, determinada pelos ensaios de DPPH, ABTS e FRAP apresentou forte correlação com os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico e ferrúlico, encontrados em alguns cogumelos. Novamente o *A. brasiliensis* se destacou por apresentar a maior atividade antioxidante determinada por DPPH e ABTS, e a segunda maior atividade quando determinada por FRAP. Dessa forma, dentre os nove cogumelos comestíveis estudados, o *A. brasiliensis* apresentou a maior concentração de CFT, a maior quantidade de compostos determinados por CLUE-DAD e o melhor nível de atividade antioxidante determinada por DPPH e ABTS.

A avaliação da atividade antibacteriana do extrato fenólico otimizado dos nove cogumelos comestíveis estudados, mostrou que 100% deles apresentaram potencial de inibição contra as bactérias Gram-positivas, *B. cereus* e *S. aureus*, e 66,7% deles são efetivos na inibição das cepas Gram-negativas, *S. enteritidis* e *E. coli*. Constatou-se também, que a espécie *L. edodes* foi mais eficiente na inibição dessas quatro bactérias, pois a concentração

mínima inibitória (MIC) foi menor para esses cogumelos, quando comparados às demais espécies.

A obtenção dos resultados dessa pesquisa ressalta a relevância de estudos que apontem alternativas alimentares com o objetivo de complementar a dieta humana e enriquecê-la nutricionalmente além de incorporar compostos com atividades biológicas. Os cogumelos comestíveis estudados mostraram-se alimentos ricos nutricionalmente, além de apresentarem compostos bioativos, como β -glucanas, aminoácidos essenciais e compostos fenólicos.

REFERÊNCIAS

- Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). **NBR 11941-02**: determinação da densidade básica em madeira. Rio de Janeiro, 2003.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). **NBR 7989**: Pasta celulósica e madeira - Determinação de lignina insolúvel em ácido. São Paulo, 2010a.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). **NBR 14853**: Madeira - Determinação do material solúvel em etanol-tolueno e em diclorometano e em acetona. São Paulo, 2010b.
- ABD-ALLAH, W. E.; AWAD, H. M.; ABDELMOHSEN, M. M. HPLC Analysis of quercetin and antimicrobial activity of comparative methanol extracts of *Shinus molle* L. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 11, p. 550–558, 2015.
- AHMAD, N.; MAHMOOD, F.; AKBAR KHALIL, S.; ZAMIR, R.; FAZAL, H.; ABBASI, B. H. Antioxidant activity via DPPH, gram-positive and gram-negative antimicrobial potential in edible mushrooms. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, n. 9, p. 826–834, 2014.
- AKATA, I.; ERGONUL, B.; KALYONCU, F. Chemical compositions and antioxidant activities of 16 wild edible mushroom species grown in Anatolia. **International Journal of Pharmacology**, v. 8, n. 2, p. 134–138, 2012.
- AKBARIRAD, H.; KAZEMEINI, S. M.; SHARIATY, M. A. Deterioration and some of applied preservation techniques for common mushrooms (*Agaricus bisporus*, followed by *Lentinus edodes*, *Pleurotus* spp.) **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 2, n. 6, p. 2398–2402, 2013.
- AKINDAHUNSI, A. A.; OYETAYO, F. L. Nutrient and antinutrient distribution of edible mushroom, *Pleurotus tuber-regium* (fries) singer. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 39, p. 548–553, 2006.
- ALAM, N.; AMIN, R.; KHAN, A.; ARA, I.; SHIM, M. J.; LEE, M. W.; LEE, T. S. Nutritional analysis of cultivated mushrooms in Bangladesh - *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus florida* and *Calocybe indica*. **Mycobiology**, v. 36, n. 4, p. 228–232, 2008.
- ALAM, N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143–152, 2013.
- ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G. De; SOUZA, C. G. M. De; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 364–368, 2007.
- ALVES, M. J.; FERREIRA, I. C. F. R.; DIAS, J.; TEIXEIRA, V.; MARTINS, A.; PINTADO, M. A review on antifungal activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and

isolated compounds. **Planta Medica**, v. 78, p. 1707–1718, 2012.

ALVES, M. J.; FERREIRA, I. C. F. R.; FROUFE, H. J. C.; ABREU, R. M. V; MARTINS, A.; PINTADO, M. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 346–357, 2013.

ANDRADE, M. C. N. De; MINHONI, M. T. D. A.; SANSÍGOLO, C. A.; ZIED, D. C. Densidade básica da madeira de sete espécies e três clones de eucalipto antes e durante o cultivo de shiitake. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 31, n. 2, p. 235–240, 2009.

ANDRADE, M. C. N. De; MINHONI, M. T. de A.; SANSÍGOLO, C. A.; ZIED, D. C.; SALES-CAMPOS, C. Estudo comparativo da constituição nutricional da madeira e casca de espécies e clones de eucalipto visando o cultivo de shiitake em toras. **Revista Árvore**, v. 35, p. 183–192, 2011.

ANDRADE, M. C. N. De; SALES-CAMPOS, C.; CARVALHO, C. S. M. De; AGUIAR, L. B. De; MINHONI, M. T. D. A. Uso de resíduos madeireiros da Amazônia brasileira no cultivo in vitro de *Lentinus strigosus*. **Revista Ambiência**, v. 9, p. 189–196, 2013.

ANJANA, K. G. S.; BALAMURUGAN;, T. S. B.; MANIVASAGAN;, V.; RAMESH, N. G. B. Phytochemical, antioxidant and antitumor activity of edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Int. J. Advanced Research in Biological Sci.**, v. 3, n. 9, p. 170–177, 2016.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, p. 183–198, 2002.

AOAC. **Official methods of the Association of Official Analytical Chemists**. 16. ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 2005.

ARASOGLU, T.; DERMAN, S.; MANSUROGLU, B. Comparative evaluation of antibacterial activity of caffeic acid phenethyl ester and PLGA nanoparticle formulation by different methods. **Nanotechnology**, v. 27, p. 1–12, 2016.

ATTARAT, J.; PHERMTHAI, T. Bioactive compounds in three edible *Lentinus* mushrooms. **Walailak Journal of Science and Technology**, v. 12, n. 6, p. 491–504, 2015.

AYAZ, F. A.; TORUN, H.; COLAK, A.; SESLI, E.; MILLSON, M.; GLEW, R. H. Macro- and microelement contents of fruiting bodies of wild-edible mushrooms growing in the East Black Sea Region of Turkey. **Food and Nutrition Sciences**, v. 2, n. 2, p. 53–59, 2011.

BADARINATH, A. V; RAO, K. M.; CHETTY, C. M. S.; RAMKANTH, S.; RAJAN, T. V. S.; GNANAPRAKASH, K. A review on In-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 2, p. 1276–1285, 2010.

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **Royal Society of Chemistry Advances.**, v. 5, n. 35, p. 27540–27557, 2015.

BAE, I. Y.; KIM, H. W.; YOO, H. J.; KIM, E. S.; LEE, S.; PARK, D. Y.; LEE, H. G. Correlation of branching structure of mushroom β -glucan with its physiological activities. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 195–200, 2013.

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, p. 191–203, 2006.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review. **J. of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BANG, T. H.; SUHARA, H.; DOI, K.; ISHIKAWA, H.; FUKAMI, K.; PARAJULI, G. P.; KATAKURA, Y.; YAMASHITA, S.; WATANABE, K.; ADHIKARI, M. K.; MANANDHAR, H. K.; KONDO, R.; SHIMIZU, K. Wild mushrooms in Nepal: some potential candidates as antioxidant and ACE-inhibition sources. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

BANO, Z.; RAJARATHNAM, S. Vitamin values of *Pleurotus* mushrooms. **Qual Plant Plant Foods Human Nutrition**, v. 36, p. 11-15, 1986.

BARROS, L.; BAPTISTA, P.; CORREIA, D. M.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B.; FERREIRA, I. C. F. R. Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 140–145, 2007a.

BARROS, L.; CRUZ, T.; BAPTISTA, P.; ESTEVINHO, L. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2742–2747, 2008a.

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, n. 6, p. 1076–1079, 2009.

BARROS, L.; FALCÃO, S.; BAPTISTA, P.; FREIRE, C.; VILAS-BOAS, M.; FERREIRA, I. C. F. R. Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 61–66, 2008b.

BARROS, L.; FERREIRA, M. J.; QUEIRÓS, B.; FERREIRA, I. C. F. R.; BAPTISTA, P. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 413–419, 2007b.

BECERRA, J.; FLORES, C.; MENA, J.; AQUEVEQUE, P.; ALARCÓN, J.; BITTNER, M.; HERNÁNDEZ, V.; HOENEISEN, M.; RUIZ, E.; SILVA, M. Antifungal and antibacterial activity of diterpenes isolated from wood extractables of Chilean *Podocarpaceae*. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 47, 2002.

BENTO, C.; CASARIL, K. Bioconversão de resíduos agroindustriais ligninocelulósicos por fungos causadores da podridão branca: uma alternativa à produção. **E-revista UNIOESTE**, v. 14, p. 151–180, 2012.

BENZIE, I. 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. 1, p. 70–76, 1996.

BERNAŚ, E.; JAWORSKA, G.; LISIEWSKA, Z. Edible mushrooms as a source of valuable nutritive constituents. **Acta Sci. Pol., Technol. Aliment**, v. 5, n. 1, p. 5–20, 2006.

BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; DE MELLO, J. C. P. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6852–6865, 2013.

BONONI, V. L.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R.; TRUFEM, S. F. B. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. 2^a ed. São Paulo: Ícone, 1999.

BOONSONG, S.; KLAYPRADIT, W.; WILAI PUN, P. Antioxidant activities of extracts from five edible mushrooms using different extractants. **Agriculture and Natural Resources**, v. 50, n. 2, p. 89–97, 2016.

BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA, M. J.; SIMÕES, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 19, n. 4, p. 256–65, 2013.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2, p. 455–475, 1960.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC Nº 272. Regulamento técnico para produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 de set. de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº. 398 de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03 de mai. de 1999.

BRUNS, R. E.; SCARMINO, I. S.; BARROS NETO, B. **Statistical design–chemometrics**. Amsterdam: Elsevier, 2006.

CAIRE-JUVERA, G.; VÁZQUEZ-ORTIZ, F. A.; GRIJALVA-HARO, M. I. Amino acid composition, score and in vitro protein digestibility of foods commonly consumed in Northwest Mexico. **Nutrición Hospitalaria**, v. 28, n. 2, p. 365–371, 2013.

CARNEIRO, A. a J.; FERREIRA, I. C. F. R.; DUEÑAS, M.; BARROS, L.; DA SILVA, R.; GOMES, E.; SANTOS-BUELGA, C. Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. **Food Chemistry**, v. 138, n. 4,

p. 2168–2173, 2013.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants , prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15–25, 2013.

CARVAJAL, A. E. S. S.; KOEHNLEIN, E. a.; SOARES, A. a.; ELER, G. J.; NAKASHIMA, A. T. a; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (*A.blazei*) and their antioxidant properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 493–499, 2012.

CARVALHO, L. M.; CARVALHO, F.; DE LOURDES BASTOS, M.; BAPTISTA, P.; MOREIRA, N.; MONFORTE, A. R.; DA SILVA FERREIRA, A. C.; DE PINHO, P. G. Non-targeted and targeted analysis of wild toxic and edible mushrooms using gas chromatography-ion trap mass spectrometry. **Talanta**, v. 118, p. 292–303, 2014.

ÇAYAN, F.; TEL, G.; DURU, M. E.; ÖZTÜRK, M.; TÜRKOĞLU, A.; HARMANDAR, M. Application of GC, GC-MSD, ICP-MS and spectrophotometric methods for the determination of chemical composition and In vitro bioactivities of *Chroogomphus rutilus*: the edible mushroom species. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 2, p. 449–458, 2014.

CHA, Y. J.; ALAM, N.; LEE, J. S.; LEE, K. R.; SHIM, M. J.; LEE, M. W.; KIM, H. Y.; SHIN, P. G.; CHEONG, J. C.; YOO, Y. B.; LEE, T. S. Anticancer and immunopotentiating activities of crude polysaccharides from *Pleurotus nebrodensis* on Mouse Sarcoma 180. **Mycobiology**, v. 40, n. 4, p. 236–243, 2012.

CHANG, S.-T.; MILES, P. G. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact**. 2^a ed. Washington: CRC, 2004.

CHANG, S. T. Overview of mushroom cultivation and utilization as functional foods. In: **Mushrooms as functional foods**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008.

CHANG, S. T.; WASSER, S. P. The Role of Culinary-Medicinal Mushrooms on Human Welfare with a Pyramid Model for Human Health. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 14, n. 2, p. 95–134, 2012.

CHEN, A. W. What is Shiitake? In: **Shiitake cultivation**. Seoul: MushWorld, 2005. p. 318.

CHEUNG, L. M.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, V. E. C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 249–255, 2003.

CHEUNG, P. C. Nutritional value and health benefits of mushrooms. In: **Mushrooms as functional foods**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008. p. 279.

CHEUNG, P. C. K. Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. **Food Science and Human Wellness**, v. 2, n. 3–4, p. 162–166, 2013.

CHOWDHURY, M. M. H.; KUBRA, K.; AHMED, S. R. Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in

Bangladesh. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 14, n. 8, p. 1–6, 2015.

COHEN, N.; COHEN, J.; ASATIANI, M. D.; VARSHNEY, V. K.; YU, H.-T.; YANG, Y.-C.; LI, Y.-H.; MAU, J.-L.; WASSER, S. P. Chemical composition and nutritional and medicinal value of fruit bodies and submerged cultured mycelia of culinary-medicinal higher basidiomycetes mushrooms. **International journal of medicinal mushrooms**, v. 16, n. 3, p. 273–91, 2014.

COLAK, A.; FAIZ, Ö.; SESLI, E. Nutritional composition of some wild edible mushrooms. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 25–31, 2009.

CRAFT, B. D.; KERRIHARD, A. L.; AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B. Phenol-based antioxidants and the In vitro methods used for their assessment. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, p. 148–173, 2012.

CUEVA, C.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; BILLS, G.; VICENTE, M. F.; BASILIO, A.; RIVAS, C. L.; REQUENA, T.; RODRÍGUEZ, J. M.; BARTOLOMÉ, B. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 5, p. 372–382, 2010.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313–7352, 2010.

DAS, K.; TIWARI, R. K. S.; SHRIVASTAVA, D. K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 2, p. 104–111, 2010.

DEEPALAKSHMI, K.; MIRUNALINI, S. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. **Journal of Biochemical Technology**, v. 5, n. 2, p. 718–726, 2014.

DENCE, C. W. Determination of lignin. In: **Methods in Lignin Chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p. 33–61.

DEV, R.; KUMAR, S.; SINGH, J.; CHAUHAN, B. Potential role of nutraceuticals in present scenerio: A review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 4, p. 26–28, 2011.

DHINGRA, D.; MICHAEL, M.; RAJPUT, H.; PATIL, R. T. Dietary fibre in foods: A review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 255–266, 2012.

DIAS, E. S. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 795–803, 2010.

DOĞAN, H. H. Evaluation of phenolic compounds, antioxidant activities and fatty acid composition of *Amanita ovoidea* (Bull.) Link. in Turkey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, n. 1, p. 87–93, 2013.

DUBOST, N. J.; OU, B.; BEELMAN, R. B. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v.

105, n. 2, p. 727–735, 2007.

EL-SHARNOUBY, G. A.; ALEID, S. M.; AL-OTAIBI, M. M. Nutritional quality of biscuit supplemented with wheat bran and date palm fruits (*Phoenix dactylifera* L.). **Food and Nutrition Sciences**, v. 2012, n. March, p. 322–328, 2012.

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.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. 2^a ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

ERJAVEC, J.; RAVNIKAR, M.; BRZIN, J.; GREBENC, T.; BLEJEC, A.; GOSAK, M. Z.; SABOTIC, J.; KOS, J.; DREO, T. Antibacterial activity of wild mushroom extracts on bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. **The American Phytopathological Society**, v. 100, n. 2, p. 453–464, 2016.

ESTRADA, A. E. R.; LEE, H. J.; BEELMAN, R. B.; JIMENEZ-GASCO, M. M.; ROYSE, D. J. Enhancement of the antioxidants ergothioneine and selenium in *Pleurotus eryngii* var. *Eryngii* basidiomata through cultural practices. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1597–1607, 2009.

FAO/WHO (2001). Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. **Human Vitamin and Mineral Requirements**. Rome: Food and Nutrition Division. p. 303. Available in: <http://www.fao.org/3/a-y2809e.pdf>.

FERNANDES, Â.; BARREIRA, J. C. M.; ANTONIO, A. L.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; MARTINS, A.; FERREIRA, I. C. F. R. Feasibility of electron-beam irradiation to preserve wild dried mushrooms: Effects on chemical composition and antioxidant activity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 22, p. 158–166, 2014.

FINIMUNDY, T. C.; DILLON, A. J. P.; HENRIQUES, J. A. P.; ELY, M. R. A review on general nutritional compounds and pharmacological properties of the *Lentinula edodes* mushroom. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, n. 12, p. 1095–1105, 2014.

FRIZON, N. T.; OLIVEIRA, G. A.; PERUSSELLO, C. A.; HOFFMANN-RIBANI, R. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 795–801, 2015.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Vitamins B1 and B2 contents in cultivated mushrooms. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 816–819, 2008.

GAITÁN-HERNÁNDEZ, R.; ESQUEDA, M.; GUTIERREZ, A.; BELTRÁN-GARCÍA, M. Quantitative changes in the biochemical composition of lignocellulosic residues during the vegetative growth of *Lentinula edodes*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 30–40, 2011.

GAITÁN-HERNÁNDEZ, R.; MATA, G. Cultivation of the edible mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) in pasteurized wheat straw - Alternative use of geothermal energy in Mexico. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, n. 4, p. 363–367, 2004.

GALANTE, F.; ARAÚJO, M. V. F. de. **Fundamentos de Bioquímica**. 2^a ed. São Paulo: Editora Rideel, 2014.

GALATO, D.; CKLESS, K.; SUSIN, M. F.; GIACOMELLI, C.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; SPINELLI, A. Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure-antioxidant activity. **Redox report: communications in free radical research**, v. 6, n. 4, p. 243–50, 2001.

GAN, C. H.; NURUL AMIRA, N. B.; ASMAH, R. Antioxidant analysis of different types of edible mushrooms (*Agaricus bisporous* and *Agaricus brasiliensis*). **International Food Research Journal**, v. 20, n. 3, p. 1095–1102, 2013.

GARCIA-SALAS, P.; MORALES-SOTO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8813–8826, 2010.

GAŞECKA, M.; MLECZEK, M.; SIWULSKI, M.; NIEDZIELSKI, P. Phenolic composition and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* enriched with selenium and zinc. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 5, p. 723–732, 2016.

GASIC, U.; KECKES, S.; DABIC, D.; TRIFKOVIC, J.; MILOJKOVIC-OPSENICA, D.; NATIC, M.; TEŠIC, Z. Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. **Food Chemistry**, v. 145, p. 599–607, 2014.

GOMES-DA-COSTA, S. M.; COIMBRA, L. B.; DA SILVA, E. S. Crescimento micelial de dois isolados de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, em resíduos ligninocelulósicos. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 30, n. 2, p. 191–196, 2008.

GONZÁLEZ-PALMA, I.; ESCALONA-BUENDÍA, H. B.; PONCE-ALQUICIRA, E.; TÉLLEZ-TÉLLEZ, M.; GUPTA, V. K.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; SORIANO-SANTOS, J. Evaluation of the antioxidant activity of aqueous and methanol extracts of *Pleurotus ostreatus* in different growth stages. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUL, p. 1–9, 2016.

GRÜNDEMANN, C.; GARCIA-KÄUFER, M.; SAUER, B. Comparative chemical and biological investigations of β -glucan-containing products from shiitake mushrooms. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 692–702, 2015.

GUO, X. hui; XIA, C. yan; TAN, Y. rong; CHEN, L.; MING, J. Mathematical modeling and effect of various hot-air drying on mushroom (*Lentinus edodes*). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, n. 1, p. 207–216, 2014.

GUTKOSKI, L. C.; BREHM, C. M.; SANTOS, E. Dos; MEZZOMO, N. Efeito de ingredientes na qualidade da massa de pão de forma congelada não fermentada durante o

armazenamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 460–467, 2005.

HAGEN, R. S.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid-chromatography of amino-acids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 6, p. 912–916, 1989.

HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S. V; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, p. 1–22, 2012.

HAN, S.; KIM, K.; LIM, K.; OH, T. Biological activity analysis of different solvent extracts from *Pleurotus ostreatus*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 8, n. 26, p. 1–8, 2015.

HELENO, S. a.; BARROS, L.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J. R. P.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I. C. F. R. Phenolic, polysaccharidic, and lipidic fractions of mushrooms from northeastern portugal: Chemical compounds with antioxidant properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4634–4640, 2012.

HELENO, S. A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J. R. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501–513, 2015.

HOELZ, L. V. B.; HORTA, B. A. C.; ALBUQUERQUE, M. G.; BICCA, R.; ALENCASTRO, D.; JANEIRO, R. De. Quantitative structure-activity relationships of antioxidant phenolic compounds. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. v. 2, n. 5, p. 291–306, 2010.

HSEU, Y.-C.; LEE, C.-C.; CHEN, Y.-C.; SENTHIL KUMAR, K. J.; CHEN, C.-S.; TSAI, C.-T.; HUANG, H.-C.; WANG, H.-M.; YANG, H.-L. *Antrodia salmonea* in submerged culture exhibits antioxidant activities in vitro and protects human erythrocytes and low-density lipoproteins from oxidative modification. **Food and Chemical Toxicology**, v. 66, p. 150–157, 2014.

HU, Q.; YU, J.; YANG, W.; MUINDE, B.; FANG, Y.; MA, N.; PEI, F. Identification of flavonoids from *Flammulina velutipes* and its neuroprotective effect on pheochromocytoma-12 cells. **Food Chemistry**, v. 204, p. 274–282, 2016.

HUFFMAN, D. M.; TIFFANY, L. H.; KNAPHUS, G.; HEALY, R. A. **Mushrooms and other Fungi of the Midcontinental United States**. 2^a ed. Iowa City: University of Iowa Press, 2008.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821–1835, 2011.

ILAIYARAJA, N.; LIKHITH, K. R.; SHARATH BABU, G. R.; KHANUM, F. Optimisation of extraction of bioactive compounds from *Feronia limonia* (wood apple) fruit using response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v. 173, p. 348–354, 2015.

JAWORSKA, G.; POGOŃ, K.; BERNAŚ, E.; DUDA-CHODAK, A. Nutraceuticals and antioxidant activity of prepared for consumption commercial mushrooms *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Food Quality**, v. 38, n. 2, p. 111–122, 2015.

JAWORSKA, G.; POGOŃ, K.; BERNAŚ, E.; SKRZYPCZAK, A.; KAPUSTA, I. Vitamins, phenolics and antioxidant activity of culinary prepared *Suillus luteus* (L.) Roussel mushroom. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 701–706, 2014.

JAYAKUMAR, T.; THOMAS, P. a.; GERALDINE, P. In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 228–234, 2009.

JAYAKUMAR, T.; THOMAS, P. A.; SHEU, J. R.; GERALDINE, P. In-vitro and in-vivo antioxidant effects of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Food Research Internationa**, v. 44, n. 4, p. 851–861, 2011.

JEENA, G. S.; PUNETHA, H.; PRAKASH, O.; CHANDRA, M.; KUSHWAHA, K. P. S. Study on in vitro antioxidant potential of some cultivated *Pleurotus* species (oyster mushroom). **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 5, n. 1, p. 56–61, 2014.

JIA, Z.; TANG, M.; WU, J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555–559, 1999.

JONATHAN, S.; NWOKOLO, V.; EKPO, E. Yield performance of *Pleurotus pulmonarius* (Fries.) quelet, cultivated on different agro-forest wastes in Nigeria. **World Rural Observations**, v. 5, n. 1, p. 22–30, 2013.

JUNIOR, N. M.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Obtenção de linhagens de *Lentinula edodes* resistentes a temperaturas elevadas e seleção de linhagens resistentes ao *Trichoderma* sp. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 34, p. 1640–1646, 2010.

KADNIKOVA, I. A.; COSTA, R.; KALENIK, T. K.; GURULEVA, O. N.; YANGUO, S. Chemical composition and nutritional value of the mushroom *Auricularia auricula-judae*. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 3, n. 8, p. 478–482, 2015.

KALÁČ, P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 9–16, 2009.

KALÁČ, P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 2, p. 209–218, 2013.

KALILI, K. M.; VILLIERS, A. de. Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 854–876, 2011.

KALOGEROPOULOS, N.; YANNI, A. E.; KOUTROTSIOS, G.; ALOUPI, M. Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesbos, Greece. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 378–385, 2013.

KAYODE, R. M. O.; OLAKULEHIN, T. F.; ADEDEJI, B. S.; AHMED, O.; ALIYU, T. H.; BADMOS, A. H. A. Evaluation of amino acid and fatty acid profiles of commercially cultivated oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) grown on gmelina wood waste. **Nigerian Food Journal**, v. 33, n. 1, p. 18–21, 2015.

KELEŞ, A.; KOCA, L.; GENÇCELEP, H. Antioxidant properties of wild edible mushrooms. **Journal of Food Processing & Technology**, v. 2, n. 6, p. 1–6, 2011.

KHATUN, S.; ISLAM, A.; CAKILCIOGLU, U.; GULER, P.; CHANDRA, N. Nutritional qualities and antioxidant activity of three edible oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.). **NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 72–73, p. 1–5, 2015.

KIKUZAKI, K.; HISAMOTO, M.; HIROSE, K.; AKIYAMA, K.; TANIGUCHI, H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2161–2168, 2002.

KIM, D.; LEE, C. Y. Comprehensive study on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 253–273, 2004.

KIM, J.-H.; KIM, S.-J.; PARK, H.-R.; CHOI, J.-I.; JU, Y.-C.; NAM, K.-C.; KIM, S.-J.; LEE, S.-C. The different antioxidant and anticancer activities depending on the color of oyster mushrooms. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 12, p. 1016–1020, 2009a.

KIM, M. Y.; CHUNG, M.; LEE, S. J.; AHN, J. K.; KIM, E. H.; KIM, M. J.; KIM, S. L.; MOON, H. I.; RO, H. M.; KANG, E. Y.; SEO, S. H.; SONG, H. K. Comparison of free amino acid, carbohydrates concentrations in Korean edible and medicinal mushrooms. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 386–393, 2009b.

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 of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7265–7270, 2008.

KOZARSKI, M. S.; KLAUS, A. S.; NIKŠIĆ, M. P.; GRIENSVEN, L. J. L. D. Van; VRVIĆ, M. M.; JAKOVLJEVIĆ, D. M. Polysaccharides of higher fungi: biological role, structure and antioxidative activity. **Hemijska industrija**, v. 68, n. 3, p. 305–320, 2014.

KUBE, L. C. Fisiologia da Fadiga, suas Implicações na Saúde do Aviador e na segurança na aviação. **Revista Conexão SIPAER**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2010.

LEE, S. H.; EOM, M. S.; YOO, K. S.; KIM, N. C.; JEON, J. K.; PARK, Y. K.; SONG, B. H.; LEE, S. H. The yields and composition of bio-oil produced from *Quercus Acutissima* in a bubbling fluidized bed pyrolyzer. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 83, n. 1, p. 110–114, 2008.

LIM, S. M.; YIM, H. S. Determination of optimal extraction time and temperature by Response Surface Methodology to obtain high-level antioxidant activity in culinary-

medicinal Oyster mushroom , *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) P . Kumm . (Higher Basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 14, n. 6, p. 593–602, 2012.

LIN, J.; LIU, C.; CHEN, Y.; HU, C.; JUANG, L.; SHIESH, C.; YANG, D. Chemical composition , antioxidant and anti-inflammatory properties for ethanolic extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting bodies harvested at different time. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 374–382, 2014.

LIU, J.; JIA, L.; KAN, J.; JIN, C. In vitro and in vivo antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 310–316, 2013a.

LIU, K.; WANG, J.; ZHAO, L.; WANG, Q. Anticancer, antioxidant and antibiotic activities of mushroom *Ramaria flava*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 375–380, 2013b.

LIU, Y.; DU, Y.; WANG, J.; ZHA, X.; ZHANG, J. Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharide isolated from Jinqian mushroom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 63–68, 2014a.

LIU, Y.; DU, Y.; WANG, J.; ZHA, X.; ZHANG, J. Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharide isolated from Jinqian mushroom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 63–68, 2014b.

LIU, Y. T.; SUN, J.; LUO, Z. Y.; RAO, S. Q.; SU, Y. J.; XU, R. R.; YANG, Y. J. Chemical composition of five wild edible mushrooms collected from Southwest China and their antihyperglycemic and antioxidant activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1238–1244, 2012b.

LIU, Z.; WANG, X. Postharvest biology and technology changes in color, antioxidant, and free radical scavenging enzyme activity of mushrooms under high oxygen modified atmospheres. **Postharvest Biology and Technology**, v. 69, p. 1–6, 2012.

LOU, Z.; WANG, H.; RAO, S.; SUN, J.; MA, C.; LI, J. *p*-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 550–554, 2012.

LU, X.; WEBB, M.; TALBOTT, M.; EENENNAAM, J. Van; PALUMBO, A.; LINARES-CASENAVE, J.; DOROSHOV, S.; STRUFFENEGGER, P.; RASCO, B. Distinguishing Ovarian Maturity of Farmed White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*) by Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A Potential Tool for Caviar Production Management. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4056–4064, 2010.

MACHADO, A. V.; PEREIRA, J. Efeito do escaldamento nas propriedades tecnológicas e reológicas da massa e do pão de queijo. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 34, n. 2, p. 421–427, 2010.

MADDOX, C. E.; LAUR, L. M.; TIAN, L. Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, v. 60, p. 53–58, 2010.

MAITY, P.; SAMANTA, S.; NANDI, A. K.; SEN, I. K.; PALOI, S.; ACHARYA, K.; ISLAM, S. S. Structure elucidation and antioxidant properties of a soluble beta-d-glucan from mushroom *Entoloma lividoalbum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 140–149, 2014.

MAJAZ, Q.; I, M. K.; NAZIM, S.; ASIR, Q.; SHOEB, Q. Nutraceuticals: importance and advances in medicine and health. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 4, p. 71–73, 2012.

MALLIKARJUNA, S. E.; RANJINI, a.; HAWARE, D. J.; VIJAYALAKSHMI, M. R.; SHASHIREKHA, M. N.; RAJARATHNAM, S. Mineral composition of four edible mushrooms. **Journal of Chemistry**, v. 2013, 2013.

MANUJA, R.; SACHDEVA, S.; JAIN, A.; CHAUDHARY, J. A Comprehensive Review on Biological Activities of P-Hydroxy Benzoic Acid and Its Derivatives. **International journal of pharmacy science**, v. 22, n. 2, p. 109–115, 2013.

MIRA, G. S.; GRAF, H.; CÂNDIDO, L. M. B. Visão retrospectiva em fibras alimentares com ênfase em beta-glucanas no tratamento do diabetes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 11–20, 2009.

MIRCEA, C.; CIOANCĂ, O.; IANCU, C.; TĂȚĂRÎNGĂ, G.; HANCIANU, M. In vitro antioxidant activity of some extracts obtained from *Agaricus bisporus* brown, *Pleurotus ostreatus* and *fomes fomentarius*. **Farmacia**, v. 63, n. 6, p. 927–933, 2015.

MISHRA, K. K.; PAL, R. S.; ARUNKUMAR, R.; CHANDRASHEKARA, C.; JAIN, S. K.; BHATT, J. C. Antioxidant properties of different edible mushroom species and increased bioconversion efficiency of *Pleurotus eryngii* using locally available casing materials. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1557–1563, 2013.

MISHRA, K. K.; PAL, R. S.; BHATT, J. C. Comparison of antioxidant properties in cap and stipe of *Lentinula edodes* - A medicinal mushroom. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 27, n. 7, p. 562–569, 2015.

MONIRA, S.; HAQUE, S.; MUHIT, A.; ALAM, A. H. M. .; RAHMAN, A.; KHONDAR, P. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic properties of *Hypsizygus tessulatus* cultivated in Bangladesh. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 6, p. 300–308, 2012.

MONTOYA-MARTÍNEZ, C.; NOLASCO-SORIA, H.; CARRILLO-FARNÉS, O.; CIVERA-CERECEDO, R.; ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, C.; VEGA-VILLASANTE, F. Chemical score of different protein sources to four *Macrobrachium* species. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 4, p. 835–844, 2016.

MOON, J.-K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1655–1666, 2009.

MORADALI, M.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S.; HEDJAROUDE, G. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 701–724, 2007.

MUJIC, I.; ZEKOVIC, Z.; LEPOJEVIC, Z.; VIDOVIC, S.; ZIVKOVIC, J. Antioxidant properties of selected edible mushroom species. **Journal Central European Agriculture**, v. 11, n. 4, p. 387–392, 2010.

MUKHOPADHYAY, R.; GUHA, A. K. A comprehensive analysis of the nutritional quality of edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* grown in deproteinized whey medium. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 339–345, 2015.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, v. 1054, p. 95–111, 2004.

NEDELKOSKA, D. N.; PANCEVSKA, N. A.; AMEDI, H.; VELESKA, D.; IVANOVA, E.; KARADELEV, M.; KUNGULOVSKI, D. Screening of antibacterial and antifungal activities of selected Macedonian wild mushrooms. **Journal of Natural Sciences**, v. 124, p. 333–340, 2013.

NOGUEIRA, A. R.; SOUZA, G. B. **Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Animal e Alimentos**. São Carlos: Embrapa, 2005.

NOIPA, T.; SRIJARANAI, S.; TUNTULANI, T.; NGEONTAE, W. New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 798–806, 2011.

NOWACKA, N.; NOWAK, R.; DROZD, M.; OLECH, M.; LOS, R.; MALM, A. Analysis of phenolic constituents, antiradical and antimicrobial activity of edible mushrooms growing wild in Poland. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 689–694, 2014.

OKE, F.; ASLIM, B. Protective effect of two edible mushrooms against oxidative cell damage and their phenolic composition. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 613–619, 2011.

OLIVEIRA, D. A.; ANGONESE, M.; GOMES, C.; FERREIRA, S. R. S. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 55–62, 2016.

OWAID, M. N.; AL-SAEEDI, S. S. S.; AL-ASSAFFII, I. A. A. Antimicrobial activity of mycelia of Oyster mushroom species (*Pleurotus* spp.) and their liquid filtrates (*In vitro*). **Journal of Medical and Bioengineering**, v. 4, n. 5, p. 376–380, 2015.

OYETAYO, V. O. Free radical scavenging and antimicrobial properties of extracts of wild mushrooms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 380–386, 2009.

ÖZÇELİK, E.; PEKSEN, A. Hazelnut husk as a substrate for the cultivation of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*). **Bioresource Technology**, v. 98, n. 14, p. 2652–2658, 2007.

ÖZYÜREK, M.; BENER, M.; GÜÇLÜ, K.; APAK, R. Antioxidant/antiradical properties of microwave-assisted extracts of three wild edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 157, p. 323–331, 2014.

PADOVANI, R. M.; AMAYA-FARFÁN, J. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais dietary reference intakes: application of tables in nutritional studies. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 741–760, 2006.

PALACIOS, I.; LOZANO, M.; MORO, C.; ARRIGO, M.; ROSTAGNO, M. A.; MARTÍNEZ, J. A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 674–678, 2011.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Res. International**, v. 39, p. 791–800, 2006.

PHAT, C.; MOON, B.; LEE, C. Evaluation of umami taste in mushroom extracts by chemical analysis , sensory evaluation , and an electronic tongue system. **Food Chemistry**, v. 192, p. 1068–1077, 2016.

PHILIPPOUSSIS, A.; DIAMANTOPOULOU, P.; ISRAILIDES, C. Productivity of agricultural residues used for the cultivation of the medicinal fungus *Lentinula edodes*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 59, n. 3, p. 216–219, 2007.

PICCININ, E.; PIERO, R. M. Di; PASCHOLATI, S. F. Cogumelo “Shiitake” (*Lentinula edodes*) reduz o crescimento de fitopatógenos e a severidade de manchas foliares em sorgo. **Summa Phytopathologica**, v. 1, n. 1, p. 68–72, 2010.

PILLAI, T. G.; DEVI, P. U. Mushroom beta glucan: Potential candidate for post irradiation protection. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 751, n. 2, p. 109–115, 2013.

PINELO, M.; RUBILAR, M.; JEREZ, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. J. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2111–2117, 2005.

PREETI, A.; PUSHPA, S.; SAKSHI, S.; JYOTI, A.; CHEMISTRY, P.; PHARMACY, M. M. C. O. Antioxidant mushrooms: a review. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 6, p. 65–70, 2012.

PUTTARAJU, N. G.; VENKATESHAIAH, S. U.; MALLAIAH, S.; MYSORE, S.; URS, N.; SOMASUNDARAM, R. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. p. 9764–9772, 2006.

RADZKI, W.; SLAWINSKA, A.; JABLONSKA-RYS, E.; MICHALAK-MAJEWSKA, M. Effect of blanching and cooking on antioxidant capacity of cultivated edible mushrooms: A comparative study. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 2, p. 599–605, 2016.

RASHIDI, A. N. M.; YANG, T. A. Nutritional and antioxidant values of oyster mushroom (*P. sajor-caju*) cultivated on Rubber Sawdust. **International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology**, v. 6, n. 2, p. 161–164, 2016.

RAYA, M. A. A.; SHALABY, M. T.; HAFEZ, S. A.; ALSHIMAA, M. H. Chemical composition and nutritional potential of some mushroom varieties cultivated in Egypt. **Journal of Food and Dairy Science**, v. 5, n. 6, p. 421–434, 2014.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

REGINA, M.; BROETTO, F.; GIOVANNOZZI-SERMANNI, G.; MARABOTINI, R.; PERANNI, C. Influence of stationary and bioreactor cultivation on *Lentinula edodes* (Berk) Pegler lignocellulolytic activity. **Brazilian Arch. of Biol. and Tech.**, v. 51, p. 223–233, 2008.

REGINA, M.; BROETTO, F.; GIOVANNOZZI-SERMANNI, G.; MARABOTINI, R.; PERANNI, C.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Atividade de enzimas oxidativas do *Lentinula edodes* em substratos agroindustriais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 4, p. 881–888, 2009.

REGUŁA, J.; SIWULSKI, M. Dried Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms as a good source of nutrient. **ACTA Acta Sci. Pol., Technol. Aliment**, v. 6, n. 4, p. 135–142, 2007.

REIS, F. S.; BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; ČIRIĆ, A.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D.; SOKOVIĆ, M.; FERREIRA, I. C. F. R. The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant, antibacterial, antifungal and antihuman tumor cell lines properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 91–98, 2013.

REIS, F. S.; BARROS, L.; MARTINS, A.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 191–197, 2012a.

REIS, F. S.; BARROS, L.; SOUSA, M. J.; MARTINS, A.; FERREIRA, I. C. F. R. Analytical methods applied to the chemical characterization and antioxidant properties of three wild edible mushroom species from Northeastern Portugal. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 3, p. 645–652, 2014.

REIS, F. S.; MARTINS, A.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between in vivo and in vitro samples. **Food Chem. Toxicology**, v. 50, p. 1201–1207, 2012b.

REN, L.; HEMAR, Y.; PERERA, C. O.; LEWIS, G.; KRISANSSEN, G. W.; BUCHANAN, P. K. Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 3, n. 2, p. 41–51, 2014.

REN, L.; PERERA, C.; HEMAR, Y. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. **Food & Function**, v. 3, n. 11, p. 1118, 2012.

RIBEIRO, B.; GUEDES DE PINHO, P.; ANDRADE, P. B.; BAPTISTA, P.; VALENTÃO, P. Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study. **Microchemical Journal**, v. 93, n. 1, p. 29–35, 2009.

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, n. 1, p. 47–56, 2008.

RIBEIRO, B.; RANGEL, J.; VALENTÃO, P.; BAPTISTA, P.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B. Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried Portuguese wild edible mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8530–8537, 2006.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure - Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.

RIJKE, E. De; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; TH, U. A. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography**, v. 1112, p. 31–63, 2006.

RIPPS, H.; SHEN, W. Review: taurine: a “very essential” amino acid. **Molecular vision**, v. 18, n. November, p. 2673–2686, 2012.

ROBBINS, R. J. Phenolic acids in foods : an overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2866–2887, 2003.

ROP, O.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. **Nutrition Reviews**, v. 67, p. 624–631, 2009.

ROSLI, W. I. W.; MAIHIZA, M. S. N.; RAUSHAN, M. The ability of oyster mushroom in improving nutritional composition , β -glucan and textural properties of chicken frankfurter. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 1, p. 311–317, 2015.

RUTHES, A. C.; SMIDERLE, F. R.; IACOMINI, M. D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 753–761, 2015.

SÁNCHEZ-RANGEL, J. C.; BENAVIDES, J.; HEREDIA, J. B.; CISNEROS-ZEVALLHOS, L.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. **Analytical Methods**, v. 5, p. 5990–5999, 2013.

SÁNCHEZ, C. Modern aspects of mushroom culture technology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 756–762, 2004.

SARMENTO, F.; BERNAUD, R.; RODRIGUES, T. C. Fibra alimentar – Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. **Arq Bras Endocr. Metab**, v. 57, p. 397–405, 2013.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Química, 1974.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Revisiting the polar paradox theory: a critical overview. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 59. p. 3499–3504, 2011.

SHANG, X.; ENKHTAIVAN, G.; CHUN, S.; GOPAL, J.; KEUM, Y. S. Transubstantiating commercial mushroom market with ultrasonically ultrasized mushroom powders showcasing higher bioactivity. **Int. J. of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 1082–1094, 2016.

SHARMA, A. K.; JANA, A. M.; SRIVASTAV, A.; GUPTA, M.; SHARMA, S.; GILL, S. S. Antimicrobial properties of some edible mushrooms: a review. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, p. 1009-1023, 2014.

SILVA, F. C. **Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes**. Brasília: Embrapa, 1999.

SILVÉRIO, F. O.; BARBOSA, L. C. de A.; GOMIDE, J. L.; REIS, F. P.; PILÓ-VELOSO, D. Metodologia de extração e determinação do teor de extrativos em madeiras de eucalipto. **Revista Árvore**. p. 1009–1016, 2006.

SINGLETON, V.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SKINNER, M.; HUNTER, D. **Bioactives in Fruit: Health Benefits and Functional Foods**. New Delhi: John Wiley & Sons, 2013.

SMIDERLE, F. R.; BAGGIO, C. H.; BORATO, G.; SANTANA-FILHO, A. P.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; GRIENSVEN, L. J. L. D. Van. Anti-inflammatory properties of the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* might be related to its linear (1-3)- β -D-Glucan. **Plos One**. v. 9, n. 10, p. 1–11, 2014.

SMOLSKAITÉ, L.; VENSKUTONIS, P. R.; TALOU, T. Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 462–471, 2015.

SOARES, A. A.; SÁ-NAKANISHI, A. B. De; BRACHT, A.; COSTA, S. M. G. da; KOEHNLEIN, E. A.; SOUZA, C. G. M. de; PERALTA, R. M. Hepatoprotective effects of mushrooms. **Molecules**, v. 18, p. 7609–7630, 2013.

SRIVIDYA, A. R.; VENKATESH, N.; VISHNUVARTHAN, V. J. Nutraceutical as medicine. **Pharmanest**, v. 1, n. 2, p. 132–145, 2010.

STALIKAS, C. D. Review Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**. v. 30, p. 3268–3295, 2007.

STEFAN, R. I.; VAMANU, E.; ANGELESCU, G. C. Antioxidant Activity of Crude Methanolic Extracts from *Pleurotus ostreatus*. **Research Journal of Phytochemistry**, v. 9, n. 1, p. 25–32, 2015.

STOJKOVIC, D.; REIS, F. S.; BARROS, L.; GLAMOCLIIJA, J.; CIRIC, A.; VAN GRIENSVEN, L. J. I. D.; SOKOVIC, M.; FERREIRA, I. C. F. R. Nutrients and non-nutrients composition and bioactivity of wild and cultivated *Coprinus comatus* (O.F.Müll.) Pers. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 289–296, 2013.

SUDHEEP, N. M.; SRIDHAR, K. R. Nutritional composition of two wild mushrooms consumed by the tribals of the Western Ghats of India. **Mycology**, v. 5, n. 2, p. 64–72, 2014.

SUN, L.; LIU, Q.; BAO, C.; FAN, J. Comparison of free total amino acid compositions and their functional classifications in 13 wild edible mushrooms. **Molecules**, v. 22, p. 1–10, 2017.

SYNYTSYA, A.; MÍČKOVÁ, K.; SYNYTSYA, A.; JABLONSKÝ, I.; SPĚVÁČEK, J.; ERBAN, V.; KOVÁŘÍKOVÁ, E.; ČOPÍKOVÁ, J. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 4, p. 548–556, 2009.

TAOFIQ, O.; HELENO, S. A.; CALHELHA, R. C.; ALVES, M. J.; BARROS, L.; BARREIRO, M. F.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Development of mushroom-based cosmeceutical formulations with anti-inflammatory, anti-tyrosinase, antioxidant, and antibacterial properties. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1–12, 2016.

TEKLIT, G. A. Chemical composition and nutritional value of the most widely used mushrooms cultivated in Mekelle Tigray Ethiopia. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 5, n. 5, p. 1–3, 2015.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, 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.

TIBUHWA, D. D. A Comparative study of antioxidant activities between fresh and dry mushrooms in the genera *Cantharellus* and *Afrocantharellus* from Tanzania. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 212–221, 2014.

TOMA, F. M.; ISMAEL, H. M.; ABDULLA, N. Q. F. Survey and identification of mushrooms in Erbil Governorate. **Research Journal of Environmental and Earth Sciences**, v. 5, n. 5, p. 262–266, 2013.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. Sulfur containing amino acids and human disease. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 58, p. 47–55, 2004.

TRUMBO, P.; SCHLICKER, S.; YATES, A. A.; POOS, M. Dietary reference intakes for energy carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 102, n. 11, p. 1621–1630, 2002.

TSAI, S.; HUANG, S.; LO, S.; WU, T.; LIAN, P.; MAU, J. Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 578–584, 2009.

TSAI, S.; MAU, J.; HUANG, S. Enhancement of antioxidant properties and increase of content of vitamin D₂ and non-volatile components in fresh button mushroom, *Agaricus bisporus* (Higher Basidiomycetes) by γ -irradiation. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 16, n. 2, p. 137–147, 2014.

ULZIJARGAL, E.; MAU, J.-L. Nutrient compositions of culinary-medicinal mushroom fruiting bodies and mycelia. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 13, n. 4, p. 343–349, 2011.

USDA. **Natural Resources Conservation Service**. *Quercus acutissima*. Disponível em: <<http://plants.usda.gov/java/charProfile?symbol=QUAC80>>. Acesso em fevereiro de 2017.

VALKO, 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 & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VALVERDE, M. E.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T.; PAREDES-LÓPEZ, O. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. **International Journal of Microbiology**, p. 1–14, 2015.

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. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 343–346, 2011a.

VAZ, J. a.; BARROS, L.; MARTINS, A.; SANTOS-BUELGA, C.; VASCONCELOS, M. H.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 610–616, maio 2011b.

VELIKA, B.; KRON, I. Antioxidant properties of benzoic acid derivatives against superoxide radical. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 4, p. 62–67, 2012.

VETTER, J. Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 6–9, 2007.

VIEIRA, P. A. F.; GONTIJO, D. C.; VIEIRA, B. C.; FONTES, E. A. F.; ASSUNÇÃO, L. S. de; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, M. G. de A.; KASUYA, M. C. M. Antioxidant activities, total phenolics and metal contents in *Pleurotus ostreatus* mushrooms enriched with iron, zinc or lithium. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 421–425, 2013.

VIKINESWARY, S.; CHANG, S. T. Edible and medicinal mushrooms for sub-health intervention and prevention of lifestyle disease. **Tech. Trends**, v. Jul-Set, p. 33–43, 2013.

VILLARES, A.; MATEO-VIVARACHO, L.; GUILLAMÓN, E. Structural features and healthy properties of polysaccharides occurring in mushrooms. **Agriculture**, v. 2, n. 4, p.

452–471, 2012.

WANG, W.; LIU, J.; ZHUANG, X.; QI, W.; YU, Q.; WANG, Q.; YUAN, Z. Reuse of enzymatic hydrolyzed residues from sugarcane bagasse to cultivate *Lentinula edodes*. **Bioresources**, v.8, p. 3017-3026, 2013.

WANG, X. M.; ZHANG, J.; WU, L. H.; ZHAO, Y. L.; LI, T.; LI, J. Q.; WANG, Y. Z.; LIU, H. G. A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. **Food Chemistry**, v. 151, p. 279–285, 2014.

WANI, B. A.; BODHA, R. H.; WANI, A. H. Nutritional and medicinal importance of mushrooms. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 24, p. 2598–2604, 2010.

WASSER, S. P. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2010.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170–177, 1986.

WHO/FAO/UNU. Protein and amino acid requirements in human nutrition. **World Health Organization technical report series**, n. 935, p. 1–265, 2007.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature protocols**, v. 3, n. 2, p. 163–75, 2008.

WOLDEGIORGIS, A. Z.; ABATE, D.; HAKI, G. D.; ZIEGLER, G. R. Antioxidant property of edible mushrooms collected from Ethiopia. **Food Chemistry**, v. 157, p. 30–36, 2014.

WOLDEGIORGIS, A. Z.; ABATE, D.; HAKI, G. D.; ZIEGLER, G. R.; HARVATINE, K. J. Fatty acid profile of wild and cultivated edible mushrooms collected from Ethiopia. **Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 5, n. 3, 2015.

WONG, F.-C.; CHAI, T.-T.; TAN, S.-L.; YONG, A.-L. Evaluation of bioactivities and phenolic content of selected edible mushrooms in Malaysia. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 6, p. 1011–1016, 2013.

WOŹNICKA, E.; KUŹNIAR, A.; NOWAK, D.; NYKIEL, E.; KOPACZ, M.; GRUSZECKA, J.; GOLEC, K. Comparative study on the antibacterial activity of some flavonoids and their sulfonic derivatives. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 70, n. 3, p. 567–571, 2013.

XIAO, G.; ZHANG, M.; SHAN, L.; YOU, Y.; SALOKHE, V. M. Extension of the shelf-life of fresh oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) by modified atmosphere packaging with chemical treatments. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 46, p. 9509–9517, 2011.

YAHIA, E. M.; GUTIÉRREZ-OROZCO, F.; MORENO-PÉREZ, M. A. Identification of phenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in seventeen species of

wild mushrooms in Central Mexico and determination of their antioxidant activity and bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 226, p. 14–22, 2017.

YANG, J.; LIN, H.; MAU, J. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. **Food Chemistry**, v. 77, p. 229–235, 2002.

YASOUBI, P.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M. A.; AZIZI, M. H. Total Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Extracts. **J. Agric. Sci. Technol**, v. 9, p. 35–42, 2007.

YE, Y.; TANG, X. S.; CHEN, F.; TANG, L. Optimization of phenolics extracted from *Idesia polycarpa* defatted fruit residue and its antioxidant and depigmenting activity in vitro and in vivo. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–12, 2014.

YILDIZ, O.; CAN, Z.; LAGHARI, A. Q.; SAHIN, H.; MALKOÇ, M. WILD EDIBLE Mushrooms as a natural source of phenolics and antioxidants. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, p. 148–154, 2015.

YILMAZ, A.; YILDIZ, S.; TABBOUCHE, S.; KILIÇ, A. O.; CAN, Z. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial properties of *Pleurotus ostreatus* grown on lime (*Tilia Tomentosa*) leaves. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 119–124, 2016.

YIM, H. S.; CHYE, F. Y.; KOO, S. M.; MATANJUN, P.; HOW, S. E.; HO, C. W. Optimization of extraction time and temperature for antioxidant activity of edible wild mushroom, *Pleurotus porrigens*. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 2, p. 235–242, abr. 2012.

YIM, H. S.; CHYE, F. Y.; RAO, V. Optimization of extraction time and temperature on antioxidant activity of *Schizophyllum commune* aqueous extract using response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. April, p. 275–283, 2013.

ZENG, X.; SUWANDI, J.; FULLER, J.; DORONILA, A.; NG, K. Antioxidant capacity and mineral contents of edible wild Australian mushrooms. **Food Science and Technology International**, v. 18, n. 4, p. 367–379, 2012.

ZHANG, Y. Y.; FANG, Y. M.; YU, M. K.; LI, X. X.; XIA, T. Molecular characterization and genetic structure of *Quercus acutissima* germplasm in China using microsatellites. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 6, p. 4083–4090, 2013.

ZHU, F.; DU, B.; BIAN, Z.; XU, B. Beta-Glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 165–173, 2015.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; BETA, T. Multi-response optimization of phenolic antioxidants from white tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze) and their identification by LC-DAD-Q-TOF-MS/MS. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 897–907, 2016.

ZOU, Y.; JIANG, A.; TIAN, M. Extraction optimization of antioxidant polysaccharides from *Auricularia auricula* fruiting bodies. **Food Science and Technology**, p. 1–6, 2015.