



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANNA BEATRIZ SABINO FERRARI

**ANÁLISE QUÍMICA DO COGUMELO *AGARICUS*
SUBRUFESCENS CULTIVADO COM DIFERENTES
SUPLEMENTOS ARTESANAIS E COMERCIAIS**

Londrina
2018

ANNA BEATRIZ SABINO FERRARI

**ANÁLISE QUÍMICA DO COGUMELO *AGARICUS*
SUBRUFESCENS CULTIVADO COM DIFERENTES
SUPLEMENTOS ARTESANAIS E COMERCIAIS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dra. Maria Luiza Zeraik

Londrina
2018

ANNA BEATRIZ SABINO FERRARI

**ANÁLISE QUÍMICA DO COGUMELO *AGARICUS SUBRUFESCENS*
CULTIVADO COM DIFERENTES SUPLEMENTOS ARTESANAIS E
COMERCIAIS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dra. Maria Luiza Zeraik
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Adriana Lourenço Soares
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 11 de dezembro de 2018.

Dedico este trabalho ao meu pai Ademir e minha mãe Hilda por terem acreditado e me apoiado durante toda esta trajetória e à todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais Ademir e Hilda por terem sido a minha base durante toda a trajetória da minha vida, e por terem me apoiado e incentivado a seguir meus sonhos.

À minha orientadora Dra. Maria Luiza por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho, por ter acreditado no meu potencial e por todos os ensinamentos que ela me proporcionou durante este dois anos de mestrado.

Ao Dr. Diego Cunha Zied pela produção das amostras estudadas, bem como, por ter me permitido dar continuidade ao seu trabalho, e a sua aluna Cinthia Cardoso, por ter esclarecido as minhas dúvidas quando necessário.

À minha colaboradora Helena M. Russo por toda paciência, amizade e ensinamentos, além da dedicação impecável a este trabalho.

À Dra. Vanderlan pela oportunidade de realização de um estágio de 6 meses em seu laboratório juntamente com o grupo de pesquisa NuBBE.

À professora Ieda por todo apoio e ensinamento referente à matéria de quimiometria, bem como ao seu laboratório (LQCN- Laboratório de quimiometria em Ciências Naturais) por todo suporte dado a esta pesquisa.

Aos meus colegas da Universidade estadual de Londrina, em especial aos integrantes do grupo de pesquisa Labfitobio: Giselle, Marcela, Tamires, Elisa, Suellen, George e a técnica Ivanira por terem sido mais que colegas e terem tornado esta jornada mais leve e prazerosa.

Aos meus colegas do Instituto de Química da Unesp em Araraquara-SP, pela parceria e colaboração com este trabalho, mas também por terem me acolhido de forma amorosa e terem feito com que eu me sentisse em casa.

Gostaria de agradecer também ao programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina e a todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica e que foram essenciais para que eu concluísse esta etapa da minha vida. Em especial ao professor Admilton e a professora Adriana por aceitarem o convite para participarem da minha banca de defesa e contribuir com este trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

FERRARI, Anna Beatriz Sabino. **Análise química do cogumelo *Agaricus subrufescens* cultivado com diferentes suplementos artesanais e comerciais.** 2018. 110 f. Dissertação (Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

O cogumelo *Agaricus subrufescens* é mundialmente conhecido devido a presença de algumas substâncias bioativas e ao seu alto valor nutricional que pode ser potencializado com a adição de alguns tipos de suplementos. Desta forma o objetivo deste trabalho foi determinar a composição química, atividade antioxidante e fenóis totais das três diferentes linhagens do cogumelo *A. subrufescens* [originárias do Japão (JP), Brasil (ABZ) e Bélgica (T2)] cultivadas com diferentes tipos de suplementos artesanais (com e sem adição de formol) produzidos a partir de resíduos industriais: amendoim (casca de vagem e amendoim), fruta (resíduos de acerola), combinação (farelo de soja, milho, trigo e algodão) e mistura (33,3% de cada suplemento artesanal), além de suplementos comerciais: setas e champfood. O estudo da composição química foi realizado de acordo com os métodos descritos pela Associação Oficial de Métodos Analíticos (AOAC) e o perfil cromatográfico dos extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV/DAD). Para o tratamento de dados foi utilizada a técnica quimiométrica de análise de fatores (AF). A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo método de DPPH^{*}, do poder de redução do ferro (FRAP) e pela capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), e o teste de fenóis totais foi realizado pelo método de *Folin-Ciocalteu*. A proposta de identificação das substâncias foi feita utilizando a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM/EM). A AF da composição química demonstrou que as linhagens ABZ e T2 possuem maiores correlações com os teores de fibras e proteínas em comparação às amostras da linhagem JP. Já em relação ao perfil cromatográfico do extrato acetato de etila a AF demonstrou que os cogumelos suplementados com mistura formol e mistura apresentaram semelhança entre as amostras cultivadas com os suplementos comerciais *champfood* e setas para as três linhagens. Para a capacidade redutora do DPPH^{*} o extrato mais ativo foi apresentado pela linhagem T2 suplementada pelo suplemento fruta formol (55,89 ± 2,06 mg EAG/100g); pelos métodos FRAP e ORAC os mais potentes resultados foram obtidos para linhagem ABZ com a suplementação do comercial setas (242,86 ± 37,40 mg EAG/100g e 5,95 ± 0,58 g EAG/100g, respectivamente), estaticamente iguais aos valores obtidos com o suplemento artesanal mistura (155,02 ± 25,00 mg EAG/100g e 5,40 ± 0,36 g EAG/100g). A linhagem ABZ também apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais. Através da análise de CL-EM/EM do extrato hidroalcoólico foi possível a identificação de cinco substâncias, dentre as quais destacou-se o ácido *p*-cumárico por possuir atividade antioxidante relatada na literatura. Já em relação ao extrato acetato de etila foram identificadas sete substâncias, sendo que a esculetina relatada pela primeira vez no cogumelo *A. subrufescens*. Assim, verificou-se que os suplementos artesanais são uma alternativa viável aos comerciais e que o tipo de suplementação influencia significativamente na composição final das diferentes linhagens de *A. subrufescens* estudadas, sendo que, a linhagem ABZ destacou-se por apresentar resultados promissores com o suplemento artesanal mistura.

Palavras-chave: *A. subrufescens*. Suplementação. Antioxidantes. Quimiometria.

FERRARI, Anna Beatriz Sabino. **Chemical analysis of the *Agaricus subrufescens* mushroom grown with different handmade and comercial supplements**. 2018. 110 p. Dissertação (Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

The mushroom *Agaricus subrufescens* is known worldwide due to the presence of some bioactive compounds and its high nutritional value that can be enhanced with the addition of some types of supplements. The aim of this work was to determine the chemical composition, antioxidant activity and total phenols of the three different strains of the *A. subrufescens* mushroom [from Japan (JP), Brazil (ABZ) and Belgium (T2)] cultivated with different types of supplements (with and without added formaldehyde), produced from industrial waste: peanut (grain or nut and peanut), fruit (acerola residues), combination (soybean meal, corn, wheat and cotton) and blend (33.3% of each handmade supplement), in addition to commercial supplements: setas and champfood. The study of chemical composition was performed according to the methods described by the Official Association of Analytical Methods (AOAC) and the chromatographic profile of the extracts were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC-UV/DAD). For the data treatment, the chemical factor analysis (FA) technique was applied. The antioxidant capacity of the extracts was evaluated by the DPPH method, ferric reducing anti-oxidant power (FRAP) and the oxygen radical absorption capacity (ORAC), and the total phenol test was performed by the Folin-Ciocalteu method. The compounds identification proposal was carried out using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS). The FA of the chemical composition showed that the ABZ and T2 strains have higher correlations with the fiber and protein contents compared to the sample JP strain. In relation to the chromatographic profile of the ethyl acetate extract, the FA showed that the mushrooms supplemented with formaldehyde mixture and mixture presented similarity between the samples cultured with the commercial supplements champfood and setas for the three strains. For the scavenging ability of DPPH• the most active extract was presented by the T2 strain supplemented with the formalin supplement (55.89 ± 2.06 mg GAE / 100g), by the FRAP and ORAC assays the most potencies were developed for the ABZ strain with commercial supplementation Setas (242.86 ± 37.40 mg GAE / 100 g and 5.95 ± 0.58 g GAE / 100 g, respectively) were statistically the same as those obtained by the FRAP and ORAC methods, (155.02 ± 25.00 mg EAG \ 100g and 5.40 ± 0.36 g GAE \ 100g). The ABZ strain also showed the highest total phenolic compounds content. Through the analysis by LC-MS/MS of the hydroalcoholic extract it was possible to identify five compounds, among which the *p*-coumaric acid was outstanding because it has antioxidant activity reported in the literature. In relation to the ethyl acetate extract, seven compounds were identified, and esculetin was reported in the *A. subrufescens* mushroom for the first time. Thus, it was verified that the handmade supplements are a viable alternative to the commercial ones and the type of supplementation influences significantly in the final composition of the different strains of *A. subrufescens* studied, being that the ABZ strain highlighted to present promising results with the handmade supplement blend.

Key words: *A. subrufescens*. Supplementation. Antioxidants. Chemometric.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - *Agaricus subrufescens* . (A) Basidiocarpo; (B) Véu parcial esbranquiçado.....17
- Figura 2** – (a) *Agaricus subrufescens in natura* para consumo; (b) *Agaricus subrufescens* industrializado e preparado em cápsulas prontas para consumo.27
- Figura 3** - Reação de um flavonoide com um radical livre (R^{*}).29
- Figura 4** - Representação gráfica de uma matriz X (3x4) com as correlações entre o tempo de retenção de um cromatógrafo em minutos (Temp) *vs* os sinais de absorbância obtidos (Abs) medidos em três experimentos (Exp) diferentes.30
- Figura 5** - Fluxograma dos processos de extração dos metabólitos secundários do *Agaricus subrufescens*.43
- Figura 6** - Gráfico de *loading* do Fator 1 *versus* Fator 3 obtido através do estudo da análise química das amostras de *Agaricus subrufescens*.53
- Figura 7** - Gráfico de *scores* do Fator 1 *versus* Fator 3 obtido através do estudo da análise química das amostras de *Agaricus subrufescens*.*53
- Figura 8** - Perfis cromatográficos (CLAE-UV/DAD) em $\lambda = 280$ nm dos extratos realizados com a amostra “0” extraídos com diferentes tipos de solventes: (a) Água 100%; (b) Etanol 80%; (c) Metanol 100%; (d) Etanol 100%; (e) Acetato de etila 100%. Fase móvel: Acetonitrila (fase B) e água Milli-Q (fase A), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. Coluna Phenomenex® C₁₈-Luna (250 x 4,6 mm, d.i.; 5 μ m), vazão de 1 mL min⁻¹. Gradiente exploratório: 5-100% B em 40 minutos.58

Figura 9 - Perfis cromatográficos (CLAE-DAD) em $\lambda = 280$ nm dos extratos (a) Metanol 100%; (b) Etanol 100%; obtidos da amostra "0" utilizando: Fase móvel: Acetonitrila (fase B) e água Milli-Q (fase A), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. Coluna Phenomenex® C ₁₈ -Luna (250 x 4,6 mm, d.i.; 5 μ m), vazão de 1 mL min ⁻¹ . Método B.	60
Figura 10 - Perfil cromatográfico (CLAE-DAD) em $\lambda = 280$ nm do extrato hidroalcoólico da amostra "0". Fase móvel: Acetonitrila (fase B) e água Milli-Q (fase A), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. Coluna Synergi TM C18 (250 x 4,6 mm; d.i.: 4 μ m), vazão de 1 mL min ⁻¹ . Método C.	60
Figura 11 - Cromatograma em $\lambda = 280$ nm do extrato de <i>A. subrufescens</i> obtidas por CLAE-DAD utilizando como fase móvel o acetonitrila (fase B) e água Milli-Q (fase A), ambas acidificada com 0,1% de ácido fórmico. Coluna Phenomenex® C18 (250x4,6 mm, d.i.; 5 μ m), vazão de 1 mL min ⁻¹ .Método D.	61
Figura 12 - Cromatogramas em $\lambda = 280$ nm dos extratos de <i>A. subrufescens</i> obtidas por CLAE-UV/DAD: utilizando como fase móvel o acetonitrila (fase B) e água Milli-Q (fase A), ambas acidificada com 0,1% de ácido fórmico. Coluna Phenomenex® C ₁₈ (250 x 4,6 mm, d.i.; 5 μ m), vazão de 1 mL min ⁻¹ . Método D.	62
Figura 13 - Gráfico de <i>scores</i> Fator2 <i>vr</i> Fator3 dos cromatogramas obtidos por CLAE-UV/DAD para os extratos da linhagem JP feitos com acetato de etila seguindo o método D.	64
Figura 14 - Gráfico de <i>loading</i> dos cromatogramas da linhagem JP obtidos por CLAE-UV/DAD com os extratos de acetato de etila de acordo com o método D.	65
Figura 15 - Gráfico de <i>scores</i> Fator2 <i>versus</i> Fator3 dos cromatogramas obtidos por CLAE para os extratos da linhagem T2 feitos com acetato de etila seguindo o método D.	68
Figura 16 - Gráfico de <i>loading</i> dos cromatogramas da linhagem T2 obtidos por CLAE com os extratos de acetato de etila de acordo com o método D.	68

Figura 17 - Gráfico de scores do Fator 3 <i>versus</i> Fator 4 dos cromatogramas obtidos por CLAE para os extratos da linhagem ABZ feitos com acetato de etila seguindo o método D.....	70
Figura 18 - Gráfico de <i>loading</i> dos cromatogramas da linhagem ABZ obtidos por CLAE com os extratos de acetato de etila de acordo com o método D.....	71
Figura 19 - Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de <i>Folin-Ciocalteu</i>	73
Figura 20 - Mecanismos de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.	78
Figura 21 - Mecanismos de reação entre o radical peroxila e proteção da fluoresceína através da presença de compostos que possuem atividade antioxidante.....	83
Figura 22 - Mecanismo de reação de transferência de átomos de oxigênio	84
Figura 23 - Cromatograma do pico base (BCP) extraído no modo negativo e positivo do extrato acetálico das amostras de <i>A. subrufescens</i>	88
Figura 24 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM do extrato acetálico obtido para a proposta do Ácido Digálico (Pico 9).	91
Figura 25 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM do extrato acetálico obtido para a proposta da esculetina (Pico 10).	91
Figura 26 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM do extrato acetálico obtido para a proposta da Ramnetina (Pico 11).	92
Figura 27 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM do extrato acetálico obtido para a proposta da Galato de Epilocatequina (Pico 12).	93
Figura 28 - Cromatograma do pico base (BCP) extraído no modo positivo e negativo do extrato hidroalcoólico das amostras de <i>A. subrufescens</i>	94
Figura 29 - Espectro de massas obtido por CL-EM\EM obtido para a proposta de molécula I (ácido <i>p</i> -cumárico).	95
Figura 30 - Proposta de formação dos íons presentes em maior abundância da substância I.	96
Figura 31 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM do extrato acetálico obtido para a proposta do Hexitol (Pico 1).	109

Figura 32 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM do extrato acetático obtido para a proposta do Ácido Pinélico (Pico 7).....	109
Figura 33 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM do extrato hidroalcoólico obtido para a proposta do Ergosterol (substância II).....	110
Figura 34 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM obtido para a proposta do Hexitol (substância III).....	110
Figura 35 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM obtido para a proposta da Lactose (substância IV).....	111
Figura 36 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM obtido para a proposta da Trehalose (substância V).....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Substâncias bioativas identificadas no cogumelo <i>Agaricus subrufescens</i> e suas respectivas atividades.	22
Tabela 2 – Composição química dos suplementos.....	24
Tabela 3 – Composição química do substrato	25
Tabela 4 – Nomenclatura das amostras de <i>A. subrufescens</i> de três linhagens cultivadas com diferentes suplementos.	37
Tabela 5 – Métodos utilizados na otimização das condições cromatográficas dos extratos de <i>A. subrufescens</i> (Fase Móvel: ACN:H ₂ O (0,1% de ácido fórmico); vazão de 1 mL min ⁻¹ , temperatura ambiente; volume de injeção de 20 µL de solução de 10 mg mL ⁻¹	45
Tabela 6 – Análise química dos suplementos utilizados na suplementação das amostras de <i>Agaricus subrufescens</i> *	50
Tabela 7 – Análise da composição química do cogumelo <i>A. subrufescens</i>	51
Tabela 8 – Massas e rendimentos obtidos dos extratos preparados a partir da mistura das amostras de <i>A. subrufescens</i>	56
Tabela 9 – Tempo de retenção dos picos discriminados pelo gráfico de <i>loading</i> da linhagem JP, T2 e ABZ e identificação das substâncias por CL-EM/EM.....	63
Tabela 10 – Teor de compostos fenólicos encontrado nos extratos de <i>Agaricus subrufescens</i>	74
Tabela 11 – Atividade antioxidante dos extratos de <i>A. subrufescens</i> através do ensaio de DPPH•.	80
Tabela 12 – Capacidade redutora do complexo Fe(III)-TPTZ à Fe(II)-TPTZ (FRAP) e atividade antioxidante pelo método ORAC feitos para os extratos de <i>Agaricus subrufescens</i>	85
Tabela 13 – Proposta de identificação das substâncias presentes no extrato acetálico do cogumelo <i>A. subrufescens</i> por CL-EM/EM.	89
Tabela 14 – Identificação das substâncias presentes no extrato hidroalcoólico do cogumelo <i>A. subrufescens</i>	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) dihidrocloro
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico
ACP	Análise de Componentes Principais
AF	Análise de Fatores
AOAC	Association of official analytical chemists
CL-UV/DAD	Cromatografia líquida com detector de arranjo de fotodiodos
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
TPTZ	Tripiridiltriazina
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
JP	Linhagem do cogumelo <i>Agaricus subrufescens</i> de origem japonesa
ABZ	Linhagem do cogumelo <i>Agaricus subrufescens</i> de origem brasileira
T2	Linhagem do cogumelo <i>Agaricus subrufescens</i> de origem belga
ACN	Acetonitrila
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	<i>Agaricus subrufescens</i>	16
1.1.1	Composição química.....	19
1.1.2	Suplementação	23
1.2	Alimentos Funcionais	25
1.2.1	Antioxidantes.....	27
1.3	Quimiometria	29
1.3.1	Análise Multivariada	31
2	OBJETIVOS	34
2.1	Objetivo Geral	34
2.2	Objetivos Específicos	34
3	METODOLOGIA	36
3.1	Amostragem.....	36
3.1.1	Preparo das amostras	36
3.2	Análise Química	38
3.2.1	Umidade.....	38
3.2.2	Cinzas	38
3.2.3	Fibra bruta.....	39
3.2.4	Nitrogênio Total.....	40
3.2.5	Proteína Bruta	41
3.2.6	Lipídios.....	41
3.2.7	Carboidratos Totais.....	42
3.3	Análise Cromatográfica	42
3.3.1	Preparo dos extratos	42
3.3.2	Análise por CLAE-UV/DAD	44
3.3.3	Identificações das substâncias presentes no extrato de <i>A. subrufescens</i>	45
3.3.3.1	Análise por CL-EM	45
3.4	Análise de fatores aplicada à análise química e metabolômica	46

3.5	Quantificação de Fenóis Totais.....	46
3.6	Determinação da Capacidade Antioxidante	47
3.6.1	Ensaio da capacidade redutora do radical DPPH'	47
3.6.2	Ensaio da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC).....	47
3.6.3	Ensaio do poder de redução do Ferro (FRAP).....	48
3.6.4	Análise Estatística	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	Composição Química dos suplementos	50
4.2.1	Análise de fatores dos resultados obtidos pelas análises da composição química.....	52
4.2	Análise Cromatográfica	56
4.2.1	Escolha do solvente extrator e análise inicial por CLAE-UV/DAD	56
4.2.2	Otimização das condições cromatográficas	59
4.2.3	Análise de fatores do perfil cromatográfico	62
4.3	Fenóis Totais.....	72
4.4	Determinação da Capacidade Antioxidante	77
4.4.1	Ensaio DPPH'	77
4.4.2	Ensaio ORAC e FRAP.....	82
4.5	Identificação das substâncias presentes nos extratos de <i>A.</i> <i>subrufescens</i>	88
4.5.1	Proposta de identificação das substâncias presentes no extrato hidroalcoólico por CL-EM.....	93
5	CONCLUSÕES	98
6	REFERÊNCIAS	100
7	ANEXO	109

1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos estão presentes na história da humanidade há milhares de anos com as mais diversas finalidades. Os egípcios, por exemplo, acreditavam que os cogumelos eram alimentos sagrados que tinham sido enviados aos humanos pelo deus Osíris em forma de recompensa por sua devoção. Já na Grécia, os guerreiros viam este alimento como uma fonte de força e coragem, por isto, o consumiam antes de partirem para a guerra. Os índios e mexicanos, por sua vez, acreditavam que este alimento poderia trazer algum tipo de benefício à saúde, e utilizavam seus extratos com propósitos terapêuticos (PRADO; FURLANI; GODOY, 2005).

Estas crenças estão associadas aos compostos presentes nos cogumelos que proporcionam benefícios à saúde humana, como as moléculas bioativas, o baixo teor de calorias, e as altas concentrações de minerais, amino ácidos, vitaminas e fibras, fatores que levam à classificação dos cogumelos como um alimento funcional, ou seja, são alimentos que produzem alguns metabólitos que são benéficos à saúde humana (FIRENZUOLI; GORI; LOMBARDO, 2008; HUANG; MAU, 2006).

Existem, aproximadamente 2.000 espécies de cogumelos comestíveis encontradas no mundo, em que apenas 25 são cultivadas em grande escala para fins comerciais. Dentre estas, as principais espécies cultivadas no Brasil são: *Agaricus bisporus* (conhecida popularmente como champignon de Paris), *Lentinula edodes* (shiitake), *Pleurotus ostratus* (shimeji), e, recentemente, o *Agaricus subrufescens* (cogumelo do sol) que vem apresentando algumas propriedades promissoras para a medicina (FURLANI; GODOY, 2007; PRADO; FURLANI; GODOY, 2005).

O *A. subrufescens* é um cogumelo de origem brasileira, nativo de um pequeno vilarejo denominado Piedade situado no estado de São Paulo. Sua descoberta ocorreu por volta dos anos de 1960 pelo pesquisador Takatoshi Gurumoto que se encarregou de coletar algumas amostras e enviá-las para o Japão. Em 1967 o botânico belga Paul Heinemann realizou a sua devida identificação e classificação como *Agaricus subrufescens*. Atualmente, este cogumelo está presente não apenas no Brasil, mas em vários países que possuem interesse na pesquisa de seus

componentes estruturais, como a China, Japão, Canadá e México (FIRENZUOLI; GORI; LOMBARDO, 2008; PRADO; FURLANI; GODOY, 2005).

Estudos recentes, realizados tanto *in vitro* quanto *in vivo* demonstraram que o *A. subrufescens* apresenta diversos metabólitos secundários com atividade antioxidante, antitumoral, capacidade de aumentar o sistema imunológico, além de auxiliar no tratamento da AIDS, diabetes, hipertensão e hepatite (AL-DBASS; AL-DAIHAN; BHAT, 2012; HUANG; MAU, 2006; LIMA; GRIS; KARNIKOWSKI, 2016; MENOLI et al., 2001).

No entanto, a capacidade dos cogumelos de atuarem contra estas doenças está diretamente relacionada com a sua produção, uma vez que, tanto a sua origem quanto a suplementação utilizada, podem alterar as suas características e, conseqüentemente, a biossíntese das moléculas bioativas (HUANG; MAU, 2006; ZIED et al., 2017).

Desta forma, alguns métodos vêm sendo desenvolvidos a fim de aprimorar a produção e aumentar a quantidade de metabólitos bioativos presentes nos cogumelos, como a adição de suplementos capazes de proporcionar o aumento da qualidade nutricional e a concentração de compostos com atividades medicinais. No entanto, ainda não há uma formulação ideal para a produção do cogumelo *A. subrufescens* que atenda todas estas necessidades e ainda apresente um baixo custo para produção em massa, tornando necessário um estudo a cerca desta problematização (HUANG; MAU, 2006; ZIED et al., 2017).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a influência de suplementos artesanais adicionados durante a produção do cogumelo *Agaricus subrufescens* utilizando ferramentas analíticas e quimiométricas, bem como a identificação dos seus principais componentes químicos benéficos à saúde humana e a avaliação de suas atividades antioxidantes.

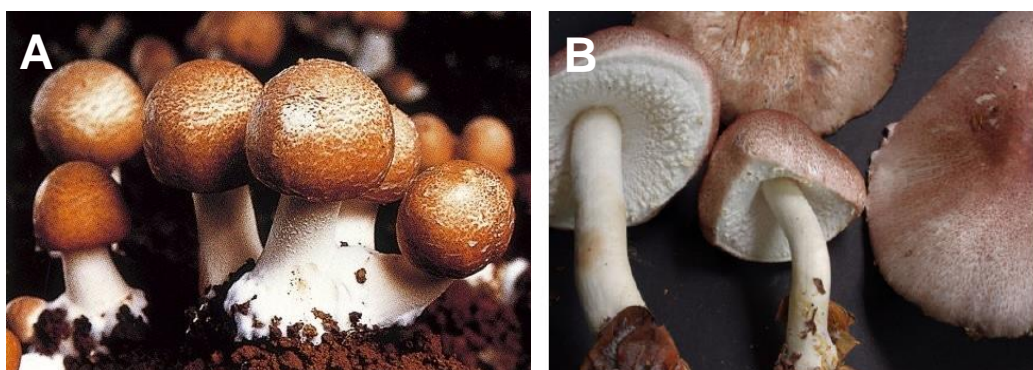
1.1 *Agaricus subrufescens*

O *Agaricus subrufescens* também conhecido como *A. blazei* Murrill é um fungo do gênero *Agaricus*, pertencente à família Agaricaceae da ordem dos Agaricales e está

inserido no filo Basidiomycota. Este gênero foi dividido em três subgêneros pelo botânico Heinemann, devido à sua vasta diversidade, sendo eles: *Agaricus*, *Conioagaricus* e *Lanagaricus*. Nesta subdivisão, as espécies mais estudadas estão inseridas no subgênero *Agaricus* (FIRENZUOLI; GORI; LOMBARDO, 2008).

Morfologicamente, o *Agaricus subrufescens* (Figura 1) possui um basidioma diversificado, ou seja, sua estrutura é multicelular e o seu corpo de frutificação pode ser robusto ou delicado em decorrência do seu genótipo e das influências ambientais locais. O chapéu, boné ou píleo (como é nomeada a parte superior dos cogumelos) medem de 20 a 70 mm de largura, quando em fase de crescimento, e 60-150 mm de largura quando já estão maduros, e seu formato tende de hemisférica e convexa a plano-convexa. O estipe apresenta uma espessura constante e uma coloração que pode variar de branco a amarelo quando friccionado. Este possui vestígios do véu parcial (anel), o qual é esbranquiçado com pequenos flocos amarelados na face inferior (WISITRASSAMEEWONG et al., 2012).

Figura 1 - *Agaricus subrufescens*. (A) Basidiocarpo; (B) Véu parcial esbranquiçado.



Fonte: (A) Associação Nacional de Produção de Cogumelos (ANPC), (2013); (B) WISITRASSAMEEWONG et al., (2012).

Seu crescimento é comum em organismos em fase de decomposição, como em matéria orgânica em decomposição comumente encontradas em florestas e parques, onde a temperatura varia entre 20 e 25°C. Esta característica classifica o *A. subrufescens* como uma espécie saprófita, ou seja, um organismo que se alimenta de

matéria orgânica decorrente de processos de decomposição (WISITRASSAMEEWONG et al., 2012).

Em geral, os fungos possuem um ciclo de vida caracterizado, em sua maior parte, pela formação dos micélios vegetativos, onde ocorre a decomposição e absorção dos nutrientes disponíveis no substrato. Esta etapa é essencial para o desenvolvimento dos basidiomas responsáveis pela reprodução da espécie. A germinação se mantém constante até o momento em que situações de estresse, umidade ou variações térmicas induzam os cogumelos a voltarem à sua fase reprodutiva, iniciando um novo ciclo de vida (NEVES, 2000).

O *Agaricus subrufescens* foi descoberto pela primeira vez no Brasil em 1960, no entanto sua comercialização teve início apenas em 1990 pelos países asiáticos, que demonstraram interesse em suas propriedades medicinais. Este comércio faturou milhões no decorrer dos anos seguintes, principalmente para o Japão, que se mostrou um grande apreciador desta espécie (MRE, 1999). Desde então a produção interna brasileira encontra-se nitidamente em expansão, impulsionada pela insuficiência deste cogumelo no mercado internacional e pelo fato do Brasil ser o país de origem do *A. subrufescens*, o que facilita a sua produção e desenvolvimento devido ao seu alto valor comercial e disponibilidade de resíduos industriais orgânicos no Brasil (AL-DBASS; AL-DAIHAN; BHAT, 2012; HERREIRA, 2001).

No entanto, o *A. subrufescens* também pode ser encontrado em outros países, o que pode provocar a diferenciação química deste cogumelo, uma vez que as condições disponíveis no meio de crescimento influenciam diretamente a produção de seus metabólitos secundários. Assim, é de suma importância o estudo da sua composição química a fim de se obter dados referentes a estas diferenciações, possibilitando então, o cultivo de cogumelos com maior produtividade e melhor qualidade em relação as suas propriedades (CARNEIRO et al., 2013; ZIED et al., 2017).

1.1.1 Composição química

Os cogumelos são utilizados como alimentos desde a antiguidade, devido a sua alta quantidade de nutrientes capazes de trazer diversos benefícios a saúde. No entanto estes benefícios só foram comprovados recentemente, onde a busca por alimentos funcionais tem impulsionado o estudo da sua composição química (FURLANI; GODOY, 2007).

A composição química de um cogumelo pode variar em função de diversas características, tais como o tipo da espécie e linhagem, as condições de cultivo, a composição do substrato, as condições ambientais (temperatura e umidade), os estágios de maturação, a técnica de colheita, e os tipos de processamentos pós-colheita. Os metabólitos presentes nos cogumelos ainda podem ser divididos em macronutrientes (carboidratos, lipídios e proteínas) e micronutrientes (vitaminas, sais minerais) (VIEIRA, 2010).

É relatado na literatura internacional e nacional o uso de técnicas descritas pela “*Association of Official Analytical Chemists*” (AOAC) para quantificar os valores nutricionais dos macronutrientes presentes nos cogumelos, como o teor de umidade, cinzas, proteínas, carboidratos e fibras. Os principais estudos estão voltados para as espécies *A. bisporus* e *Pleurotus* spp., uma vez que são as espécies mais consumidas no Brasil e no mundo. No entanto, a espécie *A. subrufescens* vêm apresentando resultados promissores em relação a quantidade destes nutrientes (PRADO; FURLANI; GODOY, 2005; STURION; OETTERER, 1995); (ABDI; WILLIAMS, 2010; BROOKS; HORNING; YOUNG, 1968).

O teor de proteínas é considerado relativamente alto nos cogumelos e pode ser calculado através da utilização de um fator de correção a partir dos resultados de nitrogênio orgânico apresentado por cada amostra (RANZANI; STURION, 1998; PRADO; FURLANI; GODOY, 2005). Quanto maior o resultado obtido, maior será o fornecimento de componentes que estão presentes no esqueleto e nas estruturas de sustentação das células humanas, como por exemplo, o colágeno e a elastina (NASCIMENTO, 2010).

Já a fibra alimentar tornou-se alvo de estudo nos cogumelos, devido aos seus altos teores, que podem atingir até 32% em base seca da massa total, representando uma porcentagem relativamente alta quando comparada a outros tipos de alimentos e o consumo adequado deste nutriente pode resultar na redução do risco de desenvolvimento de algumas doenças crônicas, como: doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, hipertensão arterial, diabetes melito, além de algumas desordens gastrointestinais. No organismo humano, as fibras alimentares são resistentes à ação de enzimas, devido ao fato de sua estrutura ser composta por polímeros e lignina – um polímero de fenil propano, por isto, seus efeitos benéficos à saúde estão relacionados, em partes, ao fato de que uma parcela da fermentação de seus componentes ocorre dentro do intestino grosso, resultando em impactos significativos na velocidade do trânsito intestinal, produzindo importantes funções fisiológicas (BREENE, 1990; BERNAUD; RODRIGUES, 2013).

Os carboidratos são considerados como o principal constituinte dos cogumelos, com exceção da água. Seus constituintes podem ser variados e apresentar diversos benefícios à saúde. De acordo com Breene (1990), apenas uma amostra de cogumelo da espécie *A. bisporus* pode conter os mais diversos tipos de carboidratos, tais como: pentoses (xilose e ribose), hexoses (glicose, galactose, manose), sacarose, metil pentoses (ramnose, fucose) e outros açúcares (manitol, inositol, ácidos galacturônico e glicurônico e glicosamina), além do polímero *N*-acetilglicosamina, chamado de quitina, que é um dos mais importantes encontrados na parede celular dos cogumelos (PRADO; FURLANI; GODOY, 2005).

Da classe dos sais minerais, de acordo com Mizuno et al. (1990) o cogumelo *A. subrufescens* apresenta uma porcentagem de 5-7% de minerais em sua composição, sendo em média: 61,88 µg de cobre, 86,90 µg de zinco e 79,13 µg de ferro em 100,0 g de cogumelo em base seca. Estes nutrientes possuem funções essenciais para o funcionamento do organismo humano, mesmo que em poucas quantidades e por isso devem ser ingeridos através de alimentos naturais como por exemplo, os cogumelos. Dentre as suas principais atividades já relatadas, destacam-se os minerais antioxidantes (zinco, selênio, cobre e o manganês) não-enzimáticos, ou seja, responsáveis por auxiliar o desenvolvimento destas atividades como cofatores de

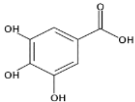

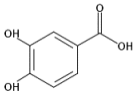
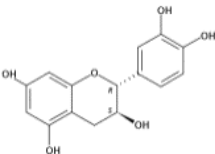
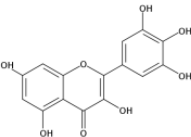
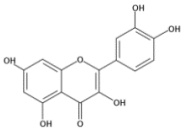
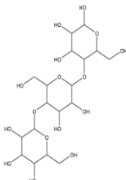
diversas reações contra os radicais livres, como por exemplo: impedindo a formação de novas espécies reativas (sistema de prevenção), neutralizando as espécies reativas já formadas ou através do auxílio na reconstrução das estruturas biológicas lesadas por estes radicais (sistema de reparo) (ALBION, 2015; ALLIATT, 2014; CORREA, 2013).

Existem ainda, outros compostos que mesmo em menores concentrações proporcionam funcionalidades específicas aos cogumelos e contribuem para que este alimento seja considerado funcional. Nesta classificação estão presentes as moléculas com caráter bioativo, como os polissacarídeos, glicoproteínas, além de compostos com atividade antioxidante, antibióticas, dentre outras (SILVA; JORGE, 2011). A Tabela 1 apresenta algumas moléculas biologicamente ativas já identificada em amostras de cogumelo *Agaricus subrufescens*.

No estudo realizado por Carvajal et al. (2012), foi possível a identificação de algumas moléculas com propriedades antioxidantes em amostras do cogumelo *A. subrufescens*, dentre as quais três fazem parte da classe dos compostos fenólicos: ácido gálico, ácido siríngico e pirogalol. Em outro estudo feito por Kim e colaboradores (2008), com este mesmo cogumelo foi concluído que os compostos fenólicos contribuem significativamente para o resultado positivo nos testes de atividade antioxidantes e que tornam o *A. subrufescens* um alimento promissor para a produção de produtos com propriedades medicinais.

Outros compostos muito estudados são as β -glucanas, elas podem ser encontradas principalmente na parede celular dos fungos e se diferenciam através das ligações que ocorrem entre as moléculas de glicose da cadeia principal e suas ramificações. Suas atividades estão relacionadas aos efeitos de imunomodulação, antitumoral, antiinflamatório, antimutagênico, atuação na diminuição do perfil lipídico, dentre outros, por isto, o estudo e isolamento desta substância em cogumelos tem sido alvo de diversos pesquisadores (DONG et al., 2002; SILVA; JORGE, 2011). Dong e colaboradores, (2002) e Kawagish et al. (1988) foram uns dos autores que já relataram o isolamento de uma β -*D*-glucana em amostras do cogumelo do sol.

Tabela 1 - Substâncias bioativas identificadas no cogumelo *Agaricus subrufescens* e suas respectivas atividades.

Susbtância	Estrutura	Atividade Relacionada	Referência
Ácido gálico		Antioxidante	(CARVAJAL et al., 2012; KIM et al., 2008a)
Pirogalolol		Antioxidante	(CARVAJAL et al., 2012; KIM et al., 2008a)
Ácido protocatecuico		Antioxidante	(KIM et al., 2008a)
Catequina		Antioxidante	(KIM et al., 2008a)
Miricetina		Antioxidante	(KIM et al., 2008a)
Quercetina		Antioxidante	(KIM et al., 2008a)
β-glucana		Anticarcinogênica\ imunomodulação Antiglicêmico	(DONG et al., 2002; SILVA; JORGE, 2011).

Desta forma, informações a respeito da composição química dos cogumelos são extremamente importantes para profissionais das áreas da saúde e alimentos visto que seus constituintes podem ser essenciais em uma dieta balanceada, além de proporcionar a comercialização medicinal deste cogumelo no Brasil (ANDRADE; MINHONI; ZIED, 2008; QUEIROZ et al., 2016).

1.1.2 Suplementação

Para cogumelos com fins medicinais, a forma de cultivo pode interferir diretamente na produtividade, qualidade nutricional e na concentração dos compostos biologicamente ativos. Por isto, é necessário que haja uma atenção especial durante a escolha do inóculo (origem e qualidade) e, principalmente, do substrato disponível, uma vez que todos os nutrientes dos fungos são captados do ambiente ao seu redor (ZIED et al., 2017).

No entanto, em alguns casos, a presença única de um substrato adequado pode não ser suficiente para que o cogumelo adquira as quantidades de carbono e nitrogênio necessários para o seu desenvolvimento, podendo ser corrigidos com a adição de uma suplementação, que deve ser aplicada junto ao inóculo da espécie (ZIED et al., 2010), favorecendo o aumento da disponibilidade de nutrientes como o carbono e nitrogênio, que são os principais responsáveis pelo bom desenvolvimento dos fungos (ZIED et al., 2010; VIEIRA, 2012).

Existem atualmente diversos tipos de suplementos industriais disponíveis no mercado, tendo as características adequadas para cada linhagem. Porém, um grande problema destes produtos é o seu alto valor de mercado, acarretando em um aumento significativo no preço do produto final, tornando-se um problema para a produção de pequenos e médios produtores no Brasil (ZIED et al., 2018).

Uma alternativa viável é a adição de suplementos produzidos artesanalmente à base de resíduos industriais, como frutas e farelos, que podem ser encontrados em diversas regiões do Brasil. Estes resíduos, além de apresentarem baixo custo, representam ainda uma alternativa à reutilização dos descartes industriais, agregando valor a esta técnica (MARINO; ABREU; DE, 2009).

No entanto, ao avaliar diferentes espécies de fungos deve-se esperar que cada uma absorva os nutrientes de forma diferente, de acordo com suas necessidades e variabilidades genéticas. Outro fator que deve ser levado em consideração é que uma ampla carga de nutrientes disponíveis no solo, nem sempre levarão a absorção total destes componentes para as culturas pois, outros fatores podem minimizar esta

interação, como: pH do meio, nutrientes tóxicos ou até mesmo sais minerais caracterizados como limitantes, de acordo com a *lei do mínimo*.

A *lei do mínimo*, também conhecida como lei de Liebig, foi criada em 1843 e explica a relação entre a absorção de nutrientes por um vegetal ou fungo e a quantidade disponível no meio de cultivo. Assim, de acordo com esta lei em cada cultivo há um nutriente denominado de limitante, ou seja, que está em menores quantidades no solo e será responsável por limitar a absorção dos demais nutrientes que estão em excesso, por exemplo, se o limitante for o calcário a produtividade será a mesma e não maior mesmo se as quantidades de potássio, sílica, ácido fosfórico, sejam aumentados em cem vezes (LOPES, 2007).

Assim Zied e colaboradores (2018) realizaram um estudo sobre os nutrientes presentes nos diferentes tipos de substratos e suplementos, adicionados no cultivo do cogumelo *A. subrufescens* utilizados neste trabalho, a fim de possibilitar um estudo mais detalhado sobre as influências das características químicas destes suplementos no desenvolvimento dos cogumelos. A **Error! Reference source not found.** apresenta os resultados da composição dos nutrientes presentes nos suplementos adicionados no cultivo dos cogumelos estudados e a **Error! Reference source not found.** apresenta a composição do substrato utilizado no mesmo cultivo.

Tabela 2 - Composição química dos suplementos

Característica química do substrato											
N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn	C/N
g kg ⁻¹						mg kg ⁻¹					razão
15±0,7	2,9±0,2	9±0,6	50±3,6	2,1±0,4	6,4±0,5	20±3	17±1,2	7456±17	141±4,9	107±9	11±3/1

Cada valor é expresso como média ± desvio padrão (n = 3).

Tabela 3 - Composição química dos substratos

Suplementos	Característica química dos suplementos											
	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Zn	Mn	C/N
	g kg ⁻¹											razão
Setas	44±0,6	3,4±0,5	17±0,7	7±1,1	2,4±0,4	1,0±0,2	26±1	11±1,1	334±18	22±2	48±1,3	11±3/1
<i>Champfood</i>	68±0,4	3,9±0,4	14±0,8	6±3	1,9±0,5	2,8±0,3	22±0,2	11±0,7	197±8	18±1	67±,4	6±1/1
Amendoim	17±0,3	0,5±1	5±1	19±2	1,3±0,2	0,7±0,04	22±2	15±2	795±57	52±3	24±1,6	31±2,8/1
Fruta	20±0,7	1,8±0,2	9±2,4	21±2,4	1,7±0,7	0,9±0,1	23±2	11±0,2	402±34	16±2	24±0,8	26±0,2/1
Mistura [£]	55±2	5,3±2	16±0,4	25±0,4	3,2±0,2	1,2±0,5	21±3	11±0,4	174±18	21±1	49±0,8	11±0,5/1
Combinação [¥]	26±0,5	2,2±0,4	11±0,5	23±2	1,8±1,0	0,9±0,2	22±1	10±0,3	394±20	38±1	29±0,7	18±0,3/1

£: Uma mistura de farelo de milho, soja e algodão (33,3% cada).

¥: Uma combinação de resíduos de amendoim, resíduos de suco de acerola e uma mistura de grãos nobres (33,3% cada). Cada valor é expresso como média ± desvio padrão (n = 3).

Desta forma, é de suma importância o estudo dos benefícios deste tipo de suplementação no desenvolvimento nutricional e biológico dos cogumelos como o *A. subrufescens*, visto que o seu consumo é feito através da busca por alimentos com caráter funcional.

1.2 Alimentos Funcionais

Diversos estudos vêm comprovando a presença de alguns compostos biologicamente ativos na estrutura dos cogumelos, incluindo o *A. subrufescens*, como polissacarídeos, glicoproteínas, compostos fenólicos, flavonoides e vitaminas. Por isso, além de serem consumidos por suas características sensoriais, os cogumelos também são utilizados como alimentos funcionais (WISITRASSAMEEWONG et al., 2012).

O termo “alimento funcional” foi descrito pela primeira vez em meados dos anos 1980, no Japão, onde fazia referência aos alimentos processados que possuíam pelo menos um ingrediente capaz de auxiliar as funções específicas do organismo humano, além de serem muito nutritivos. Neste contexto, o governo japonês lançou nesta mesma época um programa que posicionava a estes alimentos uma nova

concepção, com o objetivo de desenvolver alimentos saudáveis para a população que envelhecia e apresentava uma expectativa de vida crescente (ANJO, 2004).

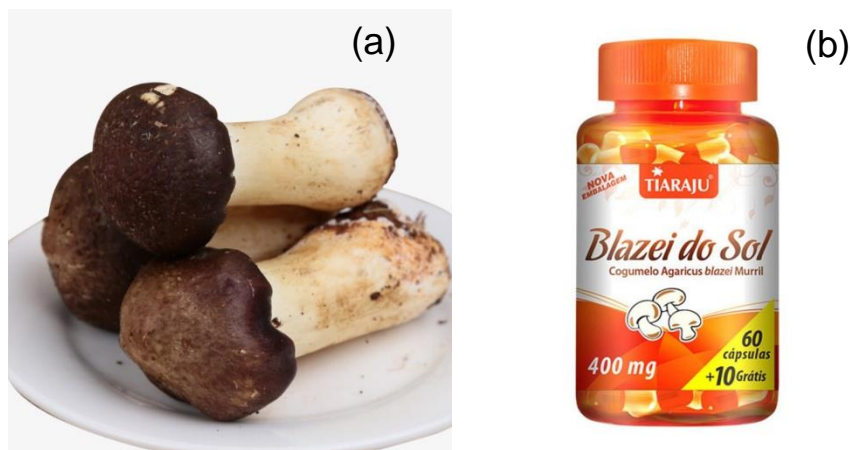
De uma forma geral, a definição de alimento funcional vem sendo alvo de vários estudos nos últimos anos. Por definição, os alimentos podem ser classificados como funcionais quando oferecem inúmeros benefícios a saúde, além do seu valor nutricional, sendo capaz de desempenhar ações que reduzam o risco de doenças crônicas degenerativas (MORAES; COLLA, 2007). De acordo com a portaria nº398 de 30/04/99 da ANVISA, os alimentos funcionais são definidos como: “Todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica” (ANVISA, 2006).

Estes alimentos podem ser divididos de duas formas: quanto a sua fonte (vegetal ou animal), ou em relação aos seus benefícios, que podem atuar em seis áreas do organismo humano: sistema gastrointestinal, sistema cardiovascular, metabolismo de substratos, crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular, comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes (MORAES; COLLA, 2007).

Os alimentos funcionais devem ser consumidos preferencialmente na forma “*in natura*” (Figura 2a), porém eles podem existir também na forma industrializada (Figura 2b), o que não impede seus efeitos funcionais, mas afeta ligeiramente seu potencial, exigindo que haja o consumo de quantidades maiores para que eles possam oferecer o mesmo benefício (MORAES; COLLA, 2007; VIDAL et al., 2012).

O consumo deste tipo de alimento ainda gera controvérsias, sendo importante destacar que eles não podem ser considerados como medicamentos, pois não possuem a característica de “curar” certas doenças, mas são utilizados pelo organismo para prevenir o aparecimento de alguma anomalia e auxiliar no combate das mesmas (VIDAL et al., 2012).

Figura 2 – (a) *Agaricus subrufescens* in natura para consumo; (b) *Agaricus subrufescens* industrializado e preparado em cápsulas prontas para consumo.



Fonte: (a) Ultrafarma, 2018; (b) Associação Nacional de Produção de Cogumelos (ANPC), (2013).

Desta forma, os alimentos mais comuns considerados como funcionais são aqueles que possuem, principalmente, substâncias com caráter antioxidante, ou seja, possuem moléculas capazes de impedir o estresse oxidativo das células, beneficiando diretamente a saúde humana (MORAES; COLLA, 2006).

1.2.1 Antioxidantes

Durante os processos metabólicos dos organismos vivos, os radicais são produzidos continuamente, sendo estes responsáveis por ocasionar a oxidação das células e dos tecidos vivos. Por isto, para combater este processo, existem algumas substâncias que possuem a característica de agir contra o processo de oxidação, chamados de antioxidantes (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A formação destes radicais ocorre através da ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que se desenvolvem continuamente no metabolismo celular, ocasionando, em alguns casos, um desequilíbrio entre as moléculas oxidantes e antioxidantes denominado de estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007). A presença em excesso destes compostos oxidantes pode causar alterações genéticas, peroxidação lipídica e até mesmo a degradação de proteínas, favorecendo o desenvolvimento de algumas doenças cardiovasculares e

neurodegenerativas além do câncer. Por isto a presença dos antioxidantes nos organismos vivos é essencial para a manutenção de uma saúde adequada (GUO et al., 2012).

Os antioxidantes podem ser quaisquer substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, ocasionam a diminuição ou inibição do processo oxidativo deste substrato de maneira eficaz. Ou seja, do ponto de vista químico, estes agentes são compostos aromáticos que possuem ao menos uma hidroxila, podendo ser de origem natural ou sintética (SIES; STAHL, 1995).

Eles são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação, podendo ser sequestrantes de radicais, de íons metálicos ou de oxigênio, ou ainda conforme a sua estrutura, podendo ser enzimático ou não enzimático (sais minerais) (ABDALLA et al., 2003). Contudo, há ainda uma subdivisão que os classifica como antioxidantes primários e secundários. Na subdivisão dos antioxidantes primários estão aqueles que possuem atividade enzimática, como as enzimas, e são capazes de bloquear a etapa de iniciação da oxidação. Já na classe dos secundários encontram-se os antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos, capazes de fazer a doação de um elétron livre ou átomo de hidrogênio aos radicais, fazendo com que haja a remoção ou inativação destes compostos formados durante as etapas de iniciação ou propagação das reações químicas, como descrito na Figura 3, utilizando o exemplo de um flavonoide (MOREIRA et al., 2004).

O termo “fenólico” está relacionado com substâncias que possuem um ou mais núcleos aromáticos ligados a substituintes hidroxilados ou a seus derivados funcionais. Os flavonoides, por exemplo, possuem um núcleo básico com 15 átomos de carbono arranjados na configuração C₆-C₃-C₆, onde dois anéis benzênicos estão ligados a um anel pirano. Já os ácidos fenólicos podem ser divididos em três grandes grupos compostos pelos derivados do: ácidos benzoicos, ácidos cinâmicos e as cumarinas, sendo que, no primeiro grupo estão agrupados os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza (SOARES, 2002).

ou na obtenção de informações químicas através da análise de dados multivariados (GELADI, 2003; LOPES, R.E.C.; DOS SANTOS, 2010).

Esta técnica é comumente aplicada ao tratamento de informações obtidas de um experimento que envolve a discussão de um número considerável de variáveis, facilitando a visualização das suas diferenças. Sendo que, frequentemente apenas um pequeno número destas variáveis apresenta maior importância, podendo ser mascarados sem o auxílio da quimiometria (HONGYU; JORGE; JUNIOR, 2015; LOPES, R.E.C.; DOS SANTOS, 2010).

Na cromatografia, por exemplo, o sinal obtido através do detector é medido no domínio do tempo, denominado como variável independente, trazendo informações indiretas sobre o sistema em estudo que serão traduzidas para resultados químicos que prescrevam a identificação ou quantificação de uma amostra. Estes dados, por sua vez, são coletados e organizados em uma matriz de trabalho \mathbf{X} denotada sempre por uma letra maiúscula e negrita, onde cada coluna representará uma amostra i e cada linha uma variável x_j , criando uma representação compacta descrita por \mathbf{X} ($I \times J$), exemplificada pela Figura 4 (FERREIRA, 2015).

Figura 4 - Representação gráfica de uma matriz \mathbf{X} (3x4) com as correlações entre o tempo de retenção de um cromatógrafo em minutos (Temp) *vs* os sinais de absorvância obtidos (Abs) medidos em três experimentos (Exp) diferentes.

$$\mathbf{X} = \begin{array}{c} \begin{array}{cc} \text{Temp.} & \text{Abs.} \\ \text{Exp 1} & \text{Exp 2} & \text{Exp 3} \end{array} \\ \left[\begin{array}{ccc} \text{A1} & \text{W1} & \text{W4} & \text{W7} \\ \text{A2} & \text{W2} & \text{W5} & \text{W8} \\ \text{A3} & \text{W3} & \text{W6} & \text{W9} \end{array} \right] \end{array}$$

Fonte: O próprio autor

No entanto durante a organização da matriz de trabalho é comum o aparecimento de *outlier*, ou seja, resultados que se mostraram muito discrepantes dos demais dados por consequência do mau funcionamento do equipamento, contaminação do solvente, dentre outros fatores. Assim, é comum que haja a exclusão destes dados, que passam a ser denominados de dados faltantes. (FERREIRA, 2015).

Algumas das soluções para o tratamento dos dados faltantes é a exclusão das linhas ou colunas que contenham estes dados ausentes, no entanto esta técnica prática só pode ser aplicada quando há um número suficiente de amostras que permitam esta exclusão. Outra alternativa é a substituição deste valor faltante por um valor estimado utilizando por exemplo, a média do restante dos valores do experimento. (FERREIRA, 2015).

Por fim, após a elaboração da matriz, esta deve então, ser aplicada a uma das técnicas quimiométrica existentes, de acordo com o objetivo do estudo em questão, a fim de facilitar a visualização dos inúmeros dados de forma simplificada (FERREIRA, 2015).

No Brasil pode-se destacar a utilização de três vertentes da quimiometria: calibração multivariada, planejamento e otimização de experimentos e reconhecimento de padrões, dentre os quais a primeira, também conhecida como análise multivariada, agrupa as técnicas mais aplicadas em experimentos químicos (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002; VARELLA, 2008).

1.3.1 Análise Multivariada

A análise multivariada é um conjunto de técnicas na qual o objetivo é a identificação de padrões específicos de um conjunto de dados criando correlações entre os objetos e as variáveis e formando pequenos grupos de amostras ou descobrindo anômalos, antes imperceptíveis (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002; VARELLA, 2008). As técnicas de análise componentes principais (ACP) e análise de fatores (AF) moldam através das transformações lineares das variáveis originais um novo grupo significativamente menor capaz de explicar a maior parte da variância dos dados e discriminar as amostras (NEISSE; HONGYU, 2016).

Diante disto, é possível visualizar e interpretar as diferenças e as correlações existentes entre uma quantidade grande de dados, sendo possível também a observação de amostras que apresentam comportamentos anômalos aos demais conjuntos de dados (VARELLA, 2008). Estes conjuntos de dados são usualmente a resposta analítica de um instrumento em função de um número considerável de variáveis, como por exemplo, a altura dos picos obtidos através de um cromatograma. Então a partir da aplicação de uma técnica multivariada obtém-se a redução das dimensões dos resultados, sem perder a sua origem através de cálculos de combinações lineares que dão origem aos Fatores ou Componentes Principais (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002).

Marekova e colaboradores, (2012) utilizaram a técnica de ACP para diferenciar a composição de ácidos graxos presentes em algumas espécies selvagens de cogumelo resultantes das análises realizadas em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrometro de massas. Já Zhou, Feng e colaboradores, (2015) utilizam as mesmas técnicas analíticas e quimiométricas para diferenciação do perfil de compostos voláteis de oito cogumelos comerciais em comparação as respostas obtidas pelo aparelho “nariz eletrônico”.

Desta forma, os resultados são representados por meio de dois gráficos, o gráfico de *scores*, que representam os novos valores das variáveis estudadas através da projeção sobre o eixo das Componente Principais, e os gráficos de *loading*, que representam a correlação entre uma variável e um componente e as informações obtidas através desta correlação. Por fim, a maneira mais eficiente para representação destes resultados é a plotagem entre si dos gráfico de *scores* com os pesos das componentes principais escolhidas, dando origem a um gráfico bi ou tridimensional (VARELLA, 2008; ABDI; WILLIAMS, 2010).

No entanto ao comparar os resultados de ambas as técnicas percebe-se uma pequena diferença nas cargas fatoriais, comunalidades e taxa de variância explicada, onde, os valores de uma ACP são relativamente maiores devido à sua análise levar em consideração a variância específica das amostras estudadas e não apenas a variância geral. Desta forma, para realização de uma análise fatorial deve-se primeiramente conhecer a matriz de dados a ser estudada e verificar a possibilidade

de normalização da mesma, possibilitando então aplicação da análise fatorial aos dados (NEISSE; HONGYU, 2016).

Assim, neste trabalho foi utilizada pela primeira vez a ferramenta quimiométrica de análise de fatores para diferenciação da composição química de diferentes linhagens de cogumelos suplementados com diferentes tipos de suplementos (artesaniais e comerciais) por meio de técnicas cromatográficas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo a diferenciação e identificação das substâncias presentes em três linhagens de cogumelos da espécie *Agaricus subrufescens* suplementadas com diferentes suplementos artesanais (produzidos à base de resíduos industriais e submetidos a dois tipos de tratamentos: redução microbiana ou adição de 5% de formol) e comerciais, a fim de se obter uma correlação entre cada tipo de suplementação e suas influências na composição química final e na capacidade antioxidantes dos cogumelos cultivados, visando o seu uso como alimento funcional.

2.2 Objetivos Específicos

Para o desenvolvimento deste trabalho foram realizadas as seguintes etapas:

- Analisar a composição dos 10 suplementos utilizados no cultivo do cogumelo *A. subrufescens* e das 33 amostras de cogumelo por meio da quantificação do teor de: umidade, cinzas, fibras, nitrogênio, proteínas e lipídios.
- Desenvolver e otimizar um método analítico por CLAE-UV/DAD para separação das principais substâncias presentes nos extratos de *A. subrufescens*;
- Correlacionar os resultados obtidos nas análises da composição química dos cogumelos e das substâncias selecionadas por meio da técnica de CLAE-UV/DAD através da ferramenta quimiométrica de análise de fatores (AF);
- Quantificar o teor de fenóis totais de todas amostras de cogumelos cultivadas com diferentes suplementos;

- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos de *A. subrufescens* por meio dos diferentes métodos: Capacidade de Redução do Radical DPPH; Potencial Antioxidante Redutor Férrico (FRAP) e Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC);
- Identificar as substâncias referentes aos picos responsáveis pela diferenciação das 33 amostras por meio da técnica quimiométrica de análise de fatores do perfil cromatográfico por CL-EM utilizando dados das relações m/z das substâncias e fragmentações relatados na literatura.
- Identificar as substâncias com caráter antioxidante presente no extrato hidroalcoólico de *A. subrufescens* por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas CL-EM, utilizando dados das relações m/z das substâncias e fragmentações relatados na literatura.

3 METODOLOGIA

3.1 Amostragem

Neste trabalho foram utilizadas três linhagens comerciais de *A. subrufescens*, sendo estas: JP, ABZ e T2 (originárias do Japão, Brasil e Bélgica, respectivamente). As amostras foram fornecidas pelo Dr. Diego Cunha Zied, pesquisador da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAT/UNESP - campus de Dracena), que cultivou e coletou os cogumelos estudados. As linhagens foram depositadas na coleção de cultura pública da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Dracena (FCAT/UNESP), que oferece acesso aberto aos pesquisadores interessados. As amostras foram cultivadas com substrato (em palha de braquiária, uma espécie de forrageira com uma relação de carbono e nitrogênio elevada) e suplementadas com quatro tipos diferentes de suplementos produzidos artesanalmente à base de resíduos industriais e denominados conforme a sua composição: amendoim (composto por 9,5% de grãos de amendoim, 90% casca de vagem e 0,5% de carbonato de cálcio); fruta (99,5% de resíduos de caroço de acerola e 0,5% de carbonato de cálcio); combinação (9,5% de farelo de soja, 30% de farelo de milho, trigo e algodão e 0,5% de carbonato de cálcio); mistura (33,3% dos suplementos amendoim, fruta e combinação). Todos foram preparados separadamente submetidos à dois processos diferentes: controle microbiano e adição de formol (5%). Foram empregados ainda dois suplementos comerciais denominados de: setas (*Pro Mycel Gold* – 27% de proteína) e champfood (*Spolu Mate II SE* – 54% de proteína). Cada uma das três linhagens possui uma amostra controle onde não foi adicionado nenhum tipo de suplementação, totalizando 33 amostras.

3.1.1 Preparo das amostras

As amostras foram cultivadas com os dois suplementos comerciais (setas e *champfood*) e com os quatro diferentes tipos de suplementos artesanais preparados

através da adição de 5% de formol ou pela técnica de redução microbiana procedimento utilizado para eliminação microbiota resistente ao fungo *A. subrufescens*. Foram então colhidas e secas conforme descrito por Zied et al., (2018), trituradas até atingir a forma de pó em um moinho de facas e peneiradas para obtenção de uma homogeneidade granulométrica. Após estas etapas, as amostras foram enumeradas e codificadas, conforme descrito na Tabela 44.

Tabela 4 - Nomenclatura das amostras de *A. subrufescens* de três linhagens cultivadas com diferentes suplementos.

Amostra	Nomenclatura*	Amostra	Nomenclatura*
1	JP controle	18	ABZ combinação formol
2	T2 controle	19	JP combinação
3	ABZ controle	20	T2 combinação
4	JP amendoim formol	21	ABZ combinação
5	T2 amendoim formol	22	JP mistura formol
6	ABZ amendoim formol	23	T2 mistura formol
7	JP amendoim	24	ABZ mistura formol
8	T2 amendoim	25	JP mistura
9	ABZ amendoim	26	T2 mistura
10	JP fruta formol	27	ABZ mistura
11	T2 fruta formol	28	JP <i>champfood</i>
12	ABZ fruta formol	29	T2 <i>champfood</i>
13	JP fruta	30	ABZ <i>champfood</i>
14	T2 fruta	31	JP setas
15	ABZ fruta	32	T2 setas
16	JP combinação formol	33	ABZ setas
17	T2 combinação formol	0	Amostragem geral

*Setas (Spolu Mate II SE) e *champfood* (Pro Mycel Gold) = suplementos internacionais/comerciais; Amendoim = 9,5% de grãos de amendoim, 90% casca de vagem e 0,5% de carbonato de cálcio; Fruta = 99,5% de resíduos de caroço de acerola e 0,5% de carbonato de cálcio; Combinação = 9,5% de farelo de soja, 30% de farelo de milho, trigo e algodão e 0,5% de carbonato de cálcio; Mistura (33,3% dos suplementos amendoim, fruta e combinação); Fruta formol, combinação formol, amendoim formol, mistura formol = adição de 5% de formol na produção do suplemento; Amostragem geral = mistura de todas as amostras. ABZ= linhagem de origem brasileira; T2= linhagem de origem belga; JP= linhagem de origem japonesa.

3.2 Análise Química

A análise química das amostras de cogumelo e dos suplementos foram realizadas em duplicata segundo os métodos descritos pela AOAC (2003) para a quantificação de cinzas, proteínas, fibras, lipídios e carboidratos totais, com exceção do método de umidade que foi realizado seguindo o método descrito por Sampaio, S.M.; QUEIROZ, M.R., (2006).

3.2.1 Umidade

O teor de umidade foi determinado através de um analisador de umidade da marca OHAUS pré-configurado a temperatura de 105 °C com tempo de análise de 7 minutos. Foram pesados 2,0 g de amostra, e o resultado foi obtido em porcentagem de umidade fornecida pelo aparelho.

3.2.2 Cinzas

O teor de cinzas foi determinado através do método de incineração em mufla. Foram pesados 2,0 g de amostra seca em uma cápsula de porcelana (previamente aquecida em mufla a 550 °C por 30 min, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada) com aquecimento e incineração prévia com o auxílio de um bico de Bunsen por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, a cápsula de porcelana contendo a amostra foi transferida para uma mufla a uma temperatura de 550 °C por 6 h para a etapa de incineração. Por fim, a cápsula foi resfriada em dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesada em uma balança analítica. A diferença entre as massas da cápsula antes e após a calcinação forneceu o teor de cinzas (Equação 2).

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{100 \times N}{p} \quad (2)$$

Onde:

N = massa (g) de cinzas da amostra;

p = massa (g) da amostra.

3.2.3 Fibra bruta

O teor de fibra bruta foi determinado pelo método de digestão ácido/base. Foram pesados, em balança analítica, 2,0 g da amostra seca e transferidas para um erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de H₂SO₄ 1,25% para serem posteriormente levadas à chapa aquecedora a uma temperatura de 105 °C por 30 min (a contagem do tempo foi iniciada após o início da fervura). Passado esse tempo, a solução foi filtrada com o auxílio de um funil de buchner adaptado com um filtro de polipropileno 100%, seguida de sucessivas lavagens com aproximadamente 500 mL de água destilada fervente. Os resíduos retidos no filtro foram retornados ao erlenmeyer com o auxílio de 100 mL de NaOH 1,25% para o início da digestão básica, que seguiu as mesmas etapas da digestão ácida previamente descrita. Ao término da lavagem com água destilada, foram adicionados aproximadamente 10 mL de éter de petróleo P.A. ao filtro com o intuito de auxiliar o processo de secagem. O resíduo foi então retirado do filtro e transferido para um cadinho de porcelana e levado a uma estufa com temperatura de 105 °C por 3 h. Após este período os cadinhos foram resfriados em dessecador até a temperatura ambiente e pesados em balança analítica. Por fim, os cadinhos foram levados à mufla, onde foram mantidos por 2 h a uma temperatura de 550 °C para serem incinerados. Após a etapa de incineração, os cadinhos foram novamente resfriados em dessecador e pesados em uma balança analítica. A diferença de massa antes e após a calcinação forneceu o valor da fibra bruta, como representado pela Equação 3.

$$\% \text{ Fibra bruta} = \frac{100 \times N}{p} \quad (3)$$

Onde:

N = massa (g) da perda de massa pós-mufla;

p = massa (g) da amostra.

3.2.4 Nitrogênio Total

A determinação do teor de nitrogênio total foi realizada através do método de Kjeldahl descrito por Lau, (1982). Para determinação do teor de nitrogênio total, inicialmente foi necessário o preparo de quatro soluções, conforme descrito:

(1) Mistura catalítica: os reagentes sulfato de sódio e sulfato de cobre em uma proporção de 10:1, respectivamente, foram adicionados em uma cápsula de porcelana onde foram homogeneizados e triturados.

(2) Solução de hidróxido de sódio 50% (m/v): 50,0 g de hidróxido de sódio P.A. Foram dissolvidos em água destilada e transferidos para um balão de 100 mL onde o volume de água destilada foi completado.

(3) Ácido bórico 2% (m/v): 2,0 g de ácido bórico foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL, o qual foi completado o volume com água destilada.

(4) Indicador misto: 2,0 g de vermelho de metila P.A. e 0,1 g de verde de bromocresol foram transferidos para um balão volumétrico de 200 mL e o volume foi completado com álcool etílico 70%.

Foram pesadas 0,2 g de amostra seca e triturada, transferidas para um tubo de Kjeldahl no qual foi adicionado 1,5 g da mistura catalítica recém preparada e 5 mL de ácido sulfúrico P.A. O tubo foi aquecido em bloco digestor até atingir a temperatura de 400 °C e mantido sob esta temperatura até a completa digestão da amostra (o fim desta etapa foi observado com a mudança na coloração da solução de cinza para azul-esverdeada). Em seguida, o tubo foi deixado sob a bancada até que a solução atingisse a temperatura ambiente. Foram então adicionados 10 mL de água destilada aos tubos contendo as amostras e em seguida os mesmos foram acoplados, um de cada vez, ao destilador de nitrogênio pré-preparado com NaOH 50% (aproximadamente 20 mL) e um erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de ácido bórico 2% e 4 gotas de indicador misto. Após a etapa de destilação, o líquido recolhido no erlenmeyer foi titulado com ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ padronizado até a viragem da coloração de azul-esverdeada para rosa clara. O cálculo utilizado para a quantificação do teor de nitrogênio está descrito na Equação 4.

$$\%N = \frac{V \times C \times F \times 14 \times 0,1}{p} \quad (4)$$

Onde:

V = Volume do HCl utilizado na titulação (mL);

C = concentração do HCl (0,1 mol L⁻¹);

F = Fator de correção da solução de HCl;

P = Massa (g) da amostra.

3.2.5 Proteína Bruta

O teor de proteína bruta foi calculado através da conversão da quantidade de nitrogênio total determinados pelo método de Kjeldahl, pelo fator de correção de 4,38 descrito por Miles e Chang (1997), como descrito pela Equação 5.

$$\% \text{ Proteína bruta} = \%N \times 4,38 \quad (5)$$

Onde:

4,38 = fator de correção para cálculo de proteínas em cogumelos;

N = nitrogênio total (%).

3.2.6 Lipídios

O teor de lipídios foi determinado utilizando o método de extração por soxhlet. Foram pesados 2,0 g de amostra em balança analítica e transferidos para um cartucho preparado com papel filtro amarrado com fio de lã previamente desengordurado. O cartucho foi acoplado a um aparelho extrator do tipo soxhlet devidamente equipado com um balão de fundo chato previamente tarado e um condensador. Foi adicionado ao aparelho extrator uma quantidade em volume de um soxhlet e meio de éter de petróleo P.A. A extração foi feita sob aquecimento em chapa elétrica por 2 h com o

gotejamento de aproximadamente 4 a 5 gotas por minuto. Após o término da extração, o éter foi devidamente recuperado e os balões foram levados a estufa a temperatura de 105 °C onde foram mantidos durante 1 hora. Por fim, os balões foram resfriados em dessecador e pesados. A diferença no peso dos balões antes e após a extração forneceu o teor de lipídios totais presentes na amostra, como descrito pela Equação 6.

$$\% \text{ Lipídios} = \frac{100 \times N}{p} \quad (6)$$

Onde:

N = massa (g) de lipídios;

P = massa (g) da amostra.

3.2.7 Carboidratos Totais

A determinação do teor de carboidratos totais foi realizada através da subtração da soma dos resultados obtidos nas análises de determinação de proteínas, lipídios, fibras e cinzas do peso total dos cogumelos, conforme descrito por Sullivan, (1993). O cálculo desta diferença é representado pela Equação 7.

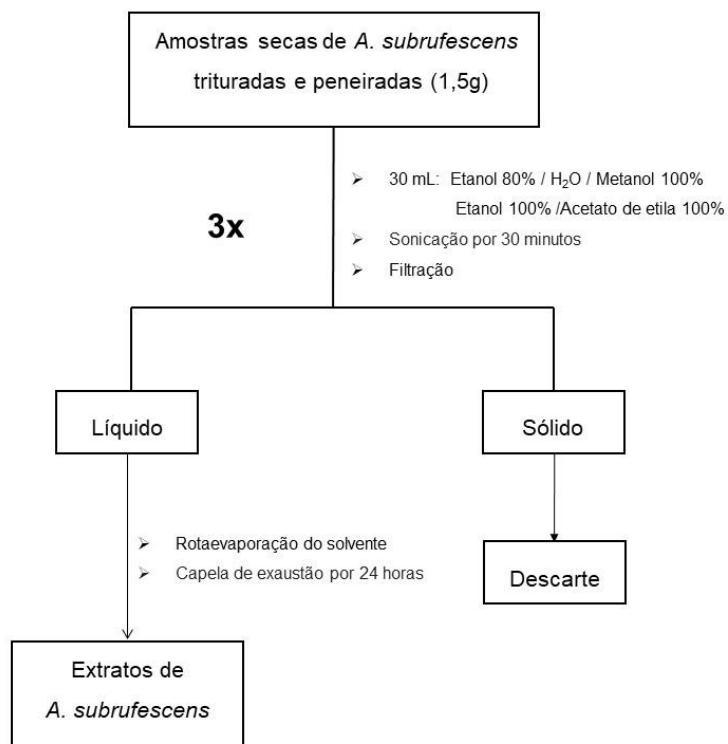
$$\% \text{ Carboidratos} = 100 - (\% \text{ proteínas} + \% \text{ lipídios} + \% \text{ cinzas} + \% \text{ fibras}) \quad (7)$$

3.3 Análise Cromatográfica

3.3.1 Preparo dos extratos

Para realização da escolha do melhor solvente a ser utilizado na diferenciação do perfil cromatográfico das amostras pela técnica de análise de fatores foi utilizado uma amostragem geral, denominada de “amostra 0” (ver Tabela 4) e o procedimento de extração está esquematizado na Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma dos processos de extração dos metabólitos secundários do *Agaricus subrufescens*.



Fonte: O próprio autor

Foram testados cinco solventes: acetato de etila P.A., metanol P.A., etanol P.A., etanol 80% e água Milli-Q para cada qual foram pesados 1,5 g de amostra e adicionados 30 mL do respectivo solvente. Em seguida, essas misturas foram sonicadas a 30 °C durante 30 minutos. Passado esse tempo, foi realizada uma filtração em papel filtro e o armazenamento dos filtrados. Este procedimento foi repetido por três vezes consecutivas, até um volume total de 90 mL. As soluções obtidas foram concentradas em rotaevaporador até a eliminação do solvente. O restante foi transferido para um frasco de massa conhecida e evaporado em capela de exaustão por 24 horas a temperatura ambiente. Dessa forma, um extrato para cada solvente foi obtido. Os cinco extratos secos obtidos foram então preparados a uma concentração de 10 mg mL⁻¹ e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodo (CLAE-UV/DAD).

O método de extração otimizado também foi realizado em escala reduzida (microextração) para as análises quimiométricas dos extratos acetálicos. Neste, adicionou-se 400,0 mg da amostra e 1 mL do respectivo solvente em um eppendorf, seguido de agitação em ultrassom por um período de 15 minutos. Após estas etapas a amostra foi levada para uma centrífuga onde foi deixada por 5 minutos com uma velocidade de 4000 rpm por minuto. O sobrenadante foi retirado, seco em capela de exaustão e solubilizado 100% de acetonitrila em uma concentração de 3,0 mg mL⁻¹ para a realização das análises cromatográficas em triplicata por CLAE-UV/DAD e posterior análise pela técnica de análise de fatores.

3.3.2 Análise por CLAE-UV/DAD

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido com detector de arranjo de diodos (SHIMADZU). Foi utilizada uma coluna analítica Phenomenex[®] com fase estacionária reversa C₁₈ (250 x 4,6 mm; d.i: 5 µm), e uma coluna analítica Synergi[™] C₁₈ (250 x 4,6 mm; d.i.; 4 µm). As fases móveis empregadas foram acetonitrila (solvente B) e água deionizada em sistema Milli-Q (solvente A), sendo as duas fases acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. As amostras, na concentração de 10 mg mL⁻¹ diluídas em 100% de acetonitrila, foram injetadas (20 µL), com vazão de 1,0 mL min⁻¹, a temperatura de 35 °C, e os cromatogramas foram registrados com varredura espectral de comprimento de onda na faixa de 190 a 400 nm, com monitoramento dos picos individuais a partir dos espectros de Ultravioleta (UV), foi feita a seleção do comprimento de onda fixo de 280 nm para as análises. As condições de eluição da fase móvel usadas nas análises cromatográficas estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Métodos utilizados na otimização das condições cromatográficas dos extratos de *A. subrufescens* (Fase Móvel: ACN:H₂O (0,1% de ácido fórmico); vazão de 1 mL min⁻¹, temperatura ambiente; volume de injeção de 20 µL de solução de 10 mg mL⁻¹).

Método	Coluna	Gradiente
A	Phenomenex® C ₁₈ (250 x 4,6 mm; d.i: 5 µm)	<ul style="list-style-type: none"> • 5-100% B* em 40 min.
B	Phenomenex® C ₁₈ (250 x 4,6 mm; d.i: 5 µm)	<ul style="list-style-type: none"> • 0-5 min : 5% B. • 5-35 min : 5-55% B. • 35-36 min : 55-80%B. • 36-40 min : 80-100%B.
C	Synergi™ C ₁₈ (250 x 4,6 mm; d.i.: 4 µm)	<ul style="list-style-type: none"> • 0-10 min : 1%B. • 10-40 min : 1-55% B. • 40-41 min : 55-80% B. • 41- 55 min : 80-100%B.
D	Phenomenex® C ₁₈ (250 x 4,6 mm; d.i: 5 µm)	<ul style="list-style-type: none"> • 0-28 min : 5-70% B. • 28-40 min : 70% B . • 40-55 min : 70-100%B.

*Solvente B: acetonitrila grau HPLC.

3.3.3 Identificações das substâncias presentes no extrato de *A. subrufescens*

3.3.3.1 Análise por CL-EM

As análises por CL-EM foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido (Shimadzu®) acoplado a um espectrômetro de massas (Amazon SL Bruker®) do tipo *ion-trap*, equipado com fonte de ionização do tipo eletro-spray (ESI). As análises foram realizadas em modo positivo e negativo com fragmentação até MS₃, faixa de íons detectada de 50-1200, e energia de ionização de 50 V. O *software Bruker Compass DataAnalysis 4.3*® foi utilizado para a análise dos dados. Os extratos hidroalcoólico e acetálico foram preparados a partir da amostragem geral de todas as amostras de *A. subrufescens* conforme o método descrito na seção 3.3.1, empregando-se o método cromatográfico descrito pelo método D apresentado pela Tabela 5. Os resultados obtidos foram comparados com os dados da literatura para a identificação de compostos conhecidos.

3.4 Análise de fatores aplicada à análise química e metabolômica

Os dados obtidos da análise química foram dispostos em forma de uma matriz **X** (66x6), no qual as linhas representam as amostras (em duplicata) e as colunas representam os teores calculados de carboidratos, lipídios, fibras, proteínas, cinzas e umidade. Para o processamento dos dados utilizou-se o *software Statistica 7.0*. Foi aplicado o método de pré-processamento de dados denominado de auto escalamento e o método utilizado para análise dos dados foi a análise de fatores.

Os cromatogramas obtidos em triplicata para os extratos de acetato de etila foram dispostos em uma matriz 99x3750 (99 cromatogramas/amostras por 3750 variáveis/absorbâncias nos diferentes tempos de retenção), no qual as linhas representaram o tempo em minutos e as colunas as absorbâncias obtidas para cada amostra. Para o processamento dos dados utilizou-se o *software Statistica 7.0* e para plotagem dos gráficos de *loading* utilizou-se o *software OriginPro 8.5*.

Não foi necessário a aplicação de nenhum método de pré-processamento de dados e o método quimiométrico utilizado foi a análise de fatores.

3.5 Quantificação de Fenóis Totais

A determinação de fenóis totais foi realizada seguindo o método descrito por Swain e Hills (1959), com adaptações. Foram pesados 5,0 mg de cada amostra em um *ependorf*, em seguida foi adicionado 1 mL de etanol 80% e o mesmo foi levado ao aquecedor/agitador a 60 °C e 500 rpm por 3 h. Após este período, as amostras foram levadas a uma centrífuga onde foram mantidas à 4000 rpm por 10 min. Em seguida, foram retirados 100 µL do sobrenadante (extrato) e esse volume foi transferido para um *ependorf* de 2 mL, onde foram adicionados 1500 µL de H₂O Milli-Q e 100 µL do reagente *Folin Ciocalteu*. A mistura foi mantida por 5 min à temperatura ambiente e, após este período, foram adicionados 300 µL de Na₂CO₃. Em seguida, as amostras foram simultaneamente aquecidas a 40 °C e agitadas a 500 rpm durante 30 min e a leitura foi realizada em cubeta de 3 mL em $\lambda = 765$ nm. O padrão utilizado para construção da curva de calibração foi o ácido gálico através da

qual obteve-se a equação da reta e realizou-se a quantificação dos compostos fenólicos expressos em mg de equivalente de ácido gálico/100g de cogumelo seco.

3.6 Determinação da Capacidade Antioxidante

3.6.1 Ensaio da capacidade redutora do radical DPPH'

A capacidade antioxidante dos extratos e do padrão (ácido gálico) foram avaliados em termos da redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH'). O ensaio do DPPH' foi então realizado de acordo com o procedimento descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com algumas modificações. Foram pesados 5,0 mg de amostra em um *eppendorf*, em seguida foi adicionado 1 mL de etanol 80% e o mesmo foi levado a incubadora a 60 °C e 500 rpm por 3 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi separado do precipitado.

Foram retirados 333,3 µL do sobrenadante e adicionados 654,2 µL de etanol 80%, 12,5 µL de DPPH 8,0 mmol L⁻¹. A reação ocorreu na ausência da luz por 1 h. A absorbância foi medida em cubeta de quartzo com capacidade de 1 mL em λ = 517 nm. A porcentagem de DPPH' reduzido foi calculada utilizando a Equação 9 e os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico/100g de cogumelo seco. Todos os testes foram realizados em triplicata.

$$\% \text{ DPPH' reduzido} = \frac{[(\text{Abs. controle} - \text{Abs da amostra})]}{\text{Abs. controle}} \quad (9)$$

3.6.2 Ensaio da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

O método ORAC relatado por Huang; Mau, (2006) com algumas modificações foi utilizado para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos de *A. subrufescens*. Inicialmente foi preparada uma solução do reagente AAPH (azobis-amidinopropano, 88,0 mmol L⁻¹) utilizando tampão glicina (pH 8,3). Em seguida, a solução estoque de

fluoresceína ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) também foi preparada em tampão de glicina (pH 8,3) e mantida a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ no escuro. No dia do ensaio, a solução estoque de fluoresceína foi diluída em tampão glicina (pH 8,3) de modo a obter uma solução de concentração $6,45 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Foram pesados 5,0 mg de cada amostra em um *ependorf* seguido da adição de 1 mL de etanol 80%, e o mesmo foi levado a uma incubadora shaker com aquecimento ($60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 500 rpm) por 3 h. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi separado do precipitado. Em seguida, em uma microplaca de 96 poços de paredes pretas, foram adicionados 30 μL de fluoresceína e 20 μL do sobrenadante. Esta mistura foi incubada a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min e em seguida a reação foi iniciada pela adição de 50 μL de AAPH. A fluorescência foi monitorada de 5 em 5 minutos durante 3 horas em um leitor de microplacas utilizando filtros de excitação em 485 nm e filtros de emissão em 528 nm. As medições finais de fluorescência foram expressas relativas ao controle de leitura. Para os ensaios de controle, os compostos testados foram substituídos pelo correspondente volume de tampão glicina, sob condições idênticas (valor considerado como 100%). Todas as determinações foram realizadas em triplicata. O padrão utilizado para construção da curva de calibração foi o ácido através da qual obteve-se a equação da reta e realizou-se a quantificação dos compostos fenólicos expressos em g de equivalente de ácido gálico/100g de cogumelo seco.

3.6.3 Ensaio do poder de redução do Ferro (FRAP)

A atividade antioxidante avaliada quanto ao poder de redução do ferro foi medida pelo método de Carneiro et al., (2013) com modificações. A solução FRAP foi preparada pela adição de 10 mL de tampão acetato ($300,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e pH 3,6) a 1 mL da solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em HCl $40,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e 1 mL da solução de cloreto férrico $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Tendo a solução reagente preparada, 5,0 mg de cada amostra foram pesados em um *ependorf*, seguido da adição de 1 mL de etanol 80% e o mesmo foi levado a uma incubadora shaker com aquecimento a $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 500 rpm por 3 h. Após este período, as amostras foram

centrifugadas a 4000 rpm por 10 min. Em seguida, 10 µL do sobrenadante foram transferidos para uma microplaca de 96 poços, onde foi adicionado juntamente 240 µL do reagente FRAP. Após 10 minutos de incubação a 37 °C, os dados de absorbância foram registrados em 595 nm. As análises foram realizadas em triplicata. O padrão utilizado para construção da curva de calibração foi o ácido através da qual obteve-se a equação da reta e realizou-se a quantificação dos compostos antioxidantes expressos em mg de equivalente de ácido gálico/100g de cogumelo seco.

3.6.4 Análise Estatística

O tratamento estatístico dos valores obtidos na análise da composição química dos suplementos, e nos testes de fenóis totais e antioxidantes das amostras de cogumelo foram realizados através da Análise de Variância (ANOVA), e os resultados encontrados foram comparados utilizando o Teste de Tukey ao nível de confiança de 95%. O teste foi realizado utilizando o *software Sisvar 5.6 (Build 86)*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição Química dos suplementos

Os resultados da análise química dos suplementos utilizados para suplementação das amostras do cogumelo *A. subrufescens* estão descritos pela Tabela 6 e foram utilizados para discutir os resultados obtidos através da análise química dos cogumelos suplementados neste trabalho descrito pelo item 4.2.1.

Tabela 6 - Análise química dos suplementos utilizados na suplementação das amostras de *Agaricus subrufescens**

Suplemento	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteína Bruta (%)	Fibra Bruta (%)	Lipídios (%)	Carboidratos (%)
Amendoim Formol	3,130±4,6 ^a	6,315±0,5 ^b	26,545±1,5 ^a	54,120±8,2 ^d	4,405±0,8 ^c	8,615±7,7 ^a
Amendoim	6,410±4,3 ^b	6,565±0,3 ^b	36,825±11,5 ^b	37,55±6,6 ^{bc}	6,063±12,3 ^e	12,893±30,4 ^b
Fruta Formol	7,260±3,4 ^c	7,913±13,0 ^c	25,419±9,0 ^a	49,978±0,9 ^{cd}	1,598±0,9 ^b	15,094±22,1 ^b
Fruta	6,970±1,3 ^{bc}	8,9925±2,8 ^c	30,054±2,5 ^{ab}	35,650±6,5 ^{bc}	1,310±4,3 ^b	23,994±28,4 ^{ab}
Combinação Formol	5,680±5,2 ^b	6,935±0,9 ^b	31,830±7,4 ^b	17,550±8,9 ^a	0,60±0,7 ^a	43,075±14,7 ^c
Combinação	4,870±2,1 ^{ab}	7,9275±3,7 ^c	30,054±7,5 ^{ab}	20,155±8,6 ^{ab}	0,62±0,3 ^a	41,244±12,5 ^c
Mistura Formol	5,950±3,0 ^b	7,542±3,5 ^c	29,885±1,2 ^{ab}	42,375±3,0 ^c	4,040±1,3 ^c	16,358±1,9 ^b
Mistura	6,620±2,3 ^b	4,000±0,1 ^a	22,756±26,4 ^a	61,250±2,9 ^e	1,68±1,7 ^b	10,314±21,8 ^a
<i>Champfood</i>	4,578±2,7 ^{ab}	4,410±1,0 ^a	40,415±6,1 ^d	28,365±10,1 ^b	0,873±0,2 ^a	37,840±2,9 ^c
Setas	6,050±2,0 ^b	6,935±0,9 ^b	28,365±10,0 ^{ab}	40,415±6,2 ^c	1,078±0,5 ^{ab}	37,565±3,0 ^c

*Resultados expressos em base seca (média ± desvio padrão, n=3).

*Letras diferentes, na mesma coluna, são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.2 Composição Química das amostras de *A. subrufescens*

Os resultados obtidos através das análises da composição química, conforme descrito na Tabela 7, apresentaram uma grande quantidade de dados a serem discutidos e relacionados, por isso foram submetidos à ferramenta multivariada de análise de fatores, com a finalidade de extrair o máximo de informações químicas possíveis.

Tabela 7 – Análise da composição química do cogumelo *A. subrufescens**

Código	Umidade (%)	Cinzas (%)	Nitrogênio Total (%)	Proteína Bruta (%)	Fibra Bruta (%)	Lipídios (%)	Carboidrato (%)
1	6,485 ± 0,21	6,910 ± 0,14	5,515 ± 0,21	24,189 ± 0,46	25,463 ± 0,41	2,110 ± 0,11	41,328
2	6,490 ± 0,28	6,975 ± 0,49	6,395 ± 0,21	27,977 ± 0,46	23,264 ± 0,55	1,315 ± 0,07	40,469
3	6,885 ± 1,20	6,492 ± 0,12	5,998 ± 0,11	26,289 ± 0,25	25,019 ± 0,82	1,575 ± 0,35	40,625
4	7,495 ± 0,07	6,993 ± 0,10	5,748 ± 0,11	25,158 ± 0,23	25,449 ± 0,93	1,650 ± 0,28	40,751
5	6,010 ± 0,14	7,023 ± 1,10	5,565 ± 0,21	24,342 ± 0,46	22,001 ± 0,19	1,095 ± 0,04	46,439
6	7,005 ± 0,07	6,268 ± 0,48	5,554 ± 1,83	24,611 ± 4,00	22,946 ± 0,46	1,775 ± 0,07	44,400
7	6,995 ± 0,07	7,240 ± 0,14	5,725 ± 0,07	25,065 ± 0,15	21,688 ± 0,54	2,05 ± 0,06	45,802
8	6,980 ± 0,14	6,120 ± 0,14	5,740 ± 0,14	25,163 ± 0,31	22,958 ± 0,27	1,965 ± 0,64	43,794
9	5,365 ± 0,14	6,805 ± 0,07	6,150 ± 0,71	27,047 ± 1,55	22,045 ± 0,86	1,695 ± 0,35	42,409
10	6,960 ± 0,14	6,695 ± 0,07	5,905 ± 0,07	25,875 ± 0,15	20,359 ± 0,52	1,785 ± 0,21	45,286
11	6,480 ± 0,14	6,740 ± 0,14	6,756 ± 0,20	29,621 ± 0,45	24,100 ± 1,01	2,060 ± 0,85	37,479
12	7,010 ± 0,14	6,725 ± 0,07	6,620 ± 0,14	29,018 ± 0,31	22,312 ± 0,63	1,805 ± 0,21	40,140
13	6,460 ± 0,14	7,010 ± 0,28	6,045 ± 0,78	26,598 ± 1,70	22,962 ± 0,95	1,930 ± 0,14	41,500
14	6,505 ± 0,07	6,390 ± 0,14	6,641 ± 1,85	28,800 ± 4,05	24,497 ± 0,08	2,860 ± 0,14	37,454
15	5,505 ± 0,07	6,695 ± 0,07	6,935 ± 0,64	30,474 ± 1,39	17,975 ± 0,37	2,805 ± 0,35	42,051
16	5,005 ± 0,07	6,990 ± 0,14	6,465 ± 0,07	28,328 ± 0,15	22,029 ± 0,31	1,970 ± 0,05	40,683
17	6,005 ± 0,07	6,755 ± 0,92	6,829 ± 2,14	30,241 ± 4,56	24,240 ± 0,56	1,735 ± 0,07	37,029
18	6,510 ± 0,14	7,010 ± 0,14	6,915 ± 0,21	30,321 ± 0,46	24,095 ± 1,00	1,095 ± 0,07	37,479
19	6,210 ± 0,14	6,970 ± 0,05	6,593 ± 2,00	28,565 ± 4,38	18,976 ± 0,40	3,685 ± 0,49	41,804
20	6,900 ± 0,05	6,365 ± 0,07	7,252 ± 0,12	31,744 ± 0,26	20,804 ± 0,06	1,865 ± 0,07	39,223
21	5,995 ± 0,07	6,600 ± 0,14	7,005 ± 0,35	30,627 ± 0,77	23,397 ± 0,86	1,840 ± 0,03	37,536
22	5,490 ± 0,14	6,970 ± 0,98	6,461 ± 0,05	28,293 ± 0,11	23,279 ± 3,41	2,555 ± 0,78	38,904
23	7,430 ± 0,42	6,770 ± 0,04	6,380 ± 0,14	27,923 ± 0,31	22,954 ± 0,80	1,250 ± 0,71	41,104
24	4,940 ± 0,57	7,045 ± 0,07	7,515 ± 0,21	32,949 ± 0,46	19,071 ± 1,62	2,375 ± 0,35	38,561
25	6,005 ± 0,07	7,210 ± 0,01	6,630 ± 0,42	29,105 ± 0,93	22,700 ± 1,58	2,020 ± 0,28	38,965
26	6,010 ± 0,14	6,375 ± 0,08	5,846 ± 0,05	25,599 ± 0,11	20,891 ± 0,17	1,905 ± 0,07	45,231
27	4,495 ± 0,07	6,630 ± 0,14	6,907 ± 0,23	30,287 ± 0,51	22,930 ± 1,72	2,190 ± 0,99	37,963
28	6,005 ± 0,07	6,720 ± 0,14	6,510 ± 0,14	28,536 ± 0,31	24,347 ± 0,92	1,760 ± 0,42	38,637
29	6,000 ± 0,05	6,423 ± 0,10	6,780 ± 0,14	29,675 ± 0,31	22,199 ± 0,30	1,415 ± 0,07	40,289
30	5,535 ± 0,92	6,875 ± 0,07	7,341 ± 0,05	32,152 ± 0,03	21,572 ± 0,50	1,538 ± 0,37	37,863
31	6,005 ± 0,07	6,760 ± 0,08	5,775 ± 0,21	25,327 ± 0,46	23,990 ± 0,50	1,798 ± 0,31	42,124
32	6,465 ± 0,35	6,670 ± 0,14	7,012 ± 0,67	30,609 ± 1,46	24,044 ± 1,08	2,465 ± 0,07	36,212
33	6,505 ± 0,07	6,955 ± 0,07	7,767 ± 0,37	34,075 ± 0,80	24,038 ± 0,89	1,469 ± 0,71	33,372

*Resultados expressos em base seca (média ± desvio padrão, n=3).

Os resultados de nitrogênio total e carboidratos não foram incluídos nesta técnica, uma vez que, estes resultados possuem uma correlação direta com os demais testes e não ocasionariam mudanças no resultado apresentado pela análise de fatores.

4.2.1 Análise de fatores dos resultados obtidos pelas análises da composição química

Os dados obtidos através das análises da composição química do cogumelo *A. subrufescens* apresentaram resultados com grandezas diferentes e por isso houve a necessidade da realização de um pré-processamento denominado de auto escalamento. Este processamento é muito utilizado quando se tem amostras com valores muito divergentes, como é o caso dos valores de lipídios que giram em torno de 20 g kg⁻¹ e os resultados de proteína bruta que apresentam uma média de 280 g kg⁻¹, fazendo com que se atribua a mesma importância a todas as variáveis. Desta forma, nesta técnica o valor de cada variável é subtraído de sua média e, então, dividido pelo desvio padrão; neste caso a média é igual a zero e o desvio padrão igual a 1 (HONGYU; JORGE; JUNIOR, 2015).

O resultado da aplicação desta técnica quimiométrica está descrito na Figura 6 (gráfico de *loading*) no qual o Fator 1 é capaz de explicar 37,68% dos dados e o Fator 3, 18,32%, resultando em 56% da variância total dos resultados. Estes dados demonstram que, pelo Fator 1, todas as amostras que estão na região negativa apresentam em sua composição maiores correlações com os teores de cinzas, lipídios e proteína bruta, enquanto que o lado positivo com os teores de umidade e fibras. Já para o Fator 3, os valores negativos estão correlacionados com os teores de cinzas e lipídios e umidade e os positivos com os teores de proteína bruta e fibras.

Relacionando o gráfico de *loadings* com o gráfico de *scores* (Figura 7) é possível verificar que as linhagens JP, T2 e ABZ obtiveram comportamentos diferentes mesmo quando suplementadas com o mesmo tipo de suplemento, já que cada amostra se enquadrou de forma distinta no gráfico de *scores*, representadas respectivamente pelas cores vermelha, verde e rosa. Isto pode ser explicado devido à diferença na origem de cada uma (Brasil, Bélgica e Japão), que pode ocasionar o desenvolvimento diferente na composição química mesmo quando cultivadas da mesma forma. Furlani e Godoy (2005) citam ainda que estas diferenças podem ser provenientes de algumas mudanças genéticas que as espécies de cogumelo comestíveis vêm sofrendo ao decorrer dos anos com o intuito de se produzir cogumelos mais ricos em um determinado nutriente.

Figura 6 - Gráfico de *loading* do Fator 1 versus Fator 3 obtido através do estudo da análise química das amostras de *Agaricus subrufescens*.

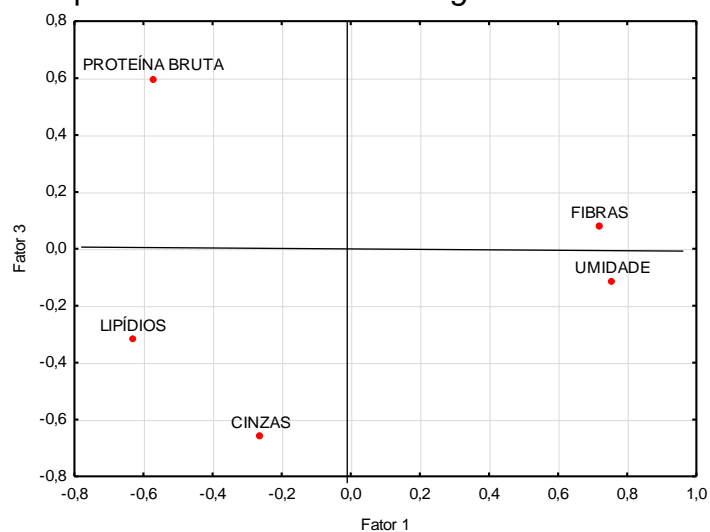
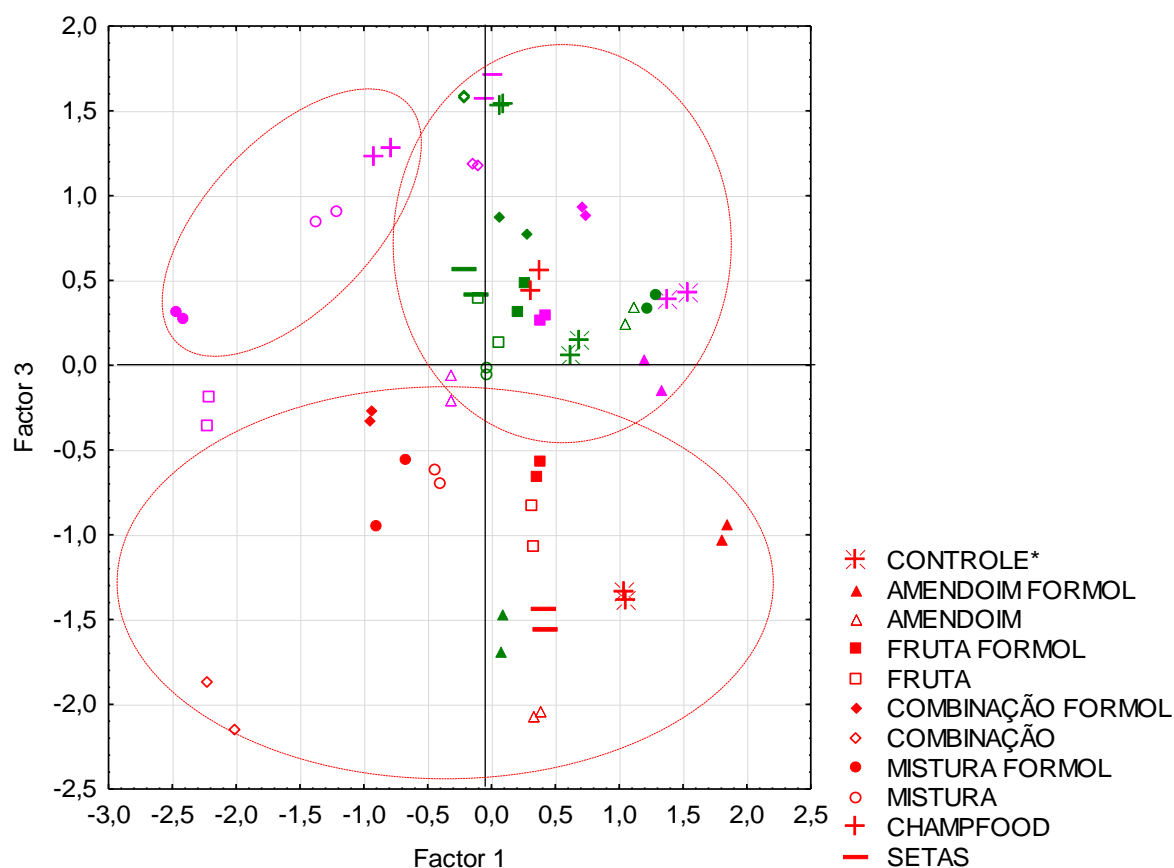


Figura 7 - Gráfico de *scores* do Fator 1 versus Fator 3 obtido através do estudo da análise química das amostras de *Agaricus subrufescens*.*



*Vermelho: Linhagem JP (proveniente do Japão); Verde: Linhagem T2 (proveniente da Bélgica); Rosa: Linhagem ABZ (proveniente do Brasil).

A linhagem JP, com exceção a amostra 28 (suplementada com *champfood*), apresentou um perfil semelhante, nas quais, independentemente do tipo de suplementação utilizada, todas obtiveram correlações com os teores de cinzas e lipídios pelo Fator 3, enquadrando-se no lado negativo desta componente, ou seja, neste caso a composição química dos suplementos não influenciou a composição final das amostras em questão. Em relação ao Fator 1 as amostras foram divididas de acordo com o tipo de suplemento. As amostras suplementadas com os suplementos: amendoim, amendoim formol, fruta, fruta formol, setas foram discriminadas em relação aos teores de fibras e umidade juntamente com a amostra controle, sendo que estes suplementos, com exceção do amendoim, apresentaram resultados estatisticamente iguais entre si, com resultados intermediários no teste de proteína bruta (ver Tabela 6), o que justifica a similaridade na composição química final destes cogumelos. Já as amostras suplementadas com combinação, combinação formol, mistura e mistura formol foram correlacionadas com os teores de lipídios, demonstrando que neste caso, a composição química dos suplementos não influenciou a composição deste nutriente no cogumelo, visto que, o teor de lipídios variou de 0,5% até 4,04%, um dos menores e maiores resultados do teste feito nos suplementos, respectivamente. A única exceção para a linhagem JP foi a amostra 28, suplementada com o suplemento comercial *champfood* que apresentou correlação com os teores de proteína e fibra bruta, se mostrando com valor nutritivo mais alto do que as demais amostras desta linhagem. Segundo Zied e colaboradores (2018), o suplemento comercial *champfood* é o mais indicado para a produção do *A. subrufescens* disponível no mercado atualmente e, de acordo com sua pesquisa, apresenta também os melhores resultados em relação à produtividade quando comparado aos demais suplementos.

Já as linhagens ABZ e T2 apresentaram, de uma forma geral, maiores correlações com os teores de fibras e proteínas, e, conseqüentemente, menores quantidades de cinzas, lipídios e umidade, conforme descrito pelo Fator 3. Onde, pôde-se perceber que a composição química do suplemento não influenciou diretamente a composição dos cogumelos destas duas linhagens.

Assim, as amostras da linhagem ABZ suplementadas com: mistura formol, mistura e *champfood* mesmo não apresentando os maiores resultados no teste de proteínas, para os suplementos, ocasionaram a produção de cogumelos com maiores correlações com este nutriente, discriminadas pelo lado negativo do Fator 1, o que enaltece o valor nutricional destas amostras. Segundo Furlani e Godoy (2007), a produção de *A. subrufescens* com altos teores de proteína bruta e baixas quantidades de lipídios tem sido o alvo de diversos produtores de cogumelo, uma vez que este fungo pode ser introduzido na dieta de pessoas que possuem carência de proteínas ou para aqueles cuja dieta possui restrições à gorduras. Outro fator observado é a presença do suplemento comercial *champfood* agrupado com três suplementos artesanais, produzidos a partir de resíduos industriais, caracterizando a eficiência na suplementação do cultivo destes cogumelos, uma vez que, proporcionaram uma quantidade de nutrientes similares ao suplemento comercial utilizado como um padrão para os resultados obtidos.

Já as amostras (T2: controle; amendoim; fruta, fruta formol; combinação formol; *champfood* e ABZ: combinação formol; fruta formol; controle; amendoim formol) discriminadas pelo lado positivo do Fator 1 apresentaram em sua composição maiores correlações com os teores de fibras, mesmo contendo suplementos que apresentaram um dos menores resultados obtidos no teste de fibras, favorecendo a composição química final deste cogumelo, visto que, segundo Monteiro et al. (2005), alimentos ricos em fibras são essenciais na dieta de algumas pessoas, pois este nutriente possui a capacidade de acelerar o tempo de excreção do bolo fecal e, conseqüentemente, reduzir a sua residência no intestino, acarretando na diminuição dos riscos de desenvolvimento de doenças como o câncer de cólon e de reto. No entanto é importante salientar que as amostras da linhagem ABZ e T2 localizadas neste quadrante (superior-esquerdo) estão agrupadas com as suas respectivas amostras controle, o que faz desnecessária a suplementação neste tipo de amostra, pois de acordo com Zied e colaboradores, (2018), esta similaridade pode ser ocasionada pela suficiência de nutrientes no substrato de cultivo, não necessitando da adição de um suplemento.

Desta forma, fica claro que a origem da linhagem influencia diretamente a forma de desenvolvimento do cogumelo *A. subrufescens*, visto que, a composição química de um suplemento não ocasionará, necessariamente, o desenvolvimento de cogumelos com o mesmo perfil químico, como já havia sido citado por Furlani e Godoy (2005) no início da discussão deste tópico.

4.2 Análise Cromatográfica

4.2.1 Escolha do solvente extrator e análise inicial por CLAE-UV/DAD

Os cinco extratos de *A. subrufescens* especificados na Tabela 6, obtidos através do método de extração descrito por Carvajal e colaboradores (2012), com modificações, foram analisados por CLAE-UV/DAD com o intuito de se obter dados sobre o comportamento das amostras na presença de solventes com diferentes polaridades. A Tabela 8 apresenta as massas e os rendimentos obtidos a partir de 1,5 g de amostras de cogumelo.

Tabela 8 – Massas e rendimentos obtidos dos extratos preparados a partir da mistura das amostras de *A. subrufescens*.

Código	Massa (g)	Rendimento (%)
AS0*_EtOH80%	0,8166	27,10
AS0_EtOH100%	0,1297	8,62
AS0_MeOH100%	0,5433	36,17
AS0_H ₂ O100%	0,8806	59,01
AS0_AcOEt100%	0,0268	1,85

*AS0 = Mistura das amostras de cogumelo *A. subrufescens* cultivados com diferentes suplementos artesanais e comerciais

Analisando a Tabela 8, é possível perceber que os solventes etanol 80% ($\epsilon_r = 60,6$), metanol 100% ($\epsilon_r = 33$) e água 100% ($\epsilon_r = 80,4$) apresentaram valores de rendimento acima de 10%, em decorrência do caráter mais polar destes compostos podendo ter extraído compostos como os açúcares, aumentando assim, a massa e

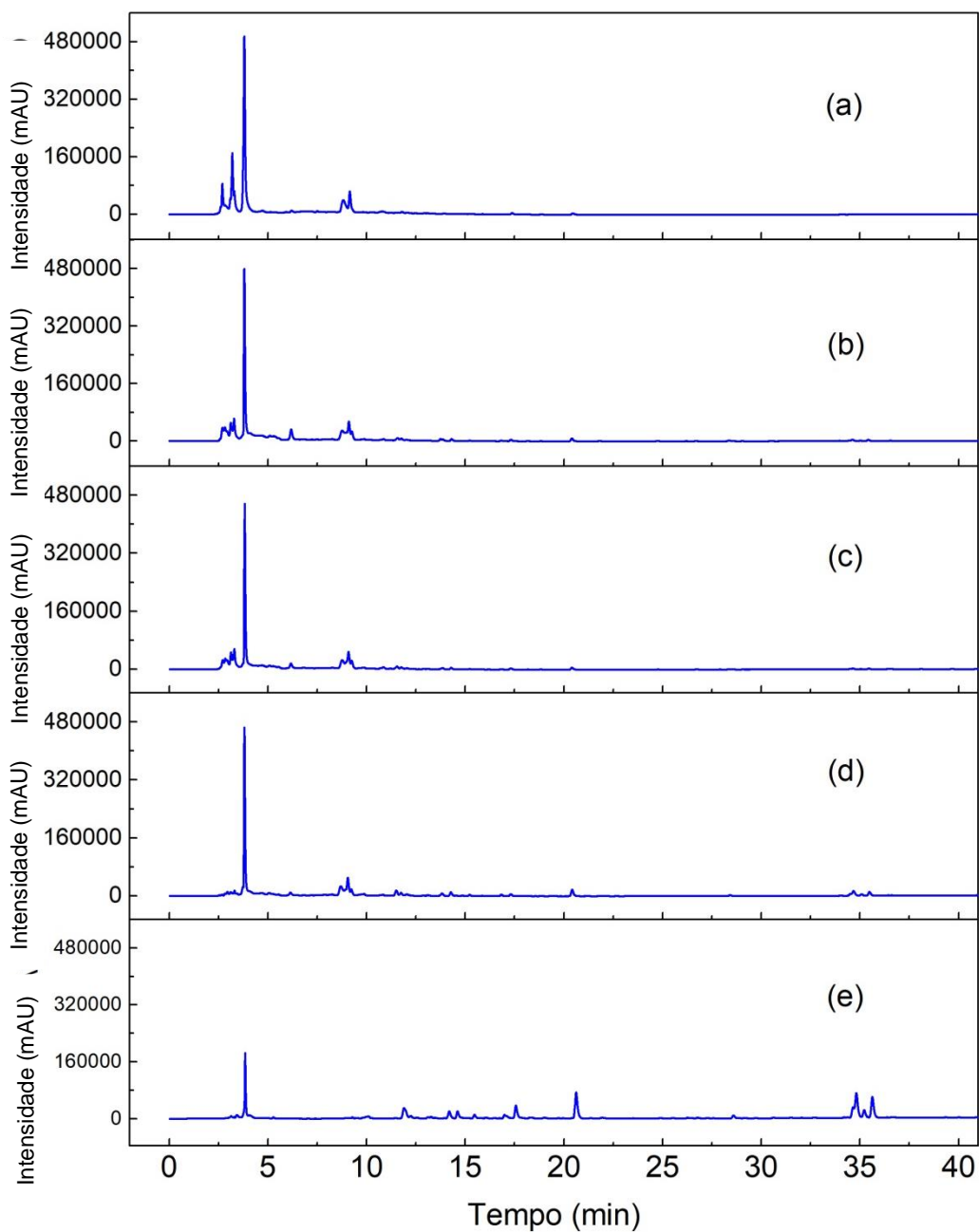
rendimento final destes solventes. Já os solventes etanol 100% ($\epsilon_r = 25,0$) e acetato de etila 100% ($\epsilon_r = 6,02$) apresentaram valores abaixo deste percentual, demonstrando que as características de cada solvente proporcionam extrações diferentes em uma mesma amostra. No entanto, para a análise de diferenciação das amostras por cromatografia líquida, outros parâmetros devem ser levados em consideração, tais como a quantidade de substâncias e a intensidade dos picos presentes nas amostras.

Assim, os extratos foram analisados por CLAE-UV/DAD utilizando inicialmente um gradiente exploratório (5-100% B em 40 minutos), denominado de método A (Tabela 5). Os cromatogramas foram adquiridos em uma faixa de 200 – 400 nm, sendo que o comprimento de onda em que foi possível observar uma maior quantidade de picos foi em 280 nm. Os cromatogramas obtidos nesta etapa estão representados na Figura 8.

Foi possível observar uma grande similaridade entre os perfis cromatográficos dos extratos aquosos, representados pela Figura 8 (a), (b) e (c), respectivamente. Observou-se que o alto grau de polaridade desses solventes ocasionou a extração de compostos com esta mesma característica. Já os extratos hidroalcoólico e acetálico (Figura 8 (d) e (e), respectivamente), apresentaram cromatogramas com uma grande variedade de polaridade de compostos. Porém, apesar de os extratos hidroalcoólico e acetálico apresentarem alguns picos semelhantes, o acetálico apresentou maiores quantidades de picos e separação eficiente, ou seja, este solvente é, dentre os apresentados, o mais adequado para prosseguir para a etapa de diferenciação da composição química dos cogumelos gerada pela suplementação, sendo escolhido para realização da etapa de micro extração de todas as amostras citadas.

No entanto, além da escolha do solvente acetato de etila, foram realizadas ainda alguns experimentos para se obter o aumento da resolução dos picos dos demais cromatogramas, a fim de se obter uma separação cromatográfica mais eficiente, em razão do rendimento destes terem sido significativamente maiores.

Figura 8 - Perfis cromatográficos (CLAE-UV/DAD) em $\lambda = 280$ nm dos extratos realizados com a amostra "0" extraídos com diferentes tipos de solventes: (a) Água 100%; (b) Etanol 80%; (c) Metanol 100%; (d) Etanol 100%; (e) Acetato de etila 100%. Fase móvel: Acetonitrila (fase B) e água Milli-Q (fase A), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. Coluna Phenomenex® C₁₈-Luna (250 x 4,6 mm, d.i.; 5 μ m), vazão de 1 mL min⁻¹. Gradiente exploratório: 5-100% B em 40 minutos.



4.2.2 Otimização das condições cromatográficas

A otimização das análises cromatográficas foi realizada por meio da otimização do tempo de análise e do gradiente de eluição, já a fase móvel e sua vazão foram mantidos conforme descrito anteriormente. Como já discutido, foi possível observar um alto grau de polaridade nas substâncias presentes nos extratos obtidos com maior rendimento (metanoico e hidroalcoólico), resultando na eluição de praticamente todas as substâncias detectadas em um tempo inferior a 10 minutos (ver Figura 8). Desta forma, com o intuito de melhorar a separação cromatográfica, visto que o solvente acetato de etila apesar de ter apresentado um perfil cromatográfico com maior número de picos, foi o solvente que apresentou o menor rendimento, realizou-se então uma modificação do método de eluição da fase móvel, empregando um platô isocrático em 5% B durante 5 minutos, seguido de um gradiente de 5 a 55% B durante 30 minutos, gradiente de 55 a 80 %B até 31 minutos, e por fim um gradiente de 80 a 100 %B até 45 minutos, totalizando 51 minutos de corrida, sendo esse método chamado de método B. O cromatograma obtido para os extratos Metanol 100% e Etanol 80% empregando o método B é mostrado na Figura 9.

Neste segundo método pôde-se observar uma melhora na separação dos compostos, porém, a maioria dos picos de interesse ainda coeluíram no início da coluna. De modo a solucionar esta questão, uma alternativa foi mudar a coluna para alguma que fosse possível atingir valores de %B ainda mais baixos que 5% B (valor mínimo recomendado pela Phenomenex, sem prejudicar a coluna). A coluna Synergi C₁₈ (250 x 4,6 mm, d.i.; 4 µm) foi utilizada e o gradiente do método C foi empregado, que consiste em uma condição de análise muito similar ao Método B, porém, iniciou-se a análise com 1% B ao invés de 5% B. Este teste foi realizado apenas com o extrato hidroalcoólico, para uma avaliação inicial das possíveis melhoras no método O cromatograma obtido para essa etapa é mostrado na Figura 10.

Figura 9 - Perfis cromatográficos (CLAE-DAD) em $\lambda = 280$ nm dos extratos (a) Metanol 100%; (b) Etanol 100%; obtidos da amostra "0" utilizando: Fase móvel: Acetonitrila (fase B) e água Milli-Q (fase A), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. Coluna Phenomenex® C₁₈-Luna (250 x 4,6 mm, d.i.; 5 μ m), vazão de 1 mL min⁻¹. Método B.

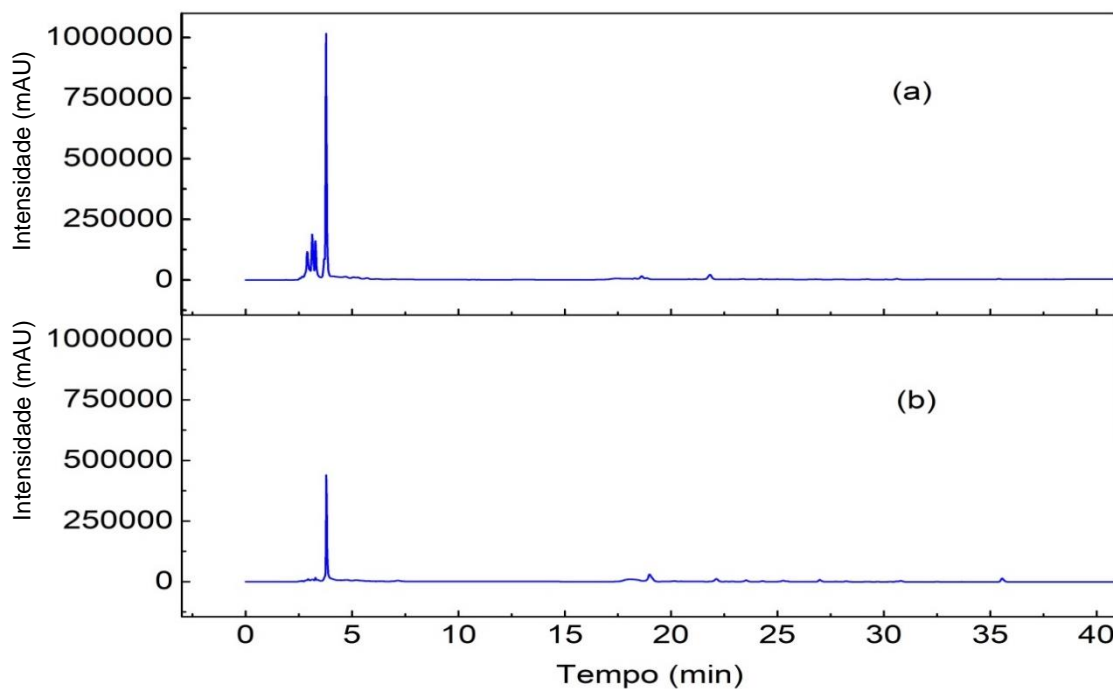
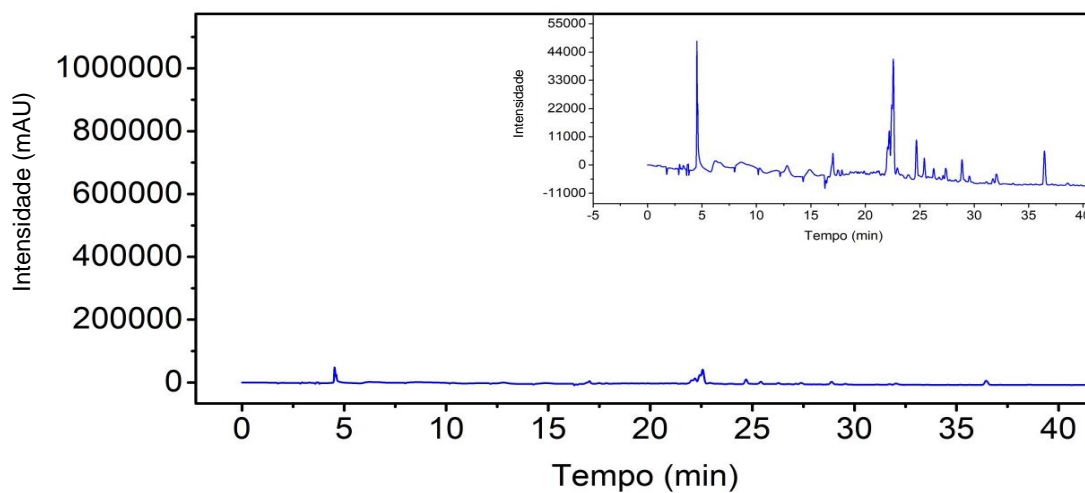


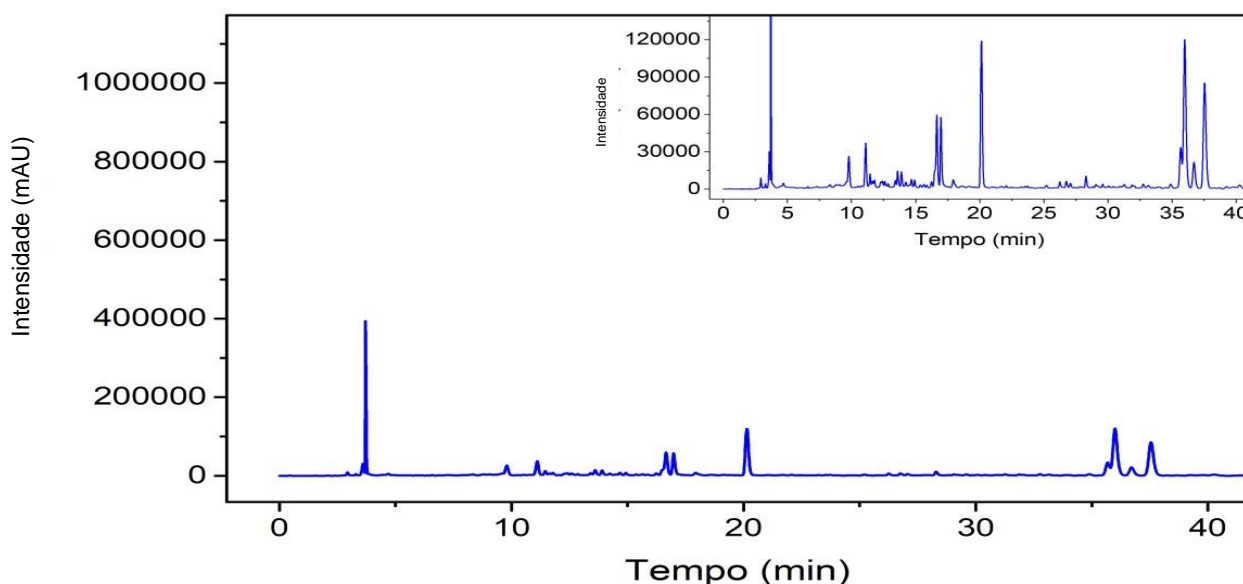
Figura 10 - Perfil cromatográfico (CLAE-DAD) em $\lambda = 280$ nm do extrato hidroalcoólico da amostra "0". Fase móvel: Acetonitrila (fase B) e água Milli-Q (fase A), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. Coluna Synergi TM C18 (250 x 4,6 mm; d.i.: 4 μ m), vazão de 1 mL min⁻¹. Método C.



No entanto, observou-se que o cromatograma obtido empregando a coluna Synergi não apresentou resultados satisfatórios, uma vez que apresentou picos largos e com baixa intensidade, uma linha de base deformada, além de um cromatograma com baixa resolução.

Tendo em vista que o resultado obtido com a coluna Phenomenex C₁₈ para o extrato acetato de etila da amostra "0" (mistura das amostras de cogumelo *A. subrufescens* cultivados com diferentes suplementos artesanais e comerciais) foi bastante interessante devido à intensidade e quantidade de picos (Figura 8 e), essa coluna voltou a ser empregada e um pequeno ajuste da região mais apolar (próximo de 35 minutos) foi realizado, empregando o método D (ver Tabela 5), que consiste em um platô isocrático em 70 % B nessa região. O cromatograma obtido é ilustrado na Figura 11.

Figura 11 - Cromatograma em $\lambda = 280$ nm do extrato de *A. subrufescens* obtidas por CLAE-DAD utilizando como fase móvel o acetonitrila (fase B) e água Milli-Q (fase A), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. Coluna Phenomenex® C₁₈ (250x4,6 mm, d.i.; 5 μ m), vazão de 1 mL min⁻¹. Método D.

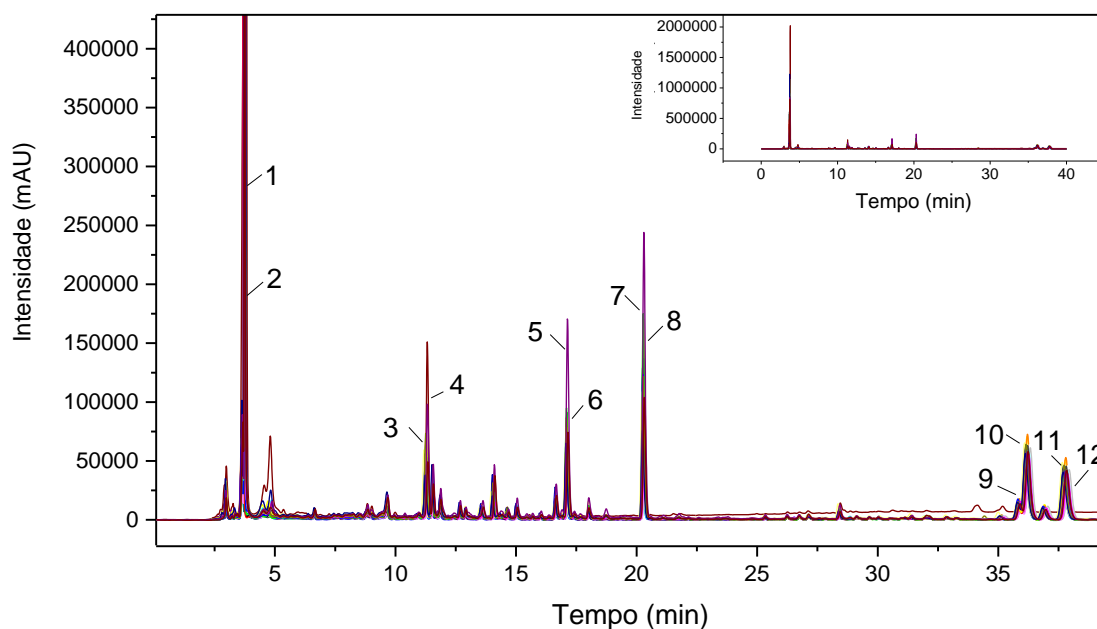


Este método foi então utilizado para análise dos 33 extratos (em triplicata) obtidos através de da extração em escala reduzida para análise de diferenciação do perfil das amostras por Análise de Fatores.

4.2.3 Análise de fatores do perfil cromatográfico

Para explorar as diferenças entre os cromatogramas obtidos através dos 33 extratos de *A. subrufescens* estes foram analisados individualmente e em seguida foram sobrepostos para facilitar a visualização. A Figura 12 apresenta a sobreposição destes cromatogramas.

Figura 12 - Cromatogramas em $\lambda = 280$ nm dos extratos de *A. subrufescens* obtidas por CLAE-UV/DAD: utilizando como fase móvel o acetonitrila (fase B) e água Milli-Q (fase A), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. Coluna Phenomenex® C₁₈ (250 x 4,6 mm, d.i.; 5 μ m), vazão de 1 mL min⁻¹. Método D.



Nota-se que todas as amostras apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, havendo diferença apenas nas intensidades de cada pico, por isto utilizou-se a técnica quimiométrica de análise de fatores para facilitar o estudo das diferenças entre cada extrato. Desta forma, para melhor visualização dos resultados, os picos responsáveis pela discriminação das amostras foram enumerados de 1 a 12 de acordo com o tempo de retenção e seus respectivos compostos foram identificados por CLAE-EM/EM de acordo com a Tabela 9, dentro os quais serão discutidos no item 4.5.1. As amostras

foram separadas de acordo com a sua respectiva linhagem e discutidas individualmente.

Tabela 9 - Tempo de retenção dos picos discriminados pelos gráfico de *loading* da linhagem JP, T2 e ABZ e identificação das substâncias por CL-EM/EM.

Pico	Tempo de retenção (min)	Substância	Referência
1	3,61	Hexitol	(LANDI et al., 2017)
2	3,69	Agaritina	(KIM et al., 2008)
3	11,22	-	-
4	11,32	-	-
5	17,09	-	-
6	17,22	-	-
7	20,26	Ácido Pinélico	(ALLEN; GREINER; WISHART, 2015)
8	20,41	-	-
9	36,14	Ácido digálico	(ABU-REIDAH et al. 2015)
10	36,37	Esculetina	(YUN et al., 2012)
11	37,72	Ramnetina	(ABU-REIDAH et al. 2015)
12	37,97	Galato de epilocatequina	(JAYAKUMAR; THOMAS; GERALDINE, 2009)

4.2.3.1 Análise de fatores da linhagem JP

Para a linhagem JP os quatro primeiros fatores explicam 98% da variância total obtida nos dados, sendo 88,49%, 4,50%, 4,25%, e 1,29%, referente aos fatores 1, 2, 3 e 4, respectivamente. A Figura 13 mostra o gráfico de *scores* do Fator 2 *versus* Fator 3. O Fator 1 apesar de apresentar uma variância maior não contribui com informações químicas relevantes sobre as amostras estudadas, por isto não está representado no gráfico. Pode-se observar a separação das amostras nos 4 quadrantes do gráfico *scores* devido a intensidade dos picos em cada uma das amostras, demonstrando a influência dos suplementos no aumento da concentração de diferentes substâncias.

Já a Figura 14 representa o gráfico de *loading*, no qual observa-se os picos que estão discriminando as características químicas de cada amostra. Assim o Fator 2 discrimina, pelos *loadings* positivos, as amostras que possuem maior correlação com os picos 2, 4, 6, 10 e 12 e pelos *loadings* negativos: 3, 5, 7, 9 e 11. Já o Fator 3 discrimina as amostras do lado positivo dos *loadings* pelos picos: 10 e 12 e pelo lado negativo: 1, 3, 5, 7, 9 e 11.

Figura 13 - Gráfico de scores Fator2 *vr* Fator3 dos cromatogramas obtidos por CLAE-UV/DAD para os extratos da linhagem JP feitos com acetato de etila seguindo o método D.

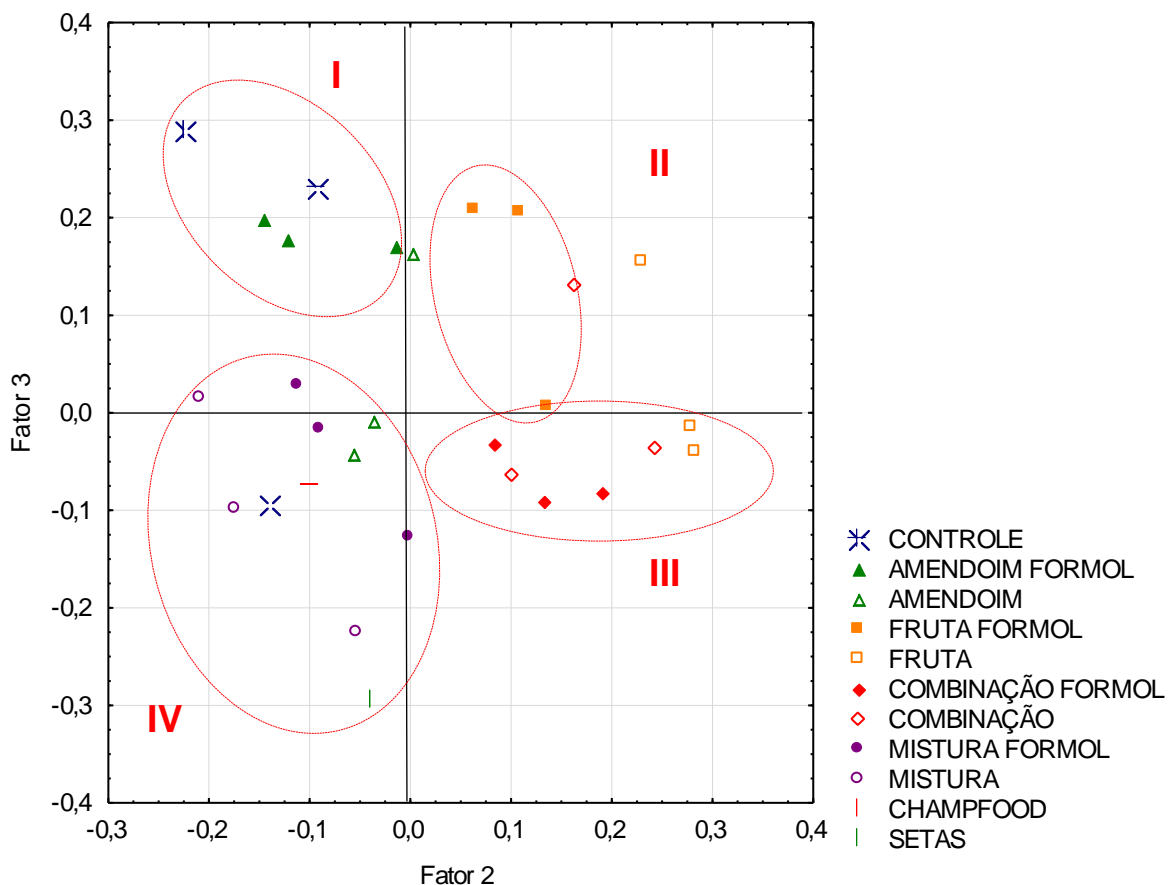
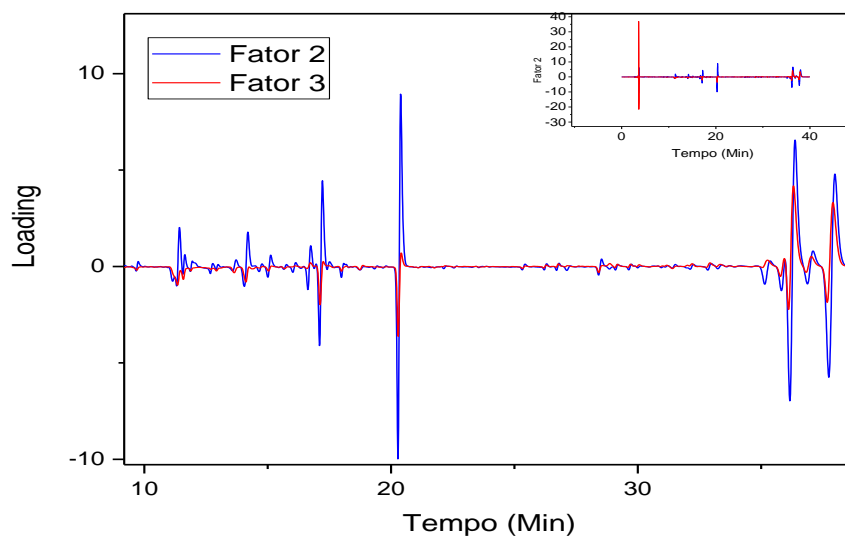


Figura 14 - Gráfico de *loading* dos cromatogramas da linhagem JP obtidos por CLAE-UV/DAD com os extratos de acetato de etila de acordo com o método D.



O agrupamento I está discriminado pelo lado positivo do Fator 3 (picos 10 e 12) e pelo lado negativo do Fator 2 (picos: 3, 5, 7, 9, 11), ou seja, a amostra suplementada com o suplemento Amendoim Formol e a amostra controle apresentam em sua composição as mesmas substâncias químicas, o que torna desnecessária a suplementação desta espécie com este suplemento, uma vez que o objetivo da suplementação é proporcionar o aumento no desenvolvimento de seus metabólitos ou a diferenciação dos mesmos. No entanto este agrupamento de amostras apresentou maiores correlações com quatro substâncias que possuem um alto potencial benéfico a saúde, sendo elas: galato de epilocatequina, ácido digálico, ramnetina e esculetina relatadas na literatura principalmente por seus potenciais antioxidantes, além do ácido pinélico que possui propriedades anti-inflamatórias.

Já o agrupamento II está representado por uma única amostra, suplementada pelo suplemento fruta formol, onde, pode-se perceber que o tipo de tratamento para este suplemento (adição de formol ou redução microbiana) influenciou o perfil químico das amostras estudadas e por isto deve ser levado em consideração na hora de escolher o tipo de tratamento adequado. Isto por que, a suplementação feita com o suplemento fruta, que sofreu o processo de redução microbiana, e que está representado pelo agrupamento III, diferencia-se do agrupamento II pelos *loadings*

negativos do Fator 3, que apresentam maiores correlações com os picos: 1, 3, 5, 7, 9, 11 enquanto o lado positivo apresenta maiores correlações com os picos: 10 e 12. No entanto, para o suplemento Combinação o tipo de tratamento não ocasionou diferenças, visto que ambos estão presentes no agrupamento III, juntamente com o suplemento fruta. Neste caso pode-se dizer que o tipo de tratamento utilizado durante o preparo do suplemento, no caso do processo de redução microbiana proporcionou o desenvolvimento de cogumelos com maiores correlações com as substâncias: Hexitol, ácido pinélico, digálico e ramnetina, sendo que a presença do ácido digálico proporciona cogumelos com maiores propriedades antioxidantes e anti-carcinogênicas. Já os que sofreram a adição de formol (5%), apresentaram maiores correlações com a substância galato de epilocatequina, que além de apresentar atividade antioxidante também relatada pela literatura, apresenta propriedades de dilatação da artéria braquial e resistência das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) à oxidação e conseqüentemente a promoção da saúde intestinal e com a esculetina, conhecida por suas atividades antioxidantes e anti-carcinogênicas (BHOURI et al., 2012; MAO et al., 2015). Demonstrando assim a importância do conhecimento das propriedades químicas que se deseja obter com a produção deste cogumelo, para que a escolha do tipo de tratamento e do suplemento seja adequada.

Segundo Zied e colaboradores, (2018) os suplementos comerciais são padrões de referência em estudos sobre a suplementação de cogumelos e são utilizados para comparação com dos resultados obtidos pelas suplementações feitas com os suplementos artesanais. Desta forma os suplementos artesanais que apresentaram as mesmas características dos comerciais, como o amendoim, mistura formol e mistura dispostos no agrupamento IV, demonstraram ser os melhores suplementos artesanais para esta linhagem. Da mesma forma com que o tipo de tratamento utilizado no preparo do suplemento mistura não influenciou na diferenciação da composição química final deste cogumelo. Pode-se observar também que os dois suplementos comerciais proporcionaram o desenvolvimento de cogumelos com as mesmas características, demonstrando que o suplemento *Setas* também pode ser indicado para a linhagem JP do cogumelo *Agaricus subrufescens*, uma vez que a sua utilização é indicada apenas para o cultivo do cogumelo *Pleurotus ostreatus*. Este

grupo está discriminado pelo lado negativo do Fator 2 e pelo lado positivo do Fator 3, e apresenta maiores correlações com os picos: 3, 5, 7; 9, 11 e 1, 3, 5, 7, 9, 11 respectivamente, representado pelas substâncias: Hexitol, ácido pinélico, digálico e ramnetina, o que demonstra que os suplementos comerciais além de apresentarem excelentes resultado em relação a produtividade deste cogumelo, segundo ZIED et al., (2018), também proporciona o desenvolvimento de um alimento com propriedades medicinais, de acordo com a atividade específica de cada substância.

4.2.3.2 Análise de fatores da linhagem T2

A Figura 15 mostra a análise de fatores das amostras referentes a linhagem T2. Os fatores F2 e F3 explicam 14,29% da variância total dos dados, onde, apesar do F1 possuir uma variância maior não contribuiu com informações químicas relevantes para discriminação destas amostras.

O gráfico de *loading* está representado pela Figura 16, e apresenta as correlações das amostras de acordo com as suas separações no gráfico de *scores*, sendo que o Fator 2 explica, do lado positivo, uma maior correlação com os picos 6, 8, 10 e 12 e do lado negativo 1, 5, 7, 9, e 11. Já o Fator 3 representa as correlações com os picos: 2, 4, 6, 8, 10 e 12 do lado positivo e 1, 3, 5, 7, 9, e 11 do lado negativo.

O grupo I está representado pelas amostras suplementadas com os suplementos artesanais Mistura e Amendoim, juntamente com o comercial Setas, demonstrando resultados favoráveis a estes suplementos artesanais, por proporcionarem o desenvolvimento das mesmas características químicas de um suplemento comercial nas amostras da linhagem T2. No entanto, segundo ZIED et al., (2018) este suplemento não é próprio para produção do *A. subrufescens*, e sim para espécie *Pleorotus ostreatus* spp., mas mesmo assim deu origem a cogumelos com propriedade medicinais ricos em substâncias com atividade antioxidante, como o ácido gálico e a ramnetina.

Figura 15 - Gráfico de scores Fator2 versus Fator3 dos cromatogramas obtidos por CLAE para os extratos da linhagem T2 feitos com acetato de etila seguindo o método D.

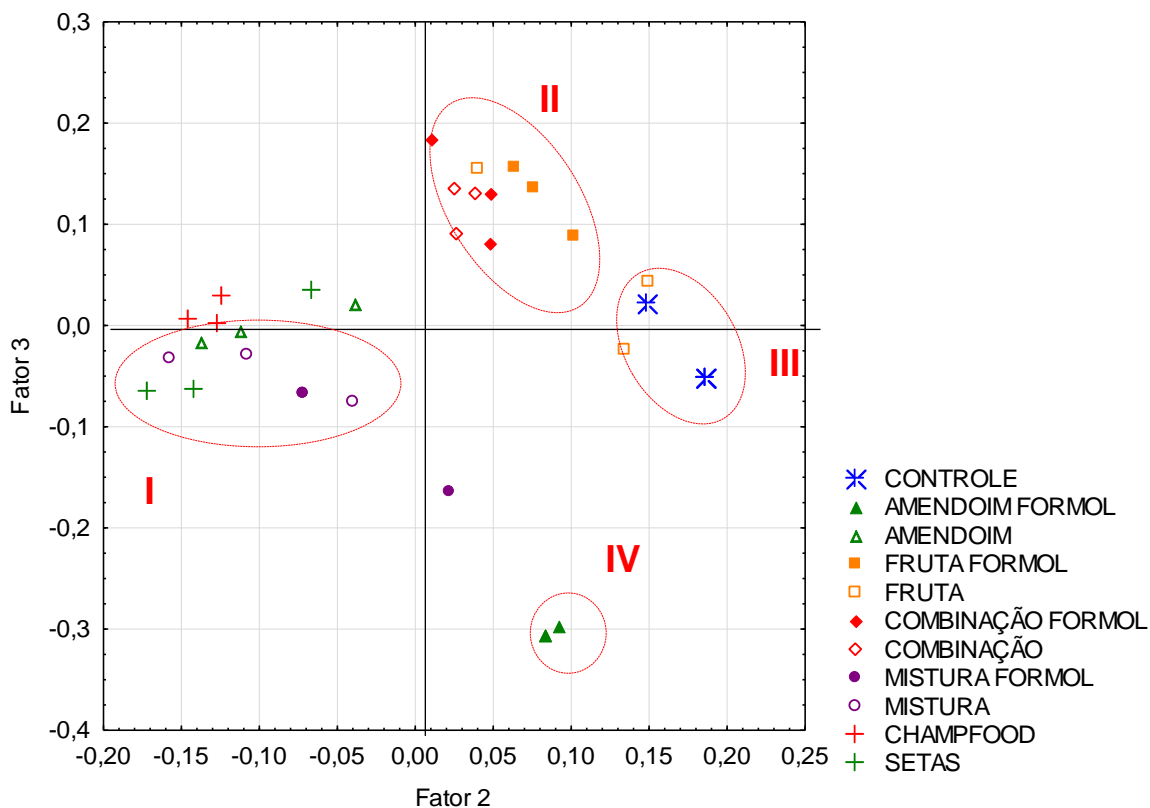
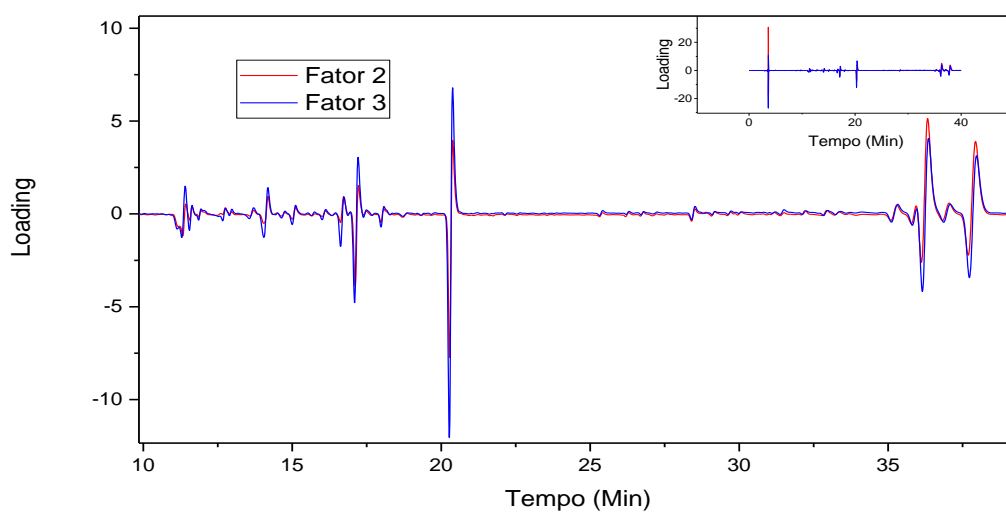


Figura 16 - Gráfico de *loading* dos cromatogramas da linhagem T2 obtidos por CLAE com os extratos de acetato de etila de acordo com o método D.



Já o agrupamento II é composto pelos suplementos: Fruta Formol, Combinação e Combinação Formol, e estão discriminados pelos *loadings* positivos do Fator 2 e pelos *loadings* positivos do Fator 3. O agrupamento destas amostras enfatiza a indiferença no tipo de tratamento do suplemento Combinação, visto que ambos proporcionaram o desenvolvimento do mesmo perfil químico, caracterizado principalmente pela presença do galato de epilocatequina e da esculetina, conhecidos por seus efeitos medicinais benéficos a saúde humana.

A amostra controle se encontra agrupadas com o suplemento Fruta, de acordo com o agrupamento III, e uma pequena diferenciação, em relação aos seus constituintes discriminados pelos *loadings* positivos do Fator 2 e negativos do Fator 3, demonstrando a ineficiência da suplementação desta linhagem com este suplemento, uma vez que, as condições iniciais do substrato foram suficientes para o desenvolvimento de cogumelos com as substâncias presentes nos picos discriminados por estes fatores, como por exemplo: hexitol, ácido pinélico, digálico, ramnetina, esculetina e galato de epilocatequina.

Já a amostra suplementada com amendoim formol, grupo IV, apensar de encontrar-se neste mesmo quadrante está discriminada mais fortemente pelo Fator 3, ou seja possui pequenas diferenças em relação a amostra sem suplementação, diferentemente da suplementação com o suplemento Amendoim produzido com a técnica de redução microbiana, onde seus nutrientes favoreceram o desenvolvimento de cogumelos com características similares aos padrões utilizados neste trabalho (suplementado pelos suplementos comerciais).

4.2.3.2 Análise de fatores da linhagem ABZ

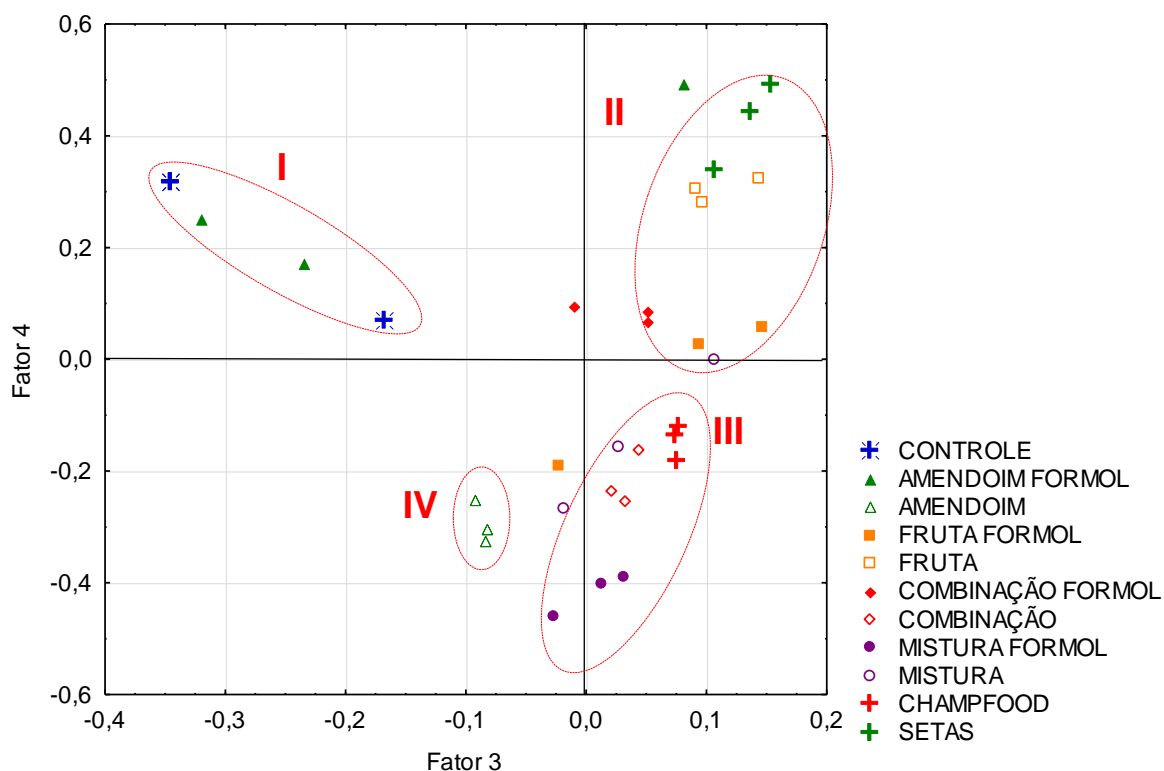
A Figura 17 mostra a análise de fatores entre os fator 3 vs 4, que explicam 6,12% da variância total dos dados, onde apesar dos fatores 1 e 2 apresentarem uma variância explicada maior (91%) não contribui com informações químicas relevantes para estas amostras.

Já a

Figura 18 apresenta o gráfico de *loading* onde é possível verificar as correlações das

amostras de acordo com as suas separações no gráfico de *scores*, sendo que o Fator 3 discrimina, do lado positivos, os picos 2; 4; 6 e do lado negativo 7 e 9. Já o Fator 4 discrimina os picos:8 e 12 do lado positivo e 1; 3 e 5 do lado negativo.

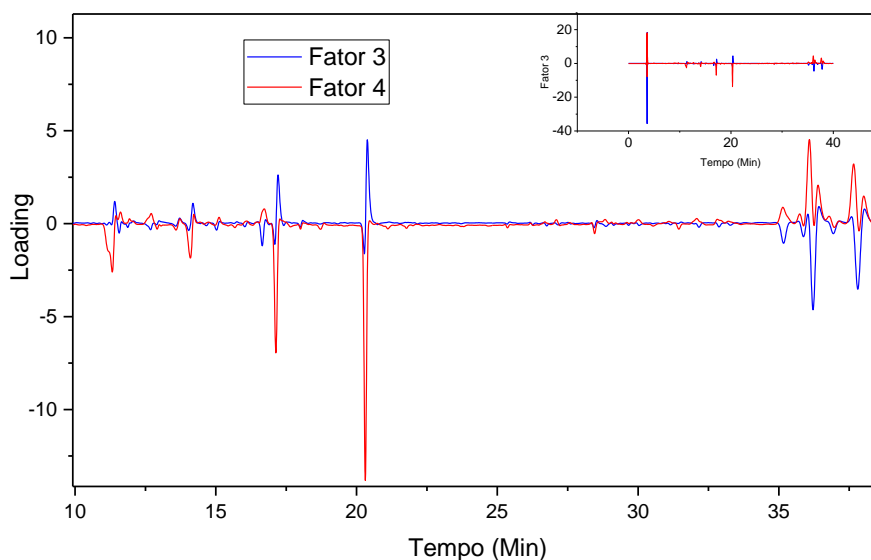
Figura 17 - Gráfico de *scores* do Fator 3 *versus* Fator 4 dos cromatogramas obtidos por CLAE para os extratos da linhagem ABZ feitos com acetato de etila seguindo o método D.



No agrupamento de amostras I, discriminado pelos *loadings* positivos do Fator 4 e negativos do fator 3, encontram-se a amostra suplementada pelo suplemento Amendoim Formol juntamente com a amostra Controle desta linhagem. Fato que ocorreu para o mesmo suplemento na linhagem JP, e como já dito anteriormente, demonstra a ineficiência deste suplemento. No entanto, em termos de rendimento de produção os suplementos feitos à base amendoim podem apresentar bons resultados, visto que, a suplementação não auxilia apenas no desenvolvimento das substâncias químicas presentes nos cogumelos, mas também favorece a produtividade (VIEIRA, 2012). Pode-se observar também que para este suplemento artesanal as diferenças nos tratamentos (adição de formol e redução microbiana) modificaram as suas

influências no desenvolvimento dos cogumelos, visto que a amostra com o suplemento Amendoim esterilizado está localizada no grupo IV, no lado esquerdo do quadrante inferior, diferencia-se pelos picos que influenciam os *loadings* negativos do Fator 4 (Figura 18), como por exemplo a presença da substância hexitol ao invés do galato de epilocatequina que está mais discriminado pelo grupamento I.

Figura 18 - Gráfico de *loading* dos cromatogramas da linhagem ABZ obtidos por CLAE com os extratos de acetato de etila de acordo com o método D.



Já no quadrante superior direito, as amostras do grupo II estão discriminadas pelos picos: 2, 4, 6 e 8, 12 de acordo com os *loadings* positivos do Fator 3 e 4, respectivamente. Nos quais estas amostras representam as suplementações feitas com: Fruta Formol, Combinação Formol, Fruta e o suplemento internacional Setas, e demonstram resultados favoráveis para estes suplementos artesanais, uma vez que seus constituintes proporcionaram um desenvolvimento químico similar a um dos suplementos comerciais. No entanto, segundo Zied e colaboradores (2018), o suplemento específico para o cultivo do cogumelo *Agaricus subrufescens* é o *Champfood*, que se encontra no quadrante inferior localizado no lado direito do gráfico de *loadings* e está discriminado pelo lado negativo do fator 4, juntamente com as amostras suplementadas por: Combinação e Mistura (agrupamento IV), que representam assim, os suplementos artesanais que proporcionaram um melhor

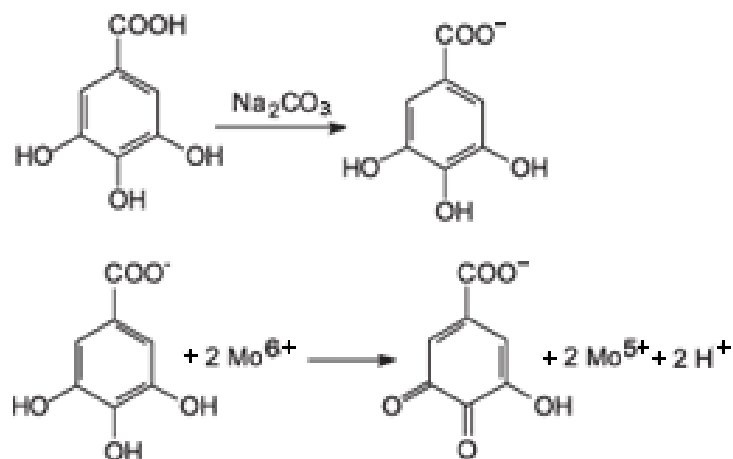
desenvolvimento da composição química desta linhagem. Desta forma, para esta linhagem as diferenças entre o perfil cromatográfico apresentado pelos suplementos padrões Setas e *Champfood*, e conseqüentemente os suplementos artesanais que obtiveram o mesmo perfil, demonstraram que o suplemento Setas proporciona o desenvolvimento de cogumelos com maiores correlações com a substância galato de epilocatequina, que possui um alto potencial antioxidante, já o *Champfood* com o hexitol, que é essencial para um bom desenvolvimento do cogumelo.

4.3 Fenóis Totais

Os compostos fenólicos são substâncias aromáticas hidroxiladas e que apresentam atividade antioxidante, uma vez que estes possuem a capacidade de eliminar os radicais livres presentes no organismo humano (LIU et al., 2013). A quantificação desses compostos em amostras de cogumelo é extremamente importante já que estes estão diretamente relacionados ao combate e/ou prevenção de doenças antitumorais, antimutagênica, anti-inflamatória, antibacteriana e antioxidante (QUEIROZ et al., 2016).

A determinação de compostos fenólicos totais é, na maioria das vezes, determinada pelo método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu*, que consiste na mistura de alguns tipos de sais, tais como: molibdato de sódio e o tungstato de sódio, a fim de que os seus íons sejam reduzidos dando origem a uma coloração azulada no teste. Assim, para que esta redução ocorra os grupos fenólicos devem estar na forma de fenolato, por isto, ocorre a desprotonação com a adição de uma base fraca, iniciando então a reação de oxirredução entre o reagente *Folin* e o ânion fenolato, como exemplificado pela Figura 19. Neste teste a quantidade de hidroxila influencia diretamente na intensidade da coloração final, que muda de amarela para azul (DALL'ANTONIA; ARCHELA, 2013; SILVA et al., 2009).

Figura 19 - Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de *Folin-Ciocalteu*.



Fonte: SILVA et al., (2009).

Desta forma, de acordo com a Tabela 8, a concentração de compostos fenólicos variou de 47,74 a 92,94 mg EAG\100g para as 33 amostras estudadas. As que apresentaram os maiores teores foram: 19, 24, 27, 32 e 33 (85,31, 90,61, 86,15, 82,55 e 92,94 mg EAG\100g, respectivamente), dentre as quais uma é referente a linhagem JP, uma à linhagem T2 e três à linhagem ABZ, representando a maior tendência da linhagem ABZ em produzir maiores quantidades destes compostos.

Tabela 10 – Teor de compostos fenólicos encontrado nos extratos de *Agaricus subrufescens*€.

Amostra	Amostra	mg EAG\100g*
1	JP controle	52,63 ± 0,60 ^{a1 a2**}
2	T2 controle	57,29 ± 0,40 ^{a2 a3}
3	ABZ controle	73,85 ± 0,60 ^{a6 a7 a8 a9}
4	JP amendoim formol	53,69 ± 0,90 ^{a1 a2}
5	T2 amendoim formol	66,42 ± 0,90 ^{a4 a5 a6 a7}
6	ABZ amendoim formol	65,57 ± 0,10 ^{a3 a4 a5 a6}
7	JP amendoim	52,20 ± 0,20 ^{a1 a2}
8	T2 amendoim	60,27 ± 1,20 ^{a2 a3 a4}
9	ABZ amendoim	75,76 ± 0,30 ^{a8 a9 a10}
10	JP fruta formol	47,96 ± 1,20 ^{a1}
11	T2 fruta formol	70,88 ± 1,20 ^{a5 a6 a8}
12	ABZ fruta formol	63,87 ± 0,90 ^{a3 a4 a5}
13	JP fruta	48,17 ± 0,90 ^{a1}
14	T2 fruta	57,51 ± 0,30 ^{a2 a3}
15	ABZ fruta	78,73 ± 0,70 ^{a8 a9 a10 a11}
16	JP combinação formol	47,75 ± 2,10 ^{a1}
17	T2 combinação formol	60,27 ± 1,20 ^{a2 a3 a4}
18	ABZ combinação formol	80,64 ± 0,60 ^{a9 a10 a11}
19	JP combinação	85,31 ± 3,00 ^{a11 a12 a13}
20	T2 combinação	71,30 ± 0,60 ^{a5 a6 a7 a8}
21	ABZ combinação	78,30 ± 2,10 ^{a8 a9 a10 a11}
22	JP mistura formol	64,51 ± 1,20 ^{a4 a5}
23	T2 mistura formol	71,30 ± 1,80 ^{a5 a6 a7 a8}
24	ABZ mistura formol	90,61 ± 0,90 ^{a12 a13}
25	JP mistura	74,48 ± 0,90 ^{a7 a8 a10}
26	T2 mistura	64,30 ± 0,90 ^{a3 a4 a5}
27	ABZ Mistura	86,15 ± 1,40 ^{a11 a12 a13}
28	JP <i>Champfood</i>	64,30 ± 0,90 ^{a3 a4 a5}
29	T2 <i>Champfood</i>	80,64 ± 1,80 ^{a9 a10 a11}
30	ABZ <i>Champfood</i>	80,00 ± 0,30 ^{a9 a10 a11}
31	JP setas	52,20 ± 0,60 ^{a1 a2}
32	T2 setas	82,55 ± 0,30 ^{a10 a11 a12}
33	ABZ setas	92,94 ± 0,30 ^{a13}

€Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). *EAG= Equivalente de Ácido gálico.

**Médias seguidas pelos mesmos números não diferem entre si pelo teste Tunkey ($P>0,05\%$)

Pode-se observar também que em relação à linhagem JP, a suplementação feita com base dos suplementos artesanais Amendoim Formol, Amendoim, Fruta formol, fruta, combinação formol e do comercial setas não proporcionou o aumento na quantidade dos compostos fenólicos, visto que, estas amostras apresentaram valores estatisticamente iguais ao apresentado pela amostra controle (padrão). Para linhagem T2, as amostras que não apresentaram a diferença estatística com relação ao controle foram as suplementadas por amendoim, fruta, combinação formol e mistura, enquanto que para a linhagem ABZ foram: amendoim, fruta, combinação, combinação formol, mistura formol e *champfood*.

Este fator pode estar correlacionado com a composição de alguns macronutrientes presentes nos substratos utilizados no cultivo dos cogumelos *A. subrufescens* descritos na Tabela 3. Os substratos apesar de apresentarem menores quantidades de zinco, manganês e cobre ($107,0 \pm 9 \text{ mg kg}^{-1}$; $141,0 \pm 4,9 \text{ mg kg}^{-1}$; e $17 \pm 1,2 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente), quando comparado aos teores dos mesmos minerais encontrados nos suplementos artesanais e comerciais, pode ter contribuído para a alta produção de compostos fenólicos, tornando desnecessária a suplementação destas amostras com estes tipos de suplementos quando se deseja obter cogumelos com maiores teores de compostos fenólicos (LOPES, 2007; MENDES, 2007).

Outro fator observado foi a influência do tipo de formulação dos suplementos nos resultados obtidos entre as amostras: 11 e 14; 12 e 15; 16 e 19; 17 e 20; 22 e 25, variando entre a adição de 5% de formol e o tratamento de redução microbiana, ambos realizados com o intuito de diminuir a flora microbiana disponível durante o crescimento dos fungos. Dentre estas amostras, todas apresentaram um aumento na produção de compostos fenólicos quando houve a adição de suplementos tratados através da técnica de redução microbiana, com exceção da linhagem T2 quando suplementada com o suplemento fruta, que apresentou uma diminuição destes resultados. As amostras que não apresentaram diferenças entre os dois tipos de tratamentos foram: 4 e 7; 5 e 8; 10 e 13; 18 e 21; 23 e 26; 24 e 27. De acordo com Silva et al. (2007), a técnica de redução microbiana não elimina toda flora microbiana

presente no suplemento, o que pode ajudar a precocidade da produção dos cogumelos, no entanto reduz a produtividade no final do cultivo.

Segundo Zied e colaboradores (2018), o suplemento comercial *Champfood* apresenta os melhores resultados em relação à produtividade quando comparado aos suplementos artesanais fruta, mistura e combinação, no entanto, para o teor de compostos fenólicos avaliados neste trabalho, o suplemento *champfood* não apresentou os melhores resultados, porém apresentou resultados estatisticamente iguais aos suplementos artesanais amendoim, combinação, combinação formol, mistura e fruta, para a linhagem ABZ; setas para linhagem T2; e mistura formol para linhagem JP, demonstrando a similaridade entre estes suplementos.

Porém, o suplemento *champfood* se mostrou eficaz quando comparado às amostras controle, com exceção da linhagem ABZ, aumentando o teor fenólico de 52,63 e 57,29 mg EAG\100g nas amostras controle das linhagens JP e T2, respectivamente, para 64,30 e 80,64 mg EAG\100g nas amostras suplementadas. Neste caso, a produção de maiores teores de compostos fenólicos pode estar correlacionada com o teor de Mn, pois este atua como co-fator na produção de diversos metabólitos secundários associados a via do ácido chiquímico que resulta na produção de compostos aromáticos como os flavonoides. O suplemento *champfood* apresentou $18 \pm 1 \text{ g kg}^{-1}$ já o substrato de cultivo apenas $141 \pm 4,9 \text{ mg kg}^{-1}$ de Mn de acordo com a Tabela 2 e 3.

O suplemento comercial setas, em relação à linhagem JP, não apresentou diferença significativa no aumento do teor de compostos fenólicos, visto que, os resultados foram estatisticamente iguais à amostra controle. No entanto, para linhagem ABZ e T2 houve um aumento significativo de 73,85 para 92,94 e de 57,29 para 82,55 mg EAG\100g, respectivamente. Estes dados mostram que os suplementos comerciais nem sempre são igualmente eficientes para linhagens diferentes de um mesmo cogumelo.

Em relação às amostras que apresentaram os menores teores de compostos fenólicos (valores inferiores a 54 mg EAG\100g) pôde-se perceber que todas são amostras da linhagem JP (16, 1, 10, 13, 7, 31 e 4) suplementadas por diferentes suplementos, incluindo o suplemento comercial setas e a amostra controle, ou seja,

para esta linhagem a suplementação foi eficaz somente com o suplemento combinação, enquanto que para as demais linhagens observou-se uma variação maior de compostos fenólicos com as diferentes formulações de suplementos.

Desta forma, a linhagem ABZ apresentou os melhores resultados quando suplementada com os suplementos artesanais mistura formol e mistura, que apresentaram resultados estatisticamente iguais ao suplemento comercial Setas. Já a linhagem JP apresentou o melhor resultado quando suplementado com o suplemento combinação, e a linhagem T2 quando suplementada pelo suplemento setas e *champfood*.

4.4 Determinação da Capacidade Antioxidante

4.4.1 Ensaio DPPH^{*}

A capacidade antioxidante das amostras de cogumelos foi estudada por meio de ensaios com diferentes mecanismos de ação (CARVAJAL et al., 2012; GUO et al., 2012). O primeiro ensaio realizado neste estudo foi o método de redução do DPPH^{*} descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com algumas modificações. Os resultados obtidos para o teste do radical DPPH^{*} são mostrados na

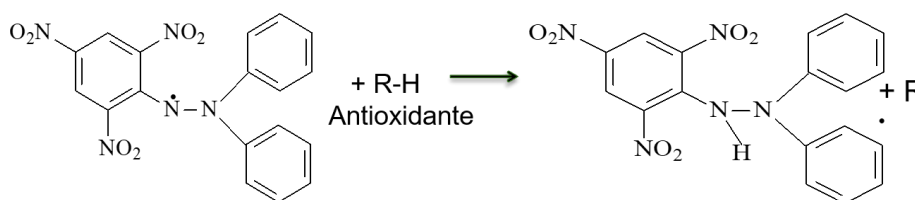
Tabela 11 e expressos em equivalente de ácido gálico por 100 g de amostra seca.

O ensaio de sequestro do radical livre DPPH[•] é um dos testes antioxidantes mais citados na literatura atual para análises realizadas *in vitro*. No entanto, esta diversidade de resultados dificulta a comparação dos estudos existentes devido às diferenças entre as metodologias utilizadas e às formas de expressar os resultados finais. Além disso, o local, a temperatura, a forma de cultivo e o tipo de suplemento utilizado durante a produção dos cogumelos também interferem significativamente nos resultados finais dos testes antioxidantes (SOARES et al., 2009).

O método de avaliação da capacidade antioxidante pelo radical DPPH[•] (2,2 difenil-1-picrilhidrazil) utilizado neste trabalho baseia-se no sequestro deste radical através de um ensaio fotométrico de mudança de coloração, onde o radical DPPH[•] apresenta uma coloração violeta-escura e ao se reduzir na presença de moléculas antioxidantes adquire coloração violeta-claro, formando DPPH₂, conforme descrito pela

Figura 20 (OLIVEIRA, 2015).

Figura 20 - Mecanismos de reação entre o radical DPPH[•] e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.



Fonte: OLIVEIRA, (2015).

Desta forma, segundo a

Tabela 11, os índices de atividade antioxidante variaram entre 31,44 e 55,89 mg EAG\100g (amostra 13 e 11, respectivamente), mostrando que o teste de sequestro do radical DPPH* não obteve muita variação entre os resultados.

Tabela 11 – Atividade antioxidante dos extratos de *A. subrufescens* através do ensaio de DPPH*.[€]

Amostra	Amostra	DPPH* (mg EAG\100g)*
1	JP controle	36,29 ± 2,90 a1 a2 a3**
2	T2 controle	42,45 ± 1,59 a1 a2 a3 a4 a5 a6 a7
3	ABZ controle	41,66 ± 1,96 a1 a2 a3 a4 a5 a6
4	JP amendoim formol	34,57 ± 0,70 a1 a2
5	T2 amendoim formol	39,80 ± 0,66 a1 a2 a3 a4 a5
6	ABZ amendoim formol	42,65 ± 0,75 a1 a2 a3 a4 a5 a6 a7 a8
7	JP amendoim	31,59 ± 4,00 a1
8	T2 amendoim	42,45 ± 2,15 a1 a2 a3 a4 a5 a6 a7
9	ABZ amendoim	55,17 ± 0,66 a7 a8
10	JP fruta formol	36,49 ± 3,09 a1 a2 a3
11	T2 fruta formol	55,89 ± 2,06 a8
12	ABZ fruta formol	44,21 ± 2,71 a1 a2 a3 a4 a5 a6 a7 a8
13	JP fruta	31,44 ± 4,18 a1
14	T2 fruta	47,45 ± 4,00 a2 a3 a4 a5 a6 a7 a8
15	ABZ fruta	47,65 ± 3,46 a2 a3 a4 a5 a6 a7 a8
16	JP combinação formol	36,53 ± 3,65 a1 a2 a3
17	T2 combinação formol	37,86 ± 0,47 a1 a2 a3 a4
18	ABZ combinação formol	50,36 ± 3,93 a4 a5 a6 a7 a8
19	JP combinação	41,69 ± 1,40 a1 a2 a3 a4 a5 a6
20	T2 combinação	42,75 ± 3,65 a1 a2 a3 a4 a5 a6 a7 a8
21	ABZ combinação	42,69 ± 0,46 a1 a2 a3 a4 a5 a6 a7 a8
22	JP mistura formol	38,91 ± 1,03 a1 a2 a3 a4 a5
23	T2 mistura formol	41,40 ± 1,58 a1 a2 a3 a4 a5 a6
24	ABZ mistura formol	53,20 ± 1,67 a6 a7 a8
25	JP mistura	51,22 ± 2,79 a5 a6 a7 a8
26	T2 mistura	31,84 ± 0,19 a1
27	ABZ Mistura	46,21 ± 1,86 a2 a3 a4 a5 a6 a7 a8
28	JP Champfood	39,29 ± 0,83 a1 a2 a3 a4a5
29	T2 Champfood	43,38 ± 8,48 a1 a2 a3 a4 a5 a6 a7 a8
30	ABZ Champfood	42,91 ± 2,80 a1 a2 a3 a4 a5 a6 a7 a8
31	JP setas	31,71 ± 0,19 a1
32	T2 setas	48,32 ± 2,24 a3 a4 a5 a6 a7 a8

33	ABZ setas	54,71 ± 3,45 ^{a7 a8}
----	-----------	-------------------------------

[€]Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). *EAG= Equivalente de Ácido gálico.

^{**}Médias dos suplementos adicionados às amostras fruta, amendoim, setas, champfood, amendoim formol, fruta formol, combinação formol, mistura formol, *champfood* e combinação, para linhagem JP; mistura, combinação formol, amendoim formol, combinação, mistura formol, amendoim, fruta, *champfood* e setas, para a linhagem T2; amendoim formol, combinação, fruta formol, fruta, mistura formol, mistura e *champfood* para linhagem ABZ não influenciaram o aumento da quantidade de sequestro do radical DPPH*, uma vez que, estes resultados foram muito próximos aos obtidos para as respectivas amostras controle.

Estes resultados são semelhantes aos encontrados para algumas amostras nos ensaios de fenóis totais e podem estar correlacionados com as limitações de absorção de nutrientes de cada espécie, de acordo com *a lei do mínimo*, ou seja, o substrato sem adição de suplemento mesmo apresentando menores teores de minerais como ferro, zinco, manganês e cobre, mostrou-se suficiente para o desenvolvimento máximo de compostos capazes de ocasionar o sequestro do radical DPPH*, igualando-se estatisticamente aos resultados obtidos pelos cogumelos suplementados com os suplementos citados acima (KUSS, 2005; LOPES, 2007).

O maior resultado do teste foi 55,89 mg EAG\100g, referente à amostra 11 (T2-Fruta Formol), no entanto, não houve diferença significativa entre este resultado e os valores obtidos para as amostras 6, 21, 20, 30, 29, 12, 27, 14, 15, 32, 18, 25, 24, 9 e 33, dentre as quais estão incluídos os suplementos comerciais *champfood* e setas para as linhagens ABZ e T2, respectivamente, demonstrando um ótimo resultado para estes suplementos artesanais, uma vez que, segundo Zied e colaboradores (2018) o desenvolvimento de suplementos artesanais que apresentem cogumelos com as mesmas características daqueles suplementados pelos suplementos comerciais é uma etapa importante para a produção destes fungos.

Para linhagem JP a única amostra que não apresentou resultados semelhantes à sua respectiva amostra controle, e conseqüentemente o melhor resultado para esta espécie, foi a suplementada pelo suplemento mistura, já para linhagem ABZ foi a amostra suplementada pelo suplemento artesanal amendoim e o comercial Setas, demonstrando como os suplementos influenciam de formas diferentes a produção do

teor de compostos fenólicos nas diferentes linhagens de *A. subrufescens*, uma vez que a fertilidade do solo e a absorção pelo fungo estão diretamente relacionadas à fatores intrínsecos como as variáveis encontradas nas condições do plantio (LOPES, 2007).

Em relação ao tratamento dos suplementos, para este teste, não houve diferença entre a adição de formol e o processo de redução microbiana. Desta forma, a utilização da redução microbiana seria a melhor opção para uma produção em grande escala, visto que viabiliza e reduz o custo de produção desta espécie de cogumelo (VIEIRA, 2010).

O suplemento comercial setas influenciou o aumento na composição de substâncias com caráter antioxidante apenas para a linhagem ABZ diferentemente das linhagens JP e T2, que apresentaram valores iguais às amostras controle. Já o suplemento *champfood*, mesmo sendo o mais indicado para a suplementação da espécie *A. subrufescens*, apresentou estatisticamente os mesmos resultados que as respectivas amostras controle para as três linhagens, sem ocasionar o aumento na composição destas substâncias.

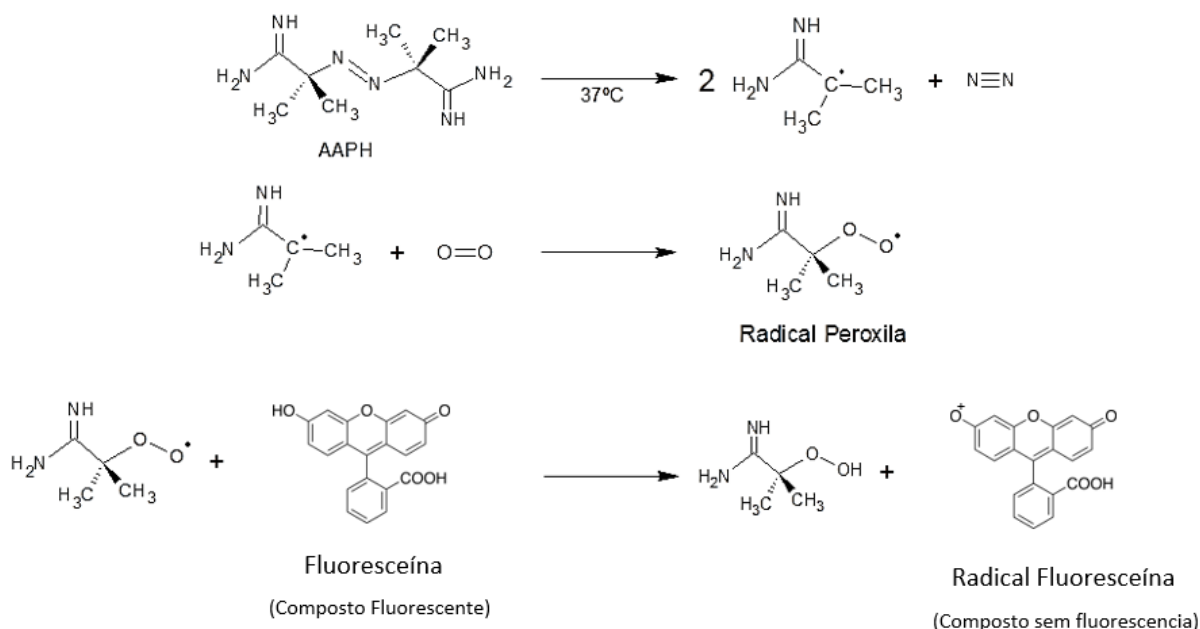
Esta diferença na produção dos compostos fenólicos pode estar correlacionada com os três tipos de linhagens estudadas neste trabalho (JP, ABZ e T2), uma vez que, as interações solo-planta são estabelecidas de diferentes formas para cada uma das linhagens, resultando em composições químicas distintas mesmo quando estão sob o mesmo tipo de substrato e suplemento. De acordo com Mendes, (2007) é ilusório analisar apenas um fator de produção, como neste caso a composição dos suplementos, sem levar em conta a interação que cada planta ou fungo estabelece com o meio de crescimento. Deve-se considerar cada fator como parte de um todo, dentre os quais estão sendo correlacionados de forma recíproca através das interações que estão ocorrendo simultaneamente, como o pH do solo, as condições do ambiente e temperatura.

4.4.2 Ensaios ORAC e FRAP

Outras abordagens utilizadas neste estudo foram a realização dos ensaios antioxidantes utilizando o método de ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*) e FRAP (*Ferric reducing ability of plasma*). O ensaio ORAC ocorre através de uma reação de transferência de elétrons e baseia-se na capacidade de um agente antioxidante sequestrar um radical peroxila formado após o 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) dihidrocloreto (AAPH) sofrer uma decomposição térmica à 37 °C. Os radicais peroxila formados degradam a estrutura química da fluoresceína sódica e levam à perda de sua conformação inicial, ocasionando a diminuição da emissão de fluoresceína com a adição da substância antioxidante durante o período de análise, conforme descrito pela

Figura 21 (OU et al., 2001).

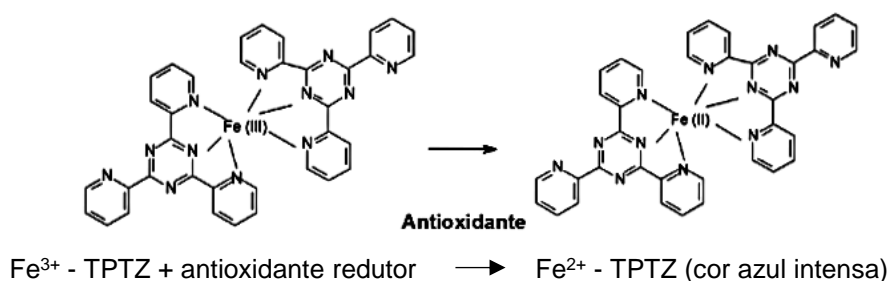
Figura 21 - Mecanismos de reação entre o radical peroxila e proteção da fluoresceína através da presença de compostos que possuem atividade antioxidante.



Fonte: COSTA, (2012).

Já o ensaio FRAP ocorre através da transferência de átomos de oxigênio e verifica a capacidade dos compostos antioxidantes presentes nas amostras reduzirem, em pH baixo, o complexo de Fe^{3+} (tripiridiltriazina - TPTZ) para Fe^{2+} , uma molécula que possui coloração azul intensa e uma absorção máxima em 593 nm, conforme descrito pela Figura 22.

Figura 22 - Mecanismo de reação de transferência de átomos de oxigênio



Fonte: Andrea; Garzón; Rojano, (2012).

Portanto, assim como no ensaio do radical DPPH^{*}, a medição para o método FRAP também é realizada utilizando a espectrofotometria monitorando a mudança de coloração das amostras. No entanto, uma desvantagem desse teste é que nem todo redutor que está apto a reduzir os íons Fe^{3+} para Fe^{2+} são necessariamente compostos antioxidantes, e vice-versa (VASCONCELOS et al. 2007).

Ambos os ensaios foram aplicados apenas para as amostras que apresentaram maior atividade no teste de fenóis totais uma vez que, segundo Sousa, (2012) há relatos na literatura de que a atividade antioxidante de materiais vegetais e cogumelos é mais bem correlacionada com os resultados do ensaio de compostos fenólicos em relação aos demais testes antioxidantes devido às variações nas condições de trabalho, como sonda, substrato, condições de reação e método de quantificação.

Desta forma, foram selecionadas apenas as 15 amostras que apresentaram atividade acima de 74 mg EAG\100g no ensaio de fenóis totais e o resultado é apresentado na Tabela 12.

Tabela 12 - Capacidade redutora do complexo Fe(III)-TPTZ à Fe(II)-TPTZ (FRAP) e atividade antioxidante pelo método ORAC feitos para os extratos de *Agaricus subrufescens*. €

Amostra	Amostra	FRAP (mg EAG\100g)*	ORAC (g EAG\100g)
1	JP Controle	92,61 ± 10,01 a1**	2,51 ± 0,07 a1
2	T2 Controle	136,53 ± 10,40 a1 a2	2,65 ± 0,22 a1
3	ABZ Controle	205,88 ± 26,18 a2 a3 a4	2,94 ± 0,17 a1
9	ABZ Amendoim	207,03 ± 8,01 a3 a4 a5	3,31 ± 0,13 a1 a2
15	ABZ Fruta	200,10 ± 16,02 a3 a4 a5	4,77 ± 0,27 a3 a4 a5
18	ABZ combinação formol	216,28 ± 2,00 a4 a5	3,30 ± 0,09 a1 a2
19	JP combinação	235,93 ± 15,89 a5	2,79 ± 0,42 a1
21	ABZ combinação	188,54 ± 38,19 a4 a5 a6	5,29 ± 0,29 a4 a5 a6
24	ABZ mistura formol	181,60 ± 14,01 a2 a3 a4 a5	5,84 ± 0,37 a6
25	JP mistura	146,93 ± 4,00 a2 a3	4,18 ± 0,33 a2 a3
27	ABZ mistura	155,02 ± 25,00 a4 a5 a6	5,40 ± 0,36 a4 a5 a6
29	T2 Champfood	185,07 ± 11,15 a2 a3 a4 a5	4,52 ± 0,42 a3 a4
30	ABZ Champfood	196,63 ± 12,50 a2 a3 a4 a5	5,30 ± 0,04 a4 a5 a6
32	T2 setas	240,55 ± 20,90 a5	5,52 ± 0,11 a5 a6
33	ABZ setas	242,86 ± 37,40 a5	5,95 ± 0,58 a6

€Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). *EAG= Equivalente de Ácido gálico.

**Médias seguidas pelos mesmos números não diferem entre si pelo teste Tukey ($P>0,05\%$)

Para o ensaio de FRAP os valores variaram de 92,61 a 242,86 mg EAG\100g sendo que a amostra que apresentou menor valor não foi suplementada durante a sua produção (amostra 1). Já a de maior valor (ABZ) foi suplementada com o suplemento comercial setas (amostra 33) indicado para produção de cogumelos da espécie *Pleurotus ostreatus*, segundo Andrade, Minhoni e Zied (2008).

As três linhagens apresentaram aumentos significativos no teor de compostos antioxidantes quando comparadas às suas respectivas amostras controle em relação a alguns suplementos. No entanto, as linhagens T2 e JP se destacam por terem suas amostras controle com os menores valores do teste, e quando foram suplementadas com o suplemento combinação, para linhagem JP, e setas, para linhagem T2, passaram a ter um dos melhores resultados (de 92,61 para 235,54 mg e de 136,53 para 240,86 mg EAG\100g, respectivamente).

Assim, estes resultados podem estar correlacionados com o aumento da disponibilidade de alguns nutrientes presentes nos suplementos adicionado aos cogumelos, visto que estes agem como cofatores de algumas enzimas específicas e favorecem o desenvolvimento de alguns compostos antioxidantes (ver **Error! Reference source not found.** e **Error! Reference source not found.**). Dentre estes nutrientes estão o cobre e o zinco (107,0 e 17,0 mg kg⁻¹ no substrato de cultivo, e 10,0 e 38,0 g kg⁻¹ no suplemento combinação, respectivamente), que podem atuar como cofator da enzima superóxido dismutase, que por sua vez auxilia no combate dos radicais livres; e o magnésio (141,0 mg kg⁻¹ no substrato e 29 g kg⁻¹ no suplemento combinação), ao qual sua deficiência esta correlacionada ao aumento na produção de radicais livres e conseqüentemente a ação dos mecanismos oxidantes (MISTRY; WILLIAMS, 2011).

A linhagem ABZ não apresentou diferenças significativas entre a amostra controle e as suplementas com: mistura, mistura formol, combinação, *champfood*, fruta, amendoim e combinação formol, ou seja, estes suplementos não influenciaram o aumento no teor de compostos antioxidantes nessa linhagem, sendo que apenas a amostra suplementada pelo suplemento comercial setas apresentou um aumento significativo e o melhor resultado obtido neste teste.

Estes resultados podem estar correlacionados com a *lei do mínimo*, citada na discussão dos resultados de fenóis totais e DPPH*, devido ao fato de que, em alguns casos o aumento da disponibilidade de alguns nutrientes não influencia diretamente o aumento da produção dos compostos antioxidantes, visto que, a absorção do fungo em relação a suplementação se desenvolve a partir da proporção de um nutriente

limitante. Assim, o aumento dos demais nutrientes torna-se desnecessário pois o cogumelo não irá absorver-los (LOPES, 2007; MENDES, 2007).

O suplemento comercial *champfood*, indicado para a produção do *A. subrufescens*, não apresentou resultados favoráveis, uma vez que, para as linhagens T2 e ABZ, os resultados não apresentaram diferença entre as amostras suplementadas e suas respectivas amostras controle, o que demonstra que os suplementos comerciais nem sempre serão a melhor escolha para a suplementação durante a produção, ou seja, ao iniciar o cultivo de um cogumelo é necessário o estudo do interesse específico da produção para obtenção de resultados favoráveis.

Para o ensaio ORAC, os resultados foram expressos em g EAG\ 100g de extrato seco para facilitar a visualização dos mesmos. Os valores variaram de 2,51 a 5,95 g EAG\100g referentes às amostras JP controle e ABZ setas.

Para linhagem ABZ, as amostras suplementadas por combinação formol e amendoim não influenciaram o aumento na quantidade de compostos antioxidantes avaliados por este teste. Já a linhagem JP, apesar de apenas uma amostra suplementada pelo suplemento mistura ter sido testada, apresentou um aumento considerável em sua composição, aumentando a atividade de 2,79 g EAG\100g da amostra controle para 4,187 g EAG\100g. A linhagem T2, por sua vez, também apresentou um aumento significativo após a suplementação, passando de 2,65 para 4,52 g EAG\100g com o suplemento comercial *champfood* e 5,55 g EAG\ 100g com o setas, sendo que, este último está entre os suplementos que apresentaram os melhores resultados nas amostras testadas e que pode estar relacionado ao seu alto teor de ferro disponível em sua composição (ver **Error! Reference source not found.** – $334 \pm 18 \text{ g kg}^{-1}$) e que favorece o desenvolvimento de alguns compostos antioxidantes.

Em relação à suplementação com suplementos comerciais, o setas apresentou o melhor resultado (5,95 g EAG\100g) para linhagem ABZ, que se apresentou estatisticamente igual à essa suplementação na linhagem T2, e aos resultados obtidos pela suplementação com o suplemento *champfood* para linhagem ABZ. Segundo Mendes e colaboradores (2007), a absorção dos nutrientes disponíveis no solo está diretamente relacionada com alguns fatores, como por exemplo, os diferentes tipos

de linhagens, e as suas respostas relacionadas às interações solo-planta, que podem explicar os diferentes resultados nos teores de compostos antioxidantes obtidos pelo método ORAC para amostras cultivadas com suplementos comerciais. Os suplementos artesanais: combinação, mistura e mistura formol, quando aplicados à linhagem ABZ não apresentaram diferenças significativas entre os resultados obtidos pela suplementação feita com os suplementos comerciais: setas e *champfood* e foram responsáveis pelos melhores resultados obtidos neste teste. Neste caso a linhagem ABZ é originária do Brasil, o que pode ter favorecido o seu melhor desenvolvimento, visto que o cultivo dos cogumelos foi feito no seu país de origem.

4.5 Identificação das substâncias presentes nos extratos de *A. subrufescens*

4.5.1 Identificação das substâncias presentes no extrato acetálico por CL-EM/EM.

Para melhor compreensão das correlações obtidas na análise de fatores dos perfis cromatográficos das 33 amostras do cogumelo *A. subrufescens*, o extrato acetálico foi analisado por CL-EM/EM (Figura 23) e as substâncias, referentes aos principais picos que ocasionaram a diferenciação das amostras, foram propostas através da utilização dos dados das relações de m/z e os padrões de fragmentações já relatados na literatura, conforme apresentado pela Tabela 13. Os espectros obtidos das três primeiras substâncias estão apresentados nos Anexos.

Figura 23 - Cromatograma do pico base (BCP) extraído no modo negativo e positivo do extrato acetálico das amostras de *A. subrufescens*.

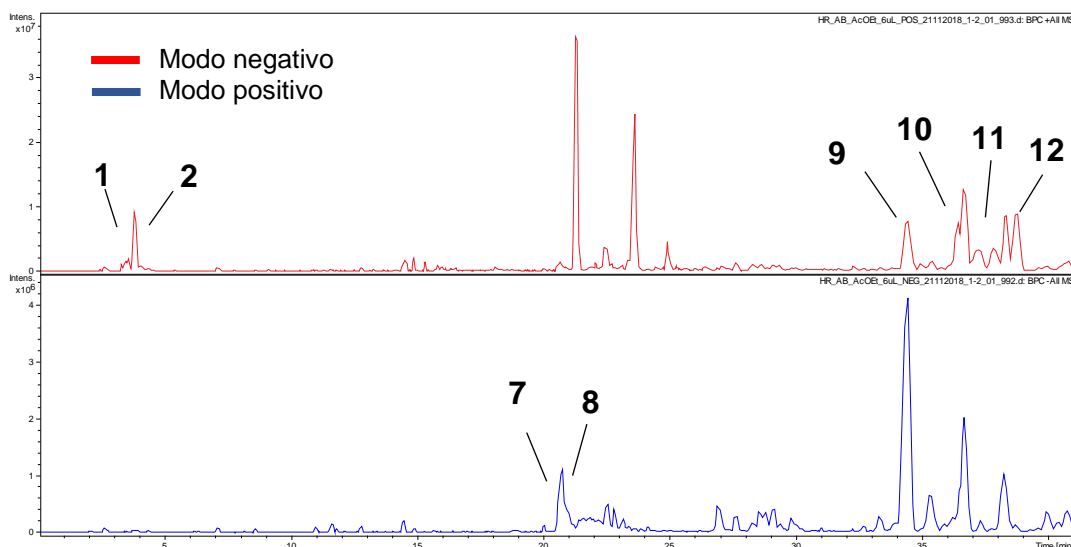


Tabela 13 – Proposta de identificação das substâncias presentes no extrato acetálico do cogumelo *A. subrufescens* por CL-EM/EM.

Pico	Substância	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MS ² /MS ³	Referências
1	Hexitol	-	181,07	163, 131, 119, 101, 89	(LANDI et al., 2017)
2	Agaratina	268	-	137	(KIM et al., 2008)
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	Ácido Pinélico	-	329	293, 229	(HMDB, 2018)
8	-	-	-	-	-
9	Ácido Digálico	-	321,04	277	(ABU-REIDAH et al. 2015)
10	Esculetina	179	-	161, 133, 105, 91	(YUN et al., 2012)
11	Ramnetina	317,06	-	301, 287 , 275	(ABU-REIDAH et al. 2015)
12	Galato de Epilocatequina	-	305,34	286, 261, 153	(JAYAKUMAR; THOMAS; GERALDINE, 2009; HMDB, 2018)

Desta forma, foi possível realizar a proposta de identificação de sete substâncias, referentes aos picos: 1,2,7,9,10,11 e 12 sendo que os três primeiros não possuem atividade antioxidante relatada na literatura, no entanto, são essenciais para o bom desenvolvimento do cogumelo *A. subrufescens* ou possuem outros tipos de efeitos benéficos a saúde humana.

O pico 1 foi proposto como sendo um hexitol (LOHMAR; GOEPP, 1949). Seu íon molecular foi de m/z 181,07 indicando a forma molecular $C_6 H_{14} O_6$ e seus principais fragmentos com m/z de 163, 131, 119, 101 e 89, caracterizou a possível presença de um manitol. Este tipo de poliol pode ser encontrado nas hifas de fungos filamentosos, ser metabolizado com o objetivo de armazenamento do poder redutor ou ainda utilizado como uma fonte de carbono reserva. Alguns autores relatam a presença deste composto em cogumelos como o Champion e o Pippino (LANDI et al., 2017).

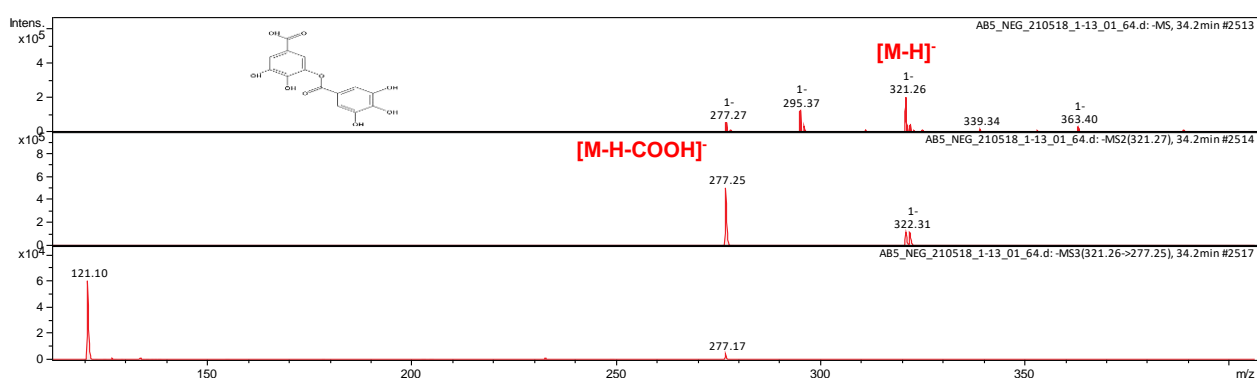
O composto referente ao pico 2 foi proposto como sendo a agaratina, um derivado natural da fenil-hidrazina muito comum em cogumelos do gênero *Agaricus*. Com a fórmula molecular de $C_6 H_{14} O_6$, este composto foi identificado no espectro de massas, no modo positivo, com um pico do íon molecular de m/z 268 com o principal fragmento em 137 referente a quebra da molécula ao meio, no carbono ligado ao átomo de nitrogênio (KIM et al., 2008b; ROUPAS et al., 2010). Sua presença na estrutura dos cogumelos é essencial para a proteção contra o crescimento de fungos competidores. Já para a saúde humana, a presença da agaratina ainda é incerta, visto que alguns estudos comprovam que ela auxilia no combate a algumas doenças como por exemplo, o câncer, já outros estudos relatam que esta substância apresentou efeitos carcinogênicos e tóxicos (AKIYAMA et al., 2011).

O pico 7, com íon molecular de relação m/z 329, no modo negativo, apresentou os principais fragmentos em 293 e 229 (HMDB, 2018) e pode ser identificado como ácido pinélico, sintetizado a partir do ácido tri-hidroxi-octadecenoico, proveniente do ácido linoleico. Sua principal atividade está relacionada com a sua capacidade de agir como um agente anti-inflamatório (NAGAI, et al. 2002).

Já o pico 9 foi proposto como sendo um ácido fenólico conhecido como ácido digálico, muito estudado por diversos pesquisadores devido ao seu alto potencial

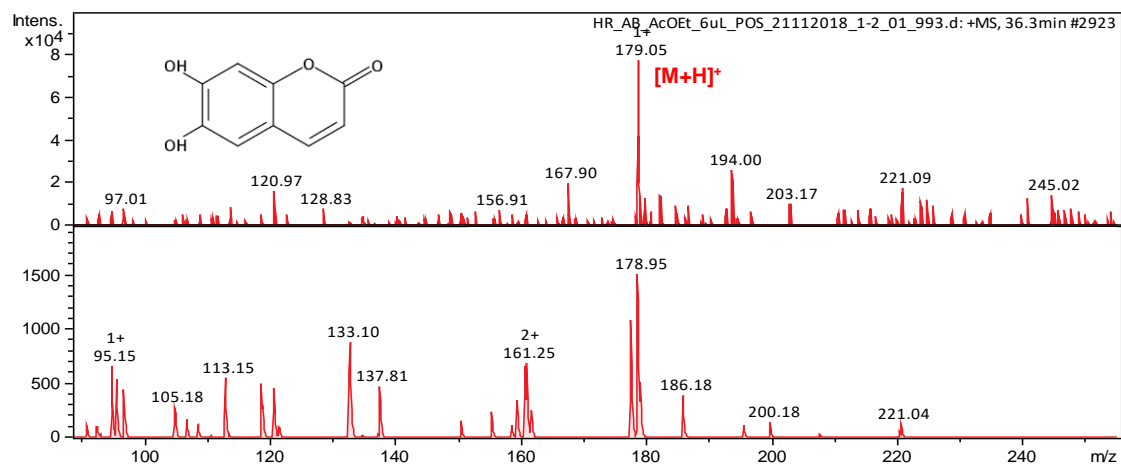
antioxidante, sendo utilizado na prevenção de algumas doenças neurodegenerativas e o câncer (NIĆIFOROVIĆ; ABRAMOVIĆ, 2014). Sua molécula apresentou um pico de íon molecular de m/z 321,04 com o principal fragmento em 277, característico da perda do grupo funcional carboxila (-COOH) e 121, como representado pela Figura 24 (KOYYALAMUDI et al. 2009).

Figura 24 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM do extrato acetálico obtido para a proposta do Ácido Digálico (Pico 9).



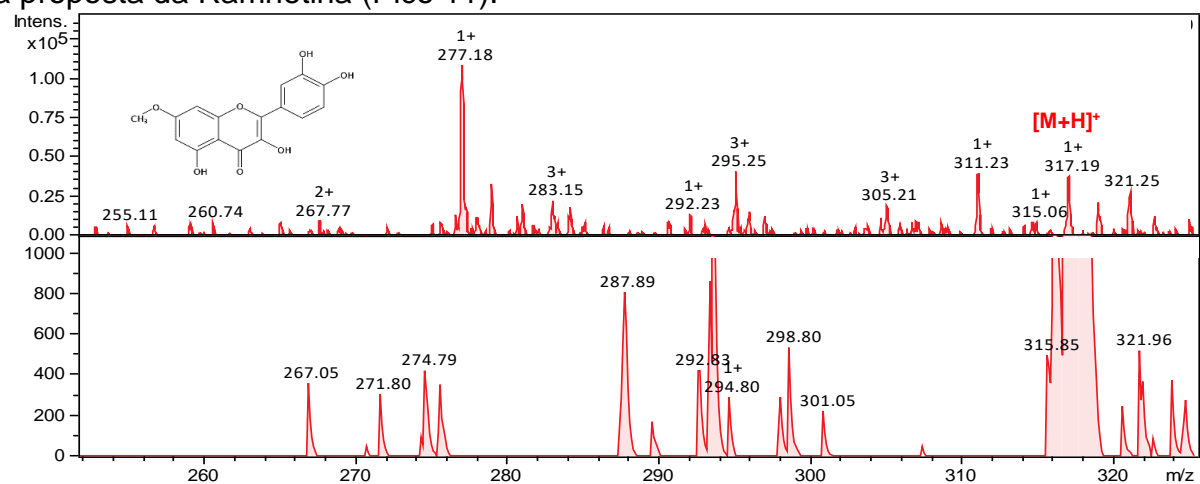
O pico 10 foi proposto como sendo a esculetina ou 6,7-di-hidroxicumarina, sendo um derivado das cumarinas encontrados em diversas fontes naturais. Seus efeitos benéficos a saúde humana são inúmeros, dentre os quais os mais estudados são seus efeitos anti-inflamatórios, anti-hepatotóxica, antioxidantes, além de suas propriedades anti-carcinogênicas (JEON et al., 2015). De acordo com MAO et al., (2015), esta substância possui a capacidade de induzir seletivamente a apoptose tumoral em diversos tipos de câncer, sendo assim, considerado como um agente quimioterápico muito promissor para medicina. Com seu pico de íon molecular protonado em m/z 179 e seus respectivos fragmentos em 161, 133, 105 e 91, esta substância foi identificada no modo positivo, de acordo com espectro mostrado na Figura 25. Esta substância foi relatada pela primeira vez na espécie do cogumelo *A. subrufescens*.

Figura 25 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM do extrato acetálico obtido para a proposta da esculetina (Pico 10).



O composto proposto referente ao Pico 11 do cromatograma seria um flavonol O-metilado, encontrado de forma natural nas plantas e fungos que possui atividade antioxidante e anti-inflamatória, como relatado por JNAWALI et al., (2013) conhecido como ramnetina. Seu íon molecular protonado foi de m/z 317,06, no modo negativo, indicando a fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_7$ com os principais fragmentos caracterizados por 301, 287 e 275, como exemplificado pela Figura 26.

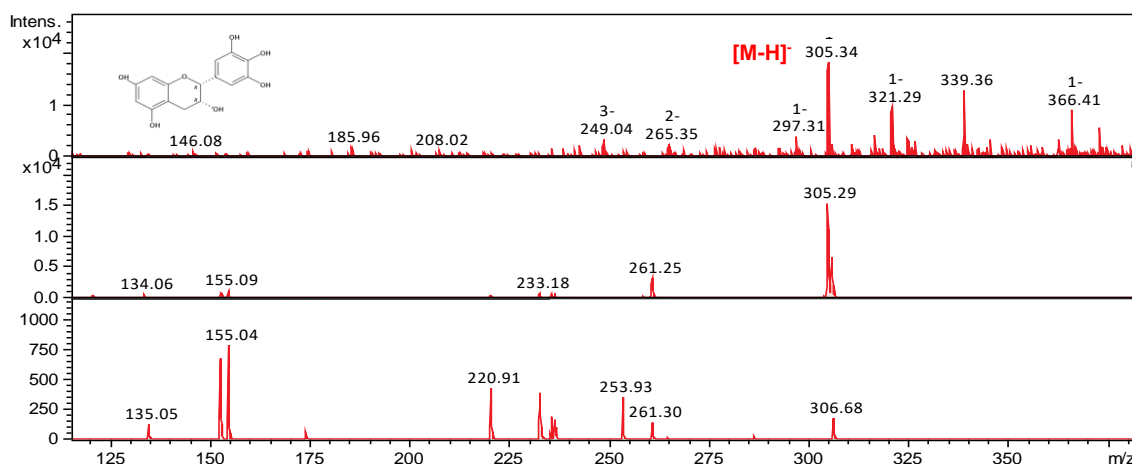
Figura 26 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM do extrato acetálico obtido para a proposta da Ramnetina (Pico 11).



Já o galato de epilocatequina foi a estrutura proposta para o pico 12 do cromatograma da Figura 12 (Item 4.2.3), esta é uma substância natural da classe das catequinas que também possui atividade antioxidante relatada na literatura, além da atividade de dilatação da artéria braquial (expansão dos vasos sanguíneos) e

oxidação da gordura e resistência do LDL (CHELLINO et al., 2016). Com a fórmula molecular de $C_{15}H_{14}O_7$, esta substância foi proposta, de acordo com o espectro obtido no modo negativo, com um íon de m/z de 305,34 e fragmentos em 261 e 153 representado pela Figura 27 (JAYAKUMAR; THOMAS; GERALDINE, 2009; HMDB, 2018).

Figura 27 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM do extrato acetálico obtido para a proposta da Galato de Epilocatequina (Pico 12).



4.5.1 Proposta de identificação das substâncias presentes no extrato hidroalcoólico por CL-EM.

Tendo em vista que os métodos de análise dos compostos antioxidantes do cogumelo *A. subrufescens* foram feitos através da utilização de uma solução hidroalcoólica foi preparado um extrato conforme descrito no item 4.2.1 para a proposta de identificação das substâncias ativas presentes neste extrato. Porém, não foi possível enumerar os compostos de acordo com seus respectivos sinais obtidos no cromatograma, pois não houve uma separação eficiente por CLAE-UV/DAD (Figura 8). Assim, as amostras foram analisadas pela técnicas CL-EM/EM (os espectros obtidos estão dispostos nos Anexos.), como apresentado pela Figura 28 e a proposta de identificação das substâncias encontradas neste extrato, realizada através da utilização dos dados das relações de m/z das substâncias e fragmentações já citados na literatura, pode ser observada na Tabela 14. Dentre as quais, é possível observar a presença de 1 composto que possui atividade antioxidante e justificando parcialmente os resultados obtidos nos testes de Fenóis totais, DPPH, ABTS e ORAC analisados neste trabalho.

Figura 28 – Cromatograma do pico base (BCP) extraído no modo negativo e positivo do extrato hidroalcoólico das amostras de *A. subrufescens*.

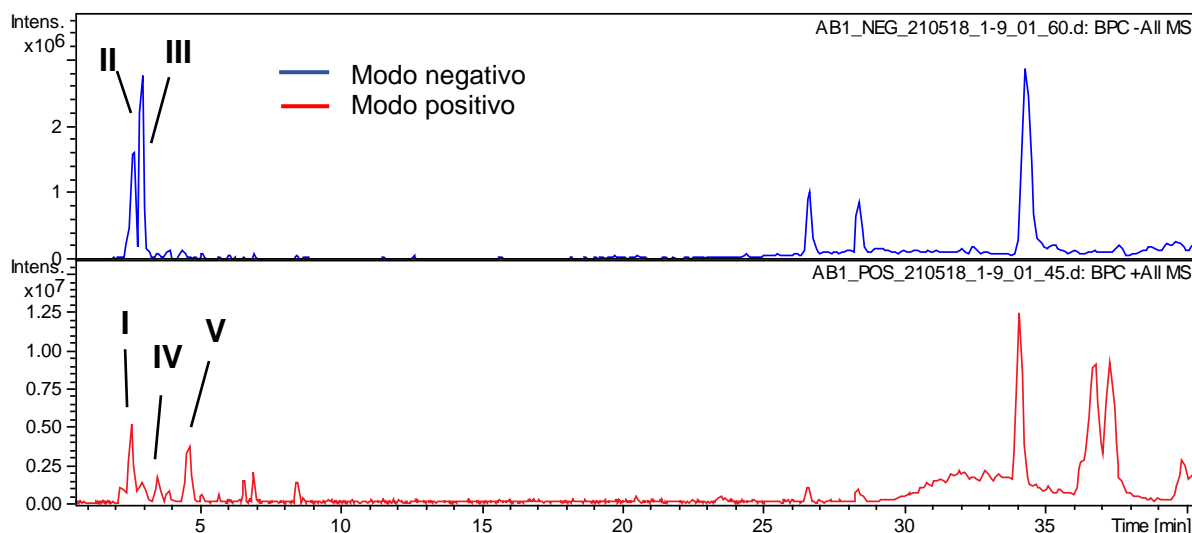


Tabela 14 - Identificação das substâncias presentes no extrato hidroalcoólico do cogumelo *A. subrufescens*.

Sustância	Nome	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MS ² /MS ³	Referência
I	Ácido <i>p</i> -cumárico	164,97	-	147, 119	(WEIJN, 2013)
II	Ergosterol	-	397,10	379,16; 337, 331	(KOYYALAMUDI et al. 2009)
III	Hexitol	-	181,07	163, 131, 119, 101, 89	(LANDI et al., 2017)
IV	Lactose	386,8	-	341, 221, 179	(GABBANINI et al., 2010)
V	Trehalose	341	-	178,96	(LANDI et al., 2017)

Desta forma, na classe dos ácidos fenólicos foi identificado o ácido *p*-cumárico (composto I) que faz parte de um importante grupo de metabólitos secundários e auxilia nos mecanismos de defesa e sobrevivência dos fungos.

O ácido *p*-cumárico apresenta no espectro de massa (Figura 29), no modo positivo, a molécula protonada m/z 164,97 [M+H]⁺, com os principais picos correspondendo à perda de uma molécula de água e uma molécula de CO, representados por m/z 146,90 [M+H-H₂O]⁺ e m/z 119,10 [M+H-H₂O-CO]⁺, respectivamente. Estas perdas são comuns aos ácidos fenólicos e estão representadas pela Figura 30.

Figura 29 - Espectro de massas obtido por CL-EM\EM obtido para a proposta de molécula I (ácido *p*-cumárico).

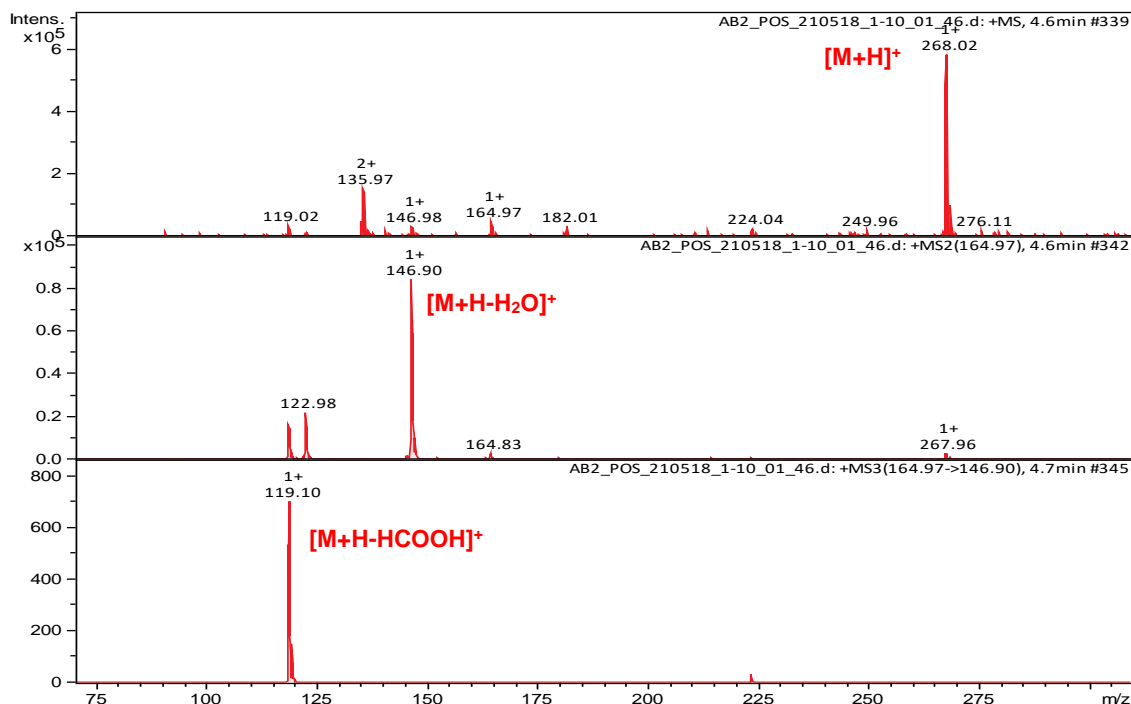
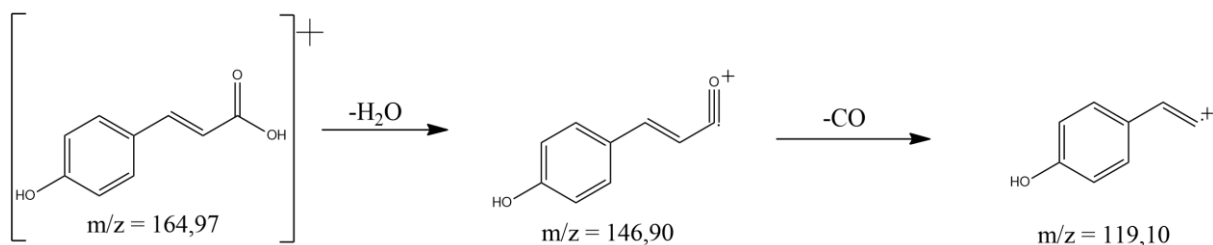


Figura 30 - Proposta de formação dos íons presentes em maior abundância da substância I.



Já a presença dos demais compostos, mesmo não sendo antioxidantes, possuem características essenciais para a sobrevivência dos fungos. A segunda molécula foi proposta como sendo o Ergosterol, um esteroide precursor da vitamina D2 também metabolizado pelos fungos. Suas principais funções são: fluidez, formação de microdomínios, funcionalidade protética (MEDINA; GALANO; TRIGOS, 2018). Assim, com uma fórmula molecular de $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$ o ergosterol apresenta no espectro de massa, no modo positivo, a molécula protonada m/z 397,10 $[\text{M}+\text{H}]^+$ com os principais fragmentos com: m/z 379,16 e 337 e 331.

As substâncias III, IV e V foram propostas como sendo alguns tipos de açúcares, muito comuns nos cogumelos e que podem ser encontrados na parede celular dos fungos como uma fonte de energia (SOPER et al., 2018). A substância III foi identificada como sendo um hexitol (LOHMAR; GOEPP, 1949). Seu íon molecular foi de 181,07 indicando a forma molecular $C_6 H_{14} O_6$ e seus principais íons de produto estavam com m/z de 163, 131, 119, 101 e 89 caracterizando a possível presença de um Manitol. Este tipo de poliol pode ser encontrado nas hifas de fungos filamentosos, ser metabolizado com o objetivo de armazenamento do poder redutor ou ainda utilizado como uma fonte de carbono reserva. Alguns autores relatam a presença deste composto em cogumelos como o Champion e o Pippino (LANDI et al., 2017). Já a substância IV foi identificada com a presença de um aduto $[M+HCOO]^-$ com m/z de 386,8 que deu origem aos fragmentos de m/z : 341, 221 e 179 caracterizando o comportamento comum de uma lactose e a substância V apresentou seu íon molecular com m/z de 341 e seu respectivo íon de produto com m/z de 178,96 caracterizando o comportamento de uma trehalose, que por sua vez, tem chamado à atenção dos pesquisadores há algum tempo por possuir algumas funções vitais aos fungos como demonstrado por LILLIE e PRINGLE (1980), onde durante um grande período de incubação a sobrevivência das células se tornaram reféns dos níveis de trehalose presente no meio ou como relatado por SOPER et al. (2018) em seu estudo sobre as propriedades estabilizantes e protetoras contra os estresses ambientais nos organismos vivos.

5 CONCLUSÕES

Por meio do estudo da variabilidade da composição química, dos testes de fenóis totais e capacidade antioxidante das 33 amostras de *Agaricus subrufescens* verificou-se as diferenças resultantes na utilização dos diferentes tipos de suplementos e suas influências sobre o desenvolvimento das linhagens estudadas.

Em relação à composição química, observou-se que as linhagens ABZ e T2 apresentaram maiores correlações com os teores de fibra e proteína bruta, sendo que o suplemento artesanal mistura e mistura formol proporcionou resultados similares a suplementação com o suplemento comercial *Champfood* para a linhagem ABZ, resultando em cogumelos com maiores quantidades de nutrientes e favorecendo a sua característica de alimento funcional.

Assim, verificou-se também que a origem da linhagem de cogumelos influencia a forma de desenvolvimento da composição química final destes alimentos, visto que, os mesmo tipos de suplementos quando aplicados à linhagens distintas deram origem a cogumelos com diferentes composições química.

No entanto, nos resultados obtidos por meio das análises dos perfis cromatográficos verificou-se uma similariedade entre as três linhagens, e as diferenciações ocorreram em relação a intensidade dos picos em cada amostra, discriminando as diferentes correlações das amostras com cada substância identificada.

Concluiu-se que os melhores suplementos artesanais foram: mistura formol e mistura, para as linhagens ABZ e T2, pois apresentaram o mesmo perfil cromatográfico da amostra suplementada com o suplemento comercial *Champfood* e Setas, sendo estes apresentaram maiores correlações com as substâncias agaritina, hexitol, ácido pinélico, digálico e ramnetina, que além de serem essenciais para o bom desenvolvimento do fungo ainda possuem propriedades medicinais.

Para os testes de fenóis totais a linhagem ABZ apresentou o maior teor de compostos fenólicos, quando suplementada pelo suplemento mistura e também o melhor resultado para ensaios de FRAP e ORAC quando suplementada pelo suplemento comercial setas, que apresentou resultados estaticamente iguais ao

suplemento artesanal mistura para ambos os métodos.

Através da análise por CL-EM do extrato hidroalcoólico identificou-se cinco substâncias, dentre as quais destacou-se o ácido *p*-cumárico por apresentar atividade antioxidante já relatada na literatura. Já no extrato de acetato de etila identificou-se sete substâncias, dentre elas a esculetina, que foi relatada pela primeira vez em cogumelos da espécie *A. subrufescens*.

Por fim, pôde-se concluir que a suplementação do cogumelo *A. subrufescens* com suplementos artesanais é uma alternativa viável à utilização de suplementos comerciais de alto custo, e que a linhagem que apresentou os melhores resultados foi a ABZ suplementada com o suplemento artesanal mistura formol e mistura. No entanto, fica claro que deve-se escolher o tipo de suplemento visando o perfil químico que se pretende obter no produto final, uma vez que, cada suplemento se comportou de forma diferente em cada uma das linhagens estudadas.

6 REFERÊNCIAS

ABDALLA, D. S. P. Radicais livres e antioxidantes. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**, v.10, p.474, 2003.

ABDEL-HAMEED, E. S. S.; BAZAID, S. A.; SALMAN, M. S. Characterization of the phytochemical constituents of taif rose and its antioxidant and anticancer activities. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–21, 2013.

ABDI, H.; WILLIAMS, L. J. Principal component analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 2, n. 4, p. 433–459, 2010.

AKIYAMA, H. et al. Agaritine from *Agaricus blazei* Murrill induces apoptosis in the leukemic cell line U937. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1810, n. 5, p. 519–525, 2011.

AL-DBASS, A. M.; AL- DAIHAN, S. K.; BHAT, R. S. *Agaricus blazei* Murill as an efficient hepatoprotective and antioxidant agent against CCl₄-induced liver injury in rats. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 303–309, 2012.

ALBION, H. N. OS MINERAIS ANTIOXIDANTES NA FORTIFICAÇÃO DE. p. 21–22, 2015.

ALLIATT, C. **Enriquecimento nutricional no cultivo do *agaricus blazei* com ferro e zinco e elaboração de preparação alimentícia com a farinha do cogumelo**, 2015.

ANDRADE, M. C. N. DE; MINHONI, M. T. D. A.; ZIED, D. C. Caracterização bromatológica de oito linhagens de *Lentinula edodes* (Shiitake) cultivadas em toras de *Eucalyptus grandis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 793–797, 2008.

ANDREA, M.; GARZÓN, G.; ROJANO, B. A. Inibição de la polifenoloxidasa extraída del banano por medio de algunos derivados del isoespintanol, 2012.

BAO, B. et al. Zinc decreases C-reactive protein , lipid peroxidation , and inflammatory cytokines in elderly subjects : a potential implication of zinc as an atheroprotective agent 1 – 3. p. 1634–1641, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BERNAUD, F. S. R.; RODRIGUES, T. C. Fibra alimentar: ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, n. 6, p. 397–405, 2013.

BHOURI, W. et al. Investigation of the apoptotic way induced by digallic acid in human lymphoblastoid TK6 cells. **Cancer Cell International**, v. 12, p. 1–8, 2012.

BIANCHI, M. DE L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123–130, 1999.

BROOKS, C. J. W.; HORNING, E. C.; YOUNG, J. S. Characterization of sterols by gas chromatography-mass spectrometry of the trimethylsilyl ethers. **Lipids**, v. 3, n. 5, p. 391–402, 1968.

CARNEIRO, A. A. J. et al. 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.

CARVAJAL, A. E. S. S. et al. 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.

CHELLINO, M. et al. Nutrition and Health Info Sheet: Catechins and Epicatechins consuming these foods. **Nutrition and Health Info Sheet**, p. 8, 2016.

CORREA, G. Estimativa do consumo de vitaminas e minerais antioxidantes da dieta brasileira Intakes of antioxidant vitamins and minerals in the Brazilian diet. v. 33, n. 3, p. 30–38, 2013.

COSTA, N. R. S. A. B. DA S. G. P. J. N. DA C. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, p. 263–269, 2012.

DALL´ANTONIA, L. H.; ARCHELA, E. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, n. 2, p. 193, 2013.

DONG, Q. et al. Structural characterization of a water-soluble b- D -glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. **Carbohydrate research**, v. 337, n. 337, p. 1417–1421, 2002.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* murrill: Review of literature and pharmaco-toxicological problems. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 1, p. 3–15, 2008.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 154–157, 2007.

GABBANINI, S. et al. Anomeric discrimination and rapid analysis of underivatized lactose, maltose, and sucrose in vegetable matrices by U-HPLC - ESI-MS/MS using porous graphitic carbon. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 45, n. 9, p. 1012–1018,

2010.

GELADI, P. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 58, n. 5, p. 767–782, 2003.

GUO, Y.-J. et al. Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible macro-fungi. **Food & Function**, v. 3, n. 11, p. 1195, 2012.

HERREIRA, O. M. CÂMPUS DE BOTUCATU PRODUÇÃO , ECONOMICIDADE E PARÂMETROS ENERGÉTICOS DO COGUMELO *Agaricus blazei* : UM ENFOQUE DE CADEIA Profª Drª Maristela Simões do Carmo. 2001.

HONGYU, K.; JORGE, G.; JUNIOR, D. O. Análise de Componentes Principais : resumo teórico , aplicação e interpretação. **Engineering and Science**, v. 1, p. 83–90, 2015.

HUANG, S. J.; MAU, J. L. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of γ -irradiation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 7, p. 707–716, 2006.

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.

JEON, Y.-J. et al. Esculetin, a Coumarin Derivative, Exhibits Anti-proliferative and Pro-apoptotic Activity in G361 Human Malignant Melanoma. **Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 2, p. 106–112, 2015.

JNAWALI, H. N. et al. Anti-inflammatory Activity of Rhamnetin and a Model of Its Binding to c- Jun NH2- Terminal Kinase 1 and p38 MAPK. p. 1–6, 2013.

KIM, M. et al. Phenolic Compound Concentration and Antioxidant Activities of Edible and Medicinal Mushrooms from Korea Phenolic Compound Concentration and Antioxidant Activities of Edible and Medicinal Mushrooms from. **Agric. Food Chem**, v. 56, p. 7265–7270, 2008a.

KIM, Y.-S. et al. Chemical Constituents of the Fruiting Bodies of *Clitocybe nebularis* and Their Antifungal Activity. **Mycobiology**, v. 36, n. 2, p. 110–3, 2008b.

KUSS, F. **AGENTES OXIDANTES E ANTIOXIDANTES**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

LANDI, N. et al. Pioppino mushroom in southern Italy: an undervalued source of nutrients and bioactive compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 15, p. 5388–5397, 2017.

LIMA, C. U. J. O.; GRIS, E. F.; KARNIKOWSKI, M. G. O. Antimicrobial properties of the mushroom *Agaricus blazei* – integrative review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 6, p. 780–786, 2016.

LOHMAR, R.; GOEPP, R. M. The Hexitols and Some of their Derivatives. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 4, n. C, p. 211–241, 1949.

LOPES, R.E.C.; DOS SANTOS, I. P. E. A. Aplicação da Análise por Componentes Principais (PCA) na identificação de marcas de canetas esferográficas – uma introdução à quimiometria. **Sbq**, p. 547–556, 2010.

LOPES, A. S. I – FERTILIDADE DO SOLO E PRODUTIVIDADE AGRÍCOLA. 2007.

MAO, G. et al. Synthesis , biological activities and therapeutic properties of esculetin and its derivatives. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 4, p. 122–130, 2015.

MAREKOVA, I. et al. Fatty acid composition of wild mushroom species of order Agaricales—Examination by gas chromatography–mass spectrometry and chemometrics. **Journal of Chromatography B**, p. 1–6, 2012.

MARINO, R. H.; ABREU, L. D. DE; DE, L. D. Cultivo do cogumelo Shiitake em resíduo de coco suplementado com farelo de trigo e / ou arroz Cultivation of mushroom Shiitake in coconut wastes supplemented with bran or / and rice. v. 4, p. 11–16, 2009.
MEDINA, M. E.; GALANO, A.; TRIGOS, A. On the Scavenging Ability of Homogentisic Acid and Ergosterol towards Free Radicals Derived from Ethanol Consumption. **Journal of Physical Chemistry B**, 2018.

MENDES, A. M. S. **A FERTILIDADE DO SOLO**, 2010.

MENOLI, R. C. R. N. et al. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 496, n. 1–2, p. 5–13, 2001.

MISTRY, H. D.; WILLIAMS, P. J. The Importance of Antioxidant Micronutrients in Pregnancy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2011, n. 841749, p. 12, 2011.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos Funcionais E Nutracêuticos: Definições, Legislação E Benefícios À Saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109–122, 2007.

NASCIMENTO, T. M. **IMPORTÂNCIA DAS PROTEÍNAS NA NUTRIÇÃO HUMANA - TEORIA E PRÁTICA PARA ENSINO MÉDIO**, 2011.

NEISSE, A. C.; HONGYU, K. Aplicação de componentes principais e análise fatorial a dados criminais de 26 estados dos EUA. **E&S Engineering and Science**, v. 5, n. 2, p. 105, 2016.

NETO, B. DE B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 ANOS DE QUIMIOMETRIA NO BRASIL. **Assuntos Gerais**, v. 25, n. 4, p. 689–695, 2002.

NIĆIFOROVIĆ, N.; ABRAMOVIČ, H. Sinapic acid and its derivatives: Natural sources and bioactivity. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 1, p. 34–51, 2014.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph•: Estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015.

PRADO, R.; FURLANI, Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis Nutritional value of edible mushrooms. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 64, n. 1, p. 149–154, 2005.

QUEIROZ, T. C. et al. Composição química e atividade antioxidante de *Agaricus blazei* e seu efeito sobre a modulação da mitose. **Journal of Health Sciences**, v. 18, n. 2, p. 134–138, 2016.

ROUPAS, P. et al. Mushrooms and agaritine: A mini-review. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 2, p. 91–98, 2010.

SILVA, C. A. et al. Fontes Vegetais Naturais De Antioxidantes. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

SILVA, A. C. DA; JORGE, N. Cogumelos : compostos bioativos e propriedades antioxidantes Mushrooms : Bioactive Compounds and Antioxidant Properties. **Cient Ciênc Biol Saúde** 20, p. 375–384, 2011.

SOARES, A. A. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus*

brasiliensis (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 775–781, 2009.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOPER, A. K. et al. Trehalose in Water Revisited. **Journal of Physical Chemistry B**, 2018.

VIDAL, A. M. et al. A ingestão de alimentos funcionais e sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças. **Cadernos de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 1, n. 15, p. 43–52, 2012.

VIEIRA, F. R. **Potencial de uso de gramíneas como substrato pasteurizado no cultivo do cogumelo *Pleurotus ostreatus***, 2011.

WISITRASSAMEEWONG, K. et al. *Agaricus subrufescens*: A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 2, p. 131–146, 2012.

YUN, E. S. et al. Determination of the esculetin contents of medicinal plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 10, p. 1247–1251, 2012.

ZHOU, J.; FENG, T.; YE, R. Differentiation of eight commercial mushrooms by electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Sensors**, 2015.

ZIED, D. C. et al. Production of *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) on different casing layers and environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1857–1863, 2010.

ZIED, D. C. et al. Mycochemical Characterization of *Agaricus subrufescens* considering Their Morphological and Physiological Stage of Maturity on the Traceability Process. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

ZIED, D. C. et al. Article type : w e i v re Frontiers website link : In w e i v re. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, 2018.

7 ANEXO

Figura 31 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM do extrato acetático obtido para a proposta do Hexitol (Pico 1).

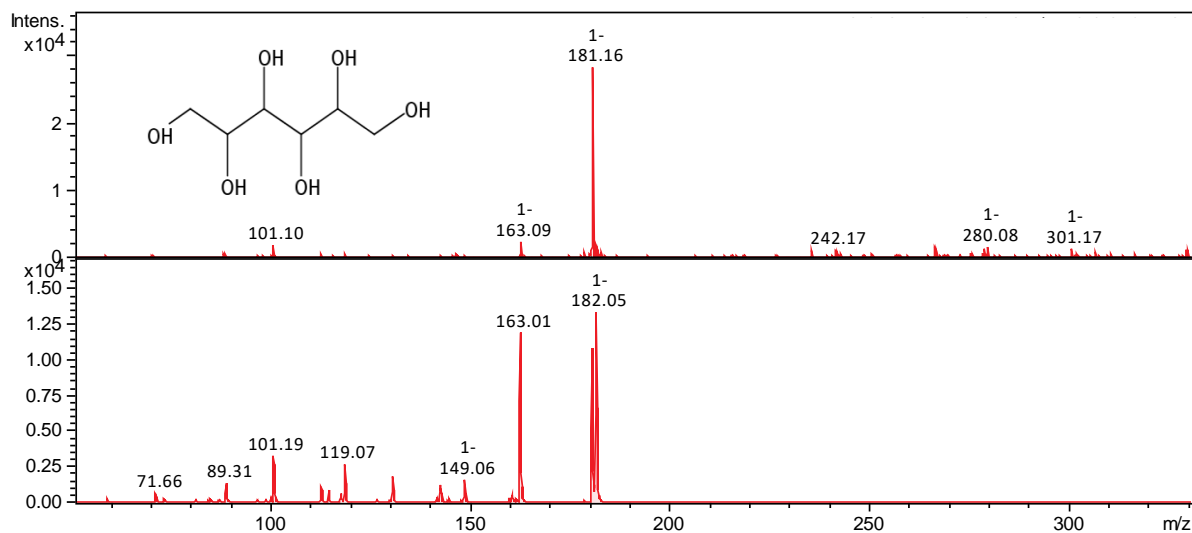


Figura 32 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM do extrato acetático obtido para a proposta do Ácido Pinélico (Pico 7).

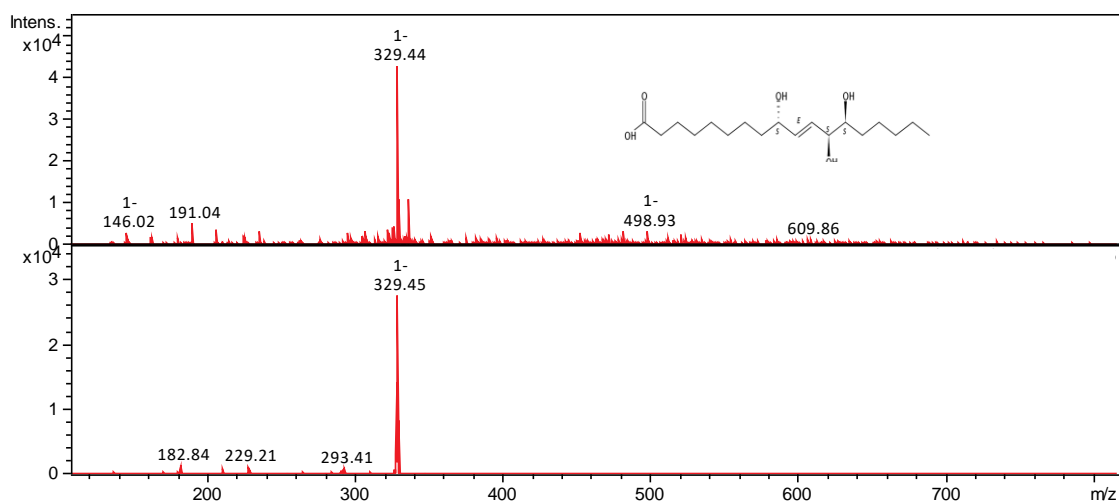


Figura 33 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM do extrato hidroalcoólico obtido para a proposta do Ergosterol (substância II).

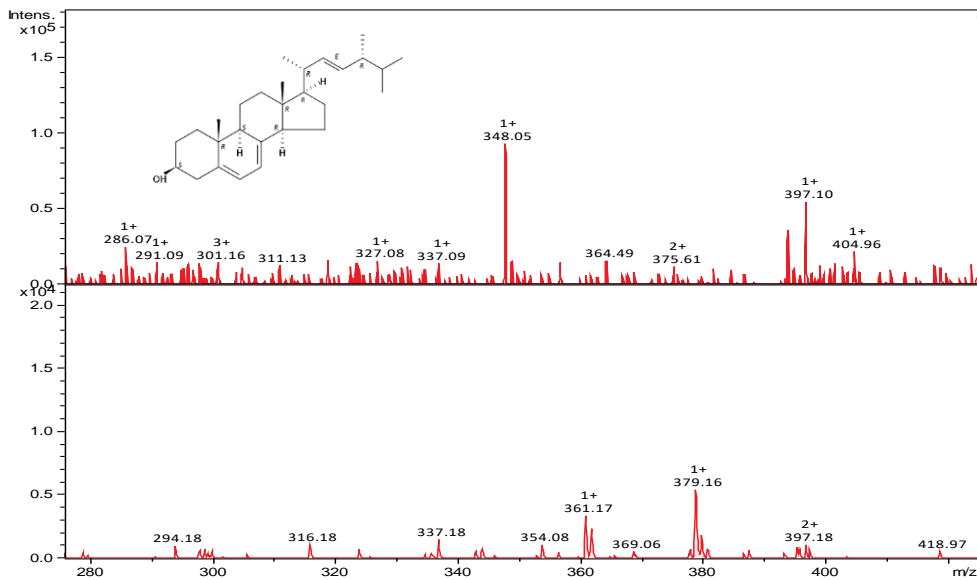


Figura 34 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM obtido para a proposta do Hexitol (substância III).

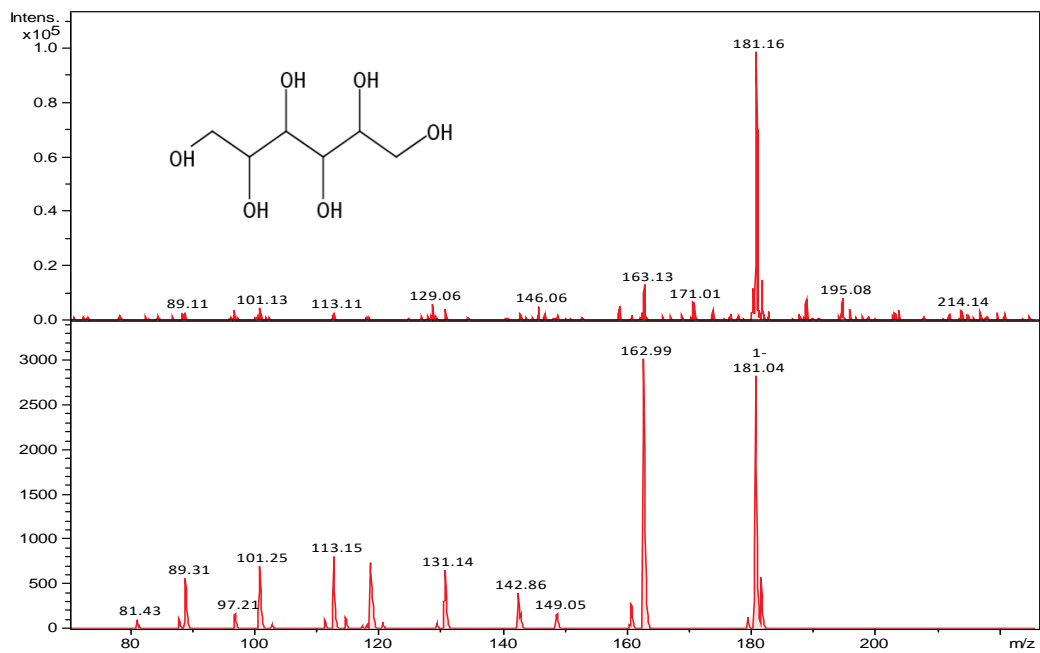


Figura 35 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM obtido para a proposta da Lactose (substância IV).

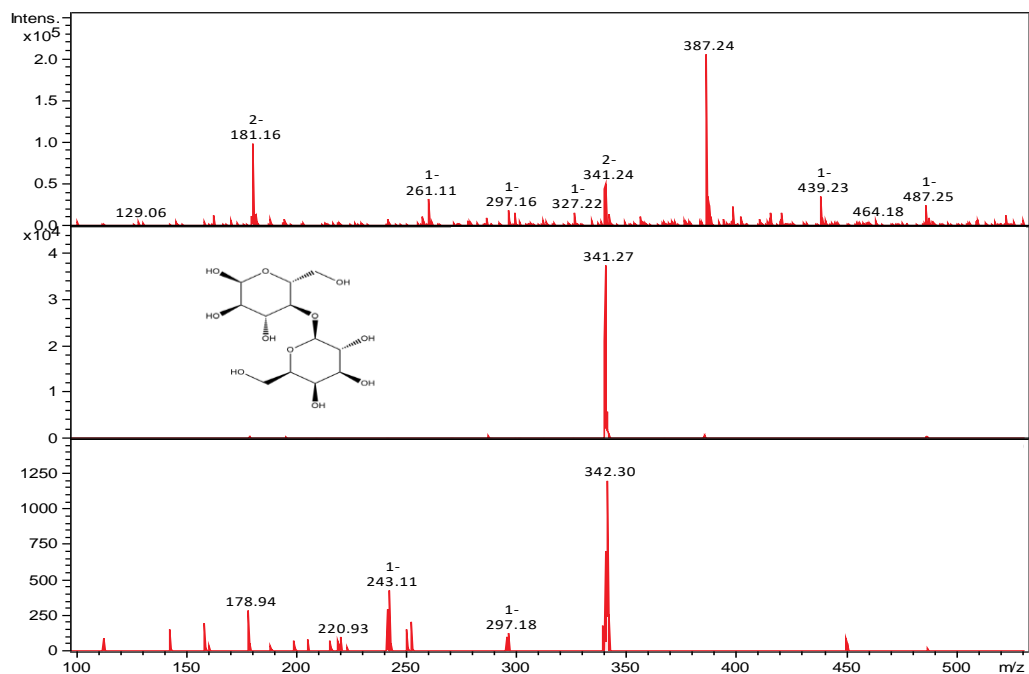


Figura 36 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM obtido para a proposta da Trehalose (substância V).

