



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GEORGE AZEVEDO DE OLIVEIRA

**ESTUDO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE *Pleurotus ostreatus* var.  
Florida CULTIVADA COM DIFERENTES SUPLEMENTOS  
ARTESANAIS E COMERCIAIS**

---

Londrina  
2019

GEORGE AZEVEDO DE OLIVEIRA

**ESTUDO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE *Pleurotus ostreatus* var.  
Florida CULTIVADA 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.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik

Londrina  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Azevedo de Oliveira, George.

ESTUDO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE *Pleurotus ostreatus* var. Florida CULTIVADA COM DIFERENTES SUPLEMENTOS ARTESANAIS E COMERCIAIS / George Azevedo de Oliveira. - Londrina, 2019.  
86 f. : il.

Orientador: Maria Luiza Zeraik.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, , 2019.

Inclui bibliografia.

1. *Pleurotus ostreatus* - Tese. 2. Suplementação - Tese. 3. Composição Química - Tese. 4. Atividade Antioxidante - Tese. I. Luiza Zeraik, Maria. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. . III. Título.

GEORGE AZEVEDO DE OLIVEIRA

**ESTUDO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE *Pleurotus ostreatus* var. Florida  
CULTIVADA 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**

---

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Alexandre Orsato  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Debora Cristina Baldoqui  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 19 de fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Aurivani Azevedo Silveira e José  
Rodrigues de Oliveira, pela força e por  
sempre acreditar nos meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela dádiva da vida e por ter me dado forças para seguir em frente todas as vezes que me senti fraco.

À minha família: Aurivani (mãe), de Oliveira (pai), Jordan (irmão) e Mariana (irmã), por sempre me incentivar a buscar meus objetivos e estarem presentes nas horas que mais preciso.

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 o mestrado.

Ao Dr. Diego Cunha Zied pela produção das amostras estudadas, bem como, por ter me permitido dar continuidade ao seu trabalho.

Ao Dr. Valdecir Farias Ximenes pela oportunidade de realização de um estágio de 6 meses em seu laboratório (Laboratório de Pesquisa Eletro Analítica e Bioquímica de Processos Oxidativos) juntamente com o grupo de pesquisa.

À minha colaboradora Doutoranda Luiza de Carvalho Bertozo pelo apoio, dedicação nos ensaios antioxidantes e pela amizade.

À professora Ieda (LQCN- Laboratório de quimiometria em Ciências Naturais) por todo suporte dado a esta pesquisa.

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

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu. Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;”

Eclesiastes 3.1-2

OLIVEIRA, George Azevedo. **Estudo de constituintes químicos e atividade antioxidante da espécie *Pleurotus ostreatus* var. Florida cultivada com diferentes suplementos artesanais e comerciais**. 2019. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

O *Pleurotus ostreatus*, conhecido como shimeji, é um dos cogumelos comestíveis mais cultivados no Brasil, ocupando essa posição desde 2012, quando a produção de *Agaricus bisporus* (champignon) foi reduzida devido a importação de cogumelos de baixo preço proveniente da China. Durante o cultivo de *P. ostreatus* var. Florida é feita a adição de um suplemento rico em diversos nutrientes capazes de aumentar o valor nutricional disponível neste cogumelo. Desta forma o objetivo deste trabalho foi determinar a composição química, fenóis totais e a capacidade antioxidante das diferentes partes do *P. ostreatus* var. Florida (estipe, píleo e o cogumelo inteiro), cultivadas com quatro diferentes tipos de suplementos artesanais e dois comerciais. O estudo da composição química foi realizado através da determinação de cinzas, fibras, umidade, proteína, carboidratos e lipídios de acordo com os métodos descritos pela Associação Oficial de Métodos Analíticos (AOAC) e os extratos hidroetanólicos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV/DAD). Para o tratamento destes dados foi utilizada a técnica quimiométrica de Análise de Fatores (AF). Os testes antioxidantes do extrato hidroalcoólico foram avaliados pelo sequestro do radical DPPH<sup>•</sup>, poder de redução do ferro (FRAP) e a capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC). O teste de fenóis totais foi determinado pelo método de *Folin-Ciocalteu*. Por fim, a proposta de identificação das substâncias presentes no extrato de cogumelo foi realizada utilizando a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM/EM). Na análise da composição química, os cogumelos inteiros cultivados com os suplementos combinação (artesanal) e *champfood* (importado) obtiveram os maiores teores de fibras (19,04%) e proteínas (17,49%), respectivamente. Nas análises das estipes do cogumelo, os maiores teores de fibras e proteínas foram apresentados por aqueles cultivados com os suplementos mistura (33,23%) e o importado *champfood* (9,34%), respectivamente. O píleo do cogumelo demonstrou maior teor de fibra bruta com o suplemento amendoim (20,98%) e o maior conteúdo proteico foi obtido com a suplementação usando *champfood* (22,28%). De um modo geral, os cogumelos *P. ostreatus* var. Florida que foram cultivados com as suplementações *champfood* e combinação foram as que apresentaram maior capacidade antioxidante apresentadas nos testes de DPPH<sup>•</sup>, ORAC e FRAP. Através da análise de CLAE-EM/EM do extrato hidroetanólico foi possível identificar o dissacarídeo trealose. Assim, verificou-se que os suplementos artesanais são uma alternativa viável aos comerciais e que o tipo de suplementação influencia significativamente na composição final do cogumelo estudado.

**Palavras-chave:** *P. ostreatus*. Suplementação. Composição química. Atividade antioxidante.

OLIVEIRA, George Azevedo. **Study of chemical constituents and antioxidant activity of the species *Pleurotus ostreatus* var. Florida grown with different artesanal and commercial supplements.** 2019. 86 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

*Pleurotus ostreatus*, known as shimeji, is one of the most cultivated edible mushrooms in Brazil, occupying this position since 2012, when the production of *Agaricus bisporus* (champignon) has been reduced due to the importation of low-priced mushrooms from china. During cultivation of *P. ostreatus* var. Florida is made the addition of a nutrient-rich supplement capable of increasing the nutritional value available in this mushroom. In this way the objective of this work was to determine the chemical composition, total phenols and antioxidant capacity of the different parts of *P. ostreatus* var. Florida (stipe, pileo and the whole mushroom), grown with four different types of handmade and two commercial supplements. The chemical composition study was performed by determination of ash, fiber, moisture, protein, carbohydrate and lipids according to the methods described by the official association of analytical methods (AOAC) and the hydroethanolic extracts were analyzed by high performance liquid chromatography (CLAE-UV/DAD). For the treatment of these data the chemical factor analysis (AF) technique was used. The antioxidant tests of the hydroalcoholic extract were evaluated by sequestration of the dpph radical, iron reducing power (FRAP) and oxygen radical absorption capacity (ORAC). The total phenol test was determined by the folin-ciocalteu method. Finally, the proposed identification of the substances present in the mushroom extract was performed using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (CLAE-EM/EM). In the analysis of chemical composition, whole mushrooms cultivated with combination (artesanal) and champfood (imported) supplements obtained the highest fiber (19.04%) and protein (17.49%), respectively. In the analysis of the sprouts of the mushroom, the highest fiber and protein contents were presented by those cultivated with the blend supplements (33.23%) and imported champfood (9.34%), respectively. Mushroom ryegrass showed higher crude fibra content with the peanut supplement (20.98%) and the highest protein content was obtained with the supplementation using champfood (22.28%). In general, *P. ostreatus* var. Florida that were cultivated with the champfood and combination supplements were the ones with the highest antioxidant capacity presented in the DPPH', ORAC and FRAP tests. Through the analysis of CLAE-EM/EM of the hydroethanolic extract it was possible to identify the disaccharide trehalose. Thus, it was verified that the artesanal supplements are a viable alternative to the commercial ones and that the type of supplementation influences significantly in the final composition of the mushroom studied.

**Key words:** *P. ostreatus*. Supplementation. Chemical composition. Antioxidant activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b>	Partes de um cogumelo. ....	17
<b>Figura 2:</b>	Cogumelo <i>Pleurotus ostreatus</i> da variação Florida. ....	19
<b>Figura 3:</b>	Estrutura polimérica da botriosferana. ....	21
<b>Figura 4:</b>	Redução do radical livre pelo flavonoide quercetina. ....	25
<b>Figura 5:</b>	Exemplos de compostos fenólicos encontrados em vegetais e fungos.....	26
<b>Figura 6:</b>	Fluxograma ilustrativo dos processos de extração dos compostos de <i>P. ostreatus</i> var. Florida. ....	41
<b>Figura 7:</b>	Gráfico de <i>loading</i> do Fator 1 versus Fator 2 obtido através do estudo da análise química das amostras inteiras, estipe e píleo da espécie <i>P. ostreatus</i> var. Florida.....	51
<b>Figura 8:</b>	Gráfico de <i>scores</i> do Fator 1 versus Fator 2 obtido através do estudo da análise química das amostras inteiras, estipe e píleo da espécie <i>P. ostreatus</i> var. Florida.....	52
<b>Figura 9:</b>	Curva analítica do padrão de ácido gálico para quantificação de fenóis totais. ....	53
<b>Figura 10:</b>	Quantificação do teor de fenóis totais nas amostras inteiras do <i>P. ostreatus</i> var. Florida. ....	54
<b>Figura 11:</b>	Redução da molécula de DPPH <sup>*</sup> na forma de radical livre (Violeta); DPPH na forma reduzida (Amarelo). ....	58
<b>Figura 12:</b>	Curvas analíticas dos cogumelos secos e moídos para cálculo do EC <sub>50</sub> da capacidade redutora do radical DPPH <sup>*</sup> , onde: a) controle; b) champfood; c) SETAS; d) amendoim; e) combinação; f) fruta; g) mistura.....	59
<b>Figura 13:</b>	Curvas analíticas das partes dos cogumelos secos e moídos para cálculo do EC <sub>50</sub> da capacidade redutora do radical DPPH <sup>*</sup> , onde: a) <i>champfood</i> estipe; b) <i>champfood</i> píleo; c) combinação estipe; d) combinação píleo.....	60
<b>Figura 14:</b>	Comparação entre os resultados da capacidade antioxidante dos cogumelos sem extração prévia, dos extratos e dos resíduos provenientes da extração.....	63
<b>Figura 15:</b>	Proteção da fluoresceína através da presença de compostos que possuem atividade antioxidante.....	65

<b>Figura 16:</b>	Capacidade antioxidante do ensaio de ORAC das amostras de <i>P. ostreatus</i> var. Florida inteiras.....	66
<b>Figura 17:</b>	Formação do complexo Fe <sup>2+</sup> - TPTZ a partir do complexo Fe <sup>3+</sup> - TPTZ por ação redutora.....	68
<b>Figura 18:</b>	Curva analítica do padrão de ácido gálico para determinação de µg EAG/mL no teste de FRAP.....	69
<b>Figura 19:</b>	Capacidade antioxidante do ensaio de FRAP das amostras de <i>P. ostreatus</i> var. Florida inteiras.....	70
<b>Figura 20:</b>	Perfis cromatográficos (CLAE-UV/DAD) em λ= 280 nm dos extratos realizados com a amostra de cogumelo cultivado com o suplemento combinação: (a) método A; (b) método B; (c) método C; (d) método D;.....	72
<b>Figura 21:</b>	Perfis cromatográficos dos extratos hidroetanólicos do <i>Pleurotus ostreatus</i> var. Florida (inteiro) cultivado com suplementos artesanais (amendoim, combinação, fruta, mistura), importados ( <i>champfood</i> e SETAS) e sem suplementação (controle). Numerados de 1 a 10 os picos majoritários.....	74
<b>Figura 22:</b>	Cromatograma do íon total (TIC) obtido no modo negativo por CLAE-EM/EM do extrato hidroetanólico de <i>P. ostreatus</i> var. Florida cultivado com o suplemento combinação.....	75
<b>Figura 23:</b>	Espectros de massas obtido por CLAE-EM/EM do extrato hidroetanólico de <i>P. ostreatus</i> -proposta da trealose (substância I); a) Espectro de massas no íon molecular (MS); b) Fragmentação do íon molecular (MS <sup>2</sup> ); c) fragmentação do pico base (MS <sup>3</sup> ).....	76
<b>Figura 24:</b>	Estrutura molecular da trealose.....	77
<b>Figura 25:</b>	Espectro de massas obtido por CLAE-EM/EM do extrato hidroetanólico de <i>P. ostreatus</i> -proposta da trealose com aduto HCOOH (substância II); a) Espectro de massas no íon molecular (MS); b) Fragmentação do íon molecular (MS <sup>2</sup> ); c) fragmentação do pico base (MS <sup>3</sup> ).....	78

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Identificação de metabólitos em <i>Pleurotus ostreatus</i> . ....	22
<b>Tabela 2:</b>	Descrição dos termos usados para alimentos segundo a Portaria nº 27 (ANVISA, 1998). ....	23
<b>Tabela 3:</b>	Amostras de <i>P. ostreatus</i> var. Florida cultivadas com diferentes suplementos artesanais e importados. ....	32
<b>Tabela 4:</b>	Condições cromatográficas para separação dos extratos de <i>P. ostreatus</i> var. Florida. ....	43
<b>Tabela 5:</b>	Composição química do cogumelo <i>P. ostreatus</i> var. Florida (inteiro) cultivado com diferentes suplementos artesanais e comerciais* ....	45
<b>Tabela 6:</b>	Composição química da estipe do <i>P. ostreatus</i> var. Florida cultivado com diferentes suplementos artesanais e comerciais. ....	47
<b>Tabela 7:</b>	Composição química do píleo do <i>P. ostreatus</i> var. Florida cultivado com diferentes suplementos artesanais e comerciais. ....	48
<b>Tabela 8:</b>	Quantificação de fenóis totais nas amostras de <i>P. ostreatus</i> var. Florida inteiro. ....	54
<b>Tabela 9:</b>	Quantificação de fenóis totais nas amostras de <i>P. ostreatus</i> var. Florida estipe e píleo suplementados com combinação e <i>champfood</i> . ....	56
<b>Tabela 10:</b>	Rendimento das extrações com diferentes solventes. ....	57
<b>Tabela 11:</b>	Valores de EC <sub>50</sub> da capacidade redutora do radical DPPH <sup>*</sup> das amostras de <i>P. ostreatus</i> var. Florida inteiros. ....	59
<b>Tabela 12:</b>	Capacidade redutora do radical DPPH <sup>*</sup> junto aos extratos dos cogumelos inteiros cultivados com suplementos artesanais e importados. ....	61
<b>Tabela 13:</b>	Capacidade redutora do radical DPPH <sup>*</sup> junto aos resíduos dos cogumelos inteiros cultivados com suplementos artesanais e importados. ....	62
<b>Tabela 14:</b>	Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos das estipes e píleos dos cogumelos produzidos com os suplementos <i>champfood</i> e combinação. ....	63

<b>Tabela 15:</b>	Atividade antioxidante dos resíduos das estipes e píleos dos cogumelos produzidos com os suplementos <i>champfood</i> e combinação.....	64
<b>Tabela 16:</b>	Resultados para o teste da capacidade antioxidante do ensaio de ORAC das amostras de <i>P. ostreatus</i> var. Florida inteiras.....	66
<b>Tabela 17:</b>	Resultados do ensaio antioxidante ORAC para estipe e píleo dos cogumelos cultivados com os suplementos combinação e <i>champfood</i> . ....	67
<b>Tabela 18:</b>	Resultados para o teste da capacidade antioxidante do ensaio de FRAP das amostras de <i>P. ostreatus</i> var. Florida inteiras.....	69
<b>Tabela 19:</b>	Resultados do ensaio antioxidante FRAP para estipe e píleo dos cogumelos cultivados com os suplementos combinação e <i>champfood</i> . ....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) dihidrocloreto
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico
AF	Análise de Fatores
AG	Ácido Gálico
AOAC	<i>Association of Oficial Analytical Chemists</i>
CLAE-UV/DAD	Cromatografia líquida com detector de arranjo de fotodiodos
CLAE-EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
DPPH <sup>•</sup>	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESI	Ionização do tipo eletro-spray
FAO	<i>Food and Agruculture Organization of the United Nation</i>
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
FT	Fenóis Totais
TPTZ	Tripiridiltriazina
ORAC	<i>Oxygen radical absorbance capacity</i>
UV	Ultra-violeta

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1.	<i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> (SHIMEJI) .....	18
1.2.	SUPLEMENTAÇÃO.....	19
1.3.	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE COGUMELOS.....	20
1.4.	COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	24
1.5.	COMPOSTOS FENÓLICOS .....	26
1.6.	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) NA ANÁLISE DE COGUMELOS .....	27
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
2.1.	OBJETIVO GERAL .....	29
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
3.1.	AMOSTRAS .....	30
3.2.	PREPARO DAS AMOSTRAS .....	31
3.3.	COMPOSIÇÃO QUÍMICA .....	33
3.3.1.	<i>Umidade</i> .....	33
3.3.2.	<i>Cinzas</i> .....	34
3.3.3.	<i>Fibra bruta</i> .....	34
3.3.4.	<i>Nitrogênio Total</i> .....	35
3.3.5.	<i>Proteína Bruta</i> .....	36
3.3.6.	<i>Lipídios</i> .....	37
3.3.7.	<i>Carboidratos Totais</i> .....	37
3.4.	FENÓIS TOTAIS .....	38
3.5.	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE .....	38
3.5.1.	<i>Preparo dos extratos</i> .....	38
3.5.2.	<i>Ensaio da Capacidade Redutora do Radical DPPH</i> .....	39
3.5.3.	<i>Ensaio da Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC)</i> .....	39
3.5.4.	<i>Ensaio do Poder de Redução do Ferro (FRAP)</i> .....	40
3.6.	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	41
3.6.1.	<i>Preparo dos extratos de P. osteratus var. Florida</i> .....	41

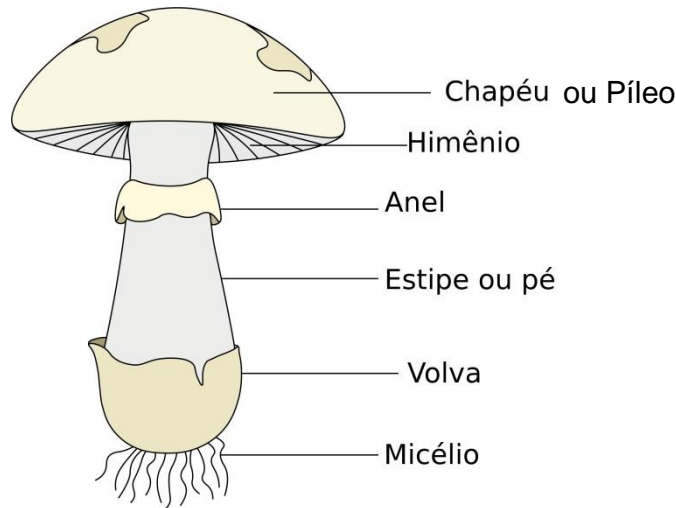
3.6.2.	<i>Otimização e Análise por CLAE-UV/DAD</i> .....	42
3.7.	ANÁLISE DE FATORES APLICADA À ANÁLISE QUÍMICA .....	43
3.8.	IDENTIFICAÇÕES DAS SUBSTÂNCIAS PRESENTES NO EXTRATO DE <i>P. OSTREATUS</i> POR CLAE-EM.....	43
3.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
4.1.	COMPOSIÇÃO QUÍMICA .....	45
4.2.	ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DA COMPOSIÇÃO DO <i>P. OSTREATUS</i> VAR. FLORIDA.....	49
4.3.	FENÓIS TOTAIS .....	53
4.4.	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE .....	56
4.4.1.	<i>Capacidade Redutora do Radical DPPH<sup>•</sup> pelos Cogumelo Seco e Moído, Extratos e Resíduos</i> .....	57
4.4.2.	<i>Ensaio da Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC)</i> .....	65
4.4.3.	<i>Ensaio do Poder de Redução do Ferro (FRAP)</i> .....	67
4.5.	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	71
4.5.1.	<i>Otimização do Método Cromatográfico</i> .....	71
4.5.2.	<i>Análise do Extrato Hidroetanólico do Shimeji por CLAE-UV/DAD</i> .....	73
4.6.	IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS PRESENTES NO EXTRATO HIDROETANÓLICO POR CLAE-EM/EM .....	75
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>80</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos constituem um grupo de seres vivos que possuem uma grande variedade de formas e tamanhos, são organismos eucariontes (com células nucleadas), podem ser organismos unicelulares (as leveduras) ou pluricelulares filamentosos (os cogumelos) que se caracterizam por serem organismos não-móveis, formados por filamentos com crescimento apical denominados de hifas, e por terem um ciclo de vida com reprodução sexuada e assexuada (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

Os cogumelos são conhecidos há milhares de anos e a partir daí começaram a ter inúmeras utilidades, como por exemplo, na culinária, principalmente em países orientais. Existem, aproximadamente 2000 espécies de cogumelos comestíveis encontradas no mundo, sendo que apenas 25 são cultivadas em grande escala para fins comerciais. Dentre estas, as principais espécies cultivadas no Brasil e no mundo são: *Agaricus bisporus* (conhecida popularmente como champignon de Paris), *Lentinula edodes* (shiitake) e *Pleurotus ostratus* (shimeji) (FURLANI; GODOY, 2007; PRADO; FURLANI; GODOY, 2005).

Os seres vivos pertencentes ao reino Fungi decompõe a matéria orgânica do corpo de outros organismos para se alimentar, sendo saprófagos e conhecidos também como decompositores. Todos os fungos, sem exceção, são heterótrofos por absorção. Para a absorção de nutrientes necessários para atividade metabólica, os cogumelos contam com o apoio de enzimas complexas. Os cogumelos podem ser divididos em píleo ou chapéu, himênio, anel, estipe ou pé, volva e micélio, conforme demonstrado na Figura 1 (CARVALHO, 2005).



**Figura 1:** Partes de um cogumelo.

Fonte: <https://www.infoescola.com/reino-fungi/cogumelo/>

A produção global de cogumelos segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) foi estimada em cerca de 2,18 a 3,41 milhões de toneladas ao longo do período de 1997-2007. Uma vez que houve um aumento de cerca de 56% da produção mundial de cogumelos nas últimas décadas a estimativa de produção nos próximos anos é de cerca de 3,5 milhões de toneladas. Os principais produtores de cogumelos no mundo são: China, EUA, Holanda, Polônia, Espanha, França, Itália, Irlanda, Canadá, Reino Unido e Japão (WAKCHAURE, 2011).

O Brasil não é um país com tradição no cultivo de cogumelos, porém essa prática está cada vez mais se difundindo por conta do aumento do consumo na culinária e da comprovação de suas propriedades medicinais (DIAS, 2010).

Os cogumelos medicinais têm um histórico bem estabelecido de uso em terapias orientais tradicionais, possuem metabólitos bioativos, e estão sendo cada vez mais usados para reduzir os riscos de doenças cardiovasculares, devido aos seus efeitos hipocolesterolêmicos (GUILLAMÓN et al., 2010).

Além disso, algumas espécies de cogumelos comestíveis podem ser considerados como alimentos funcionais, por apresentarem compostos bioativos (BARROS et al., 2007). Os alimentos funcionais são alimentos ou ingredientes que possuem efeitos benéficos à saúde, além de suas funções nutricionais básicas, inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel na redução do risco de doenças crônicas degenerativas, como, por exemplo, o câncer e diabetes.

Os cogumelos contêm polissacarídeos, compostos fenólicos,

proteínas (proteínas fúngicas imunomoduladoras, lectinas, glicoproteínas, proteínas e peptídeos não glicosilados), complexos polissacarídeo-proteína, componentes lipídicos e terpenóides, que proporcionam diversas propriedades biológicas como anti-tumorais, antioxidantes, anti-tumoral/anticancerígeno, antimicrobiano, imunomodulador, anti-inflamatório, antiaterogênico e ações hipoglicêmicas (MORO et al., 2012).

### 1.1. *PLEUROTUS OSTREATUS* (SHIMEJI)

O cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* é um fungo de crescimento rápido e de degradação de lignina (HADAR; COHEN-ARAZI, 1986). No Brasil, *Pleurotus* é atualmente o gênero mais cultivado, ocupando essa posição desde 2012, quando a produção de *Agaricus bisporus* (conhecido como champignon) foi reduzida devido aos cogumelos de baixo preço importados da China.

O *P. ostreatus* é conhecido pelo alto teor de proteínas, carboidratos, minerais e vitaminas, bem como baixo teor de gordura, sendo o cogumelo comestível comercialmente conhecido como o cogumelo ostra ou shimeji. Os efeitos benéficos do *P. ostreatus*, tais como imunomoduladores, antitumorais, anti-inflamatórios, antioxidantes, antibióticos e de redução do colesterol, são bem conhecidos em todo o mundo (TONG et al., 2008).

Esse cogumelo se caracteriza pelo seu rápido crescimento em agro-resíduos como o bolo de oliveira, tufo de tomate, agulhas de pinheiro, palha de trigo, folhas de bananeira, folha de avelã, resíduos de algodão, palha de milho, óleo de palma e outros resíduos. Os espécimes individuais do cogumelo ostra geralmente crescem em camadas umas sobre as outras (ALANANBEH et al., 2014).

A espécie *P. ostreatus* var. Florida (Figura 2) é indicada para a produção no Brasil, devido a sua capacidade de frutificação em temperaturas elevadas (ao redor de 25 e 28°C) e sua rusticidade de produção. Sua produção envolve a produção de micélio, preparo do substrato de cultivo, inoculação e corrida do micélio e produção, processamento e o seu tamanho pode variar de 5 – 20 cm de diâmetro (PARDO-GIMÉNEZ et al., 2012).



**Figura 2:** Cogumelo *Pleurotus ostreatus* da variação Florida.

Fonte: <http://www.mycelia.be/en/home/strain-list/m-2125-pleurotus-ostreatus-var-florida>

## 1.2. SUPLEMENTAÇÃO

Tratando-se do cultivo de cogumelos, vários fatores podem influenciar diretamente no resultado final no que diz respeito à qualidade nutricional e composição química dos mesmos, como umidade relativa do ar, espécie e linhagem, temperatura, tempo de cultivo, tipos de suplementos utilizados e substratos, entre outros. Os fatores que se destacam são o substrato e o suplemento disponíveis, pois os mesmos contém os nutrientes a serem captados pelo cogumelo no seu processo de crescimento (ZIED et al., 2017).

O cultivo de alguns cogumelos apenas na presença de substratos pode não ser suficiente para que os mesmos adquiram quantidades necessárias de carbono e nitrogênios para seu desenvolvimento. Devido à esse fato os agricultores fazem uso de suplementos, que são responsáveis por corrigir a deficiência desses e outros compostos (ZIED et al., 2010). Outra vantagem da suplementação é garantir o aumento na associação simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio, resultando no aumento destes nutrientes no sistema solo-planta (VIEIRA, 2012).

Existem atualmente diversos tipos de suplementos industriais disponíveis no mercado, com 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. 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 (MARINO; DE ABREU, 2009).

Desta forma, é de suma importância o estudo dos benefícios e influência deste tipo de suplementação nas propriedades nutricionais, composição química e atividades biológicas apresentadas pelos cogumelos, como o *P. ostreatus* var. Florida, visando sua utilização como alimento funcional.

### 1.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE COGUMELOS

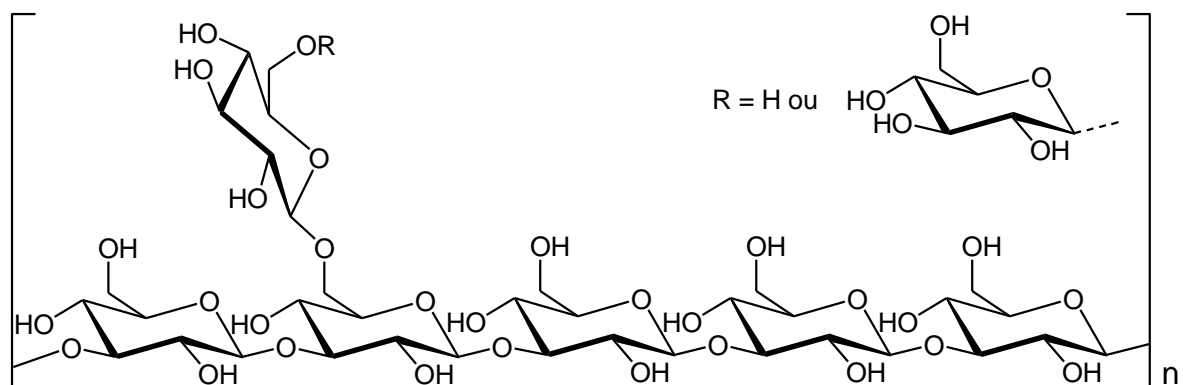
Os cogumelos em peso seco, de um modo geral, são compostos por carboidratos (~60%), fibras (~34%) e proteínas (~23%), e quantidades menores de minerais, algumas vitaminas e aminoácidos essenciais (MATTILA; SUONPÄÄ; PIIRONEN, 2000), além de teores baixos de lipídeos (~5%). Esses valores podem variar conforme as condições de cultivo que são utilizadas (MATTILA et al., 2001).

Os cogumelos possuem por volta de 90% de umidade. O teor de umidade é um dos fatores mais importantes quando se trata do valor nutricional, pois influencia diretamente na quantidade de matéria seca, neste caso, também nas quantidades dos nutrientes presentes. Ainda segundo Mattila e colaboradores (2001), vários fatores ambientais podem mudar o teor de umidade durante o cultivo e estocagem dos cogumelos, como a temperatura e a umidade relativa do ar (MATTILA et al., 2001).

Segundo Mattila e colaboradores (2000), os cogumelos podem ser compostos de 19 a 35% de proteínas, onde estão inclusos os aminoácidos essenciais, que são elementos formadores de proteínas. Para calcular o teor de proteínas é levado em consideração o conteúdo de nitrogênio orgânico presente no alimento (MATTILA; SUONPÄÄ; PIIRONEN, 2000). Geralmente o fator utilizado para calcular o teor de proteínas a partir do teor de nitrogênio em alimentos é 6,25, o que significa que as proteínas têm 16% de nitrogênio totalmente digeríveis, desconsiderando os compostos nitrogenados não proteicos presentes na composição do alimento. Porém quando se trata de cogumelos comestíveis, sabemos que possuem quantidade significativa de compostos nitrogenados que não são protéicos na parede celular, como as quitinas. Assim, o fator de correção para o cálculo do teor de proteínas em cogumelos é 4,38 (PRADO et al., 2005).

Podemos encontrar quantidades consideráveis de fibras na composição química dos cogumelos, tanto nas formas solúveis e insolúveis conforme a sua solubilidade em água. As principais fibras insolúveis são a celulose e a lignina. Quanto às fibras solúveis podemos citar os polissacarídeos, sendo as  $\beta$ -glucanas os polissacarídeos mais estudados. Dentre as  $\beta$ -glucanas presentes estão as constituídas por ligações glicosídicas  $\beta(1-3)$  e  $\beta(1-6)$ , as quais têm ação potencializadora do sistema imunológico (MANZI; PIZZOFERRATO, 2000).

As principais  $\beta$ -glucanas constituem um grupo heterogêneo de polímeros de glicose; consistem de um esqueleto de unidades  $\beta$ -glucopiranosil  $\beta$ -1,3-ligadas com cadeias laterais  $\beta$ -1,6-ligadas com diferentes distribuições e comprimentos, como por exemplo a botriosferana (Figura 3).  $\beta$ -1,3-glucanos são importantes componentes estruturais das paredes celulares dos fungos (ROSSI et al., 2018).



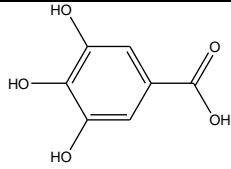
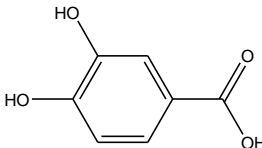
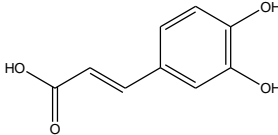
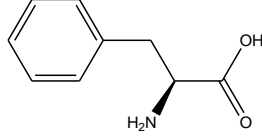
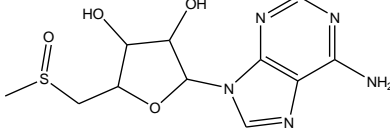
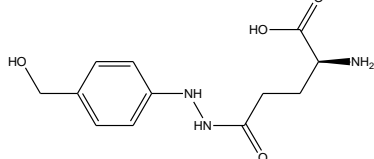
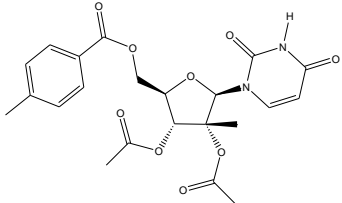
**Figura 3:** Estrutura polimérica da botriosferana.

Nas últimas décadas, tem havido inúmeras investigações sobre as atividades biológicas e farmacológicas dos polissacarídeos derivados de cogumelos. Os polissacarídeos pertencem a uma classe com uma diversidade de estruturas de macromoléculas bioativas encontradas na natureza. Dentre as atividades biológicas que os polissacarídeos provenientes de cogumelos podem apresentar estão a antiumoral, imunomodulatória, antiviral, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética e o efeito hipocolesterolêmico (OOI; LIU, 1999).

Existe um interesse cada vez maior nos estudos de cogumelos comestíveis a fim de conhecer sua composição química, sendo crescente o número de trabalhos sobre estudos dos metabólitos secundários provenientes de fungos,

principalmente relacionados à espécie *P. ostreatus* (Tabela 1).

**Tabela 1:** Identificação de metabólitos em *Pleurotus ostreatus*.

Compostos	Estrutura Molecular
Ácido gálico	
Ácido protocatecúico	
Ácido Cafeico	
Fenilalanina	
Adenosina 5'-deoxi-5'(metilsulfinil)	
Agaritina	
1- (2,3-di-O-acetil-2-metil-5-O-p-metilbenzoil-D-ribofuranosil) uracila	

Fonte: (CARRASCO-GONZALEZ, 2017).

Para um bom funcionamento do metabolismo, as vitaminas são compostos orgânicos indispensáveis. Torna-se assim importante o estudo da composição dos diferentes teores de vitaminas presentes na composição dos alimentos. Os cogumelos são fontes de várias vitaminas, dentre elas estão a riboflavina, niacina e folatos (MATTILA et al., 2001).

Os alimentos são classificados de acordo com a quantidade de

nutrientes que eles possuem pela portaria nº 27 da Secretaria de Vigilância Sanitária. Os termos estão descritos na Tabela 2. O alimento é considerado fonte de alguma substância quando tem o mínimo de 15% da ingestão diária recomendada do nutriente por 100 gramas do alimento. Quando 100 gramas do alimento fornece o mínimo de 30% da ingestão diária recomendada do nutriente, o alimento é classificado como alimento com alto teor de uma substância.

**Tabela 2:** Descrição dos termos usados para alimentos segundo a Portaria nº 27 (ANVISA, 1998).

CLASSIFICAÇÃO	NUTRIENTE	DESCRIÇÃO
Fonte	Vitaminas e minerais	Mínimo de 15% do IDR* de referência/100 gramas do alimento
Alto teor	Vitaminas e minerais	Mínimo de 30% do IDR de referência/100 gramas do alimento

\*Ingestão Diária Recomendada (ANVISA, 2005).

O alimento com alto teor de vitaminas, por exemplo, também pode ser considerado funcional (REIS et al., 2017). 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).

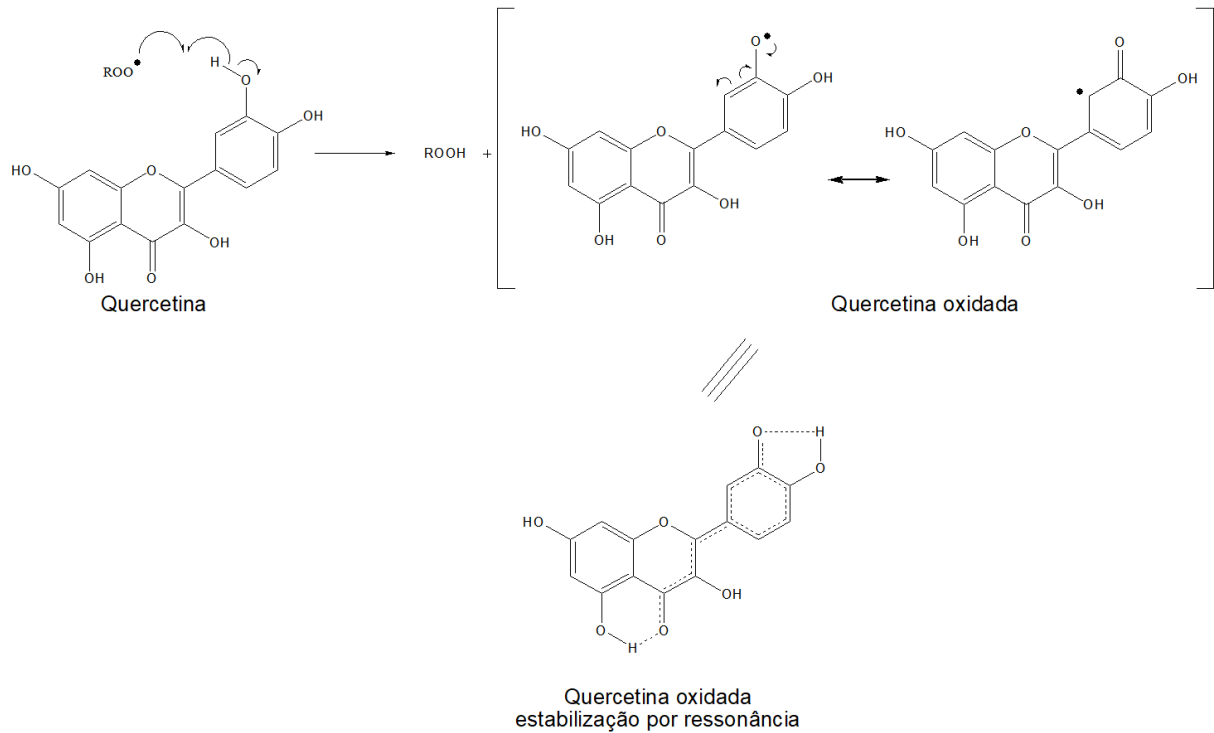
O estresse oxidativo ocorre quando há um excesso de radicais livres no organismo causado pelo desequilíbrio entre moléculas antioxidantes e oxidantes. Estes radicais contribuem nos processos de metagênese, carcinogênese, doenças coronárias e danos ao DNA (ANTOLOVICH et al., 2002; HUANG; PRIOR, 2005). Radicais ou espécies reativas do metabolismo do oxigênio e nitrogênio (ERMON) são espécies altamente instáveis e reativas, que contém um ou mais elétrons não pareados, sendo assim, sua presença se torna crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

#### 1.4. COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As substâncias com potenciais propriedades antioxidantes protegem as células do estresse oxidativo, através do sequestro dos radicais livres. Alguns estudos com frutas e vegetais, ricos em compostos antioxidantes, demonstraram que o consumo dos mesmos tem um efeito preventivo de doenças como câncer, aterosclerose e Alzheimer. Dentre as substâncias com propriedades antioxidantes mais estudadas estão a vitamina E, vitamina C, carotenoides e os compostos fenólicos (DUBOST; OU; BEELMAN, 2007).

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 (SIES; STAHL, 1995).

Eles são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação, podendo ser sequestrantes de radicais, sequestrantes de íons metálicos capazes de catalizar a oxidação lipídica, ou sequestrantes de oxigênio. Eles podem ainda ser subdivididos em antioxidantes primários, grupo formado por substâncias como enzimas, quelantes e proteínas, as quais impedem a geração de espécies reativas ou sequestram-nas, bloqueando a etapa de iniciação da cadeia radicalar; antioxidantes secundários, também conhecidos como antioxidantes preventivos, formado por compostos fenólicos como tocoferóis, tocotrienóis e flavonoides, os quais bloqueiam a etapa de propagação da cadeia radicalar, sequestrando radicais intermediários do tipo peroxila e alcóxila, conforme descrito na Figura 4, utilizando o exemplo da quercetina (flavonóide); antioxidantes terciários, constituídos pelo sistema de reparo do DNA por proteases e fosfolipases, os quais atuam removendo as lesões oxidativas do DNA, proteínas e lipídeos (ABDALLA, 2003).



**Figura 4:** Redução do radical livre pelo flavonoide quercetina.

Existem vários métodos para determinar a capacidade antioxidante das substâncias. O método pode ser baseado na captura do radical peroxila (ORAC, TRAP), na capacidade de redução do metal (FRAP, CUPRAC), na captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), captura do radical orgânico (ABTS, DPPH<sup>•</sup>) e na quantificação dos produtos formados durante a peroxidação de lipídeos (TBARS, oxidação do LDL, co-oxidação do caroteno) (RUFINO et al, 2007).

O método mais usado atualmente para avaliar a atividade antioxidante é o de captura de radical DPPH<sup>•</sup> (1,1-difenil-2-picrilidrazil). A amostra é colocada em contato com o DPPH<sup>•</sup> em solução metanólica, e a redução deste radical é monitorada pela diminuição da intensidade lida no comprimento de onda de 517 nm (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Os resultados podem ser descritos como % da redução do radical ou EC<sub>50</sub> (concentração para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH<sup>•</sup>) (GOOD KITZBERGER et al., 2007).

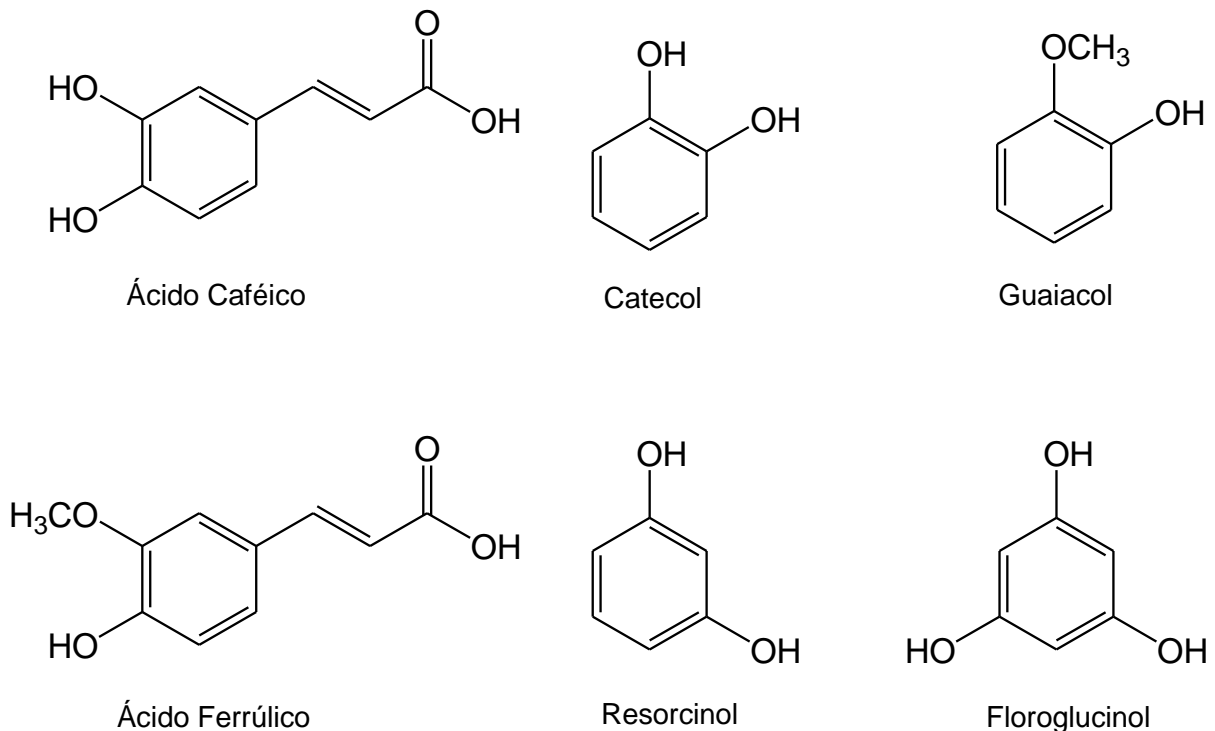
Outro método que também é muito usado para determinar a atividade antioxidante da amostra é por meio do ensaio usando o reagente ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína)), neste procedimento o cátion radical ABTS sofre redução pelo compostos com propriedades antioxidantes da amostra. Neste caso, como no ensaio pelo método do DPPH<sup>•</sup>, há perda de coloração e consequentemente

o decréscimo da absorvância em comprimento de onda de 734 mn (AMAROWICZ et al., 2004).

Desta forma, para auxiliar no combate ao estresse oxidativo, o teor de compostos fenólicos pode ser aumentado significativamente no organismo com a ingestão de alimentos que possuam estas substâncias (SOARES et al., 2009). Os cogumelos são ricos em metabólitos secundários, sendo destacados principalmente os flavonoides, ácidos fenólicos, taninos e tocoferóis.

### 1.5. COMPOSTOS FENÓLICOS

Compostos fenólicos são aqueles formados por no mínimo um anel aromático substituído com grupamento(s) hidroxila (Figura 5). Estes podem ser encontrados na natureza sob a forma de ésteres ou de heterosídeos, sendo provenientes do metabolismo secundário de plantas e fungos. Os compostos fenólicos são considerados um dos grupos mais importantes quando se refere à atividade antioxidante (DECKER, 1997). Dentre os antioxidantes fenólicos mais comuns provenientes de fontes naturais destacam-se os ácidos fenólicos, os taninos, os flavonóides e os tocoferóis (ANGELO; JORGE, 2007).



**Figura 5:** Exemplos de compostos fenólicos encontrados em vegetais e fungos.

Existem grupamentos nos compostos fenólicos que reagem com os radicais livres fazendo com que esses radicais livres percam o poder oxidante. Essas moléculas podem ter estruturas simples, ligadas a açúcares e proteínas (ANGELO; JORGE, 2007).

Existem vários métodos para determinação de compostos fenólicos, sendo o mais utilizado o método de *Folin-Ciocalteu*. O reagente de *Folin-Ciocalteu* tem em sua composição os ácidos fosfomolibídico, fosfotúngstico e o molibdênio que encontra-se no estado de oxidação (cor amarela). Em reação com os agentes redutores como os compostos fenólicos, são formados complexos molibdênio-tungstênio (cor azul), que são monitorados por espectrofotometria de absorção no ultravioleta-visível. (ANGELO; JORGE, 2007; OLIVEIRA et al., 2009).

Os compostos fenólicos também podem ser caracterizados, e identificados, a partir de técnicas cromatográficas, como a cromatografia líquida de alta eficiência, a partir de padrões conhecidos e comercializados ou mesmo da cromatografia acoplada a outras técnicas, como por exemplo, a espectrometria de massas (PANDOHEE et al., 2015).

#### 1.6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) NA ANÁLISE DE COGUMELOS

A cromatografia é uma técnica de separação de misturas simples ou até mesmo complexas, baseada em propriedades como solubilidade, tamanho e massa. Esse processo acontece utilizando duas fases: uma fixa, mais conhecida como fase estacionária, e outra móvel. De um modo geral, a fase estacionária é responsável pela separação das misturas a partir das interações entre as mesmas enquanto a fase móvel é responsável pelo arraste dos compostos a serem separados. Esse método tem grande importância em estudos de novos materiais e também para controle de qualidade de produtos de diversos segmentos, como por exemplo, alimentícios, farmacêuticos e agropecuários.

Em relação à metabolômica de cogumelos comestíveis, Pandohee e colaboradores (2014) desenvolveram pela primeira vez uma metodologia capaz de caracterizar os metabólitos secundários de cogumelos comestíveis, mais precisamente para o champignon, a partir de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. A partir deste trabalho outras espécies vêm sendo

estudadas por essa técnica analítica (PANDOHEE et al., 2015; WOLDEGIORGIS et al., 2015).

Apesar de existirem poucos trabalhos que façam as análises de metabólitos secundários da espécie *P. ostreatus* por cromatografia líquida de alta eficiência, existem trabalhos que utilizam substâncias padrão para identificar substâncias de interesse, como é o caso do trabalho realizado por Lin e colaboradores, que identificaram compostos fenólicos como ácido gálico, ácido protocatecúico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido coumarico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido elágico, ácido salicílico, ácido cinâmico, quercetina, ácido fólico, em extratos do cogumelo *Pleurotus* que apresentam atividade antioxidante (LIN et al., 2014).

Neste trabalho, a cromatografia teve um papel importante na separação e diferenciação dos compostos extraídos em amostras do cogumelo shimeji cultivados com diferentes suplementos artesanais e comerciais.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a composição química e o perfil da atividade antioxidante dos cogumelos da espécie *Pleurotus ostreatus* var. Florida (shimeji) cultivados com diferentes suplementos artesanais a base de resíduos industriais e comerciais.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a composição química e valor nutricional de 21 amostras de *P. ostreatus* var. Florida (inteiro, separadas em píleo e estipe), por meio da quantificação do teor de: umidade, cinzas, fibras, nitrogênio, proteínas e lipídios;
- Correlacionar os resultados obtidos nas análises da composição química dos cogumelos pela ferramenta quimiométrica de Análise de Fatores (AF);
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais na espécie estudada;
- Estudar a capacidade antioxidante de extratos etanólicos por diferentes métodos, como redução do radical DPPH<sup>•</sup>, FRAP (Potencial Antioxidante Redutor Férrico) e ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio);
- Desenvolver e otimizar um método analítico por CLAE-UV/DAD para separação das principais substâncias presentes nos extratos etanólicos 80% de *P. ostreatus* var. Florida;
- Identificar as substâncias presentes nas amostras de cogumelo por meio da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM), utilizando dados das relações  $m/z$  das substâncias e fragmentações relatadas na literatura.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. AMOSTRAS

As amostras de cogumelo shimeji (*Pleurotus ostreatus* var. Florida) foram fornecidas pelo Professor Dr. Diego Cunha Zied, pesquisador na 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.

O substrato adicionado em todos os cogumelos durante seu cultivo foi preparado de acordo com os padrões adotados para a produção comercial de *P. ostreatus* no Brasil: um total de 16 dias de preparação do substrato, com 10 dias na Fase I e 6 dias na Fase II (sistema semicomposto). Durante o processo da Fase I, a *Brachiaria dictyoneura* e o bagaço de cana-de-açúcar (materiais a granel) foram umedecidos por 4 dias; uma pilha foi montada no 5º dia; e no 6º dia, os materiais concentrados (arroz e farelo de trigo, calcário calcítico e gipsita) foram adicionados e a pilha foi rodada. A pilha foi posteriormente rodada mais 3 vezes (uma vez por dia) antes do substrato ser transferido para uma câmara de pasteurização no 10º dia (Fase II). O substrato foi pasteurizado entre 65 e 72 °C por 12 horas e posteriormente condicionado a 48 a 55 °C por 4 dias.

As amostras foram cultivadas com 6 tipos diferentes de suplementos, sendo quatro deles 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, 30% de trigo, 30% algodão e 0,5% de carbonato de cálcio); mistura (33,3% dos suplementos amendoim, fruta e combinação). Todas as suplementações foram empregadas separadamente, além de dois suplementos importados, denominados *Champfood* (Pro Mycel Gold) e SETAS (Spawn Mate II SE). Além das amostras suplementadas trabalhou-se com uma amostra controle onde não foi empregado nenhum tipo de suplementação.

Os suplementos baseados nos subprodutos agrícolas brasileiros foram tratados com aquecimento, como segue: o suplemento foi submetido ao calor seco de 68 °C durante 24 horas. A corrida de desova foi concluída no dia 17 e a fase de colheita durou 43 dias. Assim, o ciclo de crescimento totalizou 60 dias. A temperatura e a umidade relativa do ar foram de 26±2 °C e 70±5%, respectivamente, durante o período de desova e 26±5 °C e 80±10%, respectivamente, durante a fase de colheita. O cultivo foi conduzido em casa de vegetação utilizada especificamente para o crescimento de *P. ostreatus*, com controle de temperatura, umidade relativa e aeração.

Os cogumelos cultivados neste trabalho, além de analisados inteiros, foram estudados separadamente (píleo e estipe), totalizando 21 amostras.

### 3.2. PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras do cogumelo comestível shimeji foram cultivadas com os diferentes tipos de suplementos, colhidas e secas conforme descrito por Zied e colaboradores (2018). Então, foram 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 pela Tabela 3.

**Tabela 3:** Amostras de *P. ostreatus* var. Florida cultivadas com diferentes suplementos artesanais e importados.

<b>Amostra</b>	<b>Suplementação*</b>	<b>Partes do cogumelo</b>
1	Controle	Inteiro
2		Estipe
3		Píleo
4	Amendoim	Inteiro
5		Estipe
6		Píleo
7	Combinação	Inteiro
8		Estipe
9		Píleo
10	Fruta	Inteiro
11		Estipe
12		Píleo
13	Mistura	Inteiro
14		Estipe
15		Píleo
16	Champfood	Inteiro
17		Estipe
18		Píleo
19	SETAS	Inteiro
20		Estipe
21		Píleo

\*SETAS (Spawn 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).

### 3.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

As determinações da composição química das amostras foram realizadas em duplicata utilizando os métodos descritos pela AOAC (1993) conforme os itens seguintes.

#### 3.3.1. Umidade

Os ensaios foram realizados em duplicata para cada uma das amostras. Na determinação da umidade, o equipamento/utensílios utilizados foram: estufa, dessecador, balança analítica e cápsulas de porcelana.

Foi empregada a técnica gravimétrica, com emprego de calor, cuja umidade corresponde à perda de peso do produto quando este é aquecido em condições nas quais a água é removida (AOAC, 1993).

Por se tratar de um material cuja amostra contém mais de 80% da matéria seca, utilizou-se, para determinar a umidade, a secagem definitiva. As amostras fracionadas foram pesadas em cápsulas de porcelana, limpas e previamente numeradas e tarada, com aproximadamente 2,0 g do produto triturado, procedendo-se em seguida, a secagem em estufa à 105 °C, durante 24 horas até que toda umidade fosse removida, o que foi observado através de duas pesagens, com intervalo de 4 horas entre uma e outra, quando o peso permaneceu constante.

$$\%umidade = \frac{P1 - P2}{P1} \times 100$$

Sendo:

**P1** – Massa inicial da amostra;

**P2** – Massa final da amostra;

### 3.3.2. 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) para o 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, que está representado pela seguinte equação:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{100 \times N}{p}$$

Onde:

N = massa (g) de cinzas da amostra;

p = massa (g) da amostra.

### 3.3.3. 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 para retirada do solvente do resíduo sólido. 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, seguindo-se as mesmas etapas da digestão ácida previamente descrita. Ao término da lavagem com água, 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 à 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:

$$\% \text{ Fibra bruta} = \frac{100 \times M}{p}$$

Onde:

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

p = massa (g) da amostra.

#### 3.3.4. Nitrogênio Total

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).

(3) Ácido bórico 2% (m/v).

(4) Indicador misto: 2,0 g de vermelho de metila PA 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%.

A determinação do teor de nitrogênio total foi realizada através do método de Kjeldahl descrito por Lau (1982). 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 PA. 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<sup>-1</sup> padronizado até a viragem da coloração de azul-esverdeada para rosa clara. O cálculo utilizado para a quantificação do teor de nitrogênio está descrito pela equação:

$$\%N = \frac{V \times N \times F \times 14 \times 0,1}{p}$$

Onde:

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

N = Molaridade do HCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>);

F = Fator de correção da solução de HCl;

p = Massa (g) da amostra.

### 3.3.5. 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 mostrado pela equação:

$$\% \text{ Proteína bruta} = \%N \times 4,38$$

Onde:

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

%N = nitrogênio total

### 3.3.6. Lipídios

O teor de lipídios foi determinado utilizando o método de extração por *Soxhlet*. Foram pesados 2 g de amostra 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. Foram adicionados ao aparelho extrator 100 mL de éter de petróleo PA. 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 à 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:

$$\% \text{ Lipídios} = \frac{100 \times L}{p}$$

Onde:

L = massa (g) de lipídios;

P = massa (g) da amostra.

### 3.3.7. 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:

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

### 3.4. FENÓIS TOTAIS

A determinação de fenóis totais foi realizada seguindo o método descrito por Swain e Hills (1959), com adaptações. Para as análises foram preparados extratos de cogumelos a partir de 10 mg de cada amostra, adicionada à um *ependorf* com 1 mL de etanol 80% e levada ao aquecedor/agitador a 60 °C e 500 rpm por 3 h. Após este período, as amostras foram centrifugadas 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 H<sub>2</sub>O 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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, totalizando um volume final de 2000 µL. Em seguida, as amostras foram simultaneamente aquecidas a 40 °C e agitadas a 500 rpm durante 30 min. Após este período a leitura foi realizada em cubeta de 3 mL com comprimento de onda de  $\lambda = 765$  nm. O padrão utilizado para construção da curva de calibração foi o ácido gálico através da qual se obteve a equação da reta e realizou-se a quantificação dos compostos fenólicos expressos em mg de ácido gálico/100g de cogumelo seco.

### 3.5. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

#### 3.5.1. Preparo dos extratos

Para o ensaio antioxidante utilizando o radical DPPH<sup>•</sup> foram pesados 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 e 2,0 mg da amostra de cogumelo seca e moída. Em seguida foram adicionados 987,5 µL de EtOH 80% e 12,5 µL de DPPH 8 mmol L<sup>-1</sup> (concentração final 100 µmol L<sup>-1</sup>). Levou-se ao aquecedor/agitador à 60 °C e 500 rpm onde foram deixadas por 30 min, a extração e reação para determinar-se a atividade antioxidante foi realizada simultaneamente. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi retirado e a absorbância foi lida em  $\lambda = 517$  nm. Os ensaios foram feitos em triplicata.

Para os ensaios antioxidantes DPPH<sup>•</sup>, FRAC e ORAC foram feitas extrações prévias para utilização dos extratos e resíduos. Foram pesados 10 mg da amostra de cogumelo seco e móido, adicionou 1 mL de EtOH 80% e levou ao

aquecedor/agitador a 60 °C e 500 rpm por 3 h. Após esta etapa, centrifugou-se à 4000 rpm por 10 min e retirou-se o sobrenadante (extrato), o qual foi utilizado no ensaio do DPPH<sup>•</sup>. O resíduo foi lavado duas vezes com 1,0 mL de EtOH 80% por 30 min no aquecedor/agitador a 60 °C e 500 rpm e a seguir também foi submetido ao mesmo ensaio.

### 3.5.2. Ensaio da Capacidade Redutora do Radical DPPH<sup>•</sup>

O ensaio foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com algumas modificações. Foi pesado 10 mg de amostra em um *ependorff*, em seguida foi adicionado 1 mL de EtOH 80% e o mesmo foi levado a incubadora/agitadora 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 resíduo (composto exaurido).

Foram retirados 333,3 µL do sobrenadante e adicionados 654,2 µL de EtOH 80%, 12,5 µL de DPPH<sup>•</sup> 8,0 mmol L<sup>-1</sup>. A reação se deu na ausência da luz por 1 h. A absorbância foi medida em cubeta de quartzo com capacidade de 1 mL em  $\lambda = 517$  nm. Todos os testes foram realizados em triplicata. A porcentagem de DPPH<sup>•</sup> reduzido foi calculada utilizando a equação seguinte:

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

### 3.5.3. Ensaio da Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC)

O método ORAC relatado por Huang e colaboradores (2002) com algumas modificações foi utilizado para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos de *P. ostreatus* var. Florida. Inicialmente foi preparada uma solução do reagente AAPH (azobis-amidinopropano) (88,0 mmol L<sup>-1</sup>) utilizando tampão glicina (pH 8,3). Em seguida, a solução estoque de fluoresceína (1,0 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>) também foi preparada em tampão de glicina (pH 8,3) e mantida a 4 °C no escuro. No dia do ensaio, a solução estoque de fluoresceína foi diluída em tampão glicina de modo a obter uma solução de concentração 6,45 x 10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>. Foram pesados 5 mg de

cada amostra em um *ependorf* seguido da adição de 1 mL de etanol 80%, e o mesmo foi levado a uma incubadora/agitadora com aquecimento (60 °C e 500 rpm) por 3 h. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi separado do precipitado. Em seguida, em uma microplaca de 96 poços preta, foram adicionados 30 µL de fluoresceína e 20 µL do sobrenadante. Esta mistura foi incubada a 37 °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%). O ácido gálico foi utilizado como padrão. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

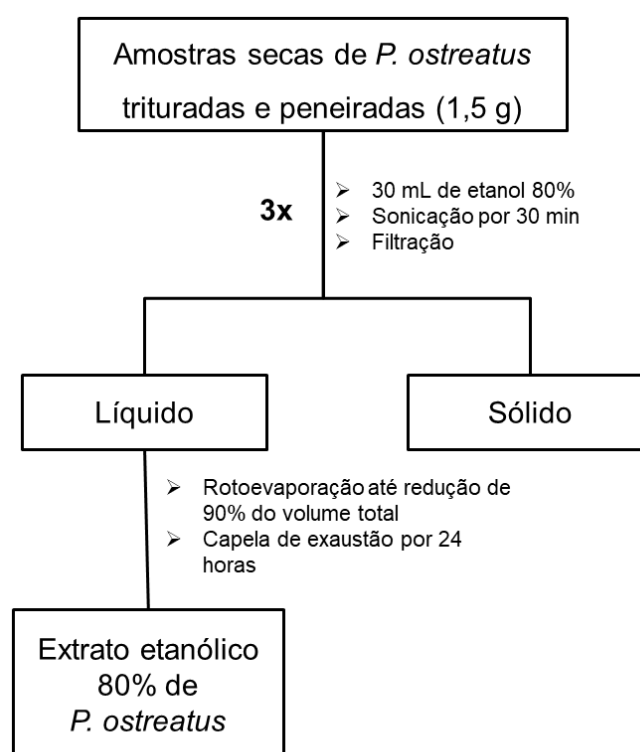
#### 3.5.4. Ensaio do Poder de Redução do Ferro (FRAP)

A atividade antioxidante avaliada quanto ao poder de redução do ferro foi medida pelo método de Firuzi et al. (2005) com modificações. A solução FRAP foi preparada pela adição de 10 mL de tampão acetato (300,0 mmol L<sup>-1</sup> e pH 3,6) à 1 mL da solução de TPTZ [2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina] 10 mmol.L<sup>-1</sup> em HCl 40 mmol L<sup>-1</sup> e 1 mL da solução de cloreto férrico 20 mmol L<sup>-1</sup>. Tendo a solução reagente preparada, 10 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/agitadora com aquecimento a 60 °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 registados em 595 nm. As análises foram realizadas em triplicata. O padrão utilizado para construção da curva de calibração foi o ácido gálico através da qual se obteve a equação da reta e realizou-se a quantificação dos compostos antioxidantes expressos em mg de ácido gálico/100g de cogumelo seco.

### 3.6. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

#### 3.6.1. Preparo dos extratos de *P. osteratus* var. Florida

O procedimento de extração é mostrado na Figura 6, e os extratos secos obtidos foram preparados e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência.



**Figura 6:** Fluxograma ilustrativo dos processos de extração dos compostos de *P. osteratus* var. Florida.

Foram pesados 1,5 g da amostra e misturados com 30 mL do solvente etanol 80%. Em seguida, essas misturas foram sonicadas a 30 °C durante 30 minutos. Passado esse tempo, foi realizada uma filtração em papel filtro e os filtrados foram armazenados. Este procedimento foi repetido por três vezes consecutivas, até um volume total de 90 mL de solvente orgânico. As soluções obtidas foram concentradas em rotaevaporador até a eliminação do etanol presente na extração. O restante foi transferido para um frasco de massa conhecida e evaporado em capela de exaustão por 24 horas a temperatura ambiente. Os

extratos hidroetanólicos secos foram então preparados e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodo (CLAE-UV/DAD).

### 3.6.2. Otimização e Análise por CLAE-UV/DAD

A otimização das análises cromatográficas foi realizada no Laboratório de Pesquisa Eletroanalítica e Bioquímica de Processos Oxidativos, Departamento de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Bauru, SP, Brasil, coordenado pelo professor Doutor Valdecir Farias Ximenes.

As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento com detector de arranjo de diodos (SHIMADZU). Foi utilizada uma coluna Phenomenex® C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; d.i: 5 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<sup>-1</sup> diluídas em 100% de acetonitrila, foram injetadas (20 µL), com vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, a temperatura de 40 °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.

Inicialmente foi empregado um gradiente exploratório (de 5 a 95%B em 50 minutos), chamado de método A, nas condições descritas pela Tabela 4 para uma avaliação inicial do perfil cromatográfico da amostra. Em seguida, de modo a otimizar a separação dos picos observados, foram empregados os métodos B, C, e D também mostrados na Tabela 4.

**Tabela 4:** Condições cromatográficas para separação dos extratos de *P. ostreatus* var. Florida.

Método	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	Gradiente
<b>A</b>	1,0	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5% B em 5 min.</li> <li>• 5-95% B até 50 min.</li> <li>• 95% B até 60 min.</li> </ul>
<b>B</b>	1,0	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20% B em 5 min.</li> <li>• 20-95% B até 42,5 min.</li> <li>• 95% B até 60 min.</li> </ul>
<b>C</b>	1,0	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20% B em 5 min.</li> <li>• 20-95% B até 23,75 min.</li> <li>• 95% B até 60 min.</li> </ul>
<b>D</b>	1,0 0,7 (20-30 min)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20% B em 5 min.</li> <li>• 20-95% B até 23,75 min.</li> <li>• 95% B Até 60 min.</li> </ul>

### 3.7. ANÁLISE DE FATORES APLICADA À ANÁLISE QUÍMICA

Os dados obtidos das análises químicas foram dispostos em forma de uma matriz **X** (42x6), no qual as linhas representaram as amostras (em duplicata) e as colunas representaram os teores calculados de carboidratos, lipídeos, 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.

### 3.8. IDENTIFICAÇÕES DAS SUBSTÂNCIAS PRESENTES NO EXTRATO DE *P. OSTREATUS* POR CLAE-EM

As análises por CLAE-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 MS<sup>3</sup>, faixa de íons detectada de 50-1200 Da, e energia de ionização de 50 V. O *software Bruker Compass DataAnalysis 4.3*® foi utilizado para

a análise dos dados. Os extratos hidroetanólicos foram analisados a partir do *P. ostreatus* var. Florida cultivado com diferentes suplementos, empregando-se o método cromatográfico descrito pelo método D apresentado pela Tabela 4. Os resultados obtidos foram comparados com os dados da literatura para a identificação de compostos conhecidos.

### 3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os tratamentos estatísticos das análises foram realizados através da Análise de Variância (ANOVA), e os valores 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

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados das análises da composição química do cogumelo inteiro *P. ostreatus* var. Florida, cultivado com as diferentes suplementações artesanais (amendoim, combinação, fruta e mistura), comerciais (*champfood* e SETAS) e o controle (sem suplementação).

**Tabela 5:** Composição química do cogumelo *P. ostreatus* var. Florida (inteiro) cultivado com diferentes suplementos artesanais e comerciais\*

Amostras	Cinzas (%)	Carboidratos (%)	Fibras (%)	Lipídios (%)	Proteínas (%)
<b>Controle</b>	6,11±0,07 <sup>a</sup>	66,11±1,38 <sup>a</sup>	10,72±1,54 <sup>c</sup>	3,55±0,10 <sup>a</sup>	13,51±0,13 <sup>c</sup>
<b>Amendoim</b>	5,46±0,05 <sup>bc</sup>	49,45±2,65 <sup>c</sup>	26,68±2,48 <sup>a</sup>	3,38±0,01 <sup>a</sup>	15,03±0,13 <sup>b</sup>
<b>Combinação</b>	6,15±0,10 <sup>a</sup>	58,32±1,07 <sup>b</sup>	19,04±1,39 <sup>b</sup>	1,61±0,09 <sup>b</sup>	14,88±0,13 <sup>b</sup>
<b>Fruta</b>	4,80±0,08 <sup>d</sup>	66,23±1,77 <sup>a</sup>	14,86±1,57 <sup>bc</sup>	1,76±0,07 <sup>b</sup>	12,34±0,04 <sup>d</sup>
<b>Mistura</b>	5,69±0,13 <sup>b</sup>	63,74±1,03 <sup>ab</sup>	15,17±0,70 <sup>bc</sup>	1,69±0,09 <sup>b</sup>	13,70±0,11 <sup>c</sup>
<b>Champfood</b>	5,80±0,04 <sup>ab</sup>	59,91±2,27 <sup>ab</sup>	14,98±2,28 <sup>cb</sup>	1,82±0,12 <sup>b</sup>	17,49±0,08 <sup>a</sup>
<b>SETAS</b>	5,17±0,15 <sup>cd</sup>	61,36±1,19 <sup>ab</sup>	17,96±0,79 <sup>b</sup>	1,84±0,07 <sup>b</sup>	13,68±0,17 <sup>c</sup>

\*SETAS (Spawn 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, 30% de trigo, 30% de algodão e 0,5% de carbonato de cálcio; Mistura (33,3% dos suplementos amendoim, fruta e combinação); Valores seguidos por letras diferentes dentro de uma coluna são significativamente diferentes em  $p < 0,05$ .

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em uma dieta humana recomenda-se o consumo diário de 7 a 10 g de carboidrato por kg da massa corporal, ou de 55-75% (DURAN et al., 2004). Neste caso os cogumelos estudados possuem teores de carboidratos dentro do recomendado para uma dieta,

com exceção do cogumelo cultivado com o suplemento amendoim (49,45%).

O teor de cinzas variou de 5,69 a 6,15% de peso seco entre os cogumelos cultivados com diferentes suplementos. O conteúdo de carboidratos encontrado em cogumelos de *P. ostreatus* var. Florida produzidos com substrato suplementado (de 49,45 a 63,74%) foi menor comparado aos cogumelos produzidos sem suplementação (66,11%), com exceção do suplemento fruta.

Um dos resultados mais significativos foi em relação ao teor de fibras dos cogumelos suplementados (chegando a 26,68%) em comparação com ao substrato não suplementado (10,72%). Também foi registrada variação significativa no conteúdo lipídico, com menores valores nos cogumelos suplementados, exceto aqueles cultivados com suplemento amendoim, devido aos altos níveis de lipídios encontrados neste alimento (existem aproximadamente 50 g de gordura total em 100 g de amendoim, base de dados do *USDA National Nutrient*). Ainda segundo a OMS, o teor de lipídios recomendados para ingestão diária é de 15-30% da dieta, e 10-15% de proteínas.

O uso de suplementos no cultivo de cogumelos aumentou a quantidade de proteína nos cogumelos para um nível de aproximadamente 10% superior ao apresentado pelo controle (substrato não suplementado). O suplemento comercial *Champfood* produziu um teor de proteína de 17,49%, o mais alto observado, e pode ser explicado pela grande quantidade de nitrogênio deste suplemento (7,7%).

Os resultados obtidos para a composição química dos cogumelos inteiros mostraram que a suplementação produziu cogumelos com menores teores de carboidratos, mas ainda dentro da faixa recomendada pela OMS em uma dieta humana, e maiores teores de fibras e proteínas, exceto quando se utilizou o suplemento fruta.

Assim, o uso de suplementos artesanais aumentou não apenas o rendimento, mas também importantes parâmetros nutricionais dos cogumelos, como proteínas e fibras, que oferecem vários benefícios para a saúde humana, exemplificado pelo estudo de Ng et al. (2017). Esses autores mostraram que a incorporação dietética de pó do cogumelo *P. ostreatus*, rico em fibras, melhora a resposta glicêmica pós-prandial, que é a resposta à absorção de carboidratos pelo organismo, que libera insulina para permitir o metabolismo da glicose pelas células, nos 10 primeiros minutos após a ingestão. Assim, o uso de suplementos aumentou

tanto o rendimento quanto a qualidade dos cogumelos.

Neste trabalho foram avaliados também o perfil nutricional das partes separadas do cogumelo shimeji, como o estipe e píleo. Na Tabela 6 estão apresentados os resultados das análises químicas da estipe.

**Tabela 6:** Composição química da estipe do *P. ostreatus* var. Florida cultivado com diferentes suplementos artesanais e comerciais.

Material	Cinzas (%)	Carboidratos (%)	Fibras (%)	Lipídios (%)	Proteínas (%)
<b>Controle</b>	4,95±0,04 <sup>a</sup>	55,68±1,30 <sup>a</sup>	30,99±1,15 <sup>a</sup>	0,82±0,14 <sup>a</sup>	7,56±0,03 <sup>d</sup>
<b>Amendoim</b>	4,13±0,02 <sup>b</sup>	71,49±0,69 <sup>c</sup>	17,26±0,63 <sup>b</sup>	0,78±0,02 <sup>a</sup>	6,33±0,06 <sup>a</sup>
<b>Combinação</b>	4,14±0,01 <sup>b</sup>	66,64±3,23 <sup>c</sup>	21,06±3,42 <sup>b</sup>	0,86±0,03 <sup>a</sup>	7,29±0,19 <sup>cd</sup>
<b>Fruta</b>	4,33±0,04 <sup>c</sup>	56,57±2,64 <sup>ab</sup>	30,10±1,10 <sup>a</sup>	2,04±1,54 <sup>a</sup>	6,96±0,05 <sup>bc</sup>
<b>Mistura</b>	4,46±0,01 <sup>d</sup>	55,13±2,75 <sup>a</sup>	33,23±2,50 <sup>a</sup>	0,77±0,02 <sup>a</sup>	6,40±0,34 <sup>ab</sup>
<b>Champfood</b>	4,13±0,09 <sup>b</sup>	64,46±0,54 <sup>bc</sup>	21,18±0,15 <sup>b</sup>	0,88±0,11 <sup>a</sup>	9,34±0,03 <sup>e</sup>
<b>SETAS</b>	4,23±0,02 <sup>bc</sup>	55,82±2,64 <sup>ab</sup>	31,86±2,03 <sup>a</sup>	0,91±0,44 <sup>a</sup>	7,50±0,19 <sup>cd</sup>

Valores seguidos por letras diferentes dentro de uma coluna são significativamente diferentes em  $p < 0,05$ .

Os teores de cinzas variaram entre 4,13 – 4,95%, com o maior valor apresentado pela amostra de cogumelo cultivada sem suplementação. As maiores quantidades de carboidratos na estipe do *P. ostreatus* foram observadas para as amostras de cogumelos suplementadas com amendoim, combinação e *Champfood*, quando comparadas ao controle. Já os demais suplementos, ainda em relação ao conteúdo de carboidratos, não possuem diferença significativa quando relacionado ao controle.

O teor de fibras brutas nas estipes dos cogumelos cultivados com os suplementos artesanais variou entre 17,26 a 33,23% e foram separados em dois grupos com diferenças significativas. Os suplementos fruta e mistura foram os suplementos que obtiveram melhores resultados, ou seja, maiores teores de fibras brutas apresentados pelos cogumelos e não diferiram do controle e do suplemento importado específico para a espécie *P. ostreatus* (SETAS). No grupo de cogumelos

que apresentaram menores teores de fibras brutas estão os cultivados com os suplementos artesanais amendoim, combinação e, também, o suplemento importado *Champfood*, específico para a espécie *Agaricus subrufescens*, conhecido como cogumelo do sol.

Em relação aos lipídios não houve diferença significativa entre os valores obtidos para os cogumelos cultivados com diferentes suplementos. Já o teor de proteínas variou de 6,33 a 7,29% entre os cogumelos suplementados artesanalmente e 7,50 a 9,34% nos suplementados com os suplementos importados. A estipe que apresentou maior conteúdo proteico foi a suplementada com o suplemento importado *Champfood* (9,34%), seguido do controle (7,56%) e SETAS (7,50%).

Na Tabela 7 estão representados os resultados das análises dos teores de cinzas, carboidratos, fibras, lipídios e proteínas obtidos a partir da análise do píleo (parte superior do cogumelo) do *P. ostreatus* var. Florida.

**Tabela 7:** Composição química do píleo do *P. ostreatus* var. Florida cultivado com diferentes suplementos artesanais e comerciais.

Material	Cinzas (%)	Carboidratos (%)	Fibras (%)	Lipídios (%)	Proteínas (%)
<b>Controle</b>	6,47±0,05 <sup>bc</sup>	58,66±0,47 <sup>a</sup>	16,06±0,97 <sup>ab</sup>	1,90±0,01 <sup>a</sup>	16,91±0,45 <sup>b</sup>
<b>Amendoim</b>	6,36±0,07 <sup>b</sup>	54,59±4,15 <sup>a</sup>	20,98±3,89 <sup>b</sup>	2,09±0,24 <sup>a</sup>	15,98±0,09 <sup>a</sup>
<b>Combinação</b>	6,33±0,01 <sup>b</sup>	57,31±0,52 <sup>a</sup>	15,89±0,89 <sup>ab</sup>	2,22±0,24 <sup>a</sup>	18,25±0,18 <sup>c</sup>
<b>Fruta</b>	6,52±0,03 <sup>c</sup>	57,18±3,33 <sup>a</sup>	16,55±2,45 <sup>ab</sup>	1,90±0,70 <sup>a</sup>	18,14±0,15 <sup>c</sup>
<b>Mistura</b>	6,62±0,01 <sup>c</sup>	55,84±3,81 <sup>a</sup>	17,13±3,40 <sup>ab</sup>	1,56±0,20 <sup>a</sup>	18,84±0,22 <sup>c</sup>
<b>Champfood</b>	5,88±0,05 <sup>a</sup>	58,14±1,03 <sup>a</sup>	11,55±0,90 <sup>a</sup>	2,14±0,01 <sup>a</sup>	22,28±0,18 <sup>d</sup>
<b>SETAS</b>	5,87±0,01 <sup>a</sup>	58,07±0,69 <sup>a</sup>	15,71±0,36 <sup>ab</sup>	2,13±0,25 <sup>a</sup>	18,21±0,07 <sup>c</sup>

Valores seguidos por letras diferentes dentro de uma coluna são significativamente diferentes em  $p < 0,05$ .

Os valores encontrados para o teor de cinzas no píleo dos cogumelos foram de 5,87 a 6,52%, sendo os menores valores encontrados quando

produzidos usando os suplementos importados *Champfood* e SETAS, 5,88 e 5,87%, respectivamente. Já os píleos dos cogumelos produzidos com os suplementos artesanais fruta e mistura foram os que apresentaram maior quantidade de cinzas. No píleo não houve diferença significativa da composição de carboidratos e lipídios entre os cogumelos cultivados com os suplementos artesanais, importados e o controle. O píleo demonstrou maior teor de fibra bruta para o cogumelo produzido com o suplemento amendoim e os demais não apresentaram diferenças significativas. O conteúdo proteico dos píleos dos cogumelos variou entre 15,98 a 22,28%, sendo o maior valor observado para os cogumelos cultivados com *Champfood* e o menor valor usando o suplemento amendoim.

Comparando a composição nutricional das diferentes partes dos cogumelos podemos notar que os maiores valores de carboidratos e fibras são encontrados na estipe e maiores valores de cinzas, lipídios e proteínas no píleo.

A busca por alimentos mais saudáveis é uma tendência de mercado, com baixo teor de lipídios e elevados valores de fibras. Os cogumelos, de um modo geral, contêm um teor de proteína entre 19 e 35%, são fontes de vitaminas e aminoácidos essenciais, sendo considerado um alimento com propriedades funcionais e nutricionais desejáveis (LEMOS, 2009).

O teor de proteínas encontrados nos píleos do shimeji tiveram a média de 18,37% do valor em massa seca, o que se enquadra nos intervalos apresentados por Chang e Milles (1989), que variou entre 10,5 e 30,4% para o shimeji e teve uma média superior ao shiitake (13,4 a 17,5%) e Manzi e colaboradores (1999) (15,19%) (CHANG; MILLES, 1989; MANZI et al., 1999). Se tratando do teor de fibras, a média para o shimeji neste trabalho foi de 26,95% nas estipes, o que vai de acordo com os estudos feitos por Furlani e Godoy (2007), onde o teor de fibras varia de 22,30 a 51,25% e chega a ser maior do que para o champignon (17,67 – 22,87%) (FURLANI; GODOY, 2007).

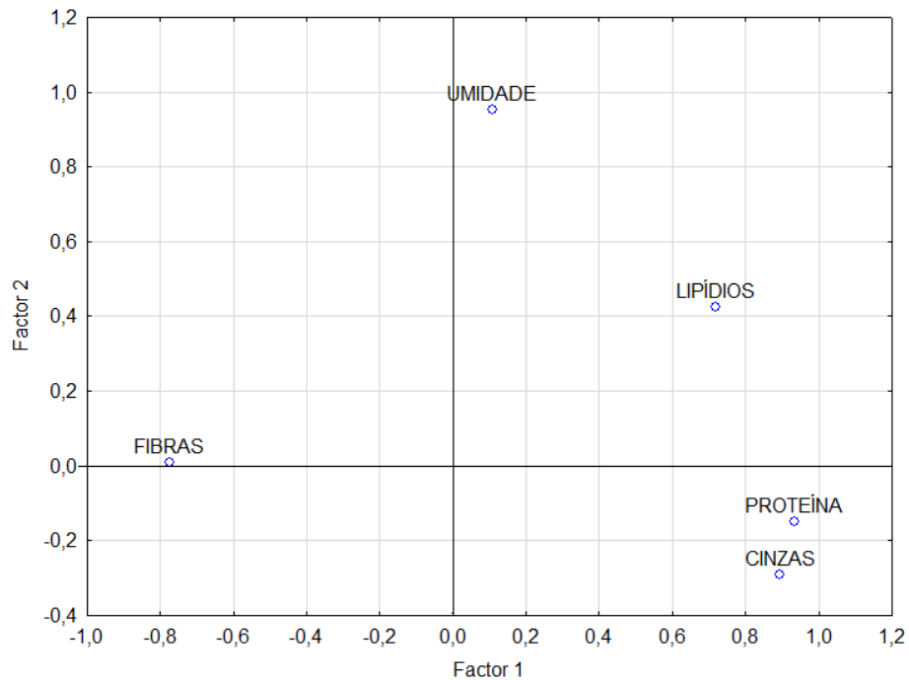
#### 4.2. ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DA COMPOSIÇÃO DO *P. OSTREATUS* VAR. FLORIDA

A análise quimiométrica é comumente aplicada ao tratamento de informações obtidas em 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.

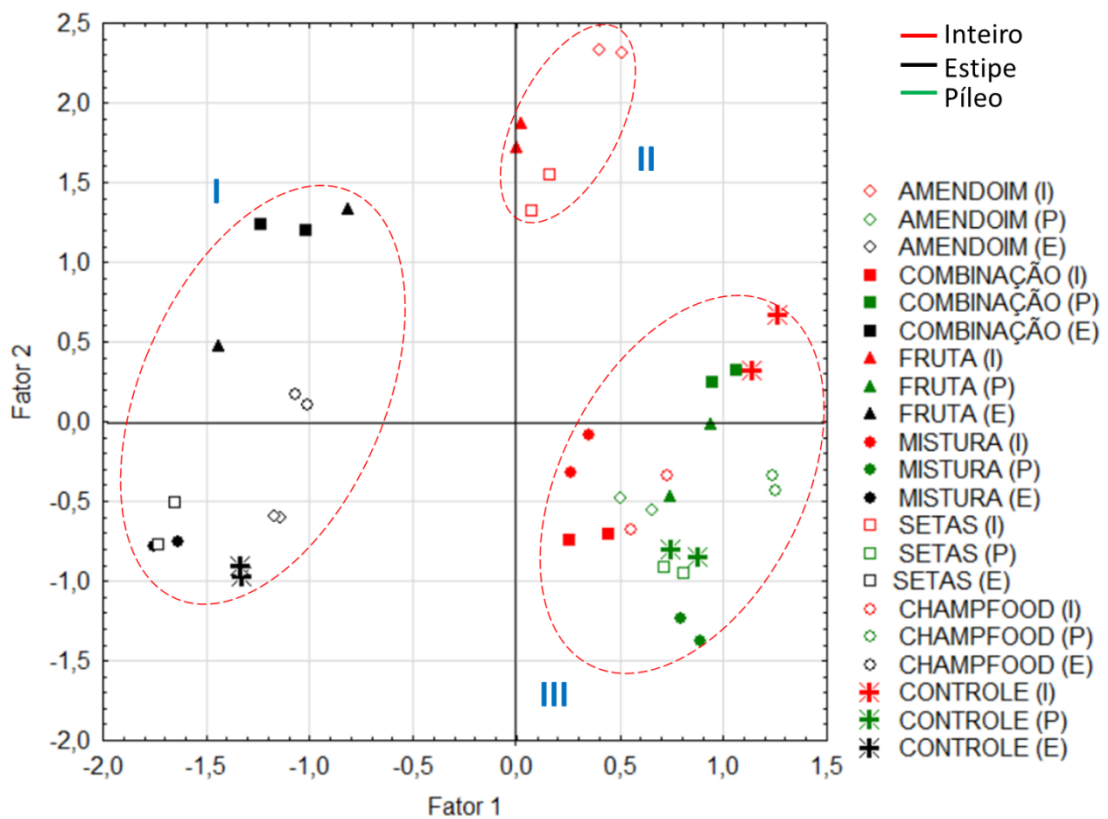
Os dados obtidos através das análises da composição química do cogumelo *P. ostreatus* apresentaram resultados com grandezas diferentes e por isso houve a necessidade da realização de um pré-processamento denominado de auto escalonamento. Este processamento é muito utilizado quando se tem amostras com valores muito divergentes, como é o caso dos valores de lipídios que estão em torno de 2%, e os resultados de proteína bruta que apresentam uma média de 18%, fazendo com que se atribua a mesma importância à todas as variáveis (HONGYU et al., 2015).

A fim de correlacionar todos os resultados das mais de 20 amostras analisadas foi realizada a análise de Fatores e o resultado da aplicação desta técnica quimiométrica está descrito na Figura 7 (gráfico de *loading*), no qual o Fator 1 é capaz de explicar 55,99% dos dados e o Fator 2, 23,88%, resultando em 79,87% 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 o teor de fibras, enquanto que o lado positivo com os teores de umidade, lipídios, proteínas e cinzas. Já para o Fator 2, os valores negativos estão correlacionados com os teores de proteínas e cinzas e os positivos com os teores de fibras, lipídios e umidade.



**Figura 7:** Gráfico de *loading* do Fator 1 *versus* Fator 2 obtido através do estudo da análise química das amostras inteiras, estipe e píleo da espécie *P. ostreatus* var. Florida.

A Figura 8 representa o gráfico de *scores*, onde temos os Fatores 1 e 2 e que são correlacionados aos Fatores 1 e 2 do gráfico de *loadings*. No gráfico de *scores* estão apresentados em vermelho o cogumelo inteiro, em preto a estipe e em verde o píleo dos cogumelos. Os resultados dos *scores* foram separados em três grupos (I, II e III).



**Figura 8:** Gráfico de *scores* do Fator 1 *versus* Fator 2 obtido através do estudo da análise química das amostras inteiras, estipe e píleo da espécie *P. ostreatus* var. Florida.

Observando o Fator 1 negativo do gráfico de *scores* (Figura 8), é possível verificar que no grupo I houve a separação das partes estipes dos cogumelos, que ao correlacionar com o Fator 1 do gráfico de *loadings* (Figura 8), observa-se que a estipe dos cogumelos cultivados com quaisquer suplementos e sem a suplementação tiveram um teor maior de fibras quando comparados com os cogumelos inteiros e o píleo. Levando em consideração a morfologia dos cogumelos, sabe-se que a estipe (base dos cogumelos) é rica em fibras, como lignina e hemicelulose, ou seja, tem uma maior concentração de celulose em relação ao píleo (GONÇALVES et al., 2010).

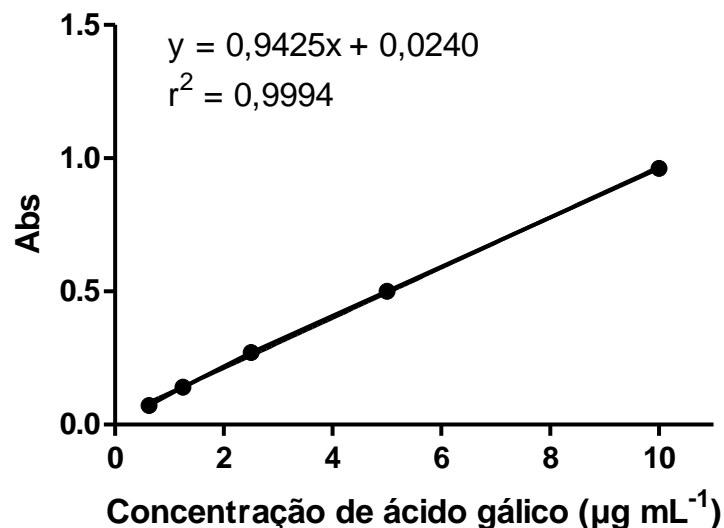
Se tratando dos Fatores 1 positivos, dos gráfico de *loadings* e *scores*, notamos que o grupo III se destaca por conta dos maiores teores de proteínas e cinzas em relação aos demais grupamentos. Nesse grupo estão os píleos dos cogumelos e os cogumelos inteiros cultivados com os suplementos combinação, mistura, *champfood* e o cogumelo cultivado sem suplementação.

O grupo II se diferenciou dos grupos I e III por conter o teor de umidade maior que os demais, menores teores de proteínas e cinzas. Neste grupamento estão os cogumelos inteiros produzidos com os suplementos amendoim, fruta e setas.

Deste forma, com o auxílio da quimiometria, podemos observar os parâmetros para comparação das amostras entre as diferentes partes dos cogumelos e sua composição química.

#### 4.3. FENÓIS TOTAIS

A quantificação de fenóis presentes nas amostras de cogumelo shimeji foi realizada a partir de uma curva analítica do padrão de ácido gálico, utilizando cinco concentrações de trabalho na faixa de 0,0625 – 1,00 mg mL<sup>-1</sup>, obtendo-se as concentrações finais de 0,625, 1,25, 2,50, 5,00 e 10,00 µg mL<sup>-1</sup>, conforme mostrado na Figura 9.



**Figura 9:** Curva analítica do padrão de ácido gálico para quantificação de fenóis totais.

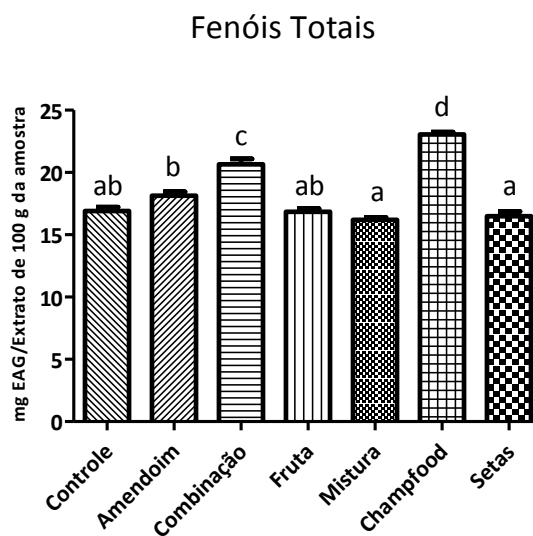
Os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais (FT) pelo método *Folin-Ciocalteu*, expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por extrato de 100 g de cogumelo seco e moído, são apresentados na Tabela 8 e na Figura 10. O teor de compostos fenólicos dos cogumelos cultivados sem suplementação teve a média de 16,90 mg EAG por extrato de 100 g de cogumelo, já

o teor de fenóis encontrado nos cogumelos suplementados artesanalmente variou entre 16,20 – 20,65 mg EAG por extrato de 100 g de cogumelo, enquanto os cogumelos com suplementos importados variou de 16,48 – 23,06 mg EAG por extrato de 100 g de cogumelo.

**Tabela 8:** Quantificação de fenóis totais nas amostras de *P. ostreatus* var. Florida inteiro.

Amostras	$\lambda = 765 \text{ nm (Abs)}$			mg EAG / extrato de 100 g de cogumelo			Média $\pm$ DP*
	1	2	3	1	2	3	
<b>Controle</b>	0,104	0,101	0,106	16,976	16,340	17,401	16,90 $\pm$ 0,53 <sup>ab</sup>
<b>Amendoim</b>	0,126	0,107	0,112	21,645	17,613	18,674	19,31 $\pm$ 2,09 <sup>b</sup>
<b>Combinação</b>	0,121	0,125	0,118	20,584	21,432	19,947	20,65 $\pm$ 0,74 <sup>c</sup>
<b>Fruta</b>	0,101	0,104	0,105	16,340	16,976	17,188	16,83 $\pm$ 0,44 <sup>ab</sup>
<b>Mistura</b>	0,099	0,102	0,100	15,915	16,552	16,127	16,20 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>
<b>Champfood</b>	0,131	0,133	0,134	22,706	23,130	23,342	23,06 $\pm$ 0,32 <sup>d</sup>
<b>SETAS</b>	0,101	0,099	0,105	16,340	15,915	17,188	16,48 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup>

Valores seguidos por letras diferentes dentro de uma coluna são significativamente diferentes em  $p < 0,05$ . \* DP: Desvio-padrão relativo referente as medidas em triplicata.



**Figura 10:** Quantificação do teor de fenóis totais nas amostras inteiras do *P. ostreatus* var. Florida.

Podemos observar, baseando-se nos resultados, que o tipo de suplementação dos cogumelos influencia diretamente na quantidade de compostos fenólicos presentes no produto final. Quando comparados os valores de FT dos cogumelos suplementados artesanalmente com o controle (sem suplementação) nota-se que há um aumento significativo do teor de FT nos cogumelos cultivados com o suplemento combinação (9,5% de farelo de soja, 30% de farelo de milho, 30% de farelo de trigo, 30% algodão e 0,5% de carbonato de cálcio).

O cogumelo que apresentou maior valor na determinação de FT foi o cultivado com suplemento importado *Champfood*. Como mencionado anteriormente, o suplemento *Champfood* é específico para o cultivo dos cogumelos da espécie *Agaricus subrufescens* (cogumelo do sol) enquanto o SETAS, com um dos menores valores de FT, é específico para as espécie em estudo neste trabalho.

Segundo dados da literatura, os compostos fenólicos presentes em diversos alimentos, como nos cogumelos apresentam potente atividade antioxidante e não são mutagênicos (CHEUNG; CHEUNG; OOI, 2003), além de serem associados com a inibição da aterosclerose e câncer (TEISSEGRE et al., 1996). Sua bioatividade pode estar relacionada com a habilidade em quelar metais, inibir lipoxigenase e eliminar radicais livres (DECKER, 1997). Segundo Jose e colaboradores (2000), os extratos de acetato de etila e metanol do *Pleurotus* demonstraram potentes inibidores de radicais hidroxila e da peroxidação lipídica (JOSE; JANARDHANAN, 2000). Outros trabalhos demonstraram a bioatividade dos extratos do basidioma de *Pleurotus spp.* (JOSE; AJITH; JANANRDHANAN, 2002) e confirmaram a inibição da peroxidação lipídica pelo extrato de *Pleurotus pulmonarius*.

A partir dos resultados de quantificação de FT dos cogumelos inteiros, foram selecionadas as amostras que mais se destacaram, ou seja, com maior quantidade de fenóis totais, como o cogumelo suplementado com o suplemento artesanal combinação e com o suplemento importado *Champfood*, para quantificação do teor de fenóis totais das suas partes separadas (estipe e píleo).

Na Tabela 9 estão apresentados os valores de FT para a estipe e o píleo dos cogumelos shimeji que obtiveram as maiores concentrações de FT quando analisados inteiros (combinação e *Champfood*).

**Tabela 9:** Quantificação de fenóis totais nas amostras de *P. ostreatus* var. Florida estipe e píleo suplementados com combinação e *champfood*.

Amostras	$\lambda = 765 \text{ nm (Abs)}$			mg EAG / extrato de 100 g de cogumelo			Média $\pm$ DP*
	1	2	3	1	2	3	
<b>Comb. estipe</b>	0,036	0,035	0,035	2,546	2,334	2,334	2,40 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>
<b>Comb. píleo</b>	0,099	0,101	0,101	15,915	16,340	16,340	16,20 $\pm$ 0,24 <sup>c</sup>
<b>Champ. estipe</b>	0,065	0,067	0,065	8,700	9,125	8,700	8,84 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>
<b>Champ. píleo</b>	0,132	0,132	0,142	22,918	22,918	25,040	23,62 $\pm$ 1,22 <sup>d</sup>

Valores seguidos por letras diferentes dentro de uma coluna são significativamente diferentes em  $p < 0,05$ . \* DP: Desvio-padrão relativo referente as medidas em triplicata.

Podemos notar uma diferença considerável do teor de FT em cada parte do cogumelo, sendo os maiores valores encontrados para o píleo, com cerca de sete vezes maior nas amostras suplementadas com combinação e aproximadamente três vezes maior para a amostra suplementada com *champfood*. Neste caso tanto a estipe quanto o píleo dos cogumelos produzidos com o suplemento internacional *champfood* foram maiores os valores de FT se comparados aos cogumelos cultivados com o suplemento artesanal combinação.

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados durante o desenvolvimento normal de alguns organismos e também em resposta a diferentes situações de estresse, tais como infecções, fermentos e radiação ultravioleta (UV) (HAMINIUK et al., 2012). Neste caso o píleo demonstra um maior teor de compostos fenólicos por conta da maior exposição à radiação solar.

#### 4.4. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos extratos dos cogumelos shimeji foi avaliada pelos métodos de DPPH\*, FRAP e ORAC. Os métodos são amplamente utilizados para a determinação da capacidade antioxidante de produtos alimentícios, devido aos seus procedimentos simples, rápidos, sensíveis e reprodutíveis (OLIVEIRA et al., 2016).

Foram feitas extrações com os solventes metanol, etanol, etanol 80% e acetato de etila, e a capacidade antioxidante destes extratos foi testada,

conforme o procedimento descrito no ítem 3.6.1. Na Tabela 10 encontram-se os rendimentos das extrações utilizando-se diferentes solventes.

**Tabela 10:** Rendimento das extrações com diferentes solventes.

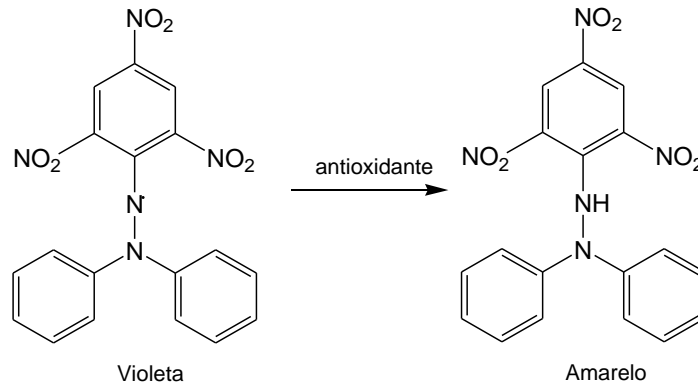
Solventes	Rendimento (%)
Metanol P.A.	19,61
Etanol P.A.	8,48
Etanol 80%	24,24
Acetato de etila	1,75

Foram feitos testes qualitativos com os extratos para verificar a atividade antioxidante frente ao radical DPPH<sup>•</sup>, porém não observada atividade antioxidante significativa.. Com isso, conclui-se que o extrato pode ter perdido sua capacidade antioxidante neste processo de extração. Assim, com base nos rendimentos, foi escolhido o solvente etanol 80% para dar continuidade à outros processos de extrações em baixa escala.

#### 4.4.1. Capacidade Redutora do Radical DPPH<sup>•</sup> pelos Cogumelo Seco e Moído, Extratos e Resíduos

Para os ensaios de DPPH<sup>•</sup> foram analisados os cogumelos sem extração prévia (material seco e moído), no qual foi calculado o EC<sub>50</sub> a partir de uma curva analítica construída com diferentes massas (mg) da própria amostra. Também foram realizados os ensaios com o extrato do cogumelo, após uma extração prévia e com o resíduo (composto exaurido), que restou da extração.

Este método se baseia na adição de um composto capaz de doar um átomo de hidrogênio ou um elétron ao DPPH<sup>•</sup>, o que resulta na descoloração da solução de DPPH<sup>•</sup>. Tal acontece uma vez que o radical DPPH<sup>•</sup> transforma-se na sua forma reduzida, o que tem como consequência a perda da coloração violeta da solução original e obtenção de uma coloração amarela pálida, devido à formação da hidrazina (Figura 11).

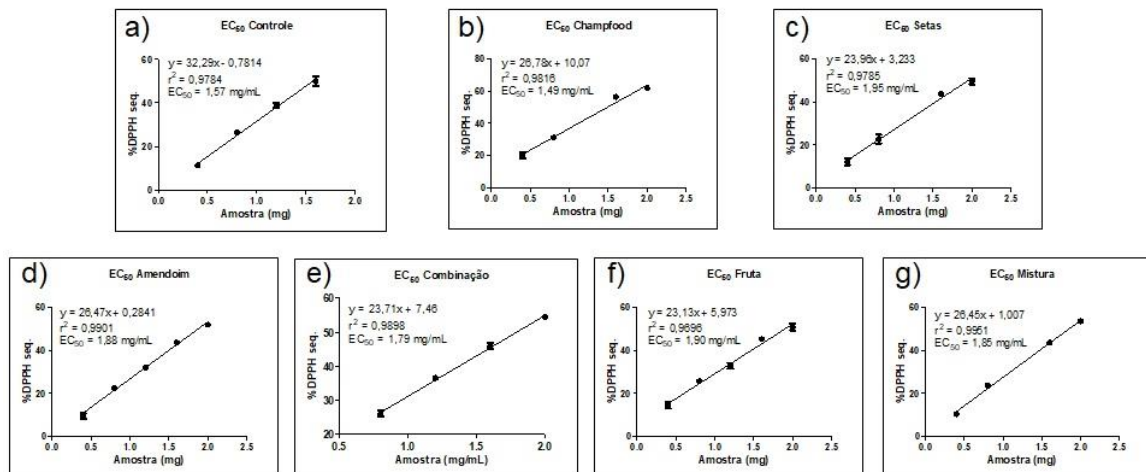


**Figura 11:** Redução da molécula de DPPH<sup>•</sup> na forma de radical livre (Violeta); DPPH na forma reduzida (Amarelo).

A reação de redução do radical DPPH<sup>•</sup> é acompanhada pela diminuição da absorvância a 517 nm, medida através de um espectrofotômetro UV-visível (AMAROWICZ et al., 2004; ANTOLOVICH et al., 2002).

O ensaio de sequestro do radical livre DPPH<sup>•</sup> 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).

Para calcular o EC<sub>50</sub> foram construídas curvas analíticas com as próprias amostras em diferentes concentrações para obtenção da equação da reta, conforme mostrado na Figura 12 para os cogumelos inteiros, e na Figura 13 para as estipes e píleo dos cogumelos, que obtiveram melhores resultados no teste de fenóis totais (*champfood* e combinação).



**Figura 12:** Curvas analíticas dos cogumelos secos e moídos para cálculo do  $EC_{50}$  da capacidade redutora do radical DPPH', onde: a) controle; b) champfood; c) SETAS; d) amendoim; e) combinação; f) fruta; g) mistura.

Os resultados da capacidade das amostras de cogumelo em reduzir 50% dos radicais DPPH' em solução estão apresentados na Tabela 11. Os resultados variaram de 1,47 a 2,03 mg de cogumelo por mL de extrato. Neste caso, quanto menor for o valor do  $EC_{50}$ , maior é a capacidade antioxidante da amostra. Os cogumelos cultivados com o suplemento importado *champfood* foram os que obtiveram melhores resultados e não demonstrou diferença significativa do controle (sem suplementação). Os resultados das demais suplementações se mostraram estatisticamente iguais.

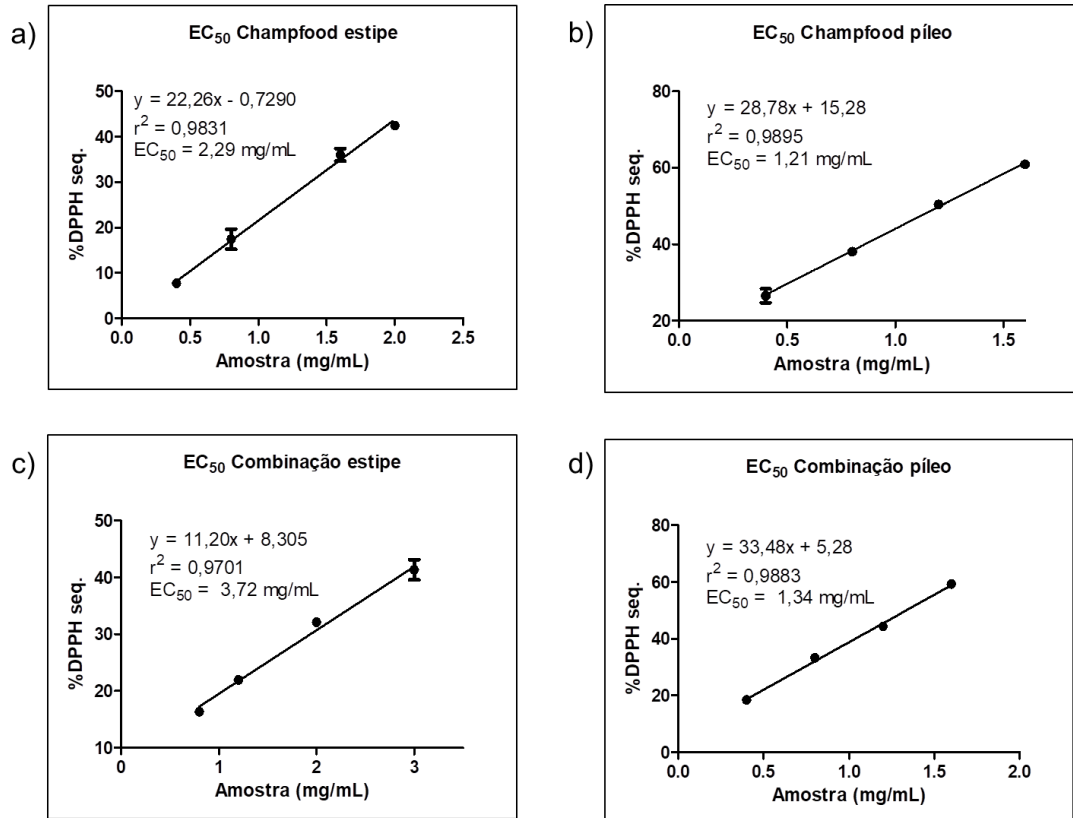
**Tabela 11:** Valores de  $EC_{50}$  da capacidade redutora do radical DPPH' das amostras de *P. ostreatus* var. Florida inteiros.

Amostras	$EC_{50}$ (mg mL <sup>-1</sup> )				mg EAG/100 g de amostra
	1	2	3	Média±DP*	
<b>Controle</b>	1,58	1,64	1,50	1,57±0,07 <sup>a</sup>	61,85±2,75 <sup>b</sup>
<b>Amendoim</b>	1,88	1,88	1,89	1,88±0,01 <sup>b</sup>	50,94±0,82 <sup>c</sup>
<b>Combinação</b>	1,76	1,83	1,79	1,79±0,04 <sup>b</sup>	60,96±2,54 <sup>b</sup>
<b>Fruta</b>	1,92	1,80	2,00	1,91±0,10 <sup>b</sup>	56,12±3,52 <sup>bc</sup>
<b>Mistura</b>	1,85	1,87	1,82	1,85±0,03 <sup>b</sup>	52,08±1,30 <sup>c</sup>
<b>Champfood</b>	1,48	1,49	1,47	1,48±0,01 <sup>a</sup>	74,69±2,83 <sup>a</sup>
<b>SETAS</b>	1,99	1,86	2,03	1,96±0,09 <sup>b</sup>	51,40±2,01 <sup>c</sup>

Valores seguidos por letras diferentes dentro de uma mesma coluna são significativamente diferentes em  $p < 0,05$ . \* DP: Desvio-padrão relativo referente as medidas em triplicata.

Quando analisadas as partes do cogumelo separadas, estipe (2,29 – 3,72 mg mL<sup>-1</sup>) e píleo (1,21 – 1,34 mg mL<sup>-1</sup>), cultivados com os suplementos

*champfood* e combinação, foi notado que a capacidade antioxidante é maior no píleo do que na estipe, e que os menores valores de  $EC_{50}$  foram obtidos para os cogumelos suplementados com *champfood* conforme demonstra a Figura 13.



**Figura 13:** Curvas analíticas das partes dos cogumelos secos e moídos para cálculo do  $EC_{50}$  da capacidade redutora do radical DPPH $^{\bullet}$ , onde: a) *champfood* estipe; b) *champfood* píleo; c) combinação estipe; d) combinação píleo.

Na

Tabela **12** estão apresentados os resultados da capacidade antioxidante dos extratos dos cogumelos cultivados com suplementações artesanais, importadas e com o controle (sem suplementação). Quando feitas as extrações e a secagem desses extratos, notou-se que os mesmos perderam a atividade antioxidante e, por conta disso, os testes foram realizados a partir de extratos de 10 mg do cogumelo seco e moído em 1,0 mL de EtOH 80% e expressos em mg EAG/extrato de 100 g de amostra.

**Tabela 12:** Capacidade redutora do radical DPPH' junto aos extratos dos cogumelos inteiros cultivados com suplementos artesanais e importados.

AMOSTRAS	%DPPH' sequestrado				mg EAG/Extrato de 100 g da amostra*
	1	2	3	Média	
<b>Controle</b>	42,91	41,16	42,29	42,12	25,97±0,63 <sup>a</sup>
<b>Amendoim</b>	50,79	51,45	54,90	52,38	33,24±1,57 <sup>c</sup>
<b>Combinação</b>	55,63	54,68	51,21	53,84	34,28±1,65 <sup>c</sup>
<b>Fruta</b>	50,90	45,90	51,46	49,42	31,15±2,17 <sup>bc</sup>
<b>Mistura</b>	46,40	43,35	44,20	44,65	27,77±1,11 <sup>ab</sup>
<b>Champfood</b>	62,27	60,81	63,95	62,34	40,31±1,11 <sup>d</sup>
<b>SETAS</b>	45,95	45,78	47,39	46,37	28,99±0,63 <sup>ab</sup>

\*Valores seguidos por letras diferentes dentro de uma coluna são significativamente diferentes em  $p < 0,05$ .

Os resultados variaram de 25,97 a 40,31 mg EAG/extrato de 100 g de amostra sendo que os suplementos mistura e SETAS não desmonstraram diferenças significativas quando comparados ao controle. O cogumelo produzido com o suplemento *champfood* foi o que apresentou maior atividade antioxidante (40,31 mg EAG/extrato de 100 g de amostra), seguido dos cultivados com amendoim, combinação e fruta, os quais não tiveram diferenças significativas entre eles.

De um modo geral, quando são feitos estudos utilizando extratos, os resíduos que sobram do processo de extração são descartados. Os resíduos (composto exaurido), mesmo após terem sido feitas extrações exaustivas, foram avaliados separadamente para saber se os mesmos ainda apresentavam atividade antioxidante. Os resultados da capacidade antioxidante dos resíduos frente ao radical DPPH' estão organizados na Tabela 13.

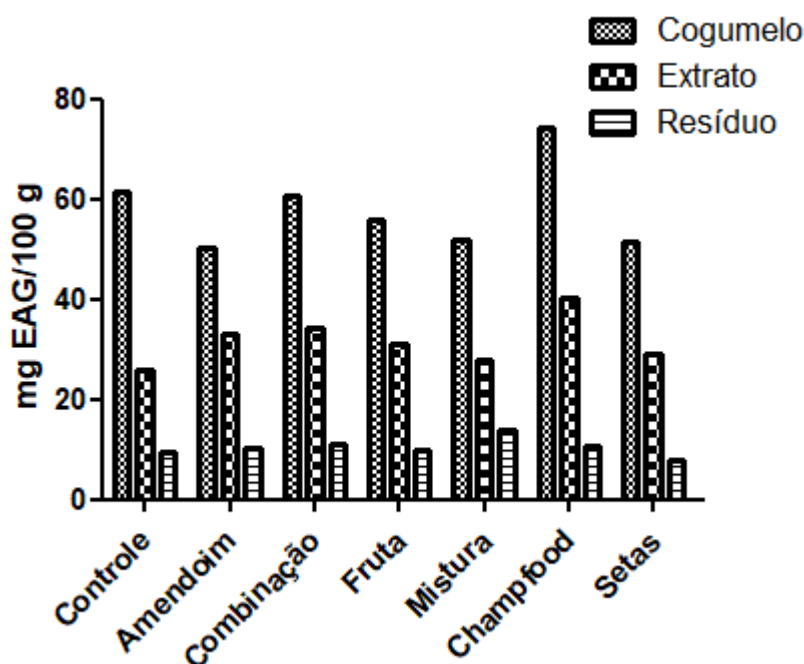
**Tabela 13:** Capacidade redutora do radical DPPH\* junto aos resíduos dos cogumelos inteiros cultivados com suplementos artesanais e importados.

AMOSTRAS	%DPPH* sequestrado				mg EAG/resíduo de 100 g da amostra*
	1	2	3	Média	
<b>Controle</b>	17,43	23,85	20,71	22,08	9,64±1,64 <sup>a</sup>
<b>Amendoim</b>	19,47	20,51	32,32	22,41	10,29±0,52 <sup>ab</sup>
<b>Combinação</b>	20,10	28,21	22,16	23,29	11,10±1,03 <sup>ab</sup>
<b>Fruta</b>	20,10	25,51	18,34	21,32	9,74±0,88 <sup>a</sup>
<b>Mistura</b>	19,21	25,77	24,27	22,12	13,85±0,75 <sup>b</sup>
<b>Champfood</b>	20,87	22,44	20,18	21,24	10,67±0,34 <sup>ab</sup>
<b>Setas</b>	15,52	28,59	18,07	20,70	8,03±1,28 <sup>a</sup>

Valores seguidos por letras diferentes dentro de uma coluna são significativamente diferentes em  $p < 0,05$ .

Os resultados apresentados na Tabela 13 variaram de 8,03 à 13,85 mg EAG/resíduo de 100 mg de amostra e os resíduos mais ativos foram obtidos para os cogumelos produzidos com o suplementos amendoim, combinação, mistura e *champfood*. Os demais tiveram valores menores e sem diferença significativa. Segundo Zied e colaboradores (2018), o desenvolvimento de suplementos artesanais torna-se importante, pois é possível produzir cogumelos com as mesmas características daqueles suplementados pelos suplementos comerciais (ZIED et al., 2010).

A Figura 14 mostra a comparação da capacidade antioxidante do cogumelo inteiro, do extrato do cogumelo inteiro e o composto exaurido (resíduo da extração). Nota-se que os resultados foram maiores quando realizados o teste com os cogumelos inteiros, ou seja, sem extração prévia, seguida dos extratos e resíduos. De um modo geral o cogumelo produzido com o suplemento internacional *champfood* foi o que demonstrou maior potencial antioxidante.



**Figura 14:** Comparação entre os resultados da capacidade antioxidante dos cogumelos sem extração prévia, dos extratos e dos resíduos provenientes da extração.

Com base nos ensaios de determinação de fenóis totais, foram escolhidos os cogumelos que obtiveram maiores teores para posterior teste utilizando as partes separadamente (estipe e píleo). Na Tabela 14 estão os resultados da atividade antioxidante dos extratos das estipes e píleos dos cogumelos cultivados com os suplementos *champfood* e combinação.

**Tabela 14:** Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos das estipes e píleos dos cogumelos produzidos com os suplementos *champfood* e combinação.

AMOSTRAS	%DPPH' sequestrado				mg EAG/Extrato de 100 g da amostra
	1	2	3	Média	
Champfood Estipe	24,28	25,16	25,16	24,86	13,76±0,36 <sup>a</sup>
Champfood Píleo	66,83	63,58	63,33	64,58	41,91±1,39 <sup>c</sup>
Combinação Estipe	23,25	24,02	20,54	22,60	12,16±1,29 <sup>a</sup>
Combinação Píleo	59,05	60,98	59,05	59,69	38,45±0,79 <sup>b</sup>

Valores seguidos por letras diferentes dentro de uma coluna são significativamente diferentes em  $p < 0,05$ .

Os resultados da atividade antioxidante entre os extratos variaram de 12,16 – 41,91 mg EAG/extrato de 100 g de amostra, contendo os melhores resultados para o píleo. Quando comparados os resultados dos píleos, apesar de apresentarem valores próximos, o extrato do *champfood* píleo foi o que teve maior resultado. Contudo, o extrato de combinação píleo teve um resultado significativo e tem destaque por ser um suplemento a base de resíduo industrial, o que seria uma vantagem econômica expressiva.

Na Tabela 15 estão os resultados da atividade antioxidante dos resíduos, composto exaurido, das estipes e píleos dos cogumelos produzidos com os suplementos *champfood* e combinação.

**Tabela 15:** Atividade antioxidante dos resíduos das estipes e píleos dos cogumelos produzidos com os suplementos *champfood* e combinação.

AMOSTRAS	%DPPH' sequestrado				mg EAG/resíduo de 100 g da amostra*
	1	2	3	Média	
<b>Champfood Estipe</b>	29,41	26,33	31,23	28,99	16,69±1,76 <sup>c</sup>
<b>Champfood Píleo</b>	37,11	35,85	36,55	36,51	22,02±0,45 <sup>d</sup>
<b>Combinação Estipe</b>	6,04	11,48	8,76	8,76	2,35±1,93 <sup>a</sup>
<b>Combinação Píleo</b>	13,94	38,99	12,57	21,83	5,54±0,68 <sup>b</sup>

Observa-se na Tabela 14 que os resultados variaram entre 2,35 – 22,02 mg EAG/resíduo de 100 g da amostra, e os maiores resultados foram obtidos para os resíduos do píleo em comparação às estipes. O resíduo que obteve a maior capacidade antioxidante foi do píleo do cogumelo produzido com o suplemento *champfood* (22,02 mg EAG/resíduo de 100 g de amostra), que é o suplemento importado e específico para a espécie *Agaricus subrufescens*, seguido do resíduo da estipe do cogumelo produzido com o suplemento internacional *champfood* (16,69 mg EAG/resíduo de 100 g de amostra).

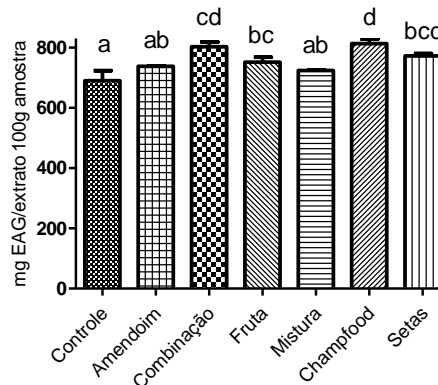


**Tabela 16:** Resultados para o teste da capacidade antioxidante do ensaio de ORAC das amostras de *P. ostreatus* var. Florida inteiras.

Amostras	mg EAG/extrato 100 g amostra			Média
	1	2	3	
<b>Controle</b>	722,98	656,62	----	689,80±46,92 <sup>a</sup>
<b>Amendoim</b>	751,75	739,00	736,22	742,32±8,28 <sup>ab</sup>
<b>Combinação</b>	786,86	818,70	738,44	781,33±40,41 <sup>cd</sup>
<b>Fruta</b>	753,90	779,29	721,13	751,44±29,16 <sup>bc</sup>
<b>Mistura</b>	726,00	749,68	721,27	732,32±15,22 <sup>ab</sup>
<b>Champfood</b>	797,58	828,45	771,10	799,04±28,70 <sup>d</sup>
<b>SETAS</b>	765,15	779,85	723,88	756,29±29,02 <sup>bcd</sup>

Valores seguidos por letras diferentes dentro de uma coluna são significativamente diferentes em  $p < 0,05$ .

Os resultados variaram entre 689,80 – 799,04 mg EAG/extrato de 100 g de amostras. Os cogumelos que melhor apresentaram capacidade antioxidante para o teste de ORAC foram os cultivados com os suplementos *champfood*, combinação e SETAS, não apresentam diferença significativa no teste tukey 5%, conforme mostrado na Figura 16. Os cogumelos produzidos com as suplementações artesanais amendoim e mistura foram os que apresentaram resultados similares com o controle (sem suplementação), ou seja, essas suplementações não influenciam no resultado final dos cogumelos no que diz respeito ao ensaio antioxidante ORAC.



**Figura 16:** Capacidade antioxidante do ensaio de ORAC das amostras de *P. ostreatus* var. Florida inteiras.

O teste antioxidante ORAC foi realizado para a estipe e o píleo dos cogumelos produzidos com o suplemento artesanal combinação e com o suplemento importado *champfood* (amostras selecionadas a partir do ensaio de fenóis totais), e os resultados estão apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17:** Resultados do ensaio antioxidante ORAC para estipe e píleo dos cogumelos cultivados com os suplementos combinação e *champfood*.

Amostras	mg EAG/extrato 100g amostra			
	1	2	3	Média
<b>Champ. Estipe</b>	783,17	812,04	847,83	814,35±32,39 <sup>b</sup>
<b>Champ. Píleo</b>	1117,33	1094,14	1274,43	1161,97±98,08 <sup>d</sup>
<b>Comb. Estipe</b>	483,48	514,12	435,43	477,68±39,66 <sup>a</sup>
<b>Comb. Píleo</b>	925,16	944,81	854,10	908,02±47,72 <sup>c</sup>

Valores seguidos por letras diferentes dentro de uma coluna são significativamente diferentes em  $p < 0,05$ .

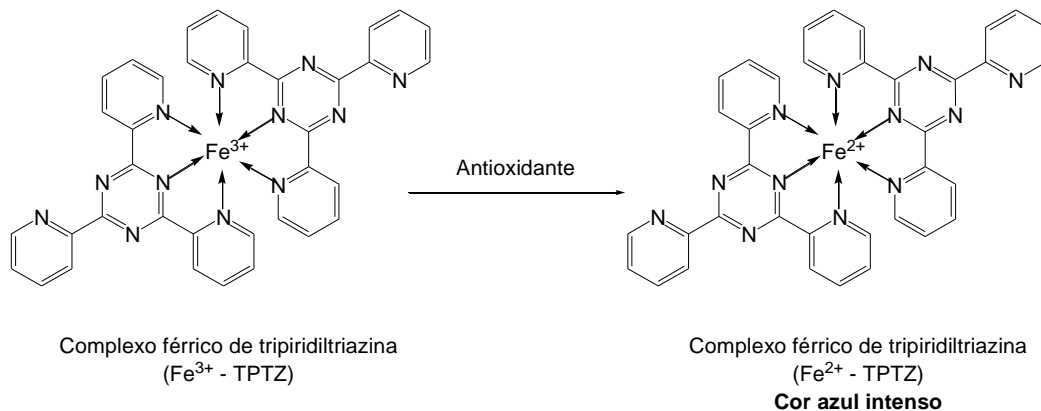
Os resultados do ensaio antioxidante ORAC para as partes variaram para estipes de 477,68 a 814,35 mg EAG/extrato de 100g de amostra, e de 908,02 a 1161,97 mg EAG/extrato de 100 g de amostra para o píleo. Igualmente aos testes antioxidantes com o radical DPPH<sup>\*</sup>, no teste antioxidante ORAC os maiores valores foram observados para os píleos. Analisando os resultados isoladamente podemos notar que tanto para os ensaios utilizando o cogumelo inteiro, quanto para as análises das partes o cogumelo produzido com o suplemento *champfood* foi o que apresentou maior atividade antioxidante por meio do ensaio de ORAC.

#### 4.4.3. Ensaio do Poder de Redução do Ferro (FRAP)

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), por meio dos métodos citados DPPH<sup>\*</sup>, ORAC e também o FRAP.

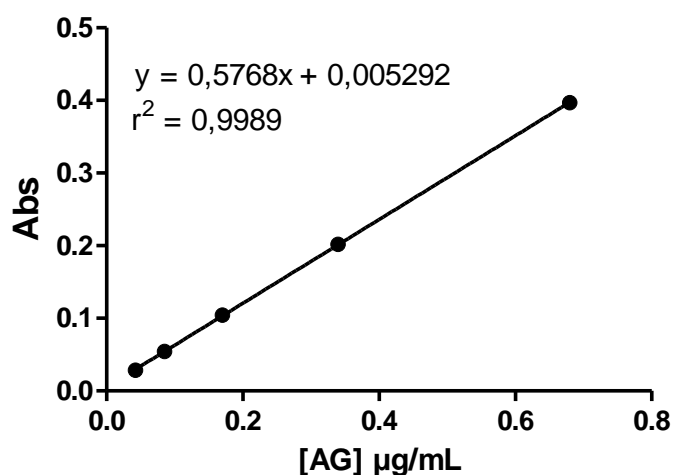
O ensaio FRAP foi originalmente aplicado ao plasma sanguíneo, mas agora é comumente utilizado em um grande número de matrizes. É

caracterizado pela redução do complexo entre o  $\text{Fe}^{3+}$  e a tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}$  - TPTZ), para  $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ, conforme a Figura 17. Esta redução ocorre em contato com antioxidantes em meio ácido, alterando a cor da solução de amarelo para azul intenso, analisado por meio de um espectrofotômetro, com máxima absorvância em 595 nm. Os resultados podem ser expressos como micromolar de  $\text{Fe}^{2+}$  equivalente, ou em relação a um antioxidante padrão, como por exemplo, o ácido gálico (CAROCHO; FERREIRA, 2013).



**Figura 17:** Formação do complexo  $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ a partir do complexo  $\text{Fe}^{3+}$  - TPTZ por ação redutora.

Neste trabalho os resultados do teste de capacidade antioxidante FRAP para as amostras de *P. ostreatus* var. Florida inteiras foram expressos em  $\mu\text{g}$  EAG  $\text{mL}^{-1}$  a partir de uma curva analítica feita com padrão de ácido gálico onde foram utilizados cinco pontos com as concentrações finais de 0,043, 0,085, 0,170, 0,340 e 0,680  $\mu\text{g}$   $\text{mL}^{-1}$ , conforme mostrado na Figura 18.



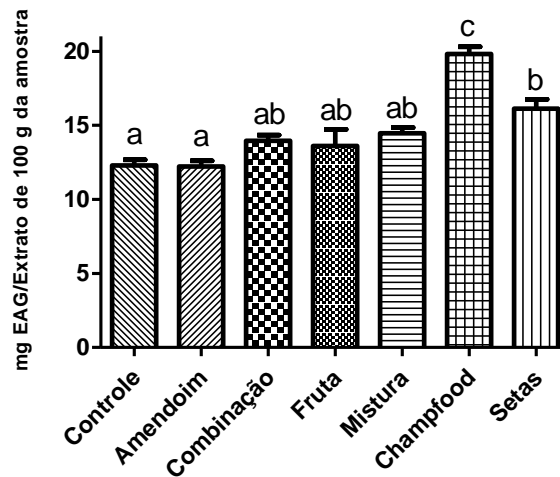
**Figura 18:** Curva analítica do padrão de ácido gálico para determinação de µg EAG/mL no teste de FRAP.

Na Tabela 18 e Figura 19 estão apresentados os resultados do teste de capacidade antioxidante FRAP para as amostras de *P. ostreatus* var. Florida inteiras.

**Tabela 18:** Resultados para o teste da capacidade antioxidante do ensaio de FRAP das amostras de *P. ostreatus* var. Florida inteiras.

Amostras	[AG] µg/mL			mg EAG/Extrato de 100 g do cogumelo			Média±DP
	1	2	3	1	2	3	
<b>Controle</b>	0,050	0,046	0,052	12,44	11,58	12,88	12,30±0,66 <sup>a</sup>
<b>Amendoim</b>	0,052	0,046	0,071	12,88	11,58	17,64	14,03±3,19 <sup>a</sup>
<b>Combinação</b>	0,069	0,053	0,058	17,21	13,31	14,61	15,04±1,99 <sup>ab</sup>
<b>Fruta</b>	0,062	0,055	0,046	15,48	13,74	11,58	13,60±1,95 <sup>ab</sup>
<b>Mistura</b>	0,060	0,055	0,058	15,04	13,74	14,61	14,47±0,66 <sup>ab</sup>
<b>Champfood</b>	0,079	0,083	0,076	19,81	20,68	18,94	19,81±0,87 <sup>c</sup>
<b>SETAS</b>	0,060	0,069	0,081	15,04	17,21	20,24	17,50±2,61 <sup>b</sup>

Valores seguidos por letras diferentes dentro de uma coluna são significativamente diferentes em  $p < 0,05$ .



**Figura 19:** Capacidade antioxidante do ensaio de FRAP das amostras de *P. ostreatus* var. Florida inteiras.

Os resultados do teste antioxidante FRAP variaram de 12,30 a 19,81 mg EAG/Extrato de 100 g de amostra e verificou-se que o maior resultado obtido para esse teste antioxidante foi para o cogumelo cultivado com o suplemento *champfood* (19,81 mg EAG/extrato de 100 g de amostra), seguido das suplementações combinação, fruta, mistura e Setas.

Os testes antioxidantes também foram realizados para as partes estipe e píleo dos cogumelos que apresentaram maiores teores de fenóis totais. Na Tabela 19 estão apresentados os resultados do teste antioxidante FRAP para as partes estipe e píleo dos cogumelos suplementos com combinação e *champfood*.

**Tabela 19:** Resultados do ensaio antioxidante FRAP para estipe e píleo dos cogumelos cultivados com os suplementos combinação e *champfood*.

Amostras	[AG] µg/mL			mg EAG/Extrato de 100 g do cogumelo			Média
	1	2	3	1	2	3	
<b>Champ. Estipe</b>	0,043	0,045	0,051	10,71	11,14	12,88	11,58±1,15 <sup>b</sup>
<b>Champ. Píleo</b>	0,071	0,083	0,093	17,64	20,68	23,28	20,53±2,82 <sup>c</sup>
<b>Comb. Estipe</b>	0,029	0,034	0,036	7,24	8,54	8,97	8,25±0,90 <sup>a</sup>
<b>Comb. Píleo</b>	0,097	0,119	0,126	24,14	29,78	31,51	28,48±3,85 <sup>d</sup>

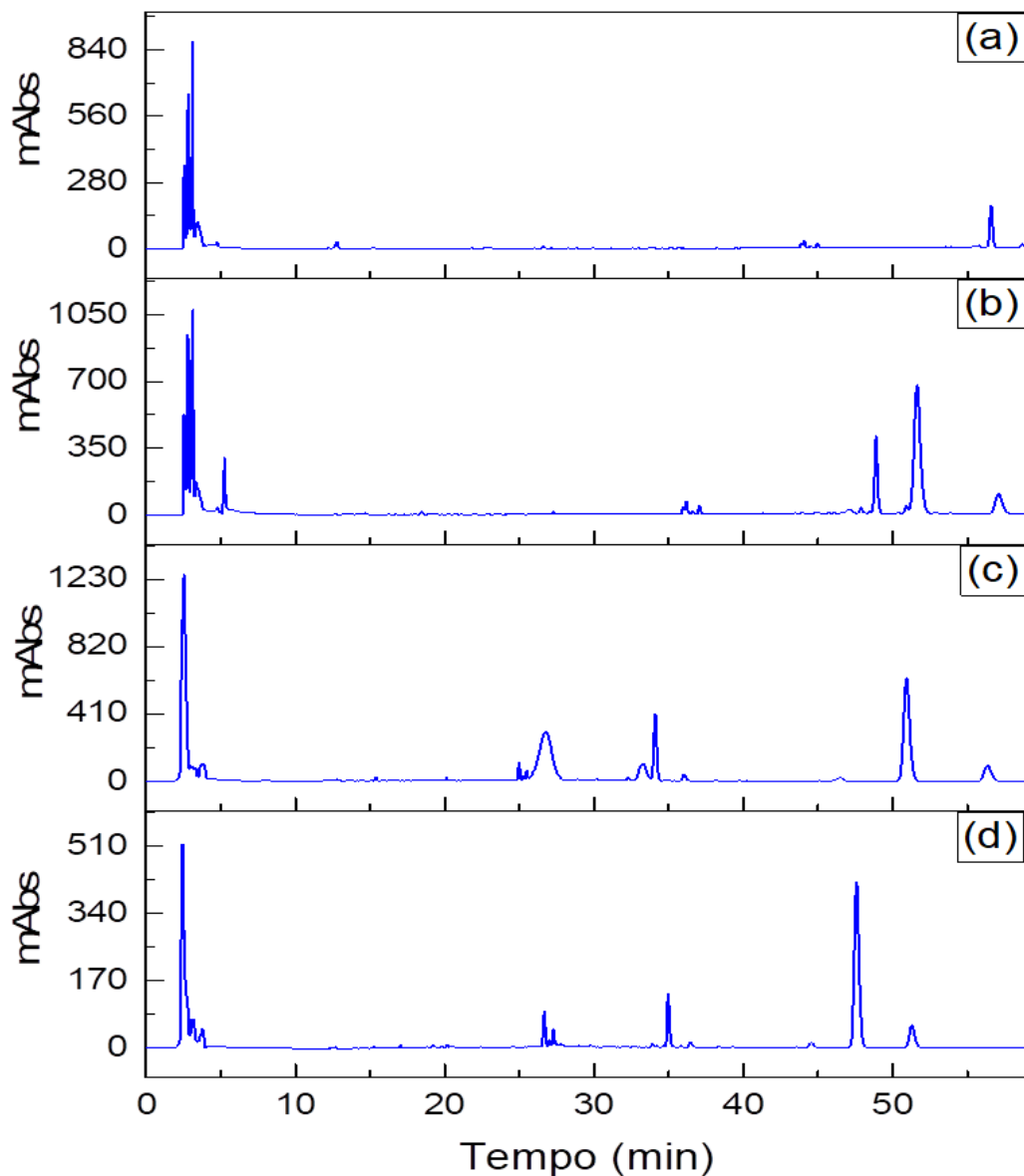
Valores seguidos por letras diferentes dentro de uma coluna são significativamente diferentes em  $p < 0,05$ .

Os resultados do teste de atividade antioxidante pelo método FRAP para as partes estipe e píleo dos cogumelos cultivados com os suplementos combinação e *champfood* variaram entre 8,25 – 28,48 mg EAG/extrato de 100 g de amostra. Para as estipes o maior resultado foi obtido para o cogumelo suplementado com *champfood*. Quando comparados os resultados do teste antioxidante para os píleos o melhor resultado foi obtido para a suplementação artesanal combinação (28,48 mg EAG/extrato de 100g de amostra).

#### 4.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

##### 4.5.1. Otimização do Método Cromatográfico

A otimização das análises cromatográficas foi realizada por meio da variação do tempo de análise, e do gradiente de eluição, usando as seguintes fases móveis: água (A) e acetonitrila (B), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. Foi possível observar nos cromatogramas (Figura 20), substâncias com baixa polaridade presentes nos extratos hidroetanólicos, a partir dos 20 minutos de corrida, enquanto as substâncias com alta polaridade aparecem logo no início da corrida, por não interagirem com a fase estacionária em fase reversa da coluna utilizada.



**Figura 20:** Perfis cromatográficos (CLAE-UV/DAD) em  $\lambda = 280$  nm dos extratos realizados com a amostra de cogumelo cultivado com o suplemento combinação: (a) método A; (b) método B; (c) método C; (d) método D;

O método A (Figura 20a), método exploratório, iniciou-se com 5% da fase móvel B por 5 min, em seguida atingiu 95% B até 50 min e 95% até 60 min. A vazão utilizada durante a corrida foi de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e a temperatura do forno mantida constante a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . O gradiente apresentou velocidade de eluição da fase móvel B de  $2\% \text{ B min}^{-1}$ . Neste cromatograma é possível verificar que no intervalo de 10 a 25 min da corrida poucas substâncias foram eluídas e, no final da corrida cromatográfica, verificou-se que ainda haviam substâncias retidas na coluna. Através dos resultados, o método B foi criado.

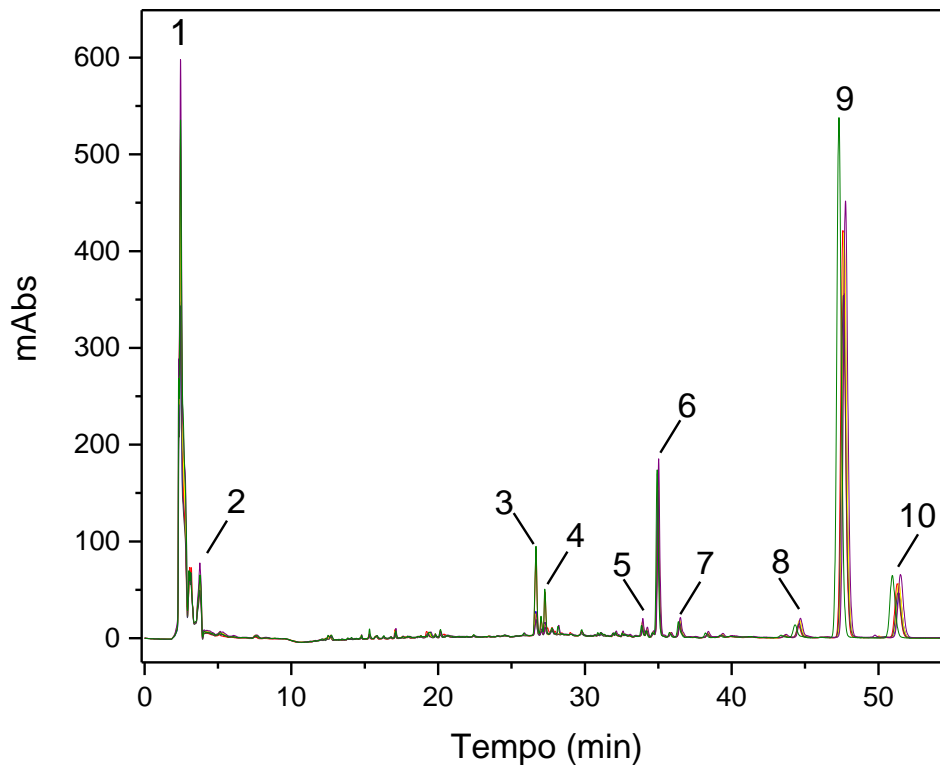
O método B (Figura 20b) iniciou-se com 20% da fase móvel B, seguido de 95% B até 42,5 min e 95% até 60 min. A vazão utilizada durante a corrida foi de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e temperatura do forno constante de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . O gradiente apresentou velocidade de eluição da fase móvel B de  $2\% \text{ B min}^{-1}$ . Notou-se que alguns picos saíram depois do término do gradiente de eluição, ou seja, na lavagem da coluna, de 45 a 60 min, ou seja, houve um deslocamento dos picos com característica mais apolar para um menor tempo de corrida. Tendo em vista que nos tempos de 5 a 25 min poucos picos, aumentou-se a velocidade de troca do solvente A pelo B e criou-se o método C.

O método C (Figura 20c) inicia-se com 20% do solvente B, e atingiu 95% de B em 23,75 min, e permaneceu com 95% até 60 min. A vazão utilizada durante a corrida foi de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  e temperatura constante de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . O gradiente apresentou velocidade de eluição da fase móvel B de  $4\% \text{ B min}^{-1}$ . Tendo em vista a baixa resolução no intervalo de tempo de 20-30 min de corrida, foi proposto o método D.

Método D (Figura 20d) iniciou-se com 20% do solvente B, seguido de um aumento de 95% de B até 23,75 min e permanecendo com 95% até 60 min. Esse método é semelhante ao método C, exceto pela vazão que entre 20 e 30 min de corrida é de  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ . Neste caso obteve-se uma melhor resolução geral no perfil cromatográfico, e esse método foi utilizado para analisar todas as amostras por CLAE-UV/DAD e também por CLAE-EM/EM, posteriormente.

#### 4.5.2. Análise do Extrato Hidroetanólico do Shimeji por CLAE-UV/DAD

Na Figura 21 estão apresentados os cromatogramas sobrepostos dos extratos hidroetanólicos dos cogumelos cultivados com os suplementos controle, amendoim, combinação, fruta, mistura, *champfood*, e SETAS.

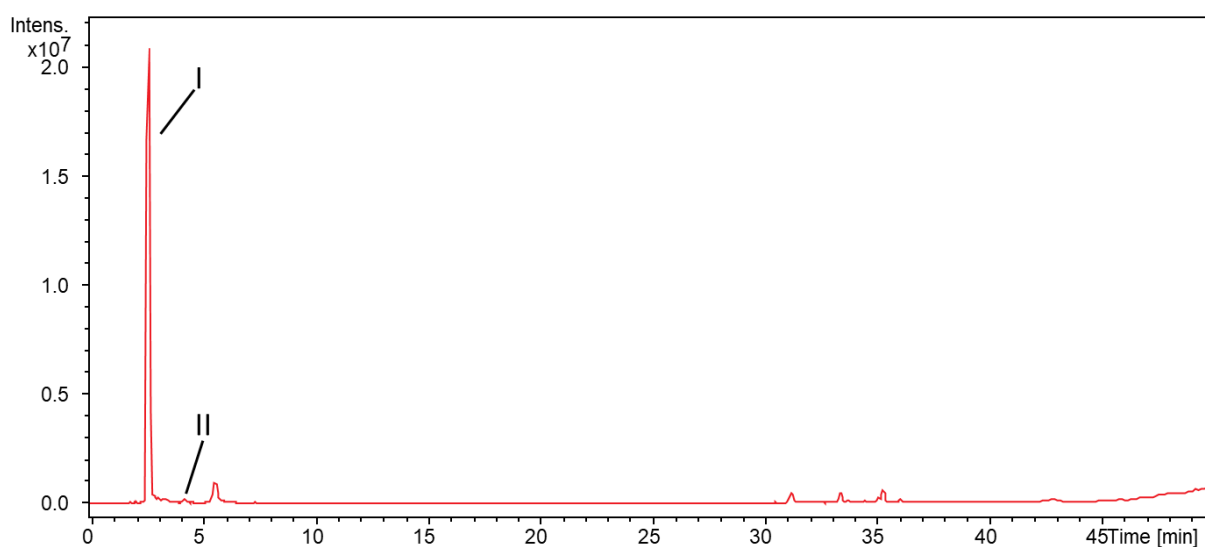


**Figura 21:** Perfis cromatográficos dos extratos hidroetanólicos do *Pleurotus ostreatus* var. Florida (inteiro) cultivado com suplementos artesanais (amendoim, combinação, fruta, mistura), importados (*champfood* e SETAS) e sem suplementação (controle). Numerados de 1 a 10 os picos majoritários.

Analisando os cromatogramas dos extratos hidroetanólicos dos cogumelos produzidos tanto com os suplementos artesanais quanto com os suplementos importados, foi possível observar uma grande similaridade entre os perfis cromatográficos, sendo que todos apresentaram 10 picos principais. Os sete cromatogramas apresentaram os mesmos picos, ou seja, provavelmente foram extraídos os mesmos compostos e demonstrando que não há diferença na composição dos cogumelos cultivados com diferentes suplementos, porém existe diferença nas intensidades dos picos, ou seja, a quantidade dos compostos varia de acordo com a suplementação, o que explica a diferença na quantidade de fenóis totais e capacidade antioxidante entre os extratos de cogumelo.

#### 4.6. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS PRESENTES NO EXTRATO HIDROETANÓLICO POR CLAE-EM/EM

Para melhor compreensão da composição das amostras do cogumelo *P. ostreatus* var. Florida, o extrato hidroetanólico foi analisado por CLAE-EM/EM (Figura 22) e duas substâncias foram identificadas através da utilização dos dados das relações de  $m/z$  e padrões de fragmentações já relatados na literatura.



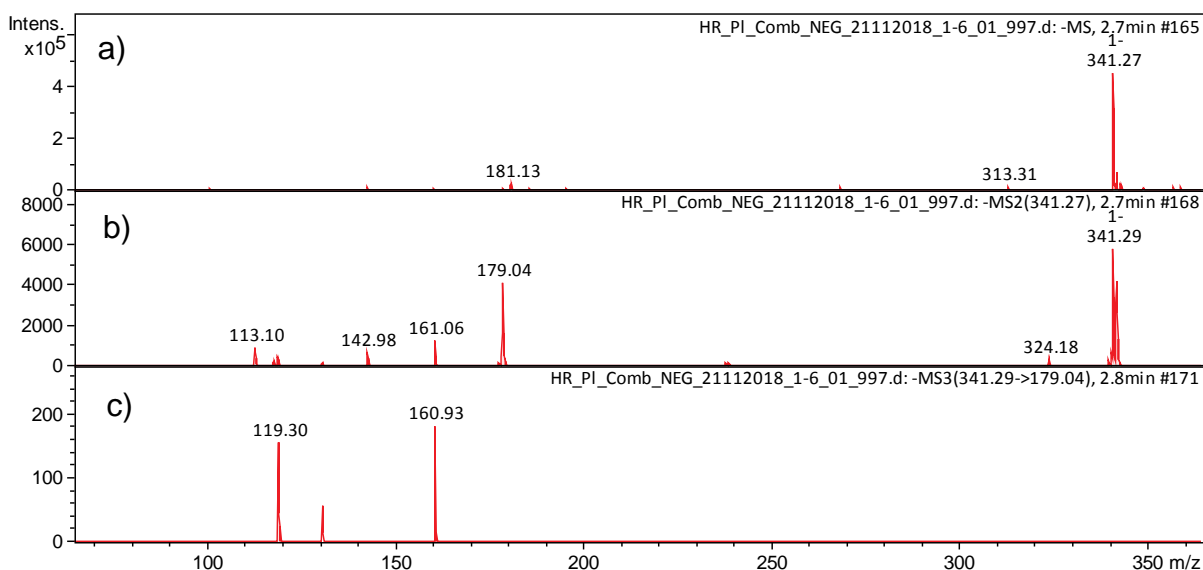
**Figura 22:** Cromatograma do íon total (TIC) obtido no modo negativo por CLAE-EM/EM do extrato hidroetanólico de *P. ostreatus* var. Florida cultivado com o suplemento combinação.

Foi possível propor a identificação de duas substâncias, sendo as substâncias I e II dissacarídeos. A substância II foi identificada com o aduto HCOOH. Dificilmente é possível identificar a configuração de uma molécula usando somente a técnica de Espectrometria de Massas por não revelar informações com relação à estereoquímica dos centros assimétricos das moléculas.

Um dissacarídeo é composto por duas moléculas de hexose unidas por uma ligação glicosídica (LANDI et al., 2017). A trealose, por exemplo, cujo íon molecular apresenta a razão massa/carga ( $m/z$ ) de 341,27  $[M-H]^-$ , já foi identificada e caracterizada em amostras de cogumelos (MATSUURA et al., 2002).

Os fragmentos observados no espectro de massas do extrato hidroetanólico de *P. ostreatus* (Figura 23) foi comparado com o MoNA (*MassBank of North America*), banco de espectros de massas, e os vários fragmentos coincidiram com os obtidos para o dissacarídeo trealose: 113, 119, 131, 143, 161, 179 e por fim

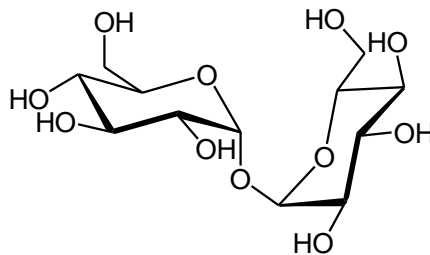
o íon molecular  $[M-H]^- = 341$  Da. Sendo assim foi confirmado que a substância I é referente a trealose. Foram feitas análises dos espectros de massas (fragmentos) dos isômeros da trealose, como lactose e maltose, a fim de comparar o padrão da formação dos fragmentos, porém verificou-se que os espectros obtidos não são semelhantes aos destes isômeros. Portanto, concluiu-se que o espectro da Figura 23 é referente ao dissacarídeo trealose (Figura 24).



**Figura 23:** Espectros de massas obtido por CLAE-EM/EM do extrato hidroetanólico de *P. ostreatus* - proposta da trealose (substância I); a) Espectro de massas no íon molecular (MS); b) Fragmentação do íon molecular (MS<sup>2</sup>); c) fragmentação do pico base (MS<sup>3</sup>).

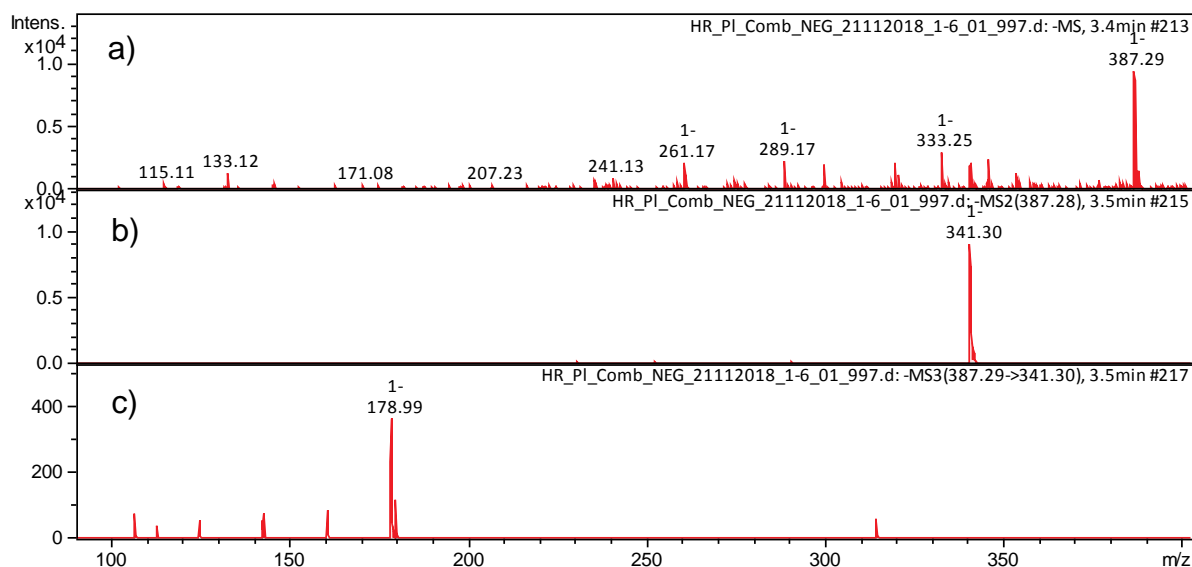
A trealose é um dissacarídeo não redutor com duas moléculas de glicose ligadas através de uma ligação  $\alpha$ ,  $\alpha$ -1,1-glicosídica. A trealose tem recebido atenção nas últimas décadas por seu papel na neuroproteção, especialmente em modelos animais de várias doenças neurodegenerativas, como as doenças de Parkinson e Huntington. O mecanismo subjacente aos efeitos neuroprotetores da trealose permanece indefinido. A hipótese predominante é que a trealose protege os neurônios induzindo a autofagia, eliminando os agregados de proteínas. Alguns dos estudos em animais mostraram ativação de autofagia e agregados protéicos reduzidos após administração de trealose em modelos de doenças neurodegenerativas, aparentemente apoiando a hipótese de indução de autofagia (LEE; YOON; LEE, 2018).

A trealose pode conferir efeitos protetores às células de duas formas: pela estabilização de membranas e conjuntos lipídicos, evitando desta forma a peroxidação lipídica; e pela estabilização de macromoléculas biológicas (por exemplo, proteínas) sob condições de estresse oxidativo que normalmente promoveriam sua desnaturação. O mecanismo de ação da trealose se dá por meio da formação de complexos moleculares com biomacromoléculas (BERLETT; STADTMAN, 1997; LUO; LI; WANG, 2008).



**Figura 24:** Estrutura molecular da trealose.

O mesmo dissacarídeo proposto para a substância I foi proposto para a substância II. A substância II se difere da I por conta da trealose formar com o aduto HCOOH o íon molecular  $[M+HCOOH]^- = 387,29$  Da. A fragmentação do aduto formado leva à molécula desprotonada  $[M-H]^-$  com  $m/z$  341 ( $MS^2$ ), acompanhada por quantidades menores de íons de  $m/z$  179 (monossacarídeo desprotonado) e  $m/z$  de 161 devido à perda de uma molécula de monossacarídeo, conforme mostrado na Figura 25 (GABBANINI et al., 2010).



**Figura 25:** Espectro de massas obtido por CLAE-EM/EM do extrato hidroetanólico de *P. ostreatus* -proposta da trealose com aduto HCOOH (substância II); a) Espectro de massas no íon molecular (MS); b) Fragmentação do íon molecular (MS<sup>2</sup>); c) fragmentação do pico base (MS<sup>3</sup>).

Os demais espectros de massas obtidos das análises do extrato hidroetanólico do shimeji estão sendo analisados para identificação de outras substâncias. Verificaram-se indicativos de compostos nitrogenados presentes no extrato de shimeji, por conta de massas ímpares, e a presença de peptídeos, que serão propostos de acordo com a literatura. Assim, mais estudos serão necessários para identificar as principais moléculas antioxidantes encontradas no cogumelo *P. ostreatus* var. Florida.

## 5. CONCLUSÃO

As análises da composição química dos cogumelos inteiros shimeji mostraram os maiores teores de fibras e proteínas para os cogumelos cultivados com os suplementos artesanal combinação e comercial *champfood*, respectivamente, sendo que o suplemento artesanal proporcionou resultados similares à suplementação com o suplemento comercial, resultando em cogumelos com maiores quantidades de nutrientes e favorecendo a sua característica de alimento funcional.

Na maioria dos testes realizados, os cogumelos *P. ostreatus* var. Florida que foram cultivados com estas suplementações (*champfood* e combinação) também apresentaram maiores teores de fenóis totais e capacidade antioxidante apresentadas nos ensaios de DPPH<sup>\*</sup>, ORAC e FRAP. Sendo o suplemento *champfood* específico para o cultivo dos cogumelos da espécie *Agaricus subrufescens* (cogumelo do sol), enquanto o SETAS, com um dos menores valores de fenóis totais, é específico para as espécie *Pleurotus ostreatus* em estudo neste trabalho.

Mesmo os cogumelos cultivados com o suplemento *champfood* apresentando os melhores resultados, podemos considerar importantes os resultados obtidos para os cogumelos cultivados com o suplemento artesanal combinação, sendo maiores que os valores obtidos com a suplementação importada SETAS e também por apresentar baixo custo na produção, sendo assim mais viável o cultivo com a suplementação combinação. Com isso, concluímos que nem sempre o suplemento específico é o mais indicado para a produção de cogumelos em termos de qualidade, levando em consideração um alimento funcional.

Através da análise de CLAE-EM/EM do extrato hidroetanólico dos cogumelos foi possível verificar a proposta de identificação da trealose, um dissacarídeo.

Contudo, sugere-se que o consumo do cogumelo *P. ostreatus* var. Florida pode ser benéfico para a saúde, uma vez que oferece proteção antioxidante aos danos do sistema oxidativo, por ser importante fonte de compostos fenólicos, capazes de combater, suprimir e inibir a formação de radicais livres. O mesmo pode ser dito sobre o seu uso como suplemento alimentar ou na indústria farmacêutica.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLA, D. S. P. Radicais livres e antioxidantes. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**, v.10, p.474, 2003.
- AOAC. Official methods of analysis. In **Association of Official Analytical Chemists**, edition 16th, Arlington, VA, 1995.
- ALANANBEH, K. M. et al. Cultivation of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* on date-palm leaves mixed with other agro-wastes in Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 616–625, 2014.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4. ed. New York, USA: [s.n.].
- AMAROWICZ, R. et al. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, v. 84, p. 551–562, 2004.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ANTOLOVICH, M. et al. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, p. 183–198, 2002.
- BARROS, L. et al. Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 103, p. 413–419, 2007.
- BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 33, p. 20313–6, 1997.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

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

CARVALHO, A. Cogumelos Silvestres. **Folha Viva: Jornal dos Clubes da Floresta do Projecto Prosepe. Floresta conVida**, n. 31, p. 1–28, 2005.

CHANG, S. T.; MILLES, P. G. **Edible Mushrooms and their cultivation**. [s.l: s.n.].

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

DECKER, E. A. Phenolics: Prooxidants or Antioxidants? **Nutrition Reviews**, v. 55, n. 11, p. 396–407, 1997.

DIAS, E. S. REVIEW MUSHROOM CULTIVATION IN BRAZIL: CHALLENGES AND POTENTIAL FOR GROWTH Cultivo de cogumelos no Brasil: desafios e potencialidades. v. 34, p. 795–803, 2010.

DUBOST, N. J.; OU, B.; BEELMAN, R. B. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 105, p. 727–735, 2007.

DURAN, A. C. DA F. L. et al. Correlação entre consumo alimentar e nível de atividade física habitual de praticantes de exercícios físicos em academia Food intake and physical activity level correlation among individuals who practice exercises in a gym. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 12, n. 3, p. 15–19, 2004.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. RADICAIS LIVRES: CONCEITOS, DOENÇAS RELACIONADAS, SISTEMA DE DEFESA E ESTRESSE OXIDATIVO. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61–69, 1997.

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.

GONÇALVES, C. C. DE M. et al. Avaliação do cultivo de *Pleurotus sajor-caju* (fries) sing. sobre o resíduo de algodão da indústria têxtil para a produção de cogumelos e para alimentação animal. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 220–225, 2010.

GOOD KITZBERGER, C. S. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 631–638, 2007.

GUILLAMÓN, E. et al. Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. **Fitoterapia**, v. 81, p. 715–723, 2010.

HADAR, Y.; COHEN-AR, E. Chemical Composition of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus* Produced by Fermentation. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 51, n. 6, p. 1352–1354, 1986.

HAMINIUK, C. W. I. et al. Phenolic compounds in fruits - an overview. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 10, p. 2023–2044, 2012.

HONGYU, K. et al. Principal Component Analysis: theory, interpretations and applications. **Engineering and Science**, v. 1, p. 83–90, 2015.

HUANG, D.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1940–1856, 2005.

JOSE, N.; AJITH, T. A.; JANANRDHANAN, K. K. Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of culinary-medicinal mushroom *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué.(Agaricomycetideae). **Intenational Journal of Medicinal Mushroom**, v. 4, n. 4, p. 329–335, 2002.

JOSE, N.; JANARDHANAN, K. K. Antioxidant and antitumour activity of *Pleurotus florida*. **Current Science**, v. 79, n. 7, p. 941–943, 2000.

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, p. 5388–5397, 2017.

LEE, H.-J.; YOON, Y.-S.; LEE, S.-J. Mechanism of neuroprotection by trehalose: controversy surrounding autophagy induction. **Cell Death and Disease**, v. 9, p. 1–12, 2018.

LEMOS, F. M. DA R. **ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTO ANÁLOGO A HAMBÚRGUER DE COGUMELO *Agaricus brasiliensis***. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2009.

LIN, S. et al. Antioxidant and Antiangiogenic Properties of Phenolic Extract from *Pleurotus tuber-regium*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 39, p. 9488–9498, 2014.

LUO, Y.; LI, W.-M.; WANG, W. Trehalose: Protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress? **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, n. 1–3, p. 378–384, 2008.

MANZI, P. et al. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. **Food Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 477–482, 1999.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. Beta-glucans in edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 68, p. 315–318, 2000.

MARINO, R. H.; DE ABREU, L. D. Marino, R. H., & de Abreu, L. D. (2009). Cultivation of mushroom Shiitake in coconut wastes supplemented with bran or/and rice bran. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 4, n. 1, p. 11–16, 2009.

MATSUURA, H. et al.  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor from the Seeds of Balsam Pear (*Momordica charantia*) and the Fruit Bodies of *Grifola frondosa*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 7, p. 1576–1578, 2002.

MATTILA, P. et al. Contents of Vitamins, Mineral Elements, and Some Phenolic Compounds in Cultivated Mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2343–2348, 2001.

MATTILA, P.; SUONPÄÄ, K.; PIIRONEN, V. Functional properties of edible mushrooms. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 16, n. 7–8, p. 694–696, 2000.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Functional foods and nutraceuticals: definition, legislation and health benefits. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109–122, 2006.

MORO, C. et al. Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. **Food Chemistry**, v. 130, p. 350–355, 2012.

Ng, S. H. et al. Incorporation of dietary fibre-rich oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) powder improves postprandial glycaemic response by interfering with starch granule structure and starch digestibility of biscuit. **Food Chemistry**, 227, 358–368, 2017.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

OLIVEIRA, D. A. et al. The Journal of Supercritical Fluids Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 55–62, 2016.

OOI, V. E. C.; LIU, F. A Review of Pharmacological Activities of Mushroom Polysaccharides. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 195–206, 1999.

PANDOHEE, J. et al. Off-line two-dimensional liquid chromatography for metabolomics: an example using *Agaricus bisporus* mushrooms exposed to UV irradiation. **Metabolomics**, v. 11, p. 939–951, 2015.

PARDO-GIMÉNEZ, A. et al. CULTIVATION OF PLEUROTUS OSTREATUS USING SUPPLEMENTED SPENT OYSTER MUSHROOM SUBSTRATE. **Acta Horticulturae**, n. 933, p. 267–272, 2012.

PRADO, R. et al. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão  
Nutritional value of edible mushrooms: a revision. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 149–154, 2005.

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.

REIS, F. S. et al. Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 66, p. 48–62, 2017.

ROSSI, P. et al. B-glucans from *Grifola frondosa* and *Ganoderma lucidum* in breast cancer: an example of complementary and integrative medicine. **Oncotarget**, v. 9, n. 37, 2018.

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.

TEISSEDRE, P. L. et al. Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 70, p. 55–61, 1996.

TONG, H. et al. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1682–1686, 2008.

VIEIRA, F. R. **Potencial de uso de gramíneas como substrato pasteurizado no cultivo do cogumelo *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2012.

WAKCHAURE, G. C. Production and marketing of mushrooms: global and national scenario. Mushrooms: cultivation, marketing and consumption. **Directorate of Mushroom Research**, p. 15–22, 2011.

WOLDEGIORGIS, A. Z. et al. LC-MS/MS Based Metabolomics to Identify Biomarkers Unique to *Laetiporus sulphureus*. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 4, n. 2, p. 142–153, 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. v. 2017, 2017.