

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA  
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

**RODRIGO BACILA BORGES DA SILVA**

**ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS  
DE BASIDIOMICETOS**

**CURITIBA**

**2016**

RODRIGO BACILA BORGES DA SILVA

**ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS  
DE BASIDIOMICETOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –  
UTFPR, como requisito para a obtenção do  
título de Bacharel em Química, sob orientação  
da Professora Dra. Giselle Maria Maciel.

CURITIBA

2016

**RODRIGO BACILA BORGES DA SILVA**

**ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE BASIDIOMICETOS**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

**Avaliador:** Profa. Dra. Marlene Soares  
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, UTFPR

**Avaliador:** Prof. Dr. Charles W. I. Haminiuk  
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, UTFPR

Profa. Dra. Giselle Maria Maciel  
**Orientadora**

Dra. Danielle Caroline Schnitzler  
**Coordenadora de Curso**

Curitiba, 28 de novembro de 2016.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me privilegiado com a vida que tenho, repleta de saúde e capacitação. Muito obrigado!

Agradeço especialmente à minha mãe, Mônica Matilde Bacila Malaguini, por toda a força e dedicação durante a minha criação, mesmo em momentos difíceis, bem como pelo amor incondicional materno e por todos os conselhos e sermões construtivos. Muito obrigado!

Ao meu pai, Luiz Antônio Borges da Silva, pelo raro senso de humor do qual compartilho, pelo amor incondicional paterno e, é claro, pela conta do Netflix! Muito obrigado!

Ao meu padrasto, Sérgio Nogueira Malaguini, pelo privilégio de poder ter meu próprio quarto e por toda a felicidade proveniente de seu sustento e companhia. Muito obrigado!

À minha família, pela companhia ao longo dos anos, bem como pelo apoio moral incessante. Muito obrigado!

À professora Dra. Giselle Maria Maciel, pela orientação fundamental fornecida durante o inteiro decorrer deste trabalho. Muito obrigado!

Ao professor Dr. Charles Windson Isidoro Himiniuk, pelas breves – mas extremamente valiosas – dicas, bem como pela participação em experimentos químicos aleatórios. Muito obrigado!

À professora Dra. Marlene Soares, pela experiência e conhecimentos passados durante meu estágio no laboratório de microbiologia, bem como por aquela carona até o campus-sede em 2014. Muito obrigado!

Aos meus tios Carlos Roberto Jatobá e Isabelle Christine Bacila Jatobá, por toda a ajuda financeira providenciada direta e indiretamente. Muito obrigado!

Ao Cleomar Pereira Hütner, pelo apoio e respeito durante meu estágio na indústria de tintas. Muito obrigado!

*“ De que serve ao homem  
Conquistar o mundo inteiro,  
Se perder a sua alma? ”  
(Jesus Cristo)*

## RESUMO

SILVA, Rodrigo B. B. **Análise de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos de basidiomicetos**, 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ecoville, Curitiba, 51 páginas.

Extratos de cogumelos têm recebido atenção por sua acessibilidade, segurança e promoção da saúde. Este projeto teve como objetivo principal o cultivo de basidiomicetos para a extração de compostos bioativos em soluções hidroalcoólicas e avaliação da atividade antioxidante dos extratos, bem como a avaliação de diferentes condições de extração e armazenamento sobre a quantidade de compostos fenólicos presentes. Para tal, foram avaliadas soluções com diferentes proporções etanol/água e concentrações soluto/solvente através de um delineamento experimental, fatorial 3x2. A biomassa fúngica foi primeiramente liofilizada para posteriormente ser submetida à extração hidroalcoólica. Os extratos foram testados para se avaliar o teor de compostos fenólicos totais, bem como o decaimento dos mesmos após 24h de armazenamento. Eles foram avaliados quanto à presença de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante foi determinada pelos métodos de ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] e DPPH [2,2-difenil-1-picrilhidrazila]. O cogumelo *Pleurotus ostreatus* apresentou maior quantidade de compostos fenólicos extraídos de sua matriz, com um valor de 2,34% de sua massa seca, ou 23,40 mg Equivalentes de Ácido Gálico por g de amostra seca. A atividade antioxidante do *Pleurotus ostreatus* também foi a maior observada, com um valor de 28% de inibição do radical DPPH e 38% de inibição do radical ABTS. O cogumelo cujo extrato teve o menor índice de decaimento para seus compostos fenólicos foi o *Pleurotus djamor*. O cogumelo *Pleurotus ostreatus*, embora tenha apresentado o maior teor de fenólicos, também apresentou o maior nível de decaimento com o tempo.

**Palavras-chave:** Cogumelos. Compostos bioativos. Decaimento. Fenólicos. Antioxidante.

## ABSTRACT

SILVA, Rodrigo B. B. **Analysis of phenolic compounds and evaluation of antioxidant activity of hydroalcoholic extracts of basidiomycetes**, 2016. Course conclusion monograph (Bachelor's in Chemistry). Federal Technological University of Paraná – Campus Ecoville, Curitiba, 51 pages.

Mushroom extracts have received attention for their accessibility, safety and health promotion. This project aimed for the cultivation of basidiomycetes for the extraction of bioactive compounds in hydroalcoholic solutions and evaluation of the extracts' antioxidant activity, as well as the evaluation of different extraction conditions and storage on the amount of phenolic compounds present. For this, solutions were evaluated with different proportions of ethanol/water and solute/solvent through an experimental delineation, 3x2 factorial. The fungal biomass was first lyophilized to be later subjected to water-alcohol extraction. The extracts were tested to evaluate the content of phenolic compounds, as well as their decay after 24 hours of storage. They were evaluated for the presence of phenolic compounds by the Folin-Ciocalteu method and their antioxidant activity was determined by ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] and DPPH [2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl] radical scavenging. The *Pleurotus ostreatus* mushroom showed the highest amount of phenolic compounds extracted from its matrix, with a value of 2,34% of its dry weight, or 23,40 mg Gallic Acid Equivalents per g of dry sample. The antioxidant activity of *Pleurotus ostreatus* was also the highest observed, with a value of 28% DPPH radical inhibition and 38% ABTS radical inhibition. The mushroom extract which had the lowest decay to its phenolic compounds was the *Pleurotus djamor* mushroom, whilst the *Pleurotus ostreatus* mushroom, although having shown the highest phenolics content, also showed the highest decay over time.

**Keywords:** Mushrooms. Bioactive compounds. Decay. Phenolics. Antioxidant.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Ilustração da estrutura química dos compostos fenólicos mais comumente encontrados em cogumelos. ....	15
<b>Figura 2</b> – Fluxograma referente às etapas que foram empregadas na metodologia adotada para a realização deste trabalho. ....	19
<b>Figura 3</b> - Gráfico referente à regressão linear dos valores mensurados do padrão de ácido gálico. ....	23
<b>Figura 4</b> – Fotografia do kit de cultivo do <i>Pleurotus djamor</i> depois de 8 dias de cultivo. ....	27
<b>Figura 5</b> – Fotografia do kit de cultivo do <i>Pleurotus ostreatus</i> depois de 8 dias de cultivo. ....	28
<b>Figura 6</b> – Fotografia do kit de cultivo do <i>Pleurotus pulmonarius</i> depois de 8 dias de cultivo. ....	28
<b>Figura 7</b> - Gráfico referente à regressão linear dos valores mensurados do padrão de Trolox para a análise de DPPH. ....	35
<b>Figura 8</b> - Gráfico referente à regressão linear dos dados mensurados do padrão de Trolox para a análise de ABTS. ....	37
<b>Figura 9</b> - Gráfico referente aos valores resultantes da análise da influência da radiação ultravioleta. ....	39



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Relação dos compostos fenólicos mais comumente encontrados em cogumelos e suas concentrações previamente relatadas para o <i>Pleurotus ostreatus</i> (PALACIOS et al, 2011). .....	14
<b>Tabela 2</b> - Fatores e níveis selecionados para a otimização das condições de extração dos compostos bioativos. ....	20
<b>Tabela 3</b> – Matriz do delineamento experimental. ....	20
<b>Tabela 4</b> - Teor de compostos fenólicos totais do cogumelo A1 ( <i>Pleurotus djamor</i> ). Onde H representa as amostras analisadas no mesmo dia da extração. ....	29
<b>Tabela 5</b> - Teor de compostos fenólicos do cogumelo A2 ( <i>Pleurotus ostreatus</i> ). Onde H representa as amostras analisadas no mesmo dia da extração. ....	29
<b>Tabela 6</b> – Teor de compostos fenólicos do cogumelo A3 ( <i>Pleurotus pulmonarius</i> ). Onde H representa as amostras analisadas no mesmo dia da extração. ....	30
<b>Tabela 7</b> - Teor de compostos fenólicos totais do cogumelo A1 ( <i>Pleurotus djamor</i> ). Onde H, A, G e C representam, respectivamente, as amostras analisadas no dia da extração, armazenadas por 24h em temperatura ambiente (25°C), geladeira (5°C) e congelador (-10°C). ....	32
<b>Tabela 8</b> - Teor de compostos fenólicos do cogumelo A2 ( <i>Pleurotus ostreatus</i> ). Onde H, A, G e C representam, respectivamente, as amostras analisadas no dia da extração, armazenadas por 24h em temperatura ambiente (25°C), geladeira (5°C) e congelador (-10°C). ....	33
<b>Tabela 9</b> – Teor de compostos fenólicos do cogumelo A3 ( <i>Pleurotus pulmonarius</i> ). Onde H, A, G e C representam, respectivamente, as amostras analisadas no dia da extração, armazenadas por 24h em temperatura ambiente (25°C), geladeira (5°C) e congelador (-10°C). ....	33
<b>Tabela 10</b> - Valores referentes à análise de captura do radical DPPH. ....	35
<b>Tabela 11</b> - Representação do percentual de captura do radical DPPH em atividade antioxidante. ....	36
<b>Tabela 12</b> - Valores referentes à análise de captura do radical ABTS. ....	38
<b>Tabela 13</b> - Representação do percentual de captura do radical ABTS em atividade antioxidante. ....	38

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>Compostos fenólicos totais</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2</b>	<b>Atividade antioxidante</b> .....	<b>16</b>
<b>3.3</b>	<b>Radiação ultravioleta</b> .....	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>19</b>
<b>4.1</b>	<b>Reagentes e equipamentos</b> .....	<b>19</b>
<b>4.2</b>	<b>Cultivo dos Basidiomicetos e liofilização</b> .....	<b>19</b>
<b>4.3</b>	<b>Delineamento experimental para avaliação da influência das condições de extração e obtenção dos extratos hidroalcoólicos</b> .....	<b>20</b>
<b>4.4</b>	<b>Avaliação das condições de armazenamento sobre a estabilidade química dos compostos fenólicos</b> .....	<b>21</b>
<b>4.5</b>	<b>Quantificação dos compostos fenólicos totais</b> .....	<b>22</b>
<b>4.5.1</b>	<b>Padrão de Ácido Gálico</b> .....	<b>22</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Análise pelo método de Folin-Ciocalteu</b> .....	<b>23</b>
<b>4.6</b>	<b>Atividade antioxidante</b> .....	<b>24</b>
<b>4.6.1</b>	<b>DPPH*</b> .....	<b>24</b>
<b>4.6.2</b>	<b>ABTS*</b> .....	<b>25</b>
<b>4.7</b>	<b>Avaliação da incidência de radiação ultravioleta</b> .....	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>5.1</b>	<b>Cultivo dos cogumelos</b> .....	<b>27</b>
<b>5.2</b>	<b>Análise de compostos fenólicos totais para as condições de extração</b>	<b>29</b>
<b>5.3</b>	<b>Análise das condições de armazenamento e decaimento de compostos fenólicos</b> .....	<b>32</b>
<b>5.4</b>	<b>Atividade antioxidante</b> .....	<b>35</b>
<b>5.5</b>	<b>Influência da incidência de radiação ultravioleta</b> .....	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>41</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Pesquisas realizadas com fungos basidiomicetos tornaram-se frequentes nos últimos anos, principalmente devido ao seu potencial de uso em uma variedade de aplicações biotecnológicas e ambientais, como na produção de enzimas, suplementos alimentares, compostos fisiologicamente ativos e em ações relacionadas à biorremediação (ASATIANI et al., 2008).

Dentre os basidiomicetos, o cultivo do gênero *Pleurotus* aumentou significativamente pelo mundo durante as últimas décadas, de forma que esse é o terceiro gênero mais cultivado. Sua popularidade vem aumentando devido à sua facilidade de cultivo, elevado potencial de rendimento e elevados valores nutricionais e medicinais (UPADHYAY, 2011), bem como à presença de compostos fenólicos em sua matriz.

Os compostos fenólicos podem ser definidos como substâncias dotadas de anéis aromáticos com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável, sendo, portanto, multifuncionais. Já foram identificados milhares de compostos fenólicos, destacando-se dentre eles os flavonóides, os ácidos fenólicos, as cumarinas, os taninos, as ligninas e os tocoferóis (LEE et al, 2005).

Em organismos vivos, o estresse ambiental e vários processos metabólicos geram espécies reativas ou radicais livres, os quais são principalmente espécies reativas de oxigênio, (ROS, do inglês *reactive oxygen species*). Um nível elevado de ROS pode danificar a estrutura de biomoléculas e modificar suas funções, levando à disfunção ou até mesmo à morte celular. O efeito cumulativo de elevada quantidade de ROS pode aumentar o estresse oxidativo em nível sistêmico e é manifestado na forma de uma variedade de problemas de saúde, como o câncer, doenças relacionadas ao envelhecimento e doenças cardiovasculares (GRUNE et al., 2001).

ROS celulares são reguladas pela interação de complexas maquinarias antioxidantes em sistemas vivos. A natureza providenciou aos seres vivos numerosas moléculas antioxidantes. Sabe-se que esses antioxidantes naturais são capazes de minimizar os efeitos adversos de radicais livres. Muitos desses antioxidantes de ocorrência natural foram isolados, caracterizados e agora estão disponíveis a várias

aplicações, sendo ativamente considerados como agentes profiláticos e terapêuticos com possíveis aplicações para contramedidas à radiação (WEISS; LANDAUER, 2003), combate ao câncer e doenças relacionadas ao envelhecimento (HEKIMI; LAPOINTE; WEN, 2011).

Os compostos antioxidantes solúveis em água mais comuns em plantas e alimentos são os compostos fenólicos. Eles são considerados metabólitos secundários e caracterizados por um anel aromático em sua estrutura química, contendo uma ou mais hidroxilas substituintes (BEER et al, 2002). A grande maioria dos antioxidantes encontrados em cogumelos inclui ácidos fenólicos e seus derivados, nomeadamente: ácidos hidroxibenzóicos, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico e ácido gentísico. Compostos fenólicos exibem diversidade estrutural e funcional, podendo ser hidroxilados e metoxilados em várias posições de sua estrutura (PALACIOS et al, 2011).

Os compostos antioxidantes podem ser divididos em duas classes: a dos compostos com atividade enzimática e a dos compostos que não apresentam essa atividade. Na primeira, estão os compostos capazes de inibir a oxidação logo no início, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. Na segunda classe estão moléculas que interagem com as espécies radiculares e são consumidas durante a reação. Nessa classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004). Portanto, avaliações de propriedades antioxidantes de compostos naturais como os compostos fenólicos são muito importantes pelo seu uso na medicina, na indústria alimentícia e farmacêutica (LIU, 2003).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Obtenção de extratos hidroalcoólicos de basidiomicetos e avaliação dos compostos fenólicos totais, das diferentes condições de extração e armazenamento e da atividade antioxidante.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Realizar o cultivo de basidiomicetos, sendo eles das espécies *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor* e *Pleurotus pulmonarius*, para a obtenção de basidiomas;
- Quantificar os compostos fenólicos totais;
- Avaliar a influência das condições de extração, com base em um delineamento experimental da proporção etanol/água e concentração soluto/solvente;
- Avaliar a influência das condições de armazenamento dos extratos sobre os compostos fenólicos, durante um período de 24h;
- Avaliar a influência da incidência de radiação ultravioleta sobre os compostos fenólicos dos extratos;
- Avaliar a atividade antioxidante através dos métodos de DPPH e ABTS.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Na última década, procurou-se encontrar fontes naturais de compostos com atividade antioxidante, como frutas, vegetais, sementes e cogumelos. Antioxidantes são capazes de proteger organismos e suas células contra o dano causado por estresse oxidativo, que pode ser considerado como uma das causas do envelhecimento e do desenvolvimento de doenças. Existe um maior interesse por substâncias inofensivas presentes nessas fontes. Portanto, devido à sua aceitação por consumidores, segurança e independência sazonal, cogumelos comestíveis apresentam elevada importância na obtenção de extratos com atividade antioxidante (CREMADES et al., 2012).

Dentre os cogumelos comestíveis, o gênero *Pleurotus* vêm sendo utilizado por culturas humanas pelo seu valor nutricional, pelas suas propriedades medicinais e por outros efeitos benéficos. Esses cogumelos são uma boa fonte de fibras alimentares e outros nutrientes valiosos. Eles também contêm um número de compostos biologicamente ativos com atividades terapêuticas. Eles podem modular o sistema imunológico, inibindo o crescimento de tumores e inflamação, possuem atividades hipoglicêmicas e antitrombóticas, diminuem a concentração de lipídios no sangue, previnem elevadas pressões sanguíneas e aterosclerose e apresentam atividade antimicrobiana (GUNDE-CIMERMAN, 1999).

Cogumelos são ricos em proteína e, conseqüentemente, em aminoácidos, possuem baixo teor de gordura e contêm quantidades relativamente elevadas de carboidratos e fibras. Além de macronutrientes, os cogumelos também possuem substâncias bioativas como vitaminas e minerais, e exercem propriedades antioxidantes principalmente relacionadas ao seu teor fenólico (KALOGEROPOULOS et al., 2013).

Espécies de cogumelos-ostra do gênero *Pleurotus* são cultivadas em uma escala comercial ao redor do mundo, pois tais espécies provaram ser uma excelente fonte de quase todos os aminoácidos essenciais. Lovastatina, um medicamento derivado de cogumelos do gênero *Pleurotus* que reduz o colesterol, e seus análogos são considerados os melhores agentes terapêuticos para correção de hipercolesterolemia (ENDO, 1988). Extratos do *Pleurotus florida* exibiram uma

elevada atividade inibidora de peroxidação lipídica e de captura de radicais hidroxila. As concentrações de cisteína, metionina e ácido aspártico são maiores na espécie *Pleurotus ostreatus* do que em outros cogumelos comestíveis, como o *Agaricus bisporus* e o *Lentinula edodes* (MATTILA et al, 2002).

### 3.1 Compostos fenólicos totais

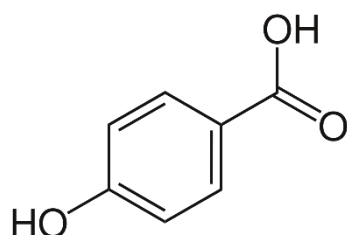
Compostos fenólicos compõem um grupo diverso de moléculas classificadas como metabólitos secundários em plantas. Eles podem ser classificados em compostos solúveis em água (ácidos fenólicos, fenilpropanóides, flavonóides e quinonas) e compostos insolúveis em água (taninos condensados, lignina e ácidos hidroxicinâmicos) (RISPAIL; MORRIS; WEBB, 2005). Compostos fenólicos têm sido considerados os mais importantes e numerosos grupos de compostos do reino Plantae (NACZK; SHAHIDI, 2004). Essas substâncias são sintetizadas durante o desenvolvimento natural da planta, bem como em resposta a diferentes situações, como estresse e radiação ultravioleta, entre outras (NACZK; SHAHIDI, 2004). Compostos fenólicos possuem um anel aromático tendo um ou mais grupos hidroxila e sua estrutura pode variar desde a de uma simples molécula fenólica à de um polímero complexo de elevada massa molecular (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Esses compostos antioxidantes doam um elétron ao radical livre e o convertem a uma molécula inócua (HAMINIUK et al., 2012).

Os compostos fenólicos mais comumente encontrados em cogumelos foram representados na Tabela 1, com concentrações referentes à sua presença no *Pleurotus ostreatus*, e na Figura 1, com suas respectivas estruturas químicas.

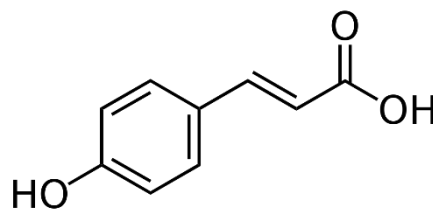
**Tabela 1** - Relação dos compostos fenólicos mais comumente encontrados em cogumelos e suas concentrações previamente relatadas para o *Pleurotus ostreatus* (PALACIOS et al, 2011).

<b>Composto fenólico</b>	<b>Concentração (µg/g amostra seca)</b>
Ácido hidroxibenzóico	4,69 ± 1,59
Ácido cumárico	11,15 ± 0,85
Ácido ferúlico	20,16 ± 0,16
Ácido gálico	290,34 ± 3,61
Ácido gentísico	292,62 ± 3,42

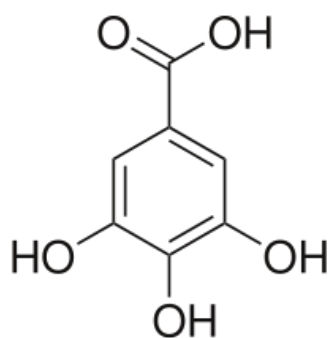
**Figura 1** - Ilustração da estrutura química dos compostos fenólicos mais comumente encontrados em cogumelos.



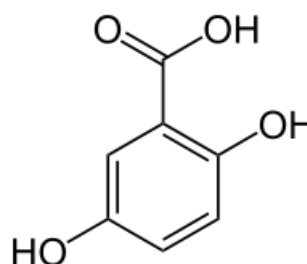
Ácido hidroxibenzóico



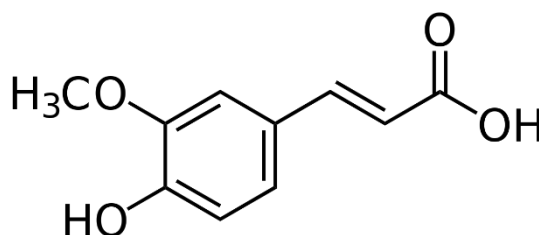
Ácido cumárico



Ácido gálico



Ácido gentísico



Ácido ferúlico

Muitos dos métodos disponíveis para quantificação dos compostos fenólicos totais em produtos alimentícios ou amostras biológicas são baseados na reação dos compostos fenólicos com um agente colorimétrico, que permite mensuração na fração visível do espectro (MAGALHÃES et al., 2006). O teste de Folin-Ciocalteu é um desses métodos e foi proposto como um método padronizado para uso no controle de qualidade rotineiro e mensuração da capacidade antioxidante de produtos e suplementos alimentícios (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Ele se baseia na transferência de elétrons em meio alcalino de compostos fenólicos para complexos de ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico, para formar complexos azuis que são



determinados espectroscopicamente em aproximadamente 760 nm (SINGLETON; ROSSI, 1999).

Sabe-se que os compostos fenólicos são geralmente estáveis e bioativos quando presentes em matrizes de plantas ou cogumelos. Contudo, tornam-se susceptíveis à degradação após serem extraídos, pois são quimicamente instáveis em muitos ambientes de pH neutro ou expostos ao oxigênio (JIA; DUMONT; ORSAT, 2016).

Sabe-se também que diferentes condições de extração podem afetar não somente a quantidade de compostos fenólicos extraídos da matriz, mas também, conseqüentemente, a atividade antioxidante resultante. Publicações recentes confirmaram tal influência das condições de extração para cogumelos do gênero *Pleurotus* (PUMTES et al, 2016).

### **3.2 Atividade antioxidante**

Todo organismo possui sistemas de defesa naturais que agem contra o dano causado por radicais livres, que se torna desequilibrado pelo envelhecimento. Portanto, um suprimento constante de produtos com atividade antioxidante é útil no sentido de ajudar o organismo a reduzir o eventual dano oxidativo (KLAUS et al., 2011).

Antioxidantes sintéticos como hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) e terc-butilhidroquinona (TBHQ) são comumente utilizados na indústria alimentícia. Entretanto, ainda é discutível se esses compostos são completamente seguros para serem utilizados em produtos alimentícios ou não (KONCZAK et al., 2010). Portanto, nos últimos anos, compostos fenólicos naturais têm sido usados como ingredientes funcionais e nutracêuticos e como alternativas a antioxidantes sintéticos na indústria alimentícia (TRUMBECKAITE et al., 2011).

O teste do DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) é frequentemente praticado para se avaliar o potencial de captura de radicais livres de uma molécula antioxidante e é considerado um dos métodos colorimétricos padrão para a avaliação de propriedades antioxidantes de compostos puros. Embora esse radical apresente semelhanças

limitadas em relação aos radicais peróxido ( $\text{ROO}^\bullet$ ), esse teste é comumente utilizado para analisar o conteúdo antioxidante de grão de trigo e farelo, vegetais, ácidos linoleicos conjugados, ervas, óleo de sementes comestíveis e farinhas, por exemplo, em diferentes sistemas de solução, incluindo etanol, acetona aquosa, metanol e benzeno (CHENG; MOORE; YU, 2006). O DPPH é um radical estável em solução e apresenta coloração roxa, absorvendo em 515 nm quando em metanol. Esse teste é baseado no princípio que o DPPH aceita um átomo de hidrogênio da molécula antioxidante, resultando na redução do DPPH a  $\text{DPPH}_2$ , quando a coloração roxa muda para amarelo com um decréscimo na absorvância em 515 nm. A mudança de coloração é monitorada espectrofotometricamente e é utilizada para a determinação de parâmetros para propriedades antioxidantes (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012).

A reação de um antioxidante com o radical  $\text{DPPH}^\bullet$  ocorre segundo a Reação 1:



Onde AH representa o antioxidante.

Outro método colorimétrico amplamente utilizado é o do ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)], no qual uma molécula incolor, o ABTS reduzido, é oxidado a  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , de coloração azul-esverdeada. Quando o  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  colorido é misturado com qualquer substância que pode ser oxidada, ele é reduzido a sua forma incolor original; em contraste, a substância que reagiu é oxidada. Essa característica é o princípio básico dos métodos que utilizam ABTS. No primeiro teste de colorimetria desenvolvido baseado em ABTS, metamioglobina era reagida com peróxido de hidrogênio para produzir o radical ferrilmetamioglobina. Esse radical então oxidava a molécula de ABTS a  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  e a coloração característica se desenvolvia (EREL, 2004). Sabe-se que antioxidantes podem suprimir o desenvolvimento de coloração (MILLER, 1993).

No teste com ABTS, essa molécula é convertida ao seu cátion radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  pela adição de persulfato de sódio. Esse cátion azul-esverdeado absorve luz em 734 nm, sendo reativo em relação à grande maioria dos antioxidantes. Após reagir com antioxidantes, o radical é convertido de volta para sua forma neutra e incolor, o que

pode ser monitorado espectrofotometricamente (MARTYSIAK-ZUROWSKA; WENTA, 2012).

### **3.3 Radiação ultravioleta**

Nas últimas décadas, a radiação ultravioleta (UV) aumentou em intensidade sobre a superfície da Terra, devido à depleção do ozônio estratosférico (MANNEY et al, 1994). Como a radiação UV pode causar danos biológicos e consequentes mudanças na flora e fauna, ela tem recebido mais atenção dos cientistas (BERTAGNOLLI et al, 2007).

Para se analisar a capacidade da radiação UV de causar dano celular, ela foi dividida em UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (200-290 nm). Os comprimentos de onda da radiação que incluem a UVA e a UVB também são chamados de UV solar (DIFFEY, 2002). A quantidade total de radiação UV que alcança a superfície da Terra é composta por aproximadamente 95% de UVA e menos de 5% de UVB, enquanto que a UVC é completamente bloqueada pela camada de ozônio (PALANCAR; TOSELLI, 2004).

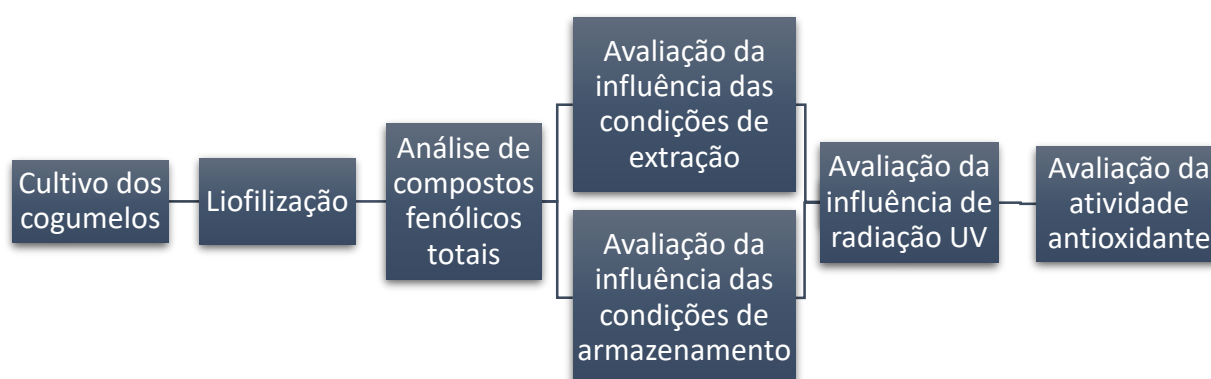
Estudos recentes indicam que tratamentos que fazem uso de radiação ultravioleta de ondas curtas (UV-C, 100-280 nm) podem aumentar os níveis de compostos fenólicos totais, bem como a atividade antioxidante de diferentes frutas e vegetais armazenados (ERKAN; WANG; WANG, 2008). Tratamentos com UV-C podem aumentar os níveis de compostos fenólicos e flavonóides de frutas cítricas após determinado tempo, porém podem vir a causar efeitos opostos em casos de exposição prolongada, mesmo sob condições de refrigeração (SHEN et al, 2013).

Lâmpadas especiais que emitem luz UV com comprimento de onda entre 230 e 270 nm são utilizadas para reduzir o número de microrganismos no ar, em superfícies de salas cirúrgicas e em salas assépticas onde produtos esterilizados são distribuídos em garrafas ou ampolas estéreis. O vidro normal é parcialmente transparente aos raios ultravioletas, deixando passar 90% da luz acima dos 350 nm. Contudo, o mesmo vidro bloqueia 90% da luz abaixo dos 300 nm (PELCZAR; CHAN, 1977).

## 4 METODOLOGIA

A metodologia se deu segundo o fluxograma representado pela Figura 2:

**Figura 2** – Fluxograma referente às etapas que foram empregadas na metodologia adotada para a realização deste trabalho.



### 4.1 Reagentes e equipamentos

Para a realização deste projeto, utilizou-se os seguintes equipamentos: centrífuga Q-222-T28 (Quimis); Incubadora Shaker SL 222 (Solab); Espectrofotômetro UV-Vis, UV-M51 (BEL Photonics); ácido gálico monoidratado puríssimo (Vetec); carbonato de sódio P.A. anidro (Alphatec); ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (“Trolox”, Sigma-Aldrich); 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (“DPPH”, Sigma-Aldrich); 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (“ABTS”, Sigma-Aldrich).

### 4.2 Cultivo dos Basidiomicetos e liofilização

Os fungos das espécies *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus djamor* e *Pleurotus ostreatus* foram obtidos através da compra de kits comerciais (Cogoo, Cogubras) e

cultivados, de modo que desenvolveram basidiomas após 8 dias. Os cogumelos foram colhidos e liofilizados para remover o conteúdo de água, mantendo a matriz intacta e preservada em estado sólido. O material foi moído com o auxílio de almofariz e pistilo até resultar em um pó fino, que por sua vez foi utilizado para a realização das análises.

#### 4.3 Delineamento experimental para avaliação da influência das condições de extração e obtenção dos extratos hidroalcoólicos

Nesta etapa de otimização, para se estudar a influência sobre a quantificação de compostos fenólicos, realizou-se a obtenção dos extratos dentro dos seguintes parâmetros (fatores): proporção de etanol e água na solução de extração (V/V) e razão massa de analito/solução de extração (mg/mL). Os níveis de cada fator são apresentados na Tabela 2. Foi utilizado um delineamento fatorial 3x2 com 3 pontos centrais (Tabela 3).

**Tabela 2** - Fatores e níveis selecionados para a otimização das condições de extração dos compostos bioativos.

Parâmetros (fatores)		Níveis		
		-1	0	1
Proporção de etanol e água na solução de extração (%)	A	60:40	40:60	20:80
Razão massa/solução de extração (mg/mL)	B	8/1	4/1	2/1

**Tabela 3** – Matriz do delineamento experimental.

Experimentos	A	B
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1	0
6	1	0
7	0	-1
8	0	1
9	0	0
10	0	0
11	0	0

O material liofilizado foi pesado em erlenmeyer de 50 mL, ao qual adicionou-se as quantidades respectivas de etanol e água ultrapura, conforme a bateria de testes detalhada nas Tabelas 1 e 2, para um volume reacional de 20 mL. A obtenção do extrato hidroalcoólico propriamente dito se deu em um equipamento shaker, sob 130 rotações por minuto e controle de temperatura definido em 25°C, durante 2 horas. Após o tempo de extração, as soluções resultantes foram centrifugadas a 7000 rpm durante 15 segundos, de maneira que apenas o sobrenadante foi utilizado para as análises de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.

#### **4.4 Avaliação das condições de armazenamento sobre a estabilidade química dos compostos fenólicos**

Estudou-se a influência das condições de armazenamento de extratos brutos sobre a estabilidade química dos compostos fenólicos presentes nos mesmos, ou sua *shelf life*. Para isso, após a obtenção dos extratos hidroalcoólicos, quatro frações de 2 mL do extrato bruto foram separadas. A primeira fração foi utilizada para se realizar a quantificação dos compostos fenólicos no mesmo dia; a segunda, a terceira e a quarta fração foram armazenadas em temperatura ambiente, geladeira e congelamento a -10°C, respectivamente, por 24 horas. Após o tempo mencionado, as amostras armazenadas foram submetidas à quantificação de compostos fenólicos totais. Os extratos armazenados em geladeira e congelador foram deixados em repouso à temperatura ambiente de aproximadamente 25°C durante 30 minutos antes de serem submetidos à quantificação de compostos fenólicos totais pelo método original previamente descrito (SINGLETON; ROSSI, 1965).

## 4.5 Quantificação dos compostos fenólicos totais

### 4.5.1 Padrão de Ácido Gálico

As soluções analíticas utilizadas nesta metodologia foram preparadas com base nas informações providenciadas em seu artigo de origem (SINGLETON; ROSSI, 1965).

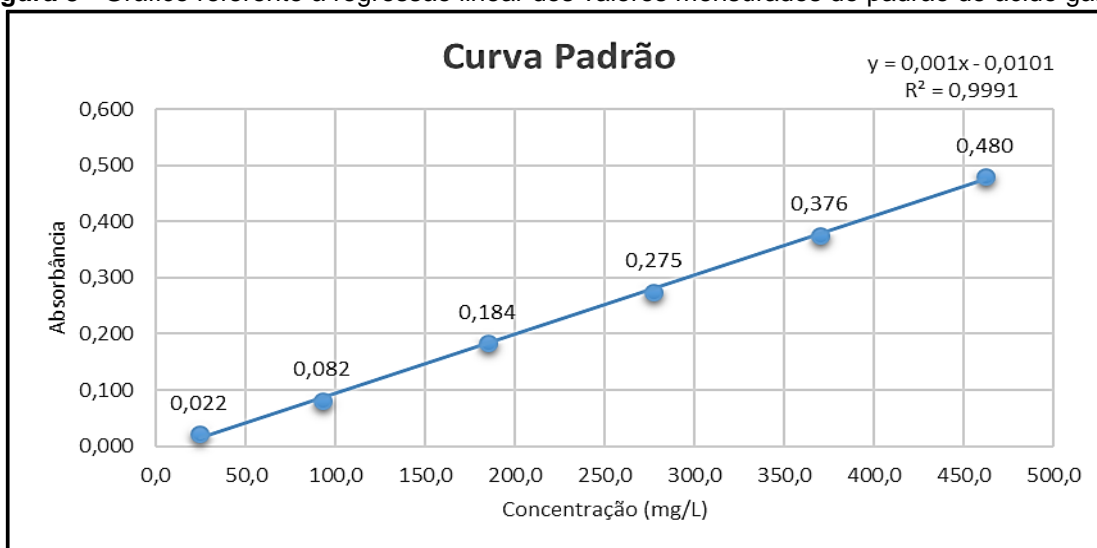
Primeiramente preparou-se uma solução de carbonato de sódio a 15% (m/V), pesando-se 150 g de carbonato de sódio anidro e adicionando-se tal medida a um béquer de 1 L contendo 400 mL de água ultrapura. Agitou-se e homogeneizou-se a solução com o auxílio de um micro-ondas, de forma que a solução foi submetida a aquecimento intermitente até que o carbonato de sódio fosse completamente solubilizado. A solução foi então deixada em repouso, em temperatura ambiente, por duas horas. Posteriormente, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 1 L e completada com água ultrapura, sendo deixada em geladeira por 24 horas. Após esse período de tempo, a solução foi filtrada e o sobrenadante armazenado para uso.

Ácido Gálico em concentrações de 24,2 a 462 mg/L foi utilizado como padrão para gerar a curva de calibração. Preparou-se a solução-mãe de ácido gálico através da dissolução de 500 mg de ácido gálico monoidratado em um béquer de 100 mL contendo 80 mL de água ultrapura. Para tal, se fez uso de um agitador com barra magnética. A solução homogeneizada foi então transferida para um balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água ultrapura.

A partir da solução-mãe de ácido gálico, preparou-se diluições utilizando-se 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 400  $\mu$ L, 600  $\mu$ L, 800  $\mu$ L e 1000  $\mu$ L da solução-mãe para 10 mL em balões volumétricos, completados com água ultrapura. Com isso, obteve-se soluções do padrão nas concentrações de 24,2 mg/L, 92,4 mg/L, 184,8 mg/L, 277,2 mg/L, 396,6 mg/L e 462,0 mg/L respectivamente.

A curva-padrão resultante de ácido gálico que foi utilizada para a análise de compostos fenólicos totais é representada pelo gráfico da Figura 3, tendo apresentado um fator de correlação de 0,9991.

**Figura 3** - Gráfico referente à regressão linear dos valores mensurados do padrão de ácido gálico.



#### 4.5.2 Análise pelo método de Folin-Ciocalteu

Os compostos fenólicos totais foram quantificados pela submissão dos extratos centrifugados ao teste de Folin-Ciocalteu, como previamente descrito (SINGLETON; ROSSI, 1965). Brevemente, 100  $\mu$ L de extrato ou do padrão de ácido gálico foram adicionados a um tubo de ensaio contendo 7,4 mL de água ultrapura, seguidos de 500  $\mu$ L do reagente de Folin-Ciocalteu. O tubo permaneceu em repouso por 3 minutos e, em seguida, adicionou-se 2 mL da solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , de forma que a solução resultante foi armazenada no escuro à temperatura ambiente por 120 minutos, para desenvolvimento de cor. Após esse período de tempo, a absorbância da solução foi mensurada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 765 nm.

A equação da reta da regressão linear da curva-padrão de ácido gálico foi utilizada para se calcular o valor referente à concentração de compostos fenólicos no extrato analisado, em mg/L. A partir da concentração, calculou-se a massa de compostos fenólicos presente no extrato, em mg/g de basidioma. O teor de compostos fenólicos resultante foi calculado através da fórmula representada pela Equação 2.

$$\% \text{ de fenólicos} = \left[ \frac{m_{20\text{mL}}}{m_i} \right] * 100\% \quad (2)$$



Onde  $m_{20\text{mL}}$  representa a massa de compostos fenólicos do extrato de 20 mL e  $m_i$  representa a massa seca de material liofilizado utilizado no início da análise.

## 4.6 Atividade antioxidante

As amostras selecionadas para ter sua atividade antioxidante avaliada foram aquelas cuja quantidade de compostos fenólicos foi a maior dentre os resultados do delineamento experimental, para cada cogumelo. A análise se deu por dois métodos previamente descritos: o que faz uso da captura do radical DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995) e o que faz uso da captura do radical ABTS (RE et al., 1999).

### 4.6.1 DPPH•

O método para quantificação de DPPH• consistiu no que foi previamente descrito (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Primeiramente, houve o preparo da solução de DPPH• 0,06 mM em metanol e, posteriormente, a adição de 500  $\mu\text{L}$  de extrato a tubos contendo uma solução de 2,75 mL de etanol e 1,75 mL da solução de DPPH•. A mistura foi então deixada para repousar no escuro durante 2 horas e posteriormente teve sua absorbância mensurada em 515 nm. Álcool etílico a 40% foi utilizado como branco e o controle negativo consistiu em uma solução de 2,75 mL de etanol e 1,75 de DPPH• adicionada de 500  $\mu\text{L}$  de etanol. A atividade antioxidante foi calculada de acordo com a captura do radical DPPH•, através da equação 3:

$$\% \text{ de captura} = \left[ \frac{(A_{\text{CONTROLE}} - A_{\text{AMOSTRA}})}{A_{\text{CONTROLE}}} \right] * 100\% \quad (3)$$

Onde  $A_{\text{CONTROLE}}$  é a absorvância do controle negativo e  $A_{\text{AMOSTRA}}$  é a absorvância da amostra.

#### 4.6.2 ABTS•

O método de ABTS consistiu no que foi previamente descrito (RE et al, 1999). Primeiramente, houve o preparo da solução de ABTS 7 mM pela dissolução de 48 mg de ABTS em água ultrapura para 12,5 mL, seguido do preparo da solução de persulfato de potássio 2,45 mM pela dissolução de 8 mg em água ultrapura para 12,5 mL. O preparo do cátion-radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  se deu pela reação de ambas as soluções preparadas, ou seja, 12,5 mL da solução de ABTS com 12,5 mL da solução de persulfato de potássio. A mistura foi então deixada em repouso, à temperatura ambiente, por aproximadamente 24 horas. Após esse período, 1 mL dessa mistura foi diluído em etanol até se obter uma absorvância, em 734 nm, de aproximadamente  $0,700 \pm 0,050$  nm. Posteriormente à estabilização do valor de absorvância da solução diluída, adicionou-se 300  $\mu\text{L}$  de extrato a 5,7 mL da solução de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  em tubos de ensaio. Logo em seguida da adição do extrato, a mistura teve sua absorvância mensurada em 734 nm, considerando-se o valor final estável após aproximadamente 6 minutos. A solução de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  serviu como branco e Trolox<sup>®</sup> foi novamente empregado como padrão analítico. A atividade antioxidante foi calculada de acordo com a captura do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , através da equação 4:

$$\% \text{ de captura} = \left[ \frac{(A_{\text{ABTS}} - A_{\text{AMOSTRA}})}{A_{\text{ABTS}}} \right] * 100\% \quad (4)$$

Onde  $A_{\text{ABTS}}$  é a absorvância da solução diluída de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  e  $A_{\text{AMOSTRA}}$  é a absorvância da amostra.

#### **4.7 Avaliação da incidência de radiação ultravioleta**

Novos extratos hidroalcoólicos dos três cogumelos foram obtidos, a partir do material liofilizado, utilizando-se as condições de extração que apresentaram o menor índice de decaimento de compostos fenólicos com o tempo.

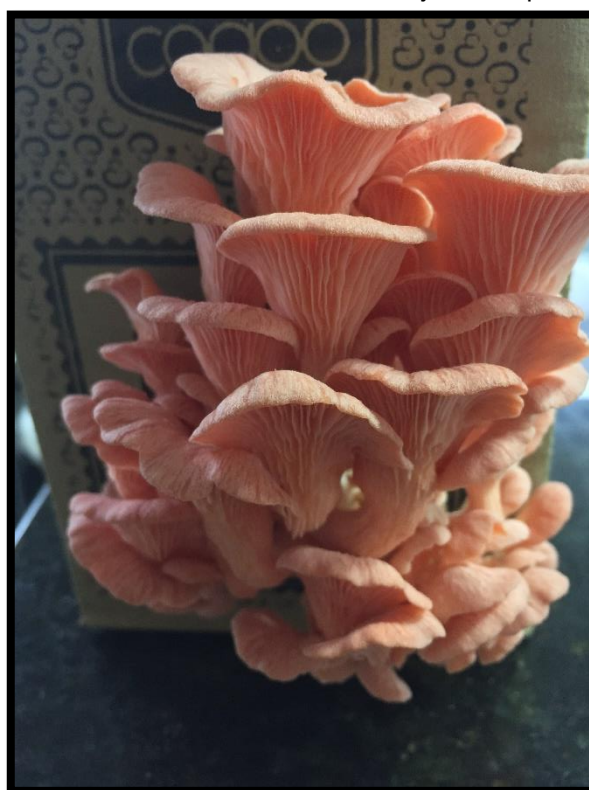
Os extratos, após a etapa de centrifugação, tiveram uma fração transferida para tubos de ensaio com tampa e posicionados diagonalmente em uma câmara de fluxo laminar, sendo então irradiados por uma lâmpada de UVC posicionada a 30 cm das amostras, que emitiu radiação de comprimento de onda entre 230 e 270 nm, durante um período de 30 minutos. Após esse período de tempo, os extratos foram submetidos à análise de compostos fenólicos totais. A outra fração dos extratos centrifugados foi deixada em repouso, no escuro, durante o período de irradiação dos primeiros, sendo estes também submetidos à análise de compostos fenólicos totais.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Cultivo dos cogumelos

Os kits de cultivo adquiridos da Cogubras proporcionaram o crescimento de basidiomas em quantidades excelentes. Preferiu-se cultivar os cogumelos para se evitar potenciais sujidades nas amostras provenientes de embalagens encontradas no mercado. Dessa forma, o material que originou as amostras para serem analisadas estava livre de contaminantes e originava da mesma cepa. Os cogumelos em seus respectivos kits são representados pelas Figuras 4, 5 e 6:

**Figura 4** – Fotografia do kit de cultivo do *Pleurotus djamor* depois de 8 dias de cultivo.



**Figura 5** – Fotografia do kit de cultivo do *Pleurotus ostreatus* depois de 8 dias de cultivo.



**Figura 6** – Fotografia do kit de cultivo do *Pleurotus pulmonarius* depois de 8 dias de cultivo.



## 5.2 Análise de compostos fenólicos totais para as condições de extração

Os valores referentes ao teor de compostos fenólicos totais foram representados como “mg equivalentes de ácido gálico por g de amostra seca” e são mostrados nas Tabelas 4, 5 e 6.

**Tabela 4** - Teor de compostos fenólicos totais do cogumelo A1 (*Pleurotus djamor*). Onde H representa as amostras analisadas no mesmo dia da extração.

<b>A1</b>	<b>Compostos Fenólicos Totais (mg EAG/g amostra)</b>
<b>Condição</b>	<b>(H)</b>
Etanol 60%, 8/1 mg/mL	8,59
Etanol 20%, 8/1 mg/mL	12,12
Etanol 60%, 2/1 mg/mL	12,27
Etanol 20%, 2/1 mg/mL	14,57
Etanol 60%, 4/1 mg/mL	9,09
Etanol 20%, 4/1 mg/mL	13,91
Etanol 40%, 8/1 mg/mL	9,36
Etanol 40%, 2/1 mg/mL	16,25
Etanol 40%, 4/1 mg/mL	11,08
Etanol 40%, 4/1 mg/mL	11,08
Etanol 40%, 4/1 mg/mL	11,22

**Tabela 5** - Teor de compostos fenólicos do cogumelo A2 (*Pleurotus ostreatus*). Onde H representa as amostras analisadas no mesmo dia da extração.

<b>A2</b>	<b>Compostos Fenólicos Totais (mg EAG/g amostra)</b>
<b>Condição</b>	<b>(H)</b>
Etanol 60%, 8/1 mg/mL	12,36
Etanol 20%, 8/1 mg/mL	14,88
Etanol 60%, 2/1 mg/mL	16,25
Etanol 20%, 2/1 mg/mL	18,62
Etanol 60%, 4/1 mg/mL	12,81
Etanol 20%, 4/1 mg/mL	17,18
Etanol 40%, 8/1 mg/mL	16,67
Etanol 40%, 2/1 mg/mL	23,40
Etanol 40%, 4/1 mg/mL	14,32
Etanol 40%, 4/1 mg/mL	13,67
Etanol 40%, 4/1 mg/mL	14,56

**Tabela 6** – Teor de compostos fenólicos do cogumelo A3 (*Pleurotus pulmonarius*). Onde H representa as amostras analisadas no mesmo dia da extração.

A3	Compostos Fenólicos Totais (mg EAG/g amostra)
Condição	(H)
Etanol 60%, 8/1 mg/mL	7,76
Etanol 20%, 8/1 mg/mL	12,84
Etanol 60%, 2/1 mg/mL	9,34
Etanol 20%, 2/1 mg/mL	13,87
Etanol 60%, 4/1 mg/mL	8,47
Etanol 20%, 4/1 mg/mL	12,97
Etanol 40%, 8/1 mg/mL	10,31
Etanol 40%, 2/1 mg/mL	15,69
Etanol 40%, 4/1 mg/mL	9,79
Etanol 40%, 4/1 mg/mL	9,67
Etanol 40%, 4/1 mg/mL	9,92

Em relação aos três cogumelos – *Pleurotus djamor*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius* – a condição de extração que propiciou a obtenção de uma maior quantidade de compostos fenólicos foi a de número 8 – mais especificamente, a condição em que foi utilizada uma solução de etanol a 40% e uma proporção entre massa de cogumelo e solvente de 2:1. A condição que resultou na obtenção de uma menor quantidade de compostos fenólicos foi a de número 1 – mais especificamente, a condição em que foi utilizada uma solução de etanol a 60% e uma proporção entre massa e solvente de 8:1.

A condição 8 proporcionou a extração de 16,25, 23,40 e 15,69 mg EAG/g de amostra seca de compostos fenólicos da matriz liofilizada dos cogumelos *Pleurotus djamor*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius*, respectivamente. A condição 1, por outro lado, proporcionou a extração de apenas 8,59, 12,36 e 7,76 mg EAG/g de amostra seca para os cogumelos *Pleurotus djamor*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius*, respectivamente.

Usualmente, quando se extrai compostos bioativos de espécies comestíveis de cogumelos, como as do gênero *Pleurotus*, se faz uso de solventes alcoólicos como o metanol ou o etanol; soluções hidroalcoólicas compostas por determinada proporção entre álcool e água; soluções aquosas de acetona; soluções de etanol e acetato de etila; ou até mesmo sistemas triplos como o de acetona, metanol e água (CHISTÉ, 2011). As soluções hidroalcoólicas baseadas em etanol possuem normalmente 40%

de seu volume composto pelo álcool, e 60% por água. Isso se deve ao fato de que essa proporção permite uma melhor extração dos compostos fenólicos presentes em matrizes e, conseqüentemente, uma atividade antioxidante evidentemente maior (SOUZA-SARTORI et al, 2012).

Estudos feitos sobre a influência de diferentes proporções de etanol e água, pH e até mesmo temperatura durante a extração dos compostos bioativos provam que existe uma condição específica que favorece, geralmente, sua obtenção. Diferentes espécies e gêneros, contudo, podem demonstrar variações pequenas no grau de extração, devido a diferenças em suas matrizes (SOUZA-SARTORI et al, 2012).

Sabe-se também que o teor de compostos bioativos em um cogumelo pode variar em relação às diferentes estruturas que podem ser analisadas. Estudos sugerem que quantidades maiores de compostos fenólicos são produzidas pelo corpo de frutificação, seguido pelo estipe, seguido pelas hifas (GONZÁLEZ-PALMA et al, 2016).

Comparando-se os valores resultantes para os compostos fenólicos totais do *Pleurotus ostreatus* (valor mínimo de 12,36 e valor máximo de 23,40 mg EAG/g amostra seca) com valores encontrados na literatura científica disponível (3,63 mg EAG/g amostra seca, VIEIRA et al, 2013), percebe-se que extratos aquosos ou alcoólicos do cogumelo promovem a obtenção de uma quantidade menor de compostos bioativos, em relação a extratos hidroalcoólicos.

Contudo, extratos exclusivamente alcoólicos podem proporcionar a obtenção de quantidades semelhantes de compostos fenólicos às observadas neste trabalho, para outras espécies de cogumelo. Por exemplo, a obtenção de compostos bioativos de cogumelos das espécies *Lactarius deliciosus*, *Lactarius sanguifluus*, *Lactarius semisanguifluus*, *Russula delica* e *Suillus bellinii*, realizada com apenas metanol, foi quantificada para valores entre 8 e 12 mg EAG/g amostra (KALOGEROPOULOS et al, 2013).

Considerando-se a espécie *Pleurotus flabellatus*, sendo ela uma espécie diferente, mas pertencente ao mesmo gênero das avaliadas neste trabalho, nota-se uma quantidade significativamente menor de compostos fenólicos extraídos em solução hidroalcoólica. Comparativamente ao *Pleurotus pulmonarius*, os valores resultantes da quantificação de compostos fenólicos totais foram, em média, aproximadamente 5 vezes menores (PUMTES et al, 2016).



A forma de tratamento adotada para as amostras iniciais dos cogumelos pode influenciar diretamente os valores resultantes de análises de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. Sabe-se que compostos fenólicos podem tornar-se instáveis quando aquecidos, e considerando-se a frequência com a qual cogumelos são secos em estufa, a temperaturas que variam entre 30°C e 60°C, conclui-se que um procedimento criogênico para obtenção de amostras é uma opção melhor (FERNANDES et al, 2014).

### 5.3 Análise das condições de armazenamento e decaimento de compostos fenólicos

Os valores referentes ao teor de compostos fenólicos totais foram representados como “mg equivalentes de ácido gálico por g de amostra seca” e são mostrados nas Tabelas 7, 8 e 9.

**Tabela 7** - Teor de compostos fenólicos totais do cogumelo A1 (*Pleurotus djamor*). Onde H, A, G e C representam, respectivamente, as amostras analisadas no dia da extração, armazenadas por 24h em temperatura ambiente (25°C), geladeira (5°C) e congelador (-10°C).

A1 Condição	Compostos Fenólicos Totais (mg EAG/g amostra)			Decaimento dos compostos (%) (em relação a H)		
	(A)	(G)	(C)			
Etanol 60%, 8/1 mg/mL	8,47	8,47	8,59	1,39	1,39	0,00
Etanol 20%, 8/1 mg/mL	12,12	12,12	12,12	0,00	0,00	0,00
Etanol 60%, 2/1 mg/mL	12,27	12,27	12,27	0,00	0,00	0,00
Etanol 20%, 2/1 mg/mL	14,57	14,57	14,57	0,00	0,00	0,00
Etanol 60%, 4/1 mg/mL	8,39	8,16	8,62	7,67	10,23	5,12
Etanol 20%, 4/1 mg/mL	13,91	13,67	13,67	0,00	1,69	1,69
Etanol 40%, 8/1 mg/mL	9,00	8,88	9,24	3,84	5,12	1,28
Etanol 40%, 2/1 mg/mL	15,77	15,77	16,25	2,93	2,93	0,00
Etanol 40%, 4/1 mg/mL	10,38	11,08	11,08	6,37	0,00	0,00
Etanol 40%, 4/1 mg/mL	10,14	11,08	11,08	8,49	0,00	0,00
Etanol 40%, 4/1 mg/mL	10,51	11,22	11,22	6,37	0,00	0,00

**Tabela 8** - Teor de compostos fenólicos do cogumelo A2 (*Pleurotus ostreatus*). Onde H, A, G e C representam, respectivamente, as amostras analisadas no dia da extração, armazenadas por 24h em temperatura ambiente (25°C), geladeira (5°C) e congelador (-10°C).

A2 Condição	Compostos Fenólicos Totais (mg EAG/g amostra)			Decaimento dos compostos (%) (em relação a H)		
	(A)	(G)	(C)			
Etanol 60%, 8/1 mg/mL	5,89	6,37	6,13	52,38	48,50	50,44
Etanol 20%, 8/1 mg/mL	8,28	7,92	8,04	44,32	46,74	45,93
Etanol 60%, 2/1 mg/mL	7,20	7,20	7,67	55,72	55,72	52,79
Etanol 20%, 2/1 mg/mL	11,29	9,82	9,82	39,37	47,24	47,24
Etanol 60%, 4/1 mg/mL	7,00	7,69	7,23	45,37	39,93	43,56
Etanol 20%, 4/1 mg/mL	10,27	10,03	10,98	40,22	41,61	36,06
Etanol 40%, 8/1 mg/mL	8,52	8,64	8,64	48,89	48,17	48,17
Etanol 40%, 2/1 mg/mL	10,53	9,10	10,05	54,99	61,10	57,03
Etanol 40%, 4/1 mg/mL	5,50	7,17	6,69	61,56	49,92	53,24
Etanol 40%, 4/1 mg/mL	5,20	6,61	6,14	61,96	51,64	55,08
Etanol 40%, 4/1 mg/mL	5,50	7,41	6,93	62,19	49,10	52,37

**Tabela 9** – Teor de compostos fenólicos do cogumelo A3 (*Pleurotus pulmonarius*). Onde H, A, G e C representam, respectivamente, as amostras analisadas no dia da extração, armazenadas por 24h em temperatura ambiente (25°C), geladeira (5°C) e congelador (-10°C).

A3 Condição	Compostos Fenólicos Totais (mg EAG/g amostra)			Decaimento dos compostos (%) (em relação a H)		
	(A)	(G)	(C)			
Etanol 60%, 8/1 mg/mL	7,28	7,52	7,40	6,14	3,07	4,61
Etanol 20%, 8/1 mg/mL	12,00	12,48	12,12	6,54	2,80	5,60
Etanol 60%, 2/1 mg/mL	8,88	9,34	9,34	4,98	0,00	0,00
Etanol 20%, 2/1 mg/mL	12,91	13,87	13,39	6,87	0,00	3,44
Etanol 60%, 4/1 mg/mL	7,99	8,23	8,47	5,70	2,85	0,00
Etanol 20%, 4/1 mg/mL	12,97	12,02	12,73	0,00	7,26	1,81
Etanol 40%, 8/1 mg/mL	8,89	9,84	9,60	13,78	4,59	6,89
Etanol 40%, 2/1 mg/mL	14,71	13,24	14,22	6,23	15,58	9,35
Etanol 40%, 4/1 mg/mL	9,79	9,79	9,79	0,00	0,00	0,00
Etanol 40%, 4/1 mg/mL	9,67	9,20	9,67	0,00	4,87	0,00
Etanol 40%, 4/1 mg/mL	9,92	9,19	9,92	0,00	7,30	0,00

Em relação à análise das condições de armazenamento, onde o extrato dos cogumelos permaneceu por 24h sob temperatura ambiente (25°C), na geladeira (5°C) ou em congelador (-10°C), os valores de decaimento variaram entre 10,23% e 62,19% do teor original. Os compostos fenólicos demonstraram um maior nível de decaimento na condição 5 (etanol 60%, 4 mg/mL) para o cogumelo *Pleurotus djamor*, com uma variação de 10,23% do teor original para armazenamento em geladeira; na condição 11 (etanol 40%, 4 mg/mL) para o cogumelo *Pleurotus ostreatus*, com uma variação de

62,19% do teor original para armazenamento em temperatura ambiente; e na condição 8 (etanol 40%, 2 mg/mL) para o cogumelo *Pleurotus pulmonarius*, com uma variação de 15,58% do teor original para armazenamento em geladeira. Os extratos armazenados em congelador, a -10°C, não apresentaram mudança para o estado sólido depois de 24h. Isso se deve à presença de etanol nos extratos, que causou uma diminuição no ponto de fusão dos extratos, visto que o ponto de fusão do etanol puro é de aproximadamente -114°C.

Durante armazenagem, compostos fenólicos menos estáveis passam por mudanças químicas para formar compostos mais estáveis, o que tipicamente envolve reações de polimerização e de degradação para ácidos hidroxibenzoicos. A exemplo das antocianinas presentes em frutas e sucos, devido à degradação, o brilho e a cor originais acabam se distorcendo com o tempo por conta da formação de compostos poliméricos diferentes (WILKES et al, 2014).

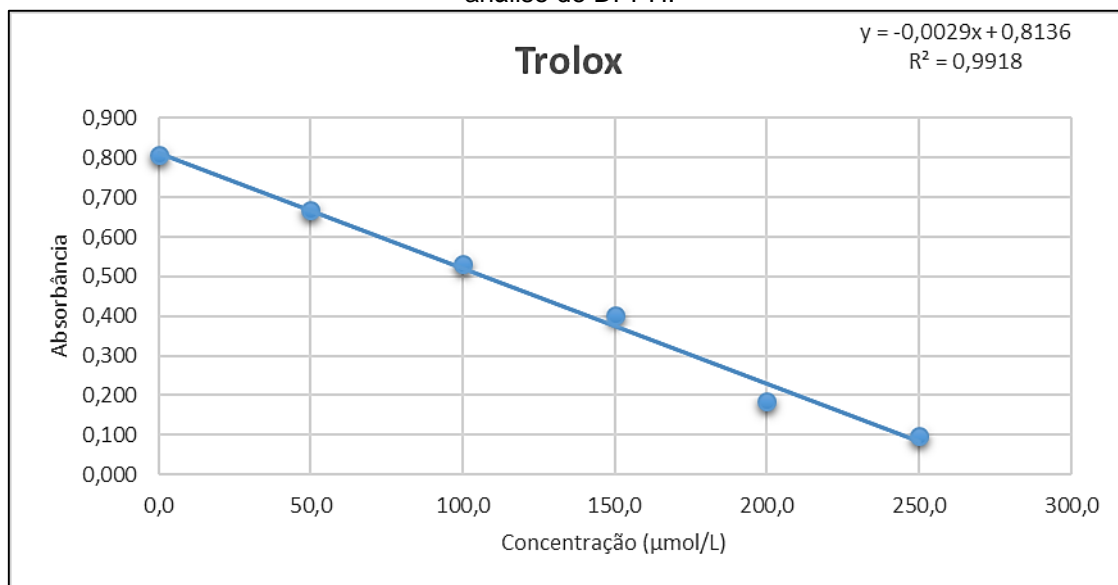
Outras mudanças podem ocorrer durante o armazenamento de extratos, como a conversão de derivados de baixo peso molecular do flavan-3-ol para taninas de elevados peso molecular, a hidrólise de glicosídeos flavonóides a agliconas correspondentes e o aumento de ácidos fenólicos. Como consequência principal, essas reações causam uma redução na concentração dos compostos fenólicos, o que pode ser considerada uma conclusão lógica para quando vários compostos de baixo peso molecular se fundem para formar um só composto, mais estável, de elevado peso molecular (MÄKILÄ et al, 2016).

Comparando-se as três diferentes condições de armazenamento, o congelamento das amostras a -10°C promoveu, em geral, uma melhor conservação dos compostos fenólicos para os extratos dos três cogumelos. Armazenar os extratos em congelador permitiu um decaimento nulo para 8 condições de extração em relação ao *Pleurotus djamor* e 5 condições de extração em relação ao *Pleurotus pulmonarius*. Os extratos do *Pleurotus ostreatus* não apresentaram decaimento nulo em qualquer condição, sendo o menor valor de decaimento para este cogumelo o de 36,06% de compostos fenólicos, para a condição 6 (etanol 20%, 4 mg/mL).

## 5.4 Atividade antioxidante

A curva-padrão resultante de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) é representada pelo gráfico da Figura 7, tendo apresentado um fator de correlação de 0,9918.

**Figura 7** - Gráfico referente à regressão linear dos valores mensurados do padrão de Trolox para a análise de DPPH.



A atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos foi analisada através da captura dos radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•</sup>. Para ambas as análises, a extração inicial do composto liofilizado foi realizada na condição de número 8 (etanol 40%, 2 mg/mL), conforme os melhores resultados da quantificação de compostos fenólicos.

Em relação à análise pelo radical DPPH, os cogumelos *Pleurotus djamor*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius* apresentaram, respectivamente, porcentagens de captura do radical de 23%, 28% e 24%. Os valores referentes à absorbância e à porcentagem de captura do radical DPPH, devido à atividade antioxidante dos extratos, são representados pela Tabela 10:

**Tabela 10** - Valores referentes à análise de captura do radical DPPH.

Cogumelo	% de captura do radical
<i>Pleurotus djamor</i>	23
<i>Pleurotus ostreatus</i>	28
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	24

Os valores referentes à atividade antioxidante também foram calculados em relação ao padrão de Trolox, conforme convencionado pela comunidade científica. Os valores foram representados como “ $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox por g de amostra seca”, sendo apresentados na Tabela 11. A concentração equivalente de Trolox no extrato foi calculada com base na equação da reta da regressão linear da curva-padrão.

**Tabela 11** - Representação do percentual de captura do radical DPPH em atividade antioxidante.

DPPH	Concentração no extrato	Atividade Antioxidante	
Cogumelo	(mmol ET/L)	( $\mu\text{mol ET/g amostra}$ )	( $\mu\text{g ET/g amostra}$ )
<i>Pleurotus djamor</i>	0,026	13,03	3,26
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,043	21,48	5,38
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	0,029	14,76	3,69

A análise de captura do radical DPPH é considerada como um teste colorimétrico fácil e válido para se avaliar propriedades antioxidantes. Esse método vem sendo utilizado com sucesso para se avaliar grãos, vegetais, ácidos linoleicos conjugados, ervas, sementes comestíveis e farinhas em diferentes sistemas de solvente, incluindo etanol, acetona aquosa, metanol, sistemas hidroalcoólicos e benzênicos. Entretanto, tornou-se difícil comparar dados referentes à capacidade de captura do radical DPPH de diferentes laboratórios ou até mesmo do mesmo grupo, mas em diferentes condições e períodos de tempo. Isso se deve ao fato de que a maioria dos resultados, em relação a sistemas que fazem uso desse radical, foram relatados em % de DPPH restante ou inibido, o que depende muito do tempo de reação e das concentrações iniciais tanto do DPPH como do antioxidante sendo testado (CHENG; MOORE; YU, 2006).

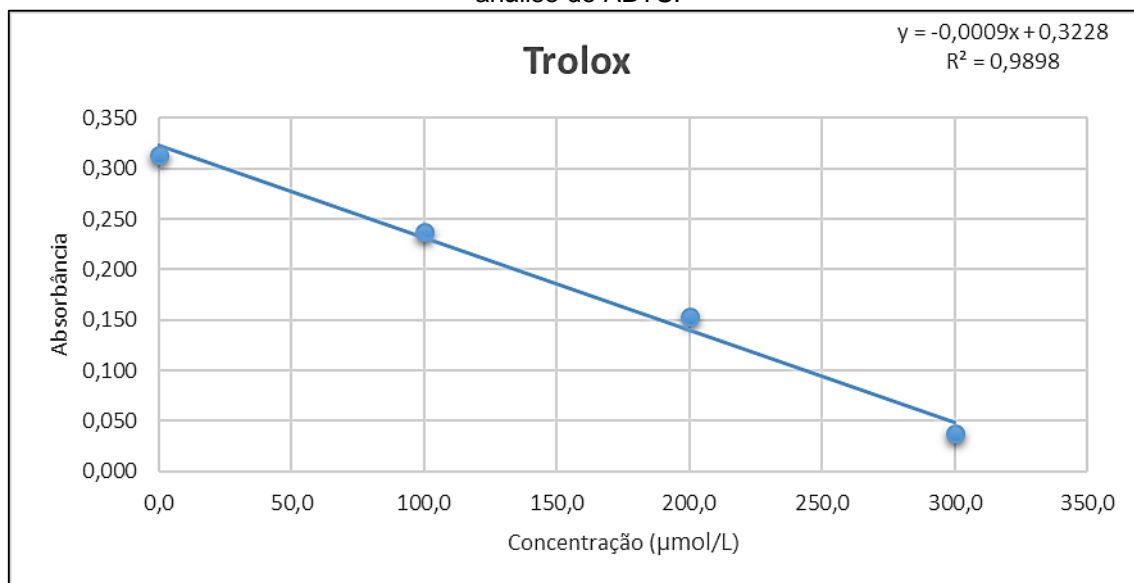
Em relação aos valores encontrados para a atividade antioxidante contra o DPPH, os dados aqui apresentados possuem uma aproximação aceitável com aqueles encontrados na literatura científica. Comparativamente entre os cogumelos, o extrato hidroalcoólico do *Pleurotus ostreatus* demonstrou maior atividade antioxidante contra o DPPH, com um percentual de captura de 28%; seguido do *Pleurotus pulmonarius*, com um percentual de captura de 24%; e do *Pleurotus djamor*, com um percentual de captura de 23%. Proporcionalmente, esses valores também

puderam ser observados na literatura científica disponível (ARBAAYAH; KALSOM, 2013).

A atividade antioxidante evidenciada para os extratos hidroalcoólicos dos cogumelos das espécies estudadas neste trabalho pode ser considerada baixa quando comparada com outras espécies de cogumelos analisadas na literatura. A *Ganoderma lucidum*, por exemplo, apresentou um percentual de captura do radical DPPH acima de 60%, enquanto que o extrato do *Pleurotus ostreatus* apresentou um valor máximo de 28% (SALTARELLI et al, 2009).

A curva-padrão de Trolox da análise de captura do radical ABTS é representada pelo gráfico da Figura 8, tendo apresentado um fator de correlação de 0,9898.

**Figura 8** - Gráfico referente à regressão linear dos dados mensurados do padrão de Trolox para a análise de ABTS.



Em relação à análise pelo radical ABTS, os cogumelos *Pleurotus djamor*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius* apresentaram, respectivamente, porcentagens de captura de radical de 28%, 38% e 25%. Os valores referentes à absorbância e à porcentagem de captura do radical ABTS, devido à atividade antioxidante dos extratos, são representados pela Tabela 12.

**Tabela 12** - Valores referentes à análise de captura do radical ABTS.

<b>Cogumelo</b>	<b>% de captura de radicais</b>
<i>Pleurotus djamor</i>	28
<i>Pleurotus ostreatus</i>	38
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	25

Os valores referentes à atividade antioxidante também foram calculados em relação ao padrão de Trolox, conforme convencionado pela comunidade científica. Os valores foram representados como “ $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox por g de amostra seca”, sendo apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13** - Representação do percentual de captura do radical ABTS em atividade antioxidante.

<b>ABTS</b>	<b>Concentração no extrato</b>	<b>Atividade Antioxidante</b>	
<b>Cogumelo</b>	<b>(mmol ET/L)</b>	<b>(<math>\mu\text{mol}</math> ET/g amostra)</b>	<b>(<math>\mu\text{g}</math> ET/g amostra)</b>
<i>Pleurotus djamor</i>	0,098	49,33	12,4
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,134	67,11	16,8
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	0,086	43,22	10,8

Os valores encontrados para a atividade antioxidante dos extratos dos cogumelos contra o radical ABTS também apresentaram variações proporcionalmente aceitáveis em relação aos relatados na literatura científica disponível. Foram relatados valores para a atividade antioxidante do *Pleurotus ostreatus* próximos a 40% de captura do radical, o que demonstrou coerência com o valor de 38% encontrado neste trabalho (HAN et al, 2015).

Outras espécies de cogumelo do gênero *Pleurotus* também foram avaliadas quanto à sua atividade antioxidante contra o radical ABTS, apesar do uso do radical DPPH ser mais comum na literatura. Extratos hidroalcoólicos do cogumelo *Pleurotus citrinopileatus* foram avaliados e sua atividade antioxidante foi relatada em valores mínimos de 0,041 mg ET/g amostra seca – ou 41,0  $\mu\text{g}$  ET/g amostra seca. Esses valores podem ser considerados elevados quando comparados com aqueles relatados para as espécies avaliadas aqui, ou seja: (0,012 mg ou 12,4  $\mu\text{g}$ ) ET/g amostra seca para a espécie *Pleurotus djamor*, (0,017 mg ou 16,8  $\mu\text{g}$ ) ET/g amostra seca para a espécie *Pleurotus ostreatus*; e (0,011 mg ou 10,8  $\mu\text{g}$ ) ET/g amostra seca para a espécie *Pleurotus pulmonarius* (NATTOH et al, 2016).

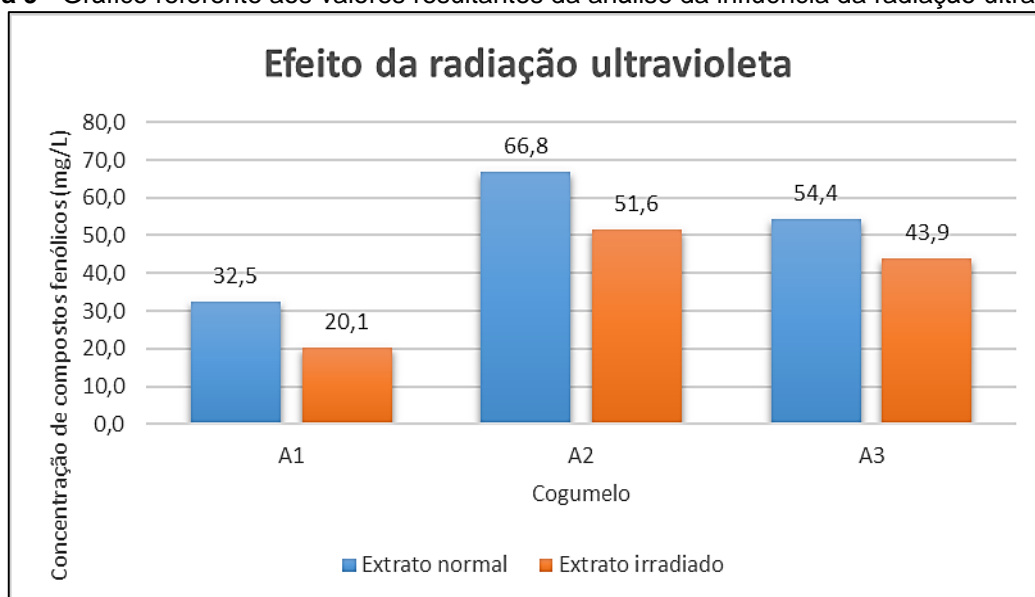
## 5.5 Influência da incidência de radiação ultravioleta

O menor índice de decaimento dos compostos fenólicos após 24 horas de armazenamento pôde ser observado na condição 4 (etanol 20%, 2 mg/mL) para o cogumelo *Pleurotus djamor*, com variação nula; na condição 6 para o cogumelo *Pleurotus ostreatus*, com variação de 36%; e na condição 6 para o cogumelo *Pleurotus pulmonarius*, com variação nula. Novas extrações foram feitas utilizando-se as condições citadas para se realizar a análise dos efeitos da incidência de radiação ultravioleta. O objetivo foi minimizar a influência do decaimento natural observado quando os compostos fenólicos são extraídos de sua matriz.

A incidência de radiação ultravioleta sobre os extratos causou uma redução nos valores resultantes da análise de compostos fenólicos totais. O extrato irradiado do cogumelo *Pleurotus djamor* apresentou um decaimento de 38,1% dos compostos fenólicos após exposição à radiação ultravioleta, em relação ao extrato deixado no escuro. O extrato irradiado do cogumelo *Pleurotus ostreatus*, por sua vez, apresentou um decaimento de 22,8% dos compostos bioativos. E por fim, o extrato irradiado do cogumelo *Pleurotus pulmonarius* apresentou um decaimento de 19,3%.

A Figura 9 contém uma representação visual dos resultados mencionados.

**Figura 9** - Gráfico referente aos valores resultantes da análise da influência da radiação ultravioleta.





Sabe-se que compostos fenólicos são geralmente instáveis quando submetidos a elevadas temperaturas, mudanças de pH ou expostos ao oxigênio. Contudo, esses compostos também são, em sua grande maioria, fotossensíveis. A incidência de luz pode ocasionar mudanças em sua estrutura química a ponto de causar instabilidade na molécula, impossibilitando que esses compostos bioativos permaneçam estáveis quando armazenados por longos períodos de tempo (MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011).

Quando se trata de compostos fenólicos dentro de uma matriz ativa, como por exemplo, a de uma planta, sabe-se que variações na incidência de luz podem ocasionar um aumento em sua produção pela planta, devido aos diversos mecanismos através dos quais a radiação luminosa é aproveitada de maneira construtiva (GHASEMZADEH et al, 2010). Contudo, com base nos resultados obtidos neste trabalho, a partir do momento em que a incidência de radiação luminosa ocorre diretamente sobre os compostos em um extrato, a situação torna-se prejudicial.

Até mesmo quando se faz uso de radiação ultravioleta, a concentração de compostos fenólicos quando dentro de uma matriz ativa pode ser alterada de maneira construtiva, através do incentivo de mecanismos produtores pela irradiação. Relatos científicos indicam que a radiação UV é capaz de ocasionar mudanças na quantidade de compostos fenólicos totais, de maneira construtiva quando incidente sobre uma matriz ativa, ou de maneira destrutiva quando incidente diretamente sobre a estrutura molecular dos compostos bioativos (MURUGESAN; ORSAT; LEFSRUD, 2012) – afirmação cuja veracidade pôde ser confirmada neste trabalho.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre os três cogumelos selecionados para se quantificar os compostos fenólicos presentes em sua matriz, o *Pleurotus ostreatus* foi o que apresentou o maior valor – 2,34%, ou 23,40 mg Equivalentes de Ácido Gálico por g de amostra. Contudo, ele também foi o cogumelo cujo extrato apresentou o maior índice de decaimento dos compostos fenólicos, após 24 horas de armazenamento – 62,19% do teor original, quando armazenado em temperatura ambiente.

Quanto à atividade antioxidante resultante das análises de captura dos radicais DPPH e ABTS, o extrato hidroalcoólico do *Pleurotus ostreatus* foi o que apresentou maior porcentagem de captura – 28%, ou 5,38 µg Equivalentes de Trolox por g de amostra seca, para o radical DPPH; e 38%, ou 16,8 µg Equivalentes de Trolox por g de amostra seca, para o radical ABTS.

A incidência de radiação ultravioleta sobre os extratos causou uma leve redução nos valores referentes à análise de compostos fenólicos totais, mesmo considerando-se que apenas 10% da radiação emitida pela lâmpada UVC penetrou os tubos de ensaio e atingiu os extratos. As diferenças provaram que a radiação ultravioleta possui a capacidade de modificar a estrutura molecular de compostos fenólicos, alterando conseqüentemente sua atividade antioxidante; ou de causar instabilidade molecular a ponto de promover dissociação intramolecular e formar novos compostos.

Como sugestão para trabalhos futuros, seria interessante investigar a possível influência de diferentes substratos sobre a produção de compostos fenólicos pelos fungos, bem como a influência da incidência de luz sobre as amostras armazenadas por 24h após extração. Outra variável de interesse seria o uso de diferentes tipos de secagem para o material, diferenciando-se os efeitos da liofilização em contraste com secagem em estufa, com temperaturas variando entre 30°C e 70°C. O uso de diferentes soluções de extração também pode ser mais profundamente estudado para as espécies de cogumelo analisadas nesse trabalho, como por exemplo, a diferença de se extrair utilizando-se soluções hidroalcoólicas de água/metanol, água/etanol, água/isopropanol; podendo-se ter mais variações com a adição de acetona.

## REFERÊNCIAS

ARBAAYAH, H. H.; KALSOM, Y. U. Antioxidant properties in the oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*) and split gill mushroom (*Schizophyllum commune*) ethanolic extracts. **Mycosphere**, 2013, Volume 4, Páginas 661-673.

ASATIANI, M. D.; KACHLISHVILI, E. T.; KHardZIANI, T. S.; METREVELI, E. M.; MIKIASHVILI, N. A.; SONGULASHVILI, G. G.; TSIKLARI, N. D.; WASSER, S. P.; ELISASHVILI, V. I. Basidiomycetes as a source of antioxidants, lectins, polysaccharides, and enzymes. **Journal of Biotechnology**, 2008, Volume 136, Página S717.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, 2006, Volume 99, Páginas 191–203.

BARRY, A. L. Procedure for testing antibiotics in agar: theoretical considerations. **Antibiotics in Laboratory Medicine**, Baltimore: Williams and Wilkins, 1980, Página 1.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, 1966, Volume 36, Páginas 493-496.

BEER, D.; JOUBERT, E.; GELDERBLUM, W. C. A.; MANLEY, M. Phenolic compounds: a review of their possible role as *in vivo* antioxidants of Wine. **South African Journal of Enology and Viticulture**, 2002, Volume 23, Número 2.

BERTAGNOLLI, C.; PERES, R. S.; CARBONE, S.; MANFRO, R. L.; PINHEIRO, D. K.; SCHUCH, A. A. M. P.; NOZAWA, H.; YAMAMOTO, H.; SCHUCH, N. J. Estimativa para cálculo de ozônio total usando dados de UVB e UVA do observatório espacial do sul, Brasil. **Revista Brasileira de Geofísica**, 2007, Volume 25, Páginas 9-15.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, 1959, Volume 37, Páginas 911-917.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, 1995, Volume 28, Páginas 25-30.

CHENG, Z.; MOORE, J.; YU, L. High-throughput relative DPPH radical assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2006, Volume 54, Páginas 7429-7436.

CHISTÉ, R. C. Avaliação da extração de compostos bioativos com propriedades antioxidantes e corantes presentes em urucum e piquiá. 2011. 127 páginas. **Tese (doutorado)** – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, SP.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. **Seventeenth Informational Supplement**, 2005, Volume 27, documento M100-S17.

CREMADES, Olga; DIAZ-HERRERO, M. Mar; CARBONERO-AGUILAR, Pilar; GUTIERREZ-GIL, Juan F.; FONTIVEROS, Enrique; RODRIGUEZ-MORGADO, Bruno; PARRADO, Juan; BAUTISTA, Juan. Preparation and characterization of selenium-enriched mushroom aqueous enzymatic extracts (MAEE) obtained from the white button mushroom (*Agaricus bisporus*). **Food Chemistry**, 2012, Volume 133, Páginas 1538-1543.

DIFFEY, B. L. What is the light? **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, 2002, Volume 18, Páginas 68-74.

DU TOIT, E. A.; RAUTENBACH, M. A sensitive standardized micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity. **Journal of Microbiological Methods**, 2000, Volume 42, Páginas 159-165.

ENDO, A. Chemistry, biochemistry and pharmacology of HMG-CoA reductase inhibitors. **The Central European Journal of Medicine**, 1988, Volume 66, Páginas 421-427.

EREL, Ozcan. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, 2004, Volume 37, Páginas 277-285.

ERKAN, M.; WANG, S.; WANG, C. Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and decay in strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, 2008, Volume 48, Páginas 163-171.

FERNANDES, A.; BARREIRA, J. C. M.; ANTONIO, A. L.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; MARTINS, A.; FERREIRA, I. C. F. R. Effects of gamma irradiation on chemical composition and antioxidant potential of processes samples of the wild mushroom *Macrolepiota procera*. **Food Chemistry**, 2014, Volume 149, Páginas 91-98.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British Journal of Experimental Pathology**, 1929, Volume 10, Páginas 226-236.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z. E.; RAHMAT, A.; WAHAB, P. E. M.; HALIM, M. R. A. Effect of different light intensities on total phenolics and flavonoids synthesis and anti-oxidant activities in young ginger varieties (*Zingiber officinale* Roscoe). **International Journal of Molecular Sciences**, 2010, Volume 11, Páginas 3885-3897.

GONZÁLEZ-PALMA, I.; ESCALONA-BUENDIA, H. B.; PONCE-ALQUICIRA, E.; TÉLLEZ-TÉLLEZ, M.; GUPTA, V. K.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; SORIANO-SANTOS, J. Evaluation of the antioxidant activity of aqueous and methanol extracts of *Pleurotus ostreatus* in different growth stages. **Frontiers in Microbiology**, 2016, Volume 7, Artigo 1099.

GRUNE, T.; SHRINGARPURE, R.; SITTE, N.; DAVIES, K. Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. **Journal of Gerontology**, 2001, Volume 56A, Páginas B459-B467.

GUNDE-CIMERMAN, N. Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (Agaricales s.l., Basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 1999, Volume 1, Páginas 69–80.

HAMINIUK, Charles W. I.; MACIEL, Giselle M.; PLATA-OVIEDO, Manuel S. V.; PERALTA, Rosane M. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, 2012, Volume 47, Páginas 2023-2044.

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

HEKIMI, S.; LAPOINTE, J.; WEN, Y. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. **Trends In Cell Biology**, 2011, Volume 21, Páginas 569-76.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation molds in vitro. **Food Chemistry**, 2001, Volume 73, Páginas 288-290.

JIA, Z.; DUMONT, M.; ORSAT, V. Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. **Food Bioscience**, 2016, Volume 15, Páginas 87-104.

JORGENSEN, J. H.; TURNIDGE, J. D. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. **Manual of Clinical Microbiology**, 2007, 9ª Edição, Washington, D.C.: ASM Press, Páginas 1152-1172.

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

KLAUS, A.; KOZARSKI, M.; NIKSIC, M.; JAKOVLJEVIC, D.; TODOROVIC, N.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. **LWT - Food Science and Technology**, 2011, Volume 44, Páginas 2005-2011.

KONCZAK, I.; ZABARAS, D.; DUNSTAN, M.; AGUAS, P. Antioxidant capacity and phenolic compounds in commercially grown native Australian herbs and spices. **Food Chemistry**, 2010, Volume 122, Páginas 260-266.

LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. G. Identification of volatile compounds in basil (*Ocimum basilicum L.*) and thyme leaves (*Thymus vulgaris L.*) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, 2005, Volume 91, Páginas 131-137.

LIU, R. H. Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **American Journal of Clinical Nutrition**, 2003, Volume 78, Páginas 517-520.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L.; RANGEL, A. O. Automatic method for the determination of Folin-Ciocalteu reducing capacity in food products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2006, Volume 54, Páginas 5241-5246.

MÄKILÄ, L.; LAAKSONEN, O.; KALLIO, H.; YANG, B. Effect of processing technologies and storage conditions on stability of black currant juices with special focus on phenolic compounds and sensory properties. **Food Chemistry**, 2016, manuscrito aceito para publicação (19 de Outubro).

MANNEY, G. L.; FROIDEVAUX, L.; WATER, J. W.; ZUREK, R. W.; READ, W. G.; ELSON, L. S.; KUMER, J. B.; MERGENTHALER, J. L.; ROCHE, A. E.; O'NEILL, A.; HARWOOD, R. S.; MACKENZIE, I.; SWINBANK, R. Chemical depletion of ozone in the Arctic lower stratosphere during winter 1992-93. **Nature**, 1994, Volume 370, Páginas 429-434.

MARTYSIAK-ZUROWSKA, D.; WENTA, W. A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. **ACTA Scientiarum Polonorum – Technologia Alimentaria**, 2012, Volume 11, Páginas 83-89.

MATTILA, P.; VAANANEN, P. S.; KONGO, K.; ARO, H.; JALAYA, T. Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2002, Volume 50, Páginas 6419-6422.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, 1993, Volume 84, Páginas 407-412.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, 2012, Volume 130, Páginas 1036-1043.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, 2004, Volume 17, Páginas 411-424.

MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. **Pharmaceutics**, 2011, Volume 3, Páginas 793-829.

MURUGESAN, R.; ORSAT, V.; LEFSRUD, M. Effect of pulsed ultraviolet light on the total phenol content of elderberry (*Sambucus nigra*) fruit. **Food and Nutrition Sciences**, 2012, Volume 3, Páginas 774-783.

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

NATTOH, G.; GATEBE, E.; MUSIEBA, F.; MATHARA J. Bioprospecting optimal phenology for bioactive molecules in native golden yellow *Pleurotus citrinopileatus* Singer. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 2016, Volume 6, Páginas 132-142.

PALACIOS, I.; LOZANO, M.; MORO, C.; D'ARRIGO, M.; ROSTAGNO, M. A.; MARTÍNEZ, J. A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. **Food Chemistry**, 2011, Volume 128, Páginas 647-678.

PALANCAR, G. G.; TOSELLI, B. M. Effects of meteorology and tropospheric aerosols on UVB radiation: a 4-year study. **Atmospheric Environment**, 2004, Volume 38, Páginas 2749-2757.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2005, Volume 53, Páginas 4290-4302.

PUMTES, P.; ROJSUNTORNKITTI, K.; KONGBANGKERD, T.; JITTREPOTCH, N. Effects of different extracting conditions on antioxidant activities of *Pleurotus flabellatus*. **International Food Research Journal**, 2016, Volume 23, Páginas 173-179.

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

RISPAIL, N.; MORRIS, P.; WEBB, K. Phenolic compounds: extraction and analysis. **Lotus Japonicus Handbook**, 2005, Páginas 349–354.

SALTARELLI, R.; CECCAROLI, P.; IOTTI, M.; ZAMBONELLI, A.; BUFFALINI, M.; CASADEI, L.; VALLORANI, L.; STOCCHI, V. Biochemical characterization and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy. **Food Chemistry**, 2009, Volume 116, Páginas 143-151.



SHEN, Y.; SUN, Y.; QIAO, L.; CHEN, J.; LIU, D.; YE, X. Effect of UV-C treatments on phenolic compounds and antioxidant capacity of minimally processed Satsuma mandarin during refrigerated storage. **Postharvest Biology and Technology**, 2013, Volume 76, Páginas 50-57.

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

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, 1999, Volume 299, Páginas 152-178.

SOUZA-SARTORI, J. A.; SCALISE, C.; BAPTISTA, A. S.; LIMA, R. B.; AGUIAR, C. L. Parâmetros de influência na extração de compostos fenólicos de partes aéreas da cana-de-açúcar com atividade antioxidante total. **Bioscience Journal**, 2013, Volume 29, Páginas 297-307.

TRUMBECKAITE, Sonata; BENETIS, Raimondas; BUMBLAUSKIENE, Lina; BURDULIS, Deividas; JANULIS, Valdimaras; TOLEIKIS, Adolfas; VIŠKELIS, Pranas; JAKŠTAS, Valdas; *Achillea millefolium* L. s.l. herb extract: Antioxidant activity and effect on the rat heart mitochondrial functions. **Food Chemistry**, 2011, Volume 127, Páginas 1540-1548.

TSENG, S. H.; LEE, C. M.; LIN, T. Y.; CHANG, S. C.; CHANG, F. Y. Emergence and spread of multi-drug resistant organisms: think globally and act locally. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2011, Volume 44, Páginas 157-165.

UPADHYAY, R. C. Oyster mushroom cultivation. Em M. Singh, B. Vijay, S. Kamal, G. C. Wakchaure (Eds.), **Mushrooms cultivation, marketing and consumption**, 2011, Páginas 129–138. Solan, India: Directorate of Mushroom Research (ICAR).

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

WEISS, J. F.; LANDAUER, M. R. Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. **Toxicology**, 2003, Volume 189, Páginas 1-20.