

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CÂMPUS CAMPO MOURÃO - PARANÁ

ANA PAULA STAFUSSA

**PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E PERFIL DOS COMPOSTOS
FENÓLICOS DE COGUMELOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2013

ANA PAULA STAFUSSA

**PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E PERFIL DOS COMPOSTOS
FENÓLICOS DE COGUMELOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Engenharia de Alimentos da Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Campo Mourão, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheira de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk.

CAMPO MOURÃO
2013



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Campo Mourão

Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos
Engenharia de Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E PERFIL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE COGUMELOS

por

ANA PAULA STAFUSSA

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 22 de fevereiro de 2013 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk
Orientador

Prof. Dra. Angela Maria Gozzo

Prof. Dr. Miguel Angel Aparicio Rodríguez

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus acima de tudo, que me deu força e discernimento para chegar até o fim dessa etapa da minha vida.

Aos meus familiares e amigos pelo incentivo, carinho e orações que me foram concedidos nos momentos mais difíceis de minha vida.

Ao meu orientador Professor Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk pelas oportunidades e ensinamentos, por meio dele, me reporto a toda a coordenação de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Câmpus Campo Mourão, pelo apoio.

A Ângela Kwiatkowski e Marcos Vieira pela ajuda nas metodologias realizadas no laboratório.

Agradeço aos professores da banca examinadora, pela atenção e contribuição dedicadas a este estudo.

Muito Grata à todos!

RESUMO

STAFUSSA, A. P. **PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E PERFIL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE COGUMELOS**. 2013. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2013.

Cogumelos têm feito parte da dieta normal humana por milhares de anos e, nos últimos tempos, as quantidades consumidas aumentaram muito, envolvendo um grande número de espécies. Além das propriedades nutricionais, cogumelos têm demonstrado possuir propriedades benéficas à saúde. Neste estudo, três variedades de cogumelos foram avaliadas: Champignon, Shimeji e Shiitaki. Metanol absoluto foi utilizado para obter os extratos puros dos cogumelos (1:20, m/v). Os compostos fenólicos totais dos cogumelos foram determinados usando o método de Folin-Ciocalteu. Flavonóides foram estimados utilizando o método colorimétrico com cloreto de alumínio e o ensaio de pH diferencial foi utilizado para quantificar as antocianinas totais nas amostras. Os testes antioxidantes do 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e β -caroteno/ácido linoleico foram usados para obter os valores de EC_{50} das amostras. A cromatografia líquida de alta eficiência de fase inversa com detecção de diodos (RP-CLAE DAD-UV/Vis) foi utilizada para a separação e identificação de compostos fenólicos nos extratos de cogumelos. Entre os três cogumelos estudados, o Champignon foi o que apresentou a concentração mais elevada de compostos fenólicos totais ($6,40 \pm 0,22$ mg base GAE/g seco) e os flavonóides ($2,36 \pm 0,19$ mg base de CE/g seco). As antocianinas só foram detectadas na amostra de Shimeji ($2,54 \pm 0,13$ mg/100g base seca). O cogumelo com o maior potencial antioxidante foi Shiitaki (valores de EC_{50} de $16,83 \pm 0,31$ ug/mL e $26,46 \pm 0,37$ ug/mL no DPPH e β -caroteno/ácido linoleico, respectivamente). Os diferentes compostos fenólicos foram identificados por análise por CLAE em cada amostra. A maior concentração foi encontrada no Champignon, sendo rutina presente de forma significativa.

Palavras-chave: Cogumelos, Compostos Fenólicos, CLAE.

ABSTRACT

STAFUSSA, A. P. **ANTIOXIDANT PROPERTIES AND PROFILE OF MUSHROOMS PHENOLIC COMPOUNDS**. 2013. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2013.

Mushrooms have been part of the normal human diet for thousands of years and, in recent times, the amounts consumed have risen greatly, involving a large number of species. Besides the nutritional properties, mushrooms have been demonstrated to possess healthy properties. In this study, three varieties of mushrooms were evaluated: Champignon, Shimeji and Shiitaki. Absolute methanol was used to obtain the crude extracts of the mushrooms (1:20, w/v). The total phenolic compounds of the mushrooms were determined using the Folin-Ciocalteu method. Flavonoids were estimated using the colorimetric method with aluminium chloride and the pH differential assay was used to quantify the total anthocyanins in the samples. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) scavenging activity and coupled autoxidation of β -carotene and linoleic acid assays were used to obtain the EC_{50} values of the samples. Reverse-phase high-performance liquid chromatography with diode-array detection (RP-HPLCDAD-UV/Vis) was used for the separation and identification of phenolic compounds in the mushrooms extracts. Among the three mushrooms studied, champignon presented the highest concentration of total phenolic compounds (6.40 ± 0.22 mg GAE/g dry basis) and flavonoids (2.36 ± 0.19 mg CE/g dry basis). Anthocyanins were only detected in the sample of Shimeji (2.54 ± 0.13 mg/100g dry basis). The mushroom with the highest antioxidant potential was shiitaki (EC_{50} values of 16.83 ± 0.31 μ g/mL and 26.46 ± 0.37 μ g/mL in the DPPH and in the β -carotene/ linoleic acid assays, respectively). Different phenolic compounds were identified by HPLC analysis in each sample. The highest concentration was found in Champignon, being rutin significantly present.

Keywords: Mushrooms, Phenolic Compounds, HPLC.

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Teores dos compostos fenólicos totais e flavonóides totais e antocianinas das três variedades de cogumelos.	25
Tabela 2. Percentual da atividade antioxidante dos extratos de cogumelos e seus respectivos valores de EC50 para o método DPPH.	27
Tabela 3. Percentual da atividade antioxidante dos extratos de cogumelos e seus respectivos valores de EC50 para o método beta- caroteno/ ácido linoléico.	27
Tabela 4. Compostos fenólicos identificados nas amostras.	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS COGUMELOS	11
3.2 ANTIOXIDANTES	14
3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. AMOSTRA	19
4.2 EXTRAÇÃO DOS POLIFENÓIS DA AMOSTRA.....	19
4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	20
4.4 QUANTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS.....	20
4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS FLAVONÓIDES.....	21
4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE DPPH.....	22
4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO BETA-CAROTENO/ÁCIDO-LINOLÉICO	22
4.8 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	23
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

Cogumelos são alimentos valiosos, com baixos teores energéticos e elevadas quantidades de minerais, aminoácidos essenciais, vitaminas e fibras. Alguns deles produzem compostos com potenciais efeitos farmacológicos e são chamados de cogumelos medicinais. Estudos têm demonstrado que o consumo regular de cogumelos ou o consumo de seus constituintes bioativos é benéfico para a saúde (SOARES, 2007).

O número estimado de espécies de cogumelos no mundo é de 140.000 sendo que 2.000 são consideradas seguras para o consumo e 700 espécies possuem atividades farmacológicas comprovadas. No Brasil são mencionados 136 gêneros e 1.011 espécies de acordo com um levantamento realizado entre 1990 e 1991. Entretanto estes números vêm sofrendo alterações com as descrições de novas espécies (TAVEIRA; NOVAES, 2007).

O interesse no uso dos cogumelos e/ou de seus extratos como suplementos dietéticos vem crescendo significativamente, devido aos seus efeitos antitumorais, anticarcinogênicos, antivirais, antiinflamatórios, hipoglicemiantes, hipocolesterolêmicos, hipotensivos, entre outros, podendo ser indicados como coadjuvantes no tratamento das neoplasias malignas (FORTES; NOVAES, 2006).

Os extratos de cogumelos também são estudados por apresentarem propriedades antioxidantes. Para uma substância ser definida como antioxidante deve prevenir ou retardar a oxidação mesmo estando em baixa concentração relativamente ao substrato a ser oxidado e, além disso, deve formar radicais estáveis após a reação (SILVA; JORGE, 2011). Alguns exemplos desses agentes antioxidantes em alimentos são as vitaminas A, C e E, os flavonóides, os fenólicos e os carotenóides (PAULI, 2010).

Os compostos fenólicos representam o maior grupo de metabólitos secundários sintetizados por plantas superiores e cogumelos, provavelmente como resultado das estratégias antioxidantes inerentes à evolução dos organismos aeróbicos. A eficácia global desses compostos naturais depende do envolvimento do hidrogênio fenólico nas

reações de radicais, da estabilidade do radical antioxidante natural formado durante reações de radicais, e das substituições químicas presentes na estrutura (QUEIRÓS, 2009). Assim sendo, o presente trabalho teve por objetivo determinar a quantidade de compostos fenólicos, a atividade antioxidante e avaliar o perfil cromatográfico de três variedades de cogumelos cultivados no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinação dos compostos fenólicos, propriedades antioxidantes e perfil cromatográfico de três variedades de cogumelos: Champignon, Shimeji e Shiitaki.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinação dos compostos fenólicos totais, flavonóides e antocianinas;
- Avaliação do potencial antioxidante dos extratos das variedades dos cogumelos pelos métodos de DPPH e Beta Caroteno/Ácido Linolêico;
- Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS COGUMELOS

De acordo com a resolução CNNPA nº 12, de 1978 da Anvisa:

Os cogumelos comestíveis são fungos pertencentes às classes dos ascomicetes e dos basidiomicetes.

Os cogumelos comestíveis são constituídos por carpóforos não inteiramente desenvolvidos (botões) cortados pela base (não arrancados): são, consistentes, isentos de manchas ou de marcas de parasitos e isentos da maior parte de matéria terrosa. Não podem apresentar-se fermentados e, quando lavados, não devem apresentar odores estranhos. (BRASIL, 1978).

O número de cultivos de cogumelos existentes é de aproximadamente 140 mil, sendo que somente 10% são conhecidos, e apenas dois mil são comestíveis. Dentre as espécies, destacam-se o *Agaricus bisporus* (Champignon de Paris), o *Lentinus edodes* (Shiitake) e o *Pleurotus ostreatus* (Shimeji), que são as espécies mais conhecidas no Brasil, sendo que os dois primeiros ocupam, respectivamente, o primeiro e segundo lugar em consumo no Brasil (PAULI, 2010). Além dos três tipos cogumelos mais cultivados e consumidos, existem várias espécies comestíveis nas matas brasileiras, entre elas estão: *Auricularia fuscusuccinea*, *Auricularia delicata*, *Oudemansiella canarri*, *Favolus brasiliensis*, *Laetiporus sulphureus*, *Agrocybe perfecta*, *Macrolepiota procera*, *Pleurotus ostreatoroseus*, *Lepista nuda*, *Suillus edulis*, *Armillaria mellea*, *Coprinus comatus*, *Agaricus silvaticus*, *Tricholoma pachymeres* e *Fistulina hepática* (MOURA, 2008).

O consumo de cogumelos está crescendo na cultura ocidental, envolvendo um grande número de espécies além do popular “Champignon”. Um grande crescimento pode ser atestado pelos seguintes números: em 1995, a produção anual mundial foi de

2,0 milhões de toneladas e, em 2005, aumentou para 3,3 milhões de toneladas, ou seja, mais de 60% em 10 anos (FURLANI; GODOY, 2007).

A produção brasileira de cogumelos deve estar em torno de 3 mil toneladas anuais ou 0,12% da produção mundial, sendo que a maioria dessa produção é de Champignon. O valor estimado da produção primária de cogumelos no Brasil alcançaria, portanto, cerca de R\$ 10 milhões anuais. Somando a produção interna às importações e subtraindo as exportações, considera-se que o consumo anual de cogumelos no país seja de 70 gramas por habitante (VILELA, 2012).

A região de Mogi das Cruzes, no estado de São Paulo é responsável pela produção de pelo menos 70% dos cogumelos comestíveis comercializados no Brasil. Os restantes 30% da produção ocorrem em outros municípios, sendo a maioria também no estado de São Paulo, como Ribeirão Pires, Suzano, Cabreúva, Atibaia e Mairiporã. Também há produtores em Porto Alegre, sul de Minas Gerais e no Paraná (MOURA, 2008).

Os cogumelos possuem vários compostos biologicamente ativos como polissacarídeos, glicoproteínas e propriedades antioxidantes e antibióticas. Assim sendo, além do cogumelo ser apreciado por suas características sensoriais, ele também é usado como fonte medicinal (SILVA; JORGE, 2011).

A lista de possíveis efeitos benéficos dos cogumelos é longa e incluem aumento da imunidade, redução dos níveis sanguíneos de colesterol e lipídeos, redução da pressão sanguínea, atenuação dos níveis sanguíneos de glicose, entre várias outras ações (SOARES, 2007).

De acordo com a composição química em peso seco, os cogumelos contêm grandes quantidades de carboidratos, fibras e proteínas, incluindo todos os aminoácidos essenciais e, em menores quantidades, minerais e algumas vitaminas como riboflavina, niacina e folato, além de baixos teores de lipídeos. Esses valores alteram de acordo com o substrato usado, as condições de cultivo e frutificação e o estágio de desenvolvimento do cogumelo (PAULI, 2010).

Considerando o elevado conteúdo protéico dos cogumelos, seu cultivo tem sido apontado como uma alternativa para aumentar a oferta de proteínas, para países em desenvolvimento e com alto índice de desnutrição. Além desses aspectos, a

importância dos cogumelos também está relacionada ao mercado em contínuo crescimento; aos avanços tecnológicos para melhorar a qualidade; produtividade e custo de produção; ao ainda baixo consumo “*per capita*” mesmo nos países mais desenvolvidos e, às ilimitadas alternativas de espécies que podem ser cultivadas (EIRA, 2012).

O formato de cultivo dos cogumelos depende do tipo de nutrição de cada espécie e de suas exigências climáticas, que podem ser distintos em função da região, de onde tenham evoluído ou de melhoramentos genéticos que tenham sido submetidos (EKANEM; UBENGAMA, 2002). As características bromatológicas dos cogumelos alteram em função da espécie, da linhagem cultivada, do processamento após colheita, do estágio de desenvolvimento do basidioma e do substrato (ANDRADE et al., 2008).

Os cogumelos são produtos muito perecíveis e tendem a perder a qualidade logo após a colheita, já que perdem água causando encolhimento e diminuição de peso. Sua vida útil é de 1 a 3 dias na temperatura ambiente, de 8 dias em atmosfera modificada (2-5% de O₂ e 3-8% de CO₂) a 3 °C e de 4 dias em atmosfera controlada (5% O₂ e 10% CO₂) a 2 °C (SILVA; JORGE, 2011).

A ingestão de certos alimentos, tais como: vegetais, frutas, legumes, vinhos tintos e sucos, promovem proteção contra várias doenças, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares. Esta proteção pode ser relacionada com a capacidade de antioxidantes nos alimentos vegetais para sequestrar radicais livres, que são responsáveis pela lesão oxidativa de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (CHEUNG et al., 2003).

Uma das características dos extratos provenientes de cogumelos é sua capacidade de funcionar como imunoestimulador, ou seja, a constituição fisiológica do mecanismo de defesa do hospedeiro é aprimorada pela entrada desses componentes dos cogumelos que restauram a homeostase e melhoram a resistência para doenças. Porém, apenas nas últimas três décadas que a tecnologia tem sido capaz para isolar componentes relevantes e usá-los em experimentos controlados para aplicação anticancer (KITZBERGER, 2005).

3.2 ANTIOXIDANTES

As substâncias aptas de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis recebem a denominação de antioxidantes, tais como: α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (flavonóides). A ingestão de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas que inibem a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas, tem sido relacionada a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (MORAIS et al., 2009).

Os radicais livres podem ser definidos como átomos ou moléculas. Tem em comum o modo como os elétrons, que constituem uma parte importante da sua estrutura, estão dispostos (ROCHA, 2011).

Em circunstâncias normais, os elétrons estão dispostos aos pares, o que lhes confere estabilidade. O radical livre tem duas alternativas para escolher:

- 1-Tirar um elétron de uma molécula ou átomo vizinho.
- 2-Dar um elétron a uma molécula/átomo vizinho.

Em qualquer caso, um novo radical livre tentará sempre equilibrar o número de elétrons presentes na sua estrutura, o que dará lugar a uma cadeia de reações. Os radicais livres são altamente instáveis e as reações a que dão início danificam as moléculas e os átomos à sua volta (ROCHA, 2011).

Existem antioxidantes apropriados para cada tipo de aplicação (ROCHA, 2011). O mecanismo de ação dos antioxidantes é bem variado, desde a remoção do oxigênio do meio, varredura das espécies reativas de oxigênio (ROS), sequestro dos metais catalizadores da formação de radicais livres, aumento da geração de antioxidantes endógenos ou mesmo a interação de mais de um mecanismo (RENZ, 2003).

Os antioxidantes são classificados como enzimáticos e não enzimáticos, de acordo com a estrutura do agente antioxidante. Além disso, conforme a ação sobre os radicais livres, o antioxidante pode ser denominado de “*scavenger*”, quando ele atua alterando um radical livre em outro menos reativo, ou “*quencher*”, quando consegue

neutralizar completamente o radical livre através da absorção de toda a energia de excitação (RENZ, 2003).

Os componentes intrínsecos (não enzimáticos) são considerados naturais, pois estão naturalmente presentes nos alimentos e envolvem um número relativamente grande de substâncias, no qual se enquadram as vitaminas, antioxidantes e os compostos fenólicos. As vitaminas antioxidantes presentes nos alimentos são consideradas como compostos nutrientes e atuam de alguma maneira do bloqueio do processo oxidativo. Estas, são as vitaminas C, E e os carotenóides, que são considerados compostos pró-vitamina A. Os antioxidantes extrínsecos (enzimáticos) são geralmente aditivos sintéticos e utilizados na indústria de alimentos objetivando o aumento da vida de prateleira, especialmente nos alimentos que contenham lipídios na sua composição (FILHO; MANCINI, 2008).

Os principais antioxidantes que existem e que atuam para proteger os alimentos e outras aplicações são, os sintéticos: BHA, BHT e TBHQ; os sintéticos similares aos naturais: propil galato e ácido ascórbico; e os naturais: delta-tocoferol. Os antioxidantes são capazes de sequestrar elétrons reativos, porém nem todos agem da mesma forma em diferentes condições. Existem antioxidantes adequados para cada tipo de aplicação (ROCHA, 2011).

O efeito da ação antioxidante dos elementos bioativos depende de sua estrutura química e da concentração destes fitoquímicos no alimento, sendo que, o teor destes fitoquímicos em vegetais é vastamente influenciado por fatores genéticos, condições ambientais, sobretudo do grau de maturação e variedade da planta, entre outros. Verifica-se, ainda, que a atividade antioxidante é influenciada pelo substrato lipídico empregado no ensaio, o solvente e a técnica de extração aplicada. No que diz respeito aos solventes orgânicos, o metanol tem sido determinado como o mais efetivo, pois este consegue extrair elevada quantidade de compostos bioativos (MELO et al., 2006).

Há diversas técnicas empregadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessante, na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre os diversos métodos destacam-se o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido

linoléico e o método de sequestro de radicais livres, tais como DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazila. O método de oxidação do β -caroteno/ácido linoléico é utilizado para avaliar a atividade de inibição de radicais livres originados durante a peroxidação do ácido linoléico. Este método é baseado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico. Igualmente ao sistema β -caroteno/ácido linoléico, o método de radicais livres está fundamentado no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio. Porém, o primeiro método determina a atividade de uma amostra ou composto de proteger um substrato lipídico da oxidação, já o método de inibição de radicais DPPH fundamenta na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante. Estas duas metodologias utilizam quantidades expressivas de reagentes, padrões e amostras, e oferecem limitações em relação ao número de análises simultâneas que podem ser obtidas (ALMEIDA et al., 2006).

3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos, mais conhecidos como os ácidos fenólicos, são compostos bioativos que estão relacionados no processo de defesa contra danos oxidativos, devido a sua capacidade antioxidante (SOUSA, 2008). Esses compostos são desde moléculas simples até moléculas com elevado grau de polimerização. Estes compostos estão contidos nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (SOARES, 2002).

A variedade estrutural dos compostos fenólicos é devido à grande variedade de combinações que ocorre na natureza e os compostos resultantes são chamados de polifenóis. Entre os compostos fenólicos, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (ANGELO; JORGE, 2007).

Recentemente, os compostos fenólicos estão sendo muito estudados, pois os alimentos que os contêm são distinguidos como funcionais, isto é, apresentam alguma propriedade adicional que pode gerar benefícios à saúde humana, além da sua importância nutricional (FILHO; MANCINI, 2008).

As substâncias fenólicas presentes nos vegetais podem atuar como antioxidantes de diferentes maneiras: interrompem as reações dos radicais livres pela doação de prótons H^+ , quebram íons metálicos e sequestram espécies reativas do oxigênio. Quando reagem com radicais livres os converte em produtos termodinamicamente mais estáveis. A estrutura dos antioxidantes fenólicos influencia diretamente sua atividade, pois a presença de radicais nas posições orto e para do grupamento fenólico aumenta as possibilidades de ressonância da sua forma de radical, conferindo certa estabilidade ao composto formado (FILHO; MANCINI, 2008).

O composto fenólico mais comum é o fenol simples, que possui apenas uma hidroxila diretamente ligada ao anel aromático. Quanto à existência dos compostos fenólicos na natureza, esses podem ser classificados em: pouco e largamente distribuídos na natureza. No grupo dos poucos distribuídos na natureza, estão um número reduzido deles. Já no grupo dos que são largamente distribuídos na natureza, estão os fenólicos encontrados geralmente em todo o reino vegetal. Esses compreendem os chamados flavonóides e derivados e os ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados e cumarinas) (SOARES, 2002).

Os compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos, proporcionam inúmeras atividades biológicas tais como propriedades antitumoral, anti-mutagênica, antiinflamatória, antibacteriana e antioxidante, por serem capazes de proteger as células, contra danos oxidativos. Além destas atividades, foram ainda conferidas propriedades pró-inflamatória e atividade modeladora carcinogênica aos compostos fenólicos, pois alguns deles têm capacidade pró-oxidante podendo reduzir, em algumas situações, danos oxidativos no DNA, proteínas e lipídeos celulares (SOUSA, 2008).

As análises dos compostos fenólicos são influenciadas pela sua estrutura química, método de extração empregado, tamanho das partículas da amostra, tempo e condições de armazenamento, bem como pelo método de análise, seleção de padrões e presença de substâncias interferentes, como gorduras, terpenos e clorofilas. Por

essas razões, nenhum método de extração é totalmente eficiente na extração de todos os fenólicos ou de uma classe específica de compostos fenólicos em alimentos. Os solventes mais frequentemente utilizados para a extração de compostos fenólicos incluem metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformamida e suas combinações (ANTOLOVICH et al., 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRA

As amostras de cogumelos foram selecionadas e compradas na cidade de Campo Mourão. Foram utilizados para as análises três variedades de cogumelos: *Agaricus bisporus* (Champignon de Paris), o *Lentinus edodes* (Shiitake) e o *Pleurotus ostreatus* (Shimeji).

Inicialmente as amostras foram congeladas em ultra freezer a - 40°C por 24 horas. Após o congelamento as amostras foram liofilizadas pelo liofilizador (L101-Liobras). Após o processo de secagem por liofilização, as amostras de cogumelos foram moídas no menor mesh possível no moedor de facas, sendo que tal procedimento teve por finalidade possibilitar trabalhar com os cogumelos por um maior prazo sem que houvesse a deterioração dos mesmos. As amostras foram embaladas a vácuo e envolvidas por papel alumínio para evitar oxidação pela luz e oxigênio e armazenadas em dessecador.

4.2 EXTRAÇÃO DOS POLIFENÓIS DA AMOSTRA

As amostras liofilizadas foram extraídas com metanol na proporção de 0,5 mg de amostra para 10 mL de metanol (1:20) , sendo que a solução foi extraída por 24 horas em um homogeneizador de sangue. Após a extração sólido-líquido, a solução foi centrifugada a 4000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado em tubos de ensaio, mantidos sob refrigeração, protegidos da luz e identificados para posteriores análises.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O teor de compostos fenólicos nos extratos dos cogumelos foi estimado por um ensaio colorimétrico de acordo com a metodologia Singleton & Rossi (1965). Onde foi utilizado como padrão o método Folin-Ciocalteu com ácido gálico. Foram pipetados em balões volumétricos de 10 mL, 150µL das amostras diluídas, com 5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin – Ciocalteu. Após 3 minutos, foi adicionado 1,5 mL de carbonato de sódio a 15%, finalizando com água destilada até completar o volume final de 10 mL. As soluções foram incubadas no escuro, em temperatura ambiente durante 2 horas. A absorvância foi medida a 765 nm usando um espectrofotômetro T-80 (PG Instruments Limited, Pequim, China). Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (GAE), utilizando uma curva de calibração na gama de 5-250 ppm (Vasco et al., 2008).

4.4 QUANTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS

A quantificação das antocianinas totais no extrato foi determinada pelo método de diferencial do pH de Giusti & Wrolsted (2001). Foi realizada uma diluição 1:5 no tampão acetato de sódio e a mesma diluição no tampão cloreto de potássio dos extratos dos cogumelos. Após a diluição os extratos foram repousados no mínimo por 15 minutos. Foi realizada para cada amostra diluída uma leitura a 510 nm e depois a 700 nm.

A absorvância A de 510 e 700nm foi calcula pela seguinte equação (1):

$$A = (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH1,0} - (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH4,5} \quad (1)$$

Sendo que, $A_{510\text{nmpH } 1,0}$ é a absorvância da amostra na diluição do pH 1,0 em 510 nm, $A_{700\text{nmpH } 1,0}$ é a absorvância da amostra na diluição do pH 1,0 em 700 nm, $A_{510\text{nmpH } 4,5}$ é a absorvância da amostra na diluição do pH 4,5 em 510nm e $A_{700\text{nmpH } 4,5}$ é a absorvância da amostra na diluição do pH 4,5 em 700 nm.

A concentração do pigmento de antocianina (MA) das amostras foi calculada de acordo com a equação (2):

$$MA = \frac{A * M * DF * 1000}{\epsilon * \lambda} \quad (2)$$

onde M é massa molar de cianidina-3-glucosídeo ($449,2 \text{ g mol}^{-1}$), DF é o fator de diluição (4,0), ϵ é o coeficiente de extinção molar ($26\ 900 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e λ é o comprimento do caminho óptico (1 cm). Os resultados foram expressos em equivalente de cianidina-3-glucosídeo (CGE) por 100 g de peso fresco.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS FLAVONÓIDES

O teor de flavonóides foi avaliado de acordo com a metodologia de Chang et al. (2002). Foi utilizado 250 μL de extrato diluídos em 1250 μL água de osmose reversa. Posteriormente acrescentou-se 75 μL NaNO_2 (5%) e depois de 6 minutos foi adicionado 150 μL $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10%) . Após 5 minutos de espera foi acrescentado 0,5 mL de NaOH 1M e 275 μL de água de osmose reversa para completar 2500 μL do volume. Logo após o preparo, a solução foi lida a 510 nm. Os resultados foram expressos em equivalentes de quercetina (QE) por 100 g de peso fresco.

4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE DPPH

A atividade antioxidante foi determinada pelo método DPPH descrita por Mensor et al. (2001). Um mL de uma solução de DPPH em metanol na concentração 0,3 mmol/L foi adicionado em 2,5 mL dos extratos nas diferentes concentrações (5, 10, 25, 50, 125, e 250 ppm em metanol) do extrato dos cogumelos e em temperatura ambiente. Após 30 minutos os valores de absorvância foram lidos a 518 nm e convertidos em porcentagem de atividade antioxidante. Metanol (1,0 mL) mais 2,5 mL do extrato foi utilizado como branco e 1,0 mL da solução de DPPH mais 2,5 mL de etanol foi utilizado como controle negativo.

Para a obtenção da atividade antioxidante (%AA), a seguinte equação (3) foi utilizada:

$$AA\% = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) * 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (3)$$

onde AA% é a porcentagem de atividade antioxidante, $Abs_{amostra}$ é a absorvância da amostra, Abs_{branco} é a absorvância do branco, e $Abs_{controle}$ é a absorvância do controle. Os valores do EC_{50} foram calculados pela regressão linear dos dados de porcentagem média da atividade antioxidante (ordenada) e concentração dos extratos (abscissa) das seis diferentes concentrações dos extratos de cogumelos.

4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO BETA-CAROTENO/ÁCIDO-LINOLÉICO

A atividade antioxidante também foi determinada pelo método beta- caroteno/ ácido linoléico de acordo com a metodologia de Emmons et al. (1999) com

modificações proposta por Prado (2009). Uma alíquota de 3 mL da emulsão β -caroteno/ácido linoléico foi misturada com 50 μ L dos extratos dos cogumelos na concentração de 100 mg/L e incubada em banho-maria à 50 °C. A oxidação da emulsão foi monitorada por espectrofotometria através da medida da absorbância durante 120 minutos. As amostras controle tiveram 50 μ L de metanol no lugar dos extratos dos cogumelos. Para o cálculo da atividade antioxidante pelo método beta-caroteno/ácido linoléico foi utilizada a seguinte equação (4):

$$AOA = 100 * \left(\frac{DR_c - DR_s}{DR_c} \right) \quad (4)$$

sendo que AOA é a atividade antioxidante, DR_c é a taxa de degradação do controle ($\ln(a/b) / 120$), DR_s é taxa de degradação da amostra ($\ln(a/b) / 120$), a é absorbância inicial no tempo zero, e b é a absorbância aos 120 min (HAMINIUK et al., 2011).

4.8 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada para quantificar a presença de compostos fenólicos individuais. Foi utilizado um sistema Dionex Ultimate 3000 HPLC (Dionex, Idstein, Alemanha) para qualificação e quantificação dos compostos fenólicos. Foi utilizado uma coluna de fase reversa Acclaim® 120, C18 5 mm 120 A (4,6 mm x 250 mm) para a separação dos compostos fenólicos. A coluna foi mantida a 40°C durante toda a análise e a detecção foi realizada em três comprimentos de onda (280, 300 e 320 nm). O volume de injeção das amostras foi de 10 μ L. A fase móvel (A) foi composta de água acidificada com ácido fosfórico 1% e metanol fase (B). A eluição dos compostos fenólicos foi realizada através de gradiente entre as duas fases móveis. Foi utilizado uma vazão de 1,0 mL/min e um tempo de corrida de 60

minutos. Os padrões de ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafêico, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico, rutina, miricetina, quercetina, caempferol foram utilizados para a obtenção da curva padrão de compostos fenólicos.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram realizados em triplicada para cada amostra. Os resultados foram expressos como valores médios \pm desvio padrão (SD). Teste t de Student foi usado para comparação entre duas médias, e a ANOVA foi utilizada para comparação de mais de duas médias. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando o Statistica software 7.1 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação de compostos fenólicos nos alimentos é de grande importância, e cada vez mais se mostra vantajosa, já que tais tem influência comprovada na prevenção de doença cardiovascular, doenças inflamatórias crônicas, inclusive câncer, além do alto poder antioxidante. Os fenóis conferem adstringência, amargura e coloração para os alimentos, particularmente quando os níveis de açúcar são baixos, como é o caso de vinho tinto, chá não adoçado e chocolate. Além disso, estudos com frutas e legumes mostram que estes também se apresentam ótimas fontes de compostos fenólicos (GENOVESE et al., 2008) (WATERHOUSE, 2002).

A Tabela 1 apresenta a quantidade de compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas determinadas nas amostras de cogumelos.

Tabela 1. Teores dos compostos fenólicos totais e flavonóides totais e antocianinas das três variedades de cogumelos.

Amostra	Teor dos compostos fenólicos totais (mg/g)	Teor de flavonóides totais (mg/g)	Teor de antocianinas (mg/100g)
Champignon	6,40 ± 0,22 ^a	2,36 ± 0,22 ^a	0 ^a
Shiitake	1,73 ± 0,11 ^b	2,00 ± 0,30 ^a	0 ^a
Shimeji	1,98 ± 0,12 ^b	1,10 ± 0,05 ^b	2,54 ± 0,13 ^b

*Resultados expressos em base seca (média ± desvio padrão).

*Amostras com letras diferentes, na mesma coluna, são significativamente diferentes no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

De acordo com a Tabela 1, a determinação para compostos fenólicos totais mostrou que houve diferença estatística entre o cogumelo Champignon e os demais, com $p \leq 0,05$, portanto, esta variedade se apresenta como o cogumelo de maior concentração de fenólicos totais (6,40 mg/g ± 0,22). As variedades Shimeji e Shiitake apresentaram teores equivalentes entre eles ($p > 0,05$).

Pauli (2010) e Dubost et. al. (2007), analisaram extratos de várias espécies de cogumelos, incluindo o Champignon. A concentração de compostos fenólicos

encontrada para a variedade Champignon foi de (6,00 mg/g \pm 0,46 e 8,0 mg/g, respectivamente) para cada trabalho. De acordo com os autores citados, a concentração de compostos fenólicos determinada confere ao cogumelo Champignon propriedades antioxidantes para agir em sistemas lipídicos. Conseqüentemente, esta variedade de cogumelo pode ser usada como uma fonte natural de antioxidantes ou como suplemento alimentar.

Tanto Dubost et. al. (2007) quanto Cheung et. al. (2003), avaliaram a espécie Shiitake, onde encontraram concentrações de compostos fenólicos superiores ao deste estudo (4,32 e 4,79 mg/g, respectivamente). O mesmo ocorreu para a variedade Shimeji no trabalho feito por Pauli (2010) que encontrou a concentração de fenólicos de (4,46 mg/g \pm 0,14).

Em relação aos flavonóides, as espécies Shiitake e Champignon mostraram-se estatisticamente iguais ao teste de Tukey, entretanto, o cogumelo Champignon obteve a maior concentração (2,36 mg/g \pm 0,22). De acordo com estudo realizado anteriormente por Barros et. al. (2008) e Pauli (2010), a quantificação de flavonóides totais para a variedade Champignon foi de (1,73 mg/g e 1,40 mg/g \pm 0,06, respectivamente). Estes dados são ligeiramente inferiores ao obtido neste trabalho.

A antocianina é um composto importante na representação dos pigmentos dos vegetais em geral (HARBORNE; GRAYER, 1988). Não se tem datado em pesquisas anteriores a determinação de antocianinas em variedades de cogumelos. Neste trabalho foi realizada a quantificação deste composto, e o mesmo só foi significativo para a variedade Shimeji (2.54 \pm 0,13 mg/100g). Logo, pode concluir que as antocianinas pouco são representativas na pigmentação dos cogumelos.

Fatores como substrato, clima, solvente utilizado, tempo de cultivo, diferença das espécies, entre outros, são variáveis que vem a interferir na quantificação dos compostos aqui estudados, o que justifica as várias divergências com estudos anteriores, bem como a presença de antocianina na variedade Shimeji.

A Tabela 2 e Tabela 3 indicam os resultados da análise de DPPH e beta-caroteno/ ácido linoléico, respectivamente, para as variedades de cogumelos avaliados em relação à porcentagem de atividade antioxidante nas diferentes concentrações

destes, e os valores de EC₅₀, que representam a concentração de extrato capaz de fornecer 50% de atividade antioxidante.

Tabela 2. Percentual da atividade antioxidante dos extratos de cogumelos e seus respectivos valores de EC₅₀ para o método DPPH.

Amostra						
Champignon	Concentração (µg/mL)					
	15,63	31,25	62,5	125	250	EC ₅₀
	3,83%	22,99%	41,69%	73,98%	89,66%	69,84
Shiitake	Concentração (µg/mL)					
	4,38	8,75	17,5	35	70	EC ₅₀
	6,62%	22,76%	50,52%	86,52%	90,01%	16,83
Shimeji	Concentração (µg/mL)					
	9,39	18,75	37,5	75	150	EC ₅₀
	8,36%	18,58%	45,87%	62,83%	96,51%	41,95

Tabela 3. Percentual da atividade antioxidante dos extratos de cogumelos e seus respectivos valores de EC₅₀ para o método beta- caroteno/ ácido linoléico.

Amostra						
Champignon	Concentração (µg/mL)					
	15,63	31,25	62,5	125	250	EC ₅₀
	24,25%	43,37%	66,94%	72,43%	77,66%	43,87
Shiitake	Concentração (µg/mL)					
	4,38	8,75	17,5	35	70	EC ₅₀
	27,02%	40,71%	44,17%	48,46%	64,78%	26,46
Shimeji	Concentração (µg/mL)					
	9,39	18,75	37,5	75	150	EC ₅₀
	12,05%	20,99%	26,53%	50,59%	54,44%	105,51

O DPPH é um ensaio rápido e fácil para se avaliar a atividade antioxidante (SILVA et al., 2005). O radical DPPH é um radical azotado orgânico estável, sendo

comercialmente útil e que apresenta uma coloração violeta intensa (AMAROWICZ et al., 2004) .Quando a solução de DPPH é misturada com a substância que pode doar um átomo de hidrogênio, é produzida a forma reduzida do radical acompanhado por perda da cor (ALI et al., 2008). De acordo com a Tabela 2, o cogumelo Champignon na concentração de 250 µg/mL teve um percentual de 89,66% da atividade antioxidante pelo método DPPH, já o Shiitake na concentração de 70 µg/mL teve um percentual de 90,01% e o Shimeji na concentração de 150 µg/mL teve um percentual de 96,51%, sendo que os resultados apresentaram um ajuste linear aceitável dos dados (R variou de 0.9576 a 0.9886) para as amostras. Os valores de EC₅₀ para os cogumelos analisados apresentaram valores variáveis para cada amostra, sendo que quanto menor os valores de EC₅₀ maior a atividade antioxidante, pois mostra que uma pequena quantidade de extrato do cogumelo é capaz de fornecer uma inibição de 50% considerada eficaz na remoção de radicais livres. A variedade Champignon apresentou uma maior quantidade de fenólicos totais, mas não foi tão eficiente na atividade antioxidante como se mostrou o Shiitaki, que apresentou o potencial de antioxidante mais alto para o DPPH com 16.83 ± 0.31 µg/mL. Em um estudo anterior de Pauli (2010) em que foram estudadas as mesmas espécies de cogumelos, verificou-se que o champignon e o Shimeji possuíam a maior atividade antioxidante, porém em seu estudo não foi aplicado o EC₅₀ e sim o percentual de inibição. Vários estudos têm correlacionado a grande quantidade de compostos fenólicos com a alta atividade antioxidante dos cogumelos (Cheung et. al. 2003; Dubost et. al. 2007). Neste trabalho não foi encontrada a mesma relação como mostra as tabelas discutidas. A atividade antioxidante exibida pelos extratos de cogumelos depende de vários fatores, como a concentração, a temperatura, o caráter hidrofóbico e hidrófilo, composição química, tratamento das amostras, entre outros.

A atividade antioxidante dos cogumelos também foi avaliada neste estudo pelo método do beta-caroteno, que se baseia na oxidação pelo calor induzido numa emulsão aquosa do sistema β-caroteno e ácido linoléico. A peroxidação lipídica é um processo complexo, entretanto, mais absoluto e muito usado nos laboratórios (ANTOLOVICH et al., 2002). O β-caroteno sofre uma descoloração na carência de um antioxidante uma vez que o radical livre derivado do ácido linoléico ataca a molécula de β-caroteno, que

perde a dupla ligação, perdendo sua coloração laranja característica (GUTIERREZ et al.,2006). Neste trabalho notou-se que a absorvância diminuiu rapidamente dentro das amostras sem um antioxidante, e a cor se manteve mais retida por muito mais tempo na presença de um antioxidante. Na Tabela 3 são indicados os resultados pelo método β -caroteno, e assim como o DPPH, a variedade Shiitaki se apresentou com a maior atividade antioxidante ($26,46 \pm 0.37 \mu\text{g/mL}$). O trabalho realizado por Queirós (2009) com outras variedades de cogumelos, porém aplicando os dois métodos para a determinação da atividade antioxidante, também tiveram o mesmo cogumelo como representativo nos dois métodos.

A Tabela 4 indica quais foram os compostos fenólicos e suas devidas concentrações identificados nas três variedades de amostras de cogumelos pela análise cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 4. Compostos fenólicos identificados nas amostras.

Champgnion		
Composto fenólico	Comprimento de onda	Concentração (mg/L)
Ácido gálico	280 nm	0,07
Ácido Cafêico	306 nm	0,08
Ácido p-Cumárico	306 nm	0,07
Ácido Siríngico	280 nm	0,12
Rutina	280 nm	5,93
Ácido trans-cinâmico	306 nm	0,19
Total		6,47mg/L
Shiitaki		
Composto fenólico	Comprimento de onda	Concentração (mg/L)
Ácido Gálico	306 nm	0,27
Catequina	280 nm	0,22
Ácido Siríngico	280 nm	0,058
Caempferol	280 nm	0,11
Total		0,66 mg/L
Shimeji		
Composto fenólico	Comprimento de onda	Concentração (mg/L)
Ácido p-cumárico	306 nm	0,08
Ácido Trans-cinâmico	280 nm	0,05
Total		0,13 mg/L

A análise por HPLC em cogumelos revelam a existência de vários ácidos fenólicos e flavonóides (RIBEIRO, 2007). Os dados da quantificação dos compostos identificados mostraram que as quantidades nos cogumelos estudados variaram. Estes compostos influenciam nas propriedades organolépticas dos cogumelos, e apresentam uma importante atividade biológica, como se verificou pelos resultados obtidos sobre a capacidade antioxidante dos cogumelos. O perfil fenólico obtido revelou que a rutina foi o composto principal, representando 91,7% do total identificado de compostos na variedade Champignon. A rutina é um dos flavonóides mais bioativos, também conhecido como vitamina P, e já descrito como um fator ativador para a vitamina C (GHICA, 2005). A espécie champignon também foi a que mais apresentou diferentes compostos fenólicos, seis, totalizando (6,47 mg/L). Os demais compostos fenólicos ponderados pouco tiveram representação e quantificação nas amostras analisadas.

6 CONCLUSÃO

O Champignon comparando aos outros cogumelos foi significativamente o que apresentou a maior quantidade de compostos fenólicos e flavonóides, sendo que a espécie Shiitake de acordo com os resultados do EC_{50} do método DPPH e Beta-Caroteno apresentou o melhor resultado com relação às propriedades antioxidantes. Com relação às análises de cromatografia de alta eficiência foi possível notar que a rutina foi o composto fenólico que apresentou maior concentração na espécie Champignon, sendo essa espécie com maior quantidade de compostos fenólicos. O desenvolvimento desse trabalho na quantificação de compostos fenólicos e propriedades antioxidantes dos cogumelos foram importantes, pois são mais dados sobre o assunto na literatura, uma vez que são ainda pouco explorados e de grande importância nutricional.

REFERÊNCIAS

ALI, S. S.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A.; BORA, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Res. Int.**, 41: 1-15, 2008.

ALMEIDA, J. M. D.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p. 446-452, Campinas, 2006.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the canadian prairies. **Food Chem.**, 84: 551-562, 2004.

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

ANGELO, P.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**, v.66, n.1, 2007.

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

BARROS, L.; CRUZ, T.; BAPTISTA, P.; ESTEVINHO, L. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Wild and commercial mushrooms as souce of nutrients and nutraceuticals. **Food. Chem. Toxic.**, V.46, p. 2742-2747, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - CNNPA nº 12, de 1978**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78_cogumelos.htm. Acesso em: 24 mar. 2012.

CHANG, C. C.; YANG, M. H.; WEN, H. M. & CHERN, J. C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, 10, 178–182, 2002.

CHEUNG, L. M.; CHEUNG, Peter C. K.; OOI, Vincent E. C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, Ed. Elsevier, vol. 81, p.249-255, mai. 2003.

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

EIRA, A. F. **Cultivo de Cogumelos (Compostagem, Condução e Ambiente**. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/IIIRifib/71-81.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2012.

EKANEM, E. O.; UBENGAMA, V. S. Chemical composition, anti-nutritional factors and shelf-life of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). **Journal of Food Science Technology**, v. 39, n. 6, p. 635-338, 2002.

EMMONS, C.L.; PETERSON, D.M. & PAUL, G.L. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47, 4894–4898, 1999.

FILHO, J. M.; MANCINI, D. A. P. **Prevenção de reações oxidativas: antioxidantes nos vegetais de consumo humano**. 2008. Disponível em: http://www.oleosegorduras.org.br/imagens/file/Prevencao_reacoes_oxidativas_antioxidantes_vegetais.pdf. Acesso em: 22 abr. 2012.

FORTES, R. C.; NOVAES, M. R. C. G. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos *Agaricales* e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 52(4): 363-371, 2006.

FURLANI, R. P. Z; GODOY, H. T. Valor Nutricional de Cogumelos Comestíveis. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 27(1): 154-157, jan.-mar, 2007.

GENOVESE, M. I.; PINTO, S. M.; GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology International**, 14, 207–214, 2008.

GHICA, M. E.; BRETT, A. M. O. **Electroanal**, 17(4), 313, 2005.

GIUSTI, M. M. & WROLSTAD, R. E. Anthocyanins: Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York, Wiley, 2001.

GUTIERREZ, R. M. P.; LUNA, H. H.; GARRIDO, S. H. Antioxidant activity of *Tagetes erecta* essential oil. *J Chill. Chem. Soc.*, 51: 883-886, 2006.

HAMINIUK, C. W. I.; PLATA, M. S. V.; GUEDES, A. R.; STAFUSSA, A. P.; BONA, E.; CARPES, S. T. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science & Technology (Print)**, v. 46, p. 1529-1537, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2011.02653.x

HARBORNE, J. B.; GRAYER, R. J., The anthocyanins. **In: The flavonoids: advances in research since 1980**. Chapman & Hall, London, p. 1-20, 1988.

KITZBERGER, C. S. G. **Obtenção de Extrato de Cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) com CO₂ a Alta Pressão**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2005.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 639-644, Campinas, 2006.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G. et al.. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, 15, 127–130, 2001.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Fortaleza, CE. Jan/Mar 2009.

MOURA, P. L. C. **Determinação de Elementos Essenciais e Tóxicos em Cogumelos Comestíveis por Análise por Ativação com Nêutrons**. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2008.

PAULI, P. A. **Avaliação da Composição Química, Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante em Cogumelos Comestíveis**. Dissertação (Mestrado) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, Araraquara, SP, 2010.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais.** Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), São Paulo, 2009.

QUEIRÓS, B. C. R. **Efeitos Sinérgicos da Capacidade Antioxidante de Cogumelos.** Dissertação (Mestrado), Universidade de Aveiro, Portugal, 2009.

RENZ, S. V. **Oxidação e antioxidantes.** UFRGS, 2003. Disponível em: http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/restrito/pdf/oxid_antiox.pdf. Acesso em: 23 abr. 2012.

RIBEIRO, B.; VALENTÃO, P.; BAPTISTA, P.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B. Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). **Food and Chemical Toxicology**, 45 1805–1813, 2007.

ROCHA, J. **Antioxidantes e suas Funcionalidades: aditivos e ingredientes.** Technical Services da Kemin South - America Kemin do Brasil Ltda. Campinas, 2011. Disponível em: http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/89.pdf. Acesso em: 26 abr. 2012.

SILVA, A. C.; JORGE, N. Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes. **Cient Ciênc Biol Saúde**, 13(Esp):375-84, 2011.

SILVA, C.G., HERDEIRO, R.S., MATHIAS, C.J. et al. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, 52, 229–33, 2005.

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

SOARES, A. A. **Atividade antioxidante e compostos fenólicos do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill.** Dissertação (Mestrado) da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2007.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, Campinas, 2002.

SOUSA, J. B. A. S. P. **Actividade Biológica de derivados do Ácido Cafeico: Efeito antioxidante e anti-inflamatório**. Dissertação (Mestrado), Universidade do Porto, Portugal, 2008.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, 111, 816–823, 2008.

VILELA, P. S. **Cogumelos: Mercado e comercialização**. Disponível em: <http://www.faemg.org.br/Content.aspx?Code=353&ParentPath=None&ContentVersion=C>. Acesso em: 21 abr. 2012.

TAVEIRA, V. C; NOVAES, M. R. C. G. Consumo de cogumelos na nutrição humana: uma revisão da literatura. **Com. Ciências Saúde**, 18(4):315-322, 2007.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. **Current protocols in Food Analytical Chemistry (edited by J. Whitaker)**. Pp. 1073–1080. Davis, CA, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2002.