



Nuno Gomes Silva

Estudo da Capacidade Antioxidante de Cogumelos Comestíveis

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Professor Doutor Fernando Ramos e coorientada pela Doutora Ana Sanches Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Nuno Gomes Silva

Estudo da Capacidade Antioxidante de Cogumelos Comestíveis

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Professor Doutor Fernando Ramos e coorientada pela Doutora Ana Sanches Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

A presente dissertação de mestrado insere-se no Projecto n° 34076/2013 submetido pela empresa iFungHealth – Fungi Innovation Solutions for Health, Lda. no âmbito do concurso SI I&DT (Projetos de Empresas Individuais) financiado pelo Mais Centro (Programa Operacional Regional do Centro) integrado no QREN (Quadro de Referência Estratégico Nacional) e do fundo Europeu FEDER (Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional), conforme publicação pelo Aviso de Concurso n° 07/SI/2012 e aprovação do mesmo.



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional

“O investigador que do processo só sabe os resultados nem os resultados sabe”

- Miguel Soares Albergaria

Agradecimentos

A realização de uma dissertação, devido à sua finalidade académica, é um trabalho individual, porém o sucesso desta etapa depende daqueles que nos acompanham, sejam professores, colegas, amigos ou familiares. Assim, a todos os que contribuíram diretamente ou indiretamente para a concretização deste objetivo deixo expressa a minha enorme gratidão.

À empresa iFungHealth pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho, em particular à Marta Leite pelos conselhos transmitidos e pelo apoio na realização deste projeto.

Ao Professor Doutor Fernando Ramos, que aceitou prontamente a orientação deste projeto, todo o apoio prestado e conhecimentos transmitidos.

À Doutora Ana Sanches Silva pelos conhecimentos técnico-científicos transmitidos e pela incansável disponibilidade que sempre demonstrou durante a concretização deste projeto.

À Professora Doutora Maria Conceição Castilho pela sua simpatia e disponibilidade em ajudar.

Às pessoas com quem tive a oportunidade de me cruzar no laboratório de Bromatologia. À D. Anabela e ao André. À Sofia e à Mariana, colegas de Mestrado, pela entreatajuda. E em particular à Patrícia Vicente pela disponibilidade que sempre demonstrou em ajudar.

Aos meus pais e irmã pelo apoio incondicional.

À Joana pelo apoio, paciência e conforto em todos os momentos.

Resumo

Os cogumelos comestíveis têm vindo assumir um papel importante na alimentação humana, tanto pelas suas características nutricionais e organoléticas singulares como pelas propriedades terapêuticas que possuem. A inclusão deste produto na dieta do Homem, com um consumo regular, provocou um aumento significativo da produção mundial nos últimos 20 anos, passando de 2,5 milhões de toneladas para cerca de 10 milhões de toneladas.

O presente trabalho teve como objetivos, estudar a influência da aplicação de subprodutos agroindustriais, durante o processo de produção, na capacidade antioxidante de cogumelos *P. eryngii*, *P. ostreatus* e *A. cylindracea*, e avaliar a capacidade antioxidante de cogumelos comercializados em grandes superfícies comerciais da Região de Coimbra. Para tal foi determinado o conteúdo em compostos fenólicos totais, o conteúdo em flavonóides totais, a capacidade de capturar eletrões pelo radical DPPH e a inibição do branqueamento do β -caroteno.

Os resultados obtidos para as espécies comercializadas, em termos de conteúdo em compostos fenólicos totais, foram os seguintes, em ordem decrescente: *B. edulis* >> *F. velutipes* > *A. bisporus* (castanho) > *P. eryngii* \approx *M. oreades* > *A. bisporus* (branco) \approx *L. edodes* > *P. ostreatus* > *C. cibarius*, dos quais o valor mais elevado foi 19,7 mg GAE/g extrato e o mais baixo 3,45 mg GAE/g extrato. A capacidade de capturar radicais DPPH foi a seguinte em ordem crescente do EC_{50} : *B. edulis* >> *F. velutipes* > *A. bisporus* (branco) > *P. ostreatus* \approx *L. edodes* > *A. bisporus* (castanho) > *P. eryngii* > *M. oreades*, em que os EC_{50} variaram entre 2,01 mg/mL e 13,5 mg/mL. Em termos de inibição do branqueamento do β -caroteno, os valores dos AAC variaram entre 352 e 986 com a seguinte ordem decrescente: *A. bisporus* (castanho) > *B. edulis* > *L. edodes* > *F. velutipes* > *A. bisporus* (branco) > *P. eryngii* > *P. ostreatus* > *M. oreades* >> *C. cibarius*.

Nos resultados obtidos para os cogumelos em que o processo de produção foi otimizado com a aplicação de subprodutos agroindustriais, em termos do conteúdo em compostos fenólicos totais, foi obtida a seguinte ordem decrescente: *A. cylindracea* (13,6 a 15,4 mg GAE/g extrato) > *P. ostreatus* (8,02 a 10,0 mg GAE/g extrato) > *P. eryngii* (4,04 a 6,75 mg GAE/g extrato). No que respeita à capacidade de capturar radicais DPPH foram obtidos os seguintes EC_{50} em ordem crescente: *A. cylindracea* (3,08 - 4,49 mg/mL) > *P. ostreatus* (4,09 - 5,11 mg/mL) > *P. eryngii* (8,34 - 22,9 mg/mL). Relativamente à inibição do branqueamento do β -caroteno, o AAC foi superior para a *A. cylindracea* (796 a 818) seguido do *P. ostreatus* (440 a 554) e do *P. eryngii* (312 a 645).

Os resultados obtidos para as várias amostras de cada espécie sugerem que a aplicação de subprodutos agroindustriais poderá melhorar a capacidade antioxidante dos cogumelos. No estudo dos micélios destas espécies, o micélio de *A. cylindracea* possui a melhor capacidade antioxidante, seguido pelo micélio de *P. eryngii* e depois o micélio de *P. ostreatus*.

O conteúdo em flavonóides totais foi quantificado apenas em *B. edulis* (4,32 mg ECE/g extrato), *A. cylindracea* (13,8 - 15,9 mg ECE/g extrato) e micélio de *A. cylindracea* (3,76 mg GAE/g extrato).

Em conclusão, os resultados obtidos demonstram que os cogumelos são uma boa fonte de compostos com capacidade antioxidante, apresentando variações entre espécies e tipo de processo de cultivo.

Palavras-Chave: Cogumelos comestíveis; Compostos fenólicos; Flavonóides; Capacidade antioxidante; Subprodutos agroindustriais.

Abstract

Edible mushrooms have come to play an important role in human diet, both for its unique nutritional and organoleptic characteristics as well as for their therapeutic properties. The inclusion of mushrooms in diet, on regular basis, caused a significant increase in world production over the last 20 years, increasing from 2.5 million tonnes to about 10 million tonnes.

This work aimed to study the influence of application agro-industrial by-products during the cultivation process, in the antioxidant capacity of mushrooms *P. eryngii*, *P. ostreatus* and *A. cylindracea*, and to evaluate the antioxidant capacity of mushrooms commercialized in major supermarket chains of the region of Coimbra, Portugal. In order to achieve these the total phenolics content, total flavonoids content, the ability of capturing electrons by DPPH radical and inhibition of the β -carotene bleaching (AAC) were determined.

The results for commercialized mushrooms, in terms of total phenolics content were the following in descending order: *B. edulis* >> *F. velutipes* > *A. bisporus* (brown) > *P. eryngii* \approx *M. oreades* > *A. bisporus* (white) \approx *L. edodes* > *P. ostreatus* > *C. cibarius*, where the highest value was 19.7 mg GAE/g extract and the lowest 3.45 mg GAE /g extract. The ability to capture DPPH radicals was in following in ascending order of EC_{50} : *B. edulis* >> *F. velutipes* > *A. bisporus* (white) > *P. ostreatus* \approx *L. edodes* > *A. bisporus* (brown) > *P. eryngii* > *M. oreades*, where EC_{50} ranged from 2.01 mg/ mL and 13.5 mg/ml. In terms of inhibition of the β -carotene bleaching, the results of AAC varied between 352 and 986 with the following descending order: *A. bisporus* (brown) > *B. edulis* > *L. edodes* > *F. velutipes* > *A. bisporus* (white) > *P. eryngii* > *P. ostreatus* > *M. oreades* >> *C. cibarius*.

The results obtained for the mushrooms in which the optimized growing process applied agro-industrial by-products was in the following in descending order of the total phenolics content: *A. cylindracea* (13.6 to 15.4 mg GAE/g extract) > *P. ostreatus* (8.02 to 10.0 mg GAE/g extract) > *P. eryngii* (4.04 to 6.75 mg GAE/g extract). In what respects to the ability to capture DPPH radicals the following results were achieved in ascending order of EC_{50} : *A. cylindracea* (3.08 - 4.49 mg/ml) > *P. ostreatus* (4.09 - 5.11 mg/ml) > *P. eryngii* (8.34 - 22.9 mg/ml). In relation to the inhibition of the β -carotene bleaching, the results of AAC was higher for *A. cylindracea* (796 - 818), following *P. ostreatus* (440 - 554) and *P. eryngii* (312 - 645).

The results obtained for several samples suggested that the application of agro-industrial by-products can improve the antioxidant capacity of mushrooms. In the study of mycelia of

these species, the mycelium of *A. cylindracea* has the highest antioxidant capacity, followed by *P. eryngii* mycelium, and then by the mycelium of *P. ostreatus*.

The total flavonoids content was quantified, only, in *B. edulis* (4.32 mg ECE/g extract), *A. cylindracea* (13.8 - 15.9 mg ECE/g extract) and mycelium of *A. cylindracea* (3.76 mg GAE/g extract).

In conclusion, the results show that the mushrooms are a good source of compounds with antioxidant capacity, with variations among species and type of cultivation process.

Keywords: Edible mushrooms; Phenolic compounds; Flavonoids; Antioxidant capacity; Agro-industrial by-products.

Abreviaturas

AAC – Coeficiente de atividade antioxidante (do inglês, *Antioxidant Activity Coefficient*)

ABAP – dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamida)

Abs – Absorvância

ABTS – 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

ADN – Ácido desoxirribonucleico

a_w – Atividade da água

BHA – Butil-hidroxianilose

BHT – Butil-hidroxitolueno

CV – Coeficiente de Variação

DP – Desvio-Padrão

DPPH· – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

dw – Peso seco (do inglês, *dry weight*)

ECE – Equivalentes de Epicatequina (do inglês, *EpiCatechin Equivalents*)

EC₅₀ – Concentração de extrato que causa uma diminuição de 50% na concentração inicial do radical DPPH

ET – Transferência de elétrons (do inglês, *Electron Transfer*)

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês, *Food and Agriculture Organization*)

fw – Peso fresco (do inglês, *fresh weight*)

FRAP – Poder antioxidante por redução do íon Férrico (do inglês, *Ferric Reducing Antioxidant Power*)

g – grama

GAE – Equivalentes de Ácido Gálico (do inglês, *Gallic Acid Equivalents*)

h – hora

HAT – Transferência de átomos de hidrogénio (do inglês, *Hydrogen Atom Transfer*)

kg – quilograma

kcal – quilocaloria

L – litro

MDA – Malondialdeído

mg – miligrama

min – minutos

mL – mililitro

MUFA – Ácidos gordos monoinsaturados (do inglês, *Monounsaturated fatty acids*)

n – número de réplicas

nd – não detetado

nm – nanómetro

ORAC – Capacidade de absorção de radicais de oxigénio (do inglês, *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

p. a. – *pro analysis*

PG – Galato de propilo

PUFA – Ácidos gordos polinsaturados (do inglês, *Polyunsaturated fatty acids*)

QE – Equivalentes de quercetina (do inglês, *Quercetin Equivalents*)

RE – Equivalentes de Rutina (do inglês, *Rutin Equivalents*)

ROS – Espécies reativas de oxigénio (do inglês, *Reactive oxygen species*)

RNS – Espécies reativas de azoto (do inglês, *Reactive nitrogen species*)

rpm – rotações por minuto

r² – Coeficiente de determinação

SFA – Ácidos gordos saturados (do inglês, *Saturated fatty acids*)

t – tempo

TBARS – Sustâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (do inglês, *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)

TBHQ – terc-Butil-hidroquinona

TEAC – Capacidade Antioxidante em Equivalente Trolox (do inglês, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)

TFC – Conteúdo em flavonóides totais (do inglês, *Total Flavonoids Content*)

TPC – Conteúdo em compostos fenólicos totais (do inglês, *Total Phenolics Content*)

TRAP – Parâmetro antioxidante de radicais totais (do inglês, *Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*)

°C – graus Celsius

µg – micrograma

µL – microlitro

%PI – Percentagem de Inibição

Índice Geral

Agradecimentos.....	V
Resumo.....	VI
Abstract.....	VIII
Abreviaturas.....	X
Índice Geral.....	XII
Índice de Figuras.....	XIV
Índice de Tabelas.....	XV
Capítulo I - Introdução.....	1
1. Introdução.....	2
1.1 Os macrofungos: Cogumelos.....	4
1.2 Cultivo de cogumelos.....	6
1.3 Caracterização das espécies.....	7
1.4 Importância dos cogumelos na alimentação.....	9
1.5 Valor Nutricional.....	10
1.5.1 Proteínas.....	11
1.5.2 Lípidos.....	11
1.5.3 Hidratos de Carbono.....	12
1.5.4 Composição Mineral.....	13
1.5.5 Sabor característico.....	14
1.6 Antioxidantes.....	15
1.7 Radicais livres e Stress Oxidativo.....	16
1.8 Compostos antioxidantes naturais.....	19
1.8.1 Compostos fenólicos.....	19
1.8.2 Tocoferóis.....	21
1.8.3 Ácido ascórbico.....	21
1.8.4 Carotenóides.....	22
1.9 Métodos para determinação <i>in vitro</i> da capacidade antioxidante.....	23
1.9.1 Mecanismos de reação: Transferência de átomos de hidrogénio (HAT) e transferência de eletrões (ET)	23
1.9.1.1 Métodos baseados em HAT: ORAC, TRAP, TBARS, β -Caroteno/Ác. linoleico.....	24
1.9.1.2 Métodos baseados em ET: Folin-Ciocalteu, radical DPPH, TEAC, FRAP.....	25
1.9.2 Determinação do conteúdo em flavonóides totais.....	27
Capítulo II - Objetivos.....	28
2. Objetivos.....	29
Capítulo III - Materiais e Métodos.....	30
3. Materiais e Métodos.....	31
3.1 Amostragem.....	32

3.2	Reagentes e materiais.....	32
3.2.1	Reagentes.....	32
3.2.2	Material laboratorial.....	33
3.3	Procedimento Experimental.....	33
3.3.1	Preparação e extração da amostra.....	33
3.3.2	Métodos analíticos.....	34
3.3.2.1	Determinação do conteúdo em compostos fenólicos totais.....	34
3.3.2.1.1	Mecanismo da reação.....	35
3.3.2.2	Determinação do conteúdo em flavonóides totais.....	35
3.3.2.2.1	Mecanismo da reação.....	36
3.3.2.3	Capacidade de capturar eletrões pelo radical DPPH.....	36
3.3.2.3.1	Mecanismo da reação.....	38
3.3.2.4	Inibição do branqueamento do β -caroteno.....	39
3.3.2.4.1	Mecanismo da reação.....	40
Capítulo IV - Resultados e Discussão.....		41
4.	Resultados e Discussão.....	42
4.1	Estudos Preliminares.....	42
4.1.1	Procedimento Experimental (inicial).....	42
4.1.1.1	Processo de extração (inicial).....	42
4.1.1.2	Capacidade de capturar eletrões pelo radical DPPH (inicial).....	42
4.1.2	Resultados preliminares.....	43
4.2	Otimização do procedimento experimental.....	45
4.2.1	Parâmetros avaliados.....	46
4.2.1.1	Processo de extração.....	46
4.2.1.2	Capacidade captadora de eletrões pelo radical DPPH.....	46
4.2.2	Resultados da otimização.....	47
4.3	Discussão de Resultados.....	48
4.3.1	Cogumelos comercializados.....	48
4.3.2	Cogumelos de processo de cultivo otimizado.....	53
4.3.3	Capacidade antioxidante do BHT e Ácido Gálico.....	59
4.3.4	Correlação do TPC com a capacidade antioxidante.....	60
4.3.5	Determinação do conteúdo em flavonóides totais.....	61
Capítulo V - Conclusão.....		63
5.	Conclusão.....	63
Capítulo VI - Perspetivas Futuras.....		66
6.	Perspetivas Futuras.....	67
Referências Bibliográficas.....		68

Índice de Figuras

Figura 1. Evolução da produção mundial de cogumelos e trufas entre 1993 e 2013. Valores expressos em milhões de toneladas (FAOSTAT, 2015).....	2
Figura 2. Evolução da produção de cogumelos e trufas em Portugal entre 1993 e 2013. Valores expressos em toneladas (FAOSTAT, 2015).....	3
Figura 3. Estrutura comum de cogumelo Basidiomycota (Adaptado de Kalac, 2009)	4
Figura 4. Esquema representativo das principais vias de produção de ROS e RNS (fonte: Ferreira & Abreu, 2007).....	18
Figura 5. Determinação dos compostos fenólicos totais. (A) solução de reagente Folin-Ciocalteu e amostra em tubos de ensaio; (B) adição de Na ₂ NO ₃ à solução com formação da coloração característica da presença de compostos fenólicos.	34
Figura 6. Estrutura genérica dos flavonóides (fonte: Ferreira et al., 2009).....	36
Figura 7. Realização do ensaio da capacidade de capturar eletrões pelo radical DPPH.....	37
Figura 8. (A) - Mecanismo da reação da molécula DPPH· na presença de um antioxidante “A”; (B) - coloração da solução de radicais DPPH; (C) - coloração da solução de DPPH na forma reduzida.	38
Figura 9. Realização do ensaio da inibição do branqueamento do β-caroteno.....	39
Figura 10. Relação entre o conteúdo em compostos fenólicos totais, TPC (mg GAE/g extrato) e a capacidade de inibir o branqueamento do β-caroteno, AAC (A) e entre o conteúdo em compostos fenólicos totais, TPC (mg GAE/g extrato) e a capacidade de capturar radicais DPPH, EC ₅₀ (mg/mL) (B).	60
Figura 11. Realização do método para determinação do TFC para o extrato de <i>P. eryngii</i> comercial. Da esquerda para a direita, utilização de extrato sem diluição, utilização de extrato diluído (1:10) e utilização de metanol (branco). Coloração formada depois da adição de AlCl ₃ (A) e depois da adição de NaOH (B).....	61
Figura 12. Realização do método para determinação do TFC para o extrato (1:1) de <i>P. eryngii</i> comercial fortificado com epicatequina. Coloração formada depois de adicionado AlCl ₃ (A) e coloração formada depois de adicionado NaOH (B).....	61

Índice de Tabelas

Tabela 1. Classificação taxonómica das espécies selecionadas para o presente estudo (fonte: Mycobank Database).....	5
Tabela 2. Caracterização geral das espécies de cogumelos em estudo (fonte: Baptista-Ferreira, 2013; RogersMushrooms.com; MushroomExpert.com).....	7
Tabela 3. Composição nutricional de cogumelos. Nota: a – amostra silvestre; b– amostra de cultivo/comercial; ^f w– por peso fresco; dw – por peso seco.....	10
Tabela 4. Composição dos cogumelos em açúcares e ácidos gordos. Os ácidos gordos são expressos em % do total de ácidos gordos, SFA (ácidos gordos saturados), MUFA (ácidos gordos monoinsaturados), PUFA (ácidos gordos polinsaturados). Nota: a – amostra silvestre; b– amostra de cultivo/comercial; c- amostra comercial desidratada; fw – por peso fresco; dw – por peso seco.	13
Tabela 5. Conteúdo em compostos fenólicos totais e conteúdo em flavonóides totais. Nota: GAE – equivalentes de ácido gálico; ECE – equivalentes de epicatequina; RE – equivalentes de rutina; QE – equivalentes de quercetina; a – amostra silvestre; b - amostra de cultivo/comercial; c - amostra seca em estufa; d – amostra liofilizada; e – amostra comercial desidratada.....	20
Tabela 6. Composição de tocoferóis, ácido ascórbico, β -caroteno e licopeno em cogumelos. Nota: a – amostra silvestre; b– amostra de cultivo/comercial; c- amostra comercial desidratada; fw– por peso fresco; dw – por peso seco; nd – não detetado.....	22
Tabela 7. Caracterização das amostras de cogumelos relativamente ao processo de produção.	31
Tabela 8. Resultados de estudos preliminares. Conteúdo em compostos fenólicos totais, média \pm DP (n=9), expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg GAE/g extrato); Conteúdo em flavonóides totais, média \pm DP (n=9), expressos em mg de equivalente de epicatequina por g de extrato (mg ECE/g extrato); Capacidade de capturar eletrões pelo radical DPPH, EC ₅₀ (mg/mL), média \pm DP (n=3) e Ensaio da inibição do branqueamento do caroteno, resultados expressos pelo coeficiente de atividade antioxidante (AAC), média \pm DP, n=3. nd – não detetado.....	45
Tabela 9. Otimização do processo de extração através da determinação do conteúdo em compostos fenólicos totais (mg GAE/g extrato), média \pm DP (n=9); capacidade de capturar eletrões pelo radical DPPH (EC ₅₀ mg/mL), média \pm DP (n=3); e inibição do branqueamento do β -caroteno (AAC), média \pm DP (n=3).....	48
Tabela 10. Cogumelos comercializados. Conteúdo em compostos fenólicos totais, média \pm DP (n=9), expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg GAE/g extrato); Conteúdo em flavonóides totais, média \pm DP (n=9), expressos em mg de equivalente de epicatequina por g de extrato (mg ECE/g extrato); Capacidade de capturar eletrões pelo radical DPPH, EC ₅₀ (mg/mL), média \pm DP (n=3) e Inibição do branqueamento do caroteno, resultados expressos pelo coeficiente de atividade antioxidante (AAC), média \pm DP, n=3; nd – não detetado.	49
Tabela 11. Cogumelos de produção. Conteúdo em compostos fenólicos totais, média \pm DP (n=9), expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg GAE/g extrato); Conteúdo em flavonóides totais, média \pm DP (n=9), expressos em mg de equivalente de epicatequina por g de extrato (mg ECE/g extrato); Capacidade de capturar eletrões pelo radical DPPH, EC ₅₀ (mg/mL), média \pm DP (n=3) e Inibição do branqueamento do β -caroteno, resultados expressos pelo coeficiente de atividade antioxidante (AAC), média \pm DP, n=3; nd – não detetado.	54

- Tabela 12.** Capacidade antioxidante do ácido gálico e do BHT. Capacidade de capturar elétrons pelo radical DPPH, EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$), média \pm DP ($n=3$) e Inibição do branqueamento do β -caroteno, resultados expressos pelo coeficiente de atividade antioxidante (AAC), média \pm DP ($n=3$)..... 59
- Tabela 13.** Conteúdo em flavonóides totais expressos em mg de equivalentes de epicatequina (ECE) por g de extrato, média \pm DP ($n=3$), correspondente às absorvâncias obtidas para o extrato 1:1, extrato 1:10 e branco. DP – desvio-padrão, CV – coeficiente de variação..... 62
- Tabela 14.** Fortificação do extrato 1:1 com várias concentrações de epicatequina (Epi) e determinação do TFC no extrato através da diferença entre os valores da fortificação e a epicatequina adicionada. Conteúdo em flavonóides totais expresso em mg de equivalentes de epicatequina (ECE) por g de extrato, média \pm DP ($n=3$). DP – desvio-padrão, CV – coeficiente de variação..... 62
- Tabela 15.** Fortificação do extrato 1:10 com várias concentrações de epicatequina (Epi) e determinação de TFC no extrato através da diferença entre os valores da fortificação e a epicatequina adicionada. Conteúdo em flavonóides totais expresso em mg de equivalentes de epicatequina (ECE) por g de extrato, média \pm DP ($n=3$). DP – desvio-padrão, CV – coeficiente de variação..... 62

Capítulo I

Introdução

I. Introdução

Os cogumelos têm assumido cada vez mais importância para o Homem, tanto pelo seu valor nutricional enquanto alimento, como por serem considerados uma fonte de compostos bioativos com propriedades terapêuticas.

Os cogumelos (frutificações de fungos) são utilizados pelo Homem desde sempre, sendo colhidos na natureza, onde surgem de forma sazonal. Assim, o interesse em cultivar este produto de elevada importância iniciou-se na China por volta do ano 600 a.C com a produção de cogumelos dos géneros *Volvaricella* e *Auricularia*. Porém, foi mais tarde, em França no séc. XVII, que ocorreu uma importante mudança na produção comercial de cogumelos com a introdução e desenvolvimento das técnicas de cultivo da espécie *Agaricus bisporus* (Azevedo et al., 2012).

Nas últimas décadas tem existido um enorme interesse em estudar as características nutricionais, a presença de compostos bioativos e os efeitos do consumo de cogumelos. Este enorme interesse em estudar as várias espécies de cogumelos comestíveis aliado às características únicas que possuem (nutricionais e terapêuticas) e têm sido demonstradas, provocou uma mudança nos padrões de consumo de cogumelos, assistindo-se a um aumento significativo da produção mundial (Fig. 1) e da diversidade de espécies de cogumelos.

A espécie mais produzida no mundo é a *Agaricus bisporus* seguida pelas espécies *Lentinula edodes*, e *Pleurotus spp.* Porém, outras espécies têm vindo a assumir relevância na produção mundial, tais como, a *Auricularia auricula*, a *Flamulina velutipes* e a *Volvariella volvacea*.

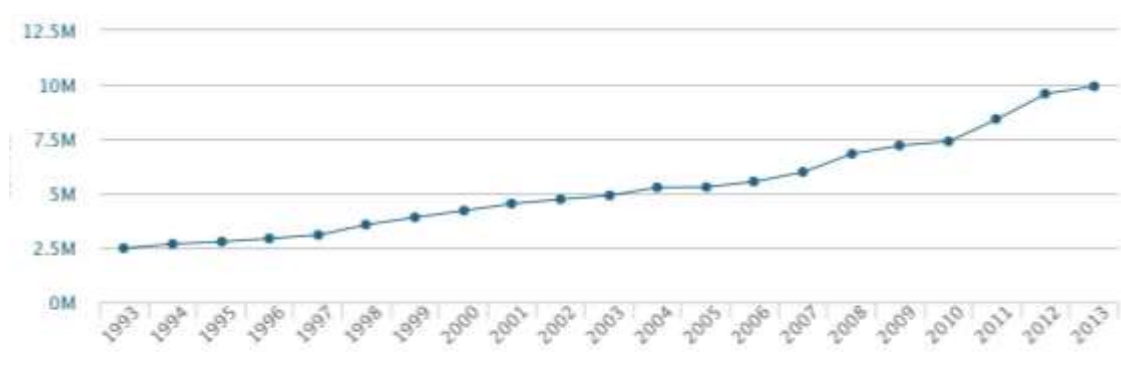


Figura 1. Evolução da produção mundial de cogumelos e trufas entre 1993 e 2013. Valores expressos em milhões de toneladas (FAOSTAT, 2015).

De acordo com dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a distribuição da produção mundial em termo geográficos, entre 1993 e 2013, foi liderada pela China, com 66,5% da produção mundial, seguida pela Europa, 23,8%, e as restantes regiões do mundo com cerca de 9,6%. Em Portugal a produção de cogumelos, entre 1993 e 2013 tem sofrido algumas oscilações, mantendo-se estável desde 2011 (Fig. 2). Em termos de espécies de cogumelos comercializadas (durante todo o ano) em Portugal, existem, o *Agaricus bisporus* (branco e castanho), *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes*, *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius* e *Marasmius oreades*.

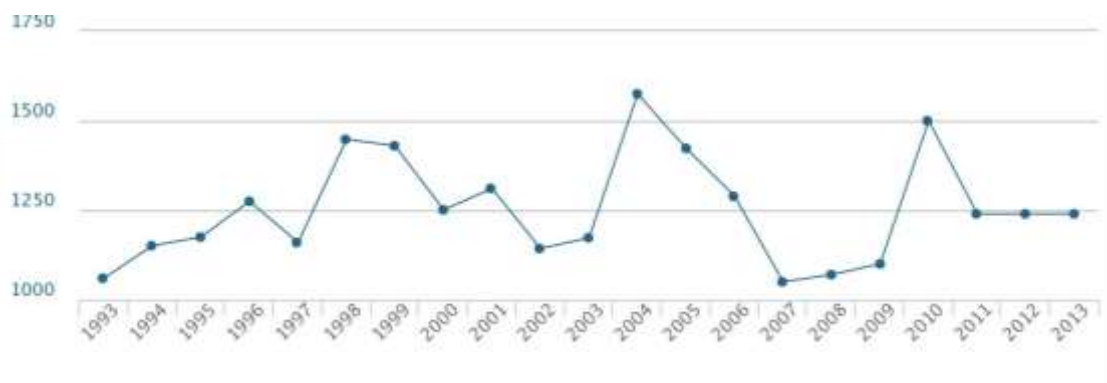


Figura 2. Evolução da produção de cogumelos e trufas em Portugal entre 1993 e 2013. Valores expressos em toneladas (FAOSTAT, 2015).

A par do aumento do consumo mundial de cogumelos urge a necessidade de melhorar a sua produção, tanto em termos de eficiência produtiva como da qualidade do cogumelo. Apostando-se na otimização do processo de cultivo de cogumelos, nomeadamente através da utilização de subprodutos agroindustriais.

I.1. Os macrofungos: Cogumelos

Os fungos são organismos com uma elevada diversidade e ubiqüitários na Terra. São seres eucariotas, onde se incluem microrganismos desde leveduras e bolores até cogumelos. Estes organismos possuem características particulares, como a presença de quitina nas paredes celulares (polímero de N-acetilglucosamina), são heterotróficos por absorção, apresentam reprodução assexuada e sexuada, produzindo esporos como produto final, são decompositores, parasitas e simbioses, possuem ergosterol nas membranas celulares, entre outras características (Martins, 2011).

Os cogumelos, organismos pertencentes, atualmente, às divisões Basidiomycota e Ascomycota do reino Fungi, consistem em macrofungos ou fungos superiores que formam um corpo frutífero (carpóforo, esporocarpo) que pode ser epígeo (acima do solo) ou hipógeo (debaixo do solo), grande o suficiente para ser visto a olho nu (Chang & Miles, 2004).



Figura 3. Estrutura comum de cogumelo Basidiomycota (Adaptado de Kalac, 2009).

Os fungos possuem uma componente vegetativa constituída por filamentos de células – as hifas – que formam uma rede sobre o substrato, constituindo o micélio, que desempenha funções vegetativas, como a ingestão de alimento, assimilação, respiração e excreção. Quando ocorre a fusão de hifas compatíveis, o micélio formado pode desenvolver-se rapidamente e em condições favoráveis originar a formação do corpo frutífero, com a função de produzir esporos. A componente reprodutiva, da qual resulta o corpo frutífero do fungo, pode ser sexual e/ou assexual (Chang & Miles, 2004; Martins, 2011).

Os cogumelos e os fungos em geral, como organismos heterotróficos por absorção, precisam de se relacionar com o meio que os rodeia para conseguirem obter alimento. Ou seja, estes organismos obtêm os nutrientes orgânicos a partir de materiais orgânicos complexos encontrados em tecidos mortos ou vivos de plantas e animais. A forma como os fungos obtêm o alimento e se relacionam com o meio permite dividi-los em três grupos funcionais diferentes – saprófitas, parasitas e simbiontes (micorrízicos) (Chang & Miles, 2004).

Os fungos saprófitos obtêm os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento através da decomposição da matéria morta como resíduos de culturas agrícolas, excrementos de animais, madeira de árvores mortas, húmus, folhas, cascas de árvores de folha caduca, solos queimados, entre outras formas. Os fungos parasitas invadem um hospedeiro vivo (vegetal, animal ou fungo) e desenvolvem-se utilizando produtos da degradação dos seus componentes. Este grupo de fungos provoca enormes preocupações aos agricultores, pois podem causar danos significativos nas culturas agrícolas. Os fungos simbiontes, no caso dos cogumelos - os micorrízicos, vivem numa associação de simbiose mutualista com as raízes das plantas. Ou seja, esta associação permite que o fungo receba nutrientes orgânicos da planta enquanto esta obtém do fungo minerais presentes no solo (fósforo, potássio, azoto), água e proteção contra toxinas e agentes patogénicos (Chang & Miles, 2004; Martins, 2011).

Na tabela I é descrita a classificação taxonómica das espécies relativamente à ordem, família e género. Todas as espécies selecionadas para o presente estudo derivam da classe Agaricomycetes (Reino Fungi, Divisão Basidiomycota).

Tabela I. Classificação taxonómica das espécies selecionadas para o presente estudo (fonte: Mycobank Database).

Espécie	Ordem	Família	Género	Referência
<i>Agaricus bisporus</i>	Agaricales	Agaricaceae	<i>Agaricus</i>	(J. E. Lange) Imbach
<i>Agrocybe cylindracea</i>	Agaricales	Strophariaceae	<i>Agrocybe</i>	(DC. ex Fr.) Maire
<i>Boletus edulis</i>	Boletales	Boletaceae	<i>Boletus</i>	Bull
<i>Cantharellus cibarius</i>	Cantharellales	Cantharellaceae	<i>Cantharellus</i>	L. ex Fr.
<i>Flammulina velutipes</i>	Agaricales	Phialacriaceae	<i>Flammulina</i>	(Curt.:Fries) Singer
<i>Lentinula edodes</i>	Agaricales	Omphalotaceae	<i>Lentinula</i>	(Berk.) Pegler
<i>Marasmius oreades</i>	Agaricales	Marasmiaceae	<i>Marasmius</i>	(Bolt ex Fr.) Fr.
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Agaricales	Pleurotaceae	<i>Pleurotus</i>	(Jacq. ex Fr.) P. Kumm
<i>Pleurotus eryngii</i>	Agaricales	Pleurotaceae	<i>Pleurotus</i>	(DC.) Quéf.

I.2. Cultivo de cogumelos

O processo de cultivo de cogumelos tem vindo a evoluir consideravelmente nos últimos anos, acompanhando o aumento significativo do seu consumo, como descrito anteriormente. A automatização do processo, a composição dos substratos e a preparação dos inóculos são alguns dos fatores que tem evoluído e que permitem melhorar a produtividade e a qualidade dos cogumelos (Chang & Miles, 2004).

O processo de cultivo envolve um conjunto de etapas (produção de micélio puro, produção do inóculo, preparação do substrato, inoculação, incubação e frutificação) que dependem da espécie a cultivar e devem ser realizadas com eficácia, pois influenciam a qualidade e a produtividade do cogumelo. A primeira etapa envolve a obtenção de micélio puro da espécie pretendida através dos esporos ou de um fragmento específico do cogumelo. Após o crescimento do micélio (em meio de cultura próprio), procede-se à produção do inóculo através da transferência de *plugs* de micélio para grãos de cereais (trigo ou centeio) previamente sujeitos a um processo de encharcamento durante a noite com água ou soluções de subprodutos agroindustriais, e, eventualmente, com adição de suplementos (e.g. CaCO_3 e CaSO_4) e meios de cultura líquidos. A finalidade dos grãos revestidos com micélio, comumente denominado de “*spawn*”, é colonizar rapidamente o substrato. O êxito da produção depende, em grande parte, da qualidade do “*spawn*”, pois deve ser produzido sob condições estéreis para evitar a contaminação do substrato (Sánchez, 2010).

A preparação do substrato é uma etapa crucial, nomeadamente na sua composição que varia consoante a espécie de cogumelo. Na constituição do substrato podem ser utilizados vários subprodutos de origem agrícola, florestal ou industrial, os quais são igualmente sujeitos à fase de encharcamento acima descrita, de modo a adquirir a humidade pretendida. Posteriormente, os substratos são esterilizados para evitar contaminações. Após esta preparação, procede-se à inoculação do substrato usando *spawn* ou cultura líquida de micélio (Chang & Miles, 2004).

Depois da inoculação do substrato, inicia-se a fase de incubação em condições de humidade e temperatura controladas e na ausência de luz. Quando o substrato está todo envolvido pelo micélio, inicia-se a fase de frutificação, também em condições de humidade, temperatura e luz controladas (Ferreira, 2014).






I.3. Caracterização das espécies

Na tabela 2 são descritas algumas características gerais das espécies de cogumelos em estudo, tais como: o nome comum pelo qual são conhecidos, a classificação quanto à fonte de alimento (saprófitos, parasitas, micorrízicos) e a classificação quanto à comestibilidade (bom, muito bom e excelente) assim como o odor e sabor característicos.

Tabela 2. Caracterização geral das espécies de cogumelos em estudo (fonte: Baptista-Ferreira, 2013; RogersMushrooms.com; MushroomExpert.com).

Espécie	Nome comum	Ecologia	Comestibilidade	
<i>A. bisporus</i> (branco)	Cogumelo branco, Champignon	Saprófito	Muito bom (é o cogumelo mais utilizado na alimentação) Odor e sabor agradáveis.	
<i>A. bisporus</i> (castanho)	Cogumelo castanho, Portobello			
<i>A. cylindracea</i>	Cogumelo dos choupos	Saprófito	Muito bom, sobretudo em jovem. Odor a barril velho de vinho, sabor a avelã.	
<i>B. edulis</i>	Cogumelo porcini, boleto, pé gordo	Micorrízico	Excelente, em jovem, laminado, pode ser consumido cru. Odor agradável, sabor doce a noz ou avelã.	
<i>C. cibarius</i>	Cantarelo, rapazinhos, canários	Micorrízico	Muito bom a Excelente. Odor a frutos, ameixa ou pêssego seco, sabor doce, por vezes amargo ou apimentado.	

Tabela 2. continuação.

Espécie	Nome comum	Ecologia	Comestibilidade	
<i>F. velutipes</i>	Cogumelos Enoki	Saprófito	Bom. Odor e sabor agradáveis mas não distintivos.	
<i>L. edodes</i>	Shiitake	Saprófito	Muito bom. Odor fúngico agradável, sabor específico mas agradável.	
<i>M. oreades</i>	Rodas das bruxas, marásmio-das-oréades	Saprófito	Bom, embora de pequenas dimensões. Odor a amêndoa amarga, sabor fúngico suave e agradável.	
<i>P. eryngii</i>	Cogumelo do cardo, eryngii	Saprófito	Muito bom, considerado superior a outras espécies de Pleurotus. Odor e sabor agradáveis.	
<i>P. ostreatus</i>	Cogumelo ostra, repolga,	Saprófito (pode atuar como parasita)	Bom em jovem. Odor fúngico suave e muito peculiar, sabor doce.	

I.4. Importância dos cogumelos na alimentação

O aroma, sabor, valor nutricional e a textura dos cogumelos possuem características singulares, fazendo com que, muitas vezes, sejam consumidos como uma iguaria (Bernas *et al.*, 2006; Kalac, 2009). Porém, devido a estas características organolépticas e à sua versatilidade gastronómica, os cogumelos são, cada vez mais, considerados como parte integrante de uma dieta equilibrada. Podem ser utilizados como ingredientes de sopas, molhos, saladas ou em pratos de carne (Bernas *et al.*, 2006).

O valor nutricional dos cogumelos varia consoante a espécie, o facto de ser silvestre ou de cultivo assim como os fatores abióticos a que está sujeito. Em geral, os cogumelos possuem cerca de 80 a 90% de água, o conteúdo proteico pode variar entre 27% e 48% face à matéria seca, a percentagem de hidratos de carbono varia, geralmente, entre 35% a 70%, a composição de lípidos varia entre 2 e 6% e o valor calórico é considerado reduzido (Azevedo *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2012b; Cheung, 2013). Apresentam, ainda, algumas vitaminas (em particular do grupo B) e minerais essenciais, como por exemplo, fósforo, magnésio, potássio e selénio (Bernas *et al.*, 2006; Azevedo *et al.*, 2012).

Barros e colaboradores (2007) estudaram em algumas espécies de cogumelos silvestres a influência do processamento culinário e do tipo de conservação (secagem e congelamento) nos valores nutricionais e propriedades antioxidantes. As amostras cozinhadas demonstraram menores concentrações de nutrientes e menor capacidade antioxidante em comparação com as amostras secas e congeladas. No entanto, para os perfis individuais de ácidos gordos e açúcares, apenas o procedimento culinário parece ser relevante, pois as amostras cozinhadas apresentaram maiores quantidades de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e baixas quantidades de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) e açúcares (Barros *et al.*, 2007).

Para além de possuírem características nutricionais e organolépticas únicas, os cogumelos possuem várias propriedades medicinais como o efeito imunomodulador, carcinogénico (Ferreira *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2014), hipolipidémico (Yeh *et al.*, 2014), inibição da agregação plaquetária (Hokama e Hokama, 1981 citado por Reis *et al.*, 2012a), prevenção de doenças cardiovasculares e redução dos níveis de açúcar no sangue (Jeong *et al.*, 2010) e atividade antimicrobiana (Nowacka *et al.*, 2014; Ahmad *et al.*, 2012; Smolskaité *et al.*, 2015). Algumas, destas propriedades medicinais são atribuídas aos compostos bioativos com capacidade antioxidante, como por exemplo, os compostos fenólicos (Ferreira *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2009).

I.5. Valor Nutricional

Os cogumelos possuem uma elevada atividade da água, a_w , devido ao alto teor de água na sua composição, que afeta a sua textura e em especial o tempo de prateleira. Por esta razão, a quantidade de matéria seca dos cogumelos é muito baixa, variando, geralmente, entre 80 a 140 g/kg. Os cogumelos secos são conhecidos pelas suas características higroscópicas (Kalac, 2013).

A reduzida quantidade de matéria seca assim como o baixo conteúdo de lípidos dos cogumelos resulta em valores energéticos baixos. Os valores 30,8, 28,8, 39,2, 39,8, 72,7, e 43,4 kcal/100 g de cogumelo fresco foram reportados para as espécies *A. bisporus* (branco), *A. bisporus* (castanho), *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *L. edodes* e *F. velutipes*, respetivamente (Reis et al., 2012b). Para a espécie *B. edulis* foi reportado um valor energético de 42,3 kcal/ 100 g de cogumelo fresco (Heleno et al., 2011) e para a espécie *A. cylindracea* foi reportado um valor de 383,9 kcal/100 g de cogumelo seco (Petrovic et al., 2015).

Tabela 3. Composição nutricional de cogumelos. Nota: a – amostra silvestre; b – amostra de cultivo/comercial; fw – por peso fresco; dw – por peso seco.

Espécie	Humidade g/100 g	Cinzas g/100 g	Proteínas g/100 g	Lípidos g/100 g	Hidratos de carbono g/100 g	Energia kcal/100 g	Referência
<i>A. bisporus</i> (branco) ^b	91,27 ^{fw}	0,85 ^{fw}	1,23 ^{fw}	0,19 ^{fw}	6,46 ^{fw}	30,86 ^{fw}	Reis et al., 2012b
<i>A. bisporus</i> (castanho) ^b	91,64 ^{fw}	0,95 ^{fw}	1,29 ^{fw}	0,14 ^{fw}	5,98 ^{fw}	28,85 ^{fw}	Reis et al., 2012b
<i>P. ostreatus</i> ^b	89,17 ^{fw}	0,62 ^{fw}	0,76 ^{fw}	0,15 ^{fw}	9,30 ^{fw}	39,27 ^{fw}	Reis et al., 2012b
<i>P. eryngii</i> ^b	89,00 ^{fw}	0,68 ^{fw}	1,2 ^{fw}	0,16 ^{fw}	8,95 ^{fw}	39,84 ^{fw}	Reis et al., 2012b
<i>P. eryngii</i> ^a	82,59 ^{fw}	14,9 ^{dw}	2,09 ^{dw}	4,36 ^{dw}	78,60 ^{dw}	362,0 ^{dw}	Reis et al., 2013
<i>L. edodes</i> ^b	79,78 ^{fw}	1,36 ^{fw}	0,89 ^{fw}	0,35 ^{fw}	17,62 ^{fw}	72,79 ^{fw}	Reis et al., 2012b
<i>F. velutipes</i> ^b	87,87 ^{fw}	0,88 ^{fw}	0,47 ^{fw}	0,21 ^{fw}	10,57 ^{fw}	43,4 ^{fw}	Reis et al., 2012b
<i>B. edulis</i> ^a	-	5,53 ^{dw}	21,07 ^{dw}	2,45 ^{dw}	70,95 ^{dw}	42,3 ^{fw}	Heleno et al., 2011
<i>C. cibarius</i> ^a	-	6,42 ^{dw}	35,79 ^{dw}	1,47 ^{dw}	56,3 ^{dw}	-	Akata et al., 2012
<i>M. oreades</i> ^a	89,5 ^{fw}	0,95 ^{fw}	4,03 ^{fw}	0,58 ^{fw}	3,92 ^{fw}	-	Leichter & Bandoni, 1980
<i>A. cylindracea</i> ^a	-	6,69 ^{dw}	6,68 ^{dw}	2,13 ^{dw}	84,50 ^{dw}	383,9 ^{dw}	Petrovic et al., 2015

1.5.1. Proteínas

As proteínas são um importante atributo nutricional dos alimentos e a quantidade presente nos cogumelos depende, entre outros fatores, da composição do substrato, tempo de colheita e da espécie de cogumelo. Geralmente, o conteúdo proteico varia entre 0,8 a 3,5 g/100 g de cogumelo fresco ou entre 19,0 e 39,0 g/100 g de cogumelo seco (Bernas *et al.*, 2006). Na tabela 3 é mencionado o conteúdo proteico das espécies em estudo.

Para a determinação do conteúdo proteico em cogumelos, se for utilizado o método de Kjeldahl, é necessário aplicar um fator específico de conversão devido à elevada proporção de nitrogénio não-proteico, principalmente na quitina (Bernas *et al.*, 2006; Kalac *et al.*, 2013). Bauer-Petrovska (2001) recomenda a utilização de um fator de 4,16, outros autores recomendam a utilização de um fator entre 3,45 a 4,38 (Bernas *et al.*, 2006). Reis *et al.* (2012b, 2013) e Heleno *et al.* (2011) utilizam um fator de 4,38.

Barros e colaboradores (2007) estudaram o efeito da temperatura no conteúdo proteico de cogumelos e verificaram que estes não sofrem alterações durante a secagem a 40 °C ou o congelamento a -20 °C, porém, quando os cogumelos frescos são cozinhados ocorre um significativo decréscimo do teor de proteínas.

De facto, a composição em proteínas dos cogumelos parece ser relevante, demonstrando uma importância nutricional superior ao da maioria das proteínas vegetais (Belitz & Grosch, 1999 citado por Kalac, 2009). Já o teor de aminoácidos livres é baixo, apenas, cerca de 1% da matéria seca, tendo um contributo nutricional limitado. No entanto contribuem para o sabor dos cogumelos (Kalac, 2009).

1.5.2. Lípidos

O conteúdo total lipídico dos cogumelos é baixo, variando, usualmente, entre 2% e 6% da matéria seca. Na tabela 3 é descrito o conteúdo total de lípidos e na tabela 4 são referidos os principais ácidos gordos presentes nos cogumelos selecionados no presente estudo.

Geralmente, os PUFA representam a maior percentagem de ácidos gordos, presentes em cogumelos, seguidos pelos ácidos gordos saturados (SFA) e por último os MUFA. Em termos de perfil individual de ácidos gordos, o ácido linoleico ($C_{18:2n6c}$) é o principal ácido gordo presente em cogumelos, seguido pelo ácido palmítico ($C_{16:0}$) e posteriormente o ácido oleico ($C_{18:1n9c}$). Estes são os ácidos gordos que prevalecem na maioria das espécies de cogumelos,

existindo outros ácidos gordos em pequenas quantidades (Barros *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2012b; Kalac, 2013).

Devido ao baixo teor de lípidos totais e a uma baixa proporção de ácidos gordos n-3, o contributo dos lípidos para o valor nutricional dos cogumelos é reduzido (Kalac, 2009).

I.5.3. Hidratos de Carbono

Os hidratos de carbono são, a seguir à água, os principais constituintes dos cogumelos. O conteúdo total situa-se entre 35% a 70% da matéria seca, variando entre as diferentes espécies (Kalac, 2009; Cheung, 2013). Na tabela 3 é descrito a composição total de hidratos de carbono em cogumelos e na tabela 4 é descrito o total de açúcares, e em particular a quantidade de manitol e trealose.

A glucose, o manitol e a trealose são os principais representantes dos monossacarídeos, dos açúcares álcoois e dos oligossacáridos, respetivamente. Geralmente, o teor de glucose e trealose é baixo. Enquanto o manitol é o mais abundante, participando no crescimento de volume e firmeza do cogumelo, contudo pode variar significativamente entre as diferentes espécies (Kalac, 2013).

Nos cogumelos em estudo a trealose é mais abundante nas espécies *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *F. velutipes*, *B. edulis*, *M. oreades* e *A. cylindracea*, enquanto o manitol é mais abundante nas espécies *A. bisporus*, *L. edodes* e *C. cibarius* (Barros *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2012b; Reis *et al.*, 2013; Petrocié *et al.*, 2015).

De acordo com Barros e colaboradores (2007), o conteúdo de trealose e manitol diminui consideravelmente quando os cogumelos frescos são submetidos a processamento culinário, enquanto nos cogumelos sujeitos a secagem e congelação é limitada.

Em cogumelos, o polissacarídeo de reserva, é o glicogénio. Normalmente, possuem um teor de 5 a 10% da matéria seca. O glicogénio é, amplamente, consumido através da carne e por isso a ingestão deste polissacarídeo através de cogumelos é nutricionalmente insignificante (Kalac, 2009). A quitina é um polissacarídeo estrutural insolúvel em água, é responsável por 80 a 90% da matéria seca nas paredes celulares dos cogumelos. Este polissacarídeo é indigerível para o Homem e, aparentemente, diminui a disponibilidade de outros nutrientes. Estudos sobre a quantificação de quitina ou outras fibras alimentares, em cogumelos, têm sido pouco reportados na literatura (Kalac, 2009).

Tabela 4. Composição dos cogumelos em açúcares e ácidos gordos. Os ácidos gordos são expressos em % do total de ácidos gordos, SFA (ácidos gordos saturados), MUFA (ácidos gordos monoinsaturados), PUFA (ácidos gordos polinsaturados). Nota: a – amostra silvestre; b – amostra de cultivo/comercial; c- amostra comercial desidratada; fw – por peso fresco; dw – por peso seco.

Espécie	Açúcares totais (g/100 g)	Manitol (g/100 g)	Trealose (g/100 g)	Total de SFA	Total de MUFA	Total de PUFA	C16:0	C18:1n9c	C18:2n6c	Referência
<i>A. bisporus</i> (branco) ^b	5,79 ^{fw}	5,60 ^{fw}	0,16 ^{fw}	20,3	1,4	78,3	11,9	1,1	77,7	Reis et al., 2012b
<i>A. bisporus</i> (castanho) ^b	4,27 ^{fw}	4,01 ^{fw}	0,22 ^{fw}	18,4	1,8	79,8	11,1	1,2	79,4	Reis et al., 2012b
<i>P. ostreatus</i> ^b	4,97 ^{fw}	0,22 ^{fw}	4,42 ^{fw}	17,0	13,6	69,4	11,2	12,3	68,9	Reis et al., 2012b
<i>P. eryngii</i> ^b	8,67 ^{fw}	0,60 ^{fw}	8,01 ^{fw}	17,4	13,1	69,4	12,8	12,3	68,8	Reis et al., 2012b
<i>P. eryngii</i> ^a	15,62 ^{dw}	1,4 ^{dw}	14,21 ^{dw}	25,79	49,05	25,17	17,4	47,5	24,7	Reis et al., 2013
<i>L. edodes</i> ^b	14,08 ^{fw}	10,01 ^{fw}	3,38 ^{fw}	15,1	2,9	82,0	10,3	2,3	81,1	Reis et al., 2012b
<i>F. velutipes</i> ^b	8,29 ^{fw}	0,97 ^{fw}	2,63 ^{fw}	18,5	7,2	74,3	11,0	5,7	45,4	Reis et al., 2012b
<i>B. edulis</i> ^c	13,46 ^{dw}	3,46 ^{dw}	9,71 ^{dw}	14,52	40,91	44,56	10,0	39,7	44,3	Barros et al., 2008
<i>C. cibarius</i> ^c	14,45 ^{dw}	8,33 ^{dw}	6,12 ^{dw}	22,63	23,29	54,08	13,0	10,7	53,5	Barros et al., 2008
<i>M. oreades</i> ^c	13,46 ^{dw}	2,42 ^{dw}	10,49 ^{dw}	18,88	30,16	50,96	13,8	28,5	50,6	Barros et al., 2008
<i>A. cylindracea</i> ^a	13,42 ^{dw}	0,93 ^{dw}	12,49 ^{dw}	17,93	3,47	78,6	13,0	3,0	78,4	Petrovic et al., 2015

1.5.4. Composição Mineral

Os cogumelos são caracterizados pelos elevados níveis de assimilação de minerais, que dependem entre outros fatores, da espécie e idade do cogumelo assim como do substrato (Bernas et al., 2006). O potássio e o fósforo são os elementos minerais presentes em maior abundância, 20000 a 40000 e 5000 a 10000 mg/ kg de matéria seca, respetivamente. O magnésio e o enxofre também estão presentes em quantidades relativamente elevadas, 800 a 1800 e 1000 a 3000 mg/kg de matéria seca, respetivamente (Kalac, 2009).

A presença de metais pesados em cogumelos tem sido reportada por vários autores, contudo a concentração varia consideravelmente entre espécies e substratos, por exemplo os cogumelos provenientes de zonas com grande poluição possuem uma maior quantidade destes elementos. Contudo, a informação tem sido muito limitada relativamente à especiação destes elementos e à biodisponibilidade no Homem. É importante referir que a concentração de metais pesados em cogumelos cultivados é, geralmente, baixa (Kalac, 2009).

Existem, ainda, estudos que reportam quantidades elevadas de selénio em cogumelos, podendo ser um fonte promissora deste elemento (Kalac, 2009).

Relativamente à presença de elementos radioativos em cogumelos silvestres, existem inúmeros estudos, principalmente a seguir ao acidente de Chernobyl. Algumas espécies, amplamente consumidas apresentavam elevados níveis de ^{134}Cs e, mais importante, de ^{137}Cs . No entanto, o consumo elevado de cogumelos com altos níveis de elementos radioativos não era um risco para a saúde.

A radioatividade de origem natural é causada principalmente pelo isótopo natural ^{40}K (Kalac, 2013), contudo podem existir outros elementos radioativos de origem natural dependendo das características geológicas onde os cogumelos crescerem, como por exemplo o ^{210}Pb e o ^{210}Po .

1.5.5. Sabor característico

O sabor característico dos cogumelos, principalmente secos, é muito apreciado pelos consumidores. Já foram identificados inúmeros compostos odoríferos, que podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química como derivados de octanos e octenos, terpenos, derivados de benzaldeído, compostos de enxofre, entre outros. O principal composto que confere um sabor característico aos cogumelos é o 1-octen-3-ol, que tem como precursor o ácido linoleico devido à sua oxidação sob a catálise da lipoxigenase e da hidroperóxido-liase. Este é um processo característico dos cogumelos e é muito intenso durante a secagem (Bernas *et al.*, 2006; Kalac, 2009).

I.6. Antioxidantes

Atualmente, quando se fala em antioxidantes surge uma panóplia de aplicações, que vão desde a indústria alimentar à farmacêutica, passando pela indústria dos plásticos e óleos de lubrificação, demonstrando a importância que estes compostos possuem. Os antioxidantes sintéticos mais conhecidos são o BHA (Butil-hidroxianisole), o BHT (Butil-hidroxitolueno), o TBHQ (*terc*-Butil-hidroquinona) e o PG (Galato de propilo), estes são amplamente utilizados na indústria alimentar assim como na indústria farmacêutica. Contudo o BHA e o BHT têm sofrido restrições na sua utilização devido a possíveis efeitos tóxicos e carcinogênicos (Gulcin *et al.*, 2012). Assim, a utilização de antioxidantes de fontes naturais, como os cogumelos, assume cada vez mais importância.

Na tecnologia alimentar, os antioxidantes, são definidos como substâncias que, em pequenas quantidades conseguem evitar ou retardar significativamente a oxidação de compostos facilmente oxidáveis, sendo aplicados nos alimentos, geralmente, com o objetivo de inibir a peroxidação lipídica (Becker *et al.*, 2004).

Nos sistemas biológicos, qualquer molécula que tenha a capacidade de inibir ou retardar a ação de agentes oxidantes pode ser considerada um antioxidante, ou seja uma substância capaz de inibir uma enzima oxidante específica, que reaja com agentes oxidantes evitando que estes oxidem outras moléculas, que forme complexos com iões metálicos ou que repare sistemas como as proteínas transportadoras de ferro, pode ser considerada um antioxidante. Desta forma, estas moléculas exercem um papel importante na prevenção da oxidação de macromoléculas, como os lípidos, os hidratos de carbono, o ADN e as proteínas, que são essenciais para o bom funcionamento dos sistemas biológicos (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

Devido à complexidade de atuação dos antioxidantes, torna-se difícil definir o termo antioxidante, não existindo uma definição universalmente aceite e por isso o conceito de antioxidante deve ser amplo. Porém, o conceito antioxidante, em termos mecanicistas, é usualmente descrito como uma substância que possui capacidade para doar hidrogénios ou eletrões (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

A capacidade antioxidante e atividade antioxidante são termos utilizados comumente como sendo sinónimos, contudo tem significados diferentes. A atividade antioxidante refere-se à constante de velocidade de uma reação entre um antioxidante específico e um oxidante específico. A capacidade antioxidante é definida como a quantidade de radicais livres que são

capturados por uma amostra de compostos antioxidantes, avaliando assim misturas heterogêneas de antioxidantes e não compostos específicos (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

I.7. Radicais livres e Stress Oxidativo

Um radical livre pode ser um átomo ou uma molécula que possui um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, tem orbitais com apenas um elétron. Assim, nesta forma, o composto apresenta uma forte reatividade com a maioria das espécies químicas (Gutteridge & Halliwell, 2006).

Nos organismos aeróbios, os radicais livres são constantemente produzidos durante o normal funcionamento da célula, na maior parte das vezes como espécies reativas de oxigênio (ROS) ou como espécies reativas de azoto (RNS). Uma vez produzidos, a maior parte dos radicais livres são removidos pelos sistemas endógenos de defesa antioxidante, que incluem enzimas (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase) e moléculas não enzimáticas (glutathione, α -tocoferol, ácido ascórbico, ácido lipóico, carotenóides) (Valko *et al.*, 2007; Gulcin *et al.*, 2012).

Em concentrações baixas ou moderadas, as ROS podem ser benéficas para a célula, estando envolvidas em vários processos fisiológicos. Porém, quando a produção de ROS é excessiva e as defesas antioxidantes da célula são deficitárias, o organismo entra num processo, denominado stress oxidativo. Nestas situações os radicais livres em excesso podem oxidar e danificar os lípidos membranares, hidratos de carbono, proteínas e ADN, levando à sua modificação, e conseqüentemente à inibição da sua função normal. Assim, a manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o normal funcionamento do organismo (Valko *et al.*, 2007; Gulcin *et al.*, 2012).

O stress oxidativo pode ser induzido por causas naturais, como a realização de exercício físico intenso ou quando ocorrem processos de inflamação no organismo, ou por causas não naturais relacionadas com a presença de xenobióticos no organismo, como poluentes ambientais, fármacos ou radiação (Ferreira & Abreu, 2007). As conseqüências, do stress oxidativo, têm sido profundamente estudadas estando associado como causa do desenvolvimento de cancro, doenças neurodegenerativas, diabetes, inflamações crónicas e envelhecimento (Valko *et al.*, 2007; Magalhães *et al.*, 2008).

Como referido, anteriormente, os radicais livres derivados de oxigênio, conhecidos por ROS, representam a classe mais importante de radicais livres gerados pelo organismo.

Verificando-se que, apesar de essencial à vida aeróbia, o oxigénio molecular (O_2) em determinadas condições pode ser tóxico para o organismo.

Alguns exemplos de ROS e RNS são os radicais superóxido (O_2^-), hidroxilo ($HO\cdot$), peróxido ($ROO\cdot$), alcóxido ($RO\cdot$), o óxido nítrico (NO). Os radicais livres hidroxilo e alcóxido são muito reativos e atacam rapidamente as moléculas das células vizinhas. Por outro lado, o anião superóxido, os hidroperóxidos lipídicos e o óxido nítrico são menos reativos. Para além dos radicais livres derivados do oxigénio, existem, espécies não-radicalares, tais como o oxigénio singlete (1O_2), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e hipoclorito ($HOCl$) (Gulcin *et al.*, 2012).

Existem várias vias de produção de ROS, que estão esquematizadas na figura 4 e descritas de seguida. O anião superóxido, formado pela adição de um eletrão ao O_2 , é considerado o ROS “primário”. Este é produzido, essencialmente, nas mitocôndrias, devido à dissipação de eletrões da cadeia respiratória mas também pode ser formada por ação de vários sistemas enzimáticos existentes na célula (Ferreira & Abreu, 2007). O anião superóxido tem sido associado como causa de várias doenças (Gilbert, 2000).

Apesar do radical superóxido não ser muito reativo pode interagir com outras moléculas e originar espécies não radicalares como o peróxido de hidrogénio ou originar outros radicais mais reativos como o radical hidroxilo, que é considerado o ROS que causa mais danos, nomeadamente no ADN (Ferreira & Abreu, 2007). A ocorrência de danos, no material genético, causados pelo stress oxidativo pode ser o primeiro passo para o desenvolvimento de mutagénese, carcinogénese e envelhecimento (Valko *et al.*, 2007).

As mitocôndrias são consideradas uma das principais fontes de ROS, contudo, também são um dos primeiros alvos dos radicais livres, nomeadamente, a membrana mitocondrial interna que sofre peroxidação lipídica. Isto, porque, a cadeia respiratória é composta por proteínas transmembranares da membrana mitocondrial interna e a formação de ROS, por exemplo O_2^- , ocorre perto da membrana. Desta forma, os ROS oxidam facilmente os lípidos da membrana, que são especialmente sensíveis ao ataque de radicais livres. A peroxidação lipídica promove a formação de vários tipos de ROS (Mehrotra *et al.*, 1991 citado por Ferreira & Abreu, 2007).

A peroxidação lipídica inicia-se, normalmente, com a remoção de um átomo de hidrogénio de uma cadeia polinsaturada de um lípido e posteriormente ocorrem uma série de reações, designadas, por reações de propagação em cadeia, com a produção de radicais peróxidos e

lipídicos. Estas reações, se não forem evitadas podem causar danos potencialmente superiores aos ROS que iniciaram a reação. Como consequência da peroxidação lipídica, as membranas podem sofrer alterações de fluidez, permeabilidade e integridade (Fridovich, 1999; Ferreira & Abreu, 2007).

De salientar que as RNS também desempenham um papel importante no organismo. O óxido nítrico (NO) é o principal RNS e é produzido nos tecidos biológicos por sintases de óxido nítrico (NOS) ao metabolizar arginina e citrulina. A produção excessiva de RNS origina stress nitrosamínico e pode causar a nitrosilação de proteínas, inibindo a sua função. Nas células do sistema imunitário, durante a ocorrência de processos inflamatórios, o NO é produzido conjuntamente com O_2^- , que ao reagirem formam peroxinitrílo (ONOO \cdot), um potente agente oxidante que pode provocar fragmentação do ADN e oxidação lipídica (Carr *et al.*, 2000).

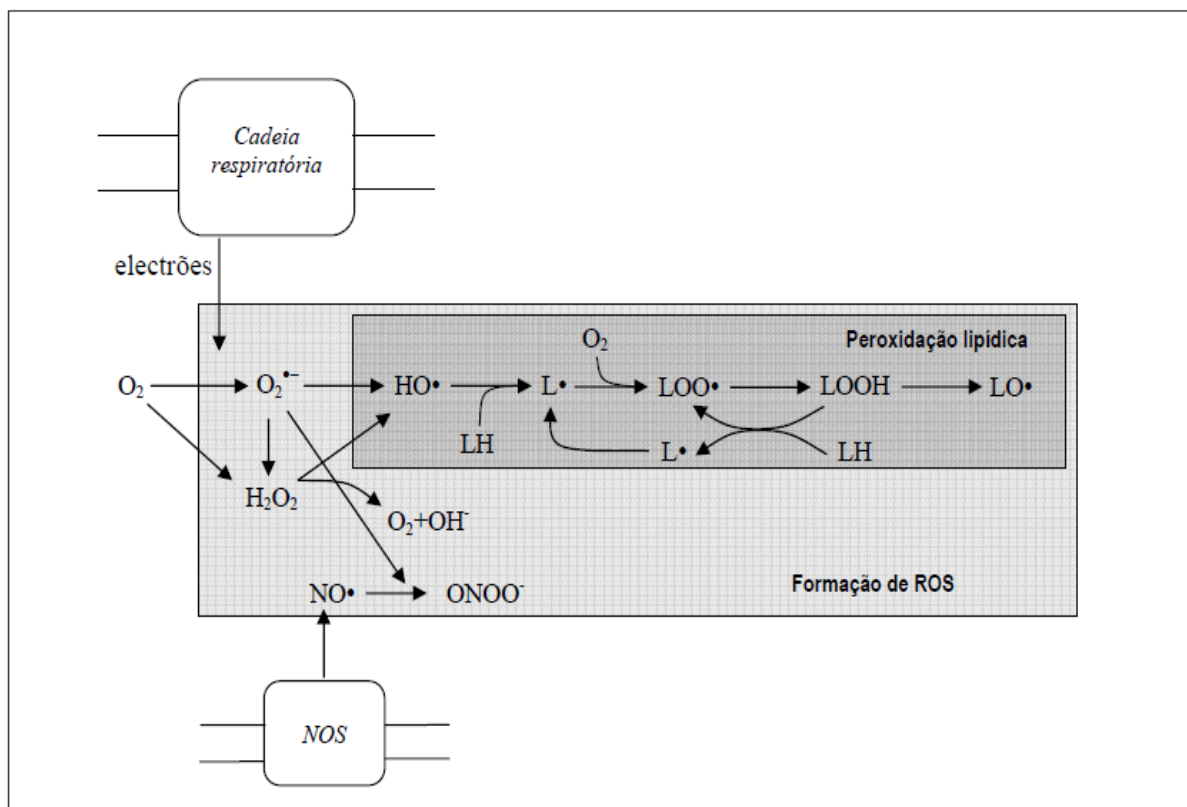


Figura 4. Esquema representativo das principais vias de produção de ROS e RNS (fonte: Ferreira & Abreu, 2007).

I.8. Compostos antioxidantes naturais

Como referido anteriormente, o nosso organismo possui sistemas de defesa endógenos contra o ataque de radicais livres, contudo, nem sempre estes sistemas têm a capacidade de evitar o stress oxidativo. Assim, os compostos naturais com propriedades antioxidantes podem ser úteis no auxílio dos sistemas de defesa endógenos, constituindo um importante sistema de defesa exógeno contra os radicais livres (Ferreira & Abreu 2007).

Desta forma, os antioxidantes presentes nos alimentos que ingerimos podem assumir um papel relevante como possíveis agentes protetores contra os radicais livres, reduzindo os danos causados pelo stress oxidativo. Sendo os cogumelos um exemplo de uma boa fonte de compostos antioxidantes, pois, vários estudos tem demonstrado que estes possuem na sua constituição química compostos fenólicos, tocoferóis, ácido ascórbico e carotenóides (β -caroteno e licopeno, essencialmente) (Ferreira & Abreu, 2007).

I.8.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão descritos como substâncias biologicamente ativas, possuindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias ou anti-tumorais (Palacios et al., 2011). São compostos aromáticos hidroxilados que tem na sua constituição básica um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilo. Incluem um vasto número de subclasses, tais como ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, estilbenos, entre outras, em que os flavonóides representam a sub-classe mais amplamente distribuída. Encontram-se em maiores teores em plantas e vegetais mas os cogumelos também possuem quantidades relevantes de compostos fenólicos (Ferreira et al., 2009; Palacios et al., 2011).

As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos dependem das suas características estruturais, como o número e as posições dos grupos hidroxilo, a extensão da conjugação estrutural e a presença de grupos doadores ou aceitadores de eletrões no anel aromático (Ferreira et al., 2009). Podendo ser classificados como inibidores de radicais livres, inativadores de metais ou captadores de oxigénio (Palacios et al., 2011).

Nos cogumelos, a sub-classe de compostos fenólicos presente em maior quantidade é a dos ácidos fenólicos. Estes podem-se dividir em dois grandes grupos, os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos, que são derivados de ácido benzóico e do ácido cinâmico, respetivamente (Ferreira et al., 2009).

Os flavonóides, apesarem de serem uma sub-classe amplamente distribuída, não são descritos como estando em quantidades relevantes em cogumelos. São caracterizados por um esqueleto de carbono C6-C3-C6. A estrutura base consiste em dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia de três carbonos que é, geralmente, um anel heterocíclico oxigenado (Ferreira *et al.*, 2009).

Na tabela 5 são mencionados o conteúdo em compostos fenólicos totais e o conteúdo em flavonóides totais descritos na literatura das espécies selecionadas no presente estudo.

Tabela 5. Conteúdo em compostos fenólicos totais e conteúdo em flavonóides totais. Nota: GAE – equivalentes de ácido gálico; ECE – equivalentes de epicatequina; RE – equivalentes de rutina; QE – equivalentes de quercetina; a – amostra silvestre; b – amostra de cultivo/comercial; c – amostra seca em estufa; d – amostra liofilizada; e – amostra comercial desidratada.

Espécie	Conteúdo em compostos fenólicos totais	Conteúdo em flavonóides totais	Referência
	(mg GAE/g extrato)	(mg ECE/g extrato)	
<i>P. ostreatus</i>	15,7 ^{b,c}	-	Yang <i>et al.</i> , 2002
	12,54 ^{b, d}	-	Reis <i>et al.</i> , 2012a
	3,20 ^a , *mg GAE/ mL	0,0 ^a , *mg QE/mL	Chowdnury <i>et al.</i> , 2015
<i>P. eryngii</i>	7,14 ^{b, d}	-	Reis <i>et al.</i> , 2012a
	18,43 ^{a, d}	-	Reis <i>et al.</i> , 2013
<i>L. edodes</i>	9,11 ^{b,c}	-	Yang <i>et al.</i> , 2002
	8,84 ^{b, d}	-	Reis <i>et al.</i> , 2012a
	10,66 ^a , *mg GAE/ mL	4,76 ^a , *mg QE/mL	Chowdnury <i>et al</i> 2015
<i>F. velutipes</i>	9,26 ^{b,c}	-	Yang <i>et al.</i> , 2012
<i>A. bisporus</i> (branco)	23,34 ^{b, d}	-	Reis <i>et al.</i> , 2012a
<i>A. bisporus</i> (castanho)	37,23 ^{b, d}	-	Reis <i>et al.</i> , 2012a
<i>A. bisporus</i>	4,49 ^e	1,73 ^e	Barros <i>et al.</i> , 2008
<i>B. edulis</i>	5,03 ^e	1,75 ^e	Barros <i>et al.</i> , 2008
	31,64 ^{a,c}	0,458 ^{a, c} *mg QE/g extrato	Sarikurkcu <i>et al.</i> , 2008
<i>C. cibarius</i>	0,88 ^e	0,67 ^e	Barros <i>et al.</i> , 2008
<i>M. oreades</i>	3,20 ^e	2,26 ^e	Barros <i>et al.</i> , 2008
<i>A. cylindracea</i>	17,36 ^{a, d}	-	Petrovic <i>et al.</i> , 2015
	15,3 ^{c,b}	-	Lo & Cheung, 2005
	13,8 ^{a, d}	0,73 ^{a, d} *mg RE/g extrato	Karaman <i>et al.</i> , 2014

1.8.2. Tocoferóis

A vitamina E é considerada um importante antioxidante natural presente nos alimentos, em especial nos que são ricos em ácidos gordos polinsaturados. O termo vitamina E é usado, frequentemente, para designar uma família de compostos químicos relacionados, denominados tocoferóis e tocotrienóis. Estes compostos partilham uma estrutura comum com um anel cromanol e uma cadeia lateral isoprenóide. A vitamina E é composta por oito compostos químicos: α -, β -, γ - e δ - tocoferol e os correspondentes quatro tocotrienóis (Ferreira *et al.*, 2009).

Devido à capacidade que tem para captar radicais livres, a vitamina E é um importante agente protetor no nosso organismo contra os danos do stress oxidativo, como doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e cancro (Ferreira *et al.*, 2009). Na tabela 6 é mencionado o teor de tocoferóis descritos na literatura das espécies selecionadas no presente estudo.

1.8.3. Ácido ascórbico

O ácido ascórbico, conhecido vulgarmente como vitamina C, é um composto hidrossolúvel considerado como derivado enólico dos ácidos aldónicos. Estruturalmente é uma γ -latona com seis átomos de carbono com um grupo endiol nos carbonos 2 e 3, biossintetizado a partir do ácido D-glucorónico (Ferreira *et al.*, 2009).

O ácido ascórbico é um importante antioxidante, exercendo um papel protetor no organismo contra várias doenças relacionadas com o stress oxidativo. É eficaz contra radicais superóxido, hidroxilo, peróxido de hidrogénio e peróxido protegendo os lípidos da membrana celular contra a peroxidação lipídica. O ácido ascórbico tem, ainda, a capacidade de interagir de forma sinérgica com a vitamina E, regenerando-a quando esta está oxidada. Esta interação é muito importante para a proteção das células, pois, a presença de forma isolada e em baixas concentrações de vitamina E ou vitamina C pode não ser suficiente contra a peroxidação lipídica (Ferreira *et al.*, 2009).

A presença de ácido ascórbico no organismo está dependente da sua ingestão, pois o ser humano é incapaz de sintetizar este composto (Ferreira *et al.*, 2009). Assim uma dieta rica em alimentos com esta vitamina é essencial para prevenção de danos causados pelo stress oxidativo. Na tabela 6 é mencionado o teor de ácido ascórbico, descrito na literatura, das espécies selecionadas no presente estudo.

I.8.4. Carotenóides

Os carotenóides são compostos com propriedades antioxidantes e alguns são precursores de vitamina A, como por exemplo o β -caroteno e o α -caroteno. Quimicamente, possuem um esqueleto de 40 carbonos com uma estrutura polisoprenóide, formando uma longa cadeia que pode conter entre 2 a 15 duplas ligações conjugadas. Os diferentes carotenóides existentes ocorrem, essencialmente, por modificações na estrutura base por ciclização dos grupos terminais e por introdução de grupos funcionais contendo oxigénio, conferindo-lhe assim as suas cores características e propriedades antioxidantes. A quantidade de ligações duplas presentes nos carotenóides faz com estes sejam suscetíveis ao ataque por radicais peróxido, formando produtos inativos. Estas características, conferem aos carotenóides um papel relevante no combate ao stress oxidativo (Ferreira et al., 2009). Na tabela 6 é mencionado o teor de carotenóides (β -caroteno e licopeno) descritos na literatura das espécies selecionadas no presente estudo.

Tabela 6. Composição de tocoferóis, ácido ascórbico, β -caroteno e licopeno em cogumelos. Nota: a – amostra silvestre; b– amostra de cultivo/comercial; c- amostra comercial desidratada; fw – por peso fresco; dw – por peso seco; nd – não detetado.

Espécie	Tocoferóis totais ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	α -Tocoferol ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	β -Tocoferol ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	γ -Tocoferol ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	δ -Tocoferol ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	Ác. Ascórbico (mg/g)	β -caroteno ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Licopeno ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Referência
<i>P. eryngii</i> ^{b, fw}	4,86	0,25	2,16	1,83	0,62	-	-	-	Reis et al., 2012b
<i>P. eryngii</i> ^{a, dw}	86,58	6,79	48,2	31,5	-	-	-	-	Reis et al., 2013
<i>P. ostreatus</i> ^{b, fw}	3,72	0,59	nd	1,49	1,64	-	-	-	Reis et al., 2012b
<i>A. bisporus</i> (branco) ^{b, fw}	5,19	0,23	0,85	1,51	2,60	-	-	-	Reis et al., 2012b
<i>A. bisporus</i> (castanho) ^{b, fw}	11,16	0,28	0,71	7,63	2,54	-	-	-	Reis et al., 2012b
<i>A. bisporus</i> ^{c, dw}	2,41	0,75	1,66	nd	-	0,03	1,95	0,91	Barros et al., 2008
<i>L. edodes</i> ^{b, fw}	10,83	0,92	nd	5,55	4,36	-	-	-	Reis et al., 2012b
<i>F. velutipes</i> ^{b, fw}	1,81	0,19	nd	1,62	nd	-	-	-	Reis et al., 2012b
<i>B. edulis</i> ^{c, dw}	10,65	0,32	8,90	1,42	-	nd	2,73	1,14	Barros et al., 2008
<i>C. cibarius</i> ^{c, dw}	0,18	0,12	0,3	0,3	.	0,86	13,5	5,06	Barros et al., 2008
<i>A. cylindracea</i> ^{a, dw}	100,38	2,10	8,80	86,08	3,40	-	-	-	Petrovic et al., 2015
<i>M. oreades</i> ^{c, dw}	1,55	0,06	0,19	1,30	-	nd	1,99	0,54	Barros et al., 2008

I.9. Métodos para determinação *in vitro* da capacidade antioxidante

A resposta dos compostos antioxidantes a diferentes fontes de radicais ou oxidantes pode ser diferente, pois a atividade antioxidante pode ser explicada através de diferentes mecanismo de ação, tais como a inibição de enzimas oxidantes, agentes quelantes de metais de transição, transferência de hidrogénios ou eletrões para os radicais, desativação do oxigénio singleto ou desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigénio (Stilinovic et al., 2014). Desta forma não existe um único método que reflita exatamente o potencial antioxidante de um composto antioxidante, sendo necessário, para realizar uma caracterização completa do potencial antioxidante, combinar diferentes métodos de determinação (Prior et al., 2005; Stilinovic et al 2014).

No caso dos alimentos, é sugerido por Becker e colaboradores, aplicar três passos fundamentais para a avaliação da capacidade antioxidante: quantificar os compostos fenólicos na amostra, quantificar a capacidade de captar radicais pelos compostos antioxidantes e ainda avaliar a capacidade dos antioxidantes para reduzir ou inibir a oxidação lipídica (Becker et al., 2004)

I.9.1. Mecanismos de reação: Transferência de átomos de hidrogénio (HAT) e transferência de eletrões (ET)

Os métodos para a determinação da atividade antioxidante baseiam-se, essencialmente, em dois mecanismos de reação, a transferência de átomos de hidrogénio (HAT) e/ou a transferência de eletrões (ET). Em ambos os mecanismos de reação o resultado final é o mesmo, determinar o potencial antioxidante das amostras, porém a cinética da reação e as reações colaterais são diferentes. A ocorrência em paralelo, dos dois mecanismos, é possível, contudo o mecanismo de reação dominante é determinado pela estrutura, solubilidade e o coeficiente de partilha do antioxidante, assim como pelo sistema de solventes. A energia de dissociação da ligação e o potencial de ionização são dois fatores que determinam o mecanismo de reação e a eficácia dos compostos antioxidantes (Prior et al., 2005; Ndhala et al., 2010).

Nos métodos baseados na HAT avalia-se a capacidade dos compostos antioxidantes doarem átomos de hidrogénio aos radicais livres através de um mecanismo de reação com uma cinética competitiva, independente do pH e do solvente, sendo normalmente um processo

rápido e finalizado em poucos segundos ou minutos. No caso dos métodos baseados na ET, o mecanismo de ação envolve, apenas, os compostos antioxidantes da amostra e o agente oxidante, em que ocorre a transferência de elétrons do antioxidante para o agente oxidante que pode ser um radical livre ou outro composto como metais ou grupos carbonilos (Prior *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2008). Este mecanismo de reação possui uma cinética não-competitiva, dependente do pH e do sistema de solventes, sendo uma reação lenta. O mecanismo de ação é muito sensível e está sujeito a interferências de pequenas quantidades de contaminantes como metais (Prior *et al.*, 2005).

1.9.1.1. Métodos baseados em HAT: ORAC, TRAP, TBARS, β -caroteno/Ác. linoleico

Os métodos baseados na transferência de átomos de hidrogénio são por exemplo, o ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais Oxigénio), o TRAP (Parâmetro Antioxidante de Radicais Totais), a inibição do branqueamento do β -Caroteno e o TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico). Nestes métodos existe um gerador de radicais peroxilo que vão atuar sobre um substrato, com a adição de um antioxidante à solução, este vai competir com o substrato para reduzir os radicais, inibindo ou reduzindo a oxidação do substrato (Prior *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2008; Ndhlala *et al.*, 2010).

O método ORAC baseia-se na reação de radicais peroxilo com um composto fluorescente que origina um produto não-fluorescente. A capacidade antioxidante é determinada pelo decréscimo da fluorescência resultante da formação de produtos não-fluorescentes. Os resultados são expressos em equivalentes de Trolox (Prior *et al.*, 2005).

O método TRAP monitoriza a capacidade que os compostos antioxidantes têm para interferir na reação entre radicais peroxilo gerados por AAPH ou ABAP [dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina)] e um composto alvo. O mecanismo de reação é semelhante ao método ORAC. Existem diferentes variantes do método que diferem no tipo de marcador da reação, como por exemplo, o consumo de oxigénio dissolvido, a fluorescência de R-ficoeritrina ou a absorvância do ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)). A capacidade antioxidante é determinada pelo tempo decorrido até à reação de todos os antioxidantes com os radicais peroxilo. Geralmente os resultados são expressos em equivalentes Trolox, comparando o tempo de reação da amostra com o tempo correspondente ao Trolox (Prior *et al.*, 2005).

O método da inibição do branqueamento do β -caroteno permite avaliar a capacidade de compostos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica. O mecanismo de reação consiste em induzir, através do calor, a oxidação do ácido linoleico formando radicais e outros produtos de oxidação como compostos orgânicos voláteis, hidroperóxidos e dienos conjugados. Ao adicionar compostos antioxidantes à reação, a oxidação do β -caroteno vai diminuir ou o ser inibida devido à doação de hidrogénios aos radicais formados pelos compostos antioxidantes. A capacidade antioxidante é determinada pelo estado de descoloração do β -caroteno através da determinação da absorvância. Normalmente os resultados são expressos através do coeficiente de atividade antioxidante (AAC) ou pelo EC_{50} (Reis *et al.*, 2012a; Mikami *et al.*, 2009; Amarowicz *et al.*, 2004).

O método TBARS apresenta uma metodologia baseada na formação de produtos de oxidação secundários. A quantificação da formação de malondialdeído (MDA) e de outros oxo-compostos pode ser realizada através da determinação da absorvância. Valores de absorvância baixos correspondem a pequenas quantidades de MDA formado, significando uma maior capacidade de proteção contra a peroxidação lipídica pelos compostos antioxidantes presentes na amostra (Ndhlala *et al.*, 2010).

1.9.1.2. Métodos baseados em ET: Folin-Ciocalteu, radical DPPH, TEAC, FRAP

Os métodos baseados na transferência de eletrões são por exemplo, o método Folin-Ciocalteu, a capacidade de capturar eletrões pelo radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), o FRAP (Poder Antioxidante por Redução do ião Férrico) e o TEAC (Capacidade Antioxidante em Equivalente Trolox) (Prior *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2008; Ndhlala *et al.*, 2010). Nestes métodos há um oxidante que vai retirar um eletrão aos compostos antioxidantes adicionados, provocando uma alteração da coloração que pode ser monitorizada espectralmente.

O método Folin-Ciocalteu ou determinação dos fenóis totais apresenta alguma controvérsia, sendo, inicialmente um método utilizado para a determinação de fenóis totais, contudo o reagente Folin-Ciocalteu não é específico para compostos fenólicos e pode ser reduzido por alguns compostos não fenólicos como aminas aromáticas, ácido ascórbico, Cu(I), Fe(II) e aminoácidos. Assim e devido ao mecanismo básico do método ser uma reação de oxidação/redução pode-se considerar como um método que avalia o poder redutor. O mecanismo de reação baseia-se na reação dos compostos fenólicos com o reagente Folin-Ciocalteu através da transferência de eletrões, em meio alcalino, dos compostos fenólicos e

de outros compostos redutores para o molidbénio, formando compostos azuis. Devido à formação de coloração o teor de fenóis totais/poder redutor é determinado através da monitorização espectral da solução, em que quanto maior for a absorvância maior é o poder redutor/teor de fenóis totais. Os resultados são expressos, geralmente, em equivalentes de ácido gálico, contudo podem ser utilizados outros padrões de referência. Vários estudos referem existir uma relação positiva entre os resultados obtidos neste método e a determinação da capacidade antioxidante através de métodos como o do radical DPPH. (Prior *et al.*, 2005; MacDonald-Wicks *et al.*, 2006; Ndhlala *et al.*, 2010).

O método FRAP consiste em avaliar a capacidade de compostos antioxidantes para reduzir, em meio ácido, o complexo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina, $[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$, a complexo ferroso, $[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$, formando um intenso complexo azul. O valor de FRAP é calculado através da determinação da absorvância da solução, comparando com a absorvância de uma solução padrão de iões ferrosos ou com soluções padrão de antioxidantes, como por exemplo o Trolox. O método apresenta algumas limitações, pois qualquer composto (sem propriedades antioxidantes) com um potencial redox inferior ao do par redox Fe(III)/Fe(II), pode teoricamente reduzir o Fe(III) a Fe(II), contribuindo para um valor FRAP falsamente elevado. Por outro lado, nem todos os antioxidantes reduzem o Fe(III) no tempo em que decorre a determinação da absorvância, tipicamente 4 minutos, por exemplo os polifenóis reagem mais lentamente e requerem um tempo de reação geralmente superior a 30 minutos (Prior *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2008; Ndhlala *et al.*, 2010).

O método TEAC ou método ABTS baseia-se na capacidade dos compostos antioxidantes capturarem o catião meta estável $\text{ABTS}^{\cdot+}$. Durante o ensaio o ABTS é oxidado por radicais peróxilos ou outros oxidantes formando o catião meta estável $\text{ABTS}^{\cdot+}$, que apresenta uma coloração intensa. O poder antioxidante é determinado pela capacidade que os compostos antioxidantes têm em reduzir o radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$, formando um produto incolor. O decréscimo da coloração é monitorizado espectralmente, sendo que quanto menor for a absorvância maior é a quantidade de radicais $\text{ABTS}^{\cdot+}$ que foram reduzidos pelos compostos antioxidantes. Os resultados são expressos em equivalentes de Trolox (Prior *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2008; Ndhlala *et al.*, 2010).

O método do radical DPPH consiste em avaliar a capacidade que os compostos antioxidantes têm para reduzir o radical. O DPPH \cdot é um dos poucos radicais orgânicos azotados estáveis, apresentando cor púrpura. O método baseia-se na adição de compostos antioxidantes a uma solução metanólica de radicais DPPH, que vão ser reduzidos pelos

compostos antioxidantes e por consequência ocorre uma descoloração da solução que pode ser monitorizada espectrofotometricamente. Os resultados são expressos pelo EC_{50} que consiste na quantidade necessária de compostos antioxidantes para reduzir 50% dos radicais DPPH presentes na solução (Becker *et al.*, 2004; Prior *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2008; Ndhlala *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2012a).

Este é um método simples e utilizado frequentemente em estudos para avaliar a capacidade antioxidante. Contudo possui algumas limitações como por exemplo, o DPPH ser um radical azotado bastante estável e, por isso, apresentar pouca semelhança com os radicais peróxido envolvidos na peroxidação lipídica. Ou seja, os antioxidantes podem reagir rapidamente *in vivo* com os radicais peróxido e lentamente com o radical DPPH. Outra das limitações é o facto de haver compostos que reajam de forma reversível com o radical DPPH, tendo como consequência valores de capacidade antioxidante falsamente baixos. Um exemplo é o eugenol ou outros compostos fenólicos com uma estrutura idêntica, significando que moléculas fenólicas pequenas que tenham um efeito estérico menos importante e com melhor acesso ao radical apresentem valores de capacidade antioxidante, ilusoriamente, mais elevados (Prior *et al.*, 2005; MacDonald-Wicks *et al.*, 2006; Ndhlala *et al.*, 2010).

Tanto o método TEAC e o DPPH são classificados, usualmente, como métodos com mecanismo de reação ET, contudo, ambos os radicais utilizados podem ser neutralizados por redução direta através da transferência de eletrões e/ou por bloqueio do radical através da transferência de átomos de hidrogénio. Nestes casos os mecanismos de reação são difíceis de interpretar sem informação detalhada sobre a composição e estrutura dos antioxidantes a testar (Prior *et al.*, 2005).

1.9.2. Determinação do conteúdo em flavonóides totais

O método para a determinação de flavonóides totais, apesar de não ser um método que avalie diretamente a capacidade antioxidante, permite quantificar um grupo específico de compostos fenólicos. O ensaio para a determinação do conteúdo de flavonóides totais consiste na complexação de flavonóides com cloreto de alumínio. A formação deste complexo origina uma coloração que pode ser avaliada espectrofotometricamente, sendo os resultados expressos em equivalentes de epicatequina ou outro padrão de referência (Naczki & Shahidi, 2006; Chowdhury *et al.*, 2015). Este é um método altamente seletivo para a estrutura flavonóide, uma vez que os derivados de isoflavona não originam cor na reação com o cloreto de alumínio (Balbaa *et al.*, 1974 citado por Palacios *et al.*, 2011).

Capítulo II

Objetivos

2. Objetivos

A presente dissertação, tem como objetivo principal estudar a capacidade antioxidante (através da determinação da capacidade de capturar elétrons pelo radical DPPH e da inibição do branqueamento do β -caroteno) e o conteúdo em compostos fenólicos e flavonóides em cogumelos comestíveis:

- Obtidos através de um processo de produção desenvolvido e otimizado (pela empresa iFungHealth) com aplicação de subprodutos agroindustriais para avaliar a influência destes nas propriedades antioxidantes dos cogumelos;
- Obtidos em grandes superfícies comerciais da região de Coimbra para caracterizar as várias espécies comercializadas relativamente às suas propriedades antioxidantes.

Capítulo III

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Amostragem

Como referido anteriormente, a presente dissertação centrou-se no estudo da capacidade antioxidante de cogumelos comestíveis e respetivos micélios. Para o efeito, foram utilizadas amostras de espécies de cogumelos comestíveis de duas origens:

- Comercializados, *Agaricus bisporus* (branco e castanho), *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes* (frescos), e *Boletus edulis*, *Marasmius oreades* e *Cantharellus cibarius* (desidratados), obtidos em superfícies comerciais da região de Coimbra;

- Cogumelos e micélios (*Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* e *Agrocybe cylindracea*) obtidos através de processos de produção desenvolvidos e otimizados pela empresa iFungHealth – Fungi Innovation Solutions for Health, Lda. Na tabela 7 são descritas as espécies e as respetivas diferenças no processo de produção, fornecidos pela respetiva empresa, em que os subprodutos agroindustriais aplicados são designados por “subproduto agroindustrial A” e “subproduto agroindustrial B” por motivos de confidencialidade.

Foram ainda utilizadas duas amostras, facultadas pela empresa iFungHealth, do cogumelo silvestre *Cantharellus cibarius* colhidas em anos diferentes, a 8-12-2012 e 3-12-2014.

As amostras foram secas em estufa a 40 °C, durante 48 horas e posteriormente conservadas a -18 °C até à realização dos ensaios.

Tabela 7. Caracterização das amostras de cogumelos relativamente ao processo de produção.

Espécie	Código da amostra	Processo de produção			
		Produção de <i>Spawn</i>	Substrato base	Encharcamento do substrato	Inoculação
<i>P. eryngii</i>	#0	Água (sem suplemento)	Normal	Água	<i>Spawn</i>
<i>P. eryngii</i>	#1	-	Normal	Subproduto agroindustrial A	Cultura líquida de micélio
<i>P. eryngii</i>	#2	-	Normal	Água	Cultura líquida de micélio
<i>P. eryngii</i>	#3	Água (suplemento padrão)	Normal	Água	<i>Spawn</i>
<i>P. eryngii</i>	#4	Água (suplemento padrão)	Normal	Subproduto agroindustrial A	<i>Spawn</i>
<i>P. eryngii</i>	#5	Água (suplemento - subproduto agroindustrial A)	Normal	Subproduto agroindustrial A	<i>Spawn</i>
<i>P. eryngii</i>	#6	Água (suplemento padrão)	Alterado	Água	<i>Spawn</i>

Tabela 7. Continuação.

Espécie	Código da amostra	Processo de produção			
		Produção de Spawn	Substrato base	Encharcamento do substrato	Inoculação
<i>P. eryngii</i>	#7	Água (suplemento padrão)	Alterado	Água	Spawn
<i>P. eryngii</i>	#8	Subproduto agroindustrial A (sem suplementos)	Normal	Subproduto agroindustrial A	Spawn
<i>P. ostreatus</i>	#0	Água (suplemento padrão)	Normal	Água	Spawn
<i>P. ostreatus</i>	#1	Água (suplemento padrão)	Normal	Subproduto agroindustrial A	Spawn
<i>P. ostreatus</i>	#2	Subproduto agroindustrial A (suplemento padrão)	Normal	Subproduto agroindustrial A	Spawn
<i>P. ostreatus</i>	#3	Água (suplemento padrão)	Normal	Subproduto agroindustrial B	Spawn
<i>P. ostreatus</i>	#4	Água (suplemento padrão)	Alterado	Água	Spawn
<i>A. cylindracea</i>	#0	Subproduto agroindustrial A (suplemento padrão)	Normal	Subproduto agroindustrial A	Spawn
<i>A. cylindracea</i>	#1	Água (suplemento padrão)	Alterado	Água	Spawn

3.2. Reagentes e materiais

3.2.1. Reagentes

Na realização dos ensaios para a determinação da atividade antioxidante foram utilizados reagentes com grau analítico p. a., com exceção do metanol e da (-)-epicatequina que foram utilizados com grau de pureza indicado para HPLC.

Os reagentes ácido gálico, BHT, nitrito de sódio, reagente fenol Folin & Ciocalteu's, tween 40, (-)-epicatequina, cloreto de alumínio, metanol $\geq 99,9\%$, ácido linoleico, β -caroteno, 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha); o carbonato de sódio foi fornecido pela May & Baker (Dagenham, Inglaterra); o hidróxido de sódio foi fornecido pela Merck (Darmstadt, Alemanha) e o clorofórmio foi fornecido pela Fisher Scientific (Loughborough, Inglaterra).

3.2.2. Material laboratorial

Durante a realização dos ensaios foram utilizados, para além do material comum de laboratório, filtros de papel Whatman™ I da GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra), micropipetas Pipetman® Gilson (Villiers le Bel, França) de volume variável, 200 e 1000 µL, balança analítica AG285 Mettler Toledo (Lisboa, Portugal), estufa Schutzart DIN 40050-ip20 (Schwabath, Alemanha), bloco de aquecimento SHT I da Stuart Scientific (Burlington, USA), agitador horizontal HS 501D da IKA®-Labortechnik (Staufen, Alemanha), evaporador rotativo RE-111 e bomba de vácuo V-700 da BÜCHI (Flawil, Suíça), agitador magnético Agimatic 243 (Barcelona, Espanha) e espectrofotómetro U-3900 da Hitachi (Tóquio, Japão) com software U.V Solutions 3.0.

3.3. Procedimento Experimental

O processo de extração utilizado durante os estudos preliminares e os métodos analíticos para a determinação da capacidade antioxidante foram realizados de acordo com os parâmetros estabelecidos no Laboratório de Bromatologia e Hidrologia Faculdade de Farmácia e posteriormente procederam-se a otimizações (descritas no capítulo IV – Resultados e Discussão) para melhorar a avaliação da capacidade antioxidante nas amostras de cogumelos, obtendo-se o procedimento experimental descrito seguidamente.

3.3.1. Preparação e extração da amostra

As amostras em análise, após processo de secagem, foram sujeitas a um processo de maceração e homogeneização com recurso a uma trituradora. Procedeu-se à pesagem de 1 g do produto macerado, o qual foi submetido a uma extração sólido-líquido com 30 mL de metanol, com agitação a 140 rpm durante 1h à temperatura ambiente. Seguidamente, o extrato metanólico obtido foi filtrado com papel de filtro Whatman n.º1 e procedeu-se a uma segunda extração sólido-líquido do resíduo da amostra com a adição de mais 30 mL de metanol, adotando as condições anteriores. As duas frações do extrato obtidas foram colocadas num balão de fundo redondo e sujeitas a evaporação completa do metanol a 40°C através de um evaporador rotativo. O resíduo seco obtido foi dissolvido num volume final de 10 mL, através do seguinte procedimento: (1) adição de 5 mL de metanol ao resíduo seco, agitando-se manualmente e procedendo-se, posteriormente, à filtração com papel de filtro Whatman n.º1; (2) repetiu-se o processo com o mesmo volume de metanol. A partir

do extrato metanólico obtido foram preparadas diluições para avaliar a capacidade antioxidante através de diferentes ensaios colorimétricos.

3.3.2. Métodos analíticos

3.3.2.1. Determinação do conteúdo em compostos fenólicos totais

O conteúdo em compostos fenólicos totais (TPC) nas amostras foi determinado através do método *Folin-Ciocalteu*. Um mililitro de amostra foi misturado com 7,5 mL de reagente *Folin-Ciocalteu* (previamente diluído com água ultrapura, 1:10, v/v). Após 5 min., foram adicionados 7,5 mL de carbonato de sódio, Na_2CO_3 (60 mg/mL, preparado com água ultrapura). A solução foi agitada vigorosamente e guardada ao abrigo da luz durante 120 minutos para desenvolvimento de coloração. A absorvância foi lida a 725 nm num espectrofotómetro.

O conteúdo em compostos fenólicos totais em cogumelos é expresso em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg GAE/g de extrato). Foi preparada uma solução *stock* de ácido gálico de 10 mg/mL a partir da qual se fizeram diluições, obtendo-se uma gama de concentrações de 0,015 a 0,15 mg/mL. Procedeu-se ao método, como descrito anteriormente, para as diferentes concentrações. A curva de calibração ($y=7,1323x + 0,0302$; $r^2= 0,999$), absorvância *versus* concentração (mg/mL) de ácido gálico, obtida permitiu calcular os mg GAE/g de extrato.

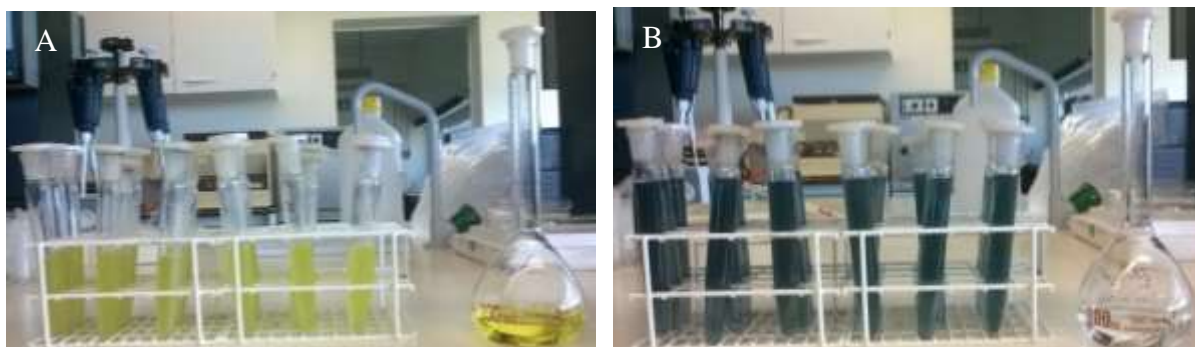
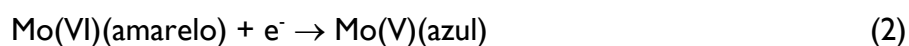


Figura 5. Determinação do conteúdo em compostos fenólicos totais. (A) solução de reagente *Folin-Ciocalteu* e amostra em tubos de ensaio; (B) adição de Na_2NO_3 à solução com formação da coloração característica da presença de compostos fenólicos.

3.3.2.1.1. Mecanismo de reação

A determinação do conteúdo em compostos fenólicos totais através do reagente *Folin-Ciocalteu* consiste num ensaio, amplamente utilizado em investigação. A natureza química exata do reagente *Folin-Ciocalteu* ainda não é bem conhecida mas sabe-se que tem, na sua constituição, uma mistura de ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico (Magalhães *et al.*, 2008).

O mecanismo de reação baseia-se na transferência de eletrões, em meio alcalino, de compostos fenólicos para o molibdénio originando um complexo de coloração azul (Fig. 5), (equações (1) e (2)) que pode ser monitorizada espectralmente a 725-765 nm (Magalhães *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2012a).



3.3.2.2. Determinação do conteúdo em flavonóides totais

O conteúdo de flavonóides totais (TFC) foi determinado através de um ensaio colorimétrico modificado, desenvolvido inicialmente por Zhishen *et al.* (1999).

Num tubo de ensaio volumétrico foi misturado 1 mL de amostra com 4 mL de água ultrapura e 0,3 mL de nitrito de sódio, NaNO_2 (5%, p/v, preparado com água ultrapura). Após 5 min., adicionou-se 0,6 mL de cloreto de alumínio, AlCl_3 (10%, p/v, preparado com água ultrapura) à solução e procedeu-se à sua homogeneização manualmente. Após 6 min., foram adicionados 2 mL de hidróxido de sódio, NaOH (1M, preparado com água ultrapura), e 2,1 mL de água ultrapura. A solução foi homogeneizada e, de seguida, procedeu-se à leitura da absorvância a 510 nm num espectrofotómetro.

A (-)-epicatequina foi utilizada para construir a curva padrão, com recurso a 6 pontos de calibração numa gama de 0,05 a 3 mg/mL, e os resultados são expressos em mg de equivalentes de (-)-epicatequina (ECE) por g de extrato, utilizando a equação linear da curva padrão ($y=1,9452x + 0,0257$; $r^2=0,998$) para expressar as absorvância obtidas em “mg ECE/g de extrato”.

3.3.2.2.1. Mecanismo de reação

O método baseia-se num mecanismo de reação em que os flavonóides formam um complexo entre o íon alumínio Al(III) e os grupos carbonilo e hidroxilo dos flavonóides, originando uma coloração amarela que em meio alcalino passa a ter uma coloração vermelha (Alvarez-Suarez *et al.*, 2009). A formação de cor permite determinar espectrofotometricamente a 510 nm a quantidade de flavonóides presentes na amostra (Turner, 1952 citado por Palacios *et al.*, 2011).

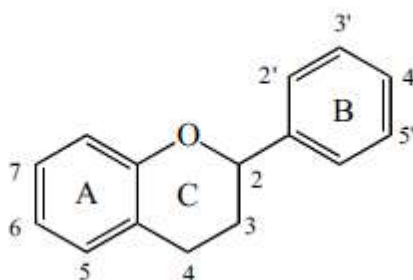


Figura 6. Estrutura genérica dos flavonóides (Fonte: Ferreira *et al.*, 2009).

3.3.2.3. Capacidade de capturar eletrões pelo radical DPPH

A avaliação da capacidade antioxidante através do presente método é determinada pela capacidade que os compostos presentes nas amostras têm para capturar radicais DPPH.

Para avaliar a atividade antioxidante foi preparada uma solução metanólica contendo radicais DPPH com uma concentração de 6×10^{-5} mol/L.

Na realização do ensaio, foram utilizadas várias diluições preparadas a partir da solução *stock* de cada extrato. Em tubos de ensaio colocaram-se 2,7 mL de solução DPPH · com 300 μ L de amostra, agitou-se vigorosamente a mistura e colocaram-se os tubos ao abrigo da luz durante 30 min. Após os 30 min de reação, procedeu-se à leitura das absorvâncias a 517 nm num espectrofótopmetro para avaliar a redução do radical DPPH que, caso ocorra, provoca uma descoloração da solução de radical DPPH e, conseqüentemente, uma diminuição da absorvância face ao branco.



Figura 7. Realização do ensaio da capacidade de capturar elétrons pelo radical DPPH.

A atividade captadora de radicais DPPH· dos extratos foi calculada em percentagem de inibição (%PI) utilizando a seguinte equação:

$$\%PI = \frac{Abs\ branco - Abs\ amostra}{Abs\ branco} \times 100$$

Em que,

Abs branco = Absorvância da mistura metanol (branco) com a solução de radical DPPH, após 30 min de reação.

Abs amostra = Absorvância da mistura de extrato com a solução de radical DPPH, após 30 min de reação.

A percentagem de inibição expressa a quantidade de radicais DPPH que foram captados pelos compostos antioxidantes dos cogumelos. Através da utilização de várias concentrações das amostras, calculou-se a %PI para cada concentração e construiu-se uma curva %PI versus concentração (mg/mL). A partir da curva obtida, determinou-se a equação linear para calcular o EC₅₀ (mg/mL). Este consiste na concentração necessária de amostra para captar 50% da quantidade de radicais livres DPPH presentes na solução. Os resultados da atividade captadora de radicais DPPH são expressos pelo EC₅₀ (mg/mL).

3.3.2.3.1. Mecanismo de reação

O método baseia-se na adição de compostos antioxidantes a uma solução de radicais DPPH com o objetivo de avaliar a capacidade dos compostos doarem elétrons aos radicais (Fig. 8A), reduzindo o DPPH que se torna numa molécula estável. Como consequência da redução do DPPH a molécula sofre descoloração, passando de cor púrpura para uma coloração amarelo pálido (Fig. 8B e 8C), caso ocorra a redução de todos os radicais DPPH presentes na solução (Reis *et al.*, 2012a). Esta descoloração é acompanhada espectrofotometricamente pela diminuição da absorvância a 517 nm. Quanto maior e mais rápida for a descoloração da solução, maior é a atividade captadora de radicais DPPH dos compostos em análise (Molyneux, 2004; Amarowicz *et al.*, 2004).

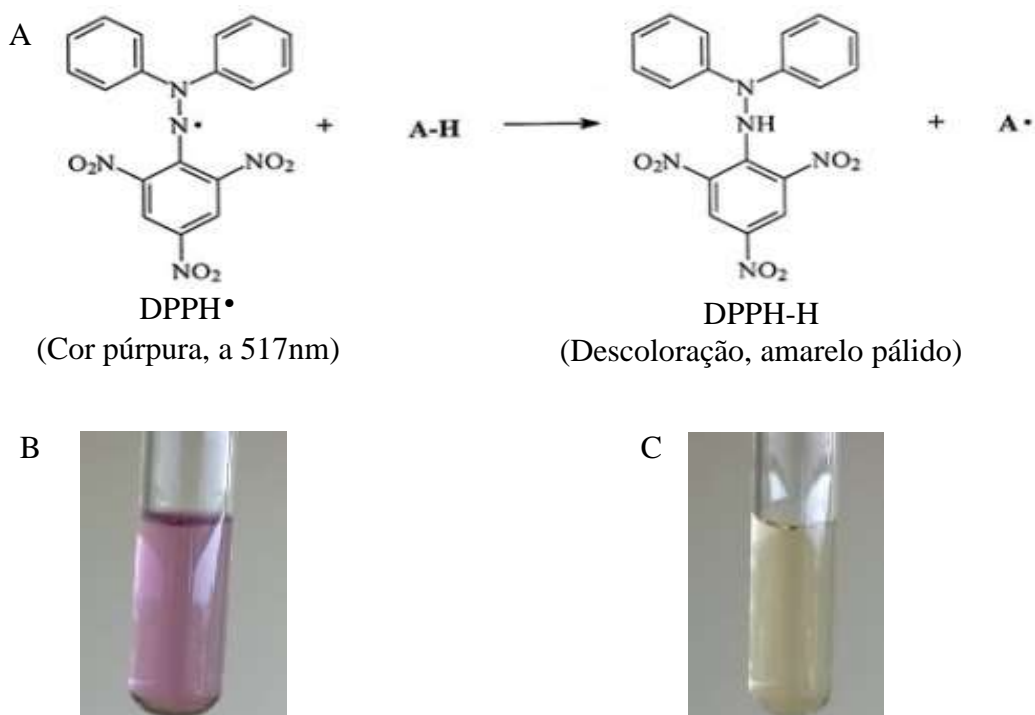


Figura 8. (A) – Mecanismo da reação da molécula DPPH· na presença de um antioxidante “A”; (B) – coloração da solução de radicais DPPH; (C) – coloração da solução de DPPH na forma reduzida.

3.3.2.4. Inibição do branqueamento do β -caroteno

O teste da inibição do branqueamento do β -caroteno, à semelhança dos ensaios anteriores, é um método colorimétrico que permite avaliar a capacidade antioxidante. Para a realização do ensaio seguiu-se a metodologia de Miller (1971).

A solução de β -caroteno foi preparada com uma concentração de 0,2 mg/mL, dissolvendo-se 2 mg de β -caroteno em 10 mL de clorofórmio. Na preparação da emulsão foi colocado, num balão de fundo redondo, emulsionante Tween 40 (200 mg), ácido linoleico (20 mg) e solução de β -caroteno (1 mL). A mistura foi colocada num evaporador rotativo, a 40 °C, sob pressão reduzida para remoção do clorofórmio. Após este processo, fez-se passar corrente de azoto para remoção completa do clorofórmio. Por último, adicionou-se à mistura 50 mL de água ultrapura oxigenada (através de agitação durante 30 min em placa de agitação magnética) e agitou-se vigorosamente até formar uma emulsão estável.

Foram colocados em tubos de ensaio 5 mL da emulsão e 200 μ L de amostra. Os tubos foram agitados e foi lida a absorvância a 470 nm do branco, considerando-se esta leitura como $t=0$ min. A seguir, colocaram-se os tubos num bloco de aquecimento a 50 °C durante 120 min. No final deste período, foram medidas as absorvâncias, a 470 nm, das soluções com amostra e o branco ($t=120$ min), num espectrofotómetro.



Figura 9. Realização do ensaio da inibição do branqueamento do β -caroteno.

A inibição do branqueamento do β -caroteno foi calculada através do coeficiente de atividade antioxidante, AAC (do inglês, *Antioxidant Activity Coefficient*), utilizando a seguinte equação (Koleva et al., 2002):

$$AAC = \frac{(Abs_{e, t=120} - Abs_{b, t=120})}{(Abs_{b, t=0} - Abs_{b, t=120})} \times 1000$$

Em que,

$Abs_{e, t=120}$ - Absorvância da amostra após 120 min de reação com a emulsão;

$Abs_{b, t=120}$ - Absorvância do branco (metanol) após 120 min de reação com a emulsão;

$Abs_{b, t=0}$ - Absorvância do branco (metanol) no início da reação (0 min) com a emulsão.

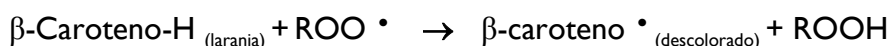
3.3.2.4.1. Mecanismo de reação

O ensaio da inibição do branqueamento do β -caroteno é um método competitivo direto que se baseia na monitorização espectrofotométrica a 470 nm (Mikami *et al.*, 2009).

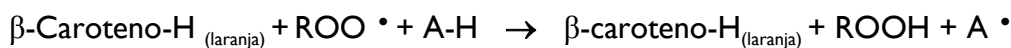
O mecanismo de reação do ensaio consiste em formar radicais livres através da peroxidação do ácido linoleico, induzida pelo calor. Como os radicais livres formados são moléculas instáveis vão captar átomos de hidrogénio do β -caroteno, provocando a sua oxidação e, por conseguinte a sua descoloração (Fig. 9). Esta descoloração pode ser inibida ou reduzida com a adição de compostos antioxidantes à solução que vão reduzir os radicais livres formados, evitando assim a oxidação do β -caroteno (Amarowicz *et al.*, 2004; Mikami *et al.*, 2009).

As reações químicas ocorrem de acordo com as seguintes equações:

Sem adição de antioxidantes.



Com adição de antioxidantes, "A".



Capítulo IV

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Estudos Preliminares

Para determinar a capacidade antioxidante nas diferentes amostras de cogumelos foram realizados estudos preliminares com o objetivo de estabelecer os parâmetros mais adequados para o estudo da capacidade antioxidante. O procedimento experimental utilizado na fase de estudos preliminares foi o descrito no Capítulo III – Materiais e Métodos, com exceção do processo de extração e do método do radical DPPH (descritos seguidamente).

4.1.1. Procedimento Experimental (inicial)

4.1.1.1. Processo de extração (inicial)

As amostras secas foram trituradas, homogeneizadas e submetidas (5 g de amostra) a uma extração sólido-líquido com 100 mL de metanol, com agitação (120 rpm) durante 1h à temperatura ambiente. Seguidamente, o extrato metanólico obtido, foi filtrado com papel de filtro Whatman n.º1 e sujeito a evaporação completa do metanol a 40 °C através de um evaporador rotativo. O extrato obtido foi dissolvido com 10 mL de metanol e filtrado novamente com papel de filtro Whatman n.º1, obtendo-se uma solução *stock* do extrato. A partir da solução *stock* foram preparadas diluições para avaliar a capacidade antioxidante através de diferentes ensaios colorimétricos.

4.1.1.2. Capacidade de capturar eletrões pelo radical DPPH (inicial)

Para avaliar a capacidade antioxidante foi preparada uma solução metanólica contendo radicais DPPH, com uma concentração de $3,6 \times 10^{-5}$ mol/L. Na realização do ensaio foram utilizadas diluições sucessivas preparadas a partir da solução *stock* de cada extrato. Em tubos de ensaio colocaram-se 4 mL de solução DPPH· com 0,1 mL de extrato, agitou-se vigorosamente a mistura e colocaram-se os tubos ao abrigo da luz durante 30 min. Após os 30 min de reação procedeu-se à leitura das absorvâncias a 517 nm num espectrofotómetro para avaliar a redução do radical DPPH.

4.1.2. Resultados preliminares

Os resultados obtidos durante a realização de estudos preliminares são descritos na tabela 8. Numa análise geral dos resultados preliminares obtidos para o TPC verifica-se que o *P. eryngii* de origem comercial apresenta o valor mais elevado do TPC (9,19 mg GAE/g extrato), enquanto o *C. cibarius* (8-12-12) apresenta o resultado mais baixo (2,58 mg GAE/g extrato).

Para as amostras da espécie *P. ostreatus* verifica-se uma ligeira diferença do TPC, sendo superior na amostra *P. ostreatus* #4 (4,41 mg GAE/g extrato) relativamente à amostra de *P. ostreatus* comercial (3,55 mg GAE/g extrato), que poderá ser indicativo da influência do substrato no TPC dos cogumelos. Porém os resultados obtidos para ambas as amostras são inferiores em comparação com o extrato de *P. ostreatus* de origem comercial descrito por Reis *et al.* (2012a) (12,54 mg GAE/g extrato) e que o extrato metanólico de *P. ostreatus* de origem comercial, proveniente da China, descrito por Yang *et al.* (2002) (15,7 mg GAE/g extrato).

No estudo das amostras da espécie *C. cibarius* silvestre, o TPC é similar entre as duas amostras. A amostra colhida a 8-12-12 obteve um valor de 2,58 mg GAE/g extrato, enquanto a amostra colhida a 3-12-14 obteve um valor de 2,63 mg GAE/g extrato. Contudo, os resultados obtidos neste estudo estão muito abaixo do resultado (31,48 mg GAE/g extrato) obtido por Orha & Ustun, 2011, para um extrato etanólico de cogumelo fresco *Cantharellus cibarius* silvestre, proveniente da Turquia, mas superior ao determinado por Barros *et al.* (2008) para um extrato de *C. cibarius* comercializado desidratado (0,88 mg GAE/g extrato).

Nas amostras de *P. eryngii* verifica-se que a amostra de cogumelo de origem comercial tem um TPC de 9,19mg GAE/g extrato, aproximadamente, três vezes superior às amostras produzidas em diferentes processos de produção. O TPC da amostra comercial é ainda superior ao valor obtido por Reis *et al.* (2012a) para o extrato metanólico de *P. eryngii* comercial (7,14 mg GAE/g extrato), no entanto é inferior ao extrato metanólico de *P. eryngii* silvestre (18,43 mg GAE/g extrato) descrito por Reis *et al.* (2013). Nas amostras de *P. eryngii* obtidas de diferentes processos de produção em estudo verificam-se pequenas diferenças. A amostra *P. eryngii* #0 apresenta o maior TPC (3,43 mg GAE/g extrato) seguida pela amostra *P. eryngii* #8 (3,11 mg GAE/g extrato) enquanto a amostra *P. eryngii* #4 possui o valor mais baixo (2,75 mg GAE/g de extrato).

No estudo da capacidade antioxidante através do ensaio do radical DPPH, verifica-se que as amostras com o EC₅₀ mais baixo são *P. ostreatus* de origem comercial e *P. eryngii* #0 (42,23 e 42,24 mg/mL respetivamente) enquanto o *P. eryngii* #4 apresenta a menor capacidade de doar eletrões ao radical DPPH (57,30 mg/mL).

Nas amostras de *P. ostreatus* verifica-se uma ligeira diferença entre a amostra comercial e a amostra *P. ostreatus* #4 (42,23 e 49,56 mg/mL respetivamente) apesar da amostra *P. ostreatus* #4 apresentar um TPC superior à amostra comercial. Contudo, o EC₅₀ obtido para ambas as amostras é muito superior ao descrito por Reis et al. (2012a), para um extrato metanólico de *P. ostreatus* comercial (6,54 mg/mL).

Nas amostras de *P. eryngii* verificam-se algumas diferenças. A amostra *P. eryngii* #0 apresenta o EC₅₀ mais baixo (42,2 mg/mL) seguido da amostra *P. eryngii* #8 (50,7 mg/mL) enquanto as amostras de *P. eryngii* comercial e *P. eryngii* #4 apresentam EC₅₀ mais elevados (55,9 e 57,3 mg/mL). Verificando-se que o facto da amostra comercial ter um TPC superior às restantes amostras não se reflete na capacidade de doar eletrões ao radical DPPH. À semelhança das amostras de *P. ostreatus*, as amostras de *P. eryngii* apresentam valores de EC₅₀ muito superiores ao descrito por Reis et al. (2012a) para o extrato metanólico de *P. eryngii* comercial (8,67 mg/mL).

Para as amostras de *C. cibarius* não foi possível calcular o EC₅₀ porque a %IP máxima conseguida não ultrapassa os 50%, impossibilitando a construção de uma curva que forneça a equação para calcular o EC₅₀.

No estudo da capacidade antioxidante através do ensaio da inibição do branqueamento β-caroteno verifica-se que a amostra com o maior AAC é o *P. ostreatus* de origem comercial enquanto a amostra de *C. cibarius* (3-12-14) apresenta o menor AAC (Tabela 8).

Nas duas amostras de *C. cibarius*, que diferem na data de colheita, verifica-se que a amostra colhida a 8-12-12 apresenta um AAC relativamente superior à amostra colhida a 3-12-14 (855 e 760 respetivamente). Ao contrário do que ocorre no TPC em que as amostras possuem valores similares.

Para as amostras de *P. eryngii* verifica-se que a amostra *P. eryngii* #0 apresenta o AAC mais elevado seguido da amostra *P. eryngii* #4, enquanto o *P. eryngii* comercial apresenta o AAC mais baixo (Tabela 8).

Relativamente ao conteúdo em flavonóides totais nas amostras em estudo, não foi possível quantificar os mesmos devido à ausência de cor característica da presença de flavonóides e a formação de um precipitado durante a execução do procedimento experimental, invalidando a leitura das absorvâncias das amostras.

Tabela 8. Resultados de estudos preliminares. Conteúdo em compostos fenólicos totais, média \pm DP (n=9), expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg GAE/g extrato); Conteúdo em flavonóides totais, média \pm DP (n=9), expressos em mg de equivalente de epicatequina por g de extrato (mg ECE/g extrato); Capacidade de capturar eletrões pelo radical DPPH, EC₅₀ (mg/mL), média \pm DP (n=3) e Ensaio da inibição do branqueamento do caroteno, resultados expressos pelo coeficiente de atividade antioxidante (AAC), média \pm DP, n=3. nd – não detetado.

Espécie/Amostra	Conteúdo em compostos fenólicos totais	Conteúdo em flavonóides totais	EC ₅₀	AAC
	(mg GAE/g extrato)	(mg ECE/g extrato)	(mg/mL)	
<i>P. ostreatus</i>	3,55 \pm 0,24	nd	42,2 \pm 2,40	920 \pm 1,60
<i>P. ostreatus</i> #4	4,41 \pm 0,39	nd	49,6 \pm 7,92	-
<i>C. cibarius</i> (3-12-14)	2,63 \pm 0,19	nd	-	760 \pm 37,4
<i>C. cibarius</i> (8-12-12)	2,58 \pm 0,18	nd	-	855 \pm 91,0
<i>P. eryngii</i>	9,19 \pm 0,41	nd	55,9 \pm 2,83	770 \pm 76,4
<i>P. eryngii</i> #0	3,43 \pm 0,08	nd	42,2 \pm 7,65	846 \pm 17,6
<i>P. eryngii</i> #4	2,75 \pm 0,26	nd	57,3 \pm 6,23	816 \pm 8,50
<i>P. eryngii</i> #8	3,11 \pm 0,18	nd	50,7 \pm 1,33	-

4.2. Otimização do procedimento experimental

Devido a alguns resultados obtidos nos estudos preliminares serem consideravelmente diferentes dos descritos por alguns autores para amostras semelhantes, procedeu-se à otimização do processo de extração e do método para avaliar a capacidade captadora de eletrões pelo radical DPPH, no qual se verificaram os resultados mais discrepantes. Assim, o objetivo da otimização foi tornar o processo de extração mais eficiente e aperfeiçoar o método do radical DPPH. Outro dos objetivos para a realização da otimização foi tornar o procedimento experimental mais amigo do ambiente adotando uma política de química

verde, assim como reduzir os custos financeiros associados, nomeadamente na utilização do solvente (metanol) e todo o processo de produção de amostras de cogumelos.

Para a realização da otimização utilizou-se a amostra de *P. eryngii* de origem comercial.

4.2.1. Parâmetros avaliados

4.2.1.1. Processo de extração

Para melhorar a eficiência da extração de compostos com capacidade antioxidante procederam-se às seguintes alterações: (1) reduziu-se a quantidade de amostra de cogumelos para 1 g; (2) testaram-se diferentes quantidades de solvente de extração (20 mL, 30 mL e 40 mL); (3) o tempo de extração alterou-se para 2 horas, dividido em duas fases, uma primeira extração de 1 hora com remoção do extrato metanólico seguido de uma segunda extração de 1 hora com o mesmo volume de metanol. No final juntaram-se as duas frações do extrato metanólico e procedeu-se à evaporação, a 40 °C através de um evaporador rotativo, até obtenção do resíduo seco do extrato que foi dissolvido com 10 mL, em duas fases: (1) adição de 5 mL de metanol ao resíduo seco, agitando-se manualmente e procedendo, posteriormente, à filtração com papel de filtro Whatman n.º1; (2) repetiu-se o processo com o mesmo volume de metanol.

4.2.1.2. Capacidade captadora de eletrões pelo radical DPPH

Os resultados obtidos para este ensaio foram consideravelmente diferentes dos descritos na literatura para amostras semelhantes. Assim, procedeu-se a alteração do ensaio com base no método descrito por Reis *et al.* (2012a), que consiste na preparação de uma solução de DPPH· com uma concentração de 6×10^{-5} mol/L e alteração do volume de solução de DPPH· e extrato a adicionar, 2,7 mL e 0,3 mL respetivamente.

4.2.2. Resultados da otimização

Após a realização dos ensaios de otimização verificaram-se algumas diferenças, essencialmente no método para avaliar a capacidade de capturar eletrões pelo radical DPPH.

De acordo com a tabela 9, no ensaio para a determinação do TPC não se verificaram diferenças apreciáveis entre a quantidade de amostra e o tempo de extração assim como entre o volume de solvente utilizado, variando entre 8,29 e 9,31 mg GAE/g extrato.

No ensaio para testar a capacidade de capturar eletrões pelo radical DPPH verificaram-se valores de EC_{50} diferentes entre as quantidades de amostra utilizadas, 1 e 5 g, obtendo valores de EC_{50} mais baixos na utilização de 1 g de amostra, entre 18,4 e 21,9 mg/mL (Tabela 9). O principal motivo consiste nas alterações que se realizaram no ensaio, descritas anteriormente. Ou seja, nos ensaios em que se utilizou 1 g de amostra para a extração foi realizado o método do radical DPPH em que a concentração da solução DPPH era 6×10^{-5} mol/L e o volume de solução e amostra era 2,7 e 0,3 mL, respetivamente. Enquanto no ensaio em que se usou 5 g de amostra o método do radical DPPH foi realizado com uma solução de DPPH a $3,6 \times 10^{-5}$ mol/L, adicionando 4 mL de solução DPPH e 0,1 mL de amostra.

Nos resultados obtidos pelo método da inibição do branqueamento do β -caroteno verificam-se algumas diferenças no coeficiente de atividade antioxidante (AAC). Na utilização de 5 g de amostra o AAC é mais elevado (770), enquanto na utilização de 1 g de amostra os coeficientes de atividade antioxidante foram ligeiramente mais baixos (599 a 667). Esta pequena diferença de AAC pode ser explicada pelo facto de se utilizar o extrato sem diluições. Logo as concentrações são diferentes, pois na utilização de 5 g de amostra a concentração é 500 mg/mL e na utilização de 1 g a concentração ser 100 mg/mL. Entre as diferentes quantidades de volume de metanol utilizado para 1 g de amostra, verificou-se que na utilização de 40 + 40 mL, o AAC é mais baixo (599) enquanto na utilização de 20 mL + 20 mL o AAC é mais elevado (667).

Em conclusão, verificou-se que é possível utilizar apenas 1 g de amostra para realizar os ensaios de capacidade antioxidante assim como a alteração no método do radical DPPH demonstrou melhores resultados de EC_{50} . Em termos de volume de solvente a utilizar, os resultados demonstraram que se poderia optar pela utilização de 30 mL + 30 mL, por apresentar, em termos globais, os melhores resultados (Tabela 9).

As alterações realizadas tornaram a realização deste procedimento experimental mais amigável do ambiente e mais económico devido à redução da utilização de solvente (metanol) e da quantidade de amostra necessária. Em particular, na utilização de metanol para o processo de extração foi possível reduzir em 40% a utilização deste solvente.

Tabela 9. Otimização do processo de extração através da determinação do conteúdo em compostos fenólicos totais (mg GAE/g extrato), média \pm DP (n=9); capacidade de capturar eletrões pelo radical DPPH (EC_{50} mg/mL), média \pm DP (n=3); e inibição do branqueamento do β -caroteno (AAC), média \pm DP (n=3).

Amostra – <i>P. eryngii</i> (comercial)	Tempo de extração	Solvente - metanol	Conteúdo em compostos fenólicos totais (mg GAE/g extrato)	EC_{50} (mg/mL)	AAC
1g	1h + 1h	20 mL + 20 mL	9,17 \pm 0,59	21,9 \pm 3,34	667 \pm 28,0
		30 mL + 30 mL	9,31 \pm 0,51	21,4 \pm 1,16	633 \pm 33,4
		40 mL + 40 mL	8,29 \pm 1,92	18,4 \pm 1,19	599 \pm 20,0
5g	1h	100 mL	9,19 \pm 0,41	55,9 \pm 2,83	770 \pm 76,4

4.3. Discussão de resultados

No presente trabalho, como descrito anteriormente, foram utilizados quatro métodos distintos para avaliar o potencial antioxidante das amostras. Os métodos para a determinação do conteúdo em compostos fenólicos totais e do conteúdo em flavonóides totais permitem avaliar a presença de compostos com potencial antioxidante enquanto os métodos para a determinação da capacidade de capturar eletrões pelo radical DPPH e inibição do branqueamento do β -caroteno permitem avaliar a capacidade antioxidante.

4.3.1. Cogumelos comercializados

Na tabela 10 são descritos os resultados obtidos para as amostras de cogumelos obtidos em superfícies comerciais, com exceção de duas amostras, facultadas pela empresa iFungHealth, de *C. cibarius* silvestre (8-12-2012 e 3-12-2014) para comparar com *C. cibarius* comercializado desidratado.

Tabela 10. Cogumelos comercializados. Conteúdo em compostos fenólicos totais, média \pm DP (n=9), expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg GAE/g extrato); Conteúdo em flavonóides totais, média \pm DP (n=9), expressos em mg de equivalente de epicatequina por g de extrato (mg ECE/g extrato); Capacidade de capturar eletrões pelo radical DPPH, EC₅₀ (mg/mL), média \pm DP (n=3) e Inibição do branqueamento do caroteno, resultados expressos pelo coeficiente de atividade antioxidante (AAC), média \pm DP, n=3; nd – não detetado.

Espécie/Amostra	Conteúdo em compostos fenólicos totais (mg GAE/g extrato)	Conteúdo em flavonóides totais (mg ECE/g extrato)	EC ₅₀ (mg/mL)	AAC
A. bisporus (branco)	9,79 \pm 0,39	nd	7,70 \pm 0,31	843 \pm 15,9
A. bisporus (castanho)	12,6 \pm 0,36	nd	10,8 \pm 0,36	986 \pm 13,4
B. edulis	19,7 \pm 1,14	4,32 \pm 0,31	2,01 \pm 0,10	960 \pm 32,8
C. cibarius	5,75 \pm 0,49	nd	-	352 \pm 39,8
C. cibarius (8-12-12)	3,45 \pm 0,23	nd	-	403 \pm 49,3
C. cibarius (3-12-14)	4,20 \pm 0,43	nd	-	411 \pm 40,3
F. velutipes	14,3 \pm 0,72	nd	6,89 \pm 0,87	859 \pm 44,9
L. edodes	9,67 \pm 0,63	nd	9,30 \pm 0,77	904 \pm 46,3
M. oreades	11,6 \pm 0,62	nd	13,5 \pm 1,72	700 \pm 23,9
P. eryngii	11,8 \pm 0,47	nd	12,4 \pm 0,74	752 \pm 21,5
P. ostreatus	7,61 \pm 0,50	nd	9,21 \pm 0,42	750 \pm 13,9

Numa análise geral dos resultados verifica-se que a espécie *B. edulis* apresenta em termos globais os melhores resultados, possuindo o maior TPC (19,7 mg GAE/g extrato) e a única espécie onde foi quantificado o TFC (4,32 mg ECE/g extrato), o EC₅₀ mais baixo (2,01 mg/mL) e um AAC elevado (960). Enquanto as amostras da espécie *C. cibarius*, tanto de origem comercial como silvestres, apresentam os resultados mais baixo, com um TPC que varia entre 3,45 e 5,75 mg GAE/g extrato, a presença de flavonóides totais não foi detetada assim como o EC₅₀, do método do radical DPPH, não foi possível calcular devido às baixas IP% obtidas, os AAC variam entre 352 e 411.

O resultado obtido para *B. edulis* na determinação do TPC (19,7 mg GAE/g extrato) é mais elevado que o reportado para o extrato metanólico de uma amostra Portuguesa idêntica (5,03 mg GAE/g extrato; Barros *et al.*, 2008), mas inferior ao descrito por Sarikurkcu *et al.* (2008) para o extrato metanólico de uma amostra silvestre da Turquia (31,64 mg GAE/g extrato).

O estudo da amostra *F. velutipes* demonstrou possuir o segundo TPC mais elevado entre as amostras comerciais (14,3 mg GAE/g extrato). É superior ao descrito por Yang *et al.* (2002) para o extrato metanólico de uma amostra comercial chinesa (8,38 mg GAE/g extrato),

assim como é superior ao extrato metanólico de uma amostra silvestre do Nordeste de Portugal (12,98 mg GAE/ G extrato) descrito por Pereira *et al.* (2012).

O TPC determinados nas duas amostras da espécie *A. bisporus* (branco e castanho) apresentam uma ligeira diferença (9,79 e 12,6 mg GAE/g extrato, respetivamente), ambas as amostras apresentam resultados consideravelmente inferiores ao descrito por Reis *et al.* (2012a) para os extratos metanólicos de amostras de *A. bisporus* (branco e castanho) obtidas comercialmente em Portugal (23,34 e 37,33 mg GAE/g extrato, respetivamente), de salientar que neste estudo, também, a amostra de *A. bisporus* castanho apresentou resultados superiores à amostra de *A. bisporus* branco. Porém, os resultados obtidos são superiores ao reportado para o extrato metanólico de uma amostra de *A. bisporus* silvestre portuguesa (4,49 mg GAE/g extrato) (Barros *et al.*, 2008).

O TPC obtido para o cogumelo *P. eryngii* (11,8 mg GAE/g extrato) é superior ao reportado para o extrato metanólico (7,14 mg GAE/g extrato) de uma amostra portuguesa de origem comercial (Reis *et al.*, 2012a), mas inferior ao descrito por Reis *et al.* (2013) para o extrato metanólico (18,43 mg GAE/g extrato) de *P. eryngii* silvestre proveniente do Nordeste de Portugal.

O resultado obtido para a espécie *P. ostreatus* demonstrou um TPC (7,61 mg GAE/ g extrato) inferior ao descrito por Reis *et al.* (2012a) para o extrato metanólico de *P. ostreatus* comercializado em Portugal (12,54 mg GAE/g extrato), assim como é inferior ao resultado reportado para o extrato metanólico (15,7 mg GAE/g extrato) de uma amostra comercial obtida na China (Yang *et al.*, 2002).

O estudo do cogumelo *M. oreades* demonstrou que esta espécie possui um TPC (11,6 mg GAE/g extrato), aproximadamente, quatro vezes superior ao reportado para o extrato metanólico de uma amostra idêntica (3,27 mg GAE/g extrato), obtida comercialmente em Portugal (Queirós *et al.*, 2009). As propriedades antioxidantes desta espécie estão pouco descritas na literatura.

O resultado obtido para a espécie *L. edodes* na determinação do TPC (9,67 mg GAE/g extrato) é ligeiramente superior ao TPC reportado por Reis *et al.* (2012a) para o extrato metanólico (8,84 mg GAE/g extrato) do cogumelo *L. edodes* obtido comercialmente em Portugal, assim como o TPC descrito por Yang *et al.* (2002) para o extrato metanólico (9,11 mg GAE/g extrato) de uma amostra chinesa de origem comercial.

Os resultados obtidos para as amostras da espécie *C. cibarius* são (5,75 mg GAE/g extrato) para a amostra de origem comercial e (3,45 e 4,20 mg GAE/g extrato) para as amostras silvestres colhidas a 8-12-2012 e 3-12-2014, respetivamente. Verifica-se que a amostra comercial é superior a ambas as amostras silvestres. Entre as amostras silvestres verifica-se uma pequena diferença, sendo presumível que o TPC diminua ao longo do tempo de conservação, pois a amostra colhida em 2012 apresenta um TPC ligeiramente inferior à amostra colhida em 2014. Em termos de comparação com a literatura, ambas as amostras demonstraram possuir um TPC consideravelmente superior ao reportado (0,88 mg GAE/g extrato) para o extrato metanólico de uma amostra comercial portuguesa (Queirós *et al.*, 2009).

Nas amostras de cogumelos presentes na tabela 10, apenas, a espécie *B. edulis* demonstrou possuir flavonóides, com um TFC (4,32 mg ECE/g extrato) superior ao reportado para o extrato metanólico (1,75 mg CE/g extrato) de uma amostra portuguesa de *B. edulis* comercial desidratado (Barros *et al.*, 2008).

Nas restantes espécies analisadas não foi detetada a presença de flavonóides, todavia, existem autores que reportam a presença destes compostos em amostras semelhantes. Barros *et al.* (2008) descreve o TFC em extratos metanólicos de *A. bisporus* silvestre, de *C. cibarius* e de *M. oreades* de origem comercial (1,73; 2,26 e 0,67 mg CE/g extrato, respetivamente). Palacios *et al.* (2011) descreve o TFC em extratos metanólicos dos cogumelos silvestres *B. edulis*, *C. cibarius* e dos cogumelos cultivados *A. bisporus* e *P. ostreatus*. Chowdnury *et al.* (2015) descreve a ausência do TFC numa amostra de *P. ostreatus* silvestre (0,0 mg QE/mL) enquanto a amostra *L. edodes* silvestre possui um TFC (4,76 mg QE/mL).

No método para avaliar a capacidade de capturar radicais DPPH, a amostra de *B. edulis* possui a melhor capacidade antioxidante ($EC_{50} = 2.01$ mg/mL) entre as amostras de origem comercial, à semelhança do elevado TPC e é a única amostra com TFC. O resultado obtido, em termos de EC_{50} , para esta amostra é inferior ao reportado para o extrato metanólico (2,55 mg/mL) de uma amostra *B. edulis* idêntica (Queirós *et al.*, 2009). Mas superior ao descrito por Sarikurkcu *et al.* (2008) para um extrato metanólico (1 mg/mL; IP=80,15%) de *B. edulis* silvestre proveniente da Turquia.

O estudo do extrato de *F. velutipes* demonstrou um EC_{50} (6,89 mg/mL), sendo a amostra comercial com a segunda melhor capacidade antioxidante, através da captura de radicais DPPH. O resultado obtido é idêntico ao reportado por Pereira *et al.* (2012) para o extrato metanólico de *F. velutipes* silvestre, proveniente do Nordeste de Portugal.

Os EC₅₀ obtidos para as amostras da espécie *A. bisporus* (branco e castanho) foram 7,70 e 10,8 mg/mL, respetivamente. Estes resultados revelam que o cogumelo branco possui melhor capacidade antioxidante que o cogumelo castanho, apesar, de este último, possuir um TPC superior, como referido anteriormente. Em termos comparativos com outros estudos, é reportado por Reis *et al.* (2012a) para extratos de amostras comerciais de *A. bisporus* (branco e castanho) EC₅₀ mais baixos (3,13 e 2,29 mg/mL, respetivamente).

O estudo do cogumelo *P. eryngii* demonstrou que esta espécie possui um EC₅₀ (12,4 mg/mL) mais elevado que os EC₅₀ descrito por Reis *et al.* (2012a; 2013) para o extrato metanólico de *P. eryngii* comercial (8,67 mg/mL) e para o extrato metanólico de *P. eryngii* silvestre (9,21 mg/mL) proveniente do Nordeste de Portugal, respetivamente.

O resultado obtido para o EC₅₀ da amostra de *P. ostreatus* (9,21 mg/mL) foi mais elevado que o reportado para o extrato metanólico (6,54 mg/mL) de *P. ostreatus* comercial (Reis *et al.*, 2012). Mas é mais baixo que o descrito por Ricardo, (2013) para o extrato metanólico (33 mg/mL) de *P. ostreatus* de origem comercial, obtido em Portugal.

O estudo do cogumelo *M. oreades* demonstrou que esta amostra apresentou o EC₅₀ mais elevado entre as amostras comerciais (13,5 mg/mL), ou seja a menor capacidade antioxidante em relação à captura de radicais DPPH. O EC₅₀ obtido é, cerca de cinco vezes, superior ao reportado para o extrato metanólico (2,78 mg/mL) de *M. oreades* de origem comercial (Queirós *et al.*, 2009).

O EC₅₀ obtido para a amostra de *L. edodes* (9,30 mg/mL) é mais elevado que o descrito por Reis *et al.* (2012a) para o extrato metanólico de *L. edodes* comercial (6,43 mg/mL), obtido em Portugal, assim como para o extrato metanólico (EC₅₀ = 4,75 mg/mL) de *L. edodes* de origem comercial proveniente da China (Yang *et al.*, 2002).

Para ambas as amostras da espécie *C. cibarius* não foi possível estabelecer o EC₅₀ devido às IP% obtidas não ultrapassarem os 50%, revelando que estas amostras possuem uma baixa capacidade antioxidante, à semelhança do baixo teor de compostos fenólicos totais. No entanto, Queirós *et al.* (2009) reportou para o extrato metanólico de uma amostra de *C. cibarius* comercial, semelhante à utilizada no presente trabalho, um EC₅₀ de 5,89 mg/mL.

Na determinação da capacidade antioxidante através do ensaio da inibição do branqueamento β-caroteno verifica-se que as amostras de *A. bisporus* (castanho) e *B. edulis* apresentam os valores de AAC mais elevados (986 e 960, respetivamente). O cogumelo *L. edodes* apresenta um AAC também elevado (904) seguido pelas espécies *F. velutipes* e *A.*

bisporus (branco) (859 e 843, respetivamente). A seguir, com AAC relativamente mais baixos mas idênticos estão as amostras do género *Pleurotus* (*P. eryngii* – 752 e *P. ostreatus* – 750), apesar de possuírem o TPC e o EC₅₀ diferentes, sendo seguidas pela amostra de *M. oreades* (700). Por último, à semelhança dos restantes ensaios, as amostras da espécie *C. cibarius* apresentam AAC consideravelmente inferiores às restantes amostras de cogumelos, com um valor de AAC para a amostra comercial de 352 e para as amostras silvestres 403 e 411.

Em termos de resultados reportados na literatura é difícil fazer comparações diretas uma vez que a capacidade de inibir o branqueamento do β -caroteno é muitas vezes determinada através do EC₅₀. Porém, num estudo realizado por Reis *et al.* (2012a) em amostras comerciais de cogumelos das espécies *A. bisporus* (branco e castanho), *P. ostreatus*, *P. eryngii* e *L. edodes* verifica-se que a espécie com melhor capacidade para inibir o branqueamento do β -caroteno é o *P. ostreatus*, seguido pelo *A. bisporus* (branco) e pelo *L. edodes* (EC₅₀ – 2,74; 3,42 e 3,92 mg/mL, respetivamente), enquanto as espécies *A. bisporus* (castanho) e *P. eryngii* apresentaram o EC₅₀ mais elevado (4,85 e 4,68 mg/mL respetivamente). Noutro estudo, realizado por Queirós *et al.* (2009) em cogumelos comerciais desidratados das espécies *B. edulis*, *C. cibarius* e *M. oreades* demonstrou que estas espécies revelam boa capacidade antioxidante, possuindo baixos EC₅₀ (1,09; 3,64 e 1,57 mg/mL, respetivamente). Pereira *et al.* (2012) reportou para a espécie *F. velutipes* silvestre uma boa capacidade de inibir o branqueamento do β -caroteno, com EC₅₀ de 1,12 mg/mL.

4.3.2. Cogumelos de processo de produção otimizado

Na tabela II estão descritos os resultados obtidos para as amostras de cogumelos obtidas através de diferentes processos de produção assim como do micélio de cada espécie que foi produzido em meio de cultura sólido pela empresa iFungHealth.

O processo de produção das diferentes amostras difere: - na fase de encharcamento, que pode ser realizada com água ou com a aplicação de soluções aquosas de subprodutos agroindustriais; - na fase de inoculação, em que o inóculo é proveniente de micélios crescidos em cultura líquida ou a partir de *spawn* com aplicação de água ou soluções aquosas de subprodutos agroindustriais (Tabela 7).

Tabela 11. Cogumelos de produção. Conteúdo em compostos fenólicos totais, média \pm DP (n=9), expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg GAE/g extrato); Conteúdo em flavonóides totais, média \pm DP (n=9), expressos em mg de equivalente de epicatequina por g de extrato (mg ECE/g extrato); Capacidade de capturar eletrões pelo radical DPPH, EC₅₀ (mg/mL), média \pm DP (n=3) e Inibição do branqueamento do β -caroteno, resultados expressos pelo coeficiente de atividade antioxidante (AAC), média \pm DP, n=3; nd – não detetado.

Espécie/Amostra	Conteúdo em compostos fenólicos totais	Conteúdo em flavonóides totais	EC ₅₀	AAC
	(mg GAE/g extrato)	(mg ECE/g extrato)	(mg/mL)	
<i>P. ostreatus</i> #0	8,02 \pm 0,48	nd	4,67 \pm 0,21	454 \pm 43,3
<i>P. ostreatus</i> #1	8,14 \pm 0,47	nd	5,11 \pm 0,65	440 \pm 43,1
<i>P. ostreatus</i> #2	9,83 \pm 0,76	nd	4,09 \pm 0,27	537 \pm 49,4
<i>P. ostreatus</i> #3	10,0 \pm 1,15	nd	4,92 \pm 0,48	554 \pm 36,4
Micélio – <i>P. ostreatus</i>	3,83 \pm 0,33	nd	29,2 \pm 6,01	392 \pm 50,6
<i>P. eryngii</i> #0	4,23 \pm 0,26	nd	15,6 \pm 0,85	406 \pm 29,1
<i>P. eryngii</i> #1	4,33 \pm 0,34	nd	15,9 \pm 1,72	377 \pm 11,7
<i>P. eryngii</i> #2	5,55 \pm 0,31	nd	21,7 \pm 0,03	312 \pm 9,10
<i>P. eryngii</i> #3	4,29 \pm 0,41	nd	22,9 \pm 2,67	466 \pm 14,1
<i>P. eryngii</i> #4	6,01 \pm 0,34	nd	10,4 \pm 0,90	587 \pm 45,8
<i>P. eryngii</i> #5	4,51 \pm 0,44	nd	14,5 \pm 2,00	534 \pm 7,91
<i>P. eryngii</i> #6	4,04 \pm 0,49	nd	20,2 \pm 5,16	407 \pm 38,9
<i>P. eryngii</i> #7	6,75 \pm 0,60	nd	8,34 \pm 0,96	645 \pm 53,9
Micélio – <i>P. eryngii</i>	4,91 \pm 0,48	nd	13,3 \pm 1,21	536 \pm 91,9
<i>A. cylindracea</i> #0	15,4 \pm 1,26	13,8 \pm 1,62	3,08 \pm 0,24	818 \pm 19,9
<i>A. cylindracea</i> #1	13,6 \pm 1,01	15,9 \pm 1,62	4,49 \pm 0,28	796 \pm 23,9
Micélio – <i>A. cylindracea</i>	7,02 \pm 0,45	3,76 \pm 0,39	6,97 \pm 0,79	754 \pm 45,2

Numa análise geral dos resultados, verifica-se que a espécie *A. cylindracea* revela os melhores resultados, tanto nas amostras de cogumelo como de micélio, sendo a única espécie em que foi quantificado o TFC. A seguir, as amostras de *P. ostreatus*, apresentam os melhores resultados para o TPC e para o EC₅₀ comparativamente com as amostras de *P. eryngii*, enquanto os valores do AAC são semelhantes. Já no caso dos micélios destas duas espécies, o *P. eryngii* apresenta melhor capacidade antioxidante que o micélio de *P. ostreatus*.

Nos resultados obtidos para as amostras de *A. cylindracea* verifica-se que a amostra *A. cylindracea* #0 apresenta um TPC superior à amostra *A. cylindracea* #1 (15,4 e 13,6 mg GAE/g extrato, respetivamente), ao contrário do que ocorre para o TFC, em que a amostra *A. cylindracea* #1 é superior à amostra *A. cylindracea* #0 (15,9 e 13,8 mg EPE/g extrato,

respetivamente). Em termos de capacidade de capturar de radicais DPPH a amostra *A. cylindracea* #0 apresenta melhor capacidade que a amostra *A. cylindracea* #1 (EC_{50} – 3,08 e 4,49 mg/mL, respetivamente), e o mesmo acontece para a inibição do branqueamento do β -caroteno (AAC – 818 e 796, respetivamente). Os resultados demonstram, para esta espécie, que a utilização do subproduto agroindustrial A na fase de encharcamento e produção de *spawn* (*A. cylindracea* #0) promove uma capacidade antioxidante superior à obtida para a amostra em que o encharcamento e produção de *spawn* foram realizados segundo o protocolo padrão mas com a composição do substrato alterada (*A. cylindracea* #1).

No estudo do micélio de *A. cylindracea* verifica-se que este possui menor capacidade antioxidante que o corpo frutífero, no entanto possui maior capacidade antioxidante que os micélios de *P. eryngii* e *P. ostreatus*, assim como das amostras de cogumelo de *P. eryngii*. O TPC e o TFC é 7,02 mg GAE/g extrato e 3,76 mg ECE/g extrato, respetivamente. O EC_{50} é de 6,97 mg/mL, mais alto que os EC_{50} das amostras de cogumelos *A. cylindracea*, ou seja, tem menor capacidade de capturar radicais DPPH, enquanto o AAC (754) é ligeiramente inferior.

Em termos comparativos com outros estudos, os resultados obtidos para o TPC são inferiores ao reportado por Petrovic *et al.* (2015) e idênticos ao reportado por Karaman *et al.* (2014) para extratos metanólicos (17,36 e 13,8 mg GAE/g extrato, respetivamente) de *A. cylindracea* silvestre. São igualmente idênticos ao reportado para o extrato metanólico (15,3 mg GAE/g extrato) de *A. cylindracea* silvestre proveniente da China (Lo & Chueng, 2005). Os EC_{50} (3,08 e 4,49 mg/mL), obtidos demonstram que as amostras estudadas possuem melhor capacidade para capturar radicais DPPH que o descrito por Petrovic *et al.* (2015) para o extrato metanólico (7,23 mg/mL) de *A. cylindracea* silvestre proveniente da Sérvia.

No estudo da influência do processo de produção da espécie *P. ostreatus* verificam-se algumas diferenças nos resultados obtidos. A amostra *P. ostreatus* #3 apresenta o TPC mais elevado seguida pela amostra *P. ostreatus* #2 (10,4 e 9,83 mg GAE/g extrato, respetivamente) enquanto as amostras *P. ostreatus* #0 e #1 demonstram um TPC inferior (8,02 e 8,14 mg GAE/g extrato). À semelhança do TPC, os resultados obtidos para o AAC demonstram que as amostras *P. ostreatus* #2 e #3 possuem a melhor capacidade de inibir o branqueamento do β -caroteno (537 e 554), já as amostras *P. ostreatus* #0 e #1 demonstram os AAC mais baixos (454 e 440) entre as amostras de *P. ostreatus*. No caso da capacidade de capturar radicais DPPH verificam-se pequenas diferenças nos EC_{50} das quatro amostras. A amostra *P. ostreatus* #2 apresenta o EC_{50} mais baixo (4,09 mg/mL) enquanto a amostra *P. ostreatus* #1 possui o

EC₅₀ mais elevado (5,11), as amostras *P. ostreatus* #0 e #3 apresentam EC₅₀ semelhantes (4,67 e 4,92 mg/mL), apesar da amostra *P. ostreatus* #3 possuir o TPC e o AAC mais elevado.

Os resultados obtidos demonstram que a utilização, na fase de produção do *spawn*, do subproduto agroindustrial B, promove uma melhor capacidade antioxidante, possivelmente devido à presença de compostos bioativos nesse subproduto. Assim como a utilização do subproduto agroindustrial A na fase de encharcamento e de produção de *spawn* promove melhores resultados que a não utilização nas duas fases ou apenas a aplicação na fase de produção do *spawn*.

No estudo do micélio de *P. ostreatus* verifica-se que este possui a menor capacidade antioxidante entre os três micélios analisados, assim como menor capacidade antioxidante que o corpo frutífero de *P. ostreatus*. O TPC obtido (3,83 mg GAE/g extrato) foi inferior ao descrito por Reis et al. (2012a) para o micélio de *P. ostreatus* (5,19 mg GAE/g extrato). No entanto, a amostra estudada demonstrou melhor capacidade para capturar radicais DPPH (EC₅₀ – 29,2 mg/mL) que o reportado por Reis et al. (2012a) (EC₅₀ – 58,13 mg/mL). A capacidade de inibir o branqueamento do β-caroteno é baixa (AAC – 392).

Comparando os resultados obtidos para estas amostras com a amostra de *P. ostreatus* comercial estudada verifica-se que o TPC é inferior na amostra comercial (7,61 mg GAE/g extrato). Em termos comparativos com a literatura, o TPC das amostras *P. ostreatus* #0, #1, #2, #3 é inferior aos resultados reportados por Reis et al. (2012a) e Yang et al. (2002) para extratos metanólicos de *P. ostreatus* provenientes de Portugal (12,54 mg GAE/g extrato) e da China (15,7 mg GAE/g extrato), respetivamente. A capacidade de capturar radicais DPPH das amostras *P. ostreatus* é #0, #1, #2, #3 é superior à amostra comercial, pois o EC₅₀ é mais elevado (9,21 mg/mL) assim como é superior ao reportado por Reis et al. (2012a) para o extrato metanólico de *P. ostreatus* comercial (EC₅₀ – 6,54 mg/mL). Pelo contrário, o AAC obtido para a amostra comercial é mais elevado (751) que os AAC obtidos para as amostras de *P. ostreatus* #0, #1, #2, #3.

No estudo das amostras de *P. eryngii* verificam-se algumas diferenças nos resultados obtidos. As amostras de *P. eryngii* #0, #1, #2, #3, #4 e #5 apresentam a mesma composição de substrato mas diferem no processo de encharcamento e produção de *spawn*, enquanto as amostras de *P. eryngii* #6 e #7 diferem na composição do substrato mas o processo de encharcamento e produção de *spawn* é igual.

De acordo com a tabela I I, verifica-se que as amostras *P. eryngii* #6 e #7 apresentam valores consideravelmente diferentes. Os resultados obtidos para TPC revelam que a amostra *P. eryngii* #7 apresenta o valor mais elevado (6,75 mg GAE/g extrato) enquanto a amostra *P. eryngii* #6 apresenta o valor mais baixo (4,04 mg GAE/g extrato). O mesmo ocorre na capacidade de capturar radicais DPPH, em que amostra *P. eryngii* #7 demonstra melhor capacidade com o EC₅₀ mais baixo entre as amostras de *P. eryngii* (8,34 mg/mL) enquanto a amostra *P. eryngii* #6 demonstra possuir um dos valores de EC₅₀ mais altos (20,2 mg/mL). Nos resultados obtidos para o AAC a tendência mantém-se igual, a amostra *P. eryngii* #7 possui o AAC mais elevado (645) enquanto a amostra *P. eryngii* possui um dos AAC mais baixos (407). Estes resultados demonstram que possivelmente o substrato exerce influência na composição dos cogumelos, nomeadamente, na presença de compostos bioativos com capacidade antioxidante.

No estudo das amostras em que diferem quanto ao processo de encharcamento e produção de *spawn* verifica-se, em termos globais, que as amostras *P. eryngii* #4 e #5 apresentam os melhores resultados enquanto a amostra *P. eryngii* #3 apresenta uma baixa capacidade antioxidante. A amostra *P. eryngii* #4 possui um TPC superior (6,01 mg GAE/g extrato) à amostra *P. eryngii* #3 (4,29 mg GAE/g extrato) e à amostra *P. eryngii* #5 (4,51 mg GAE/g extrato), sendo esta última apenas superada pela amostra *P. eryngii* #2 (5,55 mg GAE/g extrato). Em termos de capacidade de capturar radicais DPPH, ambas as amostras, *P. eryngii* #4 e #5 apresentam bons resultados, com baixos EC₅₀ (10,4 e 14,5 mg/mL, respetivamente) enquanto a amostra *P. eryngii* #3 possui um EC₅₀ mais elevado (22,9 mg/mL). Nos resultados obtidos para o AAC, as amostras *P. eryngii* #4 e #5 demonstram valores mais elevados (587 e 534) que a amostra *P. eryngii* #3 (466). Estes resultados sugerem que a aplicação do subproduto agroindustrial A, apenas, na fase de encharcamento é suficiente para melhorar a capacidade antioxidante em detrimento da sua aplicação na fase de encharcamento e produção de *spawn*. A não aplicação do subproduto agroindustrial A traduz-se numa capacidade antioxidante menor.

As amostras de *P. eryngii* #1 e #2 possuem uma característica particular na fase de inoculação, que é o facto de esta ocorrer com cultura líquida de micélio enquanto nas restantes amostras a inoculação é realizada com sementes. A diferença entre estas duas amostras está na fase de encharcamento, na amostra *P. eryngii* #1 foi utilizado o subproduto agroindustrial A enquanto na outra o processo decorreu de forma normal. Em termos de resultados obtidos verifica-se que a amostra *P. eryngii* #2 possui um TPC superior (5,55 mg GAE/g

extrato) à amostra *P. eryngii* #1 (4,33 mg GAE/g extrato). Contudo, a capacidade de capturar radicais DPPH e inibir o branqueamento do β -caroteno é superior na amostra de *P. eryngii* #1 (EC_{50} – 15,9 mg/mL; AAC – 377) em relação à amostra de *P. eryngii* #2 (EC_{50} – 21,7 mg/mL; AAC – 312). De salientar o facto de os AAC obtidos serem mais baixos que os AAC das restantes amostras de *P. eryngii*.

A amostra *P. eryngii* #0, obtida através de um processo de produção normal, apresenta um dos TPC mais baixos (4,23 mg GAE/g extrato) comparativamente com as restantes amostras. A capacidade de capturar radicais DPPH é semelhante à amostra *P. eryngii* #1 e superior às amostras *P. eryngii* #2, #6, #3, (EC_{50} – 15,6 mg GAE/g extrato). O AAC obtido (406) é apenas superior às amostras *P. eryngii* #1 e #2.

O estudo do micélio de *P. eryngii* demonstrou que este possui uma capacidade antioxidante idêntica ou superior às amostras do corpo frutífero de *P. eryngii* estudadas. O TPC determinado foi 4,91 mg GAE/g extrato, inferior ao reportado por Reis *et al.* (2012a) (9,11 mg GAE/g extrato). A capacidade de capturar radicais DPPH (EC_{50} – 13,3 mg/mL) é superior ao descrito por Reis *et al.* (2012a) (EC_{50} – 25,40 mg/mL), assim como à maioria das amostras de *P. eryngii* estudadas. O AAC obtido (536) foi inferior às amostras de *P. eryngii* #4 e #7. Em termos comparativos, verifica-se que estas amostras (4,04 a 6,75 mg GAE/g extrato, respetivamente) possuem um TPC menor que a amostra de *P. eryngii* comercial estudada (11,8 mg GAE/g extrato). Assim como é inferior aos valores reportados por Reis *et al.* (2012a e 2013) para os extratos metanólicos de uma amostra portuguesa de origem comercial (7,14 mg GAE/g extrato) e para uma amostra silvestre (18,43 mg GAE/g extrato), proveniente do Nordeste de Portugal.

No caso da capacidade captadora de radicais DPPH, apenas as amostras *P. eryngii* #4 e #7 (EC_{50} - 10,4 e 8,34 mg/mL, respetivamente) apresentaram melhor capacidade que a amostra comercial estudada (EC_{50} - 12,4 mg/mL), no entanto apenas a amostra #7 apresentou um EC_{50} ligeiramente mais baixo que o reportado por Reis *et al.* (2012a; 2013) para o extrato metanólico de *P. eryngii* comercial (8,67 mg/mL) e para o extrato metanólico de *P. eryngii* silvestre (9,21 mg/mL), respetivamente. Os resultados obtidos (AAC – 312 a 645) na inibição do branqueamento do β -caroteno foram inferiores à amostra comercial (AAC - 752).

À semelhança das amostras de *P. ostreatus*, também, nas amostras de *P. eryngii* não foi quantificado o conteúdo em flavonóides totais.

4.3.3. Capacidade antioxidante do BHT e do Ácido Gálico

Nos métodos para determinação da capacidade de capturar radicais DPPH e inibição do branqueamento do β -caroteno foram utilizados dois compostos antioxidantes de referência, o BHT (antioxidante sintético) e o ácido gálico (ácido fenólico presente em várias matrizes naturais). Os resultados da capacidade antioxidante obtidos estão descritos na tabela 12. Verifica-se, que ambos os compostos de referência apresentam uma capacidade antioxidante bastante elevada, em comparação com os extratos obtidos para os cogumelos analisados (Tabela 10 e 11).

Importa salientar a diferença na capacidade antioxidante entre o método do radical DPPH e inibição do branqueamento do β -caroteno dos dois compostos. O BHT apresenta menor capacidade de capturar radicais DPPH que o ácido gálico, ou seja possui um EC_{50} cerca de 12 vezes maior que o ácido gálico. Estes resultados estão de acordo com outros autores, Koleva e colaboradores (2002) reportaram uma situação idêntica, em que o ácido rosmarínico (ácido fenólico) apresentou capacidade antioxidante superior ao BHT, devendo-se ao maior número de elétrons doados pelos grupos hidroxilos dos compostos fenólicos em relação ao BHT (Koleva *et al.*, 2002).

Por outro lado, no AAC verifica-se o contrário, pois, o BHT possui melhor capacidade de inibir o branqueamento do β -caroteno que o ácido gálico, ver tabela 12. Esta situação é, também, idêntica ao reportado por Koleva e colaboradores (2002), em que o BHT possuiu um AAC mais elevado que o ácido rosmarínico. Segundo o autor, estes valores estão de acordo com o fenômeno do “paradoxo polar”. Como o BHT é um composto apolar vai concentrar-se na fase lipídica da emulsão, protegendo o lípido da oxidação. Pelo contrário, o ácido gálico como é polar vai permanecer na fase aquosa, ficando mais diluído e desta forma com menor capacidade de proteger o lípido da oxidação (Koleva *et al.*, 2002).

Tabela 12. Capacidade antioxidante do ácido gálico e do BHT. Capacidade de capturar elétrons pelo radical DPPH, EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$), média \pm DP ($n=3$) e Inibição do branqueamento do β -caroteno, resultados expressos pelo coeficiente de atividade antioxidante (AAC), média \pm DP ($n=3$)

Referência	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	AAC			
		125 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$
BHT	80,3 \pm 1,68	907 \pm 8,6	944 \pm 5,9	972 \pm 5,1	998 \pm 4,1
Ácido gálico	6,94 \pm 0,04	238 \pm 20,7	445 \pm 37,8	643 \pm 14,6	755 \pm 40,1

4.3.4. Correlação do TPC com a capacidade antioxidante

Os compostos fenólicos são moléculas bioativas com capacidade antioxidante, existindo vários estudos que relacionam positivamente os resultados obtidos para o TPC com a determinação da capacidade antioxidante através de métodos como o radical DPPH e a inibição do branqueamento do β -caroteno (Prior *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008; Ndhkala *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2012a).

Na figura 10 é demonstrada a correlação entre os valores obtidos para o TPC e os valores obtidos para o EC_{50} e AAC. Verifica-se que a capacidade para inibir o branqueamento do β -caroteno está mais relacionada com o TPC ($r^2 = 0,67$) que a capacidade para capturar radicais DPPH ($r^2 = 0,52$). De salientar, que nas amostras em que se quantificou o TFC, verificou-se que estas possuíam um TPC elevado assim como boa capacidade de capturar radicais DPPH e AAC elevados.

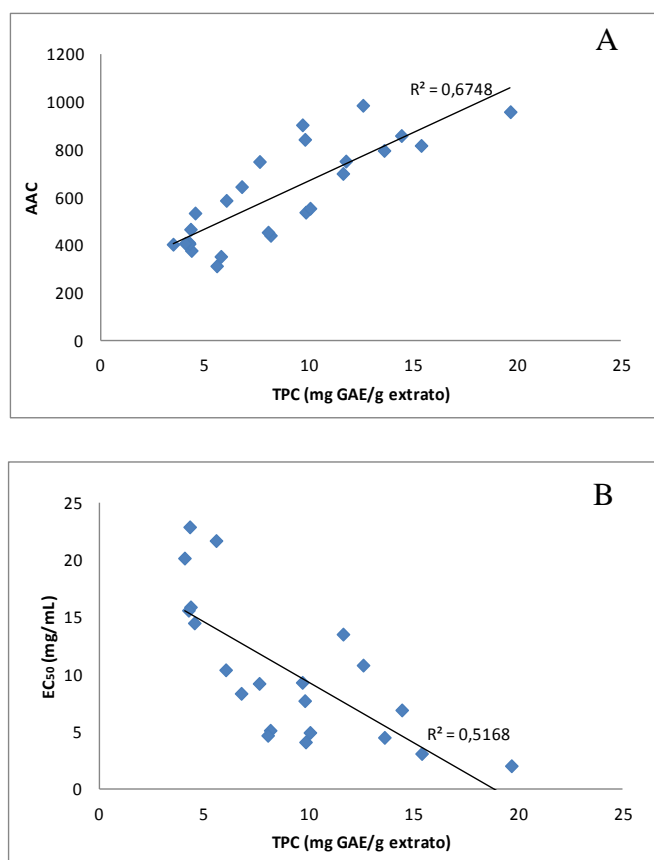


Figura 10. Relação entre o conteúdo em compostos fenólicos totais, TPC (mg GAE/g extrato) e a capacidade de inibir o branqueamento do β -caroteno, AAC (A) e entre o conteúdo em compostos fenólicos totais, TPC (mg GAE/g extrato) e a capacidade de capturar radicais DPPH, EC_{50} (mg/ml) (B).

4.3.5. Determinação do conteúdo em flavonóides totais

O conteúdo em flavonóides totais, em cogumelos, tem sido ocasionalmente reportado na literatura. Nas amostras estudadas, apenas, as espécies *B. edulis* e *A. cylindracea* demonstraram possuir flavonóides, para as restantes amostras não foi possível quantificar o TFC.

De acordo com fundamento teórico, descrito anteriormente, os flavonóides reagem com o cloreto de alumínio, formando uma coloração amarela que em meio alcalino passa a vermelha. Na realização do ensaio para essas amostras verificou-se que a solução ficava turva e não se formava a coloração característica, suspeitando-se da não existência de flavonóides nas amostras apesar de se obterem absorvâncias elevadas (Fig. 11).

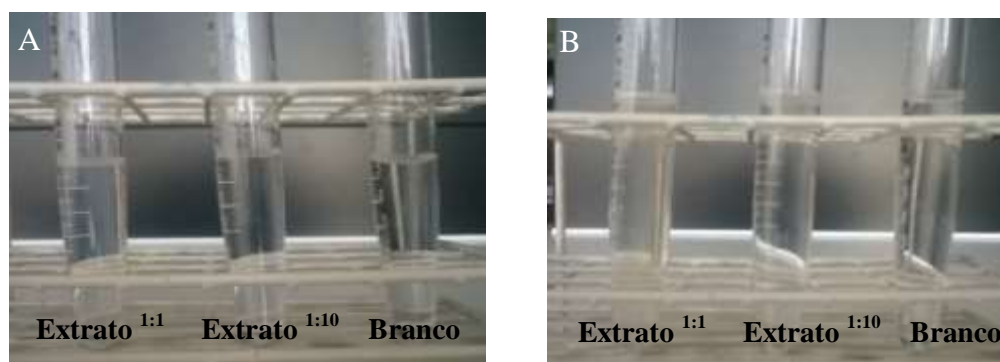


Figura 11. Realização do método para determinação do TFC para o extrato de *P. eryngii* comercial. Da esquerda para a direita, utilização de extrato sem diluição, utilização de extrato diluído (1:10) e utilização de metanol (branco). Coloração formada depois da adição de $AlCl_3$ (A) e depois da adição de $NaOH$ (B).

Para tal, decidiu-se fortificar o extrato (sem diluição e com diluição 1:10) de uma amostra (*P. eryngii* comercial) com diferentes concentrações de epicatequina com o objetivo de averiguar a formação de turbidez, tendo-se verificado a formação da coloração amarela e posteriormente avermelhada e a turbidez não era notória a olho nu (Fig. 12), podendo estar dissimulada pela coloração característica do ensaio.

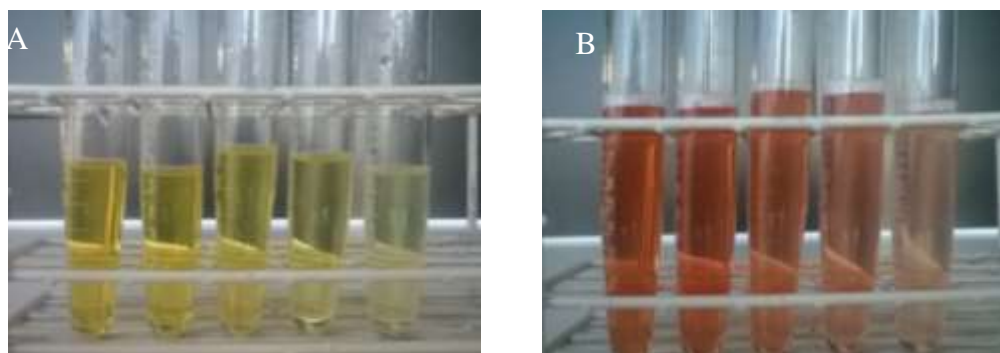


Figura 12. Realização do método para determinação do TFC para o extrato (1:1) de *P. eryngii* comercial fortificado com epicatequina. Coloração formada depois de adicionado $AlCl_3$ (A) e coloração formada depois de adicionado $NaOH$ (B).

Quando se tentou quantificar o TFC através das amostras fortificadas, na utilização do extrato 1:1 verificou-se que para todas as concentrações de epicatequina testadas os TFC eram próximos ao valor determinado no extrato (Tabelas 13 e 14). Já na utilização do extrato diluído isso não se verificou (Tabela 15).

Tabela 13. Conteúdo em flavonóides totais expressos em mg de equivalentes de epicatequina (ECE) por g de extrato, média \pm DP (n=3), correspondente às absorvâncias obtidas para o extrato 1:1, extrato 1:10 e branco. DP – desvio-padrão, CV – coeficiente de variação.

	Média (mg ECE/mL)	DP (mg ECE/mL)	CV (%)
Extrato 1:1	0,11	0,01	13,4
Extrato 1:10	0,01	0,002	19,6
Branco	0,00	-	-

Tabela 14. Fortificação do extrato 1:1 com várias concentrações de epicatequina (Epi) e determinação do TFC no extrato através da diferença entre os valores da fortificação e a epicatequina adicionada. Conteúdo em flavonóides totais expresso em mg de equivalentes de epicatequina (ECE) por g de extrato, média \pm DP (n=3). DP – desvio-padrão, CV – coeficiente de variação.

Epi (mg ECE/mL)	Fortificação Epi + extrato (1:1) (mg ECE/mL)	Determinação de TFC no extrato (mg ECE/mL)	Média (mg ECE/mL)	DP (mg ECE/mL)	CV (%)
0,28	0,42	0,14	0,12	0,02	15,4
0,23	0,37	0,14			
0,15	0,27	0,11			
0,10	0,22	0,12			
0,05	0,15	0,10			

Tabela 15. Fortificação do extrato 1:10 com várias concentrações de epicatequina (Epi) e determinação de TFC no extrato através da diferença entre os valores da fortificação e a epicatequina adicionada. Conteúdo em flavonóides totais expresso em mg de equivalentes de epicatequina (ECE) por g de extrato, média \pm DP (n=3). DP – desvio-padrão, CV – coeficiente de variação.

Epi (mg ECE/mL)	Fortificação Epi + extrato (1:10) (mg ECE/mL)	Determinação de TFC no extrato (mg ECE/mL)	Média (mg ECE/mL)	DP (mg ECE/mL)	CV (%)
0,28	0,39	0,11	0,06	0,04	65,1
0,23	0,29	0,07			
0,15	0,21	0,06			
0,10	0,13	0,03			
0,05	0,07	0,02			

Assim, nas várias concentrações de epicatequina testadas não se conseguiu eliminar o efeito da turbidez. Suspeitando-se que a sua formação se deva à presença de outros compostos.

Capítulo V

Conclusão

5. Conclusão

A realização desta dissertação centrou-se na avaliação da influência da utilização de subprodutos agroindustriais, no processo de produção de cogumelos comestíveis (*P. ostreatus*, *P. eryngii* e *A. cylindracea*) pela determinação da capacidade antioxidante e do conteúdo em compostos fenólicos e flavonóides. Realizou-se também a avaliação da capacidade antioxidante e do conteúdo em compostos fenólicos e flavonóides em cogumelos comestíveis comercializados, em Portugal, nas grandes superfícies comerciais (*A. bisporus*, *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *M. oreades*, *L. edodes*, *F. velutipes*, *B. edulis*, e *C. cibarius*) com o objetivo de conhecer as espécies com melhores propriedades antioxidantes.

Relativamente aos cogumelos obtidos através do processo de produção desenvolvido e otimizado pela empresa iFungHealth, a espécie que demonstrou melhor capacidade antioxidante foi *A. cylindracea*, seguida pela espécie *P. ostreatus* e por último a espécie *P. eryngii*. No caso dos micélios destas espécies, à semelhança do corpo frutífero, o micélio de *A. cylindracea* apresentou a melhor capacidade antioxidante. Contudo no caso das espécies *P. eryngii* e *P. ostreatus* ocorreu o inverso, o micélio de *P. eryngii* possui melhor capacidade antioxidante que o micélio de *P. ostreatus*.

Em termos da utilização de subprodutos agroindustriais no processo de produção, os resultados sugerem que a sua aplicação poderá influenciar as propriedades antioxidantes dos cogumelos. Nas amostras de *A. cylindracea*, ambas as amostras demonstraram boa capacidade antioxidante, no entanto, na amostra proveniente da utilização do subproduto agroindustrial A nas duas fases (encharcamento e produção de *spawn*) os resultados foram ligeiramente melhores. Nas amostras de *P. ostreatus*, a amostra em que foi utilizado o subproduto agroindustrial B na fase de produção de *spawn* demonstrou os melhores resultados, seguida pela amostra em que foi utilizado o subproduto agroindustrial A nas duas fases (encharcamento e produção de *spawn*). Nas amostras de *P. eryngii* verificou-se que a utilização do subproduto agroindustrial A em ambas as fases ou só na fase de encharcamento aumenta a capacidade antioxidante, no entanto, a alteração da composição do substrato tem mais influência na capacidade antioxidante do que a aplicação de subprodutos agroindustriais.

Nos cogumelos de origem comercial estudados, os resultados obtidos demonstram que a espécie *B. edulis* possui a melhor capacidade antioxidante, sendo a única entre as espécies comerciais, em que foi quantificado o conteúdo em flavonóides totais, sendo possível que a presença destes compostos esteja relacionada com a sua elevada capacidade antioxidante

que possui. A espécie *F. velutipes*, em termos gerais, apresenta a segunda melhor capacidade antioxidante. Pelo contrário, o cogumelo *C. cibarius* de origem comercial e silvestre é a espécie com menor capacidade antioxidante.

Os resultados permitiram concluir que o conteúdo em compostos fenólicos totais está relacionado positivamente com a capacidade de capturar radicais DPPH e com a inibição do branqueamento do β -caroteno. Pois nas amostras de *B. edulis* e *A. cylindracea*, em que os valores do conteúdo em compostos fenólicos totais foram os mais elevados também foram obtidos valores de EC_{50} mais baixos e valores de AAC mais elevados.

Na realização deste trabalho verificou-se, ainda, que o método para a determinação do conteúdo em flavonóides totais poderá não ser o mais adequado para amostras de cogumelos. Apenas nas espécies *B. edulis* e *A. cylindracea* foi possível quantificar o conteúdo em flavonóides totais. Nas restantes amostras, durante a realização do método, a solução ficava turva e não obtinha a coloração característica influenciando a leitura das absorvâncias. Neste caso, seria importante a identificação e quantificação de flavonóides através de cromatografia para comprovar a existência ou não destes compostos.

Em suma, o presente trabalho permitiu concluir que a utilização de subprodutos agroindustriais poderá ser benéfica para a produção de cogumelos, permitindo desta forma o aproveitamento de um subproduto agroindustrial. Por último, este trabalho também permitiu conhecer as espécies com melhores propriedades antioxidantes comercializadas em Portugal.

Capítulo VI

Perspetivas Futuras

6. Perspetivas Futuras

Como relatado anteriormente, o consumo de cogumelos tem aumentado significativamente nos últimos anos devido às suas características organoléticas e nutricionais mas, também, devido às propriedades medicinais que tem sido descritas em inúmeros estudos científicos. A par do aumento do consumo surge a necessidade de tornar a produção mais eficiente e obter cogumelos de elevada qualidade em termos nutricionais e organoléticos.

Para os cogumelos obtidos através do processo de produção otimizado, com aplicação de subprodutos agroindustriais são necessários mais estudos para corroborar os resultados obtidos com os métodos para determinação da capacidade antioxidante, nomeadamente a identificação e quantificação de compostos fenólicos e outros compostos bioativos, designadamente, por cromatografia bem como por outros ensaios de capacidade antioxidante. Também será útil realizar o estudo da influência, da utilização de subprodutos agroindustriais, na composição nutricional, no perfil de ácidos gordos e de açúcares assim como no teor de ergosterol, principal esteroide presente em cogumelos, permitindo assim uma possível valorização dos cogumelos. A aplicação de subprodutos agroindustriais noutras espécies, nomeadamente, *F. velutipes* e *L. edodes*, espécies muito apreciadas na gastronomia e de elevado Valor comercial poderá ter um enorme potencial.

Nas espécies de cogumelos comercializados em Portugal já existem alguns estudos em termos de capacidade antioxidante, composição nutricional, compostos fenólicos, ácidos gordos e açúcares. Porém, não é conhecido nenhum estudo, suficientemente abrangente, que reporte a presença de ergosterol e outros compostos bioativos nas várias espécies comercializadas em Portugal, tornando-se relevante determinar, em particular, o teor de ergosterol nessas espécies.

Para além deste tipo de caracterização, através de ensaios *in vitro*, torna-se fundamental comprovar, *in vivo*, os efeitos para a saúde da inclusão de cogumelos num regime alimentar equilibrado, nomeadamente, através da monitorização do colesterol, pressão arterial, glicémia e controlo de peso.

Todavia, um dos desafios mais importantes para os cogumelos cultivados a ser ultrapassado é a conservação deste produto em fresco, pois tem um tempo de prateleira reduzido e é bastante suscetível à degradação. Uma das possíveis soluções prende-se com a utilização de embalagens que permitam controlar a perda de água e evitar a oxidação, nomeadamente embalagens de atmosfera modificada e embalagens ativas.

Referências Bibliográficas

Ahmad, N.; Mahmood, Fazal.; Khalil, S. A.; Zamir, R.; Fazal, H.; Abbasi, B. H. – **Antioxidant activity via DPPH, gram-positive and gram-negative antimicrobial potential in edible mushrooms.** Toxicology and Industrial Health. 30 (2014) 826-834.

Akata, I.; Ergonul, B.; Kalyoncu, F. – **Chemical compositions and antioxidante activities of 16 wild edible mushroom species grown in Anatolia.** International Journal Pharmacology. 8 (2012) 134-138.

Alvarez-Suarez, J. M.; Tulipani, S.; Romandini, S.; Vidal, A.; Batino, M. – **Methodological aspects about determination of phenolic compounds and *in vitro* evaluation of antioxidant capacity in the honey: A review.** Current Analytical Chemistry. 5 (2009) 293-302.

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 Chemistry. 84 (2004) 551-562.

Azevedo, S.; Cunha, L.M.; Fonseca, S.C. – **Hortifruticultura & Floricultura: Importância de utilização de cogumelos na alimentação humana.** Agrotec, revista técnico-científica agrícola nº2 (2012), 48-50. ISSN: 2182-4401.

Baptista-Ferreira, J.; Silva, A. P.; Vicente, H. P. – **Gui do Colector de Cogumelos – para os cogumelos silvestres comestíveis com interesse comercial em Portugal.** Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural. (2013), ISBN 978-989-8539-06-09.

Barros, L.; Baptista, P.; Correia, D. M.; Morais, J. S.; Ferreira, I. C. F. R. – **Effects of conservation treatment and cooking the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55 (2007) 4781-4788.

Barros, L.; Cruz, T.; Baptista, P.; Estevinho, L. M.; Ferreira, I. C. F. R. – **Wild and comercial as source of nutrients and nutraceuticals.** Food and Chemical Toxicology. 46 (2008) 2742-2747.

- Barros, L.; Dueñas, M.; Ferreira, I. C. F. R.; Baptista, P.; Santos-Buelga, C. – **Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species.** Food and Chemical Toxicology. 47:6 (2009) 1076-1079.
- Bauer-Petrovska, B. – **Protein fractions in edible Macedonian mushrooms.** European Food Research and Technology. 212 (2001) 469-472.
- Bernas, E.; Jaworska, G.; Lisiewska, Z. – **Edible mushrooms as a source of valuable nutritive constituents.** ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria. 5(1) (2006) 5-20.
- Becker, E. M.; Nissen, L. R.; Skibsted, L. H. – **Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects.** European Food Research and Technology. 219 (2004) 561-571.
- Carr, A. C.; McCall, M. R.; Frei, B. – **Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection.** Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology. 20 (2000) 1726-1723.
- Cheung, P. C. K. – **Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits.** Food Science and Human Wellness. 2, (2013), 162-166.
- Chowdhury, M. M. H.; Kubra, K.; Ahmed, S. R. – **Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in Bangladesh.** Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 14:8 (2015).
- Chan, S. T. & Miles, P. G. – **Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact** – 2nd ed., U.S.A. 2004. ISBN – 08493-1043-1
- FAOSTAT, 2015 - Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. [Em linha]. [Acedido a 31 de julho de 2015]. Disponível na Internet: <http://faostat3.fao.org/home/E>
- Ferreira, I. C. F. R. & Abreu, R. M. V. – **Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos.** Sociedade Portuguesa de BioAnalistas da Saúde. 2 (2007) 32-39.
- Ferreira, I. C. F. R.; Barros, L.; Abreu, R. M. V. – **Antioxidants in wild mushrooms.** Current Medicinal Chemistry. 16 (2009) 1543-1560.
- Ferreira, I. C. F. R.; Vaz, J. A.; Vasconcelos, M. H.; Martins, A. – **Compounds from wild mushrooms with antitumor potential.** Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry. 10 (2010) 424-436.

- Ferreira, I. I. S. – **Avaliação do ciclo de vida de cogumelos nativos: Comparação entre sistemas de produção abertos e fechados.** Coimbra. Universidade de Coimbra. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Dissertação de Mestrado.
- Fridovich, I. – **Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?** Annals of the New York Academy of Sciences. 893 (1999) 8-13.
- Gilbert, D. L. – **Fifty years of radical ideas.** Annals of the New York Academy of Sciences. 899 (2000) 1-14.
- Gülçin I. – **Antioxidant activity of food constituents: an overview.** Archives of Toxicology. 86 (2012) 345-391.
- Gutteridge, J. M. C. & Halliwell, B. – **Free radicals and antioxidants in the year 2000: A historical look to the future.** Annals of the New York Academy of Sciences. 899 (2000) 136-147.
- Heleno, S. A.; Barros, L.; Sousa, M. J.; Martins, A.; Santos-Buelga, G.; Ferreira, I. C. F. R. – **Targeted metabolites analysis in wild Boletus species.** LWT – Food Science Technology. 44 (2011) 1343-1348.
- Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V. I. – **A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables.** Food Chemistry. 126 (2011) 1821-1835.
- Jeong, S. C.; Jeong, Y. T.; Yang, B. K.; Islam, R.; Koyyalamudi, S. R.; Pang, G.; Cho, K. Y.; Song, C. H. – **White button mushrooms (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats.** Nutrition Research. 30 (2010) 49-56.
- Kalac, P. – **Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review.** Food Chemistry. 113 (2009) 9-16.
- Kalac, P. – **A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms.** Journal of the Science of Food and Agriculture. 93 (2013) 209-218.
- Karaman, M.; Stahl, M.; Vulic, J.; Vesic, M.; Canadanovic-Brunet, J. – **Wild-growing lignicolous mushroom species as sources of novel agents with antioxidative and**

antibacterial potentials. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 65 (2014) 311-319.

Koleva, I. I.; Beek, T. A.; Linssen, J. P. H.; Groot, A.; Evsatieva, L. N. – **Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods.** Phytochemical Analysis. 13 (2002) 8-17.

Leichter, J. & Bandoni, R. J. – **Nutrient content of mushrooms grown in British Columbia.** Canadian Institute of Food Science and Technology Journal. 13:3 (1980) 122-124.

Lo, K. M. & Cheung, C. K. – **Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*.** Food Chemistry. 89 (2005) 533-539.

MacDonald-Wicks, L. K.; Wood, L. G.; Garg, M. – **Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review.** Journal of the Science of Food and Agriculture. 86 (2006) 2046-2056.

Magalhães, L. M.; Segundo, M. A.; Reis, S.; Lima, J. L.F.C. – **Methological aspects about in vitro evaluation of antioxidante properties.** Analytica Chimica Acta. 613 (2008) 1-19.

Martins, A. – **Manual para a gestão dos recursos micológicos silvestres do Baixo Alentejo.** ADPM Associação de Defesa do Património de Mértola. (2011) 7-29.

MicoBank Database – Fungal Databases, Nomenclature & Species Bancks. [Em linha]. [Acedido a 24 de Julho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.mycobank.org/>

Mikami, I., Yamaguchi, M., Shinmoto, H., Tsushida, T. – **Development and Validation of a Microplate-based β -carotene Bleaching Assay and Comparison of Antioxidant Activity (AOA) in Several Crops Measured by β -carotene Bleaching, DPPH and ORAC Assays.** Food Science and Technology Research, 15 (2009) 171-178.

Miller, H.E. – **A simplified method for evaluation of antioxidant.** Journal of the American Oil Chemists' Society. 48 (1971) 91.

Molyneux, P. – **The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity.** Journal of Science and Technology. 49 (2004) 211-219.

MushroomExpert.com – MushroomsExpert. [Em linha]. [Acedido a 25 de julho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.mushroomexpert.com/>

- Naczki, M.; Shahidi, F.; – **Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 41 (2006) 1523-1542.
- Ndhala, A.; Moyo, M.; Staden, J. V. – **Natural antioxidants; Fascinating or mythical biomolecules?** Molecules. 15 (2010) 6905-6930.
- Nowacka, N.; Nowak, R.; Drozd, M.; Olech, M.; Los, R. – **Analysis of phenolic constituents, antiradical and antimicrobial activity of edible mushrooms growing wild in Poland.** LWT – Food Science and Technology. 59 (2014) 689-694.
- Orhan, I. & Ustun, O. – **Determination of total phenol content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition in selected mushrooms from Turkey.** Journal of Food Composition and Analysis. 24 (2011) 386-390.
- 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. 128 (2011) 674-678.
- Pereira, E.; Barros, L.; Martins, A.; Ferreira, I. C. F. R. – **Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats.** Food Chemistry. 130 (2012) 394-403.
- Petrovic, J.; Glamoclija, J.; Stojkovic, D.; Ciric, A.; Barros, L.; Ferreira, I. C. F. R.; Sokovic, M. – **Nutritional value, chemical composition, antioxidant activity and enrichment of cream cheese with chestnut mushroom *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing.** Journal of Food Science and Technology. (2015).
- Prior, R. I.; 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. 53 (2005) 4290-4302.
- Queirós, B.; Barreira, J. C. M.; Sarmiento, A. C.; Ferreira, I. C. F. R. – **In search of synergistic effects in antioxidant capacity of combined edible mushrooms.** International Journal of Food Sciences and Nutrition. 60 (S6) (2009) 160-172.
- Reis, F. S.; Martins, A.; Barros, L.; Ferreira, I. C. F. R. – **Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between *in vivo* and *in vitro* samples.** Food and Chemical Toxicology. 50 (2012a) 1201-1207.

- Reis, F. S.; Barros, L.; Martins, A.; Ferreira, I. C. F. R. – **Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study.** Food and Chemical Toxicology. 50 (2012b) 191-197.
- Reis, F. S.; Barros, L.; Sousa, M. J.; Martins, A.; Ferreira, I. C. F. R. – **Analytical methods applied to the chemical characterization and antioxidant properties of three wild edible mushroom species from northeastern Portugal.** Food Analytical Methods. 7:3 (2013) 645-652.
- Ricardo, S. – **Quantificação do teor de ergosterol por HPLC-UV e determinação da actividade antioxidante no cogumelo *Pleurotus ostreatus* comercializado e cultivado em borras de café e palha de trigo.** Coimbra: Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia. 2013. Dissertação de Mestrado.
- RogersMushrooms.com – Rogers Mushrooms. [Em linha]. [Acedido a 25 de julho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.rogersmushrooms.com/>
- Sánchez, C. – **Modern aspects of mushroom culture technology.** Applied Microbiology and Biotechnology. 64 (2004) 756-762.
- Sánchez, C. – **Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms.** Applied Microbiology and Biotechnology. 85 (2010) 1321-1337.
- Sarikurkcu, C.; Tepe, B.; Yamac, M. – **Evaluation of the antioxidant activity of four edible mushrooms from the Central Anatolia, Eskisehir – Turkey: *Lactarius deterrimus*, *Suillus collitinus*, *Boletus edulis*, *Xerocomus chrysenteron*.** Bioresource Technology. 99 (2008) 6651-6655.
- Sharma, O. P.; Bhat, T. K. – **DPPH antioxidant assay revisited.** Food Chemistry. 113 (2009) 1202-1205.
- Smolskaite, L.; Venskutonis, P. R.; Talou, T. – **Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushrooms species.** LWT- Food Science and Technology. 60 (2015) 462-471.
- Stilinovic, N.; Skrbic, B.; Zivancev, J.; Mrmos, N.; Pavlovic, N.; Vukmirovic, S. – **The level of elements and antioxidant activity of commercial dietary supplement formulations based on edible mushrooms.** Food Function. (2014).

- Sun, Y.; Ma, Y.; Xu, Z.; Yang, W.; Mariga, M.; Pang, G.; Geng, C.; Hu, Q. – **Immunoregulatory role of *Pleurotus eryngii* superfine powder through intercellular communication of cytokines.** Food and Agricultural Immunology. 25:4 (2014) 586-599.
- Tabart, J.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Defraigne, JO.; Dommes, J. – **Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests.** Food Chemistry. 113 (2009) 1226-1233.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M.; Telser, J. – **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** International Journal Biochemistry and Cell Biology. 39 (2007) 44-84.
- Xue, Z.; Zhai, L.; You, W.; Wang, H.; Kou, X.; Peng, L.; Hu, D. – **Antitumor and immunomodulatory activity of *Pleurotus eryngii* extract.** Journal of Food Biochemistry. 39 (2015) 19-27.
- Yang, J. H.; Lin H. C.; Mau, J. I. – **Antioxidant properties of several commercial mushrooms.** Food Chemistry. 77 (2002) 229-235.
- Yeh, M. Y.; Ko, W. C.; Lin, L. Y. – **Hipolipidemic and antioxidant activity of enoki mushrooms (*Flammulina velutipes*).** BioMed Research International. 31 (2014) 352-385.
- Yoo, K. M.; Lee, C.H.; Lee, H.; Moon, B.; Lee, C. Y. – **Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs.** Food Chemistry. 106 (2008) 929-936.
- Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. – **The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals.** Food Chemistry. 64 (1999) 555-559.