FRANCISCO ALBERTO DE SOUZA CAMPOS JUNIOR

"PERFIL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EM COGUMELOS COMESTÍVEIS PRODUZIDOS NO BRASIL"

CAMPINAS

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FRANCISCO ALBERTO DE SOUZA CAMPOS JUNIOR

"PERFIL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EM COGUMELOS COMESTÍVEIS PRODUZIDOS NO BRASIL"

ORIENTADOR: Helena Teixeira Godoy

COORIENTADOR: Adriana Dillenburg Meinhart

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO FRANCISCO ALBERTO DE SOUZA CAMPOS JUNIOR E ORIENTADO PELA PROFA. DRA. HELENA TEIXEIRA GODOY

Assinatura do Orientador

_____

CAMPINAS, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Campos Junior, Francisco
C157p Perfil dos composto fenólicos em cogumelos comestíveis produzidos no Brasil / Francisco Alberto de Souza Campos Junior. -- Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Helena Teixeira Godoy.
Coorientador: Adriana Dillenburg Meinhart.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Cogumelos. 2. Compostos fenólicos. 3. Eletroforese capilar. 4. Otimização multivariada. 5. Hidrólise. I. Godoy, Helena Teixeira. II. Meinhart, Adriana Dillenburg. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Phenolic profile of edible mushrooms produced in Brazil
Palavras-chave em inglês:
Mushrooms
Phenolic compounds
Capillary electrophoresis
Multivariate optimization
Hydrolysis
Área de concentração: Ciência de Alimentos
Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos
Banca examinadora:
Helena Teixeira Godoy [Orientador]
Severino Matias de Alencar
Juliana Azevedo Lima Pallone
Data da defesa: 26/07/2013
Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

_____

Profa. Dra.Helena Teixeira Godoy
Orientadora
Universidade Estadual de Campinas

_____

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar
Membro Titular
Universidade de São Paulo

_____

Profa. Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone
Membro Titular
Universidade Estadual de Campinas

_____

Prof. Dr. Rodrigo Scherer
Membro Suplente
Universidade Vila Velha

_____

Dra. Daniela de Queiroz Pane
Membro Suplente
Universidade de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Francisco e Maria Lucia, pela oportunidade e incentivo que me deram para poder voltar a Universidade e concluir esse trabalho, e por todo o ensinamento que me deram durante a vida.

À minha irmã Mariana pela paciência que teve comigo nos momentos mais difíceis.

À Marina, pois sem seu apoio e compreensão nada disso teria sido possível. Em todos os momentos ao meu lado me incentivando e sempre me dando forças e carinho para terminar meu trabalho.

Ao Medina e a Rita pelo incentivo e apoio que sempre me deram, pois sabem o valor que a pesquisa tem no Brasil.

À minha orientadora Profa. Helena, excelente como pessoa e orientadora. Obrigado pelos ensinamentos, paciência e pela confiança depositada em mim.

À minha co-orientadora Adriana, sempre comigo em todos os momentos, me ensinando muitas coisas e mostrando o caminho nas adversidades.

Ao Mateus por toda a ajuda durante as análises, mas também pelos momentos de descontração, pela amizade e paciência comigo.

Ao Cristiano pela oportunidade em trabalhar contigo em diversos projetos e por todo ensinamento que me foi passado.

Á banca examinadora pelas valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

Aos amigos do laboratório Janclei, Tayse, Jéssica, Dani Bio, Dani Neves, Wellington, Thais, Polly, Danilo, Maria Rosa, Carlos, Vivian, Milene, Paula, Marla, Sabrina, Elenice, Juzinha.

Ao Seu Dirceu, Renata e a Marcela por todas as ajudas que me deram durante o trabalho.

À Fortitech, por adotar um horário flexível que me permitiu assistir as disciplinas.

Aos todos os amigos da Fortitech, mas principalmente ao Emerson, Vilene, Thiago e Rubens pelo apoio em todas as etapas do desenvolvimento do trabalho.

Ao departamento de Ciência de Alimentos, por conceder o espaço físico para a realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADO A TODOS!!!!

ÍNDICE GERAL

RESUMO GERAL X

SUMMARY XI

INTRODUÇÃO GERAL 1

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 3

REVISÃO DE LITERATURA

1. ASPECTOS GERAIS 9

2. ASPECTOS NUTRICIONAIS 11

3. CULTIVO DE COGUMELOS 12

4. COMPOSTOS FENÓLICOS 14

4.1. PROPRIEDADES BIOATIVAS 16

4.2. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO 17

5. MÉTODOS TRADICIONALMENTE EMPREGADOS PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS 18

5.1. ELETROFORESE CAPILAR 19

6. ESTUDO MULTIVARIADO 23

7. BIBLIOGRAFIA 23

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM COGUMELOS COMESTÍVEIS POR ELETROFORESE CAPILAR

RESUMO 35

ABSTRACT 36

1. INTRODUÇÃO 37

2. MATERIAL E MÉTODOS 39

2.1. AMOSTRAS 39

2.2. REAGENTES 40
2.3. MÉTODO DE ANÁLISE POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA. 40
2.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR ELETROFORESE CAPILAR 41
2.4.1. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ) 42
2.4.2. LINEARIDADE DO SISTEMA 42
2.4.3. PRECISÃO 42
2.5. ESTUDO DA EXTRAÇÃO METANÓLICA. 43
2.6. OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA E TRATAMENTO DE DADOS PARA A OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO AQUOSA E CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE. 43
2.7. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS 44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 44
3.1. CURVA DE MOBILIDADE 44
3.2. ESTUDO DAS FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO ESTABELECIDO PARA SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS. 47
3.3. AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO METANÓLICA 49
3.4. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO AQUOSA E HIDRÓLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS 50
4. CONCLUSÃO 56
5. BIBLIOGRAFIA 56
ANEXOS 63

PERFIL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE COGUMELOS COMESTÍVEIS PRODUZIDOS NO BRASIL.

RESUMO 65
ABSTRACT 66
1. INTRODUÇÃO 67
2. MATERIAIS E MÉTODOS 68
2.1. REAGENTES 68
2.2. AMOSTRAS 69

2.3. INSTRUMENTAÇÃO 70

2.4. PREPARO DA AMOSTRA 70

2.5. ANÁLISE POR ELETROFORESE CAPILAR 70

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 71

3.1. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS 71

4. CONCLUSÃO 77

5. BIBLIOGRAFIA 77

CONCLUSÃO GERAL 81

RESUMO GERAL

Dentre as propriedades funcionais apresentadas pelos cogumelos, destacam-se as propriedades antioxidantes. A principal classe de compostos que colaboram com a atividade antioxidante são os compostos fenólicos. Alguns trabalhos já relataram a presença de compostos fenólicos em diversas espécies de cogumelos, porém estudos que avaliam o perfil dos compostos fenólicos em cogumelos comestíveis cultivados no Brasil são muito escassos. O objetivo desse trabalho foi identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes em 4 espécies de cogumelos comestíveis (*Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus, Pleurotus ostreatoroseus* e *Lentinula edodes*) produzidas no Brasil, portanto foi desenvolvida uma metodologia de análise por eletroforese capilar através da otimização univariada do pH e análise da curva de mobilidade dos compostos fenólicos. Foi possível separar 11 compostos fenólicos já relatados em cogumelos. O método utilizou os seguintes parâmetros: 175 mmol.L^{-1} de ácido bórico, pH 8,5, 25°C, 30 kV, capilar 50 µm x 72 cm injeção de 50 mbar durante 5 segundos e detecção em 210 nm, em um tempo de corrida de 21 minutos. Foi realizado um estudo multivariado, utilizando-se um planejamento composto central (otimizando a concentração de ácido clorídrico, tempo e temperatura de extração) para a otimização da extração e hidrólise ácida dos compostos fenólicos presentes na matriz. A condição ótima de extração e hidrólise foi obtida analisando-se 0,3 g de amostra, com 6 mL de ácido clorídrico a 2 mol.L^{-1}, sob refluxo a 79,9°C por 30 minutos. Dentre os compostos investigados, foram identificados e quantificados os ácidos homogentísico, *p*-cumárico e cinâmico, com predominância do último. O teor de ácido homogentísico variou entre 169,85 e 388,6, *p*-coumárico entre 25,97 e 103,32 e ácido cinâmico entre 23,38 e 454,07, todos em mg.kg^{-1} de amostra liofilizada. Foi possível visualizar diferença no perfil dos compostos fenólicos de cogumelos de diferentes variedades. O tipo de substrato no qual os cogumelos são cultivados também foi significativo para os resultados. Da mesma forma, foi possível identificar diferenças em amostras com diferentes graus de maturação.

Palavras-chave: cogumelos, compostos fenólicos, eletroforese capilar, otimização multivariada, hidrólise.

SUMMARY

Among the celebrated functional properties of mushrooms, it calls the attention their antioxidant properties. Antioxidant compounds of the mushrooms are mailing the phenolic compounds. Some studies have reported the presence of phenolic compounds in several species of mushrooms, but studies that evaluate the phenolic content in edible mushrooms grown in Brazil are scarce. The aim of this study was to identify and measure phenolic compounds present in four species of edible mushrooms (*Agaricus bisporus, Pleurotus ostreatus, Lentinula edodes and Pleurotus ostreatoroseus*) cultivated in Brazil. A methodology of analysis was developed using capillary electrophoresis with pH univariate optimization and analysis of the mobility curve of phenolic compounds, separating 11 phenolic compounds already described in the literature. The following conditions were determinated: 175 $mmol.L^{-1}$ of boric acid, pH 8.5, 25°C, 30 kV, capillary of 50 µm x 72 with an injection of 50 mbar for 5 seconds and detection at 210nm, at a running time of 21 minutes. A multivariate study was conducted for the optimization of extraction and acid hydrolysis of phenolic compounds present in pattern. It was used a central composite design (optimizing the concentration of hydrochloric acid and extraction time and temperature). It was determined that the optimum condition for extraction and hydrolysis was samples of 0.3 g, 6 mL of hydrochloric acid at 2 $mol.l^{-1}$ under reflux at 79.9°C for 30 minutes. Among other compounds investigated, homogentisic, p-coumaric and cinnamic acids were identified and quantified, with predominance of the last one. Homogentisic acid content varied from 169.85 to 388.6; p-coumaric acid from 25.97 to 103.32 and cinnamic acid from 23.38 to 454.07, in $mg.kg^{-1}$ of lyophilized sample. Differences in phenolic content were observed for different varieties of mushrooms, type of substrate on which the mushrooms were grown and stage of maturity.

Keywords: mushrooms, phenolic compounds, capillary electrophoresis, multivariate optimization hydrolysis.

INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo de cogumelos durante os últimos vem crescendo por diversos fatores. Economicamente sua cultura permite a reciclagem de diversos resíduos agrícolas e agroindustriais, além da evolução contínua no cultivo, colheita, pós-colheita, processamento e armazenamento, (CHANG & MILES, 1986; PALACIOS, 2012).

Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization) em 1995, a produção mundial foi de 2,0 milhões de toneladas; em 2005, aumentou para 3,3 milhões de toneladas e em 2011 foi maior que 7 milhões de toneladas.

Os cogumelos comestíveis são, em geral, alimentos de alto valor nutricional, com baixo teor de carboidratos e de gordura, além de possuírem significativas quantidades de proteínas. São ainda ricos em minerais e vitaminas, incluindo a tiamina, riboflavina, niacina, biotina, ácido ascórbico, e outras do complexo B (FURLANI, 2004; SALES-CAMPOS, et al. 2011).

Além dessas características nutricionais, os cogumelos influenciam em propriedades fisiológicas do corpo, como na manutenção da homeostasia, regulação do biorritmo, prevenção do risco de doenças como câncer, derrame cerebral e doenças coronárias, produção de substâncias efetivas para a redução do colesterol e da pressão sanguínea, de substâncias com ação antitrombótica e hipoglicêmica. Além disso, são considerados agentes antitumorais, antibacterianos, antivirais, hematológicos e utilizados em tratamentos imunomoduladoras, e possuem capacidade antioxidante significativa. (ALETOR, 1995; WASSER & WEIS, 1999; MANZI & PIZZOFERRATO, 2000; MYAJI et al., 2006; SULLIVAN et al., 2006; KIM, et al., 2008; LO & WASSER, 2011; PALACIOS, et al. 2011; HUNG & NIH, 2012; YIM, et al., 2012).

Os compostos fenólicos são substâncias bioativas responsáveis pelos efeitos benéficos à saúde. Embora existam outros mecanismos, o modo de ação mais citado é a atividade antioxidante pela habilidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio e quelar íons metálicos. O conhecimento do conteúdo de compostos fenólicos presentes nos alimentos a base de vegetais é uma importante ferramenta para o entendimento do seu papel na saúde humana, bem como para os programas que visam o aumento do seu consumo (MONTEIRO et al*.,* 2007; MOLLER & LOFT, 2006).

Dentre os métodos de extração de compostos fenólicos, as técnicas líquido-líquido são as mais usadas para essa análise em amostras de alimentos e plantas naturais, principalmente por sua facilidade de uso, eficiência, ampla aplicabilidade e custos reduzidos (STALIKAS, 2007). Porém as substâncias fenólicas podem estar presentes nas matrizes na forma livre ou na forma de glicosídeos (BADIALE-FURLONG et al., 2003).

A hidrólise ácida e a saponificação são os meios mais comuns de libertar os ácidos fenólicos, ainda que possam decompor-se sob estas condições. O método de hidrólise ácida envolve tratamento de um extrato de plantas, como por exemplo, o ácido clorídrico em refluxo (STALIKAS, 2007; CHEW, et al., 2012; TAROLA, et al., 2013).

A técnica analítica mais utilizada para a separação e caracterização de compostos fenólicos individuais é a técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com colunas de fase reversa, sendo os sistemas de eluição por gradiente mais frequentemente empregados (ROBBINS, 2003). Porém, nos últimos anos, a eletroforese capilar mostrou-se uma técnica atrativa, permitindo a combinação de tempos de análise curtos, alta eficiência de separação e seletividade para a análise dos componentes dos alimentos, particularmente para os compostos fenólicos (KANITSAR et al., 2001; BONOLI et al., 2003; BALLUS et al. 2011; BIZZOTTO et al., 2012), além de apresentar análises de baixo custo em reagentes e consumo de amostras (JAGER & TAVARES, 2001; ASUNÇÃO et al., 2008).

Existem diversos trabalhos publicados que identificaram os fenólicos em muitas espécies de cogumelos cultivados em diferentes países, principalmente da Finlândia (MATTILA et al., 2001.), Índia (JAYAKUMAR et al., 2009; PUTTARAJU et al., 2006), Coréia do Sul (KIM et al, 2008), Portugal (BARROS et al., 2009;. RIBEIRO et al, 2006, 2007, 2008), Espanha (PALACIUS et al., 2011) e Turquia (YALTIRA et al., 2009), porém estudos que correlacionam o perfil de compostos fenólicos em cogumelos produzidos no Brasil são escassos.

Carvajal et al. (2012) avaliaram as propriedades antioxidantes e identificaram 3 compostos fenólicos presentes em amostras de *Agaricus brasiliensis*, mais conhecido como cogumelo do sol, em diferentes partes do cogumelo (corpo de frutificação, micélio jovem e micélio maduro), sendo este o único estudo encontrado dentre a literatura consultada que caracterizou os compostos fenólicos de uma espécie de cogumelo produzida no Brasil.

Por esse motivo, o presente trabalho teve como objetivo quantificar o teor de compostos fenólicos dos extratos aquosos hidrolisados de 4 espécies de cogumelos

comestíveis (*A. bisporus*, *P. ostreatus, P. ostreatoroseus* e *L. edodes*) produzidos no Brasil, levando em consideração os diferentes tipos de processamento, grau de maturação e substrato de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÀFICAS

ASUNÇÃO, N. A., BECHARA, E. J. H.; SIMIONATO, A. V. C.; TAVARES, M. F. M.; CARRILHO, E. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS): vinte anos de desenvolvimento, **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2124-2133, 2008.

ALETOR, V. A., ALADETIMI, O. O. Compositional studies on edible tropical species of mushrooms. **Food Chemistry**, v. 54, v. 3, p. 265-268, 1995.

BADIALE-FURLONG, E.; COLLA, E.; BORTOLATO, D. S.; BAISCH, A. L. M.;SOUZA-SOARES, L. A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Vetor**, v. 13, p.105-114, 2003.

BALLUS, C. A.; MEINHART, A. D.; DE OLIVEIRA, R. G.; GODOY, H. T. Optimization of capillary zone electrophoresis separation and on-line preconcentration of 16 phenolic compounds from wines produced in South America. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 136-144, 2012.

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**, v. 47, p.1076–1079, 2009.

BIZZOTTO, C. S; MEINHART, A. D.; RYBKA, A. C. P; SOBRINHO, M. R.; BOGUSZ JUNIOR, S.; BALLUS, C. A.; GODOY, H. T. Quantification of phenolic compounds by capillary zone electrophoresis in extracts of four commercial types of mate herb before and after acid hydrolysis. **Food Research International**, v. 48, p. 763–768, 2012.

BONOLI, M., MONTANUCCI, M., TOSCHI, T. G., LERCKER, G.; Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin

olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection; **Journal of Chromatography A**, v. 1011; p.163-172; 2003.

CARVAJAL, A. E. S. S.; KOEHNLEIN, E. A.; SOARES, A. A.; ELER, G. J.; NAKASHIMA,A. T. A.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of Agaricus brasiliensis (A. blazei) and their antioxidant properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, P. 493–499, 2012.

CHANG, S.T.; MILES, P.G. **Edible mushrooms and their cultivation**. CRC Press, inc Boca Raton, Florida, 1989.

CHEW, L. Y.; KHOO, H. E.; AMIN, I.; AZRINA, A.; LAU, C. Y. Analysis of Phenolic Compounds of Dabai (Canarium odontophyllum Miq.) Fruits by High-Performance Liquid Chromatography. **Food Analytichal Methods**, V. 5, p. 126-137, 2012.

FAO. Food and Agriculture Organization. FAOStat: Production (faostat.fao.org) Consulta em abril, 2013.

FURLANI, R. P. Z. **Valor nutricional de cogumelos cultivados no Brasil**. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção do Título de Doutor em Ciência de Alimentos; Universidade Estadual de Campinas, 2004.

HUNG, P. V.; NHI, N. N. Y. Nutritional composition and antioxidant capacity of several edible mushrooms grown in the Southern Vietnam. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 2, p. 611-615, 2012.

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 363-373, 2001.

JAYAKUMAR, T.; THOMAS, P. A.; GERALDINE, P. In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom Pleurotus ostreatus. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10, p. 228-234, 2009.

KANITSAR, K.; ARCE, L.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. Determination of phenolic constituents in citrus samples by on-line coupling of a flow system with capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 22, p. 1553–1565, 2001

KIM, M. Y.; SEGUIN, P.; AHN, J. K.; KIM, J. J.; CHUN, S. C.; KIM, E. H.; SEO S. H.; KANG, E. Y.; KIM, S. L.; PARK, Y. J., RO, H. M., CHUNG, I. M. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7265-7270, 2008.

LO, H. –C. & WASSER, S. P. Medicinal mushrooms for glycemic control in diabetes mellitus: History, current status, future perspectives, and unsolved problems (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 13, n. 5, p. 401-426, 2011.

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

MATTILA, P.; KONKO, K.; EUROLA, M.; PIHLAVA, J. M.; ASTOLA, J.; VAHTERISTO, L.; HIETANIEMI, V.; KUMPULAINEN, J.; VALTONEN, M.; PIIRONEN, V. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2343-2348, 2001.

MOLLER, P.; LOFT, S. Dietary antioxidants and beneficial effects on oxidatively damaged DNA. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 388-415, 2006.

MONTEIRO, M.; FARAH, A.; PERRONE, D.; TRUGO, L. C.; DONANGELO, C. Chlorogenic acid compounds from coffe are differentially absorbed metabolized in humans. **Nutrition**, v. 37, p. 2196-2201, 2007.

MIYAJI, C. K. & CÓLUS, I. M. de S. Shiitake, um cogumelo mutagênico ou antimutagênico? **Semina: Ci. Biol. Saúde**, v. 22, p. 11-17, 2001.

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**, v. 128, p. 674–678, 2011.

PUTTARAJU, N. G.; VENKATESHAIAH, S. U.; DHARMESH, S. M.; URS, S. M.; SOMASUNDARAM, R. Antioxidant Activity of Indigenous Edible Mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemmistry**, v. 54, p. 9764-9772, 2006.

RIBEIRO, B.; RANGEL, J.; VALENTÃO, P.; BAPTISTA, P.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B. Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried Portuguese wild edible mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8530-8537, 2006.

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

RIBEIRO, B.; LOPES, R.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; Gonçalves, R. F.; Baptista, P.; Quelhas, I.; Valentão, P. Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. **Food Chemistry**, v. 110, p. 47-56, 2008.

ROBBINS, R. J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2866−2887, 2003.

SALES-CAMPOS, C.; ARAUJO, L. M., MINHONI, M. T. A.; ANDRADE, M. C. N. Physiochemical analysis and centesimal composition of Pleurotus ostreatus mushroom grown in residues from the Amazon. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 456-461, 2011.

STALIKAS C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonóides. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3268 – 3295, 2007.

SULLIVAN, R., SMITH, J. E., ROWAN, N. J. Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice to Western medicine. **Perspectives in Biology and Medicine**. v. 49, n. 2, p. 159-170, 2006.

TAROLA, A. M; VELDE, F. V.; SALVAGNI, L.; PRETI, R. Determination of Phenolic Compounds in Strawberries (Fragaria ananassa Duch) by High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection. **Food Analytical Methods**, V. 6, p. 227-237, 2013.

WASSER, S.P. & WEIS, A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). **Internacional Journal Medicinal Mushrooms**, v.1, p. 31-62, 1999.

YALTIRAK, T., ASLIM, B., OZTURK, S., ALLI, H. Antimicrobial and antioxidant activities of Russula delica Fr. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2052-2056, 2009.

YIM, H. S.; CHYE, F. Y.; KOO, A. M.; MATANJUN, P.; HOW, S. E.; HO, C. W. Optimization of extraction time and temperature for antioxidant activity of edible wild mushroom, Pleurotus porrigens. **Food and bioproducts processing**, v. 90, p. 235–242, 2012.

REVISÃO DE LITERATURA

1. ASPECTOS GERAIS

Os fungos são organismos eucariontes, heterotróficos, que não podem fabricar matéria orgânica a partir de carbono inorgânico, pois não apresentam pigmentos fotossintéticos (LAURENCE, 2005).

Durante muito tempo os fungos foram considerados como vegetais, mas com o avanço das pesquisas e descobertas feitas a respeito de suas características, foram agrupados em um reino próprio, o Reino Fungi. Os fungos possuem várias características que permitem sua diferenciação das plantas, como: não realizar fotossíntese (não sintetizam clorofila). Além disso, os fungos possuem a parede das células composta principalmente por quitina (exceto alguns fungos aquáticos) e não armazenam amido como substância de reserva, e sim o glicogênio (TORTORA et al., 2002; GUERREIRO, 2003).

Os fungos constituem um grupo de organismos com enormes variedades de formas, cores e tamanhos. A coloração dos fungos é bem diversificada, variando do branco ao negro, passando pelos tons de amarelo, laranja e marrom; sendo mais raros, os fungos azulados, rosados e esverdeados. Como todo ser vivo, os fungos são constituídos de células, podendo ser unicelulares, quando formados por células isoladas, ou pluricelulares, quando as células são agrupadas em filamentos. Os filamentos dos fungos pluricelulares são denominados hifas (MOURA, 2008).

A micologia reconhece cinco filos nos fungos: Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota. Os fungos comestíveis são encontrados nos filos Ascomycota e Basidiomycota. Os Ascomycota incluem vários fungos economicamente importantes; fazem parte deste filo muitas leveduras, as morchelas e as trufas comestíveis. No filo Basidiomycota estão os cogumelos comestíveis e não comestíveis (alucinógenos, tóxicos e venenosos) (RAVEN et al., 2007).

A estrutura que é denominada cogumelo é, na realidade, apenas o corpo de frutificação do fungo. O conjunto de hifas entrelaçadas forma o micélio. O micélio que se desenvolve no interior do substrato, que atua também como um elemento de sustentação e absorção de nutrientes, é chamado de micélio vegetativo. O que se projeta na superfície e cresce acima do meio de cultivo é o micélio aéreo e este, quando se diferencia para sustentar seus órgãos de disseminação, constitui o micélio reprodutivo (MOURA, 2008).

Os fungos se reproduzem por meio da formação de esporos que são formados sexuada ou assexuadamente. No caso dos basidiomicetos, o ciclo de vida inicia-se quando

o basidioma (cogumelos) lança os esporos (basidiosporos) no ar, e assim podem ser disseminados facilmente pelo vento (Figura 1.) (BRAGA et al., 1998).

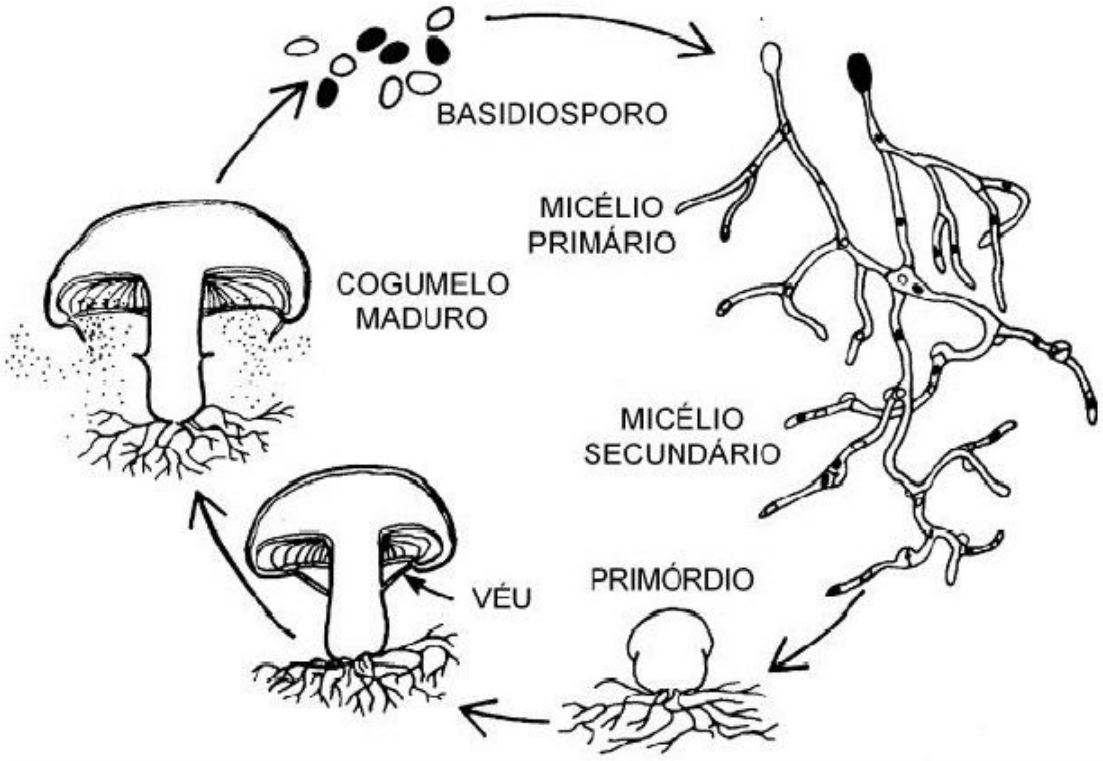


Figura 1. Ciclo de Vida de um Cogumelo

Fonte: (PICCININ, 2000)

Os basidiosporos quando germinados recebem o nome de micélio primário, o qual é pouco vigoroso e tem a metade do número de genes do cogumelo. Por esse motivo, o micélio primário é incapaz de dar origem a um novo cogumelo, sendo necessária a fusão (plasmogamia) de dois diferentes micélios primários para originarem o micélio secundário. Este apresenta o mesmo número de genes do cogumelo, e será capaz de originar, em condições adequadas ao seu desenvolvimento, novos cogumelos. O micélio secundário é conhecido comercialmente por inóculo ou "semente" do cogumelo (PICCININ, 2000).

Existem aproximadamente 45 mil espécies de cogumelos descritas na literatura, mas apenas 25 delas são comercialmente cultivadas (URBEN & SIQUEIRA, 2003). Os cogumelos mais cultivados em todo o mundo são *A. bisporus* (champignon de Paris), seguido de *Lentinus edodes* (shiitake), *Pleurotus spp* (cogumelo ostra), *Aurícula auricula* (cogumelo orelha), *Flamulina velutipes* (cogumelo inverno) e *Volvariella volvacea* (cogumelo de palha) (AIDA et al., 2009). No Brasil, as principais espécies comestíveis

cultivadas são *Agaricus bisporus, Lentinula edodes e Pleorotus spp* (EIRA et al., 1997). Recentemente, a espécie *A. blazei* tem despertado interesse da medicina popular devido a suas possíveis propriedades medicinais e tem sido exportada do Brasil, principalmente para o Japão (PINHEIRO et al., 2003).

2. ASPECTOS NUTRICIONAIS

Os cogumelos são, de modo geral, constituídos de 90% de água, apresentam elevados teores de proteínas, vitaminas A, C, D e do complexo B. São ricos em sais minerais (fósforo, potássio, cálcio, sódio e ferro) e fibras de baixo valor calórico (BADO, 1994).

Os cogumelos possuem alta quantidade de proteína. Em espécies de *Pleurotus spp* foram detectados todos os aminoácidos essenciais que constituíam de 42,57 a 56,38 % da proteína presente nesses cogumelos. Também em *Pleurotus*, foi verificada a alta presença de aminoácidos essenciais, 126,7mg/g, em peso seco, de um total de 347,5mg/g de aminoácidos totais. A espécie *A. bisporus* contém todos os aminoácidos essenciais e os mais abundantes são os ácidos glutâmico, aspártico e arginina (FURLANI, 2004).

Segundo FURLANI & GODOY (2007) os cogumelos champignon, shiitake e shimeji, por sua composição química, constituem alimentos com excelente valor nutritivo, pois apresentam alto teor de proteínas e fibras alimentares, além de conterem baixo teor de lipídeos (Tabela 1).

Tabela 1: Composição Centesimal encontrado no Champignon Paris (*Agaricus bisporus)* em base seca (FURLANI & GODOY, 2007).

COMPOSIÇÃO (*Agaricus bisporus)*	
Carboidrato	54,12%
Proteína	28,45%
Lipídeos	5,42%
Cinzas	11,98%
Fibra Alimentar	20,44%
Ácido Ascórbico	6,30 mg.100 g^{-1}
Fósforo	113,30 mg.100 g^{-1}

Os cogumelos apresentam quantidades reduzidas de gordura, porém o mesmo apresenta alta porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) e baixos teores de ácidos graxos saturados e colesterol (URBEN, 2004).

Os cogumelos podem também ser considerados fontes de vitaminas. Segundo trabalho de SALES-CAMPOS et al. (2011), cogumelos da espécie *Pleurotus ostreatus* possuem tiamina, riboflavina e niacinamida variando de 4,8-7,8; 4,7-4,9 e 55-109 mg.100 g^{-1} em base seca.

Hoje, os cogumelos são considerados por muitos pesquisadores como alimentos nutracêuticos ou funcionais fisiológicos, fato que tem estimulado aos atuais produtores brasileiros e aos novos produtores a busca de técnicas mais produtivas e introdução de outras espécies. Devido ao alto valor proteico, o cultivo dos cogumelos tem sido apontado como uma alternativa para acrescentar a oferta de proteínas aos países com alto índice de desnutrição. A utilização de certas espécies, em forma de chá ou cápsulas, como preventivo de algumas doenças, também acelerou a produção de cogumelos (FURLANI & GODOY, 2005).

Há uma grande variabilidade na composição nutricional de cogumelos entre mesma espécie e entre espécies diferentes. Estas variações são devidas às espécies de cogumelos, às estirpes escolhidas, ao tipo de substrato utilizado, ao grau de maturação, ao tipo de armazenamento, às partes analisadas e ao procedimento de conservação (SALES-CAMPOS et al., 2011).

3. CULTIVO DE COGUMELOS

A primeira técnica que os chineses empregaram para produzir cogumelos consistiu em encontrar os troncos de árvore caídos na floresta e colocá-los próximos aos troncos frutificados, que, por sua vez, eram expostos ao vento para capturar os esporos. Eventualmente, fragmentos de cogumelo eram colocados dentro ou sobre os troncos. No ocidente, em Bonnefons (França), iniciou-se a produção de cogumelos em substrato com esterco de cavalos e resíduos úmidos. Naquela época, acreditava-se que a "semente" dos cogumelos estava presente no esterco dos cavalos. A germinação de esporos e o crescimento dos cogumelos se davam em troncos de árvores, esses troncos eram plantados cobertos com esterco de cavalo e terra (HERRERA, 2001).

Estima-se que o primeiro cultivo intencional de cogumelos tenha ocorrido na China por volta do século VI, ou seja, há 1.400 anos. A primeira espécie cultivada *foi Auricularia auricula*, aproximadamente no ano de 600, em seguida *Flamulina velutipes*, no ano 800 e a terceira espécie foi *Lentinula edodes*, o Shiitake, no ano de 900 (SILVA, 2011).

O primeiro registro de produção comercial foi em 1780, quando um jardineiro francês começou a cultivar cogumelos nas pedreiras subterrâneas próximo a Paris. Após a Guerra Civil, jardineiros introduziram cogumelos na América do Norte, usando áreas escuras para seu cultivo (BEYER, 2003).

O champignon (*A. bisporus*) é a espécie mais cultivada no mundo e foi a primeira a ser cultivada no Brasil. O principal estado produtor é São Paulo, principalmente na região de Mogi das Cruzes. O início desta atividade ocorreu na década de 1950, mas só ganhou projeção no Brasil com a chegada de imigrantes chineses procedentes de Taiwan (URBEN, 2004).

Basicamente, o cultivo de qualquer cogumelo pode ser realizado em condições naturais não asséptica ou sob condições axênicas, isto é, com substrato submetido à esterilização e com as técnicas de cultivo asséptica até à colonização total do substrato pelo cogumelo.

Sob condições naturais não asséptica, os cogumelos podem ser cultivados em quatro grupos de substratos: em hospedeiros vivos (micorrízicos, ecologicamente dependentes); substratos “in natura” com relação C/N (carbono/nitrogênio) maior que 100/1, tais como troncos de madeira sem qualquer preparação prévia (usados para o cultivo de shiitake, *Pleurotus spp* e fungos medicinais como o *Ganoderma lucidum*, Pycnoporus *spp* e outros); resíduos agroindustriais com relação C/N entre 50 e 100/1, tais como palhas pré-tratadas por compostagem curta e pasteurização severa (*Pleurotus spp, Volvariela volvaceae* e outros) ou apenas pasteurização severa, como no caso de cavacos de madeira obtidos pela trituração de galhos finos e/ou serragem fresca (shiitake, *Auricularia sp* e outros); e palhas e resíduos agroindustriais (EIRA, 2000).

Outro padrão de substrato enriquecido com relação C/N entre 15 e 25/ 1 pode ser utilizado no sistema de cultivo de cogumelos sob condições axênicas, tais como o shimeji (*Pleurotus ostreatus*), o shiitake (*Lentinula edodes*), a *Flamulina velutipes, Pholiota nameko* e vários outros, incluindo quaisquer dos cogumelos normalmente cultivados sob condições naturais não asséptica. A principal razão da utilização de substratos com estreita relação C/N no cultivo axênico é para obter elevada produtividade, visando cobrir os custos dos

processos de esterilização e assepsia. Além disso, o cultivo em condições naturais não assépticas (baixo nível tecnológico de cultivo) não possibilita produções no tempo e quantidades requeridas pelo mercado consumidor (EIRA, 2000).

4. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são considerados metabolitos secundários sintetizados por plantas durante o desenvolvimento normal e ocorrem em resposta a condições de estresse tais como radiação UV, infecção, ferimentos, entre outros (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (ANGELO & JORGE, 2007).

Uma classificação simples para dividir a categoria geral de compostos fenólicos é a divisão entre fenóis simples e polifenóis, com base exclusivamente no número de subunidades fenólicas presentes. Assim, o termo "compostos fenólicos" engloba fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, até taninos hidrolisáveis e condensados, lignanas, e ligninas (STALIKAS, 2007).

Os compostos fenólicos não são uniformemente distribuídos em plantas e tecidos. Fenólicos insolúveis são encontrados na parede celular, enquanto compostos fenólicos solúveis são compartimentados dentro dos vacúolos de células vegetais (NACZK & SHAHIDI, 2004).

As camadas exteriores de plantas contêm níveis mais elevados de compostos fenólicos que aquelas localizadas nas suas partes interiores. Fenólicos da parede celular, tais como, as ligninas (o polímero de unidades monolignol) e os ácidos hidroxicinâmicos, estão ligados a componentes de células diferentes. Esses compostos contribuem para a resistência mecânica das paredes das células, desempenham um papel regulador do crescimento da planta na morfogênese e atuam na resposta celular ao estresse e agentes patogênicos (BAUCHER et al., 1998; BRETT et al., 1999).

Os ácidos fenólicos relacionados a metabólitos de plantas referem-se a um grupo distinto de ácidos orgânicos: os derivados dos ácidos hidroxibenzóicos e os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos (ROBBINS, 2003). Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecúico, vanílico e siríngico, que têm estrutura comum, C6–C1; enquanto os ácidos hidroxicinâmicos são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C6–C3), como os ácidos caféico, ferúlico e *p*-cumárico, os mais comuns (BRAVO, 1998; SOARES, 2002).

Nos alimentos, os compostos fenólicos podem contribuir para a amargura, adstringência, cor, sabor, odor e estabilidade oxidativa do produto (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob sua forma natural, podem também ligar entre si ou com outros compostos. Um exemplo dessa combinação ocorre com o ácido caféico associado a um álcool-ácido cíclico (denominado ácido quínico), que origina o ácido clorogênico (SOARES, 2002).

A estrutura química dos flavonoides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anéis A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C. O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina. Variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides. Essas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfação (ANGELO & JORGE, 2007). O anel C pode ter forma cíclica piranóica (núcleo flavonoide básico) ou ainda conter um grupo carbonila na posição 4 (RIBANI, 2006).

As cumarinas são substâncias derivadas do metabolismo da fenilalanina, através da via do ácido chiquímico ou por via mista (ácido chiquímico e acetato). Estruturalmente são lactonas do ácido o-hidróxi-cinâmico, sendo o representante mais simples a cumarina (1,2 benzopirona). Com exceção da cumarina simples, todas as cumarinas são substituídas por um grupo hidroxila na posição 7. A 7-hidróxi-cumarina, também conhecida como umbeliferona é a precursora das cumarinas 6,7-di-hidroxiladas e 6,7,8-tri20 hidroxiladas. Esses grupos podem ser metilados ou glicosilados (PREAT et al., 2005).

Os taninos e as ligninas compreendem polímeros de fenólicos nos tecidos vegetais e tradicionalmente são classificados em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos

condensados. Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central, geralmente β-D-Glicose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com ácido gálico. Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (SANTOS et al., 2004).

As ligninas são polímeros complexos de grande rigidez e resistência mecânica, e sua hidrólise libera uma grande variedade de derivados dos ácidos benzoicos e cinâmicos (SOARES, 2002).

4.1. PROPRIEDADES BIOATIVAS

A oxidação é essencial para muitos organismos vivos produzirem energia para alimentar os processos biológicos. Os radicais livres são produzidos durante o funcionamento normal e/ou durante o metabolismo celular patológico (PALA & GÜRKAN, 2008).

Lesões induzidas por espécies reativas têm sido relacionadas à patogênese de várias doenças, incluindo câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e doença de Parkinson e artrite reumatoide (LANGSETH, 2000; SCALBERT et al., 2005; ANDRÉ et al., 2010; THERIAULT et al., 2006).

Quase todos os organismos estão protegidos contra os danos causados por radicais livres por enzimas oxidativas, tais como a superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidise (GSHPx) e catalase (CAT), por compostos químicos, tais como α-tocoferol, ácido ascórbico, carotenoides e compostos fenólicos. Fitoquímicos, especialmente compostos fenólicos, são considerados antioxidantes, pois possuem a capacidade de neutralizar radicais livres, prevenindo a degradação oxidativa de células e biomacromoléculas e certas doenças humanas (câncer, distúrbios inflamatórios, degenerações neurológicas, doenças coronárias etc.) (CROZIER et al., 2009; WONG & CHYE, 2009).

Antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOARES, 2002). De acordo com o modo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres,

convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radiacal livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da autoxidação por diferentes mecanismos, que incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (ADEGOKE et al., 1998).

Segundo Balasundram et al. (2006), a estrutura dos compostos fenólicos é um fator determinante da sua atividade. No caso dos ácidos fenólicos, por exemplo, a atividade antioxidante depende do número e posição dos grupos hidroxilas em relação ao grupo funcional carboxila, tendo aumentada sua propriedade antioxidante quanto maior o seu grau de hidroxilação.

Assim, os compostos fenólicos atraem atenção por seu potencial benefício à saúde. São atribuídas a eles atividades como antioxidante, antibacteriana, antiviral, anticarcinogênica, anti-inflamatória e vasodilatadora (DUTHIE et al., 2000; BREINHOLT, 1999; NACZK & SHAHIDI, 2004).

4.2. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A extração de compostos fenólicos é influenciada por sua natureza química, pelo método de extração utilizado, pelo tamanho de partícula da amostra, por condições e tempo de armazenamento, assim como pela presença de substâncias interferentes. Não existe um processo uniforme ou completamente satisfatório que seja adequado para a extração de todos os compostos fenólicos ou de uma classe específica de substâncias fenólicas em materiais vegetais. Metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila e, em menor grau, propanol, dimetilformamida, e suas combinações são frequentemente utilizados para a extração de fenólicos (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Diferentes metodologias de extração vêm sendo descritas, podendo variar, quanto ao tempo, entre apenas alguns minutos de acordo com Puttaraju et al. (2006) ou até mesmo 72 horas de acordo com Palacios et al. (2011).

Extração em fase sólida (SPE) é uma técnica utilizada para isolar, removendo componentes indesejáveis da amostra e concentrar os analitos de interesse. Por eluição com solventes de diferentes pH, composto fenólicos maiores e os açúcares são separados dos componentes menores fenólicos (ROBBINS, 2003). Extrações com fluido supercrítico

(SFE) fornecem extratos relativamente limpos. Essa técnica pode ser aplicada em amostras de vegetais, porém para a extração de compostos polares ou iônicos, é necessária a adição de modificadores orgânicos ou a derivatização dos compostos (LIN at al., 1999).

No entanto as técnicas de extração líquido-líquido ainda são as mais usadas para a análise de polifenóis e fenóis simples em plantas, principalmente por sua facilidade de uso, eficiência, ampla aplicabilidade e custos reduzidos (STALIKAS, 2007).

As substâncias fenólicas podem aparecer livres ou na forma de glicosídeos. Poliglicosídeos são muito solúveis em água e pouco solúveis em solventes orgânicos apolares. A posição do açúcar na estrutura fenólica influi na solubilidade e em outras propriedades físico-químicas (BADIALE-FURLONG et al., 2003).

A hidrólise ácida e a saponificação são os meios mais comuns de libertar os ácidos fenólicos, ainda que possam decompor-se sob estas condições. O método de hidrólise ácida envolve tratamento do extrato de plantas, como por exemplo, o ácido clorídrico em refluxo (STALIKAS, 2007).

A liberação enzimática é uma técnica alternativa, mas menos prevalente, utilizadas para libertar os ácidos fenólicos (ácidos ferúlico e principalmente *p*-cumárico). As enzimas pectinases, celulases e amilases são empregadas para a degradação das ligações com os carboidratos (ROBBINS, 2003).

5. MÉTODOS TRADICIONALMENTE EMPREGADOS PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e aplicação dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem uma gama enorme de substâncias, são, na maioria das vezes, de alta polaridade, muito reativos e susceptíveis à ação de enzimas. Os métodos utilizados na análise de compostos fenólicos podem ser classificados em determinação de compostos fenólicos totais, quantificação individual e/ou de um grupo ou classe de compostos fenólicos (ANGELO & JORGE, 2007).

O método de Folin-Denis é o mais utilizado para a determinação de fenólicos totais em vegetais. Este método descrito por Swain e Hillls (1959) baseia-se na redução do ácido fosfomolíbdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, produzindo um complexo de

coloração azul que absorve entre 620 e 740 nm com um comprimento de onda máximo em 725 nm. O método de Folin-Denis, no entanto, não é um método específico, pois determina todos os fenólicos presentes, além de substâncias redutoras adicionadas aos alimentos ou naturalmente presentes que podem interferir nos resultados. Muitas vezes o reagente de Folin-Denis é substituído pelo de Folin-Ciocalteu. Este último é mais sensível à redução pelos fenóis e diminui a tendência à precipitação, porém independente do tipo de reagente utilizado, não é um método específico, pois detecta todos os grupos fenólicos presentes no extrato, incluindo aqueles presentes nas proteínas extraíveis ou reduzem substâncias, como o ácido ascórbico (ANGELO & JORGE, 2007).

A técnica analítica mais utilizada para a separação e caracterização de compostos fenólicos individuais é a técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com colunas de fase reversa, sendo os sistemas de eluição por gradiente mais frequentemente empregados do que eluições isocráticas. As fases móveis predominantemente utilizadas são o metanol e acetonitrila, mas propanol, butanol, tetrahidrofurano e acetato de etila também podem ser utilizados. Comumente fases aquosas ou orgânicas são adicionadas de ácidos, sendo o ácido acético o mais utilizado, muito embora, soluções contendo ácidos sulfúricos, perclórico, clorídrico, fosfórico e fórmico também sejam utilizadas (ROBBINS, 2003).

Nos trabalhos de Puttaraju et al. (2006), Ribeiro et al. (2007), Barros et al. (2009), Vaz, et al. (2011) e Palacius et al. (2011) é possível verificar o uso do HPLC como técnica analítica para identificação e quantificação de compostos fenólicos em cogumelos.

5.1. ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica em ascensão em vários países. Sua principal característica é a separação dos analitos devido às diferentes mobilidades dadas pelo peso molecular e carga dos compostos. As principais vantagens da EC são a alta eficiência de separação, boa resolução e seletividade, além de apresentar análises rápidas, de baixo custo em reagentes. O equipamento é versátil e apresenta rápida estabilização às condições de análise. Cabe ressaltar que a geração de resíduos é mínima e, na maioria dos casos, não necessitam de tratamento específico por se tratarem de tampões simples. A principal desvantagem da eletroforese é a baixa sensibilidade (LEE & LIN, 1996; XU et al.,

1995; SOGA & SERWE, 2000; BAZZANELLA & BÄCHMANN, 1998; FU et al., 1998; SILVA, 2003; JAGER & TAVARES, 2001; ASUNÇÃO et al., 2008).

A maioria dos métodos desenvolvidos para a análise de compostos fenólicos por EC emprega eletroforese capilar de zona (CZE), com base em um tampão borato em pH alcalino. Métodos por cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) com tampão borato ou fosfato e dodecilsulfato de sódio (SDS) como agente micelar também estão sendo empregados (MORIN et al., 1993; MAMAN et al., 1996).

Em eletroforese de zona com injeção no modo positivo, a migração das espécies ocorre pela combinação dos efeitos dos fluxos eletroosmótico (FEO) e eletroforético. Quando o campo elétrico é aplicado, os íons positivos da solução eletrolítica atraídos pelas hidroxilas do capilar são direcionados para o cátodo e arrastam moléculas de água formando o fluxo eletroosmotico (DABEK-ZLOTORZYNSKA et al., 1998; TAVARES, 1996). O fluxo eletroforético é direcionado ao eletrodo de carga contrária ao analito, neste caso, os cátions migram no mesmo sentido do fluxo eletroosmótico, isto é, em direção ao cátodo, enquanto os ânions migram no sentido oposto. Os ânions, como os compostos fenólicos, são carreados pelo fluxo eletroosmótico que possui maior magnitude e assim passam delo sistema de detecção. A separação das espécies aniônicas é possível graças à diferença nas mobilidades dos analitos (QUEIROZ, 2001; DABEK-ZLOTORZYNSKA et al., 1998) (Figura 2).

A movimentação dos íons gerada pelo FEO leva a um perfil radial linear, o que impede a dispersão das bandas e garante uma alta eficiência na separação. Isto não ocorre, por exemplo, no HPLC, onde a movimentação do analito ocorre por pressão, levando a um perfil de fluxo parabólico (SANTORO, 2000).

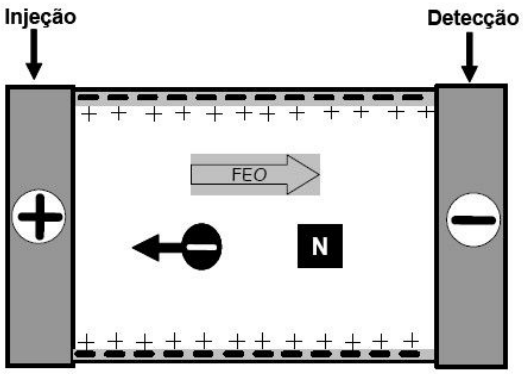


Figura 2: Representação esquemática da migração de analitos neutros e aniônicos através de eletroforese capilar de zona. FEO: Fluxoeletrosmótico; N: Composto neutro; ⊖: Composto carregado negativamente.

Diferentes modos de detecção têm sido utilizados em CE como absorção no UV-Visível, fluorescência induzida a laser (LIF), métodos eletroquímicos, condutividade e espectrometria de massas (CIFUENTES, 2006).

Diversas metodologias baseadas na eletroforese capilar foram desenvolvidas para aplicação em determinação simultânea de compostos fenólicos em produtos vegetais (ACOSTA et al., 2012; GODOY-CABALLERO et al. 2013). Estudos realizados por Kanitsar et al. (2001) utilizaram com sucesso CZE para separar 15 compostos fenólicos em citrus (laranja e toranja). Ballus et al. (2012) utilizaram tampão com ácido bórico como eletrólito de corrida, separando e quantificando 16 diferentes compostos fenólicos presentes em vinhos. Em trabalho desenvolvido por Bizzotto et al. (2012), houve a quantificação dos compostos fenólicos da erva mate, obtidos através da hidrólise do extrato vegetal, obtendo-se a separação em menos de 5 minutos.

A Tabela 2 esquematiza alguns desses trabalhos apresentando o tipo de alimento e as condições de análise empregadas para a detecção dos compostos fenólicos.

Tabela 2: Metodologias para determinação de compostos fenólicos por eletroforese capilar

Matriz	Compostos Analisados	Preparo de Amostra	Metodologia	Eletrólito de Corrida	Referência
Citrus	Trans-resveratrol, (−)-epicatequina, (+)-catequina, hesperidina, narigenina, vanilina, ácidos gentísico, salicílico, vanílico, sinapínico, ferúlico, *p*-cumárico e caféico	Extração em fase sólida em fluxo contínuo	CZE, Detecção UV 200nm	100 mmol L-1 ácido bórico, pH 9,5	Kanitsar et al. (2001)
Azeite de Oliva	Tirosol, Hidroxitorosol e 2,3-hidroxifeniletanol	Extração líquido-líquido, hexano e metanol	CZE, Detecção UV 200nm	50 mmol L-1 tetraborato de sódio, pH 9,6	Bonoli et al (2003)
Pólen	Hesperidina, crisina, narigenina, rutina, baicalen, kampeferol, apigenina, luteolina, quercitina, morina, ácidos vanílico, gálico e protocatecúico	Extração sólido-líquido, etanol e água	CZE, detecção eltroquímica	50 mmol L-1 tetraborato de sódio, pH 9,0	CHU et al. (2007)
Chá verde	Epicatequina galato, epigalatocatequina galato, epicatequina, catequina, epicagalatocatequina	Infusão com água quente	MEKC, Detecção UV 210nm	0,2% Trietilamina, 50 mmol L-1 SDS, 0.8% s-β-CD	Rodriguez-Amaya et al., 2011)
Vinhos	Narirutina, trans-resveratrol, (−)-epicatequina, (+)-catequina, rutina, kampeferol, miricetina, quercitina, morina , acidos cinâmico, ferrulico, p-cumarico, vanílico, caféico, gálico e 3,4-hidroxibenzóico	Extração líquido-líquido, etanol e agua	CZE, Detecção UV 217nm	175 mmol L-1 ácido bórico, pH 9,0	Ballus et al. (2011)
Erva mate	Rutina, ácidos caféico e 3,4-hidroxibenzóico	Extração sólido-líquido, etanol	CZE, Detecção UV 217nm	100 mmol L-1 ácido bórico, pH 9,0	Bizzotto et al. (2012)

Dentre a literatura consultada, não foram encontrados estudos de caracterização de compostos fenólicos presentes em cogumelos pela técnica de eletroforese capilar.

6. ESTUDO MULTIVARIADO

A abordagem clássica para a otimização de sistemas experimentais é o estudo univariado, onde cada parâmetro é modificado individualmente, enquanto que os demais são mantidos fixos. No estudo univariado é possível observar o efeito de apenas um parâmetro a cada alteração de alguma condição do experimento. Já o estudo multivariado de algum sistema analítico ou produtivo apresenta vantagens quando comparado a estudos univariados, já que é possível avaliar o efeito de interação entre as variáveis, o que traz uma riqueza de informações muito importante, permitindo a avaliação dos efeitos de interação e das condições intermediárias que apresentem a resposta máxima desejada (LIN et al., 1999, MEINHART et al., 2010).

A metodologia de superfícies de resposta é uma técnica de otimização de sistemas que é baseada em planejamentos fatoriais. Possui duas etapas distintas, a modelagem e o deslocamento. A primeira é feita ajustando-se modelos simples às respostas obtidas com planejamentos fatoriais. A segunda trata-se do deslocamento ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (BRUNS et al., 2003).

Esta abordagem multivariada possui vantagens em termos da redução no número de experimentos, possibilidades aperfeiçoadas de interpretação estatística, redução do tempo total requerido para a análise dos dados, redução de custos e melhorias nos resultados analíticos (BOX et al., 2005; RONDA et al., 2008).

7. BIBLIOGRAFIA

ACOSTA, G.; ARCE, S.; MARTÍNEZ, L. D.; LLABOTC, J.; GOMEZA, M. R. Monitoring of phenolic compounds for the quality control of melissa officinalis products by capillary electrophoresis. **Phytochemical Analysis**, v. 23, p.177–183, 2012.

ADEGOKE, G. O. ; KUMAR, M. V.; KRISHNA, A. G. G.; VARADARAJ, M. C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B.R. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, v. 25, p. 283-398, 1998.

AIDA, F. M. N. A; SHUHAIMI, M.; YAZID, M.; MAARUF, A.G.Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, pp.567-575, 2009.

André, C. M.; Larondelle, Y.; Evers, D. Dietary Antioxidants and Oxidative Stress from a Human and Plant Perspective: A Review. Current Nutrition & Food Science, v. 6, p. 2-12, 2010.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p.232-240, 2007.

ASUNÇÃO, N. A., BECHARA, E. J. H.; SIMIONATO, A. V. C.; TAVARES, M. F. M.; CARRILHO, E. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS): vinte anos de desenvolvimento, **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2124-2133, 2008.

BADIALE-FURLONG, E.; COLLA, E.; BORTOLATO, D. S.; BAISCH, A. L. M.;SOUZA-SOARES, L. A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Vetor**, v. 13, p.105-114, 2003.

BADO, L. C. Produccion de hongos comestibles; In: Valor Nutritivo y Toxicologia de lós hongos. San cristóbal de lãs Casas. Chiapas, p.108, 1994.

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

BALLUS, C. A.; MEINHART, A. D.; DE OLIVEIRA, R. G.; GODOY, H. T. Optimization of capillary zone electrophoresis separation and on-line preconcentration of 16 phenolic compounds from wines produced in South America. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 136-144, 2012.

BAUCHER M.; MONTIES B.; MONTAGU M.V.; BOERJAN, W. Biosynthesis and Genetic Engineering of Lignin. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 2, p. 125-197; 1998.

BAKER, D. R. Capillary Electrophoresis: Techniques in Analytical Chemistry. New York: A Wiley-Interscience Publication, 1995.

BEYER, D. M. Basic Procedures for Agaricus Mushroom Growing. Penn State University; University Park. Pennsylvania, 2003.

BIZZOTTO, C. S; MEINHART, A. D.; RYBKA, A. C. P; SOBRINHO, M. R.; BOGUSZ JUNIOR, S.; BALLUS, C. A.; GODOY, H. T. Quantification of phenolic compounds by capillary zone electrophoresis in extracts of four commercial types of mate herb before and after acid hydrolysis. **Food Research International**, v. 48, p. 763–768, 2012.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery, 2. ed. Us: Wiley-interscience, 2005.

BRAGA, G. C.; EIRA, A. F.; CELSO, P. G.; COLAUTO, N. B. Manual de cultivo de Agaricus brasiliensis Murril ¨Cogumelo do sol ¨. Botucatu: FEPAF – UNESP, 1998.

BRAVO L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutritional Reviews**, v. 56, n. 11, p.317-33, 1998.

BAZZANELLA, A.; BÄCHMANN, K. Separation and direct UV detection of sugars by capillary electrophoresis using chelation of copper(II). **Journal of Chromatography A**, v. 799, n. 1-2, p. 283-288, 1998.

BEYER, D. M. Basic Procedures for Agaricus Mushroom Growing; 2003.

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**, v. 47, p.1076–1079, 2009.

BONOLI, M., MONTANUCCI, M., TOSCHI, T. G., LERCKER, G.; Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection; **Journal of Chromatography A**, v. 1011; p.163-172; 2003.

BADIALE-FURLONG, E.; COLLA, E.; BORTOLATO, D. S.; BAISCH, A. L.; SOUZA-SOARES, L. A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Vetor**, v. 13, p. 105-114, 2003.

BREINHOLT, V. Desirable versus harmful levels of intake of flavonoids and phenolic acids. In: Kumpulainen, J., Salonen, J.E. (Eds.), Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease. **The Royal Society of Chemistry**, Cambridge, pp. 93–105, 1999.

BRETT, C. T.; WENDE, G.; SMITH, A. C.; WALDRON, K. W. Biosynthesis of cell-wall ferulate and diferulates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n.3, p. 421–424, 1999.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, L. S.; BARROS NETO, B. Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento da ciência e na indústria. Campinas: Editora da Unicamp, 4ed., 2003.

CARRASCO-PANCORBO, A.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; SEGURACARRETERO, A.; GALLINA-TOSCHI, T.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Analytical determination of polyphenols in olive oils. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 837-858, 2005.

CHU, Q.; TIAN, X.; JIANG, L.; YE, J. Application of capillary electrophoresis to study phenolic profiles of Honeybee-collected pollen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8864–8869, 2007.

CIFUENTES, A. Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis. **Electrophoresis**, v. 27, p. 283-303, 2006.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1001-1043, 2009.

DABEK-ZLOTORZYNSKA, E.; LAI, E. P. C.; TIMERBAEV, A. R. Capillary electrophoresis: the stateof-the-art in metal speciation studies. **Analytica Chimica Acta**, v. 359, p. 1–26, 1998

DUTHIE, G. G.; DUTHIE, S. J.; KYLE, J. A. M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, p. 79–106, 2000.

EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. de A.; BRAGA, G. C.; MONTINI, R. M.; ICHIDA, M. S.; MARINO, R. H.; COLAUTO, N. B.; SILVA, J.; NETO, F. J. Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis; 2 ed.; Botucatú: Unesp; 1997.

EIRA, A. F. Cultivo de cogumelos (compostagem, condução e ambiente). **Anais da III Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico**, p. 83-95, 2000.

FU, C.; SONG, L.; FANG, Y. Simultaneous determination of sugars and organic acids by co-electroosmotic capillary electrophoresis with amperometric detection at a disk-shaped copper electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 371, n.1, p. 81-87; 1998.

FURLANI, R. P. Z. **Valor nutricional de cogumelos cultivados no Brasil**. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção do Título de Doutor em Ciência de Alimentos; Universidade Estadual de Campinas, 2004.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p.149-154, 2005.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 1, p. 154-157, 2007.

GODOY-CABALLERO, M. P.; CULZONI, M. J.; GALEANO-DÍAZ, T.; ACEDO-VALENZUELA, M. I. Novel combination of non-aqueous capillary electrophoresis and multivariate curve resolution-alternating least squares to determine. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 11–19, 2013.

GUERREIRO, R. T. Glossário Ilustrado de Fungos: Termos e Conceitos Aplicados a Micologia, Rio Grande do Sul. UFRGS 2a Edição, 2003.

HERRERA, O. M. Produção, Economicidade e Parametros Energéticos do Cogumelo Agaricus brasiliensis: um enfoque na cadeia produtiva, 2001.

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 363-373, 2001.

KANITSAR, K.; ARCE, L.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. Determination of phenolic constituents in citrus samples by on-line coupling of a flow system with capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 22, p. 1553–1565, 2001.

LANGSETH, L. Antioxidants and their effect on health. In: SCHMIDL, M. K.; LABUZA, T. P. **Essential of functional foods**. Maryland: Aspen Publication, 2000.

LAURENCE J. Biologia Nova Geração. São Paulo, p.272-280, 2005.

LEE, Y. H.; LIN, T. I. Determination of carbohydrates by high-performance capillary electrophoresis with indirect absorbance detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 681, n. 1, p. 87-97, 1996.

LIN, M. C.; TSAI, M. J.; WEN, K. C. Supercritical fluid extraction of flavonoids from Scutellariae Radix. **Journal of Chromatography A**, v. 830, p. 387-395, 1999.

MAMAN, O.; MARSEILLE, F.; GUILLET, B.; DISNAR, J.-R.; MORIN, P. Separation of phenolic aldehydes, ketones and acids from lignin degradation by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 755, n. 1, p. 89-97, 1996.

MEINHART, A. D; BIZZOTTO, C. S.; BALLUS, C. A.; PRADO, M. A.; BRUNS, R. E.; FILHO, J. T.; GODOY, H. T. Optimisation of a CE method for caffeine analysis in decaffeinated coffee. Food Chemistry, V. 120, n. 4, p. 1155-1161, 2010.

MORIN, P.; VILLARD, F.; DREUX, M. Borate complexation of flavonoids-O-glycosides in capillary electrophoresis: Separation of flavonoids-7-O-glycosides differing in their flavonoid aglycone. **Journal of Chromatography A**, v. 628, n. 1, p. 153- 160, 1993.

MOURA, P.L.C. Determinação de elementos essenciais e tóxicos em cogumelos comestíveis por análise por ativação com nêutrons – Dissertação de Mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações pelo IPEN, Autartquia Associada á Universidade de São Paulo/USP; 2008.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

PALA, F. S., GÜRKAN, H.; The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases; Advances in Molecular Biology; v. 1; p. 1-9; 2008.

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**, v. 128, p. 674–678, 2011.

PICCININ, E. Cultivo do cogumelo shiitake (Lentinula edodes) em toras de eucalipto: teoria e prática. ESALQ, Série Produtor Rural, 2000.

PINHEIRO, F.; FARIA, R. R.; CAMARGO, J. L. V.; SPINARDI-BARBISAN, A. L. T; EIRA, A. F.; BARBISAN, L. F. Chemoprevention of preneoplastic liver foci development by dietary mushroom Agaricus blazei Murrill in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 11, p. 1543–1550, 2003.

PREAT, J.; JACQUEMIN, D.; PERPÉTE, E. A. Theoretical investigations of the UV spectra of coumarin derivatives. **Chemical Physics Letters**, v. 415, p. 20-24, 2005.

PUTTARAJU, N. G.; VENKATESHAIAH, S. U.; DHARMESH, S. M.; URS, S. M.; SOMASUNDARAM, R. Antioxidant Activity of Indigenous Edible Mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemmistry**, v. 54, p. 9764-9772, 2006.

QUEIROZ, A. C. N; JARDIM, I. C. S. L. Eletroforese Capilar. **Chemkeys - Liberdade para aprender**, 2001.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Biologia Vegetal, 7°.ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2007.

RIBANI, R. H. Compostos fenólicos em erva-mate e frutas. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2006.

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

ROBBINS, R. J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2866−2887, 2003.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; PERES, R. G.; TONIN, F. G.; TAVARES, M. F. M. Determination of catechins in green tea infusions by reduced flow micellar electrokinetic chromatography. **Food Chemistry**, v. 127, p. 651-655, 2011.

RONDA, F.; RODRÍGUEZ-NOGALES, J. M.; SANCHO, D.; OLIETE, B.; GOMEZ, M. Multivariate optimisation of a capillary electrophoretic method for the separation of glutenins. Application to quantitative analysis of the endosperm storage proteins in wheat. **Food Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 287-296, 2008.

SALES-CAMPOS, C.; ARAUJO, L. M., MINHONI, M. T. A.; ANDRADE, M. C. N. Physiochemical analysis and centesimal composition of Pleurotus ostreatus mushroom grown in residues from the Amazon. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 456-461, 2011.

SANTORO, M. I. R. M. Eletroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 36, n. 1, p. 97-107, 2000.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos; In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento, 5° ed., Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 615-656, 2004.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 287-306, 2005.

SILVA, J. A. F. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar, **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 56-64, 2003.

SILVA, M. M. Cultivo de cogumelos pela técnica jun-cao. Monografia apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal

de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Especialista em Microbiologia. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

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

SOGA, T.; SERWE, M. Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Food Chemistry**, v. 69, n. 3, p. 339-344, 2000.

STALIKAS C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonóides. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3268 – 3295, 2007.

SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of Prunus domestical. The quantitative analysis of phenolic compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-51, 1997.

THERIAULT, M.; CAILLET, S.; KERMASHA, S.; LACROIX, M. Antioxidant, antiradical and antimutagenic activities of phenolic compounds present in maple products. **Food Chemistry**, v. 98, p. 490– 501, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R; CASE, C. L. Microbiologia. 6ª Ed. Editora Artmed, 2002.

URBEN, A. F. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada, 2. Ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

URBEN, A. F., SIQUEIRA, P. Cogumelos e suas delícias. Brasília, D. F., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Distrito Federal, Brasília, 2003.

VAZ, J. A.; BARROS, L.; MARTINS, A.; MORAIS, J. S.; VASCONCELOS, M. H.; FERREIRA, I. C. F. R. Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 343-346, 2011.

WONG, J. Y.; CHYE, F. Y. Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p.269–277, 2009.

XU, X.; KOK, W. T.; POPPE, H. Sensitive determination of sugars by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection under highly alkaline conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 716, p. 231-240, 1995.

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM COGUMELOS COMESTÍVEIS POR ELETROFORESE CAPILAR

Francisco Alberto de Souza Campos Junior[1], Mateus Henrique Petrarca[1], Adriana Dillenburg Meinhart[1] e Helena Teixeira Godoy[1]

[1] Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP: 13083-862, Campinas, SP, Brasil

RESUMO

A produção e o consumo mundial de cogumelos vêm crescendo nos últimos anos. Diversos benefícios à saúde têm sido associados aos cogumelos, principalmente por suas propriedades antioxidantes, conferido, principalmente aos compostos fenólicos. Poucos são os estudos sobre os compostos fenólicos em cogumelos comestíveis, principalmente para os cogumelos produzidos no Brasil. O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma metodologia de identificação e quantificação, por eletroforese capilar, de 11 compostos fenólicos (pirogalol, ácido homogentísco, ácido ferúlico, ácido cinâmico, ácido gentísco, ácido *p*-cumárico, ácido clorogênico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido caféico, ácido gálico e ácido 3,4-hidroxibenzóico), mais comumente encontrados em cogumelos, e otimizar a extração aquosa e hidrólise ácida, comparando-a com a extração metanólica. Técnicas estatísticas multivariadas, como o planejamento composto central e superfície de resposta foram utilizadas para a otimização da extração aquosa e hidrólise. O método de eletroforese capilar de zona utilizou capilar de 50 µm d. i. x 72 cm comprimento efetivo com bulbo estendido, eletrólito ácido bórico 175 mmol L^{-1}. As condições utilizadas foram: pH 8,5, 25°C, injeção de 50 mbar por 5 s com aplicação de +30 kV de voltagem, detecção em 210 nm e tempo de corrida de 21 min. Os procedimentos multivariados foram eficientes na determinação da condição ótima de extração e hidrólise permitindo maior eficiência de extração, rapidez, menor custo e geração de resíduos com menor impacto ambiental. De acordo com a validação de método realizada, foi apresentado ajuste para um modelo linear ($p>0,05$) nas faixas de concentração estudadas para os compostos e apresentou valores de repetitividade e precisão intermediária satisfatórios, indicando ser adequado para a identificação e quantificação de compostos fenólicos em extratos aquosos de cogumelos.

Palavras-chave: cogumelos, compostos fenólicos, eletroforese capilar, otimização multivariada.

ABSTRACT

Global production and consumption of mushrooms have increased steadily in recent years. Several health benefits have been attributed to mushrooms, supposedly due to the antioxidant properties, assigned to their phenolic compounds. However studies of phenolic content in edible mushrooms are scarce, especially for mushrooms cultivated in Brazil. The aim of this study was to develop a methodology of capillary electrophoresis to identify and measure 11 phenolic compounds (pyrogallol and homogentisic, ferulic, cinnamic, gentisic, p-coumaric, chlorogenic, p-hydroxybenzoic, caffeic, gallic and 3,4-hydroxybenzoic acids), commonly found in mushrooms and optimize aqueous extraction and acid hydrolysis and compare it with to methanol extraction. Multivariate statistical techniques, such as central composite design and response surface were used for the optimization of aqueous extraction and hydrolysis. The method of capillary zone electrophoresis used a capillary of 50 µm i.d. x 72 cm effective length with extended bulb, boric acid 175 mmol L^{-1} electrolyte, pH 8.5 at 25 °C, injection of 50 mbar for 5 sec with application of voltage +30 kV, detection at 210 nm and running time of 21 min. The multivariate procedures were efficient in determinig the optimal condition for extraction and hydrolysis allowing increased extraction efficiency, faster analysis, lower cost and residues with less environmental impact.

Keywords: mushrooms, phenolic compounds, capillary electrophoresis, multivariate optimization hydrolysis.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a procura dos consumidores por cogumelos aumentou significativamente, envolvendo um grande número de espécies, devido à evolução contínua no cultivo, colheita, pós-colheita, processamento e armazenamento, fatores que impulsionaram o consumo ao longo dos anos (PALACIOS, 2012).

Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization) em 1995, a produção mundial foi de 2,0 milhões de toneladas; em 2005, aumentou para 3,3 milhões de toneladas e em 2011 a produção foi maior que 7 milhões de toneladas, porém, não existem estatísticas oficiais sobre a produção de cogumelos no Brasil.

Além de possuir baixo teor de lipídeos e um alto teor de proteínas e fibras (FURLANI & GODOY, 2007), os cogumelos acumulam uma grande variedade de metabolitos secundários, tais como compostos fenólicos, terpenos e esteroides que, possivelmente, estão envolvidos nos seus efeitos medicinais (SOARES et al. 2002).

Recentemente têm sido atribuídos aos cogumelos diversos benefícios á saúde, como, por exemplo, propriedades antioxidantes (RIBEIRO, 2007; KIM, 2008), hipocolesterômica (WASSER & WEIS, 1999; LO & WASSER, 2011), anti-inflamatórias (DORE et al., 2007; GARCÍA-LAFUENTE et al. 2010), antialérgicas (YOSHINO et al., 2008) antimicrobianas (BARROS et al., 2007; YALTIRAK et al. , 2009), antivirais (FACCIN et al., 2007) e antitumorais (CHEN et al., 2009).

Estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes exerce uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo (DEGÁSPARI, 2004; KUROSUMI et al., 2007). Lesões induzidas por espécies reativas têm sido relacionadas à patogênese de várias doenças, incluindo câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e doença de Parkinson e artrite reumatoide (LANGSETH, 2000; SCALBERT et al., 2005; ANDRÉ et al., 2010; THERIAULT et al., 2006).

Os antioxidantes encontrados em cogumelos são principalmente os compostos fenólicos. Existem diversos trabalhos publicados que identificaram os fenólicos em muitas espécies de cogumelos, cultivados em diferentes países, principalmente da Finlândia (MATTILA et al., 2001.), Índia (JAYAKUMAR et al., 2009; PUTTARAJU et al., 2006), Coréia do Sul (KIM et al, 2008), Portugal (BARROS et al., 2009;. RIBEIRO et al, 2006, 2007, 2008), Espanha (PALACIUS et al., 2011) e Turquia (YALTIRA et al., 2009). Os estudos a respeito de

compostos fenólicos em cogumelos produzidos no Brasil são escassos. O único trabalho encontrado foi o desenvolvido por Carvajal et al. (2012), onde os pesquisadores avaliaram as propriedades antioxidantes e identificaram 3 compostos fenólicos presentes em amostras de *Agaricus brasiliensis*, mais conhecido como cogumelo do sol, em diferentes partes dos cogumelos (corpo de frutificação, micélio jovem e micélio maduro).

Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos. A estrutura pode variar desde uma molécula simples até um complexo de elevada massa molecular (BALASUNDRAM et al., 2006). Existem cerca de cinco mil fenóis, subdivididos em grupos, como os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (ANGELO & JORGE, 2007).

A extração é uma das etapas mais importantes para a recuperação e isolamento dos compostos fenólicos e no processo da análise como um todo. Os métodos de extração líquido-líquido e sólido-líquido são amplamente utilizados para a análise de fenólicos em plantas, principalmente por sua facilidade de uso, eficiência, ampla aplicabilidade e custos reduzidos (STALIKAS, 2007). Metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila e, em menor extensão, propanol, dimetilformamida e suas combinações, são frequentemente utilizadas para a extração de compostos fenólicos (NACZK & SHAHIDI, 2004). Métodos de extração em fase sólida (RUIZ et al., 2013), ultrassom (WANG et al., 2013) e fluído supercrítico (ROSEIRO et al., 2013) estão sendo recentemente introduzidos para tal finalidade. A extração metanólica é uma das formas de extração de compostos fenólicos mais utilizadas (CHEN et al., 2000; DAÍ & MUMPER, 2010; TLILI et al. 2013). PUTTARAJU et al., 2006 avaliaram o teor de compostos fenólicos totais em 23 espécies de cogumelos coletadas na Índia em extratos aquosos e metanólicos, sendo possível observar que o teor de compostos fenólicos nos extratos aquosos foi significativamente maior em comparação com os extratos metanólicos.

Além dos desafios relacionados à extração, as substâncias fenólicas podem estar presentes livres ou ligada principalmente à açúcares. Os poliglicosídeos são muito solúveis em água e pouco solúveis em solventes orgânicos apolares. A posição do açúcar na estrutura fenólica influi na solubilidade e em outras propriedades físico-químicas (BADIALE-FURLONG et al., 2003). A hidrólise ácida e a saponificação são os meios mais comuns de libertar os ácidos fenólicos, ainda que possam decompor-se sob estas condições. O método de hidrólise ácida envolve tratamento de um extrato com um ácido forte, como, por exemplo, o ácido clorídrico em refluxo em temperaturas e tempos que variam de acordo

com a amostra. A hidrólise enzimática é uma técnica alternativa, mas menos prevalente, determinado principalmente pelos custos envolvidos (STALIKAS, 2007). Dentre a literatura consultada, não foram encontrados estudos multivariados que otimizaram as condições de extração aquosa e hidrólise ácida ótimas para a análise de fenólicos em cogumelos.

Para a determinação dos compostos fenólicos, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência tem sido a mais empregada (RIBEIRO et al., 2006, 2007, 2008; BARROS et al., 2009; PALACIOS et al., 2011). No entanto, nos últimos anos, a eletroforese capilar mostrou-se uma técnica atrativa, permitindo a combinação de tempos de análise curtos, alta eficiência de separação e seletividade para a análise dos componentes dos alimentos, particularmente para os compostos fenólicos (KANITSAR et al., 2001; BONOLI et al., 2003; BALLUS et al. 2011; BIZZOTTO et al., 2012), além de apresentar análises de baixo custo em reagentes e consumo de amostras (JAGER & TAVARES, 2001; ASUNÇÃO et al., 2008). Dentre a literatura consultada, também não foram encontrados estudos de separação e quantificação de compostos fenólicos em cogumelos empregando a técnica de eletroforese capilar.

Devido à escassez de estudos a respeito do perfil de compostos fenólicos em cogumelos produzidos no Brasil, à ausência de método por eletroforese capilar para quantificação destes compostos nesta matriz e à falta de informações sobre as condições ótimas de extração aquosa e hidrólise ácida, neste trabalho foi proposta uma metodologia de identificação e quantificação desses compostos por eletroforese capilar de zona. Além disso, foi realizado um estudo de otimização multivariada a respeito da extração aquosa e hidrólise ácida, bem como a comparação com a extração metanólica já consolidada na literatura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

Para a otimização da extração foi utilizado o cogumelo de Paris fresco (*Agaricus bisporus* branco) por ser a espécie mais cultivada no mundo. As amostras foram adquiridas em supermercados da cidade de Campinas – SP.

Foram obtidos 3 embalagens, com 200 gramas cada um. As amostras foram congeladas, liofilizadas, trituradas em um moinho analítico da marca Ika (modelo A11 Basic Mill), acondicionadas em embalagens de polipropileno e armazenadas em freezer até o momento das análises.

2.2.Reagentes

Os padrões de pirogalol, ácido homogentísco, ácido ferúlico, ácido cinâmico, ácido gentísco, ácido *p*-cumárico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido caféico, ácido gálico e ácido 3,4-hidroxibenzóico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). O padrão do ácido clorogênico foi adquirido da Biopurify phytochemicals Ltd. (Chengdu, China). Também foram utilizados metanol p.a. (Synth, Brasil), metanol grau HPLC (J. T. Baker, EUA), ácido bórico (Ecibra, Brasil), hidróxido de sódio p.a. (Synth, Brasil). A água ultrapura foi obtida do sistema Direct Q3 UV (Millipore Corporation, France). Todas as soluções foram degaseificadas em ultrassom (Microsonic SX-20, Arruda Ultra-sons LTDA, Brasil) antes da injeção.

Os compostos investigados neste trabalho foram escolhidos com base na literatura. As soluções estoque dos mesmos, foi preparada na concentação de 1000 mmol.L^{-1}, em metanol:água (10:90), filtradas em membrana de 0,45 µm (Millipore), armazenadas em freezer e protegidas da luz.

2.3.Método de análise por eletroforese capilar de zona.

O equipamento utilizado foi um sistema de eletroforese capilar Agilent G1600AX (Agilent Technologies, Germany), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), injetor automático e sistema de controle de temperatura ajustado em 25°C.

O método empregado foi adaptado a partir do método desenvolvido por BALLUS et al. (2012), utilizando o modo de separação por zona. Os fenólicos foram separados em capilar de 50 µm de diâmetro interno por 72 cm de comprimento efetivo, eletrólito contendo 175 mmol.L^{-1} de ácido bórico, pH 8,5, com temperatura de 25°C, voltagem de 30kV, injeção de 50 mbar durante 5 segundos e detecção em 210 nm.

A modificação do método de BALLUS et al. (2012) foi quanto ao valor de pH, um parâmetro muito importante na eletroforese capilar, já que nas condições do método original a separação dos fenólicos do presente estudo não foi eficiente.

Portanto, avaliou-se de forma univariada o efeito da variação do pH entre 8,1 e 9,3. O pH da solução tampão é um dos parâmetros que afeta fortemente a separação em eletroforese capilar, afetando tanto o fluxo eletroosmótico, quanto a mobilidade eletroforética dos analitos.

Valores de pH abaixo de 8,1 não foram estudados, pois o tampão borato não possui poder tamponante nessas condições; também não foram estudados condições com pH acima de 9,3, pois o tempo de corrida torna-se muito extenso.

Os capilares novos foram ativados e condicionados por lavagem com pressão de 1 bar, utilizando uma solução de aquosa de NaOH mmol.L^{-1} durante 30 min, seguido de 10 min de água e 30 minutos com solução tampão. No início de cada análise, o capilar foi condicionado durante 1 min com NaOH 1 mmol.L^{-1}, espera de 0,5 min, seguido de 1 min com água purificada em sistema Milli-Q, 1 min de eletrólito, espera de 1 min e novamente 1 min de eletrólito. No final do dia foi realizada uma limpeza do capilar com lavagem por 5 min com NaOH 1 mmol.L^{-1} e 5 min de água Milli-Q. O capilar foi armazenado em água durante a noite.

A análise e o tratamento dos dados foi feito através dos softwares HP ChemStation e Statistica 7.0 (Statsoft, USA). Os modelos foram validados através da Análise de Variância (ANOVA, 95% de confiança).

2.4.Validação do método por eletroforese capilar

Com o método estabelecido, este foi validado intra-laboratorialmente, seguindo o protocolo estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA, 2003), tendo os seguintes parâmetros avaliados:

2.4.1. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) foi calculado pela relação sinal/ruído igual a 3 e o limite de quantificação (LQ) calculado pela relação sinal/ruído igual a 6.

2.4.2. Linearidade do sistema

A linearidade foi verificada de forma individual para cada um dos compostos, sendo a curva analítica construída com 8 pontos em triplicatas. Os pontos inferiores foram determinados com base no valor do limite de quantificação encontrado para cada um dos compostos e os pontos superiores foram definidos de acordo com as faixas lineares observadas nos ensaios, buscando contemplar no centro da faixa a concentração encontrada em amostras teste. Os modelos matemáticos das curvas analíticas foram avaliados quanto à falta de ajuste e significância da regressão através do software Statistica 7.0 (Statsoft, USA).

2.4.3. Precisão

A avaliação da precisão foi realizada através da repetitividade e da precisão intermediária. Para a avaliação da repetitividade, foram realizadas 7 determinações em um mesmo dia, incluindo as concentrações do limite de quantificação de cada composto, de um ponto intermediário da curva analítica e uma concentração na extremidade superior da curva. A precisão intermediária foi avaliada através de cinco determinações, nos mesmos níveis de concentração que para a repetitividade, em três dias diferentes.

A precisão foi avaliada pelos coeficientes de variação (CV). Foram considerados aceitáveis coeficientes de variação menores do que 15%, com exceção dos pontos analisados nos limites de quantificação, considerados como aceitáveis valores inferiores a 20% (ANVISA, 2003).

2.5. Estudo da extração metanólica.

O estudo conduzido para a avaliação da extração metanólica foi baseado na metodologia apresentada por Palacios et al. (2011). A extração utilizada foi baseada na extração exaustiva, onde 0,2 g da amostra liofilizada e moída foi extraída com 2 ml de metanol, sob agitação constante a 65°C por 72 horas. Após a agitação por 24 horas, a mistura foi centrifugada, o sobrenadante foi removido e o extrato sólido foi reextraído por mais duas vezes, cada qual com 2 mL de metanol e agitação de 24 horas, totalizando 72 horas de extração.

Para efeito de comparação, foi avaliada a relação entre o tempo de extração e a concentração dos compostos fenólicos extraídos. Foram conduzidos três experimentos: o primeiro com tempo total de extração de 72 horas, com troca da solução extratora (metanol) e reextração a cada 24 horas, como descrito no método de referência; o segundo com tempo total de 48 horas, com troca da solução e reextração a cada 12 horas; e o terceiro com tempo total de 24 horas de extração, com troca da solução e reextração a cada 8 horas.

2.6. Otimização multivariada e tratamento de dados para a otimização da extração aquosa e condições de hidrólise.

Foi utilizado um planejamento composto central 2^3 para investigar os efeitos de três variáveis: tempo e temperatura de extração e concentração de ácido clorídrico empregado para a extração e hidrólise dos compostos fenólicos. Os níveis estudados estão apresentados na Tabela 1. A resposta avaliada foi a concentração dos compostos fenólicos presentes na amostra. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e conduzidos em ordem aleatória.

Tabela 1. Variáveis e níveis experimentais para o planejamento composto central 2^3

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Tempo (Minutos)	30	48,2	75	101,78	120
Temperatura (°C)	40	50,1	65	79,9	90
HCl ($Mol.L^{-1}$)	0	0,8	2	3,2	4

Para a hidrólise foi utilizado um sistema composto de um banho de aquecimento com um condensador de bolas acoplado a um balão de fundo redondo, onde 0,3 g de amostra liofilizada e moída foi colocada e adicionado de 6 ml da solução aquosa com ácido clorídrico, conforme as condições do estudo de otimização.

Após a hidrólise, cada extrato foi filtrado com papel de filtro comum e o pH foi ajustado para 7,00 com uma solução de hidróxido de sódio. O volume final foi ajustado para 25 ml e os extratos foram filtrados com Milex (Millipore) 0,45 um e armazenados sob congelamento até o momento da análise.

O tratamento estatístico dos dados foi realizado com o auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft, USA). Os modelos matemáticos gerados foram validados através de análise de variância (ANOVA) para a falta de ajuste e significância da regressão, ao nível de 95% de confiança.

2.7. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

A identificação foi feita através da comparação entre os eletroferogramas das amostras e o eletroferogramas dos padrões. Essa comparação foi realizada com base nos tempos de retenção, espectro de absorção e adição de padrões á amostra.

A quantificação foi realizada através de padronização externa, utilizando-se os referidos padrões puros na construção de curvas analíticas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CURVA DE MOBILIDADE

Como as condições do método desenvolvido por Ballus et al. (2012) não permitiram a separação de todos os compostos fenólicos avaliados neste trabalho, estudou-se o efeito do pH sobre a resolução dos mesmos através das curvas de mobilidade.

Pode ser observado na Figura 1 que o pH da solução de eletrólito afetou o grau de ionização dos analitos, alterando assim a mobilidade eletroforética dos compostos, tanto que ocorreram inversões na ordem de eluição. Para valores de pH entre 8,1 e 8,9, com

exceção dos estudos que ocorreram em pH 8,5 e 8,6, os compostos apresentaram alta taxa de coeluição.

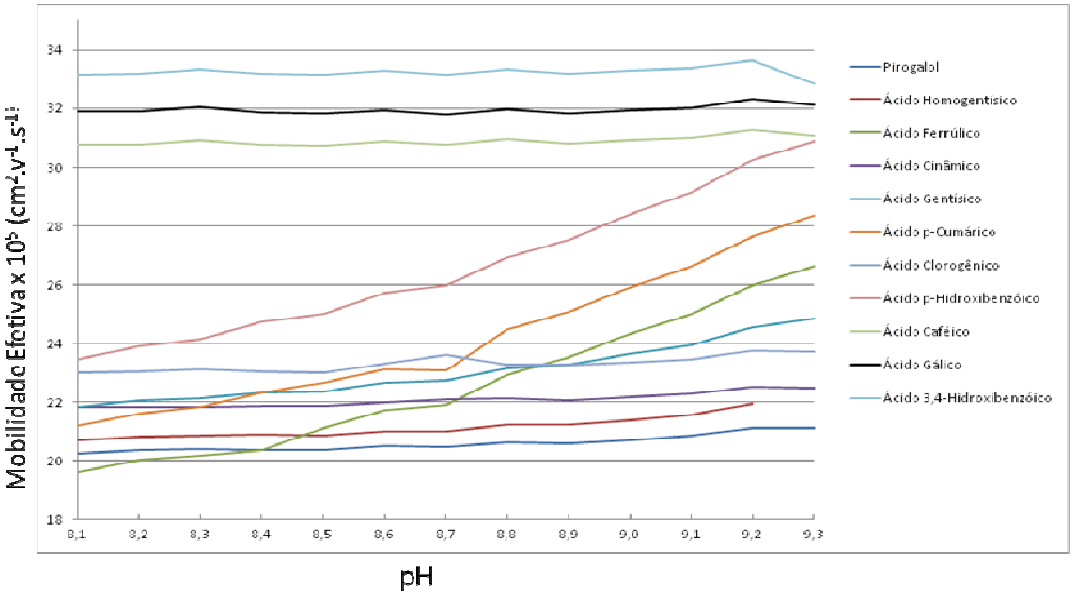


Figura 1. Curva de mobilidade efetiva para os 11 compostos fenólicos encontrados em cogumelos. Eletrólito ácido bórico 175 mmol L^{-1}, 25ºC, injeção de 50 mbar por 5 s com aplicação de voltagem de +30 kV e detecção em 210 nm.

Em pHs mais altos, entre 9,0 e 9,3, embora não tenham sido observadas coeluições entre os compostos estudados, notou-se uma redução do sinal correspondente ao ácido homogentísico e em pH 9,3 esse composto não foi mais detectado. Simultâneo à redução do sinal correspondente ao ácido homogentísico, notou-se o aparecimento de um sinal, próximo ao pico referente ao ácido clorogênico, com espectro de absorção similar ao do ácido homogentísico, porém não foi possível realizar a sua identificação. Estas observações provavelmente estão correlacionadas à degradação do ácido homogentísico nesse pH. No entanto, não foram encontrados trabalhos que descreveram esse efeito. Outro fator negativo observado com o aumento do pH é o aumento do tempo total de análise.

Como não houve coeluições nos pHs 8,5 e 8,6 e nestas condições os tempos de análise foram menores quando comparados aos pHs mais elevados, optou-se por escolher umas dessas condições. Foi escolhido o pH 8,5 pois nesta condição os compostos foram separados com resolução entre 2,88 e 68,65, dependendo dos pares de picos. Além disso, em pH 8,5 o tempo de corrida foi menor que em pH 8,6. Na Figura 2 estão apresentados três eletroferogramas em diferentes pHs (8,2, 8,5 e 9,2).

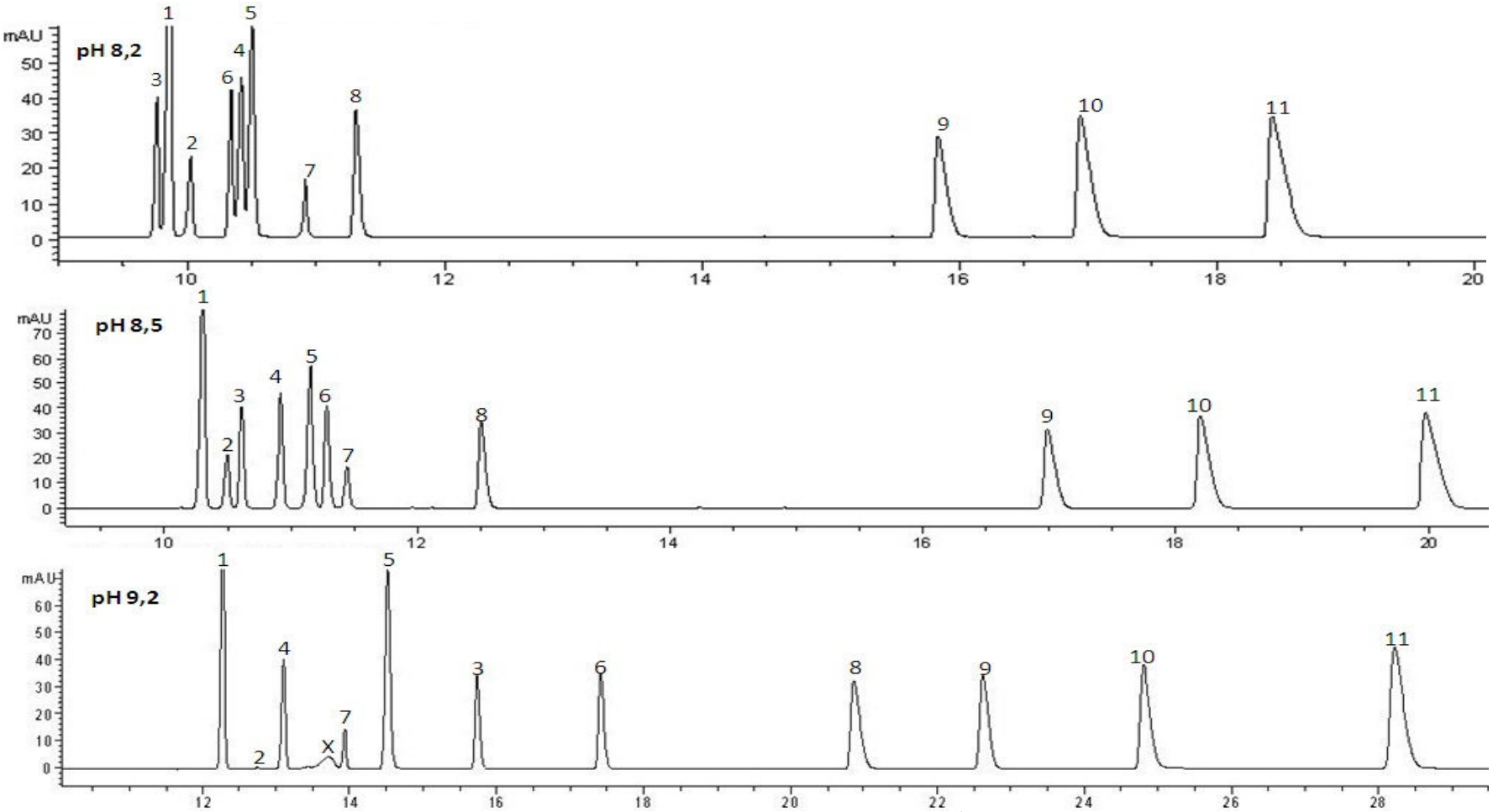


Figura 2. Eletroferograma da separação de padrões de compostos fenólicos. Condições utilizadas: 175 mmol.L^{-1} de ácido bórico, 25ºC, 30kV, capilar 50µm x 72 com injeção de 50 mbar durante 5 segundos e detecção em 210nm. Identificação dos picos: 1) Pirogalol, 2) Ácido Homogentísico, 3) Ácido Ferúlico, 4) Ácido Cinâmico, 5) Ácido Gentísico, 6) Ácido *p*-Cumparico, 7) Ácido Clorogênico, 8) Ácido *p*-Hidroxibenzóico, 9) Ácido Caféico, 10) Ácido Gálico, 11) Ácido 3,4-Hidroxibenzóico, X) Sinal não identificado.

3.2. Estudo das figuras de mérito do método estabelecido para separação dos compostos fenólicos.

Determinadas as condições de análise com o pH ajustado a 8,5, algumas figuras de mérito do método foram avaliadas. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 1.

Através da análise de variância, verificou-se que a regressão linear foi significativa nas faixas de concentração estudadas e que os modelos matemáticos não apresentaram falta de ajuste ($p>0,05$) já que o valor do quociente MQfaj/MQep (média quadrática devido à falta de ajuste/média quadrática devido ao erro puro), que representou o valor de F, apresentou valores menores que $F_{15,5\ (95\%)}$ crítico que é de 4,62. Além disso, os resíduos apresentaram distribuição normal, sem indícios de heterocedasticidade (anexo 1), mostrando que os modelos matemáticos são apropriados para realizar as quantificações.

Todos os compostos foram separados em apenas 21 minutos, tempo de corrida muito aquém dos encontrados em metodologias que utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência como ferramenta analítica, cujos tempos de análise relatados em publicações foi de 60 minutos ou mais (KIM et al., 2008; BARROS et al., 2009). Além disso, a análise por eletroforese capilar utilizou soluções simples, como hidróxido de sódio e solução de ácido bórico, enquanto que nos métodos por HPLC foram empregados fases móveis contendo metanol e acetonitrila. Dessa forma, o método proposto apresentou menor custo em reagentes e geração de resíduos simples, com menor toxicidade que os apresentados por HPLC.

Quanto a repetitividade, foram observados coeficientes de variação abaixo dos limites máximos estabelecidos pela ANVISA (ANVISA, 2003). Nos níveis do limite de quantificação os coeficientes de variação variaram entre 4,51 e 17,8. No nível intermediário da curva analítica a variação ocorreu entre 2,21 e 8,61, enquanto nos níveis superiores da curva foi entre 0,87 e 6,10. Para a precisão intermediária também foram verificados valores dentro dos limites estabelecidos. Os coeficientes de variação foram entre 6,12 e 13,38 no nível inferior, 1,73 e 6,09 no nível intermediário e entre 1,18 e 8,55 para o nível superior.

Tabela 1. Figuras de mérito para a validação do método de separação de 11 compostos fenólicos em padrões.

Composto	Faixa Linear ($mg.L^{-1}$)	Equação de reta	MQ_{faj}/MQ_{ep}	$F_{15,5\ (95\%)}$	Repetitividade** (n=7)	Precisão Intermediária** (n=5)	Limite de Detecção ($mg.L^{-1}$)	Limite de Quantificação ($mg.L^{-1}$)
Pirogalol	0,24 - 7,10	y = 4,5308x - 0,5003	0,77		5,21	4,13	0,12	0,24
Ácido Homogentísico	1,34 - 38,98	y = 1,2218x + 0,3065	0,66		6,10	8,55	0,67	1,33
Ácido Ferúlico	0,64 - 18,56	y = 2,2019x + 0,1783	0,89		1,80	1,81	0,32	0,65
Ácido Cinâmico	0,53 - 15,37	y = 2,8115x + 0,5446	0,93		1,30	2,04	0,27	0,53
Ácido Gentísico	0,62 - 18,06	y = 4,0028x + 0,0681	0,76		0,87	3,28	0,21	0,43
Ácido *p*-cumárico	0,62 - 18,09	y = 2,3846x + 0,4926	0,57	4,62	1,93	1,18	0,31	0,62
Ácido Clorogênico	1,59 - 46,34	y = 1,0496x + 0,2173	1,97		1,26	1,49	0,8	1,6
Ácido *p*-hidroxibezóico	0,52 - 15,15	y = 2,567x + 0,94	1,20		4,96	1,88	0,26	0,52
Ácido Caféico	0,77 - 22,44	y = 3,8104x + 0,1257	1,09		1,64	1,84	0,39	0,77
Ácido Gálico	0,65 - 18,85	y = 5,8205x - 0,4417	0,99		1,97	2,76	0,32	0,65
Ácido 3,4,-Dihidroxibenzóico	0,53 - 15,43	y = 7,1231x + 0,3217	1,21		2,15	1,27	0,27	0,53

* Os parâmetros repetibilidade e precisão intermediária foram avaliados através do cálculo do coeficiente de variação CV (%). MQfaj = Média Quadrática devida à falta de ajuste; MQep = Média Quadrática devida ao erro puro.

** Valores de repetitividade e de precisão intermediária referente ao nível superior analisado.

3.3. Avaliação da Extração Metanólica

Com base na extração metanólica proposta pela metodologia de referência foi possível identificar, na matriz analisada, dentre os compostos estudados, apenas o ácido cinâmico. A identificação de apenas um dos compostos estudados não está de acordo com o que foi relatado em outras publicações que utilizaram o metanol para a extração dos compostos fenólicos em cogumelos. Palacios et al. (2011) identificaram, nas mesmas espécies de cogumelos, porém produzidos na Espanha, os compostos ácido caféico, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido homogentísico e pirogalol. De acordo com Sales-Campos et al. (2011), as variações nas composições podem ser justificadas pelos vários fatores que interferem na composição química dos cogumelos, como as condições de cultivo (época de cultivo e coleta, temperatura, clima, luminosidade, umidade, etc), grau de maturação, cepa e substrato utilizado, mesmo sendo uma cultura com condições de cultivo muito controladas.

No entanto, de acordo com os resultados obtidos (Tabela 2), foi possível observar que, em média, a extração que ocorreu em um tempo total de 24 horas extraiu um teor menor de ácido cinâmico quando comparado às extrações que ocorreram em 48 e em 72 horas. Além disso, foi possível observar que nos tempos de extração de 48 e 72 horas não houve variações estatisticamente significativas na concentração de ácido cinâmico extraído da amostra. Portanto, o tempo total de extração pode ser reduzido de 72 para 48 horas sem prejuízo da concentração extraída do composto fenólico em questão.

Tabela 2. Concentração de ácido cinâmico presente nos extratos metanólicos do cogumelo *Agaricus bisporus* produzidos no Brasil nos diferentes tempos de extração.

Tempo (Horas)	Ácido Cinâmico ($mg.kg^{-1}$)
24	59,52 ± 6,51 [a]
48	83,17 ± 7,03 [b]
72	95,03 ± 11,97 [b]

Os resultados expressam a média de determinação em triplicata ± desvio padrão.

Letras iguais representam médias que não diferiram estatisticamente a um nível de 95% de confiança.

3.4. Otimização da extração aquosa e hidrólise dos compostos fenólicos

Na Tabela 3 também estão apresentadas as variáveis estudadas, bem como os níveis experimentais e os resultados de concentração de fenólicos encontrados no estudo de otimização de extração e hidrólise. Os dados expressam a média de uma triplicata verdadeira para cada nível experimental.

Da mesma forma que na extração metanólica, foi possível a identificação de apenas um dos compostos estudados. Em todas as condições estudadas, houve apenas a identificação do ácido cinâmico, como pode ser observado na Figura 3.

Tabela 3. Resultados encontrados nas condições experimentais do planejamento composto central para a otimização da extração e hidrólise

ENSAIO	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas			Ácido cinâmico (mg kg^{-1})*
	Tempo (min.)	Temperatura (°C)	HCl ($mol.L^{-1}$)	Tempo (min.)	Temperatura (°C)	HCl ($mol.L^{-1}$)	
1	-1	-1	-1	48,2	50,1	0,8	280,11
2	-1	-1	1	48,2	50,1	3,2	246,15
3	-1	1	-1	48,2	79,9	0,8	291,72
4	-1	1	1	48,2	79,9	3,2	294,39
5	1	-1	-1	101,8	50,1	0,8	271,02
6	1	-1	1	101,8	50,1	3,2	232,94
7	1	1	-1	101,8	79,9	0,8	285,72
8	1	1	1	101,8	79,9	3,2	308,60
9	-1,68	0	0	30	65	2	289,03
10	1,68	0	0	120	65	2	312,13
11	0	-1,68	0	75	40	2	266,69
12	0	1,68	0	75	90	2	318,02
13	0	0	-1,68	75	65	0	291,92
14	0	0	1,68	75	65	4	237,85
15	0	0	0	75	65	2	289,81

*Os valores representam a média de uma triplicata verdadeira, realizada em cada nível experimental

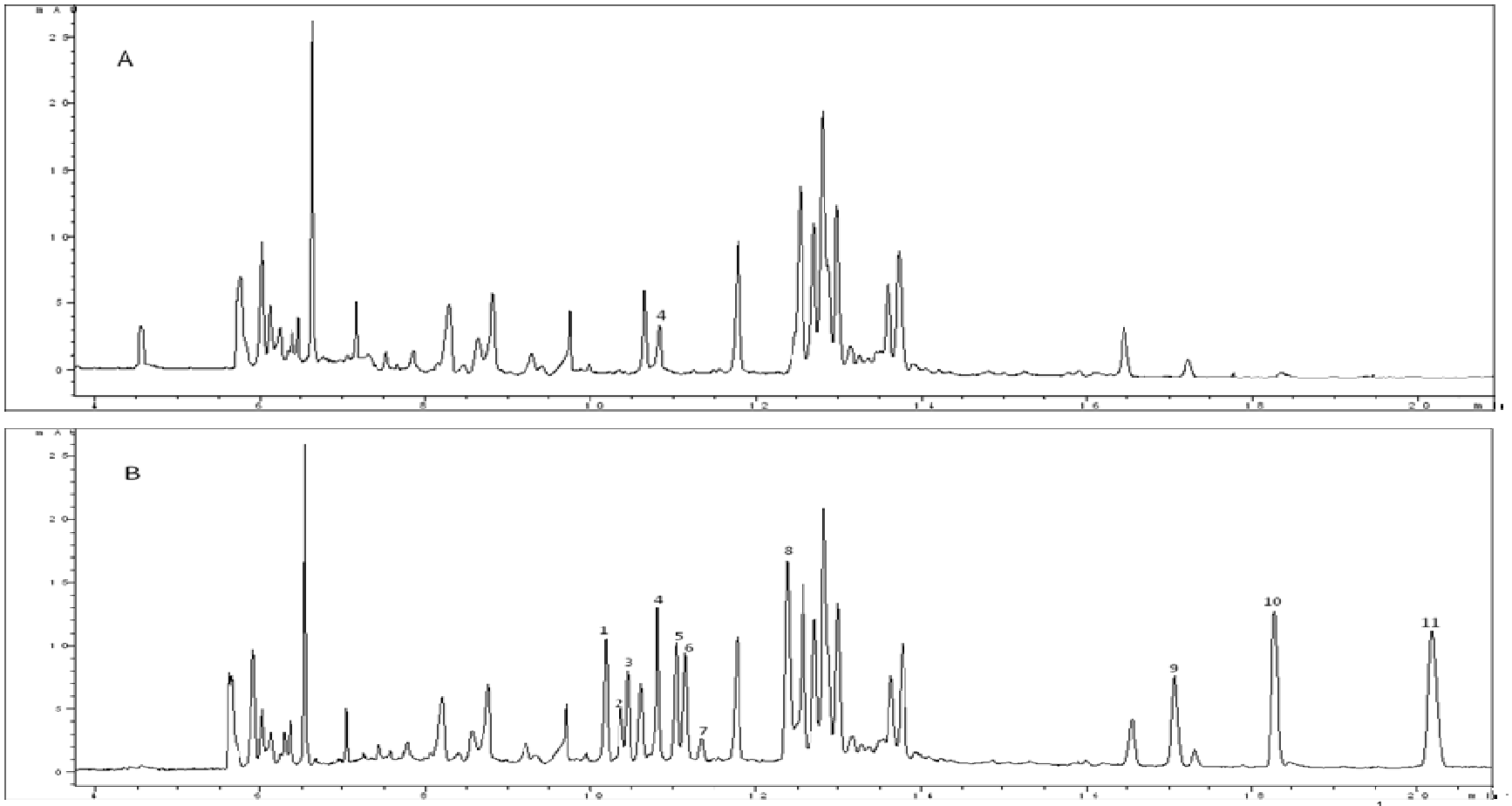


Figura 3. Eletroferogramas dos extratos aquosos hidrolisados de *Agaricus bisporus* obtidos no ponto central. Condições de análise: Tampão de 175 mmol.L^{-1} de ácido bórico, pH8,5, 25◦C, +30 kV, capilar 50 µm x 72 cm com injeção de 50 mbar durante 5 segundos e detecção em 210 nm; A= Amostra; B= Amostra fortificada; 1) Pyrrogalol, 2) Ácido Homogentísico, 3) Ácido Ferúlico, 4) Ácido Cinâmico, 5) Ácido Gentísico, 6) Ácido *p*-Cumarico, 7) Ácido Clorogênico, 8) Ácido *p*-Hidroxibenzóico, 9) Ácido Caféico, 10) Ácido Gálico, 11) Ácido 3,4-Hidroxibenzóico

Os coeficientes de regressão e os valores para a significância da regressão e ajuste dos modelos obtidos através da ANOVA podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4. Validação do modelo matemático, significância da regressão e teste para falta de ajuste.

	Regressão		Falta de Ajuste	
Resposta	MQ_R/MQ_r	$F_{9,40\ (95\%)}$	MQ_{faj}/MQ_{ep}	$F_{5,30\ (95\%)}$
Ácido Cinâmico	6,13	2,12	1,37	2,53

O tratamento estatístico indicou que o modelo quadrático não apresentou falta de ajuste para os dados uma vez que os valores de F obtidos para as respostas foram inferiores aos valores de $F_{5,30\ (95\%)}$ crítico. A regressão para o modelo quadrático foi significativa ao nível de 95% de confiança.

Os dados experimentais foram utilizados para gerar as equações polinomiais de segunda ordem e os coeficientes de regressão foram calculados, conforme resumido na Tabela 5.

Tabela 5. Coeficientes de regressão do modelo predito de segunda ordem para concentração do ácido cinâmico.

	Coeficientes de regressão
	Y_1
Intercepto, X_0	291,664
Linear:	
X_1: Tempo	1,812
X_2: Temperatura	17,327
X_3: Conc. Ácido	-10,065
Quadrático	
X_1^2: Tempo	1,305
X_2^2: Temperatura	-1,607
X_3^2: Conc. Ácido	-11,341
Interações	
X_1X_2	3,813
X_1X_3	2,011
X_2X_3	12,198

Modelos matemáticos puderam ser determinados e utilizados para gerar a superfície de resposta para obter as condições ótimas de extração e hidrólise para máxima obtenção do ácido cinâmico, de acordo com a equação abaixo.

$$\mathbf{y} = \underset{(\pm 12,2)}{291,7} + \underset{(\pm 3,33)}{1,812\,X_1} + \underset{(\pm 3,33)}{17,327\,X_2} - \underset{(\pm 3,33)}{10,065\,X_3} + \underset{(\pm 5,01)}{1,305X_1^2} - \underset{(\pm 5,01)}{1,607X_2^2} - \underset{(\pm 5,01)}{11,341X_3^2} + \underset{(\pm 4,35)}{3,813X_1X_2} + \underset{(\pm 4,35)}{2,011\,X_1X_3} + \underset{(\pm 4,35)}{12,198\,X_2X_3}$$

Onde, y corresponde à concentração do ácido cinâmico, X_1 ao tempo de extração, X_2 à temperatura de extração e X_3 à concentração de ácido clorídrico utilizada. O valor de 291,7 corresponde ao intercepto. X_1, X_2 e X_3 são os coeficientes de primeira ordem e X_1^2, X_2^2 e X_3^2 são os coeficientes de segunda ordem para estimar a curvatura, com X_1X_2, X_1X_3 e X_2X_3 representando as interações entre os termos. Os erros padrões estão entre parêntesis em baixo de cada um dos termos.

A concentração de ácido clorídrico, dentro da faixa estudada, afetou negativamente a resposta avaliada, indicando que maior quantidade de ácido cinâmico é extraída quando são utilizadas menores concentrações desse ácido.

A temperatura, dentro dos limites estudados, foi o parâmetro que mais teve efeito positivo sobre a resposta avaliada, sendo possível visualizar que o aumento linear desse parâmetro resultou em extratos com maior conteúdo de ácido cinâmico.

Ao contrário do efeito negativo quanto ao uso de ácido clorídrico, foi observado que o efeito de interação entre a temperatura e a concentração do ácido clorídrico foi um fator que afetou positivamente a resposta avaliada, apresentando-se como o efeito mais significativo depois do aumento da temperatura.

O tempo de extração, dentro dos limites estudados, foi um fator que teve pouco impacto na resposta avaliada, tanto que foi menor que o erro padrão experimental. Como o tempo de extração foi um fator que causou pouco impacto na resposta avaliada, determinou-se que o mesmo fosse o menor possível, permitido extrações mais rápidas sem que houvesse prejuízo na resposta avaliada.

Dessa maneira, a superfície de resposta foi gerada a partir do modelo obtido para cada função resposta e está representada na Figura 4.

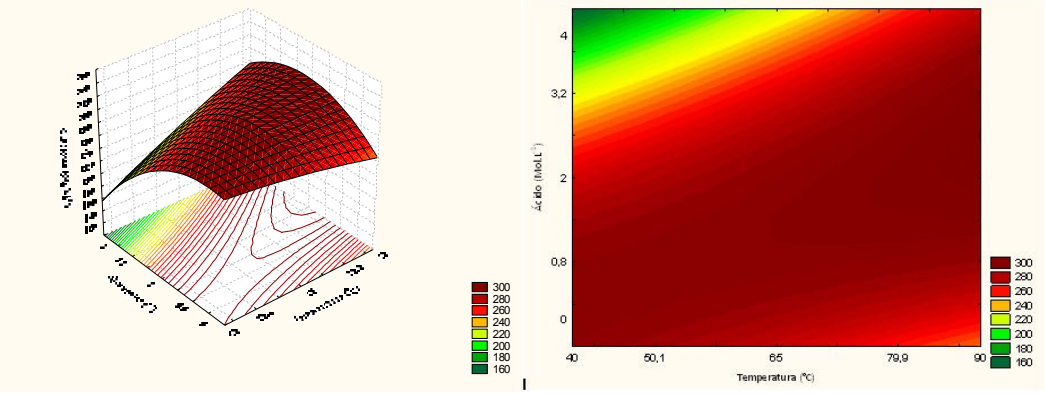


Figura 4. Superfície de resposta da concentração do ácido cinâmico em função da concentração de ácido e temperatura.

Foi possível observar que a concentração do ácido cinâmico aumentou com o aumento da temperatura, atingindo o máximo quando a temperatura encontrava-se entre 79,9 e 90 °C. Também foi possível observar que o aumento da concentração do ácido clorídrico diminui a concentração do ácido cinâmico extraído, porém, devido ao efeito de interação entre a concentração de ácido e a temperatura, notou-se que um teor maior de ácido cinâmico foi extraído quando a concentração do ácido clorídrico encontrava-se entre 2 e 2,6 mol.L^{-1} a temperatura no intervalo de 79,9 e 90 °C.

A fim de minimizar os custos de energia do processo e de reagentes, optou-se por utilizar a concentração do ácido clorídrico em 2 mol.L^{-1}, a temperatura em 79,9 °C e o tempo de extração em 30 minutos. Nestas condições de análise foi quantificado 319,59±14,57 mg.kg^{-1} de ácido cinâmico na amostra. Na mesma amostra, obtida com extração metanólica, foi encontrado 83,17±7,03 mg.kg^{-1} do mesmo composto. Este resultado evidencia que o método com extração aquosa e hidrólise ácida foi mais eficiente. Além disso, necessitou de um tempo total para extração cerca de 50 vezes menor quando comparado à extração metanólica.

Outro fator de extrema relevância se refere aos reagentes utilizados e sua consequência em relação à exposição do analista, aos custos e ao impacto ambiental. O método por extração alcoólica expõe o analista ao metanol, cuja toxicidade já foi relatada por diversos autores (CLAY et al., 1975; TEPHLY, 1991; NAGATO et al., 2001). Ainda, o custo de aquisição do metanol é superior à aquisição de ácido clorídrico, que, ainda assim, é utilizado em baixa concentração. Os resíduos contendo metanol possuem impacto ambiental negativo e conhecido, de forma que necessitam de incineração controlada para

o descarte. Isso ocasiona o aumento de custos já que requer uma estrutura específica para a queima e a contratação de recursos humanos treinados para essa atividade. No entanto, os resíduos da análise por hidrólise com ácido clorídrico necessitam apenas de neutralização, prática simples que já é realizada pelo próprio analista durante o protocolo de extração.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a viabilidade do método de eletroforese capilar para a identificação e quantificação de 11 compostos fenólicos comumente presentes em cogumelos comestíveis, técnica que apresenta baixos custos de operação e baixa geração de resíduos químicos.

Através do emprego de técnicas estatísticas multivariadas, como o planejamento composto central e a superfície de resposta, foi possível estabelecer as condições ótimas para a extração aquosa e hidrólise ácida da amostra. Esse método de extração se apresentou como uma técnica mais eficiente que a extração metanólica, com tempo de extração menor, baixo consumo de reagentes, pouca exposição do analista a solventes com elevada toxicidade, baixo custo e geração de resíduos simples com menor impacto ambiental.

5. BIBLIOGRAFIA

ANDRÉ, C. M.; LARONDELLE, Y.; EVERS, D. Dietary Antioxidants and Oxidative Stress from a Human and Plant Perspective: A Review. **Current Nutrition & Food Science**, v. 6, p. 2-12, 2010.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n1, p.232-240, 2007.

ANVISA, Resolução n°899. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos anexo, 2003.

ASUNÇÃO, N. A.; BECHARA, E. J. H.; SIMIONATO, A. V. C.; TAVARES, M. F. M.; CARRILHO, E. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS): vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2124-2133, 2008.

BADIALE-FURLONG, E.; COLLA E.; BORTOLATO, D. S.; BAISCH, A. L.; SOUZA-SOARES, L. A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Vetor**, n. 13, p. 105-114, 2003.

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

BALLUS, C. A.; MEINHART, A. D.; DE OLIVEIRA, R. G.; GODOY, H. T. Optimization of capillary zone electrophoresis separation and on-line preconcentration of 16 phenolic compounds from wines produced in South America. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 136-144, 2012.

BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; VAZ, J. A.; FERREIRA, I.; BAPTISTA, P.; ESTEVINHO, L. M. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. **European Food Research and Technology**, v. 225, p. 151–156, 2007.

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**, v. 47, p.1076–1079, 2009.

BIZZOTTO, C. S; MEINHART, A. D.; RYBKA, A. C. P; SOBRINHO, M. R.; BOGUSZ JUNIOR, S.; BALLUS, C. A.; GODOY, H. T. Quantification of phenolic compounds by capillary zone electrophoresis in extracts of four commercial types of mate herb before and after acid hydrolysis. **Food Research International**, v. 48, p. 763–768, 2012.

BONOLI, M.; MONTANUCCI, M.; TOSCHI, T. G.; LERCKER, G. Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin

olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1011, p.163-172, 2003.

CARVAJAL, A. E. S. S.; KOEHNLEIN, E. A.; SOARES, A. A.; ELER, G. J.; NAKASHIMA,A. T. A.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of Agaricus brasiliensis (A. blazei) and their antioxidant properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, P. 493–499, 2012.

CHEN, J. N.; WANG, Y. T.; WU, J. S. B. A glycoprotein extracted from golden oyster mushroom pleurotus citrinopileatus exhibiting growth inhibitory effect against U937 leukemia cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6706–6711, 2009.

CHEN, G.; ZHANG, H.; YE, J. Determination of rutin and quercetin in plants by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 423, p. 69–76, 2000.

CLAY, K. L.; MURPHY, R. C.; DAVID WATRINS, W. Experimental methanol toxicity in the primate: Analysis of metabolic acidosis. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 34, n. 1, p. 49-61, 1975.

DAÍ, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313-7352, 2010.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKY, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DORE, C.; AZEVEDO, T. C. G.; DE SOUZA, M. C. R.; REGO, L. A.; DE DANTAS, J. C. M.; SILVA, F. R. F. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of betaglucan- rich extract from Geastrum saecatum mushroom. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 1160–1169, 2007.

Food and Agriculture Organization. FAOStat: Production (faostat.fao.org) Consulta em abril, 2013.

FACCIN, L. C.; BENATI, F.; RINCAO, V. P.; Mantovani, M. S.; Soares, S. A.; Gonzaga, M. L. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from Agaricus brasiliensis against poliovirus type 1. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 24–28, 2007.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.1, p. 154-157, 2007.

GARCÍA -LAFUENTE, A.; MORO, C.; VILLARES, A.; GUILLAMÓN, E.; ROSTAGNO, M. A.; D'ARRIGO, M. Mushrooms as a source of anti-inflammatory agents. **Antiinflammatory and Anti-allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 125–141, 2010.

JAYAKUMAR, T.; THOMAS, P. A.; GERALDINE, P. In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom Pleurotus ostreatus. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10, p. 228-234, 2009.

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 363-373, 2001.

KANITSAR, K.; ARCE, L.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. Determination of phenolic constituents in citrus samples by on-line coupling of a flow system with capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 22, p. 1553–1565, 2001.

KIM, M. Y.; SEGUIN, P.; AHN, J. K.; KIM, J. J.; CHUN, S. C.; KIM, E. H.; SEO S. H.; KANG, E. Y.; KIM, S. L.; PARK, Y. J., RO, H. M., CHUNG, I. M. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7265-7270, 2008.

KUROSUMI, A.; SASAKI, C.; KUMADA, K. ;KOBAYASHI, F.; MTUI, G.; NAKAMURA, Y. Novel extraction method of antioxidant compounds from Sasa palmata (Bean) Nakai using steam explosion. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1449–1453, 2007.

LANGSETH, L. Antioxidants and their effect on health. In: SCHMIDL, M.K.; LABUZA, T.P. Essential of functional foods. Maryland: Aspen Publication, 2000.

LO, H.C.; WASSER, S.P. Medicinal mushrooms for glycemic control in diabetes mellitus: history, current status, future perspectives, and unsolved problems (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 13, n. 5, p. 401-26, 2011.

MATTILA, P.; KONKO, K.; EUROLA, M.; PIHLAVA, J. M.; ASTOLA, J.; VAHTERISTO, L.; HIETANIEMI, V.; KUMPULAINEN, J.; VALTONEN, M.; PIIRONEN, V. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2343-2348, 2001.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NAGATO, L. A. F.; DURAN, M. C.; CARUSO, M. S. F.; BARSOTTI, R. C. F.; BADOLATO, E. S. G. Monitoramento da autenticidade de amostras de bebidas alcoólicas enviadas ao instituto Adolfo Lutz em São Paulo. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, 2001.

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**, v. 128 , p. 674–678, 2011.

PUTTARAJU, N. G.; VENKATESHAIAH, S. U.; DHARMESH, S. M.; URS, S. M.; SOMASUNDARAM, R. Antioxidant Activity of Indigenous Edible Mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemmistry**, v. 54, p. 9764-9772, 2006.

RIBEIRO, B.; RANGEL, J.; VALENTÃO, P.; BAPTISTA, P.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B. Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried Portuguese wild edible mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8530-8537, 2006.

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

RIBEIRO, B.; LOPES, R.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; Gonçalves, R. F.; Baptista, P.; Quelhas, I.; Valentão, P. Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. **Food Chemistry**, v. 110, p. 47-56, 2008.

ROSEIRO, L. B.; DUARTE, L. C.; OLIVEIRA, D. L.; ROQUE, R.; BERNARDO-GIL, M. G.; MARTINS, A. I.; SEPÚLVEDA, C.; ALMEIDA, J.; MEIRELES, M.; GÍRIO, F. M.; RAUTER, A. P. Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob (Ceratonia siliqua L.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity. **Industrial Crops and Products**, v. 47, p. 132–138, 2013.

RUIZ, A.; MARDONES, C.; VERGARA, C.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; VON BAER, D.; HINRICHSEN, P.; RODRIGUEZ, R.; ARRIBILLAGA, D.; DOMINGUEZ, E. Analysis of hydroxycinnamic acids derivatives in calafate (Berberis microphylla G. Forst) berries by liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1281, p. 38–45, 2013.

SALES-CAMPOS, C., ARAUJO, L. M., MINHONI, M. T. A., ANDRADE, M. C. N. Physiochemical analysis and centesimal composition of Pleurotus ostreatus mushroom grown in residues from the Amazon. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31, p.456-461, 2011.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 287-306, 2005.

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

STALIKAS C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3268 – 3295, 2007.

TEPHLY, T. R. The toxicity of methanol. **Life Sciences**, v. 48, p. 1031-1041, 1991.

THERIAULT, M.; CAILLET, S.; KERMASHA, S.; LACROIX, M. Antioxidant, antiradical and antimutagenic activities of phenolic compounds present in maple products. **Food Chemistry**, v. 98, p. 490– 501, 2006.

TLILI, N; ELFALLEH, W.; HANNACHI, H.; YAHIA, Y.; KHALDI, A.; FERCHICHI, A.; NASRI, N. Screening of natural antioxidants from selected medicinal plants. **International Journal of Food Properties**, v. 16, p. 1117–1126, 2013.

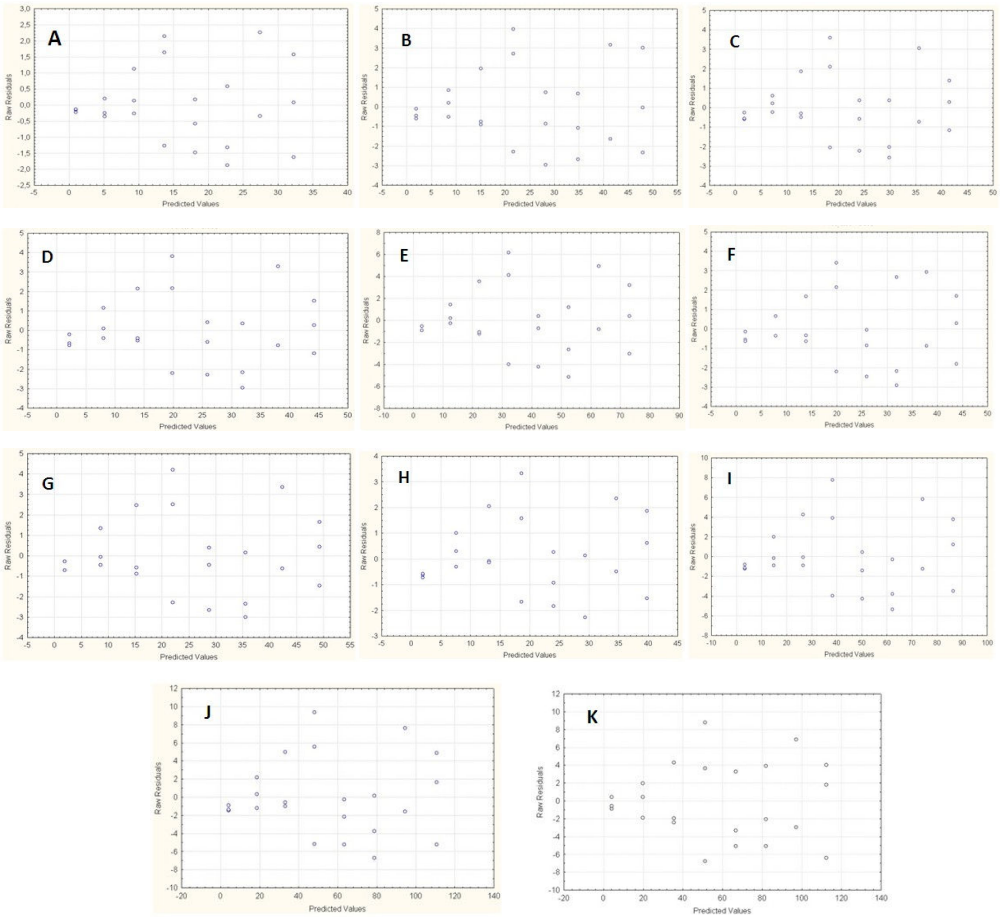
WANG, X.J.; QI, J.C.; WANG, X.; CAO, L.P. Extraction of polyphenols from barley (Hordeum vulgare L.) grain using ultrasound-assisted extraction technology. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 1324-1330, 2013.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Medicinal Properties of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspectives. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 47-50, 1999.

YALTIRAK, T.; ASLIM, B.; OZTURK, S.; ALLI, H. Antimicrobial and antioxidant activities of Russula delica Fr. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2052-2056, 2009.

YOSHINO, K.; KONDOU, Y.; ISHIYAMA, K.; IKEKAWA, T.; MATSUZAWA, T.; SANO, M. Preventive effects of 80% ethanol extracts of the edible mushroom Hypsizigus marmoreus on mouse type IV allergy. **Journal of Health Science**, v. 54, p. 76–80, 2008.

ANEXOS



Anexo 1. Gráfico de distribuição de resíduos (valores previstos versus valores observados). Identificação das figuras: A= Pirogalol; B= Ácido homogentísico; C= Ácido ferrúlico; D= Ácido cinâmico; E= Ácido gentísico; F= Ácido *p*-cumárico; G= Ácido Clorogênico; H= Ácido *p*-hidroxibenzóico; I= Ácido caféico; J= Ácido Gálico; K= Ácido 3,4-hidroxibenzóico.

PERFIL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE COGUMELOS COMESTÍVEIS PRODUZIDOS NO BRASIL.

Francisco Alberto de Souza Campos Junior[1], Mateus Henrique Petrarca[1], Adriana Dillenburg Meinhart[1] e Helena Teixeira Godoy[1]

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP: 13083-862, Campinas, SP, Brasil

RESUMO

A análise do perfil dos compostos fenólicos dos cogumelos comestíveis produzidos no Brasil foi realizada através da técnica de eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos a 210nm, utilizando extração aquosa e hidrólise. Dentre os compostos fenólicos estudados, foi possível identificar a presença dos ácidos homogentísico, *p*-cumárico e cinâmico, com teores variando entre 85 e 388,6 $mg.kg^{-1}$ para o ácido homogentísico, 23,38 e 454,07 $mg.kg^{-1}$ para o ácido cinâmico e 25,97 e 103,32 $mg.kg^{-1}$ para o ácido *p*-cumárico, em base seca. *Pleurotus ostreatus* (shimeiji branco fresco) foi único extrato que apresentou os três compostos fenólicos juntos. Foi possível observar que alterações no cultivo e o estado de maturação são parâmetros importantes que afetam o perfil dos compostos fenólicos encontrados.

Palavras-chave: cogumelos, compostos fenólicos, eletroforese capilar, estágio de maturação.

ABSTRACT

Analysis of phenolic content of edible mushrooms cultivated in Brazil was carried out by capillary zone electrophoresis with diode array detection at 210nm, using aqueous extraction and hydrolysis. It was identified homogentisic acid varied from 169.85 to 388.6; p-coumaric acid from 25.97 to 103.32 and cinnamic acid from 23.38 to 454.07, in $mg.Kg^{-1}$ of lyophilized samples. Fresh *Pleurotus ostreatus* (white shimeiji) extract was the only all three phenolic compounds. It was observed that farming conditions and maturity are important parameters affecting the phenolic content.

Keywords: mushrooms, phenolic compounds, capillary electrophoresis, maturity stage.

1. INTRODUÇÃO

Os cogumelos comestíveis são, em geral, alimentos de alto valor nutricional, com baixo teor de carboidratos e de gordura, além de possuírem significativas quantidades de proteínas. São ainda ricos em minerais e vitaminas, incluindo a tiamina, riboflavina, niacina, biotina, ácido ascórbico, e outras relacionadas ao complexo B (FURLANI, 2004; SALES-CAMPOS, et al. 2011).

A produção de cogumelos tem aumentado continuamente com o tempo. Isso se deve à alta demanda e ao aumento da conscientização do consumidor sobre os benefícios dos cogumelos à saúde (AIDA, et al., 2009). Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization) em 1995, a produção mundial foi de 2,0 milhões de toneladas; em 2005, aumentou para 3,3 milhões de toneladas e em 2011 a produção mundial de cogumelos foi de mais de 7 milhões de toneladas.

Os cogumelos são considerados como agentes antitumorais, antibacterianos, antivirais, agentes hematológicos e utilizados em tratamentos imunomoduladores. Também foi verificado possuírem capacidade antioxidante significativa (KIM, et al., 2008; PALACIOS, et al. 2011; HUNG & NIH, 2012; YIM, et al., 2012).

Antioxidantes funcionam como sequestradores de radicais livres e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os antioxidantes encontrados em cogumelos são principalmente compostos fenólicos (SOARES, 2002).

Os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Existem cerca de cinco mil fenóis já relatados, dentre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (ANGELO & JORGE, 2007). Em fontes naturais os compostos fenólicos são principalmente encontrados esterificados com pequenas moléculas como o ácido quínico ou o ácido tartárico, bem como ligados a componentes estruturais da parede celular como celulose, lignina e proteínas através de ligações ésteres (LIU, 2004).

Diversos autores tem trabalhos publicados identificando os fenólicos em muitas espécies de cogumelos, cultivados em diferentes países, principalmente da Finlândia (MATTILA et al., 2001), Índia (JAYAKUMAR et al., 2009; PUTTARAJU et al., 2006), Coréia do

Sul (KIM et al, 2008), Portugal (BARROS et al., 2009;. RIBEIRO et al, 2006, 2007, 2008), Espanha (PALACIUS et al., 2011) e Turquia (YALTIRA et al., 2009).

O único estudo encontrado dentre a literatura consultada que caracteriza o perfil de compostos fenólicos de uma espécie de cogumelo produzida no Brasil foi desenvolvido por Carvajal et al. (2012), o qual identificou 3 compostos fenólicos presentes em amostras de *Agaricus brasiliensis.*

Devido à falta de estudos que caracterizam o perfil de compostos fenólicos presentes em cogumelos comestíveis produzidos no Brasil, esse trabalho teve como objetivo investigar o perfil fenólico de 4 espécies de cogumelos comestíveis (*Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus, Pleurotus ostreatoroseus* e *Lentinula edodes*) produzidas no Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Os padrões de pirogalol, ácido homogentísco, ácido ferúlico, ácido cinâmico, ácido gentísco, ácido *p*-cumárico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido caféico, ácido gálico e ácido 3,4-hidroxibenzóico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). O padrão do ácido clorogênico foi adquirido da Biopurify phytochemicals Ltd. (Chengdu, China).

Também foram utilizados metanol p.a. (Synth, Brasil), metanol grau HPLC (J. T. Baker, EUA), ácido bórico (Ecibra, Brasil), hidróxido de sódio p.a. (Synth, Brasil), ácido clorídrico p.a. (Synth, Brasil). A água ultrapura foi obtida do sistema Direct Q3 UV (Millipore Corporation, France).

Todas as soluções foram degaseificadas em ultrassom (Microsonic SX-20, Arruda Ultra-sons LTDA, Brasil) antes da injeção.

As soluções estoque com 1000 $mg.L^{-1}$ dos padrões foram preparadas em metanol:água (10:90), filtradas em membrana de 0,45 µm, armazenadas a –18°C e protegidas da luz.

2.2. Amostras

As amostras de Champignon de Paris (*Agaricus bisporus* branco), Portobello (*Agaricus bisporus* marrom), Salmon (*Pleurotus ostreatoroseus*), Shimeji (*Pleurotus ostreatus*), Hiratake (*Pleurotus ostreatus*) e Shiitake (*Lentinula edodes*) foram fornecidas por uma empresa localizada na região de Campinas – SP, Brasil, em dois períodos distintos, Fevereiro de 2011 e Junho de 2011. Foram obtidos 3 lotes, com 600 gramas cada um, de cada amostra para cada um dos períodos de cultivo. Uma vez coletadas, as amostras foram congeladas, liofilizadas, trituradas em um moinho analítico da marca Ika (modelo A11 Basic Mill), acondicionadas em embalagens de polipropileno e armazenadas em freezer até o momento das análises. Detalhes das amostras utilizadas podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Amostras, formas de comercialização e substrato utilizado no cultivo.

Amostra	Forma de Comercialização	Substrato
Agaricus bisporus branco (Champignon de Paris)	Fresco	Composto
Agaricus bisporus branco (Champignon de Paris)	Conserva	Composto
Agaricus bisporus branco (Portobello)	Fresco	Composto
Pleurotus ostreatus* (Shimeji)	Fresco	Composto
Pleurotus ostreatus (Shimeji)	Seco (ao sol)	Composto
Pleurotus ostreatus* (Hiratake)	Fresco	Composto
Pleurotus ostreatoroseus (Salmon)	Fresco	Composto
Lentinula edodes (Shiitake)	Fresco	Tora de eucalipto
Lentinula edodes (Shiitake)	Fresco	Composto à base de serragem e resíduos da agroindústria

*Os cogumelos Shimeji e Hiratake são ambos *Pleurotus ostreatus*, diferindo apenas no estágio de maturação. Enquanto o Hiratake é colhido com o chapéu aberto (maturo) o Shimeji é colhido com o chapéu fechado (imaturo).

2.3. Instrumentação

O equipamento utilizado foi um sistema de eletroforese capilar Agilent G1600AX (Agilent Technologies, Germany), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), injetor automático e sistema de controle de temperatura ajustado em 25°C. Utilizou-se um capilar de sílica fundida com 50 µm de diâmetro interno por 72 cm de comprimento efetivo, com bulbo estendido (Agilent Technologies, Germany). A detecção foi realizada a 210 nm. A análise e o tratamento dos dados foram realizados no software HP ChemStation.

2.4. Preparo da Amostra

Para a obtenção dos extratos aquosos e hidrólise dos cogumelos, foi utilizado um sistema composto de um banho de aquecimento com um refluxador de bolas acoplado, onde 0,3 g de amostra liofilizada e moída foi extraída com 6 ml da solução aquosa com ácido clorídrico a 2 $mol.L^{-1}$ por 30 minutos a 79,9°C, segundo método de CAMPOS JUNIOR (2013).

Uma vez recolhido, cada extrato foi filtrado com papel de filtro comum, o pH foi ajustado para um intervalo entre 6-7 com uma solução de hidróxido de sódio, o volume foi ajustado para 25 mL, filtrados com Milex (Millipore) 0,45 µm e armazenados em freezer até o momento da análise.

2.5. Análise por eletroforese capilar

Foi utilizado o método proposto por CAMPOS JUNIOR (2013) e validado para a análise de compostos fenólicos em cogumelos.

A metodologia utilizou a técnica de eletroforese capilar de zona como modo de separação dos compostos fenólicos em cogumelos. A separação foi realizada em capilar de 50 µm de diâmetro interno por 72 cm de comprimento, eletrólito contendo 175 $mmol.L^{-1}$ de ácido bórico, pH 8,5, com temperatura de 25°C, voltagem de 30kV, injeção de 50 mbar durante 5 segundos e detecção em 210 nm. O tempo de cada corrida eletroforética foi de 21 min.

A identificação foi feita através da comparação entre os eletroferogramas das amostras e o eletroferograma do pool de padrões. Essa comparação foi realizada com base nos tempos de retenção, espectro de absorção e adição de padrões á amostra.

O teor dos compostos fenólicos das amostras foi avaliado através da análise variância (ANOVA) e as médias comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), usando o programa Statistica 7.0 (Statsoft, USA).

Os capilares novos foram ativados e condicionados por lavagem com pressão de 1 bar, usando uma solução de aquosa de NaOH 1 $mol.L^{-1}$ durante 30 min, seguido de 10 min de água e 30 minutos de solução tampão. No início de cada análise, o capilar foi condicionado durante 1 min com NaOH 1 $mol.L^{-1}$, espera de 0,5 min, seguido de 1 min com água purificada em sistema Milli-Q, 1 min de eletrólito, espera de 1 min e novamente 1 min de eletrólito. No final do dia foi realizada uma limpeza do capilar com lavagem por 5 min com NaOH 1 $mol.L^{-1}$ e 5 min de água Milli-Q. O capilar foi armazenado em água durante a noite.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

No presente trabalho foi possível a identificação de 3 compostos fenólicos (ácido homogentísico, ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico), dentre os 11 estudados, nas amostras avaliadas. O cogumelo Shimeji fresco (*Pleurotus ostreatus*) foi o único que apresentou os três compostos simultaneamente. Os cogumelos Shimeji seco (*Pleurotus ostreatus*) e Shiitake (*Lentinula edodes*), cultivado em tora, apresentaram dois dos compostos fenólicos estudados (ácido homogentísico e ácido cinâmico). Os cogumelos Hiratake (*Pleurotus ostreatus*) e Salmon (*Pleurotus ostreatoroseus*) apresentaram dois dos compostos fenólicos estudados (ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico). Já os cogumelos Champignon de Paris freso e em conserva (*Agaricus bisporus* branco), Portobello (*Agaricus bisporus* marrom) e Shiitake (*Lentinula edodes*) cultivado em composto apresentaram apenas o ácido cinâmico dentre os compostos fenólicos estudados.

Na Figura 1 são apresentados dois eletroferogramas obtidos para os padrões e para uma amostra de Shimeji fresco (*Pleurotus ostreatus*).

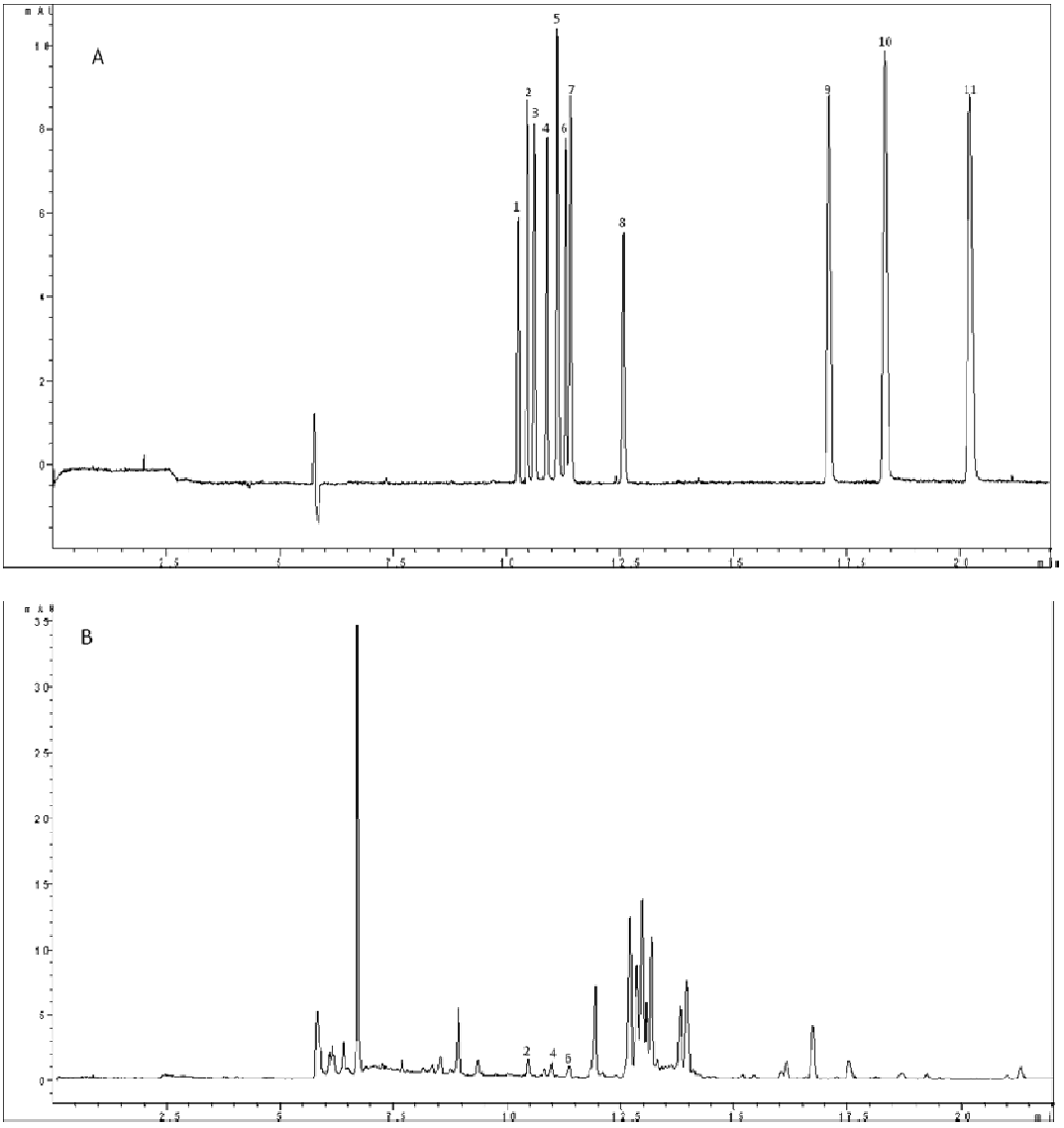


Figura1. Separação de compostos fenólicos. Condições de análise: Tampão de 175 mmol.L-1 de ácido bórico, 25ºC, 30kV, capilar 50µm x 72 com injeção de 50 mbar durante 5 segundos e detecção em 210nm. Identificação dos picos: 1) Pirogalol, 2) Ácido Homogentísico, 3) Ácido Ferúlico, 4) Ácido Cinâmico, 5) Ácido Gentísico, 6) Ácido *p*-Cumparico, 7) Ácido Clorogênico, 8) Ácido *p*-Hidroxibenzóico, 9) Ácido Caféico, 10) Ácido Gálico, 11) Ácido 3,4-Hidroxibenzóico. (A) Mistura de padrões dos compostos fenólicos (B) Extrato de Shimeji branco fresco (Pleurotus ostreatus).

Os resultados de quantificação obtidos são apresentados nas Tabelas 3 e 4. De acordo com os resultados pode-se observar uma grande variação do teor dos compostos fenólicos entre os três lotes analisados para cada tipo de cogumelo, assim como entre as duas diferentes épocas de colheita. Estas variações podem ser devidas às espécies de cogumelos, às estirpes escolhidas, ao tipo de substrato utilizado, ao grau de maturação, ao tipo de armazenamento e às partes analisadas, mesmo os cogumelos sendo cultivados em condições muito controladas.

Tabela 3. Concentração dos compostos fenólicos presente nos extratos de cogumelos produzidos em fevereiro.

Compostos Fenólicos (mg.kg^{-1})				
Espécies	**Lote**	**Produção Fevereiro**		
		Ácido Homogentísico	**Ácido Cinâmico**	**Ácido *p*-Cumárico**
Champignon de Paris Fresco (*Agaricus bisporus branco*)	1	nd	216,67 ± 19,56^{a}	nd
	2	nd	263,62 ± 24,76^{a,b}	nd
	3	nd	348,83 ± 67,99^{b}	nd
Média		nd	276,37 ± 66,99^{B,C}	nd
Portobello (*Agaricus bisporus* marrom)	1	nd	264,93 ± 9,27^{a}	nd
	2	nd	417,89 ± 6,12^{a,b}	nd
	3	nd	368,18 ± 85,64^{b}	nd
Média		nd	350,33 ± 78,02^{C}	nd
Shimeji branco fresco (*Pleurotus ostreatus*)	1	254,58 ± 14,51^{b}	85,67 ± 1,51^{a}	87,76 ± 6,61^{a}
	2	294,65 ± 20,87^{c}	96,84 ± 17,72^{a}	80,89 ± 2,54^{a}
	3	195,94 ± 3,99^{a}	194,7 ± 13,79^{b}	87,23 ± 9,19^{a}
Média		248,39 ± 49,64^{A}	125,73 ± 59,98^{A}	85,29 ± 3,82^{A}
Shimeji branco seco (*Pleurotus ostreatus*)	1	198,72 ± 17,3^{a}	104,15 ± 3,37^{a}	nd
	2	249,74 ± 14,76^{a,b}	102,83 ± 7,83^{a}	nd
	3	317,07 ± 44,41^{b}	131,73 ± 19,17^{a}	nd
Média		255,18 ± 59,36^{A}	112,90 ± 16,32^{A}	nd
Hiratake (*Pleurotus ostreatus*)	1	nd	113,24 ± 11,8^{a}	103,32 ± 19,93^{a}
	2	nd	121,47 ± 13,87^{a}	74,06 ± 10,07^{a}
	3	nd	143,48 ± 28,11^{a}	82,65 ± 12,15^{a}
Média		nd	126,06 ± 15,63^{A,B}	86,68 ± 15,04^{A}
Salmon (*Pleurotus ostreatoroseus*)	1	nd	148,16 ± 8,97^{a}	46,6 ± 1,14^{a}
	2	nd	149,72 ± 20,99^{a}	39,62 ± 6,01^{a}
	3	nd	154,23 ± 3,65^{a}	58,73 ± 3,04^{b}
Média		nd	150,70 ± 3,15^{A,B}	48,32 ± 9,67^{B}
Shiitake de tora (*Lentinula edodes*)	1	170,56 ± 24,14^{a}	64,47 ± 5,72^{a}	nd
	2	169,85 ± 5,07^{a}	84,13 ± 9,19^{b}	nd
	3	388,60 ± 23,00^{b}	203,71 ± 3,17^{c}	nd
Média		243,00 ± 126,09^{A}	117,44 ± 75,36^{A}	nd
Shiitake de composto (*Lentinula edodes*)	1	nd	nq	nd
	2	nd	89,01 ± 8,54^{a}	nd
	3	nd	87,03 ± 4,67^{a}	nd
Média		nd	na	nd
Champignon de Paris conserva (*Agaricus bisporus branco*)	1	nd	nq	nd
	2	nd	nq	nd
	3	nd	117,73 ± 8,53	nd
Média		nd	na	nd

Resultados expressos em base seca como média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes para o mesmo composto em uma mesma linha, para o mesmo cogumelo, representam médias com diferença significativa a 95% de confiança. Letras maiúsculas diferentes para o mesmo composto, em uma mesma coluna, representam diferença estatística significativa em um nível de 95% de confiança. nd = não detectado, nq = não quantificado, na = não aplicável.

Tabela 4. Concentração dos compostos fenólicos presente nos extratos de cogumelos produzidos em junho.

Compostos Fenólicos (mg.kg^{-1})				
Espécies	**Lote**	**Produção Junho**		
		Ácido Homogentísico	**Ácido Cinâmico**	**Ácido *p*-Cumárico**
Champignon de Paris Fresco (*Agaricus bisporus branco*)	1	nd	318,46 ± 28,87^{a}	nd
	2	nd	281,37 ± 30,90^{a}	nd
	3	nd	403,44 ± 6,43^{b}	nd
Média		nd	334,42 ± 62,58^{C,D}	nd
Portobello (*Agaricus bisporus* marrom)	1	nd	290,48 ± 29,68^{a}	nd
	2	nd	454,07 ± 1,91^{b}	nd
	3	nd	440,42 ± 25,24^{b}	nd
Média		nd	394,99 ± 90,77^{D}	nd
Shimeji branco fresco (*Pleurotus ostreatus*)	1	358,86 ± 24,79^{a}	186,15 ± 17,54^{b}	45,84 ± 10,48
	2	320,20 ± 7,17^{a}	116,54 ± 6,94^{a,A}	nq
	3	199,24 ± 12,66^{b}	102,02 ± 7,82^{a,A}	nq
Média		292,77 ± 83,27^{A}	134,90 ± 44,97^{A,B}	na
Shimeji branco seco (*Pleurotus ostreatus*)	1	294,55 ± 1,52^{a}	174,95 ± 31,46^{a}	nd
	2	349,04 ± 47,9^{a}	106,28 ± 11,67^{b}	nd
	3	174,04 ± 17,96^{b}	170,5 ± 18,31^{a}	nd
Média		272,54 ± 89,55^{A}	150,58 ± 38,43^{A,B}	nd
Hiratake (*Pleurotus ostreatus*)	1	nd	152,25 ± 8,11^{a}	nq
	2	nd	159,46 ± 31,19^{a}	nq
	3	nd	146,5 ± 6,97^{a}	29,48 ± 2,86
Média		nd	152,74 ± 6,49^{A,B}	na
Salmon (*Pleurotus ostreatoroseus*)	1	nd	178,02 ± 22,71^{a}	nq
	2	nd	272,97 ± 14,21^{b}	31,29 ± 4,71^{a}
	3	nd	177,35 ± 0,10^{a}	25,97 ± 7,06^{a}
Média		nd	209,45 ± 55,01^{B,C}	na
Shiitake de tora (*Lentinula edodes*)	1	257,31 ± 31,01^{a}	116,7 ± 15,11^{a}	nd
	2	223,84 ± 26,58^{a}	45,28 ± 3,1^{b}	nd
	3	231,64 ± 20,17^{a}	116,47 ± 9,06^{a}	nd
Média		237,60 ± 17,51^{A}	92,82 ± 41,17^{A,B}	nd
Shiitake de composto (*Lentinula edodes*)	1	nd	85,23 ± 4,44^{a}	nd
	2	nd	54,64 ± 3,99^{b}	nd
	3	nd	53,88 ± 2,50^{b}	nd
Média		nd	64,58 ± 17,88^{A}	nd
Champignon de Paris conserva (*Agaricus bisporus branco*)	1	nd	23,38 ± 1,61^{a}	nd
	2	nd	35,08 ± 7,30^{b}	nd
	3	nd	nq	nd
Média		nd	na	nd

Resultados expressos em base seca como média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes para o mesmo composto em uma mesma linha, para o mesmo cogumelo, representam médias com diferença significativa a 95% de confiança. Letras maiúsculas diferentes para o mesmo composto, em uma mesma coluna, representam diferença estatística significativa em um nível de 95% de confiança. nd = não detectado, nq = não quantificado, na = não aplicável.

Os teores dos compostos fenólicos encontrados variaram entre 169,85 e 388,6 $mg.kg^{-1}$ para o ácido homogentísico, entre 23,38 e 454,07 $mg.kg^{-1}$ para o ácido cinâmico e entre 25,97 e 103,32 $mg.kg^{-1}$ para o ácido *p*-cumárico, em base seca, nas duas épocas de coleta realizadas.

Os cogumelos Shimeji fresco, Shimeji seco e Shiitake cultivados em tora, produzido nos dois períodos analisados, nos quais foi possível a quantificação do ácido homogentísico, apresentaram, em média, teores estatisticamente iguais ($p \geq 0,05$). Em média, os cogumelos Portobelo e Champignon de Paris fresco produzido nos dois períodos analisados, nos dois períodos analisados, foram os que apresentaram os maiores teores de ácido cinâmico, já o cogumelo Shiitake cultivado em composto e o Shiitake cultivado em tora, produzidos no mês de Junho, apresentaram, em media, os menores teores de ácido cinâmico.

Nas amostras de cogumelos produzidas em fevereiro foi possível observar que os cogumelos Shimeji branco fresco e Hiratake apresentam, em média, maiores teores de ácido *p*-cumárico, já o cogumelo Salmon apresentou no mesmo período de produção, em média, os menores teores para o ácido *p*-cumárico. A mesma análise não pôde ser feita para as amostras produzidas em junho, pois houve uma grande variação nos teores de ácido *p*-cumárico encontrados entre os lotes analisados.

O tipo de substrato no qual os cogumelos foram cultivados demonstrou ter efeito na composição dos compostos fenólicos encontrados. Em amostras de cogumelos Shiitake, produzidas no mesmo período do ano, foi possível observar que quando foram cultivadas em toras foi possível a quantificação do ácido homogentísico, no entanto, quando foram cultivadas em compostos à base de serragem e resíduos da agroindústria, não foi possível a identificação desse ácido fenólico.

Foi observado também o efeito no grau de maturação nas espécies analisadas. Nos cogumelos colhidos em estágio imaturo (Shimeji) foi possível a detecção do ácido homogentísico, já em cogumelos colhidos em estágio maturo (Hiratake) não foi possível identificar a presença desse mesmo composto fenólico.

A forma de comercialização dos cogumelos (seco, fresco ou em conserva) teve pouca influência no teor dos compostos analisados, sendo que o teor dos ácidos homogentísico e cinâmico encontrados nos cogumelos Shimeji fresco e Shimeji seco foram estatisticamente iguais. Em amostras de Champignon de Paris em conserva, devido ás altas variações encontradas no teor do ácido cinâmino entre os lotes estudados, não foi possível observar diferenças na composição e teor do composto fenólico estudado.

Não foram encontrados, dentre a literatura consultada, estudos que relacionam o perfil de compostos fenólicos com a composição do substrato no qual os cogumelos são produzidos, nem efeitos relacionados à forma de comercialização dos cogumelos. Carvajal et al. (2012) analisaram amostras do cogumelo *Agaricus brasiliensis* e observaram que o grau de maturação, assim como disposto no presente trabalho, interfere quantitativamente nos teores dos compostos fenólicos encontrados.

Vaz et al. (2011) analisaram o perfil de compostos fenólicos de 17 diferentes espécies de cogumelos coletadas em Portugal e observaram a presença de ácido cinâmico com teores entre 0,4 e 46 $mg.kg^{-1}$, valores inferiores aos encontrados no presente estudo, e ácido *p*-cumárico com teores entre 8,65 e 79,34 $mg.kg^{-1}$, equivalentes aos valores encontrados.

Mattila et al. (2001) estudaram extratos do cogumelo Champignon de Paris (*Agaricus bisporus* branco), Portobelo (*Agaricus bisporus* marrom) e Shiitake (*Lentinula edodes*) produzidos na Finlândia obtidos com o emprego de hidrólise enzimática e ácida. Foram encontrados, além do ácido cinâmico, o ácido *p*-hidroxibenzóico e o ácido caféico, com teores, em base seca, entre 1,47 e 2,69 $mg.kg^{-1}$, 0,51 a 7,9 $mg.kg^{-1}$ e <0,5 a 0,82 $mg.kg^{-1}$, respectivamente. Os teores encontrados para o ácido cinâmico foram inferiores aos encontrados no presente trabalho. Além disso, os ácidos *p*-hidroxibenzóico e caféico não foram identificados nas amostras produzidas no Brasil. Kim et al. (2008) também estudaram extratos dos cogumelo Champignon de Paris (*Agaricus bisporus* branco) e Shiitake (*Lentinula edodes*) produzidos na Coreia do Sul. Nesse estudo foi possível identificar os ácidos gálico e pirogalol. Os ácidos cinâmico e homogentísico também foram investigados, mas não foram identificados. Esse resultado diferiu dos dados encontrados no presente estudo, uma vez que nas amostras produzidas no Brasil, não foram detectados o pirogalol e o ácido gálico, mas os ácidos homogentísico e cinâmico foram detectados e quantificados.

Barros et al. (2009) também identificaram, em amostras de *Agaricus bisporus* produzidos em Portugal, a presença de ácido *p*-hidroxibenzóico, resultado que novamente difere das amostras analisadas no presente estudo.

Palacios et al. (2011) analisaram o perfil de compostos fenólicos de 8 espécies de cogumelos selvagens cultivadas e coletadas em diversas regiões da Espanha e identificaram o ácido homogentísico, com teores variando ente 340 e 3444 $mg.kg^{-1}$, em base seca, valores compatíveis com os do presente estudo quando consideradas as espécies que apresentam teores mais baixos. Palacios et al. (2011) também identificaram e quantificaram o ácido *p*-cumárico, com teores entre 0,87 e 11,15 $mg.kg^{-1}$, valores inferiores aos encontrados nas

amostras analisadas nesse estudo. Além disso, verificaram a presença de ácido caféico, ácido clorogênico, ácido ferrúlico, ácido gálico e pirogalol em amostras de *Agaricus bisporus* e *Pleurotus ostreatus,* resultado distinto do presente estudo, no qual não foram encontrados esses compostos.

4. CONCLUSÃO

Dentre os 11 compostos fenólicos estudados, três (ácido homogentísico, ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico) foram identificados em extratos de cogumelos produzidos no Brasil.

O estado de maturação e meio de cultivo dos cogumelos foram fatores que influenciaram no perfil de compostos fenólicos presentes em cogumelos.

Em cogumelos colhidos no estágio imaturo foi possível a detecção do ácido homogentísico não sendo possível identificar o mesmo composto em cogumelos colhidos no estágio maturo. Em amostras de cogumelos em conserva não foi possível e identificação do ácido homogentísico, quando comparados com as amostras frescas e secas.

Estes resultados indicam que a produção brasileira de cogumelos pode ser otimizada de forma a empregar condições de cultivo e colheita que proporcionem cogumelos com maior teor desses compostos.

5. BIBLIOGRAFIA

AIDA, F.M.N.A.; SHUHAIMIA, M.; YAZID M.; MAARUF, A.G. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 567-575, 2009.

ANGELO, P.M., JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão; **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

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**, v. 47, p. 1076–1079, 2009.

CAMPOS JUNIOR, F. A. S. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2013.

CARVAJAL, A. E. S. S.; KOEHNLEIN, E. A., SOARES, A. A., ELER, G. J., NAKASHIMA,A. T. A., BRACHT, A., PERALTA, R. M. Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of Agaricus brasiliensis (A. blazei) and their antioxidant properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 493–499, 2012.

Food and Agriculture Organization. FAOStat: Production (faostat.fao.org) Consulta em abril, 2013.

FURLANI, R. P. Z. **Valor nutricional de cogumelos cultivados no Brasil**. Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-graduação do Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas/ UNICAMP, 2004.

HUNG, P. V.; NHI, N. N. Y. Nutritional composition and antioxidant capacity of several edible mushrooms grown in the Southern Vietnam. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 2, p. 611-615, 2012.

YIM, H. S.; CHYE, F. Y.; KOO, A. M.; MATANJUN, P.; HOW, S. E.; HO, C. W. Optimization of extraction time and temperature for antioxidant activity of edible wild mushroom, Pleurotus porrigens. **Food and bioproducts processing**, v. 90, p. 235–242, 2012.

JAYAKUMAR, T.; THOMAS, P. A.; GERALDINE, P. In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom Pleurotus ostreatus; **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 228-234, 2009.

KIM, M. Y.; SEGUIN, P.; AHN, J. K.; KIM, J. J.; CHUN, S. C.; KIM, E. H.; SEO S. H.; KANG, E. Y.; KIM, S. L.; PARK, Y. J.; RO, H. M.; CHUNG, I. M. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7265-7270, 2008.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in câncer prevention: mechanism of action. **Journal Nutrition**, v. 134, p. 3479S-3485S, 2004.

MATTILA, P.; KONKO, K.; EUROLA, M.; PIHLAVA, J. M.; ASTOLA, J.; VAHTERISTO, L.; HIETANIEMI, V.; KUMPULAINEN, J.; VALTONEN, M.; PIIRONEN, V. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2343-2348, 2001.

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**, v. 128, p. 674–678, 2011.

PUTTARAJU, N. G.; VENKATESHAIAH, S. U.; DHARMESH, S. M.; URS, S. M.; SOMASUNDARAM, R. Antioxidant Activity of Indigenous Edible Mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemmistry**, v. 54, p. 9764-9772, 2006.

RIBEIRO, B.; RANGEL, J.; VALENTÃO, P.; BAPTISTA, P.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B. Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried Portuguese wild edible mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8530-8537, 2006.

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

RIBEIRO, B.; LOPES, R.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; Gonçalves, R. F.; BAPTISTA, P.; QUELHAS, I.; VALENTÃO, P. Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. **Food Chemistry**, v. 110, p. 47-56, 2008.

SALES-CAMPOS, C., ARAUJO, L. M., MINHONI, M. T. A., ANDRADE, M. C. N. Physiochemical analysis and centesimal composition of Pleurotus ostreatus mushroom grown in residues from the Amazon. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31, p.456-461, 2011.

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

VAZ, J. A.; BARROS, L.; MARTINS, A.; MORAIS, J. S.; VASCONCELOS, M. H.; FERREIRA, I. C. F. R. Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 343-346, 2011.

YALTIRAK, T.; ASLIM, B.; OZTURK, S.; ALLI, H. Antimicrobial and antioxidant activities of Russula delica Fr. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2052-2056, 2009.

CONCLUSÃO GERAL

A metodologia analítica que foi desenvolvida para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes em cogumelos demonstrou ser uma metodologia atrativa, uma vez que combina baixos custos de operação, mínima geração de resíduos químicos com baixo impacto ambiental e tempos de análise mais curtos se comparados com os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência comumente utilizada para a identificação e quantificação de compostos fenólicos.

Através do emprego de técnicas estatísticas multivariadas, como o planejamento composto central e a superfície de resposta, foi possível estabelecer as condições ótimas para a extração aquosa e hidrólise ácida da amostra. A extração aquosa e hidrólise, em comparação com a metodologia descrita em literatura que utiliza metanol para a extração, demonstrou ser superior quando comparam-se o teor dos compostos fenólicos extraídos e o tempo total de extração, sendo este cerca de 50 vezes menor.

Dentre os onze compostos fenólicos investigados, três foram identificados (ácido homogentísico, ácido *p*-cumárico e ácido cinâmico) nos extratos dos cogumelos, com predominância do ácido cinâmico.

Foi verificado que o estado de maturação e meio de cultivo dos cogumelos são fatores que estão relacionados com o perfil de compostos fenólicos presentes nos cogumelos, interferindo qualitativamente no perfil dos compostos fenólicos analisados.