

**Sofia Cristina Nunes Ricardo**

**Quantificação do teor de ergosterol por HPLC-UV e  
determinação da actividade antioxidante no cogumelo  
*Pleurotus ostreatus* comercializado e cultivado em borras de  
café e palha de trigo**

**Coimbra**

**2013**

**Sofia Cristina Nunes Ricardo**

**Quantificação do teor de ergosterol por HPLC-UV e  
determinação da actividade antioxidante no cogumelo  
*Pleurotus ostreatus* comercializado e cultivado em borras de  
café e palha de trigo**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Farmácia da Universidade de Coimbra  
para a obtenção do grau de Mestre em  
Segurança Alimentar sob a orientação da  
Professora Doutora Maria Conceição  
Castilho e da Doutora Ana Sanches Silva.

**Coimbra**

**2013**

*“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”*

Leonardo Da Vinci.

*Aos meus Pais e Irmãos, em especial à Patrícia;  
a todos aqueles que me acompanharam e me deram força  
para continuar.*

## AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Conceição Castilho, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, o meu agradecimento por me ter proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho, pelos ensinamentos transmitidos e pelo tempo generosamente despendido desde o início das actividades experimentais.

À Doutora Ana Sanches Silva, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, a quem coube a co-orientação desta dissertação, agradeço o apoio na concretização deste projecto, orientação técnico-científica, disponibilidade, atenção e pelo conhecimento transmitido, os quais foram fundamentais para a realização deste estudo.

À Doutora Maria Antónia Calhau, coordenadora do Departamento de Alimentação e Nutrição, à Doutora Helena Soares Costa, responsável pela Unidade de Investigação & Desenvolvimento, e ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge que possibilitaram a concretização de parte deste trabalho.

Ao Professor Doutor Fernando Ramos, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pelo apoio técnico-científico prestado.

Agradeço a toda equipa do Laboratório de Bromatologia e Nutrição da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por toda a colaboração durante toda actividade experimental e que tornaram este trabalho possível.

À Patrícia Ricardo, à Rute Gomes, à Patrícia Vicente, à Diana Lourenço, à Andreia Vicente e ao Ricardo Pereira pelas longas horas de companhia, amizade e entreaajuda.

Aos meus amigos que se mostraram interessados, dispostos em ajudar-me e tiveram sempre uma palavra de ânimo.

Aos meus pais e irmãos o meu profundo agradecimento por todo o apoio, compreensão e por nunca terem deixado de acreditar em mim.

## ABREVIATURAS

- ABTS** - Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
- AGS** - Ácidos gordos saturados
- ATP** - Adenosina trifosfato
- BHA** - Butil hidroxianisol
- BHT** - Butil hidroxitolueno
- CBG** - Cogumelo cultivado em borras de café
- CBP** - Cogumelo cultivado em borras de café e papelão
- CES** - Cogumelo enlatado (origem Portugal)
- CFE** - Cogumelo comercializado (origem Espanha)
- CFP** - Cogumelo comercializado (origem Portugal)
- CPG** - Cogumelo cultivado em palha de trigo
- CSD** - Cogumelo *Lentinula edodes* comercializado desidratado (origem China).
- DAD** - Detector de diodos (Diode-Array Detection)
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- DPPH•** - Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
- EFSA** - Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (European Food Safety Authority)
- ET** - Transferência de electrões (Electron Transfer)
- FDA** - Administração da Alimentação e Drogas (Food and Drugs Administration)
- FRAP** - Poder redutor férrico (Ferric Reducing Antioxidant Power)
- GC-FID** - Cromatografia gasosa com detector de Ionização de chama (Gas Chromatography - Flame Ionization Detector)
- HAT** - Transferência de átomos de hidrogénio (Hydrogen Atom Transfer)
- HPLC** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High-Performance Liquid Chromatography)
- ICH** - Conferência Internacional de Harmonização (International Conference on Harmonization)
- LD** - Limite de Detecção
- LDL** - Lipoproteínas de baixa densidade
- LQ** - Limite de Quantificação
- min.** - minuto
- mL** - mililitro
- MUFA** - Ácidos gordos monoinsaturados

**n** - Número de réplicas

**NP** - Norma Portuguesa

**°C** - graus Celsius

**ORAC** - Capacidade de absorção de radicais de oxigénio (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

**PI** - Percentagem de Inibição

**PITP** - Posfatidilinositol

**PUFA** - Ácidos gordos polinsaturados

**r** - Coeficiente de correlação

**r<sup>2</sup>** - Coeficiente de determinação

**REDOX** - Reacções de Oxidação-Redução

**RNA** - Ácido ribonucleico

**RNS** - Espécies Reactivas de Azoto

**ROO<sup>•</sup>** - Radical Peroxilo

**ROS** - Espécies Reactivas de Oxigénio

**Rpm** - Rotações por minuto

**RSD** - Desvio padrão relativo

**RSD** - Desvio-padrão relativo

**RT** - Tempo de retenção

**TRAP** - Total Reactive Antioxidant Potential (Total Reactive Antioxidant Potential)

**USDA** - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (United States Department of Agriculture)

**USP** - Farmacopeia dos Estados Unidos (The United States Pharmacopeia)

**UV** - Ultra-violeta

**UV-Vis** - Ultravioleta-Visível

**ND** – Não detectado

## RESUMO

Os cogumelos comestíveis são apreciados em todo o mundo não só pela sua textura e sabor, mas também pelas suas propriedades nutricionais e funcionais.

Estas propriedades devem-se ao facto dos cogumelos possuírem compostos bioactivos, nomeadamente, ergosterol (precursor da vitamina D<sub>2</sub>), compostos fenólicos, tocoferóis, ácido ascórbico e carotenóides, responsáveis pela actividade antioxidante, pelo que podem ser associados à promoção da saúde.

Um dos cogumelos comestíveis que tem suscitado maior interesse nos últimos anos é o *Pleurotus ostreatus*, conhecido como cogumelo ostra, devido à facilidade de cultivo e ao seu grande potencial económico e qualidade nutricional. Existe, assim, a necessidade de estudar o seu índice qualitativo e quantitativo de nutrientes e de compostos bioactivos por forma a sobrevalorizar o seu cultivo.

Este estudo tem por objectivo centrar-se, fundamentalmente, na quantificação do teor de ergosterol por HPLC-UV (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – detector UV-Vis) e na determinação da actividade antioxidante pelo método da actividade captadora do radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) do cogumelo *Pleurotus ostreatus* cultivado em diferentes substratos, nomeadamente, borras de café e palha de trigo, dada a sua possível influência no teor de compostos bioactivos na matriz em estudo.

Os resultados obtidos para a actividade antioxidante, expressos em EC<sub>50</sub>, indicaram uma maior actividade antioxidante no caso das amostras de cogumelo *P. ostreatus* cultivado em borras de café (17 mg/mL) e em borras de café e papelão (14 mg/mL), comparativamente à amostra cultivada em palha de trigo (26 mg/mL) e às restantes amostras obtidas comercialmente. Estes resultados também sugerem a influência da composição do substrato utilizado no cultivo no teor de compostos antioxidantes no cogumelo *Pleurotus*, sendo que tal pode ser justificado pelo facto das borras de café apresentarem teores consideráveis de compostos fenólicos totais na sua composição.

O método cromatográfico desenvolvido para a determinação do ergosterol provou ser específico, selectivo e rápido, apresentando a detecção do ergosterol a um RT de aproximadamente, 3,2 minutos. A linearidade estudada foi satisfatória ( $r^2 = 0,9969$ ) num intervalo de 200 a 2000 µg/mL. A precisão intra-dia e inter-dia para a amostra de cogumelo cultivado em borras de café (n=3) apresentou valores de desvio padrão relativo (% RSD) de 4,9 % e 7,8 %, respectivamente. No caso da amostra de cogumelo cultivado em palha de trigo (n=3), os valores de precisão intra-dia e inter-dia foram de 2 % e 5,8 %.



respectivamente. A metodologia de extracção desenvolvida apresentou resultados variáveis de recuperação do ergosterol (78,2 % a 101 %) para os três níveis de concentração estudados.

Verificou-se que a amostra de cogumelo *P. ostreatus* cultivado em borras de café apresentou uma concentração de ergosterol superior (4,06 mg/g  $\pm$  0,32 de matéria seca) relativamente à amostra de cogumelo *P. ostreatus* cultivado em palha de trigo (3,34 mg/g  $\pm$  0,19 de matéria seca), sendo que os resultados indicam que o substrato à base de borras de café poderá ter uma influência no aumento da concentração de ergosterol, embora os teores sejam relativamente próximos.

O conhecimento científico de determinados compostos, como o ergosterol, e da actividade antioxidante em cogumelos ostra cultivados em Portugal é escasso, sendo o seu estudo fundamental para sobrevalorizar e incentivar o cultivo e o consumo deste alimento funcional, que constitui, também, uma fonte promissora de compostos bioactivos para alimentação humana e para a produção de preparados farmacêuticos e suplementos alimentares.

**Palavras-chave:** Ergosterol; DPPH; *Pleurotus ostreatus*; Actividade Antioxidante; Borras de café; HPLC-UV.

## ABSTRACT

Edible mushrooms are appreciated throughout the world not only for their taste and texture, but also for their nutritional and functional properties.

These properties are due to the presence of bioactive compounds in mushrooms, such as, ergosterol (precursor of vitamin D<sub>2</sub>), phenolic compounds, tocopherols, ascorbic acid and carotenoids, responsible for the antioxidant activity so they may be associated with health promotion.

The mushroom *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) is an edible mushroom that has sparked greater interest in recent years due to the facility of cultivation and its potential economic and nutritional quality. Thus, it becomes essential to study their qualitative and quantitative content on nutrients and bioactive compounds.

The aim of the present work was to determine the ergosterol content by HPLC-UV (High-Pressure Liquid Chromatography - Ultra Violet detector) and to carry out the determination of the antioxidant activity by DPPH radical scavenging activity assay in the *Pleurotus ostreatus* mushrooms grown on different substrates, namely coffee grounds and wheat straw, due to their possible influence on the content of bioactive compounds of mushrooms.

The results obtained for antioxidant activity, expressed as EC<sub>50</sub>, showed an increased antioxidant activity for samples of *P. ostreatus* grown on coffee grounds (17 mg/ml) and coffee grounds and cardboard (14 mg/ml) compared to those grown on wheat straw (26 mg/mL) and the remaining samples obtained commercially. These results also suggest the influence of the substrate used in the content of antioxidant compounds of *Pleurotus* mushrooms, and that may be justified by the fact that coffee grounds have considerable levels of phenolic compounds in their composition.

The chromatographic method developed for the determination of ergosterol proved to be specific, selective and rapid. Ergosterol as a retention time of approximately, 3.2 minutes. Linearity was satisfactory ( $r^2 = 0.9969$ ) in the range 200-2000 mg / mL.

Regarding the intra-assay and inter-assay precision, sample of mushroom grown in coffee grounds (n = 3) was obtained relative standard deviation (RSD %) values of 4.9 % and 7.8 %, respectively. Regarding cultivated in wheat straw (n = 3), the relative standard deviation (RSD %) values of intra-assay and inter-assay precision were 2 % and 5.8 %, respectively. The extraction process of ergosterol showed variables recovery results for the concentration levels studied (78.2 % to 101 %).

*P. ostreatus* mushroom grown in coffee grounds had the highest concentration of ergosterol (4.06 mg/g dry matter  $\pm$  0.32) compared with sample of mushroom *P. ostreatus* grown on wheat straw (3.34 mg/g dry matter  $\pm$  0.19). These results indicate that the substrate based on coffee grounds may have an influence on the increase of the concentration of ergosterol.

The scientific knowledge of certain compounds, such as ergosterol, and the antioxidant activity of oyster mushrooms grown in Portugal is scarce. Thus, this study is fundamental to overestimate and encourage the cultivation and consumption of functional food, which is also a promising source of bioactive compounds for human consumption and for the production of pharmaceutical preparations and dietary supplements.

**Keywords:** Ergosterol; DPPH; *Pleurotus ostreatus*; Antioxidant activity; Coffee grounds; HPLC-UV.

# ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	i
ABREVIATURAS .....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
ÍNDICE GERAL.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	xiv
<b>I. Introdução</b> .....	<b>1</b>
I.1. Considerações gerais sobre os cogumelos .....	1
I.2. A importância dos cogumelos comestíveis na alimentação humana .....	3
I.3. Caracterização do cogumelo <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	4
I.3.1. Descrição Morfológica .....	5
I.3.2. O cultivo.....	5
I.3.3. Composição nutricional .....	7
I.3.3.1. Proteínas e aminoácidos .....	7
I.3.3.2. Lípidos.....	8
I.3.3.3. Hidratos de Carbono .....	9
I.3.3.4. Fibras alimentares.....	10
I.3.3.5. Vitaminas .....	11
I.3.3.6. Minerais .....	11
I.4. Actividade antioxidante .....	12
I.4.1. Os radicais livres .....	13
I.4.2. O stresse oxidativo .....	14
I.4.3. O contributo dos cogumelos contra o stresse oxidativo .....	15
I.4.4. Compostos Antioxidantes.....	16

1.4.4.1. Compostos fenólicos.....	18
1.4.4.2. Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) .....	19
1.4.4.3. Ácido ascórbico (Vitamina C).....	20
1.4.4.4. $\beta$ – Caroteno.....	21
1.5. Os esteróis .....	22
1.5.1. O papel fisiológico dos esteróis .....	23
1.5.2. Ergosterol.....	23
1.5.2.1. Caracterização química .....	23
1.5.2.2. Ergosterol versus colesterol .....	25
1.5.2.3. As funções do ergosterol .....	25
1.5.2.4. A Conversão do ergosterol dos cogumelos em vitamina D <sub>2</sub> .....	26
1.5.2.5. Fontes de ergosterol.....	29
1.5.2.6. Os benefícios para a saúde do ergosterol e dos seus produtos.....	32
1.6. Métodos de pré-tratamento, extracção e quantificação.....	34
1.6.1. Métodos utilizados para a determinação da actividade antioxidante em cogumelos <i>in vitro</i> .....	34
1.6.2. Processos de pré-tratamento da amostra para extracção do ergosterol .....	36
1.6.3. Processos de extracção do ergosterol da amostra .....	37
1.6.4. Métodos analíticos para a quantificação do ergosterol.....	38
<b>2. Material e Métodos .....</b>	<b>40</b>
2.1. Determinação da humidade.....	40
2.2. Determinação da actividade antioxidante .....	42
2.2.1. Amostras biológicas .....	42
2.2.1.1. Produção do cogumelo <i>Pleurotus ostreatus</i> a partir de borras de café e papelão	42
2.2.2. Reagentes .....	44
2.2.3. Material e Equipamentos.....	44
2.2.4. Determinação da actividade antioxidante <i>in vitro</i> dos extractos de cogumelo.....	45

2.2.4.1. Preparação dos extractos de cogumelo para a determinação da actividade antioxidante.....	45
2.2.4.2. Avaliação da actividade antioxidante pelo método do radical DPPH•.....	46
2.3. Determinação do ergosterol no cogumelo <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivado em borras de café e em palha de trigo.....	48
2.3.1. Amostras biológicas.....	48
2.3.2. Reagentes e Padrões.....	49
2.3.3. Material e Equipamentos.....	49
2.3.4. Preparação de soluções.....	50
2.3.4.1. Soluções padrão.....	50
2.3.4.2. Preparação da fase móvel.....	50
2.3.5. Preparação da amostra para a determinação do ergosterol por HPLC-UV.....	50
2.3.5.1. Processo de extracção do ergosterol.....	51
2.3.6. Análise cromatográfica.....	52
2.3.6.1. Sistema cromatográfico.....	52
2.3.6.2. Condições cromatográficas.....	53
<b>3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>54</b>
3.1. Determinação da humidade.....	54
3.2. Avaliação da actividade antioxidante pelo método do radical DPPH•.....	56
3.3. Determinação do ergosterol.....	61
3.3.1. Justificação do método de extracção e das condições cromatográficas utilizados.....	61
3.3.2. Validação da metodologia analítica.....	61
3.3.3. Parâmetros de validação.....	62
3.3.4. Discussão dos resultados.....	68
<b>4. Conclusões e considerações finais.....</b>	<b>71</b>
<b>5. Referências bibliográficas.....</b>	<b>74</b>
Anexo I – Equações utilizadas na validação da metodologia.....	89

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Classificação taxonómica do cogumelo <i>Pleurotus ostreatus</i> (Fonte: Alexopoulos et al., 1996) .....	4
<b>Tabela 2</b> - Valor nutricional do cogumelo <i>P. ostreatus</i> expresso em g/100 g de matéria seca. ....	7
<b>Tabela 3</b> - Principais Espécies Radicalares (Fonte: Magalhães, 2009) .....	13
<b>Tabela 4</b> - Teor de fenóis totais expresso em equivalentes de ácido gálico (GAE) no <i>P. ostreatus</i> e em outras espécies de cogumelos utilizando o método <i>Folin-Ciocalteu</i> . <sup>a</sup> Amostras secas em estufa; <sup>b</sup> Amostras liofilizadas.....	17
<b>Tabela 5</b> - Teor de tocoferóis, $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico e $\beta$ -caroteno presente no <i>P. ostreatus</i> e em outras espécies.....	18
<b>Tabela 6</b> - Concentração de ergosterol livre, ergosterol esterificado e ergosterol total (mg/g de matéria seca) em várias espécies de cogumelos comestíveis e respectivos tecidos. I – Amostras cultivadas; <sup>a</sup> Amostras secas em estufa; <sup>b</sup> Amostras liofilizadas.....	31
<b>Tabela 7</b> - Condições do sistema de cromatografia líquida para a determinação do ergosterol em amostras de cogumelo <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	53
<b>Tabela 8</b> - Percentagem de humidade presente em 100 g de amostra de cogumelo <i>Pleurotus ostreatus</i> fresco e enlatado.....	54
<b>Tabela 9</b> - Percentagem de humidade (%) presente em 100 g de amostra de cogumelo pertencentes a várias espécies.....	55
<b>Tabela 10</b> - Coeficiente de determinação ( $r^2$ ) obtido para as amostras de cogumelo <i>P. ostreatus</i> e <i>Lentinula edodes</i> ( <i>Shiitake</i> ) na determinação da actividade antioxidante pelo método do radical DPPH•. ....	57
<b>Tabela 11</b> - Capacidade antioxidante, expressa em EC <sub>50</sub> (mg/mL), dos extractos metanólicos das amostras de <i>P. ostreatus</i> utilizando o método do radical livre DPPH•. Percentagem de inibição obtida para a concentração de 18,75 mg/mL para cada amostra...58	58
<b>Tabela 12</b> - Precisão da determinação do ergosterol em análises intra-dia e inter-dia nas amostras de cogumelo <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivado em diferentes substratos.....	65
<b>Tabela 13</b> - Valores de recuperação (%) obtidos para os 3 níveis de concentrações na amostra de <i>P. ostreatus</i> cultivado em borras de café. ....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura de um Basidiomycota (Adaptado: Kalac, 2000).....	2
<b>Figura 2</b> - Partes principais de um corpo frutífero da espécie <i>Pleurotus ostreatus</i> . (A) Chapéu; (B) Lâminas; (C) Pé/Caule (Fonte: Bruschi, 2013). .....	5
<b>Figura 3</b> - Produção de cogumelos <i>Pleurotus ostreatus</i> na fase de frutificação (Fonte: Micosylva, 2012).....	6
<b>Figura 4</b> - As principais causas relacionadas com o excesso de produção de radicais livres (stresse oxidativo), possíveis alvos celulares e consequências associadas ao stresse oxidativo (Fonte: Ferreira & Abreu, 2007). .....	14
<b>Figura 5</b> - Estruturas químicas para os ácidos fenólicos derivados do: (a) - ácido cinâmico e (b) - ácido benzóico (Fonte: Campos, 1999).....	19
<b>Figura 6</b> - Estrutura base para os flavonóides (Fonte: Sandhar, 2011).....	19
<b>Figura 7</b> - Estrutura química dos tocoferóis (Fonte: Ramalho et al., 2006).....	20
<b>Figura 8</b> - Estrutura química do ácido L-ascórbico (Batista, 2012) .....	21
<b>Figura 9</b> - Estrutura química do $\beta$ -caroteno (Fonte: EFSA, 2012).....	22
<b>Figura 10</b> - Representação da fórmula geral dos esteróides (Fonte: Casimir, 2008) .....	22
<b>Figura 11</b> - Estrutura química de uma molécula de ergosterol (Yuan et al., 2006).....	24
<b>Figura 12</b> - Estrutura dos principais esteróis em mamíferos e em fungos, colesterol e ergosterol, respectivamente (Fonte: Cordeiro et al., 2009).....	25
<b>Figura 13</b> - O mecanismo de conversão do ergosterol em vitamina D <sub>2</sub> . (A) Clivagem fotoquímica do anel B por UV; (B) Rearranjo térmico (Fonte: Horst & Reinhardt, 1997). ....	27
<b>Figura 14</b> - Fluxograma de produção do cogumelo <i>P. ostreatus</i> . .....	43
<b>Figura 15</b> - (A) Início da frutificação (B) Fim da frutificação (C) Após a colheita.....	44
<b>Figura 16</b> - Redução da molécula de DPPH. DPPH na forma de radical livre (Violeta); DPPH na forma reduzida (Amarelo pálido) (Fonte: Santos et al., 2011).....	46
<b>Figura 17</b> - Produto da empresa Gumelo (Fonte: Gumelo, 2013).....	48
<b>Figura 18</b> - Saponificação (aquecimento sob refluxo).....	51
<b>Figura 19</b> - Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizado na determinação do ergosterol.....	52
<b>Figura 20</b> - (A) Extracto metanólico de cogumelo; (B) Extracto etanólico de cogumelo.....	56
<b>Figura 21</b> - Pico cromatográfico do padrão do ergosterol (400 $\mu$ g/mL), a 282 nm, tempo de retenção de 3,2 minutos. ....	63



**Figura 22** - (A) Pico cromatográfico do ergosterol a 282 nm na amostra de cogumelo *P. ostreatus* cultivada em borras de café a 282 nm (Tempo de retenção 3,2 min); (B) Pico cromatográfico do ergosterol na amostra de cogumelo *P. ostreatus* cultivada em palha de trigo a 282 nm (Tempo de retenção de 3,2 min.).....63

**Figura 23** - Representação gráfica da curva de calibração do ergosterol num intervalo de concentrações de 200 a 2000 µg/mL.....64

## INTRODUÇÃO GERAL

Os cogumelos comestíveis têm sido amplamente utilizados na alimentação humana durante séculos e têm sido apreciados pelas suas características organolépticas. No entanto, o conhecimento de que os cogumelos comestíveis são um alimento saudável, rico em compostos biologicamente activos com valor medicinal, só surgiu recentemente (Lindequist *et al.*, 2005).

Nesta dissertação estudou-se especificamente o cogumelo *Pleurotus ostreatus* devido à sua qualidade nutricional e facilidade de cultivo que o tornam um grande potencial económico. Uma particularidade importante no cultivo desta espécie é a possibilidade da utilização de resíduos agro-alimentares, como é o caso das borras de café.

Portugal é um dos países importadores de café, sendo co-responsável por resíduos como as borras de café, que constitui um volume de resíduos representativos. Estima-se uma produção nacional de 40 mil toneladas/ano de borras de café, sendo que o seu destino continua a ser aterros sanitários ou incineradoras, constituindo uma ameaça ambiental por ser um resíduo tóxico (Ferreira, 2011).

O uso das borras de café no substrato de crescimento *Pleurotus ostreatus* revelou-se ser bastante vantajoso pois permite produzir cogumelos de elevado valor comercial, e o resíduo restante torna-se menos tóxico devido à degradação parcial da cafeína e de taninos, promovida pelo fungo (Fan & Soccol, 2005).

O tipo de substrato utilizado no cultivo do cogumelo *Pleurotus* tem influência no teor de compostos bioactivos, nomeadamente, no teor de esteróis totais no cogumelo (Savón *et al.* 2002). Uma vez que existem poucos estudos que reportem esta influência, sendo inexistentes em Portugal, decidiu-se realizar a quantificação por HPLC-UV do esterol maioritário presente nos fungos, o ergosterol, em amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus* cultivadas em borras de café e em palha de trigo, nas mesmas condições ambientais, sendo este o principal objectivo desta dissertação.

O ergosterol é um composto com actividades farmacológicas interessantes, as quais se destacam a actividade antimicrobiana, antitumoral e antioxidante (Yuan *et al.*, 2006), sendo que até ao momento não foram publicados estudos nacionais sobre a sua quantificação em cogumelos.

Um outro objectivo desta dissertação foi a determinação da actividade antioxidante pelo método do radical DPPH• em amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus* cultivado em borras de café e em palha de trigo, por forma a verificar se o tipo de substrato utilizado

também teria influência no teor de compostos antioxidantes desta matriz, até ao momento não estudada. Nesta determinação também se utilizou uma amostra de *Pleurotus ostreatus* cultivada *in loco* em borras de café e papelão e diferentes amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*, obtidas comercialmente, de modo a estabelecer-se uma comparação.

## **Organização da Dissertação**

A presente dissertação encontra-se estruturada em cinco partes fundamentais, nomeadamente, a revisão bibliográfica (1), material e métodos (2), resultados e discussão (3), conclusões e considerações finais (4) e referências bibliográficas (5).

Na introdução aborda-se inicialmente os cogumelos comestíveis de um modo geral e a sua importância na alimentação humana. É realizada a caracterização do cogumelo *Pleurotus ostreatus* sob o ponto de vista morfológico, taxonómico, das particularidades do seu cultivo e da sua composição nutricional. A actividade antioxidante é abordada, descrevendo-se a problemática do stresse oxidativo, o contributo dos cogumelos contra o stress oxidativo e os compostos antioxidantes presentes no cogumelo *P. ostreatus*. O ergosterol é explorado no que diz respeito à sua caracterização química, às suas funções, à sua conversão em vitamina D<sub>2</sub>, às suas principais fontes e aos seus benefícios para a saúde humana. No final é realizada uma revisão dos métodos utilizados para a determinação da actividade antioxidante em cogumelos e das metodologias analíticas desenvolvidas para a determinação do ergosterol em cogumelos nessa mesma matriz.

Na parte de material e métodos caracterizam-se as amostras usadas, os reagentes, materiais e equipamentos utilizados na determinação da humidade, da determinação da actividade antioxidante e na quantificação do teor de ergosterol.

Na parte dos resultados e discussão, faz-se em primeiro lugar a apresentação e discussão dos resultados da determinação da humidade. Os resultados da actividade antioxidante nas diferentes amostras de *P. ostreatus* e de *Lentinula edodes* são discutidos e comparados entre si. É realizado o estudo dos parâmetros de validação de acordo com os critérios estabelecidos pelas organizações internacionais, apresentando-se e discutindo-se os resultados obtidos nas amostras de cogumelo cultivados em borras de café e em palha de trigo.

No final, apresenta-se uma compilação das conclusões gerais retiradas do trabalho efectuado, de acordo com os resultados obtidos.

# I. Introdução

## I.1. Considerações gerais sobre os cogumelos

Os cogumelos constituem um grupo de organismos que foi enquadrado durante longos anos entre os vegetais. Porém, a partir da década de 60, os cogumelos foram colocados num reino autónomo devido às suas características peculiares, denominado, Reino *Fungi* (Alexopoulos et al., 1996).

Os fungos foram definidos com base nas suas características como organismos eucariotas que produzem esporos, não sintetizam clorofila e não possuem celulose na sua parede celular, sendo esta constituída, na maioria das vezes, por  $\alpha$ -quitina. São seres heterotróficos, obtendo o seu alimento por absorção e armazenam o glicogénio como substância de reserva (Kirk et al. 2008).

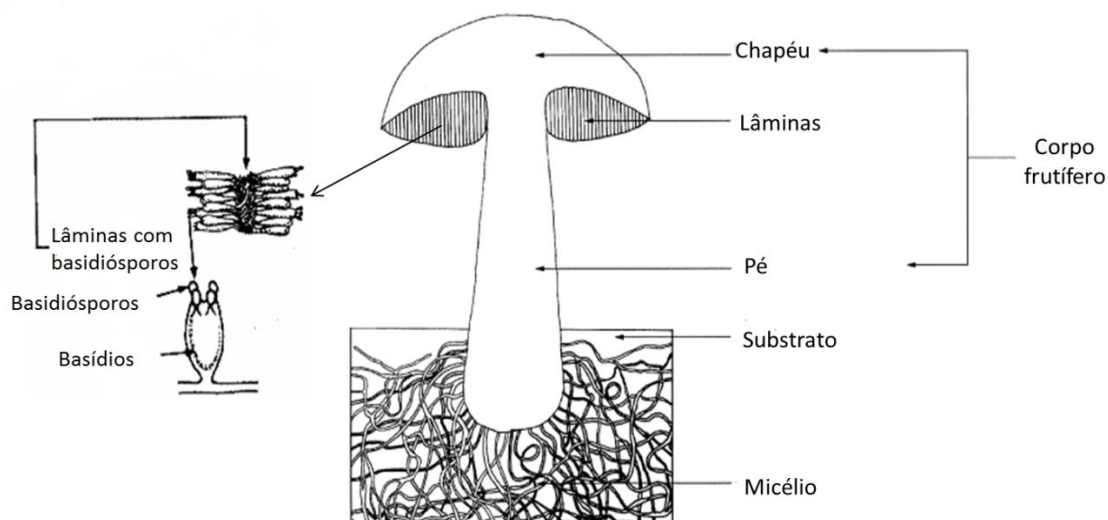
Os fungos na sua grande maioria são saprófitas, ou seja, produzem enzimas que hidrolisam a matéria orgânica morta que os rodeia, sendo que nesta categoria estão inseridos os cogumelos comestíveis do género *Pleurotus*. Todavia, podem ser, também, parasitas que recebem o alimento do corpo dos hospedeiros, prejudicando-os, ou com benefício para ambos. (Alexopoulos et al., 1996; Bononi et al., 1999).

Algumas espécies de fungos podem ser tanto saprófitas como parasitas, ocasionalmente, o que lhes permite agirem de acordo com a oportunidade apresentada pelo ambiente, pelas condições do substrato e pela suscetibilidade do hospedeiro (Alexopoulos et al., 1996).

Os cogumelos são a parte visível de certos fungos, o chamado “fruto” portador de esporos necessários para se reproduzir. Neste tipo de fungos, a parte vegetativa é formada por uma rede de filamentos ramificados chamados hifas. Estas contêm citoplasma e núcleos, e podem apresentar diferentes formas. As hifas iniciam-se como formações tubulares a partir de esporos, ramificando-se repetidamente. Constituem, assim, uma rede mais ou menos densa que forma o micélio (Carlile et al., 2001).

Os fungos podem reproduzir-se sexual e/ou assexuadamente por gemiparidade ou por formação de vários esporos. O tipo de reprodução que apresentam bem como outras características tais como as suas microestruturas, especializações de acordo com o modo de vida, enzimas produzidas, entre outras, permitem classificar os fungos em vários grupos, considerando-se quatro divisões fundamentais, nomeadamente, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Deuteromycota* (Bononi et al., 1999).

Os fungos pertencentes à divisão *Basidiomycota* apresentam um processo de reprodução sexuada que envolve a produção de basidiósporos, contidos num basídio, nos quais o núcleo sofre meiose. O cogumelo da espécie *Pleurotus ostreatus* pertence a esta divisão (Alexopoulos et al., 1996). A estrutura de um *Basidiomycota* encontra-se representada na Figura 1.



**Figura 1** - Estrutura de um Basidiomycota (Adaptado: Kalac, 2000).

Na Figura 1 encontram-se representadas as lâminas radiais existentes na face interior do chapéu, que contêm hifas especializadas chamadas basídios que originam esporos sexuais designados basidiósporos. O conjunto dos basídios forma assim uma estrutura reprodutora complexa denominada basidiocarpo (Trabulsi, 1991).

Os esporos, quando maduros, caem no solo e germinam formando hifas que darão origem aos micélios primários. Quando se encontram duas hifas compatíveis juntam-se célula a célula e dão origem a micélios secundários, sendo estas as estruturas que irão produzir novos cogumelos (Trabulsi, 1991).

## 1.2. A importância dos cogumelos comestíveis na alimentação humana

Os cogumelos têm sido utilizados pela humanidade desde sempre e são apreciados não só enquanto alimento, mas também para outros fins, dos quais se destacam a sua utilização como agente terapêutico (Azevedo *et al.*, 2012)

Os cogumelos comestíveis fazem parte de duas grandes divisões: *Ascomycota* e *Basidiomycota* (*Agaricus* e *Pleurotus*), (Bononi *et al.*, 1999). Apesar de Portugal e de outros países não apresentarem legislação específica que regule o comércio dos cogumelos, é possível a comercialização de espécies cultivadas sem risco para a Saúde Pública e com interesse sob o ponto de vista alimentar, sendo o caso de algumas espécies, nomeadamente, o *Pleurotus ostreatus* (repolgas ou cogumelo ostra), o *Lentinula edodes* (*shiitake*), ambos com propriedades medicinais, o *Pleurotus eryngii*, (setas de cardo), *Lepista nuda* (pé azul) e *Agaricus bisporus* (cogumelos de Paris), entre outros (Martins, 2004).

Para além das características organolépticas e da versatilidade gastronómica, os cogumelos comestíveis são também considerados um alimento atractivo do ponto de vista nutricional.

Os cogumelos comestíveis contêm 90% de água e, dependendo da espécie, o conteúdo proteico pode variar entre 27% a 48%, face à matéria seca. Apresentam uma percentagem de hidratos de carbono na ordem dos 60% e um nível de lípidos residual (2-8% face à matéria seca), e baixas percentagens de sódio, sendo por isso alimentos interessantes para dietas específicas (Azevedo *et al.*, 2012). Possuem ainda inúmeras vitaminas e minerais essenciais, tais como, o fósforo, o magnésio, o cobre e o selénio (Manzi *et al.*, 1999; Bernas *et al.*, 2006; Rai & Paul, 2007; Azevedo *et al.*, 2012).

Actualmente surgem evidências científicas que demonstram os benefícios do consumo de cogumelos devido às suas propriedades terapêuticas. Desta forma, têm sido reportadas actividades pré-biótica, antioxidante e anti-inflamatória (Azevedo *et al.*, 2012). Algumas espécies demonstram ter acção imunomoduladora, isto é, actuam ao nível do sistema imunitário, condicionando a resposta imunológica, com efeito anti-tumoral ou imunossupressor. São também usadas para o tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares como hipertensão, hipercolesterolemia, cancro e diabetes (Helm *et al.*, 2009).

### 1.3. Caracterização do cogumelo *Pleurotus ostreatus*

O cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* encontra-se distribuído em todo o mundo, sendo usualmente denominado por cogumelo ostra devido à sua forma característica (Apati, 2004).

O cultivo desta espécie à escala industrial tomou ênfase a partir da década de 70, tornando-se um dos cogumelos comestíveis mais cultivados no mundo (Apati, 2004).

O *Pleurotus* apresenta um ciclo de produção bastante curto uma vez que são necessários menos de 30 dias desde o início de seu crescimento vegetativo até à primeira colheita, num total de três ciclos de produção. Esta espécie além de apresentar um ciclo produtivo reduzido requer uma tecnologia de produção menos complexa, sendo estas características determinantes na viabilidade técnica e económica de um cultivo à escala industrial (Apati, 2004; Mandeel *et al.*, 2005; Coelho, 2012).

O *Pleurotus ostreatus* é um cogumelo decompositor da matéria vegetal. Esta espécie bem como outras espécies de cogumelos produzem enzimas ligninolíticas extracelulares como a lignina peroxidase, a manganês peroxidase e a lacase, que estão envolvidas na degradação da lignina. Esta particularidade confere aos cogumelos a capacidade de crescerem em troncos de árvores vivas ou mortas (Martinez *et al.*, 2001; Regina *et al.*, 2009; Coelho, 2012).

No que diz respeito ao ponto de vista taxonómico a espécie *Pleurotus ostreatus* pode ser classificada de acordo com a Tabela I.

**Tabela I** - Classificação taxonómica do cogumelo *Pleurotus ostreatus* (Fonte: Alexopoulos *et al.*, 1996)

<b>Reino</b>	<i>Fungi</i>
<b>Subreino</b>	<i>Fungi Superior</i>
<b>Divisão</b>	<i>Basidiomycota</i>
<b>Subdivisão</b>	<i>Basidiomycotina</i>
<b>Classe</b>	<i>Himenomycetes</i>
<b>Ordem</b>	<i>Agaricales</i>
<b>Família</b>	<i>Tricholomataceae</i>
<b>Género</b>	<i>Pleurotus</i>
<b>Espécie</b>	<i>ostreatus</i>

### 1.3.1. Descrição Morfológica

A espécie *Pleurotus ostreatus* (Figura 2) apresenta um chapéu convexo a plano-convexo, de cor acizentada ou esbranquiçada e com um diâmetro de 5 a 15 centímetros. Na parte inferior do chapéu, as lâminas encontram-se dispostas radialmente, sendo esbranquiçadas e bastante estreitas. Esta espécie apresenta ainda um pé lateral piloso e muito curto face ao diâmetro do chapéu. A parte edível apresenta uma coloração esbranquiçada com aroma agradável e intenso (Barbado, 2003; Coelho 2012).



**Figura 2** - Partes principais de um corpo frutífero da espécie *Pleurotus ostreatus*. (A) Chapéu; (B) Lâminas; (C) Pé/Caule (Fonte: Bruschi, 2013).

### 1.3.2. O cultivo

Os cogumelos comestíveis do género *Pleurotus* apresentam determinadas particularidades que constituem vantagens no seu cultivo em relação a outras espécies, como é o caso do género *Agaricus* (Zadrazil, 1984; Apati, 2004).

O cogumelo *Pleurotus* apresenta um crescimento mais rápido, possui a capacidade de se desenvolver numa grande amplitude térmica e adapta-se a uma ampla diversidade de substratos, que não necessitam de sofrer um processo de compostagem (Zadrazil, 1984; Apati, 2004).

Uma série de subprodutos agrícolas, como palhas de trigo, de arroz, gramíneas, serragens, polpa e casca de frutas, folhas de bananeira, polpa de café, bagaço de cana-de-açúcar, entre outros, podem ser utilizados para produção de cogumelos comestíveis como o *P. ostreatus* (Moda *et al.*, 2005; Moura, 2008). Esta espécie por ser um fungo lignícola possui a



capacidade de se desenvolver em qualquer resíduo que contenha lignina, celulose ou hemicelulose (Bononi *et al.*, 1995).

O cultivo do género *Pleurotus* é similar para todas as linhagens, com excepção das temperaturas de frutificação. Na espécie *Pleurotus ostreatus*, por exemplo, a temperatura para a sua produção varia entre 15 °C a 18 °C (Bononi *et al.*, 1999; Moura, 2008).

O cultivo do cogumelo *Pleurotus* divide-se em duas fases fundamentais, nomeadamente, a fase de incubação e a fase de frutificação, sendo que os factores ambientais como a temperatura, a humidade e a ventilação deverão ser bem controlados (Bononi *et al.*, 1995).

A fase de incubação caracteriza-se por uma actividade biológica intensa uma vez que o micélio degrada o substrato e absorve os seus nutrientes. Este processo é visível quando se forma uma massa branca e compacta devido ao desenvolvimento do micélio no substrato. Esta fase apresenta uma duração de 15 a 20 dias, sendo aconselhável a manutenção da temperatura entre 25 °C a 28 °C, na ausência de luz (Bononi *et al.*, 1995; Apati, 2004).

A partir do momento em que ocorre a colonização total do substrato por parte do micélio significa que o período de incubação terminou e dever-se-á induzir as condições necessárias para se iniciar a fase da frutificação. Deste modo, os sacos onde se encontram o substrato e o micélio são perfurados, submetidos a condições de luminosidade durante 12 horas por dia e recomenda-se que a humidade relativa do ar seja mantida a 95%. Por fim, quando as margens do píleo estiverem planas significa que chegou o momento para se proceder à sua colheita (Figura 3) (Bononi *et al.*, 1995; Apati, 2004).



**Figura 3** - Produção de cogumelos *Pleurotus ostreatus* na fase de frutificação (Fonte: Micosylva, 2012).

### 1.3.3. Composição nutricional

A crescente popularidade dos cogumelos comestíveis *Pleurotus ostreatus*, na Europa, deve-se à sua qualidade sensorial e ao seu valor nutritivo. Tal como a grande maioria dos cogumelos comestíveis, o *Pleurotus ostreatus* é caracterizado pelo seu baixo valor calórico (360 kcal kg<sup>-1</sup> parte edível), tornando-o adequado para o seu consumo numa dieta saudável (Jaworska & Bernas., 2009).

No que diz respeito ao seu valor nutricional, o *P. ostreatus* contém hidratos de carbono, fibra, vitaminas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, C, D e E), aminoácidos, baixos teores de lípidos e teores consideráveis de minerais, tais como, potássio, fósforo, manganês, ferro e cálcio. Contudo, a composição nutricional pode variar de acordo com o substrato utilizado no cultivo, idade ou maturidade do corpo de frutificação (Carvalho *et al.*, 2012).

A Tabela 2 apresentado o valor nutricional do cogumelo *P. ostreatus*, expresso em matéria seca, verificando-se que para além da água, os hidratos de carbono constituem os componentes maioritários da sua composição, seguindo-se a proteína e a gordura.

**Tabela 2** - Valor nutricional do cogumelo *P. ostreatus* expresso em g/100 g de matéria seca.

	(USDA, 2013b)	(Reis <i>et al.</i> , 2012a)
<b>Proteína (g/100 g)</b>	30,5	7,01
<b>Gordura (g/100 g)</b>	3,7	1,38
<b>Hidratos de carbono (g/100 g)</b>	56,2	85,8

#### 1.3.3.1. Proteínas e aminoácidos

Um dos principais atributos nutricionais dos cogumelos comestíveis é o seu elevado conteúdo proteico (25%), o qual é equiparado ao do leite (25,2%) e do feijão (24,2%), sendo mais elevado que o reportado para o arroz (7,3%) e para o trigo (13,2%). Porém, a qualidade proteica de um alimento é, sobretudo, determinada pelo seu valor biológico (Astudillo, 2007).

A espécie *Pleurotus ostreatus* é considerada uma boa fonte de proteínas. Alguns investigadores alegam que a composição em aminoácidos destes cogumelos é comparável com à das proteínas animais (Reis *et al.*, 2012a)

Dados reunidos por vários autores apontam que os cogumelos da espécie *Pleurotus* contêm, em matéria seca, entre 10,5 a 30,4 % de proteína bruta, tendo sido usado o factor de correcção 4,38 (Furlani & Godoy, 2005). Yang *et al.*, (2001), em Taiwan, verificou que na amostra de *P. ostreatus*, proveniente do mercado local, analisada utilizando o factor de correcção de 4,38, o teor de proteína foi de 23,9%.

É de referir que para o cálculo do teor de proteína, deve-se ter em conta o factor de correcção a partir do conteúdo de azoto orgânico presente no alimento. O factor geral utilizado é 6,25, o que significa que as proteínas possuem 16% de azoto totalmente digeríveis, desprezando compostos azotados não proteicos que possam estar presentes. No entanto, os cogumelos possuem quantidades significativas de compostos azotados não proteicos nas suas paredes celulares, como é o caso da  $\alpha$ -quitina. Desse modo, o factor de correcção adoptado para os cogumelos é 4,38, sugerindo que apenas 70% dos compostos azotados presentes sejam digeridos pelo corpo humano ( $0,70 \times 6,25 = 4,38$ ), (Furlani & Gody, 2005).

De acordo com um estudo sobre a comparação entre as espécies de cogumelos verificou-se que houve uma grande variabilidade nos teores de proteína que pode ser explicada pela concentração de  $\alpha$ -quitina presente em cada espécie (Guillamón *et al.*, 2010).

Ainda no género *Pleurotus*, Wang *et al.*, (2001) verificaram a presença considerável de aminoácidos essenciais, 12,67 g/100 g, em matéria seca, de um total de 34,75 g/100 g de aminoácidos totais. O cogumelo do género *Pleurotus* apresentou, segundo vários autores, todos os aminoácidos essenciais (Wang *et al.*, 2001; Furlani & Gody, 2005). Entre os aminoácidos essenciais mais abundantes encontrados na espécie *Pleurotus ostreatus* destacam-se a leucina, a treonina e o triptofano (Chirinang & Intarapichet, 2009).

Assim, é previsível que a importância de uma dieta rica em cogumelos cresça nos próximos anos devido à riqueza proteica deste alimento e ao interesse em reduzir os riscos relacionados com o consumo de fontes de alimentos de origem animal.

### 1.3.3.2. Lípidos

Os cogumelos comestíveis são reconhecidos como uma excelente opção para dietas de baixo valor calórico uma vez que possuem um elevado teor de água e um baixo teor de gordura (média de 2 a 6% de gordura em matéria seca) (Kalac, 2009). Em algumas espécies, *L. edodes*, *S. commune*, e *P. ostreatus*, o teor de lípidos pode atingir apenas os 2% (Cheung, 2008).

A gordura existente nos cogumelos comestíveis contém todas as classes de compostos lipídicos, incluindo ácidos gordos livres, mono-, di-, e triglicéridos, esteróis (ergosterol), ésteres de esteróis e fosfolípidos (Heleno *et al.*, 2009a).

Os teores de ácidos gordos polinsaturados (MUFA) e monoinsaturados (PUFA) nos cogumelos comestíveis são elevados, sendo o ácido linoleico e o ácido oleico os mais significativos (Cheung, 2008; Kalac, 2013; Reis *et al.*, 2012). Também foi reportada a presença de ácidos gordos saturados (AGS) em várias espécies de cogumelos, sendo o ácido palmítico o mais abundante (Cheung, 2008; Reis *et al.*, 2012a)

Os níveis de ácido linolénico são geralmente baixos nos cogumelos, porém, apesar da sua pequena quantidade, este composto está fortemente relacionado com o sabor de certos cogumelos, uma vez que é o precursor do 1-octen-3-ol, sendo o principal composto aromático na maior parte dos cogumelos (Cheung, 2008).

### 1.3.3.3. Hidratos de Carbono

Os hidratos de carbono são, geralmente, os componentes predominantes dos cogumelos, sobretudo, nos corpos de frutificação. Os hidratos de carbono são os constituintes principais do cogumelo, com exceção da água. O teor de hidratos de carbono nos cogumelos comestíveis varia, em matéria seca, de 35 a 70 % (Cheung, 2008).

Os cogumelos comestíveis são conhecidos por apresentarem um elevado teor de oligossacáridos e baixos teores de açúcares solúveis totais.

A glicose, o manitol e a trealose são os principais representantes dos monossacáridos, dos seus derivados (açúcares alcoóis) e dos dissacarídeos, respectivamente. De acordo com estudo comparativo de várias espécies, o manitol que participa no crescimento do volume e firmeza dos corpos de frutificação é o álcool mais abundante nos cogumelos comestíveis cultivados. No grupo dos dissacarídeos, a trealose é a mais abundante (Barros *et al.*, 2007a; Barros *et al.*, 2007b; Barros *et al.*, 2007c; Barros *et al.*, 2008a; Barros *et al.*, 2008b; Heleno *et al.*, 2009; Kalac, 2009; Kalac, 2013). O manitol predomina na espécie *Agaricus bisporus* e na espécie *L. edodes*, enquanto que a trealose predomina na espécie *Pleurotus ostreatus* e na espécie *Pleurotus eryniji* (Reis *et al.*, 2012a).

Outros estudos revelaram que os álcoois, como o arabitol (12,7 g/100 g de matéria seca), o manitol (0,93-5,09 g /100 g de matéria seca), e o inositol (0,14-0,32 g/100 g de matéria seca), foram encontrados em cogumelos comestíveis, sendo o manitol o principal componente encontrado nas espécies *P. ostreatus* e *V. volvocea*.

No grupo dos monossacarídeos e dissacarídeos, a glicose (0,491-3,94 g/100 g de matéria seca), e a trealose (0,97-34,1 g/100 g de matéria seca), respectivamente, foram os principais componentes encontrados nestas espécies de cogumelos (Cheung, 2008).

Os cogumelos comestíveis possuem, também, na sua constituição glicogénio, um polissacarídeo de reserva dos cogumelos (5-10% da matéria seca), tal como o amido nas plantas. Como o glicogénio é amplamente consumido pelos seres humanos, principalmente na carne, a sua baixa ingestão nos cogumelos é nutricionalmente insignificante (Reis *et al.*, 2012a).

#### 1.3.3.4. Fibras alimentares

O teor de hidratos de carbono inclui, também, as fibras alimentares, tais como, os polissacáridos estruturais,  $\beta$ -glucanas,  $\alpha$ -quitina, hemiceluloses e substâncias pécticas (Kalac, 2009).

Além do cogumelo *Pleurotus ostreatus*, outras espécies apresentaram um nível elevado ou apreciável de fibra total, nomeadamente, *Agrocybe aegerita*, *A.bisporus*, *Pleurotus eryngii*. Contudo, os cogumelos comestíveis, de um modo geral, apresentam níveis mais elevados de fibra insolúvel do que de fibra solúvel (Reis *et al.*, 2012a).

A quitina é o polímero da N-acetilglicosamina, sendo um polissacarídeo estrutural importante presente na parede celular dos cogumelos. A quitina é um polissacarídeo insolúvel em água, indigerível pelos seres humanos e representa 80-90% da matéria seca da parede celular dos cogumelos (Kalac, 2013)

As glucanas constituem os principais homopolissacáridos presentes na parede celular dos cogumelos. As suas ligações glicosídicas apresentam diferentes disposições ( $\alpha$  ou  $\beta$ ), sendo que as  $\alpha$ -glucanas constituem a forma predominante, podendo se encontrar livres ou associadas a outros polissacarídeos, proteínas e lípidos (Williams, 1997; Assis, 2011).

As glucanas constituem compostos bioactivos promotores da saúde uma vez que apresentam propriedades hipocolesterolémica, anticoagulante, antitumorogénica, anticitotóxica e antimutagénica. Além disso, estimulam o sistema imunitário, modulando a imunidade humoral e celular, exercendo assim um efeito benéfico no combate a infecções (Mantovani *et al.*, 2008; Assis, 2011).

### 1.3.3.5. Vitaminas

As vitaminas são compostos orgânicos importantes para o organismo uma vez que este não é capaz de as sintetizar. São essências para evitar doenças como a xerofthalmia, o escorbuto, o beribéri e o raquitismo que são causadas por hipovitaminoses. Todos os cogumelos são uma boa fonte de niacina, ácido ascórbico (vitamina C), tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>), folatos e biotina (Pauli, 2010).

No caso particular da espécie *Pleurotus ostreatus*, o teor de tiamina varia de 4,8 a 7,8 mg/100 g, o teor de riboflavina de 4,7 a 4,9 mg/100 g e o teor de niacina varia de 55 a 109 mg/100 g, sendo os dados expressos em matéria seca. Os teores de ácido ascórbico (vitamina C) são muito altos, variando de 36 a 58 mg/100 g de matéria seca, pelo que esta espécie pode ser uma fonte de antioxidantes para a produção de medicamentos e complementos nutricionais, como também, no tratamento das diabetes, da hipoglicémia e do cancro (Romero *et al.*, 2000).

Os cogumelos possuem um teor considerável de ergosterol que é transformado em vitamina D<sub>2</sub> por acção de raios ultravioleta, quando são submetidos a um processo de fotoirradiação. Os cogumelos comestíveis fotoirradiados constituem, assim, uma boa fonte desta vitamina tão importante para a absorção do cálcio, sobretudo do fosfato de cálcio, fundamental para o bom desenvolvimento dos ossos e dos dentes (Jasinghe, 2005).

### 1.3.3.6. Minerais

Os minerais são obtidos a partir da alimentação, uma vez que não são sintetizados pelo organismo, e possuem um papel importante na saúde na medida em que regulam o sistema biológico. A quantidade de minerais presentes nos cogumelos está directamente relacionada com determinados factores, tais como, a espécie, a área de cultivo, o tempo de crescimento do corpo de frutificação e a distância de fontes poluidoras, sendo também altamente influenciada pelas condições de cultivo, como o clima e o substrato (Gençcelep *et al.*, 2009; Pauli, 2010).

Os cogumelos absorvem todos os minerais que se encontram no substrato onde são cultivados que, geralmente, contêm uma boa quantidade de fósforo e potássio e uma menor quantidade de cálcio. Os cogumelos comestíveis cultivados, incluindo o *P. ostreatus*, são uma boa fonte de minerais, contendo na sua composição o potássio, o fósforo, o magnésio, o cálcio e o sódio. Também podem conter microelementos, nomeadamente, o cobre, o ferro, o manganês e o zinco (Chang & Miles, 2004; Cheung, 2008).

Os cogumelos são também conhecidos por acumularem metais pesados, porém, a concentração desses elementos depende da espécie e da composição do substrato. Os níveis de cádmio e selênio variam, mas baixos níveis de chumbo e mercúrio são, geralmente, reportados (Cheung, 2008).

Os cogumelos são, também, ricos em selênio, sendo este elemento importante na medida em que está envolvido em diversas funções fisiológicas que incluem actividade no centro catalítico de proteínas, aumento de funções do sistema imunitário e redução do risco de cancro (Silva, 2009).

#### **1.4. Actividade antioxidante**

A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes (enzimas e moléculas não enzimáticas) é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo. Quando este equilíbrio tende para a produção não controlada de radicais livres significa que o organismo está em stress oxidativo e, nestas situações, os radicais livres em excesso podem oxidar e danificar os lípidos celulares, as proteínas, o DNA (ácido desoxirribonucleico) e o RNA (ácido ribonucleico), inibindo a sua função normal e, conduzindo, a várias doenças, tais como, aterosclerose, diabetes, cirrose, cataratas, cancro e envelhecimento precoce (Valko *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2009).

Nos organismos aeróbios, os radicais livres são constantemente produzidos durante o funcionamento normal da célula, na maior parte sob a forma de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS).

A exposição dos organismos a radicais livres, conduziu ao desenvolvimento de mecanismos de defesa endógenos para os eliminar (Ferreira & Abreu, 2007). Porém, apesar de todos os organismos possuírem sistemas de defesa e de reparação que evoluíram para protegê-los contra danos oxidativos, estes sistemas são muitas vezes insuficientes para impedir, completamente, os danos induzidos pelo stress oxidativo (Yang *et al.*, 2001). Contudo, a presença de antioxidantes na dieta pode ajudar o sistema de defesa endógeno, reduzindo os danos oxidativos (Fang *et al.*, 2002; Liu, 2003; Barros *et al.*, 2008b).

Assim, existe, actualmente, um grande interesse na utilização de antioxidantes naturais, como suplementos alimentares e na conservação dos alimentos, com vista a proteger os componentes do corpo humano e os alimentos contra os danos oxidativos, respectivamente. No entanto, os antioxidantes sintéticos, como o BHA (butil hidroxianisol)

e o BHT (butil hidroxitolueno), apresentam um uso restrito em alimentos pois são suspeitos de serem cancerígenos. Por esta razão, as fontes naturais de compostos antioxidantes, como os cogumelos, estão a ser cada vez mais procuradas (Jayakumar *et al.*, 2009).

O cogumelo *Pleurotus ostreatus* é reportado como uma das espécies comestíveis com uma elevada actividade antioxidante, estando os compostos antioxidantes presentes na sua composição na origem das suas propriedades antioxidantes (Jayakumar *et al.*, 2009).

#### 1.4.1. Os radicais livres

Um radical livre constitui um átomo ou uma molécula que contém um ou mais electrões desemparelhados. Durante o metabolismo celular normal dos organismos aeróbios, os radicais livres estão constantemente a ser produzidos, principalmente na forma de ROS e RNS, tendo como principal fonte os organelos citoplasmáticos que metabolizam o oxigénio e o azoto (Valko *et al.*, 2007; Ferreira & Abreu, 2007; Goetz & Luch, 2008).

Na tabela 3 encontram-se descritos os principais radicais livres na forma de ROS e RNS.

**Tabela 3** - Principais Espécies Radicalares (Fonte: Magalhães, 2009)

Radicais livres	
$O_2^{\bullet}$	Radical superóxido
$HO_2^{\bullet}$	Radical hidroperóxido
$HO^{\bullet}$	Radical hidróxido
$RO^{\bullet}$	Radical alcóxido
$ROO^{\bullet}$	Radical peróxido
$NO^{\bullet}$	Radical monóxido de azoto
$NO_2^{\bullet}$	Radical dióxido de azoto

Estes radicais são geralmente instáveis e muito reactivos. Os radicais livres que derivam de moléculas de oxigénio ( $O_2$ ), geralmente conhecidos como ROS, representam a classe mais importante de espécies de radicais originada nos sistemas biológicos (Miller *et al.*, 1990).



Os radicais livres apresentam diferentes mecanismos de acção através de determinadas reacções que levam à produção de ROS e RNS, os quais estão envolvidos em várias doenças.

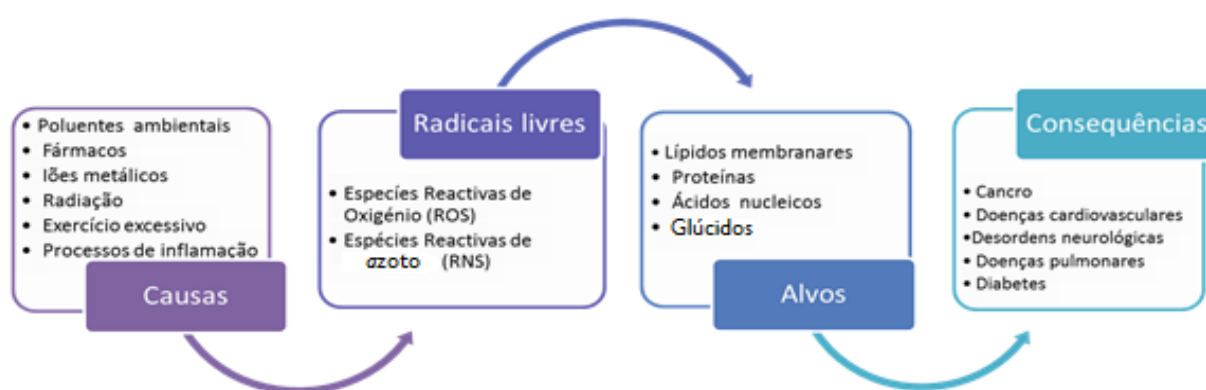
As mitocôndrias constituem uma das principais fontes de ROS, mas são também um dos primeiros alvos de ataque destes radicais e onde existe um maior número de defesas antioxidantes (McCord, 2000; Abreu *et al.*, 2000).

#### 1.4.2. O stresse oxidativo

Em organismos aeróbios, os radicais livres, sobretudo ROS, são constantemente produzidos durante o funcionamento normal da célula. Uma vez produzidos, a maior parte dos radicais livres são removidos pelas defesas antioxidantes da célula (enzimas e moléculas não enzimáticas) (Valko *et al.*, 2007).

Em concentrações baixas ou moderadas, os ROS podem ser benéficos para a célula, estando envolvidos em vários processos fisiológicos de sinalização e de regulação. Todavia, o equilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes pode ser destruído quer pela produção excessiva de radicais livres quer pela perda das defesas antioxidantes da célula. Este desequilíbrio é conhecido como stresse oxidativo (Ferreira *et al.*, 2009).

O stresse oxidativo pode ter causas naturais, como o que ocorre em situações de exercício físico intenso, ou em processos de inflamação, mas pode também ter causas não naturais como a presença de xenobióticos no organismo ou em situações relacionadas com várias doenças (Ferreira & Abreu, 2007).



**Figura 4** - As principais causas relacionadas com o excesso de produção de radicais livres (stresse oxidativo), possíveis alvos celulares e consequências associadas ao stresse oxidativo (Fonte: Ferreira & Abreu, 2007).

De facto, conforme consta na Figura 4, os radicais livres podem reagir com diversas macromoléculas celulares, tais como, os ácidos nucleicos, lípidos, glucidos ou proteínas, o que resulta na formação de diversos produtos de oxidação. Deste modo, o stresse oxidativo pode estar envolvido em processos de mutagénese, carcinogénese, processos inflamatórios, envelhecimento, entre outros (Ferreira & Abreu, 2007).

As principais consequências do stresse oxidativo são, sobretudo, a peroxidação lipídica, a danificação do DNA e a oxidação das proteínas.

A cadeia respiratória é composta por proteínas transmembranares existentes na membrana mitocondrial interna, sendo que a formação de ROS ocorre perto da membrana. Assim, os ROS têm fácil acesso aos lípidos da membrana, especialmente sensíveis a fenómenos de ataques de radicais livres. Este ataque denomina-se peroxidação lipídica, promovendo também, por sua vez, a formação de vários tipos de ROS (Mehrotra *et al.*, 1991; McCord, 2000).

Como consequência da peroxidação lipídica pode ocorrer alterações da fluidez, permeabilidade e integridade das membranas e “*Cross-linking*” das proteínas das membranas celulares (Abreu *et al.*, 2000; McCord, 2000; Ferreira & Abreu, 2007).

A danificação do DNA constitui outro resultado do stresse oxidativo. Os danos oxidativos causados por ROS e RNS envolvem a alteração de bases, perda de bases, fragmentação e ligações cruzadas do DNA, desempenhando um papel importante nos processos de mutagénese e de carcinogénese (Poulsen *et al.*, 1998; Magalhães *et al.*, 2009).

O stresse oxidativo conduz, também, à oxidação das proteínas. A exposição das proteínas a ROS leva à alteração das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos, conversão das proteínas em formas de elevado peso molecular (“*Cross-linking*” entre proteínas), e fragmentação da cadeia peptídica, alterando a função dessas proteínas (Stadman & Berlett, 1997; Magalhães *et al.*, 2009).

#### **1.4.3. O contributo dos cogumelos contra o stresse oxidativo**

Alguns produtos naturais com actividade antioxidante podem ser úteis no auxílio do sistema protector endógeno e podem constituir um sistema exógeno de defesa, reduzindo o dano oxidativo. Nesta perspectiva, os cogumelos comestíveis assumem um papel importante uma vez que apresentam na sua composição potentes antioxidantes.

Jayakumar *et al.*, 2009 determinaram a actividade antioxidante do cogumelo *Pleurotus ostreatus* e demonstraram que na concentração de 10 mg/mL, o extracto etanólico de

cogumelo ostra mostrou uma actividade antioxidante superior ao antioxidante sintético BHT.

Estudos recentes focam-se, também, na determinação do teor de compostos fenólicos totais e na determinação da actividade antioxidante de vários cogumelos comercializados, existindo uma relação directa. Um estudo realizado aos extractos metanólicos de algumas espécies de cogumelos comestíveis comercializadas em Portugal, tais como, *Agaricus bisporus* (branco), *Agaricus bisporus* (castanho), *P. ostreatus*, *P. eryngii* e *Lentinula edodes*, revelou que estas espécies possuem um efeito bloqueador nos radicais DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), inibem a peroxidação lipídica e possuem um forte poder redutor (Reis et al., 2012b).

Estudos similares com outros cogumelos, incluindo, *Dictyophora indusiata*, *Tricholoma giganteum*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus cystidiosus* e *Pleurotus ostreatus*, mostraram que estes cogumelos também possuem as propriedades antioxidantes acima mencionadas, além de apresentarem um efeito bloqueador de radicais hidroxilo e a capacidade de quelar metais.

Por conseguinte, é provável que a maioria dos cogumelos possuam um efeito bloqueador de radicais hidroxilo e DPPH•, a capacidade de quelar metais, de inibir a peroxidação lipídica e tenham um forte poder de redução (Mau et al, 2001; Mau et al, 2002; Yang et al., 2002; Jayakumar et al., 2009).

Nos vários estudos verifica-se que a actividade antioxidante presente nos cogumelos está relacionada, principalmente, com o seu elevado teor de compostos fenólicos totais, sendo reconhecidos como excelentes antioxidantes devido à sua capacidade para bloquear radicais livres por transferência de um único electrão e às excelentes propriedades redox dos seus grupos hidroxilos fenólicos (Cheung, 2008; Kim et al. 2008; Jayakumar et al., 2009).

#### **1.4.4. Compostos Antioxidantes**

De uma maneira geral, o termo antioxidante é usado para classificar moléculas que estão presentes em baixas quantidades relativamente ao substrato que é oxidável, e que reagem rapidamente de maneira a suprimir ou a prevenir a sua oxidação (Magalhães, 2009).

O nosso organismo possui defesas endógenas, nas quais se incluem enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, entre outras), que existem tanto no meio intracelular como no meio extracelular. Para além das defesas endógenas existe uma panóplia de moléculas naturais ou sintéticas com

propriedades antioxidantes e que podem ser úteis no auxílio do sistema protector endógeno (Ferreira & Abreu, 2007).

O *Pleurotus ostreatus*, bem como outras espécies de cogumelos comestíveis, constitui uma óptima fonte de antioxidantes naturais, apresentando na sua constituição compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides), seguido por tocoferóis (principalmente, o  $\alpha$ -tocoferol), o ácido ascórbico e carotenóides, sobretudo o  $\beta$ -caroteno. Estes compostos foram quantificados em várias espécies de cogumelos, principalmente, da Finlândia, da Índia, da Coreia, da Polónia, de Taiwan, da Turquia e de Portugal (Ferreira *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2009).

Os teores destes compostos presentes em algumas espécies, incluindo no *Pleurotus ostreatus*, encontram-se referenciados nas tabelas 4 e 5.

**Tabela 4** - Teor de fenóis totais expresso em equivalentes de ácido gálico (GAE) no *P. ostreatus* e em outras espécies de cogumelos utilizando o método *Folin-Ciocalteu*. <sup>a</sup> Amostras secas em estufa; <sup>b</sup> Amostras liofilizadas.

Espécie	Fenóis totais (mg GAE/g extracto)	Referências
<i>P. ostreatus</i> <sup>a</sup>	15,7	(Yang <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. cystidiosus</i> <sup>a</sup>	10,24	
<i>L. edodes</i> <sup>a</sup>	9,11	
<i>F. velutipes</i> (amarelo) <sup>a</sup>	9,26	
<i>F. velutipes</i> (branco) <sup>a</sup>	8,38	
<i>P. ostreatus</i> <sup>a</sup>	54,90	(Jayakumar <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. ostreatus</i> <sup>a</sup>	42,47	(Chirinag & Intarapichet, 2009)
	30,93	
<i>P. eryngii</i> <sup>a</sup>	37,98	
	29,30	
<i>P. ostreatus</i> <sup>b</sup>	12,45	(Reis <i>et al.</i> , 2012b)
<i>P. eryngii</i> <sup>b</sup>	7,14	
<i>A. bisporus</i> (branco) <sup>b</sup>	23,34	
<i>A. bisporus</i> (castanho) <sup>b</sup>	37,33	
<i>L. edodes</i> <sup>b</sup>	8,84	

**Tabela 5** - Teor de tocoferóis,  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico e  $\beta$ -caroteno presente no *P. ostreatus* e em outras espécies.

Espécie	Tocoferóis (mg/g)	$\alpha$ -tocoferol (mg/g)	Ácido ascórbico (mg/g)	$\beta$ -caroteno (mg/g)	Referências
<i>A. arvenses</i>			0,02		(Barros et al., 2008b)
<i>A. bisporus</i>	-	-	0,03	-	
<i>A. romagnesii</i>			0,04		
<i>P. ostreatus</i>	0,27				(Yang et al., 2002)
<i>P. cystiosus</i>	0,45	-	-	-	
<i>L. edodes</i>	0,13				
<i>A. bisporus</i>			0,03	1,95	(Barros et al., 2008a)
<i>Cantharellus cibarius</i>	-	-	0,86	13,56	
<i>Marasmius oreades</i>			ND	1,99	
<i>P. ostreatus</i>	-	0,30	0,25	0,031	(Jayakumar et al., 2009)

#### 1.4.4.1. Compostos fenólicos

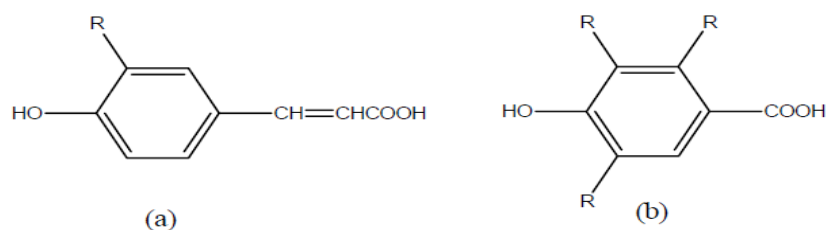
Os compostos fenólicos encontram-se em maiores teores nos vegetais e plantas. Apresentam propriedades antioxidantes e a sua presença também contribui para as propriedades organolépticas dos alimentos, como a cor, o sabor e o aroma (Magalhães, 2009).

Incluem um grande número de subclasses, tais como, os flavonóides, os ácidos fenólicos, estilbenos, lignanas, taninos e cumarinas, exibindo uma grande diversidade de estruturas (Ferreira et al., 2009). Os flavonóides representam o sub-grupo mais comum e amplamente distribuído (Bravo, 1998). Todavia, no caso particular dos cogumelos, os ácidos fenólicos constituem os principais compostos fenólicos presentes na sua constituição (Ferreira et al., 2009).

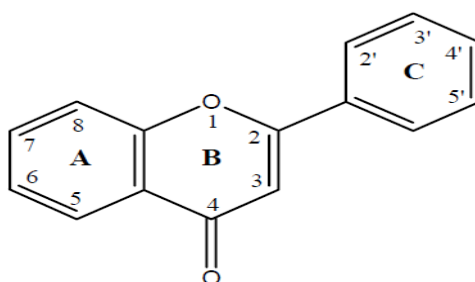
Este conjunto de compostos tem na sua constituição básica um ou mais anéis benzénicos hidroxilados e as suas propriedades antioxidantes estão relacionadas com as suas características estruturais, nomeadamente, o número e as posições dos grupos hidroxilo e metoxilo no anel, a extensão da conjugação estrutural e a presença de grupos dadores ou aceitadores de densidade electrónica no anel aromático (Ferreira et al., 2009).

Os ácidos fenólicos (Figura 5) encontram-se, frequentemente, esterificados e dividem-se em derivados do ácido benzóico e derivados do ácido cinâmico (Campos, 1999).

Todos os flavonóides possuem uma estrutura base C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, em que dois dos anéis da molécula são anéis aromáticos. Estes compostos possuem como estrutura base, a flavona (Figura 6) ou uma forma hidrogenada dessa estrutura (Martinez-Flórez *et al.*, 2002).



**Figura 5** - Estruturas químicas para os ácidos fenólicos derivados do: (a) - ácido cinâmico e (b) - ácido benzóico (Fonte: Campos, 1999).



**Figura 6** - Estrutura base para os flavonóides (Fonte: Sandhar, 2011).

A elevada actividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se à sua capacidade para captar os radicais livres que têm origem nas células e que são o resultado de factores ambientais (García *et al.*, 2000; Echavarría *et al.*, 2009). Assim, o mecanismo de acção destes compostos permite desempenhar um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares, determinados tipos de cancro, doenças neurodegenerativas e diabetes (Scalbert *et al.*, 2005).

#### 1.4.4.2. Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol)

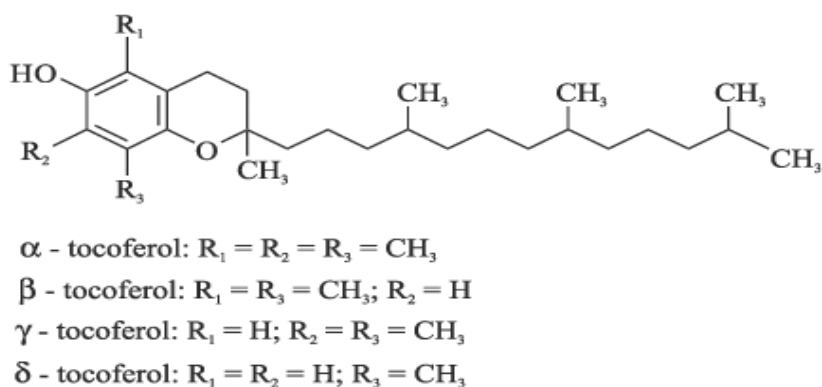
A vitamina E é o termo usado para designar uma família de compostos lipossolúveis, quimicamente relacionados, nomeadamente, tocoferóis e tocotrienóis, os quais partilham uma estrutura comum com um anel cromanol e uma cadeia lateral de unidades isopreno. O grupo hidroxilo (OH) situado no anel cromanol, tanto nos tocoferóis como nos tocotrienóis, é um centro da actividade antioxidante da vitamina (Palace & Werner, 2006).

Nos cogumelos apenas foram detectados e quantificados tocoferóis, nomeadamente, o  $\alpha$ -tocoferol e o  $\gamma$ -tocoferol. O  $\alpha$ -tocoferol foi reportado como um composto abundante na espécie *Pleurotus ostreatus*, enquanto que o  $\gamma$ -tocoferol foi reportado em outras espécies de cogumelos, nomeadamente, *G. licidum*, *G. licidum antler* e *G. tsugae* (Jayakumar *et al.*, 2009).

O  $\alpha$ -tocoferol é referenciado como um importante antioxidante que desempenha um papel vital em vários estágios da carcinogénese através da sua contribuição para a imunocompetência e a redução do dano oxidativo do DNA (Jayakumar *et al.*, 2009).

A vitamina E actua ao nível da protecção do nosso organismo contra anomalias degenerativas, sobretudo, as doenças cardiovasculares e o cancro, devido à sua capacidade de captar os radicais livres (Fang *et al.*, 2002).

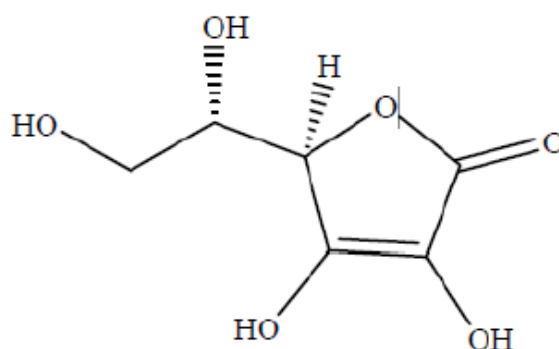
Os tocoferóis (Figura 7) possuem a capacidade de inibir a produção de radicais peróxido lipídicos induzida pelas ROS. Esta acção permite proteger as células da peroxidação dos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) na membrana fosfolipídica, de danos oxidativos das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), de proteínas celulares e DNA, e da degeneração da membrana (Fang *et al.*, 2002).



**Figura 7** - Estrutura química dos tocoferóis (Fonte: Ramalho *et al.*, 2006).

#### 1.4.4.3. Ácido ascórbico (Vitamina C)

O termo vitamina C é uma denominação genérica para todos os compostos que apresentam a actividade biológica do ácido ascórbico. Este último é amplamente encontrado nos alimentos e possui maior poder antioxidante. O ácido ascórbico constitui uma vitamina hidrossolúvel abundante nos cogumelos (Yi *et al.*, 2009), sendo, quimicamente, uma  $\gamma$ -lactona com um grupo enodiol nas posições  $C_2$  e  $C_3$  como se encontra representado na Figura 8 (Lehninger *et al.*, 2008).



**Figura 8** - Estrutura química do ácido L-ascórbico (Batista, 2012)

O ácido ascórbico actua como um antioxidante muito eficaz que pode proteger as moléculas indispensáveis para o organismo dos danos oxidativos causados pelos radicais livres (Yi *et al.*, 2009). Outra função importante do ácido ascórbico diz respeito à sua capacidade de regenerar o  $\alpha$ -tocoferol e, por conseguinte, actuar no mecanismo protector contra a peroxidação lipídica (Ames, 1993; Beyer, 1994).

As características bioquímicas e funções farmacológicas do ácido ascórbico permitem, assim, prevenir a ocorrência e desenvolvimento de algumas doenças crónicas, nomeadamente, as doenças cardiovasculares, o cancro e as cataratas (Yi *et al.*, 2009).

#### 1.4.4.4. $\beta$ - Caroteno

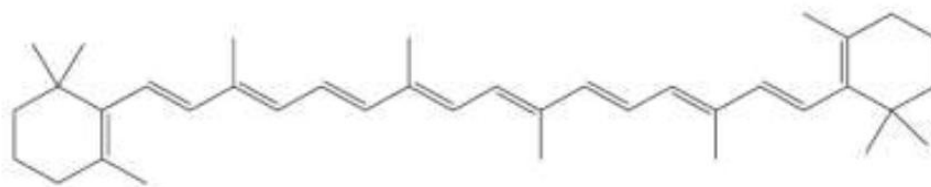
Os carotenóides são isoprenóides, constituídos na sua maioria por 8 unidades de isoprenos, formando uma longa cadeia que pode conter de 2 a 15 duplas ligações conjugadas, sendo que isto permite várias configurações *cis* e *trans* (Rao & Rao, 2007).

A quantidade de ligações duplas conjugadas, presentes nas moléculas dos carotenóides, interfere na acção captadora de radicais livres. Os carotenóides reagem com os radicais livres, principalmente com os radicais peróxidos e com o oxigénio molecular, sendo esta a base da sua acção antioxidante. É importante referir, também, que os carotenóides exercem funções benéficas na prevenção de doenças cardiovasculares, o cancro e a osteoporose (Rao & Rao, 2007).

A molécula de  $\beta$ -caroteno actua ao nível das fases lipídicas, impedindo que os radicais livres danifiquem as membranas lipoprotéicas (Sies e Stahl, 1995). Dessa forma, este composto actua como precursor da vitamina A na dieta, sendo o mais importante precursor dessa vitamina (Handelman, 2001).



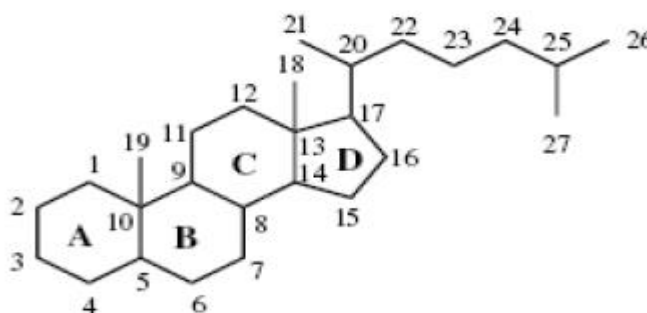
A reactividade química e as propriedades de absorção de luz que a molécula de  $\beta$ -caroteno apresenta devem-se à sua estrutura química formada por uma longa cadeia de ligações duplas conjugadas (Figura 9) (Lehninger *et al.*, 2008; Pereira, 2011)



**Figura 9** - Estrutura química do  $\beta$ -caroteno (Fonte: EFSA, 2012)

### 1.5. Os esteróis

Os esteróis constituem um grupo de moléculas lipossolúveis e são compostos que pertencem à classe dos esteróides, que são constituídos por um núcleo esteróide resultante da fusão de quatro anéis de hidrocarbonetos com um grupo  $3\beta$ -hidroxilo, denominado ciclopentanoperidrofenantreno, e uma cadeia lateral alifática de 8 ou mais átomos de carbonos ligada ao núcleo esteróide na posição  $C_{10}$  (Figura 4) (Fahy *et al.*, 2005).



**Figura 10** - Representação da fórmula geral dos esteróides (Fonte: Casimir, 2008)

Os esteróis são resistentes à saponificação e encontram-se em quantidades consideráveis em todos os tecidos animais, plantas e fungos.

Os esteróis contêm um grupo hidroxilo na posição  $C_3$  e podem possuir uma cadeia formada por 27 a 29 átomos de carbono. As principais diferenças nos esteróis incluem o número, a localização e a orientação das duplas ligações e das cadeias laterais. (Fahy *et al.*,

2005). As principais diferenças nos esteróis dos fungos, algas e plantas estão relacionadas com a variação das cadeias laterais (Moore, 1993).

### **1.5.1. O papel fisiológico dos esteróis**

Os esteróis desempenham um papel fisiológico importante na medida em que são compostos vitais da membrana plasmática, desempenhando um papel crítico ao nível da manutenção da estrutura e viabilidade das células. O papel biofísico primário dos esteróis consiste em manter o espaçamento entre as moléculas fosfolipídicas da bicamada lipídica da membrana plasmática, a fim de restringir as forças de *Van der Waals* (Brumfield, 2009).

A temperaturas elevadas, a bicamada lipídica pode enfraquecer e tornar-se demasiado líquida, enquanto que a temperaturas mais baixas pode tornar-se demasiado rígida e solidificar. Porém, a presença de esteróis impede a solidificação a baixas temperaturas bem como a fusão ou enfraquecimento da membrana a temperaturas elevadas. Desta forma, a manutenção da fluidez da membrana plasmática continua a ser um papel vital e bem definido dos esteróis. (Solomon *et al.*, 2008; Brumfield, 2009).

O principal esteroide que se encontra nas membranas das várias espécies fúngicas é o ergosterol. Este esteroide desempenha um papel muito importante nas vias de biossíntese dos lípidos, havendo vários processos de biossíntese de fosfolípidos regulados pelo ergosterol.

Os fungos e os vertebrados sintetizam os esteróis através do lanosterol, como intermediário, enquanto que as plantas sintetizam os esteróis utilizando o cicloartenol como intermediário. Existe uma diferença evolutiva entre os esteróis encontrados nos mamíferos, fungos, plantas superiores, algas e alguns protozoários (Bloch, 1983).

### **1.5.2. Ergosterol**

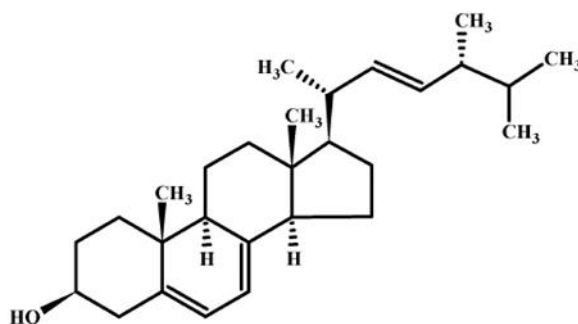
#### **1.5.2.1. Caracterização química**

O ergosterol é o principal esteroide presente nas células ou membranas miceliais da grande maioria dos fungos. Os maiores níveis deste composto encontram-se nas camadas fosfolipídicas da membrana fúngica (Peacock & Goosey, 1989), onde o ergosterol desempenha uma importante função estrutural e hormonal na progressão do ciclo celular (Goad, 1994).

O ergosterol está presente em duas formas fundamentais, nomeadamente, como ergosterol livre e ergosterol esterificado, sendo que os seus teores variam de acordo com a espécie de cogumelo (de Sio *et al.*, 2000).

O ergosterol ou provitamina D<sub>2</sub>, cujo nome químico é 5,7,22 ergostatrien-3β-ol apresenta a fórmula empírica C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O e a massa molecular relativa de 386,64 g/mol (Cahagnier, 1988). O ergosterol é um composto sólido, cristalino, incolor e com um ponto de fusão na ordem dos 161-166°C. No vácuo, suporta a temperatura de 250°C, sem decomposição (Ferreira, 1985).

O ergosterol (Figura 11), possui uma cadeia lateral com uma dupla ligação em C<sub>22</sub> e duas ligações duplas ao nível das posições C<sub>5</sub> e C<sub>7</sub> (anel B), sendo responsáveis pelo máximo de absorção na gama UV entre 300 a 240 nm. Em muitos dos outros esteróis, a ligação dupla em C<sub>7</sub> está ausente, sendo a sua absorção na gama UV mais baixa (Cahagnier, 1988).



**Figura 11** - Estrutura química de uma molécula de ergosterol (Yuan *et al.*, 2006).

A estrutura da molécula de ergosterol é bem conhecida. O oxigénio faz parte de um grupo hidroxilo na posição C<sub>3</sub>, a partir do qual se podem obter ésteres. A molécula tem três duplas ligações pelo que pode ser hidrogenada cataliticamente e fixar seis átomos de hidrogénio. É um composto quimicamente pouco estável. Os ácidos causam-lhe alteração na posição das duplas ligações, sendo que com o oxigénio dá origem a peróxidos e com o hidrogénio origina diferentes compostos desidrogenados (Ferreira, 1985).

Este composto é praticamente insolúvel em água, mas apresenta boa solubilidade em solventes orgânicos. Além disso, possui boa estabilidade na manipulação laboratorial, principalmente, quando conservado em meio alcalino (Gessner & Shmitt, 1996) e protegido da luz ultravioleta (Schwadorf & Muller, 1989).

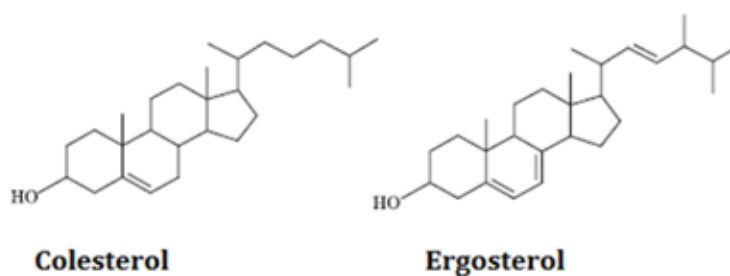
O ergosterol é termoestável, mas fotossensível uma vez que sob influência da luz ultravioleta, o anel diénico B abre-se, originando o ergocalciferol (vitamina D<sub>2</sub>), a mais importante das pró-vitaminas D. Os máximos de absorção do ergosterol dissolvido em

etanol absoluto situam-se nos comprimentos de onda de 262, 271, 282 e 293 nm, sendo a sua absorção máxima obtida a 282 nm (Solomons, 1990).

### 1.5.2.2. Ergosterol versus colesterol

A estrutura química do ergosterol é diferente da estrutura química do colesterol (Figura 12). O ergosterol apresenta um grupo metilo na posição  $C_{24}$  na cadeia lateral e duas ligações duplas na posição  $C_7$  e  $C_{22}$ . Além disso, o ergosterol apresenta uma cadeia insaturada e o colesterol uma cadeia saturada (Souza & Rodrigues, 2009).

Estas diferenças estruturais constituem a resposta a alguns requisitos específicos relacionados com a fisiologia dos organismos que contêm o ergosterol como esterol principal (Weete & Gandhi, 1997; Cordeiro, 2009).



**Figura 12** - Estrutura dos principais esteróis em mamíferos e em fungos, colesterol e ergosterol, respectivamente (Fonte: Cordeiro *et al.*, 2009).

A caracterização biofísica do colesterol já se encontra bem documentada, porém, o efeito do ergosterol na organização e dinâmica da membrana não foi estudada em profundidade (Coutinho *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006a; Cordeiro, 2009). Estudos de Schrivastava & Chattopadhyay (2007) demonstram que o efeito do ergosterol na dinâmica e organização da membrana é diferente da exercida pelo colesterol.

### 1.5.2.3. As funções do ergosterol

O ergosterol é um composto fundamental a nível da arquitectura da membrana citoplasmática dos fungos. Devido à sua estrutura e natureza, o ergosterol aumenta a microviscosidade da membrana e participa, juntamente com os fosfolípidos, na regulação das trocas trans-membranares (Cahagnier, 1988; Peacock *et al.*, 1989). Além disso, o ergosterol encontra-se igualmente presente a nível da membrana mitocondrial dos fungos, parecendo

haver uma estreita relação entre a sua presença e a respiração dos fungos, em particular das leveduras (Cahagnier, 1988).

Os corpúsculos citoplasmáticos presentes a nível da zona apical das hifas e que desempenham um papel fundamental na biossíntese da membrana celular dos fungos são constituídos por ésteres de esteróis, bem como esteróis livres, particularmente por ergosterol. Além desta função, o controlo das várias fases desde a estimulação à germinação do esporo, bem como o controlo da esporulação das hifas conidiogénicas, encontra-se parcialmente dependente de certos esteróis, entre eles o ergosterol (Cahagnier, 1988),

A acção do ergosterol a nível da microviscosidade da membrana dos fungos influencia a fluidez e o movimento molecular dos restantes lípidos, que por sua vez, modulam a actividade de enzimas da membrana, como ATPases e sintetases. Assim, a biossíntese do ergosterol é essencial para o normal crescimento e desenvolvimento fisiológico da célula fúngica (Peacock *et al.*, 1989).

Vários processos de biossíntese de fosfolípidos são regulados pelo ergosterol. A composição dos fosfolípidos é afectada pela taxa de transferência de fosfolípidos pela proteína fosfatidilinositol (PITP) quando estimulada pelo ergosterol (Szolderits *et al.*, 1989).

O ergosterol livre e o ergosterol esterificado desempenham funções distintas. O ergosterol livre é mais importante para a integridade das células e contribui para uma variedade de funções celulares. Porém, os ésteres do ergosterol, captados pelas partículas lipídicas citosólicas, constituem uma forma de armazenamento inerte de esteróis e podem servir de intermediários para o fornecimento de ergosterol (Yuan *et al.*, 2007).

#### **1.5.2.4. A Conversão do ergosterol dos cogumelos em vitamina D<sub>2</sub>**

O ergosterol foi descoberto há mais de três décadas em cogumelos, no entanto, há apenas algumas investigações que têm sido realizadas sobre a conversão do ergosterol em vitamina D<sub>2</sub> em cogumelos (Jasinghe, 2005).

A vitamina D<sub>2</sub> é conhecida pelo seu papel na regulação dos níveis de cálcio e de fósforo (Shao *et al.*, 2010), constituindo uma forma de vitamina D que pode ser fornecida a partir de cogumelos, sendo que essa forma apresenta vantagens notáveis em relação à vitamina D<sub>3</sub>. A vitamina D<sub>2</sub> é mais eficaz na mineralização óssea do que a vitamina D<sub>3</sub> (Tjellesen *et al.*, 1985), além disso, a primeira consegue ser menos tóxica que a segunda (Mehta & Metha, 2002).

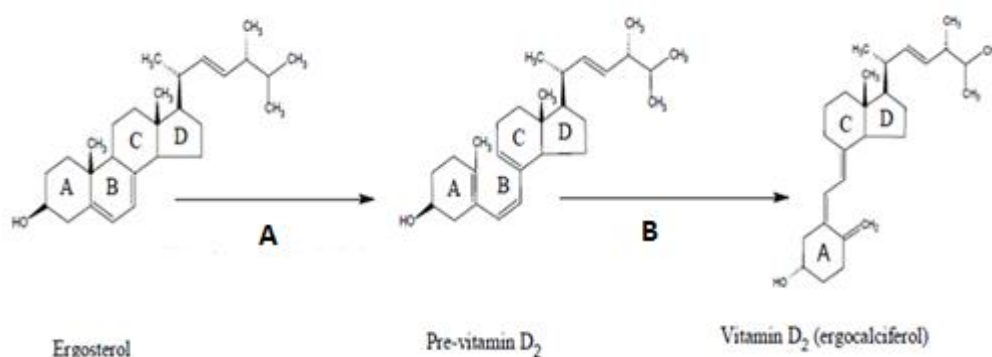
Na natureza, uma quantidade limitada de vitamina D<sub>2</sub> foi detectada em alguns cogumelos silvestres comestíveis, no entanto, os cogumelos comestíveis cultivados demonstraram serem desprovidos de vitamina D<sub>2</sub> (Mattila *et al.*, 1994; Mattila *et al.*, 2002; Jasinghe & Perera, 2004).

Naturalmente, os cogumelos silvestres podem ser expostos à radiação UV, que compreende 8-9% do espectro solar total (Hollosoy, 2002), sendo que isto poderá constituir a razão para a presença de uma quantidade limitada de vitamina D<sub>2</sub> em cogumelos selvagens. Os cogumelos cultivados, comercialmente disponíveis, não podem ser expostos à luz solar, o que é essencial para a produção natural da vitamina D<sub>2</sub>. No entanto, o ergosterol existente nos cogumelos pode ser convertido em vitamina D<sub>2</sub> por irradiação UV (Mau *et al.*, 1998; Jasinghe & Perera, 2004).

O efeito da fonte de luz UV foi evidenciado como sendo um factor importante na conversão de ergosterol. Mau *et al.* (1998) estudou a conversão do ergosterol em vitamina D<sub>2</sub> em cogumelos sob radiação UV, tendo-se verificado que a conversão foi superior através da radiação UV-B comparado com a radiação UV-C. Porém, este autor não estudou o efeito da radiação UV-A, a qual representa aproximadamente 6,3% da radiação solar incidente (Hollosoy, 2002), sobre a conversão de ergosterol em vitamina D<sub>2</sub>, nos cogumelos.

Além da radiação UV, outros factores, como o teor de humidade e a temperatura da radiação dos cogumelos desempenham um papel importante nesta conversão, sobretudo ao nível do rendimento.

Na figura 13, encontra-se representado o mecanismo de conversão do ergosterol em vitamina D<sub>2</sub>, nos cogumelos.



**Figura 13** - O mecanismo de conversão do ergosterol em vitamina D<sub>2</sub>. (A) Clivagem fotoquímica do anel B por UV; (B) Rearranjo térmico (Fonte: Horst & Reinhardt, 1997).

A clivagem fotoquímica do anel B do ergosterol ocorre sob radiação UV e, em seguida, o intermediário (pré-vitamina D<sub>2</sub>), sofre um rearranjo térmico com formação da vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol). No entanto, a pré-vitamina D<sub>2</sub> também absorve a radiação UV, sendo que a irradiação prolongada pode levar à produção por fotoisomeração de subprodutos indesejáveis, nomeadamente, o taquistero e o lumisterol (Braun *et al.*, 1991).

Resultados de um estudo (Jasinghe, 2005), demonstraram que a vitamina D<sub>2</sub> não foi detectada nas várias espécies cultivadas, nomeadamente, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus cystidus* e *Flammulina velutipes*. Todavia, a orientação dos cogumelos para a fonte de radiação foi muito importante na conversão do ergosterol de vitamina D<sub>2</sub>, sendo que os cogumelos devem ser irradiados com as lâminas voltadas para a fonte de luz UV de forma a maximizar a conversão do ergosterol em vitamina D<sub>2</sub>.

A temperatura de radiação e o teor de humidade dos cogumelos também desempenharam um papel importante nesta conversão. O teor de humidade nos cogumelos frescos verificou-se ser cerca de 89 %, enquanto que o teor de humidade óptimo dos cogumelos para a conversão do ergosterol em vitamina D<sub>2</sub> foi cerca de 70 % a 80 %. Desta forma, aproximadamente 10 % a 15 % de humidade deve ser removida dos cogumelos frescos antes de serem submetidos a um tratamento de radiação UV (Jasinghe, 2005).

Além destes factores, o rendimento da conversão do ergosterol em vitamina D<sub>2</sub>, nos cogumelos, foi estudada sob as radiações UV-A, UV-B e UV-C, verificando-se que a radiação UV-C é mais eficaz do que a conversão sob radiação UV-A (Jasinghe, 2005).

Desta forma, o pó de cogumelo irradiado rico em vitamina D<sub>2</sub> pode ser usado na fortificação de alimentos. Embora a vitamina D<sub>2</sub> seja uma vitamina lipossolúvel, a partir do pó de cogumelo pode ser incorporada em produtos alimentares sem uma base de gordura. Esta constitui uma vantagem deste produto ao ser usado como um suplemento de vitamina D, uma vez que a sua incorporação nos alimentos não altera o valor calórico ou a composição do alimento fortificado de forma significativa (Jasinghe, 2005).

Além disso, o pó de cogumelo irradiado pode ser utilizado na indústria farmacêutica para desenvolver comprimidos de vitamina D<sub>2</sub> com o objectivo de erradicar a deficiência de vitamina D na população afectada (Jasinghe, 2005).

### 1.5.2.5. Fontes de ergosterol

O ergosterol é o principal esteroide existente nas camadas fosfolipídicas da membrana celular dos fungos, encontrando-se presente em quase todos os fungos pertencentes aos chamados fungos verdadeiros (eumicetos) (Peacock & Goosey, 1989).

O ergosterol é abundante nos cogumelos comestíveis, nas borras de leveduras dos vinhos e nos cogumelos medicinais, nomeadamente, *Ganoderma lucidum* e *Cordyceps sinensis*. Todavia, o ergosterol é um composto ausente ou minoritário na maior parte das plantas superiores (vasculares) (Kuo et al., 2011).

O ergosterol encontra-se, também, presente nas membranas da parede celular das leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e das mitocôndrias, sendo, também, um constituinte das membranas nos micélios, esporos e células vegetativas (Pasanen et al., 1999).

O cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* apresenta um teor considerável de esteróides, sendo o ergosterol o mais importante, rondando os 70% do total dos esteróides presentes na matriz fúngica. A presença de ergosterol foi verificada tanto em cogumelos silvestres como em cogumelos cultivados (Mattila et al., 2002).

Segundo a literatura, o teor de ergosterol varia de acordo com a espécie de cogumelo, dentro da mesma espécie e os diferentes cultivares e com a idade da cultura (Pasanen et al., 1999; Jasinghe, 2005).

Estudos também evidenciaram que a concentração de esteróides nos cogumelos, nomeadamente, o ergosterol, depende da parte do tecido e da fase de desenvolvimento em que o cogumelo se encontra (Jasinghe, 2005). Por exemplo, a concentração de ergosterol no cogumelo *Shiitake* foi maior na fase inicial de crescimento, mas diminuiu quando o cogumelo cresceu. Além disso, a distribuição do ergosterol variou em diferentes partes do cogumelo *Shiitake*, sendo que as lâminas dos cogumelos apresentaram o maior teor de ergosterol (Tabela 6), seguido pelo chapéu e a menor quantidade foi encontrada no caule (pé) do cogumelo (Jasinghe, 2005).

Além das características genéticas específicas, o teor de ergosterol depende de factores ambientais, tais como, a luz, o calor, a temperatura, a humidade, a concentração de acetato de sódio e o tipo substrato utilizado (Savón et al., 2002).

Estudos demonstraram que a concentração do ergosterol na biomassa dos fungos aumentava com a quantidade de luz recebida durante o período de frutificação, sendo que os resultados revelaram esse acréscimo no caso dos corpos de frutificação do *Pleurotus*



*ostreatus*, o que abre novas possibilidades para abordar com maior profundidade o potencial desta espécie (Savón *et al.*, 2002).

Também foi evidenciado que o teor de ergosterol em cogumelos cultivados varia de acordo com a composição do meio de cultura (Jasinghe, 2005). Mattila *et al.* (2002) verificaram que o teor de ergosterol foi superior em cogumelos cultivados (6,02-6,79 mg/g de matéria seca) do que em cogumelos selvagens (2,96-4,89 mg/g de matéria seca).

Na tabela 6 é possível observar os teores de ergosterol livre, esterificado e total, existentes em várias espécies de cogumelos e nos diferentes tecidos, determinados através de diferentes métodos de quantificação.

**Tabela 6** - Concentração de ergosterol livre, ergosterol esterificado e ergosterol total (mg/g de matéria seca) em várias espécies de cogumelos comestíveis e respectivos tecidos. I – Amostras cultivadas; <sup>a</sup>Amostras secas em estufa; <sup>b</sup>Amostras liofilizadas.

Espécie	Tecido	Ergosterol livre (mg/g)	Ergosterol esterificado (mg/g)	Ergosterol total (mg/g)	Métodos de Quantificação	Referências		
<i>A. aegerita</i> <sup>1,a</sup>	Chapéu	3,51	0,43	3,94	HPLC-DAD	(Yuan et al., 2008)		
	Lâminas	1,44	1,98	3,42				
	Caule/Pé	2,40	0,07	2,47				
<i>T. albuminosus</i> <sup>1,a</sup>	Chapéu	2,15	0,37	2,52				
	Lâminas	1,70	1,00	2,70				
	Caule/Pé	4,02	0,61	4,63				
<i>L. edodes</i> <sup>1,a</sup>	Chapéu	1,11	0,17	1,28			HPLC-UV	(Jasinghe, 2005)
	Lâminas	3,69	0,34	4,03				
	Caule/Pé	1,25	0,13	1,38				
<i>L. edodes</i> <sup>1,b</sup>	Lâminas	10,6			HPLC-UV	(Jasinghe, 2005)		
	Chapéu	5,34						
	Caule/Pé	2,97						
<i>L. edodes</i> <sup>1,b</sup>	Corpo Frutífero	6,05			HPLC-UV	(Jasinghe, 2005)		
<i>Pleurotus ostreatus</i> <sup>1,b</sup>		4,40						
<i>Agaricus bisporus</i> <sup>1,b</sup>		7,80						
<i>Pleurotus cystidis</i> <sup>1,b</sup>		4,35						
<i>Flammulina velutipes</i> <sup>1,b</sup>		0,68						
<i>Cantharellus cibarius</i> <sup>1,b</sup>		2,61						
<i>Agaricus bisporus</i> <sup>1,b</sup>	3,06	Corpo Frutífero			GC-FID	(Gil-Ramirez et al., 2011)		
<i>Pleurotus ostreatus</i> <sup>1,b</sup>	3,75							
<i>Lentinula edodes</i> <sup>1,b</sup>	5,51							
<i>Boletus edulis</i> <sup>1,b</sup>	5,69							
<i>Amanita caesarea</i> <sup>1,b</sup>	3,81							
<i>Lactarius deliciosus</i> <sup>1,b</sup>	1,60							
<i>Lyophyllum shimeji</i> <sup>1,b</sup>	4,64							
<i>Acrocybe aegerita</i> <sup>1,b</sup>	5,11							
<i>Ganoderma lucidum</i> <sup>1,b</sup>	0,69							
<i>Craterellus cornucopioides</i> <sup>1,b</sup>	0,79							
<i>Marasmius oreades</i> <sup>1,b</sup>	3,85							
<i>Pleurotus eryngii</i> <sup>1,b</sup>	1,40							
<i>Lepiota procera</i> <sup>1,b</sup>	2,57							
<i>Agaricus blazei</i> <sup>1,b</sup>	1,73							
<i>Amanita ponderosa</i> <sup>1,b</sup>	1,65							
<i>Grifola</i>	3,24							

Tal como de pode verificar na Tabela 6, os teores de ergosterol variam consideravelmente de acordo com a espécie e o tecido fúngico. As diferenças entre as mesmas espécies poderão dever-se aos diferentes processos de tratamento da amostra bem

como às diferentes técnicas de quantificação utilizadas pelos autores referenciados, não esquecendo os factores ambientais que assumem um peso considerável no teor de ergosterol na matriz em estudo.

#### **1.5.2.6. Os benefícios para a saúde do ergosterol e dos seus produtos**

Estudos demonstraram que o ergosterol e os seus produtos de peroxidação podem contribuir para potenciais benefícios para a saúde e actividades farmacológicas significativas, nomeadamente, a actividade antioxidante, antimicrobiana e antitumoral. Além disso, estes compostos permitem reduzir a incidência de doenças cardiovasculares e da dor associada à inflamação através da inibição da enzima ciclo-oxigenase (Yuan *et al.*, 2007).

A actividade antitumoral do ergosterol pode ser devida à sua capacidade de inibir a angiogénese (desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes), induzida por tumores sólidos (Takaku *et al.*, 2001; Zaidman *et al.*, 2005; Slominski *et al.*, 2005).

O ergosterol é absorvido no tracto digestivo, acumulando-se nas glândulas suprarrenais e em outros órgãos, podendo ser metabolizado *in vivo* para gerar novos produtos bioactivos, tais como, o 17 $\alpha$ , 24 – dihidroxiergosterol, que se verificou ser capaz de inibir a proliferação das células da pele, em cultura, tal como foi demonstrado nos queratinócitos humanos e nas linhas celulares de melanoma (Slominski *et al.*, 2005).

Noutros estudos, o ergosterol foi isolado a partir da fracção lipídica do cogumelo *Agaricus brasiliensis*, onde se verificou haver redução do volume e inibição do crescimento tumoral em ratos com sarcoma 180 (Takaku *et al.*, 2001; Zaidman *et al.*, 2005).

Na determinação da actividade antioxidante dos componentes lipofílicos dos cogumelos foi reportado um estudo que investigou a inibição da peroxidação dos lipossomas pelo ergosterol proveniente do corpo de frutificação do cogumelo comestível da espécie *Agrocybe algerita*, que apresentou uma taxa de inibição na ordem dos 43% (Zhang *et al.*, 2003).

Outros estudos indicaram que o ergosterol livre era a única forma presente e o principal composto da fracção lipídica responsável pela actividade antioxidante do extracto de hexano do cogumelo *Agaricus bisporus* castanho, verificando-se que o teor de ergosterol está positivamente relacionado com a actividade antioxidante ( $r^2 > 0,89$ ) (Shao *et al.*, 2010).

O ergosterol também pode actuar como os fitoesteróis dos vegetais e reduzir a absorção do colesterol através do deslocamento da molécula a partir de micelas mistas formadas durante a digestão intestinal (Gil-Ramirez *et al.*, 2011).

Um metabolito que é vulgarmente encontrado nos cogumelos comestíveis é o peróxido de ergosterol, tendo vindo a tornar-se um composto muito promissor pelas suas propriedades imunossupressoras, anti-plasmodiais, anti-micobacterianas, anti-virais, anti-inflamatória e anti-tumoral (Ramos-Ligonio *et al.*, 2012).

A vitamina D<sub>2</sub>, referida anteriormente, é conhecida pelo seu papel na regulação dos níveis de cálcio e de fósforo (Greer & Marshall, 1989). Estudos clínicos demonstraram que os baixos níveis de D<sub>2</sub> têm sido associados a uma maior incidência de insuficiência cardíaca congestiva e aumento da mortalidade (Pilz *et al.*, 2008). Além disso, várias evidências científicas demonstraram uma relação protectora entre os teores aceitáveis de vitamina D no organismo e o menor risco do cancro colorretal, da mama, da próstata e dos ovários (Rossi *et al.*, 2009; Stolzenberg-Solomon *et al.*, 2009).

## **1.6. Métodos de pré-tratamento, extracção e quantificação**

### **1.6.1. Métodos utilizados para a determinação da actividade antioxidante em cogumelos *in vitro***

Evidências epidemiológicas crescentes do papel de alimentos ricos em compostos antioxidantes, na prevenção de certas doenças, têm conduzido ao desenvolvimento de um grande número de métodos para avaliar a capacidade antioxidante dos mesmos (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2006).

A capacidade antioxidante pode ser realizada por vários métodos, incluindo a remoção de um radical peroxil (ORAC - Capacidade de absorção de radicais de oxigénio, TRAP - Capacidade sequestradora de radicais livres), a capacidade de redução de metal (FRAP - Poder redutor férrico), a capacidade de remoção de radical orgânico (ABTS - ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), DPPH - peroxidação do 2,2-difenil-1-picrylhidrazil), e a quantificação de produtos formados durante a peroxidação dos lípidos (a oxidação das LDL, co-oxidação do  $\beta$ -caroteno) (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998; Reis *et al.*, 2012b).

Os métodos ORAC, FRAP, ABTS e DPPH são mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante *in vitro* (Duarte-Almeida *et al.*, 2006).

Os ensaios analíticos utilizados para a determinação da capacidade antioxidante são baseados em dois mecanismos de reacção fundamentais, nomeadamente, transferência de átomos de hidrogénio (HAT) e transferência de electrões (ET). Para ambos os mecanismos de reacção o objectivo é determinar o efeito protector da amostra contra os radicais livres, porém, eles diferenciam-se quanto ao radical iniciador, à cinética da reacção e às reacções laterais (Prior *et al.*, 2005; Castelo-Branco & Torres, 2011).

Os exemplos de métodos baseados em ET é o caso do método do radical DPPH• e do método do radical ABTS<sup>•+</sup> expresso em TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox<sup>®</sup>) e da determinação do teor de fenólicos totais pelo reagente de *Folin-Ciocalteu* e o FRAP (Castelo-Branco & Torres, 2011; Prior *et al.*, 2005), sendo que os métodos DPPH, *Folin-Ciocalteu* e FRAP são os mais utilizados na determinação da actividade antioxidante dos cogumelos (Reis *et al.*, 2012b; Jayakumar *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008; Chirinang & Intarapichet, 2009).

Os métodos baseados na transferência de um electrão envolvem apenas dois componentes, os antioxidantes da amostra e o agente oxidante, sendo que a transferência de electrões ocorre de um composto antioxidante para um oxidante (Castelo-Branco &

Torres, 2011; Prior *et al.*, 2005), causando uma mudança na sua própria absorvância, permitindo o acompanhamento da reacção e a determinação da capacidade antioxidante da amostra. Dessa forma, os ensaios com mecanismo de ET permitem detectar a capacidade da amostra em reduzir o oxidante, que não necessita ser estritamente um radical livre, ao contrário dos ensaios com mecanismo de HAT (Castelo-Branco & Torres, 2011; Huang & Prior, 2005).

Os ensaios de ET apresentam mecanismos não competitivos e não utilizam espécies reactivas de oxigénio e, por isso, são considerados menos representativos das condições reais de um alimento, quando comparados com os ensaios com mecanismo de HAT.

Os métodos baseados no mecanismo de HAT (os métodos ORAC e TRAP) investigam a capacidade dos antioxidantes em bloquear a acção dos radicais peróxido ( $\text{ROO}^\circ$ ) através da doação de hidrogénio, onde o antioxidante inibe, por competição, a oxidação do substrato pelas ROS.

Todavia, estudos demonstraram que apesar dos métodos dos radicais  $\text{ABTS}^\bullet$  e  $\text{DPPH}^\bullet$  apresentarem o mesmo mecanismo de reacção de ET, ambos os radicais são capazes de ser neutralizados por antioxidantes, tanto por redução directa através da transferência electrões (ET) como por bloqueio do radical através transferência de átomos de hidrogénio (HAT) (Prior *et al.*, 2005; Castelo-Branco & Torres, 2011).

A maioria dos estudos utiliza o método DPPH para a determinação da actividade antioxidante em cogumelos (Kim *et al.*, 2008; Chirinang & Intarapichet, 2009; Yang *et al.*, 2002; Reis *et al.*, 2012). Esse ensaio envolve o mecanismo de ET e de HAT, baseiando-se na determinação da capacidade dos antioxidantes da amostra em reduzir o radical  $\text{DPPH}^\bullet$ .

A capacidade redutora da amostra é determinada através da redução da absorvância (515-528 nm) do radical ao fim de um determinado período de tempo ou até cessar a diminuição da absorvância (Huang & Prior, 2005)

Geralmente, os resultados são apresentados como  $\text{EC}_{50}$ , que expressa a concentração de amostra antioxidante, necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical  $\text{DPPH}^\bullet$ , utilizando, normalmente, o metanol como solvente de extracção para as amostras (Huang & Prior, 2005; Castelo-Branco & Torres, 2011).

O método DPPH é considerado o mais adequado para a determinação da actividade antioxidante nos cogumelos uma vez que os principais compostos antioxidantes presentes nesta matriz são, sobretudo compostos fenólicos (Kim *et al.*, 2008; Chirinang & Intarapichet, 2009; Reis *et al.*, 2012b).

Existem vários estudos que demonstraram uma correlação positiva significativa entre a actividade antioxidante pelo método DPPH e o teor de compostos fenólicos totais presentes nos cogumelos, em geral, e na espécie *Pleurotus ostreatus* em particular (Kim *et al.*, 2008; Chirinang & Intarapichet, 2009; Reis *et al.*, 2012b).

### **1.6.2. Processos de pré-tratamento da amostra para extracção do ergosterol**

A secagem em estufa, a liofilização e a trituração das amostras de cogumelo constituem os processos utilizados no pré-tratamento das amostras de cogumelo antes da extracção do ergosterol.

A secagem em estufa consiste na remoção da água do alimento através do aquecimento, sendo que a temperatura de secagem utilizada ronda os 50 °C, o que não permite a degradação do ergosterol (Yuan *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2008).

Antes da colocação da amostra no interior da estufa, a mesma deve ser triturada com a menor espessura possível de modo a facilitar a evaporação da água por este processo de secagem. (Cecchi, 2007).

Outros autores realizaram outro processo de desidratação, nomeadamente, a liofilização. Este processo permite remover a água e outros solventes da amostra congelada pelo processo de sublimação.

A liofilização apresenta várias vantagens em relação a outros processos de desidratação uma vez que a baixa temperatura, mantida durante todo o processo, evita qualquer alteração química dos compostos da amostra. Por este motivo, uma amostra desidratada por esta técnica mantém inalterável a sua composição química original, a sua actividade terapêutica e outras propriedades características (Pessoa, 2010).

A trituração das amostras de cogumelo antes e após o processo de desidratação permite reduzir o tamanho das partículas da amostra para que esta se torne mais uniforme e de modo a facilitar o processo de extracção do composto em análise. Segundo a bibliografia, os autores realizaram a trituração das amostras, em pó, através do almofariz e pilão (Jasinghe, 2005; Yuan *et al.*, 2008; Shao *et al.*, 2010).

Os vários processos de pré-tratamento da amostra foram realizados ao abrigo da luz pelo facto do ergosterol ser um composto fotossensível (Jasinghe, 2005; Shao *et al.*, 2010).

### 1.6.3. Processos de extracção do ergosterol da amostra

A maioria dos estudos realizados para a extracção do ergosterol em cogumelos baseia-se, fundamentalmente, na saponificação seguida da extracção líquido-líquido da fracção insaponificável e, por fim, na concentração da solução por evaporação do solvente de extracção (Pasanen *et al.*, 1999; Jasinghe *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2006; Shao *et al.*, 2010; Gil-Ramirez *et al.*, 2011).

O processo de saponificação consiste na hidrólise alcalina que permite a separação das fracções saponificável e insaponificável da amostra.

De uma forma genérica, o método consiste em usar a saponificação directa do ergosterol com solventes polares, nomeadamente, metanol e/ou etanol (mais usuais), sendo que o extracto obtido é tratado com uma base (hidróxido de potássio ou de sódio) que hidrolisa o ergosterol esterificado a ergosterol livre de modo a facilitar a sua detecção. A mistura é submetida a um aquecimento sob refluxo, durante 30 a 60 minutos, dependendo dos autores, a uma temperatura de 80 °C, com o objectivo de libertar o ergosterol esterificado recalcitrante que ainda tenha ficado na matriz de cogumelo (Zill *et al.*, 1988; Abreu, 1998; Panasen *et al.*, 1999; Jasinghe, 2005; Cunha, 2007; Chaos *et al.*, 2010)

Nos vários estudos analisados, a utilização do hidróxido de potássio como base é comum a todos os autores. Porém, a utilização do tipo de solventes polares variam, verificando-se a utilização de metanol (Panasen *et al.*, 1999), de etanol (Jasinghe, 2005; Shaos *et al.*, 2010) ou soluções aquosas do mesmo (Gil-Ramirez *et al.*, 2011). Também se verificou a adição de antioxidantes, nomeadamente, ácido ascórbico de forma a minimizar as reacções de oxidação (Gil-Ramirez *et al.*, 2011).

A extracção líquido-líquido da fracção insaponificável, na qual se encontra o ergosterol livre, é, habitualmente, efectuada com n-hexano puro ou misturado com solventes mais polares (p. ex. etanol, metanol), de forma a aumentar o rendimento extractivo. São também referidos outros solventes orgânicos como o éter de petróleo (Zill *et al.*, 1988; Cunha, 2007).

O n-hexano provou ser um solvente de extracção superior ao éter de petróleo, já que os teores de ergosterol com eles obtidos foram superiores. Além disso, em contraste com os extractos de n-hexano, os extractos obtidos com éter de petróleo demonstraram conter uma série de impurezas capazes de interferir com a análise cromatográfica. A maior afinidade do ergosterol para o n-hexano do que para o metanol ou etanol, bem como a imiscibilidade entre o n-hexano e os álcoois, permite realizar a separação do ergosterol de



outras substâncias interferentes, através de uma cromatografia de partição líquido-líquido, em que o ergosterol passa para o n-hexano, enquanto as moléculas de menor afinidade permanecem na solução alcoólica (Zill *et al.*, 1988; Abreu, 1998).

De acordo com Jasinghe *et al.* (2005), após a saponificação, arrefecimento e respectiva filtração da solução, foram adicionados água desionizada, etanol e n-pentano como solvente de extracção, sendo a extracção realizada três vezes sucessivas. Porém, a maioria dos autores utilizaram o n-hexano como solvente de extracção, acompanhado pela adição do antioxidante sintético BHT de modo a prevenir a degradação do ergosterol (Panasen *et al.*, 1999; Shaos *et al.*, 2010; Gil-Ramirez *et al.*, 2011).

Por fim, as fases orgânicas são então reunidas, purificadas e submetidas a um processo de evaporação até à secura. De acordo com os estudos analisados, a evaporação é efectuada em evaporador rotativo ou sob vácuo a uma temperatura entre 30°C a 40°C (Jasinghe, 2005; Chaos *et al.*, 2010; Gil-Ramirez *et al.*, 2011), ou em corrente de azoto (Panasen *et al.*, 1999).

#### **1.6.4. Métodos analíticos para a quantificação do ergosterol**

O ergosterol tem sido determinado em várias espécies de cogumelos, mas a sua quantificação também tem sido utilizada como indicador da concentração fúngica em sementes, folhas, produtos hortícolas e no solo (West *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1990; Bermingham *et al.*, 1995).

O ergosterol é facilmente detectado na região UV pois apresenta picos de absorção a 282 e 293 nm. As duplas ligações em C<sub>5</sub> e C<sub>7</sub> são responsáveis pela forte absorção do ergosterol entre 240 e 300 nm, enquanto que os outros esteróis apresentam baixa absorção acima de 240 nm (Naewbanij *et al.*, 1984; Schwadorf & Muller, 1989).

A quantificação do ergosterol em cogumelos, após a sua extracção, tem sido efectuada, actualmente, por dois métodos, nomeadamente, por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) (Jasinghe, 2005; Yuan *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2008; Shaos *et al.*, 2010), e por cromatografia gasosa (GC) (Schwadorf & Muller, 1989; Gil-Ramirez *et al.*, 2001; Phillips *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de métodos por HPLC permitiu uma considerável redução do tempo de análise/resposta, sem prejuízo da recuperação e resolução. O método de quantificação por HPLC apresenta vantagens relativamente ao método GC uma vez que permite a utilização de baixas temperaturas durante a análise, o que reduz o risco de

isomerização das duplas ligações dos ésteres metílicos (Czuderna & Kowalczyk, 2001; Li *et al.*, 2001) e o facto de não ser necessário derivatizar a amostra, permitindo, reduzir o tempo de análise (Knothe, 2001). Além do método por HPLC ser uma técnica não destrutiva, apresenta um grande potencial para resolver problemas de separação difíceis, já que pode utilizar uma variada gama de mecanismos de separação (absorção, partição em fase normal, partição em fase reversa, absorção química, troca iónica, permeabilidade de gel e formação de pares iónicos) (Peacock *et al.*, 1989; Abreu, 1998)

A determinação do ergosterol por HPLC é realizada, maioritariamente, com detectores ultravioleta-visível (UV-Vis) (Zill *et al.*, 1988; Schwadorf & Muller, 1989; Abreu, 1998; Jasinghe, 2005) ou de fotoiodos (DAD) (Yuan *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2008; Shaos *et al.*, 2010).

O DAD é mais sofisticado que o UV-Vis, sendo utilizado nos estudos mais recentes. Este sistema de detecção permite a detecção a vários comprimentos de onda, apresenta alta sensibilidade, sendo capaz de gravar todo o intervalo espectral (de 190 a 800 nm), durante as análises (Oliver & Palou, 2000; Quirós & Costa, 2000), o que permite identificar o ergosterol na forma esterificada (Yuan *et al.*, 2007).

O UV-Vis é menos sensível pois o comprimento de onda seleccionado para a análise pode não ser o mais adequado para todos os componentes da amostra, o que resulta numa perda de sensibilidade. Todavia, a sua utilização é adequada e eficaz para a determinação do ergosterol *per si* dado que apresenta forte absorção a 282 nm (Jasinghe, 2005).

Na quantificação do ergosterol, e de outros esteróis, têm sido utilizadas diferentes técnicas de HPLC, tais como, fase reversa (Jasinghe, 2005; Yuan *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2008; Shaos *et al.*, 2010) e fase normal (Zill *et al.*, 1988; Schwadorf & Muller, 1989; Abreu, 1998).

A maioria dos estudos para a determinação do ergosterol em cogumelos utiliza o método HPLC em fase reversa com coluna C18 e detecção UV a 280 e 282 nm (Jasinghe, 2005; Yuan *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2008; Shaos *et al.*, 2010).

A eluição utilizada tanto é de gradiente (Jasinghe, 2005; Yuan *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2008; Shaos *et al.*, 2010) ou isocrática (Schwadorf & Muller, 1989; Abreu, 1998).

A maioria dos métodos para a determinação do ergosterol usa colunas com partícula de tamanho de 5  $\mu\text{m}$  (Schwadorf & Muller, 1989; Jasinghe, 2005; Yuan *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2008; Shao *et al.*, 2010), e com partículas de 4  $\mu\text{m}$  (Yuan *et al.*, 2007). Segundo os artigos, a temperatura da coluna é em geral 20°C (Yuan *et al.*, 2007) e 30°C (Yuan *et al.*, 2008).

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Determinação da humidade

Para a determinação da humidade foi utilizado o método de secagem em estufa elaborado segundo as Normas Portuguesas NP 1088 e NPI614. Este método baseia-se na evaporação da água existente na amostra por secagem em estufa até à obtenção de peso constante.

A humidade foi determinada para três amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus*, nomeadamente, amostra de cogumelo cultivado em palha de trigo, amostra de cogumelo cultivado em borras de café e amostra de cogumelo enlatada. As amostras foram previamente trituradas através de um liquidificador antes de iniciar o método da determinação da humidade e os ensaios foram realizados em triplicado para cada uma das amostras.

Na determinação da humidade, o equipamento/utensílios utilizados foram uma estufa da marca Memmert (Alemanha), exsiccador com sílica, banho de água fervente (Gerhardt Bonn, Alemanha), uma balança analítica de resolução 0,0001g da Mettler Toledo® (Modelo A-G285, Switzerland, Suíça), cápsulas de porcelana e varetas de vidro. Utilizou-se areia tratada como agente dispersante.

#### **Descrição do método:**

Colocou-se a cápsula de porcelana com areia tratada e uma vareta de vidro no seu interior na estufa a uma temperatura de  $102 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante uma hora. Retirou-se o material da estufa, deixou-se arrefecer no exsiccador até atingir a temperatura ambiente e pesou-se em balança analítica com uma exactidão de 0,0001 g.

Pesou-se  $\pm 5$  g de amostra de cogumelo na cápsula e, de seguida, homogeneizou-se bem a amostra, com o auxílio da vareta de vidro. Colocou-se o conjunto (cápsula + amostra) em banho de água fervente durante uma hora a uma temperatura de  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , para evaporar a maior parte da água antes da secagem em estufa;

Colocou-se a cápsula de porcelana com a amostra na estufa a uma temperatura de  $102 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 2 horas. Retirou-se da estufa, deixou-se arrefecer no exsiccador até atingir a temperatura ambiente, e pesou-se em balança analítica com uma resolução de 0,0001 g.

Repetiu-se o procedimento de secagem (com períodos de 1 hora), arrefecimento e pesagem até à obtenção de peso constante, ou seja, até se atingir uma variação de peso  $\leq 0,0010$  g.

O teor de humidade (W), expresso em gramas por 100 g, é calculado pela seguinte equação:

$$W = [(m_1 - m_2) / (m_1 - m_0)] * 100$$

Sendo:

$m_0$  - Massa, expressa em gramas, da cápsula de porcelana com a areia;

$m_1$  - Massa, expressa em gramas, da cápsula de porcelana com a areia e a amostra;

$m_2$  - Massa, expressa em gramas, da cápsula de porcelana com areia e a amostra, após obtenção de peso constante.

## 2.2. Determinação da actividade antioxidante

### 2.2.1. Amostras biológicas

Na determinação da actividade antioxidante foram utilizadas cinco amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus* e uma amostra de cogumelo espécie *Lentinula edodes*.

Assim, utilizaram-se as amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus* cultivadas em borras de café e em palha de trigo, fornecidas pela empresa Gumelo.

Além destas, foram utilizadas amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus* frescas, obtidas comercialmente, com origem em Espanha e em Portugal.

Também foi utilizada uma amostra de cogumelo *Pleurotus ostreatus* enlatada de agricultura biológica e uma amostra de cogumelo *Lentinula edodes* (*Shittake*) desidratada.

Por fim, utilizou-se uma amostra fresca de cogumelo *Pleurotus ostreatus* cultivado com uma mistura de borras de café e papelão, sendo que a sua produção foi realizada *in loco*, no âmbito do trabalho experimental.

As amostras frescas foram armazenadas a uma temperatura de -18 °C até ao dia do tratamento térmico por secagem em estufa a 40°C, sendo que a amostra enlatada sofreu apenas o tratamento por secagem.

#### 2.2.1.1. Produção do cogumelo *Pleurotus ostreatus* a partir de borras de café e papelão

Na produção do cogumelo *Pleurotus ostreatus* utilizaram-se 3 quilogramas de borras de café fornecidos por um café local em Coimbra, papelão às tiras, uma pequena caixa de papelão, um saco de plástico e 300 gramas de SPAWN (micélio em grão), fornecido pela empresa Quadrante Natural (Lisboa, Portugal).

Como se pode observar no fluxograma da Figura 14, o processo de produção consistiu, primordialmente, na adição de água a uma temperatura de 80 °C às borras de café que, após o arrefecimento (até temperatura ambiente) e escorrimento, serviu para homogeneizar a mistura de papelão às tiras e SPAWN, posteriormente adicionados.

A mistura homogeneizada foi de seguida acondicionada num saco plástico, tendo sido fechado, prensado e perfurado em quatro zonas distintas, com o objectivo de facilitar a circulação do ar no substrato. Em seguida, o saco foi então colocado numa pequena caixa de papelão com uma pequena abertura na zona dos orifícios, com o objectivo de criar condições de temperatura mais favoráveis e constantes para o processo de incubação.

A caixa foi colocada num local escuro, a uma temperatura ambiente de 20 °C a 28 °C, durante 20 dias. Durante este período verificou-se que o substrato começou a apresentar-se branco devido à proliferação do micélio.

Após 20 dias, a caixa foi submetida a 12 horas de luz por dia e foi pulverizada com água, duas a três vezes por dia. Após 15 dias o cogumelo *Pleurotus ostreatus* começou a surgir na zona de abertura da caixa, iniciando-se a frutificação. Por fim, os cogumelos foram colhidos quando as margens do píleo ficaram planas (Figura 15). O período desde o início da formação do corpo frutífero até à sua colheita foi sensivelmente 7 a 8 dias.



**Figura 14** - Fluxograma de produção do cogumelo *P. ostreatus*.



**Figura 15** - (A) Início da frutificação (B) Fim da frutificação (C) Após a colheita.

### 2.2.2. Reagentes

Nos ensaios da actividade antioxidante, o radical DPPH• e o metanol, de grau analítico HPLC, foi adquirido pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

### 2.2.3. Material e Equipamentos

Neste ensaio foram utilizadas pipetas graduadas, balões volumétricos, provetas, funis de vidro, tubos de ensaio, uma micropipeta de 100  $\mu$ L Gilson (Pipetman PI00, Molsheim, França), balões para evaporador rotativo com capacidade de 250 mL, filtros de papel Whatman n°1 (Maidstone, Inglaterra), filtros poliamida para seringa com poro de 0,45  $\mu$ m (Millipore, Irlanda).

Ao nível de equipamentos foi usado uma estufa (Hemmert, Alemanha), um agitador mecânico da IKA®-Labortechnik (Alemanha), evaporador rotativo da Büchi Re111 (Switzerland, Suíça), balança analítica Mettler Toledo® (PB303-S/FACT, Switzerland, Suíça) e o espectrofotómetro Hitachi U-3900 (Tóquio, Japão).

## **2.2.4. Determinação da actividade antioxidante *in vitro* dos extractos de cogumelo**

A determinação da actividade antioxidante *in vitro* dos extractos de cogumelo foi testada e optimizada no Departamento de Nutrição e de Alimentação do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, tendo sido, posteriormente, aplicada e desenvolvida nas amostras de cogumelo no laboratório de Bromatologia e Nutrição da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Na determinação da actividade antioxidante foi utilizado o método de extracção e o método de DPPH adaptado de Kim *et al.*, (2008). Nesta análise foi utilizada a técnica de espectrofotometria na região do UV-Vis através do espectrofotómetro. O espectro de absorção foi determinado a 517 nm.

Antes de se proceder à determinação da actividade antioxidante nas várias amostras foram testados diferentes solventes de extracção, nomeadamente, metanol e água (80:20 v/v) e etanol e água (95:5 v/v), para uma amostra de cogumelo *Pleurotus ostreatus* obtida comercialmente.

### **2.2.4.1. Preparação dos extractos de cogumelo para a determinação da actividade antioxidante**

As amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* (*Shiitake*) referidas no ponto 2.2.1. foram trituradas num liquidificador até se obter uma pasta homogénea.

As amostras foram submetidas a um tratamento de secagem em estufa a uma temperatura de 40 °C. Após a secagem, as amostras foram novamente trituradas de modo a obter-se um pó, tendo sido armazenadas num recipiente hermeticamente fechado à temperatura de -18 °C até ao dia da análise.

Pesaram-se 5 g de amostra de cogumelo que foi dissolvida em 100 mL de metanol. A mistura foi agitada através de um agitador mecânico durante 24 horas à temperatura ambiente, sendo de seguida filtrada através de papel Whatman nº1.

Os extractos metanólicos foram evaporados a 40 °C através de um evaporador rotativo, de modo a obter-se um resíduo que posteriormente foi redissolvido com 10 mL de metanol.

A solução final obtida foi filtrada com filtro de 0,45 µm de poro, sendo que a partir desta solução foram realizadas sucessivas diluições de modo a obter-se diferentes concentrações dos extractos metanólicos de cogumelo.



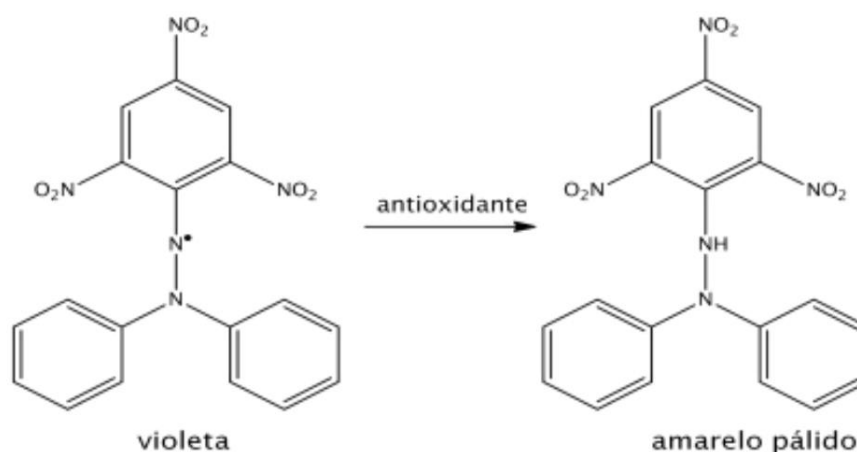
A extracção e a análise foram realizadas em triplicado para cada uma das amostras, sendo que durante todo o processo, os extractos metanólicos foram devidamente protegidos da luz.

#### 2.2.4.2. Avaliação da actividade antioxidante pelo método do radical DPPH•

O DPPH• é um radical de azoto estável, apresenta uma cor púrpura intensa e reage com compostos que podem doar um átomo de hidrogénio ou um electrão (compostos antioxidantes).

Este método baseia-se na adição de um composto capaz de doar um átomo de hidrogénio ou um electrão ao DPPH•, o que resulta na descoloração da solução de DPPH•. Tal acontece uma vez que o radical DPPH• transforma-se na sua forma reduzida, o que tem como consequência a perda da coloração púrpura intensa da solução original e obtenção de uma coloração amarela pálida pela formação da hidrazina (Figura 16).

A reacção de redução do radical DPPH• é acompanhada pela diminuição da absorvância a 517 nm, medida através de um espectrofotómetro UV-Visível (Antolovich et al., 2002; Amarowicz et al., 2004; Molyneux, 2004; Pereira, 2009).



**Figura 16** - Redução da molécula de DPPH. DPPH na forma de radical livre (Violeta); DPPH na forma reduzida (Amarelo pálido) (Fonte: Santos et al., 2011).

Para a determinação da actividade antioxidante foi preparada uma solução metanólica de DPPH•, com uma concentração de  $1,5 \times 10^{-3}$  mg/mL (1,5 mg de DPPH dissolvido em 100 mL de metanol).

Após a preparação dos extractos metanólicos das várias amostras de cogumelo realizaram-se diluições sucessivas, com diferentes concentrações, a partir da concentração do extracto inicial.

A determinação da actividade antioxidante dos extractos metanólicos foi realizada em triplicado, acrescentando-se, 2 mL de solução DPPH e 0,05 mL de extracto num tubo de ensaio. Após a agitação da mistura realizou-se a leitura da absorvância no espectrofotómetro a 517 nm, no início da reacção ( $t=1$  min) e após 30 minutos do início da reacção, no escuro.

Este procedimento foi efectuado para cinco concentrações diferentes. Utilizou-se o metanol, como branco.

Durante todo o procedimento de análise, a solução de DPPH e os extractos metanólicos de cogumelo foram manipulados à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

A actividade antioxidante dos compostos presentes nas amostras é expressa em percentagem de inibição (% PI), sendo que os resultados foram apresentados em valor de  $EC_{50}$  (concentração eficiente). A percentagem de inibição consiste na quantidade de radicais livres DPPH<sup>•</sup> captados pelos compostos antioxidantes, sendo que a percentagem de inibição é directamente proporcional à concentração de antioxidantes presentes no extracto.

A percentagem de inibição (% PI) é calculada através da equação 1.

$$PI = \frac{(Abs_{t=1min} - Abs_{t=30min})}{Abs_{t=1min}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo,

**Abs<sub>1min</sub>** = Absorvância da mistura de extracto com o radical DPPH<sup>•</sup> no início da reacção ( $t=1$  minuto).

**Abs<sub>30 min</sub>** = Absorvância da mistura de extracto com o radical DPPH<sup>•</sup> após 30 minutos de reacção.

Após a análise foi calculada a percentagem de inibição para cada uma das concentrações e determinou-se a equação da recta que relaciona a percentagem de inibição com a concentração do extracto metanólico.

A equação da recta permitiu encontrar o valor de  $EC_{50}$  (mg/mL), isto é, a concentração de substrato necessária para provocar uma percentagem de inibição de 50%, o que permitiu a comparação dos resultados obtidos para as diferentes amostras de cogumelo por este método (Brand-Williams *et al.*, 1995; Molyneux, 2004; Santos *et al.*, 2011).

## 2.3. Determinação do ergosterol no cogumelo *Pleurotus ostreatus* cultivado em borras de café e em palha de trigo

### 2.3.1. Amostras biológicas

Na determinação do ergosterol foram utilizadas dois tipos de amostras, o cogumelo *Pleurotus ostreatus* cultivado em borras de café e cultivado em palha de trigo.

As amostras de cogumelo foram fornecidas pela empresa Gumelo (Lisboa, Portugal), que se dedica, exclusivamente, à comercialização de cogumelos desta espécie através de pequenas caixas, chamadas “eco gumelo”, que contêm o substrato e o micélio inoculado, sendo que, quando induzidas as condições necessárias, o cogumelo desenvolve-se e é colhido pelo próprio consumidor (Figura 17).

Os cogumelos foram cultivados em borras de café e em palha de trigo sob as mesmas condições pela empresa, tendo sido fornecidos frescos e inteiros, devidamente acondicionados. Foram fornecidos cerca de 850 gramas de amostra de cogumelo cultivado em borras de café e cerca de 700 gramas de amostra de cogumelo cultivado em palha, sendo que sob o ponto de vista morfológico verificaram-se diferenças entre os dois tipos de amostras. A primeira apresentou uma cor acinzentada intensa e um píleo de maiores dimensões, enquanto que a segunda apresentou uma cor mais esbranquiçada e um píleo de menores dimensões. Para ambas as amostras foram removidos os caules, tendo sido armazenadas a uma temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  até à sua liofilização.



**Figura 17** - Produto da empresa Gumelo (Fonte: Gumelo, 2013).

### 2.3.2. Reagentes e Padrões

No processo de extracção do ergosterol utilizou-se metanol, de grau analítico HPLC, e n-hexano, ambos fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), etanol absoluto, hidróxido de potássio e sulfato de sódio anidro da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água destilada utilizada no processo de extracção foi obtida por sistema da Millipore (Milli-Q Integral 10, Billerica, E.U.A.).

Na análise de quantificação do ergosterol foi usado o padrão de ergosterol (CAS No. 57-874) adquirido à Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA), no estado sólido, com um grau de pureza  $\geq 95\%$ .

O solvente orgânico utilizado foi de grau analítico HPLC. O Isooctano (2,2,4 Trimetilpentano), utilizado para a preparação da fase móvel para análise em HPLC, foi fornecido pela Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA), com um grau de pureza  $\geq 99,5\%$ .

### 2.3.3. Material e Equipamentos

A extracção e a quantificação do ergosterol no cogumelo *Pleurotus ostreatus* foi realizada no laboratório de Bromatologia e de Nutrição da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Os materiais utilizados na preparação das amostras foram balões de Erlenmeyer de vidro âmbar (250 mL), tubos de condensação, provetas (50,100 mL), quitasatos (250 mL), funis de Büchner, ampolas de decantação (250 mL), funis de vidro, balões para evaporador rotativo (250 mL), espátulas, seringas de vidro, filtros de papel Whatman nº 1 (Maidstone, Inglaterra), filtros de poliamida para seringa com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, Irlanda) e filtros de poliamida de membrana com poro de 0,20  $\mu\text{m}$  e diâmetro de 50 mm (Whatman, Dassel, Alemanha).

Os equipamentos usados foram um liofilizador FreeZone® Stoppering Tray Dryer (Modelo 794880), uma balança analítica Mettler Toledo® (PB303-S/FACT, Switzerland, Suíça), um liquidificador, placas de aquecimento (FALC, Itália), evaporador rotativo da Büchi Re111 (Switzerland, Suíça), agitador de vórtex Retschmixer (Haan, Alemanha) e um aparelho de ultrassonificação modelo Sonorex RK 100 (Berlim, Alemanha) para a desgaseificação da fase móvel. O equipamento cromatográfico utilizado encontra-se descrito no ponto 2.3.6.1.

### **2.3.4. Preparação de soluções**

#### **2.3.4.1. Soluções padrão**

A solução padrão de ergosterol foi preparada por dissolução de 80 mg de ergosterol em 10 mL de etanol absoluto (8 mg/mL). A solução *stock* foi armazenada à temperatura de refrigeração de 2 °C, devidamente protegida da luz durante o desenvolvimento de todo o trabalho laboratorial.

A partir da solução *stock* foram preparadas cinco soluções trabalho, num intervalo de 200-2000 µg/mL para a realização da respectiva curva de calibração.

Para cada solução trabalho foi retirado um volume conhecido de solução *stock* para um tubo de ensaio. Evaporou-se o etanol em corrente de azoto e diluiu-se o ergosterol em 10 mL de fase móvel, num balão volumétrico.

As soluções trabalho foram preparadas devidamente protegidas da luz pelo facto do ergosterol ser um composto fotossensível.

Antes da análise em HPLC, as soluções de trabalho de ergosterol foram filtradas utilizando filtros de seringa com 0,45 µm de poro.

#### **2.3.4.2. Preparação da fase móvel**

A composição da fase móvel foi baseada no estudo de Schwardorf & Muller (1989) e Abreu (1998), que realizaram a quantificação do ergosterol por HPLC em fase normal.

A fase móvel consiste exclusivamente em isooctano, filtrada sob vácuo através de um filtro de membrana (0,2 µm de poro), e desgaseificada por ultra-sons durante 30 minutos.

### **2.3.5. Preparação da amostra para a determinação do ergosterol por HPLC-UV**

Neste estudo, a amostra de cogumelos cultivados em borras de café e a amostra de cogumelos cultivados em palha de trigo, ambas congeladas, foram submetidos a um processo de liofilização a uma temperatura de – 50 °C.

As amostras liofilizadas foram trituradas num liquidificador, até à obtenção de um pó, o qual foi armazenado, num recipiente hermeticamente, fechado, à temperatura de refrigeração de 2 °C. Durante todo o processo de pré-tratamento, as amostras foram protegidas da luz.

### 2.3.5.1. Processo de extracção do ergosterol

A extracção do ergosterol nas amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus* baseou-se, fundamentalmente, na saponificação seguida da extracção líquido-líquido da fracção insaponificável e na concentração da solução por evaporação do solvente de extracção.

As amostras foram preparadas de acordo com o método adaptado de Schwadorf & Muller (1989).

Foram pesados 0,5 g de amostra liofilizada em pó para um balão *Erlenmeyer* de vidro âmbar de 250 mL de capacidade. De seguida, adicionou-se 15 mL de metanol, 10 mL de etanol e 4 g de hidróxido de potássio (KOH). A mistura foi submetida a um aquecimento a 80 °C, sob refluxo, durante 30 minutos (Figura 18). Após o arrefecimento procedeu-se à filtração da mistura, sob vácuo, através de um funil de Büchner, arrastando-se os resíduos existentes no balão Erlenmeyer com 5 mL de metanol.



**Figura 18** - Saponificação (aquecimento sob refluxo).

O filtrado foi transferido para uma ampola de decantação, lavando o recipiente com 5 mL de água destilada. A mistura saponificada foi agitada com 10 mL de n-hexano durante 1 minuto no vórtex, deixando-se repousar para uma completa separação das duas fases.

A fase superior (n-hexano) foi guardada, extraíndo-se, novamente, a fase inferior com 5 mL de n-hexano. Repetiu-se a extracção com mais 5 mL de n-hexano. Por fim, reuniu-se o conjunto das três fases superiores, desprezando-se a fase inferior.

As fases superiores reunidas foram filtradas através de papel de filtro Whatman n° 1 e sulfato de sódio anidro. O filtrado final foi de seguida evaporado, até à secura, num evaporador rotativo a uma temperatura de 40°C.

O resíduo final foi redissolvido em 5 mL de isooctano (fase móvel) e filtrado utilizando filtros de seringa (0,45 µm de poro), tendo-se injectado 20 µL no sistema cromatográfico.

É de referir que durante todo o processo de extracção as amostras foram devidamente protegidas da luz de modo a evitar a degradação do analito em estudo.

### 2.3.6. Análise cromatográfica

#### 2.3.6.1. Sistema cromatográfico

O sistema cromatográfico utilizado para a identificação e quantificação do ergosterol (Figura 19) é caracterizado pelos seguintes componentes:

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) composto por uma bomba Gilson modelo 307 (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, França), um injector manual Gilson com loop de 20 µl;
- Detector UV/Vis GILSON® modelo 155 (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, França);
- Integrador modelo SP4270 da Spectra-Physics (Darmstadt-Kranichstein, R.F.A).



**Figura 19** - Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizado na determinação do ergosterol.

### 2.3.6.2. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram definidas de acordo com o método de Abreu (1998), encontrando-se resumidas na Tabela 7, tendo-se verificado, experimentalmente, que o fluxo mais adequado foi de 1,5 mL/min.

**Tabela 7** - Condições do sistema de cromatografia líquida para a determinação do ergosterol em amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus*

Fase Estacionária	Coluna de fase normal de Sílica Nucleosil 100-5 (25 cm x 4,6; partículas de 5µm) da HICHROM® (Inglaterra)
Fase Móvel	Isooctano
Fluxo	1,5 ml/min.
Iluição	Isocrática
Volume de Injecção	20 µL
Temperatura da Coluna	Temperatura ambiente
Temperatura do Injetor	Temperatura ambiente
Comprimento de onda	282 nm



### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Determinação da humidade

Segundo Mattila *et. al.* (2001), um dos factores mais importantes quando se trata do valor nutricional é o teor de humidade, pois este influencia directamente a quantidade de matéria seca, e, desta forma, também a quantidade dos nutrientes presentes na matriz. Segundo este autor, factores ambientais como a temperatura e a humidade relativa do ar podem afectar o teor de humidade dos cogumelos durante o seu crescimento e armazenamento.

Na tabela 8, é possível observar os resultados obtidos relativamente à percentagem de humidade nas amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus* enlatado, cultivado em borras de café e em palha de trigo.

Nas três amostras os teores de humidade foram elevados, sendo que no caso das amostras cultivadas os teores estão de acordo com os dados obtidos na literatura (Tabela 9), sendo muito próximos dos valores dados por Reis *et al.* (2012) e por USDA (2013), para a mesma espécie. Em comparação com o teor de humidade presente em outras espécies as percentagens de humidade são igualmente elevadas e semelhantes entre si (Tabela 8 e Tabela 9).

Verificou-se uma ligeira diferença no teor de humidade entre as amostras de cogumelo cultivadas e a amostra enlatada. O teor de humidade foi superior no caso na amostra enlatada o que pode estar relacionado com o facto de ser um produto enlatado em calda (Tabela 8).

**Tabela 8** - Percentagem de humidade presente em 100 g de amostra de cogumelo *Pleurotus ostreatus* fresco e enlatado.

Amostra	Humidade (%)	DP (%)
<i>Pleurotus ostreatus</i> (cultivado em borras de café)	89,88	0,09
<i>Pleurotus ostreatus</i> (cultivado em palha de trigo)	89,44	0,14
<i>Pleurotus ostreatus</i> (enlatado)	93,47	0,43

**Tabela 9** - Percentagem de humidade (%) presente em 100 g de amostra de cogumelo pertencentes a várias espécies.

<b>Espécie de cogumelo</b>	<b>Humidade (%)</b>	<b>Referência</b>
<i>P. ostreatus</i>	85,25-93,49	
<i>P. eryngii</i>	91,69	(Manzi, 1999)
<i>P. pulmonarius</i>	87,70	
<i>L.edodes</i>	90,00	
<i>P. ostreatus</i>	89,17	(Reis et al., 2012)
<i>Agaricus bisporus</i>	91,27	
<i>Agaricus bisporus</i>	92,00	(Mattila et al., 2001)
<i>P. ostreatus</i>	89,18	
<i>L.edodes</i> (cozido)	83,48	(USDA, 2013a)

### 3.2. Avaliação da actividade antioxidante pelo método do radical DPPH•

O principal objectivo deste estudo foi verificar o potencial antioxidante do cogumelo *Pleurotus ostreatus* e analisar a influência da utilização de diferentes substratos na actividade antioxidante nesta mesma espécie, até ao momento não estudada.

Além disso, procurou-se estabelecer uma comparação com outras amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*, obtidas comercialmente (enlatada, fresca e desidratada), de diferentes origens geográficas.

Segundo a literatura, os solventes de extracção utilizados na preparação dos extractos de cogumelo foram o metanol puro, etanol e água (95:5 v/v), e metanol e água (80:20 v/v), (Yang *et al.*, 2002; Chirinang & Intarapichet, 2009; Kim *et al.*, 2008), respectivamente. Assim, no presente estudo foram testados diferentes solventes de extracção, nomeadamente, metanol e água (80:20 v/v) e etanol e água (95:5 v/v), para uma amostra de cogumelo *Pleurotus ostreatus* obtida comercialmente.

Após o processo de extracção e análise verificou-se que para a mesma concentração, a amostra preparada com metanol e água apresentou uma percentagem de inibição (% PI) de 70,1 % enquanto que a amostra preparada com etanol e água apresentou uma percentagem de inibição de apenas 18,6%. Este ensaio preliminar sugere que o metanol permite uma maior extracção dos compostos antioxidantes presentes no cogumelo, o que também é visível pela coloração das duas soluções de extracto (Figura 20).



**Figura 20** - (A) Extracto metanólico de cogumelo; (B) Extracto etanólico de cogumelo.

Durante a aplicação do método nas amostras no laboratório de Bromatologia e Nutrição da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra utilizou-se como solvente de extracção metanol e água (80:20 v/v). Porém, verificou-se que durante o processo de evaporação do solvente, a água não evaporou por questões relacionadas com a pressão, o que comprometia toda a metodologia, tendo-se optado pela utilização de metanol puro como solvente de extracção.

A determinação da actividade antioxidante foi realizada pelo método do radical livre DPPH• de acordo com o ponto 2.2.4., sendo que os ensaios foram realizados em triplicado para cada uma das amostras.

Neste estudo, a capacidade de inibição dos radicais DPPH• foi avaliada utilizando concentrações distintas para cada extracto metanólico das amostras, que foram variando de acordo com a resposta antioxidante de cada um. Após a determinação da percentagem de inibição para cada uma das concentrações obteve-se a equação da recta para cada amostra, calculando-se a partir desta, o EC<sub>50</sub>.

Na Tabela 10 encontra-se, para cada intervalo de concentrações, o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) obtido para o extracto metanólico de cada amostra. Tal como se pode observar pelos valores de  $r^2$  obtidos, pode-se afirmar que existiu uma boa linearidade na maioria das amostras, sendo os valores superiores a 0,97.

**Tabela 10** - Coeficiente de determinação ( $r^2$ ) obtido para as amostras de cogumelo *P. ostreatus* e *Lentinula edodes* (*Shiitake*) na determinação da actividade antioxidante pelo método do radical DPPH•.

Amostras	Intervalo de concentrações (mg/mL)	Coeficiente de determinação ( $r^2$ )
CBG	6,25 - 23,68	0,998
CPG	6,25 - 50	0,984
CBP	2,63 - 18,75	0,998
CFE	6.25 - 50	0,978
CFP	6.25 - 50	0,979
CEP	6.25 - 50	0,990
CSD	6.25 - 50	0,970

**Legenda:** CBG – Cogumelo cultivado em borras de café; CPG - Cogumelo cultivado em palha de trigo; CBP - Cogumelo cultivado em borras de café e papelão; CFE - Cogumelo comercializado (origem Espanha); CFP - Cogumelo comercializado (origem Portugal); CES - Cogumelo enlatado (origem Portugal); CSD – Cogumelo *Lentinula edodes* comercializado desidratado (origem China).

Os resultados obtidos na Tabela II, expressos em  $EC_{50}$  (mg/L), isto é, a concentração de substrato (antioxidantes) necessária para inibir 50% dos radicais livre DPPH• presentes em solução, permitiram estabelecer uma comparação entre os extractos metanólicos das diferentes amostras no que diz respeito ao seu potencial antioxidante.

**Tabela II** - Capacidade antioxidante, expressa em  $EC_{50}$  (mg/mL), dos extractos metanólicos das amostras de *P. ostreatus* utilizando o método do radical livre DPPH•. Percentagem de inibição obtida para a concentração de 18,75 mg/mL para cada amostra.

Amostras	$EC_{50}$ (mg/mL)	DP (mg/mL)	Percentagem de Inibição (%) C=18,75 mg/mL
CBG	17	3,0	54
CPG	26	1,3	41
CBP	14	1,5	63
CFE	35	3,2	31
CFP	33	1,0	30
CEP	47	1,8	18
CSD	-	-	19

Legenda: CBG – Cogumelo cultivado em borras de café; CPG - Cogumelo cultivado em palha de trigo; CBP - Cogumelo cultivado em borras de café e papelão; CFE - Cogumelo comercializado (origem Espanha); CFP - Cogumelo comercializado (origem Portugal); CES - Cogumelo enlatado (origem Portugal); CSD – Cogumelo Lentinula edodes comercializado desidratado (origem China).

Nos resultados da actividade antioxidante verifica-se que as amostras de *Pleurotus ostreatus* cultivadas em borras de café (CBG) e em borras de café e papelão (CBP) apresentaram os menores valores de  $EC_{50}$ , ou seja, 17 mg/mL e 14 mg/mL, respectivamente. Isto significa que possuem maior actividade antioxidante uma vez que apresentam a menor concentração de extracto metanólico capaz de inibir 50% dos radicais livres DPPH•.

A amostra cultivada em palha de trigo (CPG) apresentou um valor de  $EC_{50}$  de 26 mg/mL, sendo superior relativamente às amostras cultivadas em substrato à base de borras de café, o que sugere a influência da composição do substrato no potencial antioxidante do cogumelo em estudo, embora as suas concentrações sejam próximas.

As amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus* comercializadas (CFE e CFP) apresentaram valores de  $EC_{50}$  bastante próximos entre si, apesar de serem de diferentes origens. No entanto o  $EC_{50}$  é superior relativamente às amostras de cogumelo cultivadas, revelando uma menor actividade antioxidante.

A amostra de cogumelo *P. ostreatus* enlatada (CES) obteve a menor actividade antioxidante, apresentado o maior valor de  $EC_{50}$  (47 mg/mL), o que pode dever-se à

utilização do tratamento térmico no processamento industrial (pasteurização), conduzindo à destruição de parte dos compostos antioxidantes presentes.

As percentagens de inibição (% PI) obtidas para uma concentração de 18,75 mg/mL (concentração comum a todas as amostras) nos extractos metanólicos das várias amostras estão em concordância com os resultados expressos em  $EC_{50}$ . No caso da amostra de cogumelo *Lentinula edodes* não foi possível determinar o valor de  $EC_{50}$  uma vez que a percentagem de inibição obtida para a concentrada mais elevada (50 mg/mL) não atingiu uma percentagem de inibição de 50%. Porém, pela percentagem de inibição (Tabela II) é possível verificar que o extracto metanólico da amostra de cogumelo *Lentinula edodes* apresentou uma baixa actividade antioxidante comparativamente às amostras de *Pleurotus ostreatus* cultivadas (CBG; CPG; CBP) e comercializadas (CFE e CFP), uma vez que apresentou uma percentagem de inibição mais baixa (19 %).

De acordo com os estudos de Yang *et al.* (2002), Kim *et al.* (2008) e Reis *et al.* (2012), a actividade antioxidante varia de acordo com a espécie de cogumelo. Todavia neste caso não é possível estabelecer uma comparação entre o cogumelo *Pleurotus ostreatus* e o cogumelo *Lentinula edodes*, uma vez que o último foi obtido comercialmente na forma desidratada, pelo que as condições de secagem são desconhecidas, o que poderá comprometer a sua composição e o seu teor em compostos antioxidantes.

Segundo a literatura, o cogumelo *P. ostreatus*, bem como outras espécies de cogumelos, são ricos em compostos antioxidantes, sendo os compostos fenólicos os principais componentes antioxidantes encontrados nos extractos de cogumelos. Deste modo, vários estudos confirmam que os compostos fenólicos têm uma contribuição significativa nas propriedades antioxidantes dos cogumelos, existindo uma relação directa entre o teor de compostos fenólicos totais e a actividade antioxidante avaliada pelo método do radical DPPH• (Yang *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2008; Chirinang & Intarapichet, 2009; Reis *et al.*, 2012).

Até ao momento ainda não foi estudada a influência da utilização de diferentes substratos na actividade antioxidante dos cogumelos. Porém, as borras de café, utilizadas como substrato de cultivo neste estudo, foram reportadas como sendo ricas em compostos fenólicos, sendo os principais compostos responsáveis pela actividade antioxidante deste resíduo (Mussatto *et al.*, 2011). Desta forma, os resultados obtidos, que indicaram uma maior actividade antioxidante no caso dos cogumelos cultivados em substratos à base de borras de café, poderão ser justificados pelo facto das borras de café apresentarem teores consideráveis de compostos fenólicos totais.

Contudo, de forma a obter resultados mais conclusivos sobre a influência do substrato na actividade antioxidante do cogumelo *P. ostreatus* dever-se-á realizar a determinação do teor de compostos fenólicos totais nas amostras de cogumelo cultivadas em diferentes substratos, nas mesmas condições ambientais, bem como nos diferentes substratos utilizados, de forma a estabelecer uma relação com a actividade antioxidante determinada pelo método DPPH•. Além disso, dever-se-á realizar um maior número de produções de cogumelo *P. ostreatus* de modo a obter dados mais representativos.

O ergosterol é um composto que está documentado como o principal composto da fracção lipídica responsável pela actividade antioxidante nos cogumelos, existindo uma relação positiva entre o teor de ergosterol e a actividade antioxidante nesta matriz (Shao et al., 2010). Deste modo, é de referir que no presente estudo, o cogumelo *P. ostreatus* cultivado em borras de café apresentou o teor de ergosterol e a actividade antioxidante mais elevados comparativamente com o cogumelo *P. ostreatus* cultivado em palha de trigo, existindo, assim, uma concordância nos resultados obtidos.

### 3.3. Determinação do ergosterol

#### 3.3.1. Justificação do método de extracção e das condições cromatográficas utilizados

No método de extracção o solvente utilizado foi o n-hexano uma vez que existe uma maior afinidade do ergosterol para o n-hexano do que para o metanol ou etanol. Além disso, o n-hexano permite realizar a separação do ergosterol de outras substâncias interferentes, as quais permanecem na solução alcoólica (Zill *et al.*, 1988; Abreu, 1998).

A maioria dos autores utilizou o n-hexano como solvente de extracção do ergosterol em amostras de cogumelo (Panasen *et al.*, 1999; Shaos *et al.*, 2010; Gil-Ramirez *et al.*, 2011).

A quantidade de amostra utilizada baseou-se nas quantidades normalmente referenciadas na literatura, nomeadamente, cerca de 0,2-0,5 g de cogumelo liofilizado (Jasinghe, 2005; Shaos *et al.*, 2010; Gil-Ramirez *et al.*, 2011).

Nas condições cromatográficas, o comprimento de onda selecionado para determinar o ergosterol foi de 282 nm, dado que o ergosterol apresenta uma forte absorção neste comprimento de onda, sendo proveniente das duplas ligações nas posições C<sub>5</sub> e C<sub>7</sub> (Solomons, 1990; Abreu, 1998; Jasinghe, 2005; Aureli & Motto, 2005).

#### 3.3.2. Validação da metodologia analítica

O objectivo principal da validação do método será demonstrar que a metodologia analítica satisfaz os critérios de aceitação por entidades reguladoras, permitindo uma correcta interpretação dos resultados analíticos, uma vez que conduz à identificação e quantificação de erros e incertezas inerentes ao procedimento analítico que não podem ser eliminados.

Assim, a validação de procedimentos analíticos deve ser baseada nas recomendações e critérios de organizações internacionais de grande relevância científica, nomeadamente, a Administração da Alimentação e Drogas (FDA), Conferência Internacional de Harmonização (ICH), Farmacopeia dos Estados Unidos (USP), bem como de referências bibliográficas relevantes neste âmbito (Delacre, 2000; FDA, 2001; ICH Q2 (RI), 1994; ICH Q2B, 1996; USP, 2005).



Tendo em consideração a elevada importância da validação de um método analítico para a credibilidade científica dos resultados obtidos, iniciou-se a exploração da validação da metodologia analítica aplicada neste estudo. Os parâmetros determinados para a realização do presente estudo foram a especificidade/selectividade, a linearidade, a precisão e a exactidão.

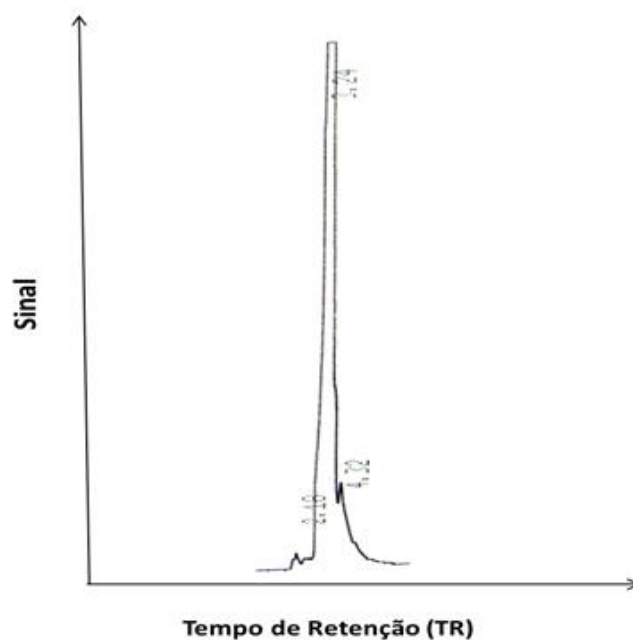
Assim, são de seguida apresentados e discutidos os parâmetros de validação avaliados para o composto em estudo em amostras de cogumelo *Pleurostus ostreatus* cultivado em borras de café e em palha de trigo.

### 3.3.3. Parâmetros de validação

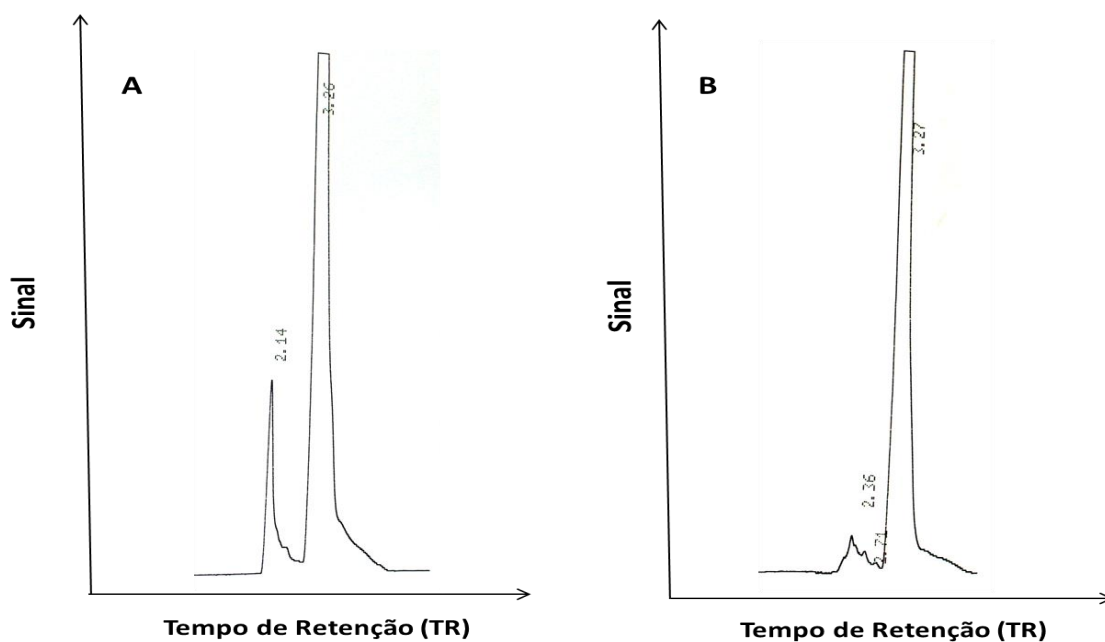
A selectividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar de forma inequívoca, o analito de interesse na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação numa matriz complexa (Ribani *et al.*, 2004)

A selectividade/especificidade de um método pode ser determinada através de diferentes processos. Neste estudo, a especificidade foi demonstrada através dos valores da resolução de dois picos cromatográficos com tempos de retenção muito próximos, nomeadamente, por comparação do tempo de retenção do padrão com o tempo de retenção do analito nas amostras (ICH Q2 (RI), 1994; Almeida & Bronze, 2005).

Assim, a identificação do ergosterol no cogumelo *P. ostreatus* foi realizada pela comparação dos tempos de retenção (TR) das amostras com o tempo de retenção obtido no padrão de ergosterol. Além disso, através dos tempos de retenção verificou-se se existia algum interferente que pudesse comprometer a identificação do ergosterol. Esta análise tornou-se possível através da observação comparativa entre os cromatogramas dos analitos das amostras de cogumelo *P. ostreatus* cultivado em borras de café e em palha de trigo e do padrão de ergosterol (Figura 21 e Figura 22).



**Figura 21** - Pico cromatográfico do padrão do ergosterol (400 µg/mL), a 282 nm, tempo de retenção de 3,2 minutos.



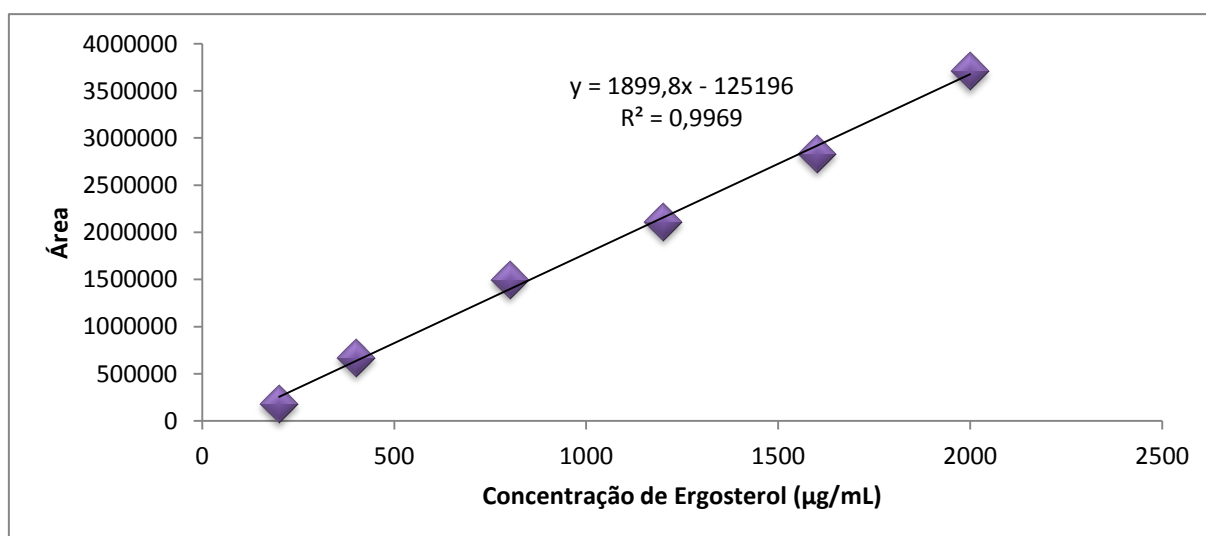
**Figura 22** - **(A)** Pico cromatográfico do ergosterol a 282 nm na amostra de cogumelo *P. ostreatus* cultivada em borras de café a 282 nm (Tempo de retenção 3,2 min); **(B)** Pico cromatográfico do ergosterol na amostra de cogumelo *P. ostreatus* cultivada em palha de trigo a 282 nm (Tempo de retenção de 3,2 min.).

Tal como se pode observar pelos cromatogramas das figuras 21 e 22, não se verificam picos com o mesmo tempo de retenção do analito em estudo, existindo uma separação suficiente entre os picos para que se possa identificar o analito de interesse na matriz em estudo. Deste modo, as amostras de cogumelo *P. ostreatus* analisadas demonstraram a inexistência de interferentes da matriz que pudessem comprometer a identificação do ergosterol, podendo concluir-se que o método utilizado satisfaz o parâmetro da especificidade.

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados, directamente proporcionais à concentração do analito em análise, dentro de um determinado intervalo de concentrações (FDA, 2001).

Assim, para a concretização deste parâmetro foram preparadas seis soluções do padrão de ergosterol com um intervalo de concentrações entre 200 e 2000 µg/mL de modo a estabelecer-se uma curva de calibração. Os padrões de calibração foram analisados nas mesmas condições cromatográficas das amostras, sendo que cada ponto da curva de calibração corresponde à média de 2 injecções.

A curva de calibração que relaciona a concentração do analito com a respectiva área do pico consiste numa representação gráfica de um determinado coeficiente de determinação ( $r^2$ ), que permite uma estimativa da qualidade da curva. Deste modo, a linearidade do método utilizado foi expressa pelo coeficiente de determinação ( $r^2$ ) (FDA, 2001; ICH, 1996).



**Figura 23** - Representação gráfica da curva de calibração do ergosterol num intervalo de concentrações de 200 a 2000 µg/mL.

De acordo com a curva de calibração do ergosterol (Figura 23), o método apresentou uma boa correlação entre o sinal instrumental e a variação da concentração do ergosterol. O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) permitiu avaliar a linearidade, observando-se para o analito em estudo um coeficiente de determinação de 0,9969.

A precisão de um método analítico é o grau de conformidade entre os resultados individuais dos ensaios, quando o processo é aplicado repetitivamente a amostras múltiplas de uma amostra homogênea (Relacre, 2000).

A precisão foi determinada para as duas amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus*, cultivadas em borras de café e em palha de trigo, sendo estas avaliadas no mesmo dia (precisão intra-dia ou repetibilidade) em triplicado ( $n=3$ ), e em dias diferentes (precisão inter-dia ou reprodutibilidade intra-laboratorial), utilizando o mesmo equipamento e as mesmas condições de operação.

A precisão permitiu avaliar a variabilidade dos resultados obtidos das diferentes alíquotas da amostra, e foi expresso em termos de desvio padrão relativo (RSD), em percentagem, por aplicação da equação I do anexo I.

**Tabela 12** - Precisão da determinação do ergosterol em análises intra-dia e inter-dia nas amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus* cultivado em diferentes substratos.

Amostras	Precisão Intra-dia (n = 3)			Precisão Inter-dia (n = 9)		
	Média (mg/g)	DP (mg/g)	RSD (%)	Média (mg/g)	DP (mg/g)	RSD (%)
<i>P. ostreatus</i> (borras de café)	4,02	0,20	4,91	4,06	0,32	7,8
<i>P. ostreatus</i> (palha de trigo)	3,02	0,07	2,39	3,34	0,19	5,8

De acordo com a Tabela 12, na precisão intra-dia da determinação do ergosterol para ambas as amostras, verificou-se que o valor de RSD (%) foi de 4,91 % e de 2,39 % para as amostras de *P.ostreatus* cultivadas em borras de café e em palha de trigo, respectivamente. Estes valores de RSD (%) encontram-se dentro dos limites considerados aceitáveis ( $\leq 5\%$ ) (Almeida & Bronze, 2005).

O estudo da precisão inter-dia foi realizado durante 3 dias consecutivos em condições de repetibilidade. No estudo da precisão inter-dia para ambas as amostras, verificou-se que o valor de RSD (%) foi de 7,8 % para as amostras de cogumelo cultivado em borras de café e de 5,8 % para as amostras de cogumelo cultivado em palha de trigo. Estes valores de RSD (%) encontram-se dentro dos limites considerados aceitáveis ( $\leq 10\%$ ) (Almeida & Bronze, 2005).

A recuperação permite demonstrar a eficácia do processo extracção do analito em estudo, sendo determinada com base em ensaios onde as amostras são fortificadas com concentrações conhecidas de analito e dentro do intervalo de linearidade (Ribani *et al.*, 2004).

Foram preparados três níveis de concentração de ergosterol para a realização dos ensaios de recuperação, nomeadamente, 800  $\mu\text{g/mL}$ , 1200  $\mu\text{g/mL}$  e 1600  $\mu\text{g/mL}$ . Assim, a amostra de cogumelo *P. ostreatus* cultivada em borras de café foi fortificada com 2000  $\mu\text{g}$ , 3000  $\mu\text{g}$  e 4000  $\mu\text{g}$  de ergosterol, em condições de repetibilidade.

A fortificação das amostras com os três níveis de concentração foi realizada depois do pré-tratamento e do processo de extracção. Posteriormente, as soluções de amostra fortificada foram injectadas no sistema HPLC-UV e analisadas em duplicado nas mesmas condições cromatográficas das amostras sem fortificação.

Este parâmetro foi determinado por comparação das áreas dos picos obtidos para as amostras fortificadas com o ergosterol com as áreas dos picos obtidos para o respectivo padrão, nos mesmos níveis de concentração. Sendo que, a partir da curva de calibração do ergosterol (Figura 23), determinou-se a quantidade de ergosterol existente nas amostras fortificadas bem como nos três níveis de solução padrão utilizados.

A recuperação média (%) do ergosterol foi calculada através da aplicação da equação 2 do anexo I para cada um dos três níveis de fortificação. Os resultados obtidos encontram-se representados na Tabela 13, verificando-se o melhor resultado de recuperação média (101 %) para o primeiro nível de fortificação.

**Tabela 13** - Valores de recuperação (%) obtidos para os 3 níveis de concentrações na amostra de *P. ostreatus* cultivado em borras de café.

Amostra	Nº de amostras	Quantidade fortificada ( $\mu\text{g}$ )	Recuperação Média (%)	Desvio Padrão (%)
<i>P. ostreatus</i>	3	2000	101	16,4
	3	3000	78,2	1,92
	4	4000	84,3	8.87

A metodologia de extracção desenvolvida apresentou resultados variáveis de recuperação da substância em estudo (78,2 % a 101 %) para os três níveis de concentração estudados (800, 1200 e 1600  $\mu\text{g/mL}$ ).

Na literatura existem valores de percentagem de recuperação superiores aos obtidos neste estudo. No caso do estudo do autor Yuan *et al.* (2007) utilizou um processo de extracção diferente na determinação do ergosterol no cogumelo *Cordyceps sinensis*, obtendo valores de recuperação na ordem dos 99,1 e 101,4 %. O processo de extracção consistiu na extracção da amostra seca com uma mistura de metanol e diclorometano (75:25, v/v), sendo que a mistura foi, posteriormente, centrifugada a 10, 000 rpm durante cinco minutos.

Num outro estudo (Yuan *et al.*, 2008) foi adoptado um método de extracção semelhante em amostras de cogumelo da espécie *A. Aegerita*, *T. albuminosus* e *L. edodes*, no qual obteve valores de recuperação da ordem dos 97, 8 a 102,6 %.

Este método de extracção do ergosterol poderá estar na origem da obtenção de valores superiores de recuperação no estudo do autor uma vez que o método de extracção utilizado envolve uma menor manipulação da amostra, sendo menos moroso e laborioso comparativamente ao método de extracção utilizado no presente estudo. A fase da extracção da fracção insaponificável por meio de ampolas de decantação poderá ser um dos pontos críticos que poderá originar perdas.

Todavia, não foram encontrados estudos com o método de extracção semelhante ao utilizado no presente trabalho, que evidenciassem os valores de recuperação de modo a estabelecer-se uma comparação. Contudo, pode-se considerar que a utilização de um método de extracção semelhante ao utilizado por Yuan *et al.*, (2007, 2008), poderia resultar na obtenção de um valor superior de percentagem de recuperação do ergosterol nas amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus*.

### 3.3.4. Discussão dos resultados

O teor de ergosterol no cogumelo depende de factores ambientais, principalmente, a luz, a temperatura, a humidade, a concentração de acetato de sódio e o tipo de substrato utilizado (Savón *et al.*, 2002).

Neste estudo, o principal objectivo foi procurar estabelecer uma comparação entre a concentração de ergosterol presente nas duas amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus* cultivadas nas mesmas condições, mas em diferentes substratos, nomeadamente, borras de café e palha de trigo. Deste modo, o objectivo é verificar se o tipo de substrato utilizado no cultivo tem influência no teor de ergosterol presente no cogumelo desta espécie.

A amostra de cogumelo *P. ostreatus* cultivado em borras de café apresentou uma concentração de ergosterol superior ( $4,06 \text{ mg/g} \pm 0,32$  de matéria seca) relativamente à amostra de cogumelo *P. ostreatus* cultivada em palha de trigo ( $3,34 \text{ mg/g} \pm 0,19$  de matéria seca).

Uma vez que as amostras foram cultivadas nas mesmas condições ambientais pela empresa que as forneceu, com excepção do tipo substrato utilizado, existe a possibilidade das borras de café contribuírem para a presença de um maior teor de ergosterol no cogumelo *Pleurotus ostreatus*, embora os teores obtidos tenham sido relativamente próximos.

Os estudos encontrados até ao momento apenas são conclusivos relativamente à influência da quantidade de luz e do tipo de radiação UV recebida no período de frutificação na concentração de ergosterol na biomassa fúngica. Estudos conclusivos sobre a influência do tipo de substrato *per si* sobre o teor de ergosterol nos cogumelos não foram reportados até ao momento.

Savón *et al.* (2002) estudaram o efeito da utilização de diferentes substratos no teor de esteróis totais do cogumelo *P. ostreatus*. Os resultados do estudo evidenciaram que o cogumelo *P. ostreatus* cultivado em polpa de café (sub-produto obtido do processamento do café) apresentou mais do dobro do teor de esteróis totais comparativamente ao cogumelo *P. ostreatus* cultivado em palha de cevada, sob as mesmas condições.

Deste modo, sendo o ergosterol o esterol maioritário existente nos fungos existe a possibilidade dos resíduos à base de café contribuírem para o aumento da concentração de ergosterol nos cogumelos.

Assim, no presente estudo, para a obtenção de resultados mais conclusivos sobre a influência do substrato na concentração de ergosterol no cogumelo desta espécie dever-se-á

realizar maior número de produções de cogumelo *P. ostreatus* nas mesmas condições ambientais, utilizando diferentes substratos, de modo a obter dados mais representativos.

Nesta discussão realizou-se uma comparação entre os resultados obtidos neste estudo com os dados encontrados na literatura.

Jasinghe *et al.* (2005) investigaram o teor de ergosterol em várias espécies de cogumelos comestíveis obtidas comercialmente, através de um método de extracção semelhante ao utilizado neste estudo e cuja quantificação foi realizada por HPLC-UV. O teor de ergosterol apresentado para a espécie *Pleurotus ostreatus* foi de  $4,40 \pm 0,08$  mg/g de matéria seca, sendo que este teor se encontra muito próximo do teor de ergosterol obtido para o cogumelo *Pleurotus ostreatus* cultivado em borras de café.

Gil-Ramirez *et al.* (2011) também investigaram o teor de ergosterol em várias espécies de cogumelos obtidas comercialmente, porém, o método de extracção e o método de quantificação (GC-FID) foram diferentes. Os teores de ergosterol apresentados para os cogumelos do género *P. ostreatus* e *P. eryngii* foram de 3,75 mg/g e de 1,40 mg/g em matéria seca, respectivamente. O teor de ergosterol apresentado para o *P. ostreatus* foi semelhante aos teores obtidos neste estudo tanto para o cogumelo cultivado em borras de café como para o cultivado em palha de trigo, apesar do método de análise utilizado ter sido diferente.

O teor de ergosterol apresentado para o cogumelo *P. eryngii* foi inferior aos obtidos no presente estudo e noutros estudos para a espécie *P. ostreatus*, o que poderá estar relacionado com as diferentes características genéticas dessa espécie.

Deste modo, os dados da literatura encontrados demonstraram que existe uma concordância com os resultados do ergosterol obtidos no presente estudo para o cogumelo *Pleurotus ostreatus*, independentemente do método de extracção e do método de quantificação utilizados, sendo as condições de cultivo desconhecidas.

Phillips *et al.* (2011) determinaram o teor de ergosterol por Cromatografia Gasosa-Espectroscopia de Massa (GC-MS) em várias espécies de cogumelos, entre elas, no *Pleurotus ostreatus*, utilizando a amostra fresca. Neste caso, o teor de ergosterol apresentado foi de 0,68 mg/g em peso húmido, sendo que este resultado sugere a influência do pré-tratamento da amostra na quantificação do ergosterol na matriz em estudo.

Existem vários dados na literatura sobre o teor de ergosterol noutras espécies de cogumelos comestíveis, bastante procuradas, como é o caso dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus bisporus* (cogumelo de Paris). No caso do cogumelo *Lentinula edodes* os valores do teor de ergosterol encontrados variam entre 5,51 mg/g a 6,79 mg/g em matéria seca (Mattila *et al.*, 2002; Jasinghe *et al.*, 2005; Gil-Ramirez *et al.*, 2011). Enquanto que no



cogumelo *Agaricus bisporus* o teor variou entre 3,06 mg/g a 7,80 mg/g em matéria seca (Jasinghe et al., 2005; Gil-Ramirez et al., 2011).

De acordo com o estudo de Jasinghe et al. (2005), os cogumelos *Lentinula edodes* (6,05 mg/g) e *Agaricus bisporus* (7,80 mg/g) apresentaram um teor de ergosterol superior relativamente ao cogumelo *P. ostreatus*, o que também se verifica através da comparação com os resultados obtidos nesta tese para esta espécie. Gil-Ramirez et al. (2011) verificaram também que o cogumelo *Lentinula edodes* (5,51 mg/g) apresentou um teor de ergosterol superior ao cogumelo *P. ostreatus*. Porém, o cogumelo *Agaricus bisporus* (3,06 mg/g) apresentou um teor de ergosterol bastante mais próximo do *P. ostreatus* quer no mesmo estudo quer no presente trabalho.

Verificou-se, também, que a espécie *P. ostreatus* possui um teor de ergosterol superior em comparação a outras espécies de cogumelos comestíveis, obtidas comercialmente, bastante apreciadas, tais como, *Lactarius deliciosus* (1,60 mg/g), *Ganoderma lucidum* (0,69 mg/g), *Agaricus blazei* (1,73 mg/g), *Cantharellus cibarius* (2,61 mg/g), *Flammulina velutipes* (0,53 mg/g), (Gil-Ramirez et al., 2011; Jasinghe et al., 2005).

## 4. Conclusões e considerações finais

Um dos cogumelos comestíveis que tem suscitado maior interesse nos últimos anos é o *Pleurotus ostreatus*, conhecido como cogumelo ostra, devido à facilidade de cultivo e ao seu grande potencial económico e qualidade nutricional, existindo, assim, a necessidade de estudar o seu índice qualitativo e quantitativo de nutrientes e compostos bioactivos por forma a sobrevalorizar o seu cultivo.

Este estudo centrou-se, fundamentalmente, na quantificação do teor de ergosterol e da determinação da actividade antioxidante em amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus* comercializadas e cultivadas em diferentes substratos, nomeadamente, borras de café e palha de trigo, dada a sua possível influência no teor de compostos bioactivos nesta matriz.

A actividade antioxidante pelo método do radical DPPH• foi determinada para as duas amostras de cogumelo *P. ostreatus* cultivadas nas mesmas condições ambientais em borras de café e em palha de trigo, sendo que o objectivo principal foi analisar a influência da utilização de diferentes substratos na actividade antioxidante nesta mesma espécie, até ao momento não documentada. Além disso, procurou-se estabelecer uma comparação com uma amostra de cogumelo da mesma espécie cultivada em borras de café e papelão, e com outras amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*, obtidas comercialmente.

Os resultados obtidos, expressos em  $EC_{50}$ , indicaram uma maior actividade antioxidante no caso das amostras de cogumelo *P. ostreatus* cultivado em borras de café (17 mg/mL) e em borras de café e papelão (14 mg/mL), comparativamente à amostra cultivada em palha de trigo (26 mg/mL) e às restantes amostras obtidas comercialmente. Estes resultados, embora tenham sido relativamente próximos, sugerem a influência da composição do substrato utilizado no teor de compostos antioxidantes no cogumelo *Pleurotus*, sendo que tal pode ser justificado pelo facto das borras de café apresentarem teores consideráveis de compostos fenólicos totais na sua composição (Mussatto *et al.*, 2011).

Todavia, de forma a obter resultados mais conclusivos dever-se-á realizar a determinação do teor de compostos fenólicos nas amostras de cogumelos *Pleurotus* cultivados e nos diferentes substratos utilizados, de forma a estabelecer uma relação com actividade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH• bem como através da utilização de outros métodos anteriormente descritos.

A metodologia de HPLC otimizada para a determinação do ergosterol revelou-se totalmente adequada para o fim em vista, sendo que a utilização do detector UV-Vis, a um

comprimento de onda de 282 nm, possibilitou a detecção e a quantificação do ergosterol nas amostras de cogumelo *P. ostreatus*.

Tendo em consideração a elevada importância da validação de um método analítico para a credibilidade científica dos resultados obtidos, avaliaram-se alguns parâmetros analíticos tais como a especificidade/selectividade, a linearidade, a precisão e a exactidão.

O método cromatográfico descrito apresentou a detecção do ergosterol a um RT de aproximadamente, 3,2 minutos.

Efectivamente, o método provou ser específico e selectivo, sem interferentes da matriz nem a presença de picos que pudessem co-eluir com o composto em estudo.

O método apresentou uma boa correlação entre o sinal instrumental e a variação da concentração do ergosterol, cumprindo uma linearidade para a gama de trabalho proposta (200 a 2000 µg/mL), com um coeficiente de determinação de 0,9969.

De acordo com os critérios de validação adoptados, a precisão intra-dia e a precisão interdia, calculadas para as duas amostras de *P. ostreatus* cultivadas em borras de café e palha de trigo, não deverá exceder os 5% e os 10% do desvio padrão relativo (% RSD), respectivamente. Desta forma, os resultados para a precisão intra e inter dia obtidos para a amostra de cogumelo cultivado em borras de café (n=3) demonstraram que o método apresentou valores de desvio padrão relativo dentro dos critérios estabelecidos, nomeadamente, 4,91 % (precisão intra-dia) e 7,8 % (precisão inter-dia). O mesmo sucedeu para a amostra de cogumelo cultivado em palha de trigo, cujos valores de precisão intra-dia e inter-dia foram de 2,39 % e de 5,8 %, respectivamente.

A metodologia de extracção desenvolvida apresentou resultados variáveis de recuperação do composto em estudo para os três níveis de concentração estudados (800, 1200 e 1600 µg/mL), obtendo-se valores recuperação de 78,2 % a 101 %. A utilização de um método de extracção menos laborioso, tal como o descrito por Yuan *et al.* (2007), poderá originar melhores resultados de recuperação.

De acordo com os dados de precisão obtidos neste estudo verificou-se que amostra de cogumelo *P. ostreatus* cultivado em borras de café apresentou uma concentração de ergosterol superior (4,06 mg/g ± 0,32 de matéria seca) relativamente à amostra de cogumelo *P.ostreatus* cultivada em palha de trigo (3,34 mg/g ± 0,19 de matéria seca), sendo que estes teores estão de acordo com os teores de ergosterol reportados na literatura para esta espécie. Os resultados indicaram que o substrato à base de borras de café poderá ter uma influência no aumento da concentração de ergosterol no cogumelo *P. ostreatus*, embora os resultados obtidos sejam relativamente próximos. Contudo, de modo a obter dados mais

representativos, torna-se fundamental realizar no futuro um maior número de produções de cogumelo da mesma espécie, em diferentes substratos, nas mesmas condições ambientais.

Os resultados obtidos na determinação do teor de ergosterol e na determinação da actividade antioxidante do cogumelo *P. ostreatus* são, assim, considerados como resultados preliminares, constituindo um incentivo e uma base para o aprofundamento do estudo desta espécie apta para de ser cultivada em resíduos agro-alimentares que não são reaproveitados, como é o caso das borras de café.

As potencialidades do aproveitamento das borras de café não têm sido tão estudadas como as da polpa e casca do café. Embora em menor quantidade, a borra contém à semelhança da polpa e da casca, cafeína e taninos tornando-o, por isso, um resíduo tóxico. O uso das borras de café no substrato de crescimento da espécie comestível *Pleurotus ostreatus* torna-se vantajosa pois para além de permitir produzir cogumelos de elevado valor comercial, o resíduo restante, apresenta potencialidades de ser subsequentemente utilizado na alimentação animal. A degradação parcial da cafeína e de taninos, promovida pelo fungo, torna este resíduo menos tóxico e mais apto para a alimentação animal (Fan & Soccol, 2005).

Em suma, a utilização das borras de café no cultivo do cogumelo *Pleurotus ostreatus* permitirá torná-las num resíduo biodegradável de impacto reduzido além de existir a possibilidade de permitir o enriquecimento da matriz em estudo, a qual se destaca por ser uma fonte promissora de compostos bioactivos para alimentação humana e para a produção de preparados farmacêuticos e suplementos alimentares.

## 5. Referências bibliográficas

Abreu, R.M; Santos, D.J.; Moreno, A.J. - **Effects of carvedilol and its analog BM-910228 on mitochondrial function and oxidative stress.**The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 295, 3 (2000), 1022-30.

Abreu, V. – Tese de mestrado – **Comparação de dois métodos para avaliação da qualidade micológica da matéria-prima utilizada na indústria do concentrado de tomate** – Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 1998. Tese de Mestrado.

Alexopoulos, C. J.; Mins, W.C.; Blackwell, M. - **Introductory Mycology.** – 4<sup>th</sup>. Ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1996. 869 p.

Almeida, C & Bronze, M - **Validação de metodologias analíticas. Cadernos de Formação da Ordem dos Farmacêuticos: Ordem dos Farmacêuticos.** Research Opportunities Forum. (2005), 1-34.

Amarowicz, R; Pegg, R.B.; Rahimi-Moghaddam, P.; Barl, B; Weil, J.A. – **Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies.** Food Chemistry. 84, (2004), 551-562.

Ames, B.N.; Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. - **Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington DC. 90, 17 (1993), 7915- 7922.

Antolovich, M.; Prenzler, P.D.; Patsalides, E.; McDonald, S.; Robards, K. – **Methods for testing antioxidant activity.** Analyst. 127, (2002), 183-198.

Apati, G – **Secagem e Resfriamento a vácuo de cogumelos comestíveis da espécie *Pleurotus ostreatus*** – Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, 2004. Tese de Mestrado.

Assis, I.S. – **Síntese e avaliação in vivo de substâncias bioativas de *Pleurotus ostreatus sajor-caju*.** Joinville: Universidade da Região de Joinville, 2011. Tese de Mestrado.

Astudillo, Y. I. H. – **Obtención de cepas híbridas de *Pleurotus ostreatus* spp. Apareamiento de neohaplontes compatibles.** México: Instituto Nacional Unidad Profesional Interdisciplinaria de biotecnología, 2007. Tese de Mestrado.

Aureli, M.G. & Motto, M. E. – **Chromatographic analysis of ergosterol in maize and wheat.** Maydica. 50, (2005) 157-162.

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

Barbado, J. L. – **Hongos comestíveis.** 1ª Edição. Buenos Aires: Albatros, 2003. ISBN 950-25-1034-3.

- Barros L.; Baptista P.; Correia, D.M.; Morais, J.S.; Ferreira, I.C.F.R. - **Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55, (2007b), 4781-4788.
- Barros, L. Baptista, P. Estevinho, L.M.; Ferreira, I.C.F.R. - **Effect of fruting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of Lactarius sp. mushrooms.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55, (2007c), 8766-8771.
- Barros, L.; Baptista, P.; Correia, D.M.; Casal, S.; Oliveira, B.; Ferreira, I.C.F.R. - **Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal.** Food Chemistry. 105, (2007a), 140-145.
- Barros, L.; Cruz T., Baptista P., Estevinho L.M., & Ferreira I.C.F.R. - **Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals.** Food Chemical and Toxicology. 46, (2008a), 2742–2747.
- Barros, L.; Dueñas, M.; Ferreira, I.C.F.R.; Baptista, P.; Santos-Buelga, C. - **Phenolic acids determination by HPLC–DAD–ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species.** Food and Chemical Toxicology. 47, 6 (2009), 1076-1079.
- Barros, L.; Falcão, S.; Baptista, P.; Freire, C.; Vilas-Boas, M.; Ferreira, I.C.F.R. - **Antioxidant activity of Agaricus sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays.** Food Chemistry. 111, (2008b), 61–66.
- Batista, C.E.O. – **Propriedades nutricionais e nutracêuticas de grelos e espigos.** Bragança: Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, 2012. Tese de Mestrado.
- Bermingham, S.; Malby, L.; Cooke, R.C.A. - **A critical assessment of the validity of ergosterol as an indicator of fungal biomass.** Mycological Research. 99, 4 (1995), 479-484.
- Bernas, E.; Jaworska, G.; Lisiewska, Z. - **Edible mushrooms as a source of valuable nutritive constituents.** ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria. 5, (2006), 5-20.
- Beyer, R. E. - **The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: Interaction with vitamin E and coenzyme Q.** Journal of Bioenergy and Biomembrane. 26, (1994), 349-358.
- Bloch, K. E. - **Sterol structure and membrane function.** CRC Critical Reviews in Biochemistry. 14, (1983), 47-92.
- Bononi, V. et al. – **Cultivo de cogumelos comestíveis.** 2ª Edição. Coleção Brasil Agrícola, 1991.
- Bononi, V.L.; Capelari, M.; Maziero, R.; Trufem, S.F.B. - **Cultivo de cogumelos comestíveis.** São Paulo: Ícone, 1999.

Braun, M.; Fub, W.; Kompa, K.L. - **Improved photosynthesis of previtamin D by wavelengths of 280-300 nm.** Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 61, (1991), 15-26.

Bravo, L. - **Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance.** Nutrition Reviews. 56, (1998), 317 – 333.

Brumfield, K. M. - **Investigations of Chlamydomonas Reinhardtii ergosterol biosynthesis.** Louisiana: Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, 2003. Tese de Doutorado.

Bruschi Borgotaro SRL. [Em linha]. Itália. [Consult. 7 de Setembro de 2013]. Disponível em WWW:<URL: <http://www.bruschiborgotaro.com/Inglese-IFunghi.htm>>

Cahagnier, B. – **Qualita Microbiologique des Grains et Teneurs en Ergosterol.** Industries Alimentaires et Agricoles. 1, (1988), 5-15.

Campos, L.S.; Mourato, M. - **Nomenclatura dos Compostos Orgânicos.** Lisboa: Escolar Editora, 1999.

Carlile, M.J.; Watkinson, S.C.; Gooday, G.W. - **The Fungi.** 2nd Edition. Hungary: Academic Press, 2001.

Carvalho, S.; Aguiar, L – **Determinação Bromatológica de *Pleurotus ostreatus* cultivado em resíduos de diferentes cultivares de bananeira.** Interciencia, Vol. 37 nº8, (2012).

Casimir C.; Akoh, D. B. M. - **Chemistry of Waxes and Sterols.** In Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology. 3 ed. London: Press, C., Ed. Taylor & Francis Group, 2008.

Castelo-Branco, A. G. - **Total antioxidant capacity of edible vegetable oils: chemical determinants and associations with oil quality.** Revista de Nutrição, Campinas. 24, 1 (2011), 73-187.

Cecchi; Máscia, H.; - **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos.** São Paulo; Editora Unicamp, 2007.

Chang, S.T., & Miles P.G. - **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact** – 2nd ed., U.S.A. 2004. ISBN – 0-8493-1043-1. [Acedido a 12 de Junho de 2013]. Disponível em WWW:<URL: <http://www.amazon.com/dp/0849310431>.>

Cheung, Peter C.K. – **Mushrooms as a functional foods** - Hong Kong: The Chinese University of Hong Kong, 2008. ISBN 978-0-470-05406-2.

Chirinang, P. & Intarapichet – **Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*.** ScienceAsia. 35, (2009), 326-331.

Coelho, S. A. S. – **Determinação expedita de amins biogénicas em cogumelos por TLC**. Instituto Politécnico de Bragança: Escola Superior Agrária de Coimbra, 2012. Tese de Mestrado.

Cordeiro, A.M.M. – **Estudos biofísicos em modelos de membrana plasmática da levedura**. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2009. Tese de Mestrado.

Coutinho, A.; Silva, L.; Fedorov, A.; Prieto, M. - **Cholesterol and ergosterol influence nystatin surface aggregation: relation to pore formation**. Biophysical Journal. 87, (2004), 3264-3276.

Cunha, S. – **Autenticidade e segurança de azeites e azeitonas: desenvolvimento de metodologias cromatográficas para o doseamento de triacilgliceróis, fitosteróis, tocoferóis/tocotrienóis e pesticidas**. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2007. Tese de Doutoramento.

Czauderna, M. & Kowalczyk, J. - **Separation of some mono-, di- and triunsaturated fatty acids containing 18 carbon atoms by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection**. Journal of Chromatography B. 760, 1 (2001), 165-178.

Dahl, C.; Biemann, H. P.; Dahl, J. - **A protein kinase antigenically related to pp60v-src possibly involved in yeast cell cycle control: positive in vivo regulation by sterol**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 84, (1987), 4012-6.

de Sio, F.; Laratta, B.; Giovane, A.; Quagliuolo, L.; Castaldo, D.; Servillo, L. - **Analysis of free and esterified ergosterol in tomato products**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48, (2000), 780-784.

Delacre. **Guia da Delacre 13 – Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química**. Delacre, Lisboa. 2000.

Duarte-Almeida, J.M.; Santos, R.J.; Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. - **Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH•**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 26, 2 (2006), 446-52.

Echavarría, B.Z.; Franco, A.S.; Martínez, A.M. - **Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe Colombiano**. Revista de la Facultad de Química Farmaceutica. 16, (2009), 126 – 131.

EFSA - **Scientific Opinion on the safety and efficacy of beta-carotene as a feed additive for all animal species and categories**. EFSA Journal. 10, 6 (2012), 2737.

Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H.; Jr., Murphy, R. C.; Raetz, C. R. H.; Russell, D. W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; VanNieuwenhze, M. S.; White, S. H.; Witztum, J. L.; Dennis, E. A. - **A comprehensive classification system for lipids**. Journal of Lipid Research. 46, (2005), 839-62.



Fan, L. & Soccol, C. - **Shiitake bag cultivayion. Parte I Shiitake. Coffee residues.** Mushroom Grower's Handbook. Mushworld All. 2, (2005), 92-94.

Fang, Y-Z; Yang, S.; Wu, G. - **Free radicals, antioxidants, and nutrition.** Nutrition. 18, (2002), 872 – 879.

FDA - Food and Drug Administration: U.S. Department of Health and Human Services. **Guidance for industry, bioanalytical method validation.** [documento online] 2001 [consultado em 25 de Abril de 2013]. Disponível em WWW: <URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>>

Ferreira, A. D. – **Influência da borra no crescimento e nas propriedades químicas e biológicas de plantas de alface (*Lactuca sativa L.*).** Escola Superior Agrária de Bragança, 2011. Tese de Mestrado.

Ferreira, G. F. A. - **Nutrição humana.** Fundação Calouste Gulbenkian, 1985. 255-259.

Ferreira, I.C.F.R. & Abreu, R.M.V. – **Stresse oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos.** - Sociedade Portuguesa de BioAnalistas da Saúde. 2, (2007), 32-39.

Ferreira, I.C.F.R.; Barros, L.; Abreu, R.M.V. - **Antioxidants in wild mushrooms.** – Current Medicinal Chemistry. 16, (2009), 1543-1560.

Furlani, R.P.Z. & Godoy, H.T. - **Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão - Nutritional value of edible mushrooms: a revision.** Revista Instituto Adolfo Lutz. 64, 2 (2005), 149-154.

García, M.; Quinterio, R.; López, - **Biología alimentaria.** México: Limusa, 2000.

Garnweidnet, E.; Jankovics, G., Vasconcelos, M. - **Cogumelos: como identificar, classificar e apanhar cogumelos. Guia de cogumelos venenosos comestíveis.** Rio de Mouro: Everest, 1999. ISBN 973-750-418-3.

Gençcelep, H.; Uzun, Y.; Tunçturk, Y.; Demirel, K. - **Determination of mineral contents of wild-grown edible mushrooms.** Food Chemistry. v. 113, (2009), 1033-1036.

Gessner, M.O. & Schimitt, A.L. - **Use of solid-phase extraction to determine ergosterol concentrations in plant tissue colonized by fungi.** Applied Environmental Microbiology. 62, 2 (1996), 415-419.

Gil-Ramirez, A.; Clavijo, C.; Palanisamy, M.; Soler-Rivas, C.; Ruiz-Rodriguez, A.; Marini, F.; Reglero, G.; Perez, M. – **Edible mushrooms as potential sources of new hypocholesterolemic compounds.** Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, (ICMBMP7), 2011.

Gil-Ramirez, A; Clavijo, A.C.; Palanisamy, M; Soler-Rivas, C.; Ruiz-Rodriguez, A.; Marini, F.R.; Reglero, G.; Pérez, M. – **Edible mushrooms as potential sources of new hypocholesterolemic compounds.** Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7), 2011.

Goad, L.J. - **The effects of antifungal compounds on growth and sterol metabolism in plants and protozoa.** Biochemical Society Transactions. 22, (1994), 269-635.

Goetz, M.E. & Luch, A. - **Reactive species: A cell damaging route assisting to chemical carcinogens.** Cancer Letters. 266, (2008), 73 – 83.

Greer, F. R. & Marshall, S. - **Bone mineral content serum vitamin D metabolite concentrations and UV-B light exposure in infants fed human milk with and without Vitamin D2 supplements.** Journal of Pediatrics. 114, (1989) 204-212.

Guillamón, E.; García-Lafuente, A.; Lozano, M.; D'arrigo, M.; Rostagno, M. A.; Villares, A.; Martínez, J. A. - **Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases** – Fitoterapia. 81 (2010), 715–723.

Gumelo – [Em linha]. [Consult. 1 Ago. 2013]. Disponível em WWW: <URL: <http://pt.gumelo.com/eco-gumelo/>>

Guzman, G. - **Genus Pleurotus (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae): Diversity, Taxonomic Problems, and Cultural and Traditional Medicinal Uses.** International Journal of Medicinal Mushrooms, v. 2 (2000), 29.

Handelman, G.J. **The evolving role of carotenoids in human biochemistry.** Nutrition. 17, 10 (2001), 818-822.

Heleno, S.A.; Barros, L.; Sousa, M.J.; Martins, A.; Ferreira, I.C.F.R. - **Study and characterization of selected nutrients in wild mushrooms from Portugal by gas chromatography and high performance liquid chromatography.** Microchemical Journal. 93, (2009a), 195-199.

Helm, C.; Corandin, J.; Kestring, D. - **Avaliação da Composição Química do Cogumelos Comestíveis Agaricus bisporus, Agaricus brasiliensis, Agaricus bisporus portobello, Lentinula edodes e Pleurotus ostreatus.** Colombo: Embrapa Florestas, 2009. ISSN 1517-5030.

Hollosy, F. - **Effect of ultraviolet radiation on plant cells.** Micron 33, (2002), 179-97.

Horst, R.L. & Reinhardt, T.A. - **Vitamin D metabolism.** In **Vitamin D.** New York: Academic Press, 1997. p. 13 – 31.

Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. - **The Chemistry behind antioxidant capacity assays.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53, (2005), 1841-56.

ICH Q2 (R1) – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1).** [documento disponível online] 1994 [consultado em 28 de Abril de 2013]. Disponível em WWW:<URL: <http://www.reimeranalytical.com/meth%20val%20ich.pdf>>.

ICH Q2 B – Guidance for industry. **Q2B Validation of analytical procedures: Methodology,** 1996.

- Jasinghe, V. J. – **Conversion of ergosterol in edible mushrooms to vitamin D<sub>2</sub> by irradiation**. Singapore: Department of Chemistry Nacional University of Singapore, 2005. Tese de Doutoramento.
- Jasinghe, V.J. & Perera, C.O. - **Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D<sub>2</sub> by UV irradiation**. Food Chemistry. 92, (2005), 541–546.
- Jaworska, G. & Bernas, E. - **Qualitative changes in *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. mushrooms resulting from different methods of preliminary processing and periods of frozen storage**. Journal of the Science of Food and Agriculture. 89 (2009), 1066 –107.
- 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. 10, 2 (2009), 228-34.
- Jayakumar, T.; Thomas, P.A.; Geraldine, P. - **In vitro antioxidant of an ethanolic extract of the oyster mushroom *pleurotus ostreatus***. – Innovative Food Science and Emerging Tecnologies. 10, (2009), 228-234.
- Jong, S. C.; & Donovick, R. - **Antitumor and antiviral substances from fungi**. Advances in Applied Microbiology. 34, (1989), 183–262.
- Kalac, P. - **Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review**. Food Chemistry. 113 (2009), 9-16.
- Kalac, P.; Svoboda, L. - **A review of trace element concentrations in edible mushrooms**. Food Chemistry, 69 (2000), 273-281.
- Kalac., P. - **A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms**. Journal of the Science of Food and Agriculture. 93, (2013) 209–218.
- Kim, M. Y.; Seguin, P.; Ahn, J. K.; Kim, J. J.; Chun, S.C.; Kim, E.H.; Seo, S.H. - **Phenolic compound concentration and antioxidante activities of edible and medicinal mushrooms from Korea**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56, (2008), 7265-7270.
- Kirk, P.M.; Cannon, P.F.; Minter, J.C.; Stalpers, J.A. - **Dictionary of the Fungi**. 10th ed. Wallingford: CAB International, 2008.
- Knothe, G., - **Analytical methods used in the production and fuel quality assessment of biodiesel**. American Society of Agricultural Engineers. 44, 2 (2001), 193-200.
- Kuo, C.F.; Hsieh, C.H.; Lin, W.Y. - **Proteomic response of LAP-activated RAW 264.7 macrophages to the anti-inflammatory property of fungal ergosterol** - Food Chemistry. 126, (2011), 207–212.

Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. - **Principles of Biochemistry**. W.H. Freeman, 5th edition, 2008.

Li, Z. et al., - **Analysis of fatty acids in mouse cells using reversed-phase highperformance liquid chromatography**. *Chromatographia*. 54, (2001), 463-467.

Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J.; Julich, W.D. - **The pharmacological potential of mushrooms**. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2, (2005), 285-299.

Liu, R.H. - **Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals**. *American Journal of Clinical Nutrition*. 78, (2003), 517S – 520S.

Magalhães, A. S. M. – **Estudo do efeito protector da espécie *Cydonia oblonga miller* na danificação oxidativa em eritrócitos humanos**. Porto: Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, 2009. Tese dE Licenciatura em Ciências Farmacêuticas.

Magalhães, A.S.; Silva, B.M.; Pereira, J.M.; Andrade, P.B.; Valentão, P.; Carvalho, M. - **Protective effect of quince (*Cydonia oblonga Miller*) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes** – *Food and Chemical Toxicology*. 47, (2009), 1372-1377.

Mandeel, Q.A.; Al-Laith, A.A.; Mohamed, S.A. - **Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*) on various lignocellulosic wastes**. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.21 (2005), 601-607.

Mantovani, M.S.; Bellini, M.F.; Angelini, J.P.F.; Oliveira, R.J.; Silva, A.F.; Ribeiro, L.R. - **B-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer**. *Mutation Research*. 658, (2008), 154-161.

Manzi, P.; Gambelli, L.; Marconi, S.; Vivanti, V.; Pizzoferrato, L. - **Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study**. *Food Chemistry*. 65, 4 (1999), 477-482.

Martin, F. F.; Delaruelle, C.; Hilbert, J.L. - **An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomyrrhizas**. *Mycological Research*. 94, 8 (1990), 1059-1064.

Martinez, A. T.; Camarero, S.; Gutierrez, A.; Bocchini, P.; Galletti, G. C. - **Studies on wheat lignin degradation by *Pleurotus* species using analytical pyrolysis**. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 58, (2001), 401-411.

Martínez-Florez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J. M.; Tunon, M. J. - **Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes**. *Nutrición Hospitalaria*. 17, 6 (2002), 271-278.

Martins, X.F. - **Cogumelos – Património Natural Transmontano**. Vol. I. Portugal, João Azevedo Editor, 2004. 19-101

Mattila, P.H.; Lampi, A.M.; Ronkainen, R.; Toivo, J.; Piironen, V. - **Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms**. *Food Chemistry*. 76, (2002), 293 - 98.

- Mattila, P.H.; Piironen, V.I. Uusi-Rauva, E.J.; Koivistoinen, P.E. - **Vitamin D contents in edible mushrooms.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 42, (1994), 2449–53.
- Mau, J.L.; Chao, G.R.; Wu, K.T. - **Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49, (2001), 5461-5467.
- Mau, J.L.; Chen, P.R.; Yang, J.H.; - **Ultraviolet irradiation increased vitamin D2 content in edible mushrooms.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46, (1998), 5269-72.
- Mau, J.L.; Lin, H.C.; Song, S.F. (2002). **Antioxidant properties of several specialty mushrooms.** Food Research International 35, 519-526.
- McCord, J.M. - **The evolution of free radicals and oxidativestress.** American Journal of Medicine. 108, 8 (2000), 652-9.
- Mehrotra, S; Kakkar, P; Viswanathan, P.N. - **Mitochondrial damage by active oxygen species in vitro.** Free Radical Biology & Medicine. 10, (1991), 277-85.
- Mehta, R.G. & Mehta, R.R. - **Vitamin D and cancer.** The Journal of Nutritional Biochemistry. 13, (2002), 252-264.
- Micosylva - [Em linha]. Actual. 23 Set. 2012. [Consult. 13 Ago. 2012]. Disponível em WWW: <URL: [http://www.micosylva.com/sites/default/files/accion/docs/ponencia\\_p.cheira.pdf](http://www.micosylva.com/sites/default/files/accion/docs/ponencia_p.cheira.pdf).>
- Miller, D.M.; Buettner, G.R.; Aust, S.D. - **Transition metals as catalysts of antioxidation reactions.** Free Radical Biology & Medicine. 8, 95 (1990),108.
- Moda, E.M.; Horii, J.; Spoto, M.H.F. - **Edible mushroom *Pleurotus sajor caju* production on washed and supplemented sugarcane bagasse.** Science Agriculture. 62, 2 (2005),127-132.
- Molyneux, P. - **The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity.** Songklanakarin Journal of Science and Technology. 26, 2 (2004), 211-219.
- Moore, T. S. - **Lipid metabolism in plants.** CRC Press, Boca Raton, 1993. 653 p.
- Moura, P. – **Determinação de elementos essenciais e tóxicos em cogumelos comestíveis por análise por activação de nêutrons.** São Paulo: Autarquida associada à Universidade de São Paulo, 2008. Tese de Mestrado.
- Mussatto, S.I.; Ballesteros, L.F.; Martins, S.; Teixeira, J. A. - **Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds.** Separation and Purification Technology. 83, (2011), 173–179.
- Naewbanij, M. (et al.,) – **Determination of Ergosterol using Thin-Layer Chromatography and Ultraviolet Spectroscopy.** American Assoc. of cereal Chemists. 61, S (1984), 385-388.

NP 1088: 1982 (2ªEd). Leites em pó. Determinação da humidade.

NP 1614: 2002 (2ª Ed). Carnes e produtos cárneos. Determinação do teor de humidade. Método de referência.

Oliver, J & Palou, A - **Chromatographic determination of carotenoids in foods.** *Journal of Chromatography A.* 881, (2000), 543–555.

Palace VP, Werner J. - **Vitamin A and E in the maternal diet influence egg quality and early life stage development in fish: a review.** In Olivar MP, Govoni. JJ, ed. Recent Advances in the study of fish eggs and larve Scientia Marina. (2006), 41-57

Pasanen, A.L.; Yli-Pietila, K.; Pasanen, P.; Kalliokoski, P.; Tarhanen, J.; - **Ergosterol Content in Various Fungal Species and Biocontaminated Building Materials.** Applied and environmental microbiology. (1999), 139-141.

Paul, M. D., - **The Mevalonate and Deoxyxylulose Phosphate Pathways: Terpenoids and Steroids.** 2nd Ed. In Medicinal Natural Products, 2001.

Pauli, P. A. – **Avaliação da composição química, compostos bioactivos e actividade antioxidante em cogumelos comestíveis.** São Paulo: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2010. Tese de Mestrado.

Peacock, G. A. & Goosey, M. W. – **Separation of sterols by normal phase Phase High – Performance Liquid Chromatography.** *Journal of Chromatography.* 469, (1989), 293 – 304.

Peacock, G.A & Goosey, M.W. - **Separation of fungal sterols by normal-phase hingh performance liquid chromatography-application to the evaluation of ergosterol biosynthesis inhibitors.** *Journal of Chromatography.* 469, (1989), 293-303.

Pereira, E. A. P. C. – **Contribuição para a inventariação química e nutricional de cogumelos do Nordeste de Portugal.** Bragança: Escola Superior Agrária de Coimbra, Instituto Politécnico de Bragança, 2011. Tese de Mestrado.

Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. - **Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays.** *Food Research International.* 39, (2006), 791-800.

Pessoa, João. - **Liofilização como método de agregar valor ao camarão marinho Litopenaeus vannamei.** Paraíba: – Universidade Federal da Paraíba centro de tecnologia – Programa de Pos-graduação em ciência e tecnologia de alimentos, 2010. Tese de Doutorado.

Phillips, K.M.; Ruggio, D.M.; Horst, R.L.; Minor, B.; Simon, R.R.; Feeney, M.; Byrdwell, W.C.; Haytowits, D.B.- **Vitamin D and Sterol Composition of 10 Types of Mushrooms from Retail Suppliers in the United States -** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 59, (2011), 7841–7853.

- Pilz, S.; Dobnig, H.; Fischer, J. E.; Wellnitz, B.; Seelhorst, U.; Boehm, B. O.; Marz, W. - **Low vitamin D levels predict stroke in patients referred to coronary angiography.** Stroke. 39, (2008), 2611-2613.
- Poulsen, H.E.; Prieme, H.; Loft - **Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion.** European Journal of Cancer Prevention. 7, (1998), 9-16.
- Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. - **Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53, (2005), 4290-302.
- Quirós, A & Costa, H. S. **Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review.** Journal of Food Composition and Analysis. 19, 97 (2006), 97–111.
- Rai, D. R. & Paul, S. - **Transient state in-pack respiration rates of mushroom under modified atmosphere packaging based on enzyme kinetics.** Biosystems Engineering, 98 (2007), 319-326.
- Ramos-Ligonio, A.; López-Monteon, A.; Trigoso, A. - **Trypanocidal activity of ergosterol peroxide from *Pleurotus ostreatus*.** Phytother Res. 26, 6 (2012), 938-43.
- Ramalho, V.C. & Jorge, N. - **Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos.** Química Nova. 29, 4 (2006), 755-760.
- Rao A.V. & Rao L.G. - **Carotenoids and human health.** Pharmacological Research, 55, (2007), 207-216.
- Regina, M.; Broetto, F.; Giovannozzi-Sermanni, G.; Marabotini, R.; Peranni, C.; Linde, G.A.; Colauto, N. B.; Paccola-Meirelles, L. D. - **Oxidative enzymes activities from *Lentinula edodes* on agribusiness substrate.** Ciências Agrárias, Londrina. 30, 4 (2009), 881-888.
- Reis, F.S.; Barros, L.; Martins, A.; Ferreira, I.C. - **Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study.** Food and Chemical Toxicology. 50, 2 (2012a), 191-7.
- Reis, F.S.; Martins, A.; Barros, L.; Ferreira, I.C. - **Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between in vivo and in vitro samples.** Food and Chemical Toxicology. 50, 5 (2012b), 1201-7.
- Relacre, *Guia Relacre 13* - **Validação de métodos internos de ensaio em análise química.** Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000.
- Ribani, M; Bottoli, C.B.G.; Melo, L.F.C. – **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Química Nova. 27, 5 (2004), 771-780.
- Romero, J.; Rodriguez, M.; Pérez, R. - ***Pleurotus ostreatus*. Importancia y tecnologia de cultivo.** Universidad de cienfuegos “Carlos Rafael Rodriguez”. Cuatro Caminos ciudad de cienfuegos. 2000. 155 págs.

Rossi, M.; McLaughlin, J. K.; Lagiou, P.; Bosetti, C.; Talamini, R.; Lipworth, L.; Giacosa, A.; Montella, M.; Franceschi, S.; Negri, E.; Vecchia, C. L. **Vitamin D intake and breast cancer risk: a casecontrol study in Italy.** *Annals of Oncology.* 20, (2009), 374-378.

Sanchez-Moreno, C.; Larrauri J.A.; Saura-Calixto, F. - **A procedure to measure the antiradical efficiency of poly phenols.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 76, (1998), 270-6.

Sandhar, H. K. S.; Kumar, B.; Prasher, S.; Tiwari, P.; Salhan, M.; Sharma, P. - **A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids.** *Internationale Pharmaceutica Scientia.* 1, (2011), 25-41.

Santos, S.N.; Castanha, R.F.; Haber, L.L.; Marques, M.O.M.; Scramim, S; Melo, I.S. – **Determinação quantitativa da atividade antioxidante de extratos brutos de microrganismos pelo método de captura de radical livre DPPH.** *Comunicado Técnico 50.* Jaguariúna, SP Técnico, 2011. ISSN 1516-8638.

Savón, R.C.B., Fernández, C.D.; Manrique, C.E.M.; Sevilla, E.I.R.; Quevedo, H.J.M. – **Efecto de la luz en la concentración de micosteroles de *Pleurotus ostreatus* var. Florida.** - *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición.* 16, (2002), 13-8.

Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Remesy, C., Jimenez, L. - **Dietary polyphenols and the prevention of diseases.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 45, (2005), 287 – 306.

Schwadorf, K. & Muller, H. – **Determination of Ergosterol in cereals, mixed feed components and mixed feeds.** *Journal of the Association of Official Analytical Chemists.* 72, 3 (1989), 457-462.

Shao, S.; Hernandez, M.; Kramer, J.K.G; Rinker, D.L.; Tsao, R. - **Ergosterol Profiles, Fatty Acid Composition, and Antioxidant Activities of Button Mushrooms as Affected by Tissue Part and Developmental Stage** - *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 58, (2010), 11616–11625.

Shrivastava, S. & Chattopadhyay, A. - **Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics using different fluorescent reporter probes.** *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 356, (2007), 705–710.

Sies H, Stahl W. - **Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants.** *American Journal of Clinical Nutrition.* 62, 6 (1995), 1315-2.

Silva, L.; Coutinho, A.; Fedorov, A.; Prieto, M. - **Competitive Binding of Cholesterol and Ergosterol to the Polyene Antibiotic Nystatin. A Fluorescence Study.** *Biophysical Journal.* 90, (2006a), 3625-3631.

Silva, M – **Enriquecimento e biodisponibilidade de selênio no cogumelo *Pleurotus ostreatus*** – Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Programa de pós-graduação em microbiologia agrícola, 2009. Tese de Mestrado.



Slominski, A.; Semak, I.; Zjawiony, J.; Wortsman, J.; Gandy, M. N.; Li, J. H.; Zbytek, B.; Li, W.; Tuckey, R. C. - **Enzymatic metabolism of ergosterol by cytochrome P450<sub>scc</sub> to biologically active 17R,24-dihydroxyergosterol**. Chemistry & Biology. 12, (2005), 931-939.

Solomon, E. P.; Berg, L. R.; Martin, D. W. 2008. - **Biology**. Xxxiv. Australia, United States: Thomson-Brooks/Cole, 2008. 1234 p.

Solomons, T.W. G. – **Química orgânica 3**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos Científicos Editora Lda., 1990.

Souza, W. & Rodrigues, J. C. F. - **Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Antitrypanosomatid Drugs**. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. (2009), 19 p.

Stadtman, E. R. & Berlett, B.S. (1997). **Free-radical-mediated modification of proteins**. In: Wallace, K.B (Ed). Free Radical Toxicology. Taylor & Francis, 1997, p. 71-87.

Stamets, P. - **Growing gourmet and medicinal mushrooms**. 3rd. ed. Berkeley. California, USA: Ten Speed Press, 2000. ISBN 1 - 58008 -175 – 4.

Stolzenberg-Solomon, R. Z.; Hayes, R. B.; Horst, R. L.; Anderson, K. E.; Hollis, B. W.; Silverman, D. T. - **Serum vitamin D and risk of pancreatic cancer in the prostate, lung, colorectal, and ovarian screening trial**. Cancer Research. 69, (2009), 1439-1447.

Szolderits, G.; Hermetter, A.; Paltauf, F.; Daum, G. - **Membrane properties modulate the activity of a phosphatidylinositol transfer protein from the yeast, Saccharomyces cerevisiae**. Biochim Biophys Acta. 986, (1989), 301-9.

Takaku, T.; Kimura, Y.; Okuda, H. - **Isolation of an antitumor compound from Agaricus blazei Murill and its mechanism of action**. Journal of Nutrition. 131, (2001), 1409-1413.

Tjellesen, L.; Gotfredsen, A.; Christiansen, C. - **Different actions of vitamin D2 and D3 on bone metabolism in patients treated with phenobarbitone / phenytoin**. Calcified Tissue International. 37, (1985), 218-22.

Trabulsi, Luiz Rachid – **Microbiologia**. 2ª Edição. São Paulo: Atheneu, 1991.

USD – **National Nutrient Database for Standard Reference**. Release 25. [Consultado 6 de Agosto de 2013a]. Disponível em WWW:<URL: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>>

USD – **National Nutrient Database for Standard Reference**. Release 25. [Consultado 10 de Setembro de 2013b]. Disponível em WWW:<URL: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3641?qlookup=pleurotus&fg=&format=&man=&facet=&max=25&new=1>>

USR (The United States Pharmacopeia): **<1225> Validation of compendial methods**. [Documento disponível online]. 2005. [Consultado em 15 de Julho de 2013] Disponível em WWW:<URL: [http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0\\_c1225.html](http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1225.html)>

- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; Telser J. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease**. International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 39, (2007), 44-84.
- Brand-Williams, M. E. Cuvelier and C. Berset - **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 28, (1995), 25-30.
- Wang, D.; Sakoda, A.; Suzuki, M. - **Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain**. Bioresource Technology. 78, 3 (2001), 293-300.
- Weete, J. & Gandhi, S. -**Sterols of the Phylum Zygomycota: Phylogenetic Implications**. Lipids. 32, (1997), 1309-1316.
- West, A.W.; Grant, W.D.; Sparling, G.P. - **Use of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine contents of soils to monitor changes in microbial populations**. Soil Biology and Biochemistry. 19, 5 (1987), 1987.
- Williams, D. L. - **Overview of (1→3)-β-D-Glucan immunobiology**. Mediators of Inflammation. 6, 4 (1997), 247-250.
- Yang, J.H.; Lin, H.C.; Mau, J.L. - **Antioxidant properties of several commercial mushrooms**. Food Chemistry. 77, (2002), 229-235.
- Yang, JH; Lin, H.C.; Mau, J. L. - **Non-volatile taste components of several commercial mushrooms**. Food Chemistry. 72, 4 (2001), 465-71.
- Yi, W.; Wu, X.; Cao, R.; Song, H.; Ma, L. - **Biological evaluations of novel vitamin C esters as mushroom tyrosinase inhibitors and antioxidants**. Food Chemistry. 117, (2009), 381-386.
- Yuan, J.P.; Kuang, H. C.; Wang, J.H.; Liu, X. - **Evaluation of ergosterol and its esters in the pileus, gill, and stipe tissues of agaric fungi and their relative changes in the comminuted fungal tissues** - Appl Microbiol Biotechnol. 80, (2008), 459–465.
- Yuan, J.P.; Wang, J.H.; Liu, X.; Kuang, H.C.; Huang, X, N. - **Determination of Ergosterol in Ganoderma Spore Lipid from the Germinating Spores of Ganoderma lucidum by High-Performance Liquid Chromatography**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54, 17 (2006), 6172-6.
- Yuan, J.P.; Wang, J.H.; Liu, X.; Kuang, H.C.; Yan, S. Z. - **Simultaneous determination of free ergosterol and ergosteryl esters in Cordyceps sinensis by HPLC**. - Food Chemistry. 105, (2007), 1755–1759.
- Zadrazil, F.; Kurtzman, R.H. - **The biology of *Pleurotus* cultivation in the tropics**. In: **tropical mushrooms**. Hong Kong: The Chinese Univ. Press., 1984.
- Zaidman, B.; Yassin, M.; Mahajana, J.; Wasser, S.P. - **Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics**. Applied Microbiology and Biotechnology. 67, (2005), 453-468.

Zhang, Y.; Mills, G. L.; Nair, M. G. - **Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the fruiting body of an edible mushroom, *Agrocybe aegerita***. Phytomedicine. 10, (2003), 386-390.

Zill, Gabriele; Engelhardt, Gabriele and Wallnofer, Peter. – **Determination of ergosterol as a measure of fungal growth using SI 60 HPLC**. Lebernom Unters Forgch. (1988), 246-249.

### **Referências das imagens utilizadas na capa da dissertação**

Revista Salud y Bienestar - [Consultado 6 de Setembro]. Disponível em WWW:<URL: <http://es.paperblog.com/suplementos-de-vitamina-d-podrian-ser-necesarios-para-proteger-contra-las-infecciones-en-el-invierno-1498424/>>

AGROCIM - [Consultado 6 de Setembro]. Disponível em WWW:<URL: <http://www.agrocim.com.br/noticia/Borra-de-cafe-sera-transformada-em-biodiesel-em-Portugal.html>>

## Anexo I – Equações utilizadas na validação da metodologia

### 1. Equação da Precisão (Almeida & Bronze, 2005)

$$CV (\%) = \frac{\sigma}{\mu} \times 100$$

(Eq. 1)

Onde o  $\sigma$  é o desvio-padrão e  $\mu$  é a média dos resultados.

### 2. Equação da Recuperação (Almeida & Bronze, 2005)

$$Rec = \frac{C_R V_R - C_A V_A}{C_P V_P} \times 100$$

(Eq. 2)

Onde,

CR – Concentração do analito na amostra fortificada;

VR – Volume de amostra do ensaio de recuperação (VA + VP);

CA – Concentração do analito na amostra não fortificada;

VA – Volume de amostra utilizada no ensaio de recuperação;

CP – Concentração do padrão de analito utilizado para fortificar a amostra;

VP – Volume de padrão de analito utilizado no ensaio de recuperação.

