



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

LARISSA COSTA SILVA

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DE COMPOSTOS
BIOATIVOS EM COGUMELOS COMESTÍVEIS

ITAPETINGA – BA
MARÇO, 2013

LARISSA COSTA SILVA

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DETERMINAÇÃO DE
COMPOSTOS BIOATIVOS EM COGUMELOS COMESTÍVEIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

ORIENTADOR: Prof^a. DSc. Silmara Almeida de Carvalho

CO-ORIENTADOR: Prof^ª. DSc. Jacqueline Aparecida Takahashi

Itapetinga / BA

Março, 2013

S581m Silva, Larissa Costa.
 Determinação da composição química e de
 Compostos bioativos em cogumelos comestíveis /
 Larissa Costa Silva, 2013.
 71f.: il.: color.
 Orientador (a): Silmara Almeida de Carvalho.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
 do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-
 Graduação em Engenharia de Alimentos,
 Itapetinga, BA, 2013.
 Referências: f. 39-49.
 1. Cogumelos comestíveis – Valor nutricional.
 I. Carvalho, Silmara Alemida de. II. Universidade
 Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-
 Graduação em Engenharia de Alimentos. III. T.

CDD: 635.8

Elinei Carvalho Santana – CRB-5/1026
Bibliotecária - UESB – Campus de Vitória da Conquista-BA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Engenharia de Processos de Alimentos

Campus de Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM COGUMELOS COMESTÍVEIS”.

Autor: LARISSA COSTA SILVA

Orientadora: Prof^ª. SILMARA ALMEIDA DE CARVALHO, DSc., UESB

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS DE ALIMENTOS, pela Banca Examinadora.


Prof^ª. Silmara Almeida de Carvalho, DSc., UESB


Prof. Anderson Santos Souza, DSc., UFBA


Prof^ª. Alexilda Oliveira de Souza, DSc., UESB

Data da Realização: 21 de Fevereiro de 2013.

Praça Primavera, Nº 40, Bairro Primavera – Telefone: (77) 3261-8629 - Fax: (77) 3261-8701
Itapetinga – BA CEP: 45.700-000 – e-mail: ppgeal.uesb@yahoo.com.br

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me guiado nos momentos mais difíceis e por não me deixar fraquejar nesse longo caminho que percorri.

Aos meus pais, Lucia e Ademar que por todo momento estiveram ao meu lado e me mostraram que com persistência e fé posso obter grandes conquistas. Agradeço a eles por toda compreensão e amor, por estar sempre à disposição por todas as vezes que precisei e por acreditar no meu sucesso. Essa caminhada eu devo principalmente a vocês.

Agradeço a Professora Silmara pela oportunidade dada a mim, para que eu pudesse crescer na minha vida acadêmica e pudesse trilhar um caminho de grandes conquistas. Por acreditar que eu seria capaz e me orientar nessa árdua caminhada.

Agradeço a Professora Jacqueline Takahashi por me receber na Universidade Federal de Minas Gerais e me tratar com tanta afeição e cuidado, sempre disposta a me ajudar no que fosse preciso. Aos colegas de laboratório na UFMG, por estarem do meu lado sempre que necessário e por me acolherem com tanto carinho.

Agradeço as grandes amigas, Daiane, Samira, Fernanda, Ludmila que sempre estiveram ao meu lado, nos momentos difíceis e também nos momentos especiais. Agradeço o apoio de Bruna e Ben Hur pelos dias e noites no laboratório e por estarem sempre dispostos a me ajudar. Todos foram muito importantes para mais essa conquista.

A Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), por ser sempre acolhedora e por propiciar a conquista não só de uma carreira profissional, mas também por me formar cidadã.

A todos os colegas, amigos e docentes, a quem não me referi, mas que sempre me presentearam com um sorriso ou uma palavra amiga e que por isso foram, e continuarão a ser importantes para mim.

Enfim, agradeço a todos que por um momento estiveram ao meu lado, que de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica e principalmente a formação de quem sou hoje.

*“Algumas pessoas sonham com o sucesso,
outras levantam cedo e batalham para
alcançá-lo.”*

*Dedico essa vitória a Deus e principalmente
a minha família, meu ALICERCE, por todo
amor e incentivo.*

RESUMO

SILVA, L. C. Avaliação da composição química e determinação de compostos bioativos em cogumelos comestíveis. Itapetinga – Ba: UESB, 2013. (Dissertação Mestrado em Engenharia de Alimentos – Engenharia de Processos de Alimentos).

Estudos realizados com o intuito de avaliar a composição e qualidade dos cogumelos comestíveis cultivados no Brasil são recentes e restritos, principalmente com respeito ao seu valor nutricional. Considerando a escassez de dados sobre o valor nutricional e terapêutico de cogumelos comestíveis cultivados no Brasil e a busca por fontes alternativas de nutrientes e compostos que sejam biologicamente ativos, este trabalho objetivou avaliar a composição centesimal dos cogumelos comestíveis Shitake, Hiratake Salmão, Eryngui, Shimeji Preto, Shimeji Branco, Champignon Paris e Champignon Portobello, seus perfis de ácidos graxos, assim como ensaios biológicos *in vitro* para avaliação das atividades antimicrobiana e de inibição de acetilcolinesterase. Os cogumelos apresentaram teores de umidade que variaram entre 83,1 e 91,9% em base úmida, teores médios de proteína total que variaram de 20,3 a 36,3%, teores de cinzas totais entre 4,2 e 10,9%, teor médio de extrato etéreo entre 9,4 e 14,8%, teor médio de fibra alimentar total entre 25,8 e 56,3% e teor de carboidratos totais variando entre 34,3 e 54,8%, evidenciando excelente valor nutricional destes cogumelos, com elevados teores de carboidratos, fibras alimentares e proteínas. Em seus extratos hexânicos foi analisada a composição de ácidos graxos, onde foram encontrados treze ácidos graxos, com destaque para os ácidos linoleico, oleico e palmítico. O total de ácidos graxos identificados entre os extratos lipídicos dos cogumelos variou entre 71,2% e 93,9%, com maior porcentagem para o extrato do Champignon Portobello. A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos cogumelos revelou maior atividade inibitória do cogumelo Hiratake Salmão frente às bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *B. cereus*. Todos os cogumelos avaliados apresentaram ainda excelente atividade inibitória frente à bactéria Gram-negativa *E. coli*. Quando avaliados qualitativamente quanto a sua atividade inibitória frente à enzima acetilcolinesterase, os extratos apresentaram inibição positiva, com alto potencial anticolinesterásico para o extrato hexânico do cogumelo Shitake, com uma porcentagem de inibição maior que 50%. Os cogumelos cultivados no país e comercializados na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais podem ser considerados como alimentos com excelente qualidade nutricional, trazendo benefícios à saúde humana, devendo ser incluídos na dieta usual dos brasileiros.

Palavras-chave: cogumelos comestíveis, valor nutricional, ácidos graxos, atividade antibacteriana, acetilcolinesterase.

ABSTRACT

SILVA, L. C. Evaluation and determination of the chemical composition of bioactive compounds in edible mushrooms. Itapetinga - Ba: UESB, 2013. (Dissertation Master in Food Engineering - Food Process Engineering).

Studies conducted in order to evaluate the composition and quality of edible mushrooms cultivated in Brazil are recent and limited, especially with respect to its nutritional value. Considering the scarcity of data about the nutritional and therapeutic edible mushroom grown in Brazil and the search for alternative sources of nutrients and compounds that are biologically active, this study aimed at evaluating the chemical composition of Shitake, Hiratake Salmon, Eryngui, Shimeji Black, Shimeji White, Champignon Paris and Champignon Portobello edible mushrooms, their fatty acid profiles, as well as *in vitro* biological assays to evaluate the antimicrobial activity and inhibition of acetylcholinesterase. The mushrooms had moisture contents ranging from 83.1 to 91.9% wet basis, mean levels of total protein ranging from 20.3 to 36.3%, total ash content between 4.2 and 10.9 % average content of ether extract between 9.4 and 14.8%, average content of total dietary fiber between 25.8 and 56.3% and total carbohydrate ranging from 34.3 to 54.8%, showing excellent nutritional value of mushrooms, with high levels of carbohydrates, fiber and protein. The fatty acid composition in their hexane extracts was analyzed, in which thirteen fatty acids were found, especially linoleic acids, oleic and palmitic acids. The total fatty acids identified among the lipid extracts of the mushrooms ranged between 71.2% and 93.9%, with a higher percentage for the extract of Champignon Portobello. The antimicrobial activity of ethanolic and hexane extracts of mushrooms showed higher inhibitory activity of mushroom Hiratake Salmon front of Gram-positive *S. aureus* and *B. cereus*. All mushrooms studied were still excellent inhibitory activity against the Gram-negative bacterium *E. coli*. When evaluated qualitatively regarding their inhibitory activity against the enzyme acetylcholinesterase, the extracts showed inhibition positive, with high potential for anticholinesterase hexane extract of Shitake mushroom, with a percentage inhibition greater than 50%. The mushrooms grown in the country and traded in the city of Belo Horizonte - Minas Gerais can be considered as food with excellent nutritional quality, bringing benefits to human health and should be included in the diet of ordinary Brazilians.

Keywords: edible mushrooms, nutritional value, fatty acids, antibacterial activity, acetylcholinesterase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura de um basidiomiceto (a) Fungo Basidiomiceto (b)	17
Figura 2. Reações envolvidas no método de Rhee	26
Figura 3. Espécies de cogumelos estudadas	27
Figura 4. (a) Microplacas 96 poços; (b) Leitora ELISA Thermo Plate.....	30
Figura 5. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a bactéria Gram-positiva <i>S. aureus</i>	47
Figura 6. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a bactéria Gram-positiva <i>S. aureus</i>	47
Figura 7. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a bactéria Gram-positiva <i>B. cereus</i>	48
Figura 8. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a bactéria Gram-positiva <i>B. cereus</i>	49
Figura 9. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a bactéria Gram-negativa <i>E. coli</i>	50
Figura 10. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a bactéria Gram-negativa <i>E. coli</i>	51
Figura 11. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a bactéria Gram-negativa <i>Salmonella</i> ..	52
Figura 12. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a bactéria Gram-negativa <i>Salmonella</i> ..	52
Figura 13. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a levedura <i>C. Albicans</i>	53
Figura 14. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a levedura <i>C. Albicans</i>	54

Figura 15. (a) e (a') Placas cromatográficas dos extratos etanólicos de Inibição da acetilcolinesterase das espécies de cogumelos comestíveis, (b) e (b') Placas cromatográficas dos extratos hexânicos de Inibição da acetilcolinesterase das espécies de cogumelos comestíveis. 56

Figura 16. Média do percentual de inibição da enzima acetilcolinesterase dos extratos hexânicos e etanólicos do terceiro lote dos cogumelos em comparação com a eserina (controle positivo) e os solventes hexano e etanol (controles negativos)..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teor de umidade em sete espécies distintas de cogumelos (%) _____	34
Tabela 2. Teor de proteínas em sete espécies distintas de cogumelos (%) _____	36
Tabela 3. Teor de cinzas em sete espécies distintas de cogumelos (%) _____	37
Tabela 4. Teor de extrato etéreo em sete espécies distintas de cogumelos (%) _____	38
Tabela 5. Teor de fibra alimentar total em sete espécies distintas de cogumelos (%) _	39
Tabela 6. Teor de carboidratos totais em sete espécies distintas de cogumelos (%) __	41
Tabela 7. Composição de ácidos graxos em extratos hexânicos de sete espécies distintas de cogumelos comestíveis (%) _____	42
Tabela 8. Percentual (%) de inibição das amostras no ensaio anticolinesterásico em microplaca pelo método de Ellmann _____	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterase
ACh	Acetilcolina
ACTI	Iodeto de Acetilcolina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BHI	Brain Heart Infusion
CEDETEC	Centro de Desenvolvimento e Difusão de Tecnologias
DA	Doença de Alzheimer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico]
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ICEX	Instituto de Ciências Exatas
IDR	Ingestão Diária Recomendada
MUFAs	(Monounsaturated fatty acids) Ácidos graxos monoinsaturados
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMs	Peptídeos Antimicrobianos
pH	Potencial hidrogeniônico
PUFAs	(Polyunsaturated fatty acids) Ácidos graxos poli-insaturados
Rf	Fator de retenção
SFAs	(Saturated fatty acids) Ácidos graxos saturados
VDR	Valor Diário de Referência

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Cogumelos Comestíveis – Fungos Macroscópicos	16
3.2 Composição Centesimal	18
3.3 Perfil de ácidos graxos em cogumelos	21
3.4 Antimicrobianos Naturais	22
3.5 Atividade de Inibição da Acetilcolinesterase (AChE)	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Amostras	26
4.2 Composição centesimal	27
4.3 Preparação dos Extratos	28
4.4 Hidrólise dos Triglicerídeos	28
4.5 Derivatização dos Ácidos Graxos	29
4.6 Análise de Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa	29
4.7 Testes de Atividade Biológica	29
4.7.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana - Técnica de Microdiluição em Caldo	29
4.7.2 Avaliação da atividade de inibição de acetilcolinesterase em cromatografia em camada delgada (CCD) – Método Ellmann	31
4.7.3 Avaliação da atividade de inibição de acetilcolinesterase em microplaca – Método de Ellmann	32
4.8 Análise Estatística	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Determinação da Composição Química	34
5.2 Perfil de Ácidos Graxos	41
5.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana - Técnica de Microdiluição em Caldo	45

5.4 Avaliação da atividade de inibição de acetilcolinesterase em camada delgada (CCD) – Método Ellmann _____	55
5.5 Avaliação da atividade de inibição de acetilcolinesterase em microplaca – Método de Ellmann _____	56
6 CONCLUSÕES _____	59
7 PERSPECTIVAS FUTURAS _____	60
8 REFERÊNCIAS _____	61

1 INTRODUÇÃO

Há milhares de anos os cogumelos fazem parte da dieta diária de orientais, como alimentos ou medicamentos. O consumo vem aumentando gradativamente, envolvendo um maior número de espécies e esse aumento requer o conhecimento do valor nutritivo e funcional destes cogumelos (MATTILA *et al.*, 2001). Estudos realizados com o intuito de avaliar a composição e qualidade dos cogumelos comestíveis cultivados no Brasil são recentes e restritos, principalmente com respeito ao seu valor nutricional. Os dados encontrados sobre sua composição ainda são escassos e provenientes de pesquisas realizadas em países orientais, onde os cogumelos são cultivados em condições distintas das encontradas no Brasil, como clima, solo e substrato utilizado, fatores esses que podem modificar a composição dos cogumelos (FURLANI e GODOY, 2007).

Os cogumelos comestíveis são apreciados principalmente por suas propriedades sensoriais, tais como aroma e sabor, além de possuírem elevado teor de carboidratos e proteínas e baixo teor lipídico, podendo ser utilizado em dietas com teor calórico reduzido. São ainda considerados fontes de fibras, vitaminas e minerais (GUEDES *et al.*, 2008; MATTILA *et al.*, 2000a; PEDNEAULT *et al.*, 2006; BARROS, *et al.*, 2007)

Um estudo mais detalhado dos cogumelos comestíveis produzidos e comercializados no Brasil se faz necessário também devido às suas conhecidas propriedades medicinais e por estes serem capazes de produzir uma vasta gama de metabólitos secundários com elevado valor terapêutico (DEMAIN, 1999), despertando assim o interesse no uso dos cogumelos e/ou de seus extratos como suplementos nutracêuticos.

Considerando a escassez de dados sobre o valor nutricional e terapêutico de cogumelos comestíveis cultivados no Brasil e a busca por fontes alternativas de nutrientes e compostos que sejam biologicamente ativos, este trabalho objetivou avaliar a composição centesimal dos cogumelos comestíveis, seus perfis de ácidos graxos, assim como ensaios biológicos *in vitro* para avaliação das atividades antimicrobiana e de inibição de acetilcolinesterase.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a composição química e determinar compostos bioativos presentes em cogumelos comestíveis comercializados na cidade de Belo Horizonte, MG.

2.2 Específicos

- Determinar a composição centesimal dos cogumelos comestíveis encontrados em redes de supermercados da referida cidade;
- Quantificar os ácidos graxos presentes nos extratos hexânicos dos cogumelos comestíveis em análise;
- Realizar ensaios biológicos *in vitro*, visando a avaliação das atividades antimicrobiana e de inibição de acetilcolinesterase.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cogumelos Comestíveis – Fungos Macroscópicos

Os fungos são seres vivos eucarióticos, que podem ser classificados como unicelulares, quando constituídos de uma única célula, ou pluricelulares, quando possuem células agrupadas em filamentos constituindo, assim, as hifas. Existe uma vasta diversidade de fungos, cerca de 1,5 milhões, sendo descritos apenas uma gama de 70.000 espécies, cerca de 6% da diversidade total de fungos existentes (HAWKSWORTH *et al.*, 1995).

Os fungos apresentam dimensões microscópicas, entretanto, alguns fungos apresentam uma estrutura macroscópica produtora de esporos denominada corpo de frutificação, que os tornam visíveis (BOA, 2004). Possuem parede celular constituída principalmente por quitina e β -glicanos e a membrana celular por ergosterol, um esteroide característico de fungos, também presente em algumas microalgas (SILVA e COELHO, 2006).

São classificados de acordo com uma série de características, principalmente em relação às suas microestruturas, reprodução sexuada e assexuada, especializações de acordo com o modo de vida e enzimas produzidas (BONONI *et al.*, 1995). O reino Fungi abrange 5 classes: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Nesses dois últimos filos encontram-se os fungos comestíveis. Os *Ascomycota* incluem vários fungos economicamente importantes; fazem parte deste filo muitas leveduras, as morchelas e trufas comestíveis. No filo *Basidiomycota* estão cogumelos comestíveis, alucinógenos, tóxicos e venenosos (RAVEN, 2007).

A classe dos Basidiomicetos inclui mais de 25.000 espécies descritas (CARLILE, WATKINSON e GOODAY, 2001). Essa classe de fungos abrange os utilizados na alimentação e medicina popular desde tempos remotos (WASSER, 2002). Os fungos basidiomicetos incluem espécies que têm corpos de frutificação macroscópicos (basidioma ou basidiocarpo) e são conhecidos popularmente por cogumelos (Figura 1), entretanto, essa classe também engloba as leveduras e alguns fungos que não formam frutificações macroscópicas, (WASSER e WEIS, 1999).

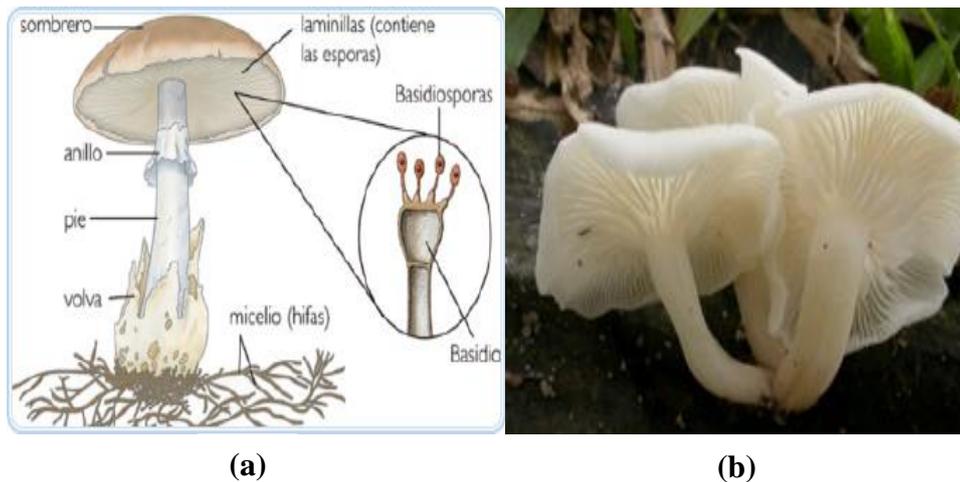


Figura 1. Estrutura de um basidiomiceto (a) Fungo Basidiomiceto (b)

Fonte: KALIPEDIA, 2012

São conhecidas muitas espécies de cogumelos comestíveis, entretanto, apenas algumas alcançaram níveis de produção mundial como alimento, por possuírem características organolépticas aceitáveis e pelas suas propriedades terapêuticas e nutricionais (TONIAL, 1997). Estima-se que o número de cultivares de cogumelos alcancem 140 mil, sendo que destes apenas 10% são conhecidos (WASSER, 2002), e apenas dois mil são comestíveis. Dentre esses, destaca-se o *Agaricus bisporus* (Champignon de Paris), o *Lentinus edodes* (Shitake) e o *Pleurotus ostreatus* (Shimeji), que são as espécies mais conhecidas no Brasil, com destaque para o Champignon Paris (PAULI, 2010).

A utilização dos cogumelos como alimento funcional tem aumentado expressivamente nos últimos anos e seu consumo mundial vem crescendo em razão do seu valor nutritivo e da disponibilidade do mercado, o que torna o produto mais popular e acessível (DONINI, BERNARDI e NASCIMENTO, 2006). Entretanto, no Brasil o cogumelo ainda é considerado uma iguaria, devido à falta de hábito do consumidor, ao custo elevado e à pequena disponibilidade do produto no mercado (LEMOS, 2009).

Os cogumelos são comercializados frescos, em conserva ou desidratados fatiados, sendo muito apreciados na culinária internacional (MONTEIRO *et al.*, 2005). Segundo a Resolução nº 272, de 22 de setembro de 2005 da ANVISA que Aprova o "Regulamento técnico para produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis" o cogumelo comestível tradicionalmente utilizado como alimento pode estar dessecado, inteiro, fragmentado, moído ou em conserva, defumado e/ou submetido

à cocção e/ou salga e/ou fermentação ou outro processo tecnológico considerado seguro para a produção de alimentos. Os cogumelos comestíveis para uso humano também podem ser apresentados na forma de cápsula, extrato, tablete, líquido, pastilha, comprimido ou outra forma não convencional de alimento (BRASIL, 2005).

Segundo dados da FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, a produção mundial de cogumelos foi estimada em 2000, em cerca de 2,4 milhões de toneladas métricas, destacando-se como maiores produtores a China, com 708 mil toneladas métricas, e os Estados Unidos, com 390 mil toneladas métricas (FAEMG, 2012).

O Brasil não possui dados oficiais relativos à produção anual de cogumelos. Estima-se que a região do Alto Tietê, em São Paulo, é a maior produtora nacional. Anualmente, a região comercializa nos mercados interno e externo mais de 4 mil t, representando cerca de 80% da produção nacional. A produção brasileira, portanto, deve girar em torno de 3 mil toneladas anuais ou 0,12% da produção mundial, com destaque para o champignon. Somando a produção interna às importações e subtraindo as exportações, estima-se que o consumo anual de cogumelos no país seja de 70 gramas por habitante (FAEMG, 2012).

3.2 Composição Centesimal

Estudos comprovam que o valor nutritivo dos cogumelos, apesar da variabilidade existente entre as espécies estudadas, é considerado de qualidade para uma dieta balanceada (MANZI *et al.*, 1999). Considerando seu elevado teor de proteínas, carboidratos e fibras e seu baixo teor lipídico, os cogumelos podem ser perfeitamente incluídos na dieta usual, como fonte de nutrientes importantes e como alimento de baixo valor calórico.

O teor de umidade dos cogumelos é muito elevado, em torno de 86 a 94% em base úmida, teor este que pode afetar a textura e diminuir o prazo de validade dos cogumelos comestíveis *in natura* (KALÁČ, 2009). A alta umidade e a própria composição bioquímica dos cogumelos torna-os suscetíveis a mudanças indesejadas através de enzimas endógenas ou microbianas, por esse motivo os cogumelos devem ser estocados a baixas temperaturas e consumidos dentro de um curto prazo após sua coleta (SIMÒN *et al.*, 2005; MANZI *et al.*, 2004) ou devem ser submetidos a processos que

possam conservá-los por um maior período de tempo. As diferentes espécies de cogumelos comestíveis podem apresentar variabilidade no teor de umidade presente. Mattila *et al.*, (2001) afirma que vários fatores ambientais podem afetar esse conteúdo de umidade nos cogumelos durante o crescimento e armazenamento, como a temperatura e a umidade relativa do ar.

Com uma taxa média de 4 a 6% de proteína nos cogumelos frescos (LEMOS, 2009) e de 19 a 35% em cogumelos secos (MATTILA, *et al.*, 2000), estas espécies de fungos podem ser consideradas fontes dessas macromoléculas. Esses teores são calculados utilizando um fator de correção de 4,38, diferente do geralmente usado, 6,25, fator que considera que as proteínas possuem 16% de nitrogênio totalmente digerível. Entretanto, os cogumelos possuem uma grande quantidade de quitina, compostos nitrogenados não proteicos em suas paredes celulares, adotando assim, um fator de correção de 4,38, sugerindo que 70% dos compostos nitrogenados sejam digeridos (PAULI, 2010).

O fator de correção adotado para quantificar o teor de proteínas pelo método Kjeldahl diverge entre alguns pesquisadores. Segundo Bauer-Petrovska (2001) o fator 4,16 é recomendado, pois foi observada uma proporção média de 33,4% de nitrogênio não proteico, a partir do nitrogênio total. Alguns autores ainda utilizam o fator 6,25 para o cálculo de proteínas em cogumelos comestíveis, no entanto o fator de 4,38 tem sido bastante adotado entre os pesquisadores.

Pesquisas realizadas com cogumelos comestíveis comercializados no Brasil relataram uma grande variabilidade nos teores de proteínas presente. Espécies cultivadas em Curitiba – Paraná apresentaram teores que variaram entre 16,42 e 38,91% de proteína bruta (Helm *et al.*, 2009). Cogumelos adquiridos na região de Salto em Campinas / SP, foram analisados por Pauli (2010) e a quantidade de proteínas variou de 14,8 a 27,0% em seis espécies diferentes. Furlani e Godoy (2007) avaliaram os cogumelos comestíveis Champignon Paris, Shitake e Shimeji, adquiridos na cidade de Campinas e obtiveram um valor médio de 23% de proteína bruta entre as espécies.

Segundo dados apresentados na literatura em revisão feita por Kalač (2009), os teores de proteína apresentaram grande variabilidade conforme espécie estudada variando de 16,5 a 59,4%. Em estudos realizados com cogumelos comestíveis cultivados no sudoeste da China encontrou-se um teor de proteínas com variação entre 21,04 e 29,04% (LIU *et al.*, 2012). Todos os autores citados utilizaram 4,38 como fator de correção.

As fibras também são constituintes de grande importância presentes em quantidades consideráveis nos cogumelos comestíveis. Estas estão presentes na forma solúvel e insolúvel. As principais fibras insolúveis são a celulose e a lignina. Dentre as solúveis, a mais conhecida é o polissacarídeo Beta-glucana, com ação potencializadora do sistema imunológico (MANZI e PIZZOFERRATO, 2000). Dados relatados na literatura, compilados por Furlani e Godoy (2007), destacaram teores de fibra alimentar total que oscilaram entre as espécies estudadas variando de 18,20 a 52,70%, todos calculados a partir da matéria seca, demonstrando elevado teor deste constituinte em cogumelos comestíveis.

Os teores de fibras alimentares variam de acordo com a espécie estudada, Helm *et al* (2009), encontraram para cogumelos cultivados no sul do Brasil, Curitiba- Paraná, valores que variavam de 21,13 a 36,46% com maior teor para o cogumelo da espécie *Lentinula edodes*. Esse cogumelo possui a lentiniana, um conhecido e importante polissacarídeo. Estima-se que o mecanismo de ação da lentiniana seja por estimulação do funcionamento dos macrófagos, que aumentam a produção de interleucina-1, substância esta que age combatendo os tumores. Além disso, ele também estimula a proliferação de linfócitos T, aumentando a secreção de interleucina-2 (PAULI, 2010).

Os cogumelos são considerados ainda fontes de carboidratos, como manitol e trealoses (MANZI *et al.*, 2001; BARROS *et al.*, 2008; KALÁČ, 2009). O teor de carboidratos dos cogumelos representa a maior parte da composição dos cogumelos comestíveis, com uma média de 50 a 65% da composição em base seca (WANI, 2010).

Os estudos encontrados na literatura para composição centesimal de alimentos calcula o teor de carboidratos em cogumelos por diferença, utilizando os dados de proteínas, lipídios, cinzas, sólidos totais e fibras do alimento estudado (FURLANI, 2004). Entretanto, existem divergências entre alguns autores em excluir os teores de fibras alimentares desse cálculo. Helm e colaboradores (2009) contabilizaram no cálculo para carboidratos os teores de fibras alimentares e encontraram valores para carboidratos em cinco espécies de cogumelos comestíveis, que variaram de 25,71 a 38,08%, teores inferiores aos encontrados em estudos feitos por Furlani e Godoy (2007), que variaram de 54,12 a 69,58% em três espécies de cogumelos comestíveis. Liu e colaboradores (2012), não utilizaram o teor de fibra alimentar em seus cálculos e obteve para cinco espécies de cogumelos comestíveis cultivadas no Sudoeste da China teores de carboidratos que variaram de 56,76 a 64,72%.

Os cogumelos apresentam baixo teor lipídico e por consequência baixo valor energético (SMIDERLE *et al.*, 2008). O teor de lipídios presente em cogumelos comestíveis varia entre 1,1 e 8,3% em base seca (FURLANI, 2004), entretanto, estes possuem proporções elevadas de ácidos graxos insaturados, além de apresentarem em sua composição lipídica, ácidos graxos livres, esteróis, ésteres de colesterol e fosfolipídios.

3.3 Perfil de ácidos graxos em cogumelos

O consumo e os benefícios da ingestão de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) têm sido constantemente estudados, constatando-se efeitos fisiológicos importantes em humanos na prevenção e no tratamento de muitas doenças (WARD, 1995; MAYSER *et al.*, 1998; SANDER, 2000). A identificação destes ácidos graxos em alimentos é de grande interesse, por serem essenciais e pela capacidade limitada do organismo humano em sintetizar os PUFAs, devendo ser ingeridos na dieta alimentar (TAKAHASHI, 2005).

Os ácidos graxos poli-insaturados são precursores de prostaglandinas, as quais são responsáveis por importantes funções fisiológicas, como contração do útero, controle de pressão sanguínea e secreção das paredes do estômago (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007). A presença desses ácidos graxos na alimentação é importante para que possam ser utilizados pelos tecidos corporais, através da ação de enzimas presentes no fígado que dão origem a ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, importantes em processos inflamatórios e de defesa do organismo (HAAG, 2003).

Estudos tem relatado uma elevada proporção de ácidos graxos em cogumelos comestíveis. Dentre os mais apontados em pesquisas diversas, tem-se a presença em quantidades expressivas dos PUFAs, como ácido linoleico e linolênico. O fato dos cogumelos terem uma alta proporção de ácidos graxos insaturados em relação aos saturados, e uma alta percentagem de ácido linoleico, valoriza o seu consumo numa perspectiva de alimento saudável (CHANG e MILES, 2004). A presença de quantidades elevadas do ácido graxo linoleico confere ao alimento excelente qualidade nutricional, pois este pode ser convertido ao ácido araquidônico que desempenha um importante papel imunológico, dando origem a mediadores inflamatórios como os eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos) (HAAG, 2003).

A quantidade de ácidos graxos livres presentes em cogumelos comestíveis varia entre 74,0 - 83,55 % do total de ácidos graxos, com destaque para os ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoleico, sendo que este último compreende cerca de 70 a 90% do conteúdo lipídico presente nestas espécies (NAPPI *et al.*, 1999).

Estudos apontam o ácido graxo linoleico como predominante em cogumelos comestíveis. Carvalho (2009) avaliou o perfil de ácidos graxos em extratos hexânicos de sete espécies de cogumelos comestíveis comercializadas na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais e obteve resultados que variaram de 40,6 a 95,5% do total de ácidos graxos identificados, com um maior teor para o cogumelo Champignon Paris, que obteve também maior teor de ácido graxo linoleico (41,7%), seguido pelo Hiratake salmão (20,2%). Neste estudo, o cogumelo Hiratake salmão apresentou também quantidade expressiva de ácido α – linolênico com um teor de 22,0%. Öztürk e colaboradores (2011) avaliaram cogumelos da espécie *Agaricus* coletados na cidade de Banaz-Usak - Turquia e encontraram uma porcentagem de ácido graxo linoleico em extratos hexânicos que variou de 61,82 a 67,29%, evidenciando também a predominância desse ácido.

Em estudo comparativo desenvolvido por Ribeiro e colaboradores (2009) foram avaliadas doze espécies de cogumelos coletadas na cidade de Trás-os-Montes no Nordeste de Portugal e num aspecto geral os ácidos graxos oleico, linoleico, palmítico e esteárico estavam presentes em teores mais elevados, com predominância do ácido oleico variando de 18 a 79%, seguido do linoleico (11 - 79%) e, em menor proporção os ácidos palmítico (0,4 - 24%) e esteárico (0,2 - 16%). É importante salientar que a composição de ácidos graxos nos cogumelos é variável de acordo com a espécie estudada (YILMAZ *et al.*, 2006).

3.4 Antimicrobianos Naturais

Atualmente a busca por substâncias naturais que possam agir como agentes antibacterianos têm crescido dentre a comunidade acadêmica, considerando assim a inclusão destas substâncias nos chamados sistemas de bioconservação de alimentos, um sistema de preservação amplamente aceito, sendo referido como um procedimento natural capaz de prover a extensão da vida útil e satisfatória segurança microbiológica

de alimentos (FIORENTINI *et al.*, 2001; RISTORI; PEREIRA; GELLI, 2002; UTAMA *et al.*, 2002).

Uma maior estabilidade dos alimentos e um eficiente controle na qualidade destes torna-se um incentivo para o emprego de métodos de bioconservação, que sejam eficazes no controle de microrganismos patogênicos. Com o intuito de garantir a segurança dos alimentos e atender aos requisitos nutricionais surgem os conservantes naturais com potencial aplicação em alimentos, que podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com outra tecnologia. Todavia, a escolha do antimicrobiano deve ser baseada na compatibilidade química e sensorial deste com o alimento alvo, na sua efetividade contra microrganismos indesejáveis, segurança, dentre outras características (SETTANNI; CORSETTI, 2008).

Nesse contexto, o uso de agentes antimicrobianos naturais torna-se uma alternativa viável para garantir a estabilidade de alimentos. Esses agentes são muitas vezes polipeptídios que, após hidrólise enzimática, liberam peptídeos biologicamente ativos (TIWARI *et al.*, 2009). Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) apresentam largo espectro de atividade contra grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias Gram positivas e Gram negativas, protozoários, bolores, leveduras e vírus. Por apresentarem atividade de inibição contra microrganismos frequentemente envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar, problemas decorrentes da ingestão de alimentos contaminados devido a falhas no processo de fabricação, conservação ou exposição, os agentes antimicrobianos são promissores para a indústria de alimentos (KRÜGER *et al.*, 2006).

A quitosana devido às suas propriedades antimicrobianas vem sendo sugerida como uma opção viável para atender às necessidades desse segmento alimentício que necessita garantir a estabilidade e segurança dos seus produtos, a partir de produtos naturais. Trata-se de um heteropolímero natural, amino catiônico, composto por unidades β -1,4 D-glucosamina ligadas a resíduos de N-acetilglucosamina, sendo encontrada na parede celular de fungos. A quitosana também pode ser obtida através da desacetilação da quitina, podendo o grupo N-acetil sofrer vários graus de desacetilação, gerando assim diversos derivados (KHAN *et al.*, 2002; ANDRADE *et al.*, 2003; OKAWA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2003). Seu mecanismo de ação sobre os microrganismos não está completamente elucidado, entretanto, sabe-se que esta ação sofre influência de fatores intrínsecos (grau de desacetilação) e extrínsecos (nutrientes,

condições do meio ambiente, substratos químicos) (COSTA SILVA, SANTOS e FERREIRA, 2006).

A utilização de massa micelial de fungos como fonte alternativa de quitina e quitosana tem demonstrado grandes vantagens, tais como: extração simultânea de quitina e quitosana, independência dos fatores de sazonalidade, produção em larga escala (SILVA *et al.*, 2006; AMORIM *et al.*, 2001; FRANCO *et al.*, 2005; AMORIM *et al.*, 2006b). Os cogumelos possuem uma quantidade significativa de quitina, polímero da N acetilglicosamina, em suas paredes celulares (PARDO *et al.*, 2001), tornando-se uma possível fonte dessa substância com propriedades antimicrobianas. Esses teores podem variar conforme a espécie e seu estágio de maturação, pois em estágios mais avançados, ocorre maior síntese de quitina na parede celular dos cogumelos. O cogumelo Champignon Portobello, que se apresenta como uma variedade mais madura quando comparada ao *A. bisporus* convencional (Champignon Paris), possui maior teor de quitina (BEELMAMN e EDWARDS, 1989).

Estudos realizados com cogumelos do gênero *Pleurotus* os apontam como eficientes agentes antimicrobianos, a partir das substâncias produzidas por estes, tais como: *Pleurotus japonicus*, que produz o antibiótico 6-deoxyilludin M, com atividade contra *Bacillus subtilis* (HARA *et al.*, 1987), *P. griseus*, *P. palmatus* e *P. sapidus*, que têm atividade antibiótica especialmente sobre *Staphylococcus aureus* (GUNDECIMERMAN, 1999) e *P. ostreatus*, com ação antimicrobiana principalmente contra *B. subtilis* (GARCIA *et al.*, 1998; BELTRAN-GARCIA, 1997).

3.5 Atividade de Inibição da Acetilcolinesterase (AChE)

A doença de Alzheimer (DA) é uma das principais doenças neuro-degenerativas que acomete a grande maioria da população acima de 65 anos. É uma enfermidade progressiva e irreversível, com consequente perda da memória e diversos distúrbios cognitivos (SMITH, 1999). Os principais sintomas estão relacionados com a redução de neurotransmissores cerebrais, como acetilcolina, noradrenalina e serotonina (BRYNE, 1998). O tratamento sintomático envolve primariamente a restauração da função colinérgica, sugerindo que o aumento dos níveis de acetilcolina (ACh) pela inibição da acetilcolinesterase (AChE) pode melhorar a insuficiência na função cognitiva em estágios prematuros da Doença de Alzheimer (DA) (MESULAM; LARRY, 2009).

Os inibidores da enzima AChE são uma das principais classes de medicamentos utilizadas no tratamento de sintomas de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA), pois são capazes de elevar os níveis de acetilcolina no cérebro. Diante disso cresce o interesse na investigação de propriedades biológicas de espécies que apresentem novas moléculas bioativas, com atividade de inibição (SILVEIRA *et al.*, 2011).

Alguns agentes anticolinesterásicos usados comumente no tratamento da Doença de Alzheimer (DA) possuem limitações de uso devido à meia-vida curta e aos efeitos colaterais que causam (SUNG *et al.*, 2002). Alguns compostos naturais vegetais como a galantamina e huperzina, que apresentam ação de inibição da AChE, já foram detectados desencadeando a realização de estudos com intuito de encontrar através de fontes alternativas, como plantas e microrganismos, novos fármacos com menos efeitos colaterais que proporcionem ao indivíduo portador da doença uma melhor qualidade de vida (TREVISAN; MACEDO 2003; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006, VIEGAS *et al.*, 2004).

Na busca de agentes anticolinesterásicos naturais, estudos foram realizados na Turquia com extratos metanólicos, etanólicos e de acetato de etila dos cogumelos *A. bitorquis*, *A. essettei* e *A. bisporus*. Foi investigada a atividade de inibição da enzima AChE, em comparação com a galantamina, utilizada no tratamento da DA. Foi detectada atividade inibitória nos extratos de acetato de etila das três espécies avaliadas, com maior atividade para extrato da espécie *A. bitorquis* (ÖZTÜRK *et al.*, 2011). Ainda na Turquia, extratos metanólicos de cogumelos coletados na província de Bolu foram avaliados quanto ao seu efeito inibitório, sendo esses, ativos frente a AChE, com maior eficácia da espécie *P. sulphureus* com uma média percentual de 37,61%, seguido pelo *P. pinicola* (31,44%) e *T. versicolor* (28,35%) (ORHAN e ÜSTÜN, 2011).

Atualmente, a busca de inibidores da AchE tornou-se viável com a modernização dos ensaios para detecção de possíveis inibidores desta, utilizando-a nos bioensaios, permitindo assim a avaliação de uma maior quantidade de amostras (TELES, 2012). Este método sensível, capaz de detectar e selecionar amostras com ação anticolinesterásica é baseado na hidrólise do iodeto de acetilcolina (ACTI) pela AchE, produzindo tiocolina, que reage com o ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB) originando o composto 5-tio-2-nitro-benzoato (Figura 5), que apresenta coloração amarela (SILVA, 2009).

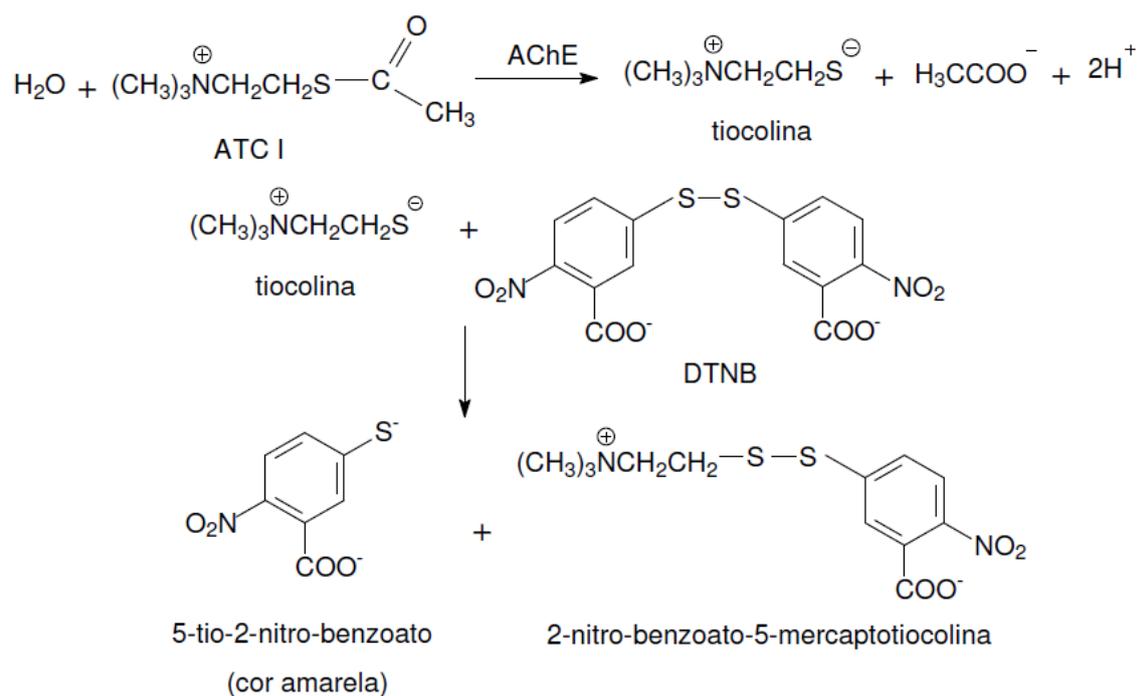


Figura 2. Reações envolvidas no método de Rhee

Fonte: SILVA, 2009

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A composição centesimal foi realizada no laboratório de Bioprocessos Alimentícios, no Centro de Desenvolvimento e Difusão de Tecnologias (CEDETEC) na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Itapetinga, Bahia. O perfil cromatográfico de ácidos graxos e ensaios biológicos foram realizados nos Laboratórios do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas (ICEX) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), *campus* Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais.

4.1 Amostras

Foram adquiridos três lotes diferentes de amostras das espécies de cogumelos, Champignon de Paris (*Agaricus bisporus*), Shimeji Preto (*Pleurotus ostreatus*), Eryngui (*Pleurotus eryngii*), Champignon Portobello (*Agaricus bisporus*), Shiitake (*Lentinula edodes*), Hiratake Salmão (*Pleurotus ostreatus*) e Shimeji Branco (*Pleurotus ostreatus*) em diferentes redes de supermercados da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais (Figura 3). Esta capital foi escolhida por apresentar disponibilidade de um maior número de espécies e por haver periodicidade na comercialização das mesmas. As amostras de cogumelos frescos apesar de serem adquiridas na cidade de Belo Horizonte eram provenientes da cidade de Mogi das Cruzes – São Paulo, cidade considerada maior produtora de cogumelos comestíveis no país.

As amostras foram secas em estufa a 65°C (SOLAB / São Paulo - Brasil), trituradas e acondicionadas em embalagens plásticas e estocadas até o momento da realização das análises, que foram realizadas em triplicata.



Figura 3. Espécies de cogumelos estudadas

4.2 Composição centesimal

Todas as determinações foram realizadas nas amostras secas, exceto a umidade, que foi realizada com as amostras frescas.

O teor de umidade foi baseado na determinação da perda de peso das amostras de cogumelos comestíveis frescas aquecidas em estufa a 105 °C, até peso constante, conforme metodologia recomendada pelo IAL (2004).

O teor de cinzas foi determinado de acordo com a metodologia proposta pela AOAC (1995). Pesou-se 1 g de amostra moída e submeteu-se à incineração em mufla (marca Lavoisier, modelo 400 C / São Paulo, Brasil) a 550 °C por 4 horas até obtenção do resíduo de coloração cinza esbranquiçada.

O teor do extrato etéreo foi realizado a partir de extração direta em Soxhlet (marca Marconi Modelo Ma 044), utilizando 1 g de amostra seca e moída e o éter de petróleo PA como solvente extrator durante 6 horas, conforme recomendado pela AOAC (1995).

A quantificação de proteína bruta foi realizada pelo método de Kjeldahl, recolhendo-se a amônia liberada em ácido bórico a 4%, de acordo com a metodologia recomendada pelo IAL (2004). Utilizou-se o fator de conversão 4,38, já que os cogumelos possuem uma significativa quantidade de compostos nitrogenados não

proteicos (que não são digeridos) na forma de quitina, em suas paredes celulares (BREENE, 1990).

A determinação de fibra alimentar total foi realizada segundo procedimento da AOAC (1997). As amostras foram tratadas com enzimas α – amilase, protease e amiloglicosidase e soluções tampão em diferentes níveis de pH e temperatura, para remoção total do amido e parcial da proteína. Esse método enzimico-gravimétrico requer a digestão enzimática de proteínas e de amido não resistente, seguido pela precipitação de fibra solúvel e determinação de peso.

O teor de carboidratos totais foi calculado por diferença (100 g – gramas totais de sólidos totais, proteínas, extrato etéreo e cinzas). A fração calculada incluiu as fibras alimentares, e estas não fizeram parte do cálculo (TBCAUSP, 2012).

4.3 Preparação dos Extratos

Os extratos das espécies de cogumelos comestíveis foram obtidos a partir da imersão das amostras secas e trituradas em hexano por um período de 24 horas, à temperatura ambiente (25°C). Posteriormente, este material foi filtrado e concentrado em rotavapor (marca Fisatom, modelo 802 / São Paulo - Brasil). Foram realizadas três extrações e os extratos obtidos foram combinados e pesados. Realizou-se uma segunda extração, utilizando os resíduos das amostras, com o solvente hidroetanólico 96%. Os extratos obtidos foram, similarmente, filtrados e concentrados (CARVALHO, 2009).

4.4 Hidrólise dos Triglicerídeos

A reação de hidrólise do material lipídico resultante das extrações realizadas com hexano foi conduzida em microescala em aparelho microondas. Em tubos ependorfs foram pesados 10 mg dos extratos hexânicos e adicionados 100 μ L de uma solução alcoólica de hidróxido de sódio 5% (v/v), uma base forte que resulta na reação de saponificação. Após agitação em vortéx (marca Phoenix/Araraquara, Brasil) por 10 segundos, os extratos foram hidrolisados em forno de microondas doméstico (Panasonic Piccolo), à potência de 80W durante 5 minutos (CARVALHO, 2009).

Posteriormente, foram adicionados 400 μ L de ácido clorídrico a 20%, 10 mg de cloreto de sódio e 600 μ L de acetato de etila, para precipitação do ácido graxo. Após

agitação em vortéx (marca Phoenix/Araraquara, Brasil) por 10 segundos e repouso de 10 minutos, para completa visualização de duas fases, uma alíquota de 300 μL da camada orgânica foi retirada, colocada em tubos ependorfs e o solvente remanescente foi removido por evaporação em capela com fluxo de ar, obtendo-se assim os ácidos graxos livres (CARVALHO, 2009).

4.5 Derivatização dos Ácidos Graxos

Os ácidos graxos livres, originalmente presentes, e os resultantes da hidrólise foram derivatizados para as suas formas de ésteres metílicos com 100 μL de trifluoreto de boro (BF_3) solução metanólica (14%), aquecidos à 80 ° C durante 10 minutos. Em seguida, 25 μL de solução do padrão interno tridecanoato de metila (C13:0) em metanol (2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram adicionados em cada amostra, com homogeneização em vortéx (marca Phoenix/Araraquara, Brasil) e em seguida uma alíquota de 2 μL foi retirada para análise por Cromatografia Gasosa.

4.6 Análise de Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa

As análises foram realizadas em um Cromatógrafo a Gás HP5890 equipado com detector por ionização de chamas. Utilizou-se uma coluna SILAR 10C (NST) 30m x 0,25mm x 0,25 μm com temperatura inicial da coluna de 100°C por 1 min, com aumento de 7°C/min até 220°C, temperatura do injetor (split de 1/50) a 250°C e temperatura do detector a 250°C. Hidrogênio como gás de arraste (2,0 ml/min) e volume de injeção de 1,0 μL . A identificação dos picos foi feita por comparação com padrões de ácidos graxos metilados SUPELCO37.

4.7 Testes de Atividade Biológica

4.7.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana - Técnica de Microdiluição em Caldo

Para a avaliação da ação antimicrobiana dos extratos obtidos das amostras de cogumelos comestíveis foram utilizadas as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*

cereus e a levedura *Candida albicans*. Os procedimentos de preparação do pré-inóculo e inóculo dos microrganismos foram realizados em cabine de segurança biológica, sob condições assépticas. Os materiais e reagentes utilizados foram previamente autoclavados a 121 °C durante 20 minutos.

O teste foi realizado em quintuplicata, com preparo de placas controles. Foram utilizadas microplacas de 96 poços, com 12 colunas e 8 linhas (Figura 5a) e os extratos foram testados em uma concentração fixa de 1000 µg/mL. Os extratos foram pesados e solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em uma concentração de 50 mg/mL. Os resultados foram mensurados por leitor de microplacas Thermo Plate (Figura 5b).

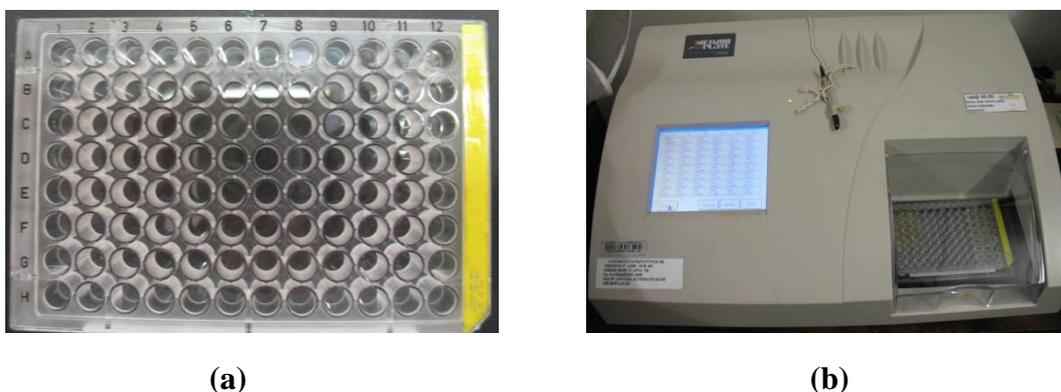


Figura 4. (a) Microplacas 96 poços; (b) Leitora ELISA Thermo Plate

O preparo do pré-inóculo foi realizado a partir de bactérias estocadas em tubos de ensaio que fazem parte da coleção do Laboratório de Bioensaios e Biotecnologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Estas foram raspadas com o auxílio de uma alça de platina e inoculadas em tubos de ensaios pequenos contendo 3,0 mL de meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion). Em seguida, os tubos foram incubados em estufa a 37°C durante 8-18 horas.

O inóculo bacteriano foi preparado a partir de 500 µL do pré-inóculo, transferidos para tubos de ensaio contendo 4,5 mL de água destilada estéril. Os tubos foram homogeneizados e a concentração ajustada comparando-se com o tubo de 0,5 da escala de McFarland de turbidez padrão (10^8 UFC/mL). Para realização do teste, 500 µL do inóculo preparado foram adicionados a 4,5 mL de meio de cultura BHI.

Após preenchimento das microplacas, estas foram incubadas em estufa a 37°C e após 24 horas foi realizada a primeira leitura do teste em leitor de microplacas. Uma

nova leitura foi realizada, após 48 horas para finalização do teste. As leituras foram realizadas a um comprimento de onda fixo de 492 nm.

Para realização do procedimento foram preparadas as seguintes placas.

- **Placa Teste**

Em cada placa teste foram testados 12 extratos, ou seja, um em cada coluna, utilizando-se assim, quatro placas para cada teste com cada microrganismo. Aos primeiros 5 poços de cada coluna foram adicionados 100 µL da solução de trabalho que continha 40 µL de solução do extrato mais 960 µL de meio de cultura BHI, e 100 µL de inóculo do microrganismo testado.

- **Placa de controle de crescimento do microrganismo**

Foram adicionados a cada poço da placa controle de crescimento do microrganismo, 100 µL de inóculo do microrganismo em teste e 100 µL de meio de cultura BHI.

- **Placa do Branco**

Em cada poço das placas do branco, foram adicionados 100 µL da solução de trabalho, composta por 40 µL da solução do extrato mais 960 µL de meio de cultura BHI, e 100 µL de água destilada estéril.

- **Placa de controle de esterilidade do meio de cultura BHI**

Adicionou-se a cada poço da placa de controle de esterilidade do meio de cultura, 100 µL de meio de cultura BHI e 100 µL de água destilada estéril.

4.7.2 Avaliação da atividade de inibição de acetilcolinesterase em cromatografia em camada delgada (CCD) – Método Ellmann

O ensaio para avaliação qualitativa da atividade anticolinesterásica foi realizado segundo metodologia descrita por Ellmann (1961), adaptada por Rhee *et al.* (2001), para cromatografia em camada delgada, utilizando-se placas cromatográficas de sílica gel. Como padrão foi utilizado uma solução de eserina.

Foram aplicados em placa cromatográfica, 5 µL de amostra (extratos brutos dissolvidos em clorofórmio e metanol) e do padrão na concentração de 10 mg/mL. A placa foi eluída em uma solução de hexano com 15% de acetato de etila, para os extratos hexânicos e uma solução de hexano com 30% de acetato de etila para os extratos etanólicos.

Após secagem, à temperatura ambiente, as placas foram borrifadas com uma solução 1:1 de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB) (1mM) e iodeto de acetilcolina (ACTI) (1 mM). Após 5 minutos, as placas foram borrifadas com a enzima (3 U/mL) em tampão Tris/HCl (50 mM) pH 8 contendo 0,1% p/v de albumina sérica bovina. Os resultados para inibição positiva a acetilcolinesterase foram confirmados pela observação da presença de halos brancos, após 10 minutos, em meio ao fundo amarelo.

4.7.3 Avaliação da atividade de inibição de acetilcolinesterase em microplaca – Método de Ellmann

O ensaio para a avaliação quantitativa da atividade anticolinesterásica foi realizado seguindo-se a metodologia de Ellmann (1961) para microplacas, fazendo-se a leitura de absorbância à 406 nm, utilizando-se microplacas. Esse teste foi realizado apenas para os extratos do terceiro lote, pois todas as amostras apresentaram um valor de Rf semelhante no ensaio qualitativo de inibição da enzima AchE, indicando que possivelmente a substância seja a mesma em todos os extratos estudados. O ensaio foi realizado em quintuplicata e, utilizando-se como padrão positivo de inibição da enzima AchE, uma solução de eserina na concentração de 10 mg/mL e como controle negativo o solvente utilizado para solubilizar as amostras.

- Preparo da solução de trabalho
 - a. Foram solubilizados 10 mg de amostra em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em solução de concentração de 10 mg/mL;
 - b. Retiraram-se 25 µL dessa solução e diluiu-se em 225 µL de solução tampão Tris/HCl (50 mM), obtendo-se, assim, a solução de trabalho;
- Adicionou-se 25 µL da solução de trabalho aos poços da placa de Elisa, mais 25 µL da solução de iodeto de acetilcolina (ACTI), 125 µL da solução de ácido 5,5' -ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB) e 50 µL de Tris/HCl (50 mM) pH 8,0 com albumina sérica bovina 0,1% (p/v);
- Mediu-se a absorbância a 406 nm em 8 repetições com intervalo de 1 minuto;
- Adicionou-se 25 µL da solução da enzima AchE (0,222 U/mL) em Tris/HCl pH 8,0 (contendo albumina sérica bovina 0,1% p/v) aos poços da microplaca;

- Mediu-se novamente a absorvância a 406 nm em 10 repetições com intervalo de 1 minuto.

As porcentagens de inibição foram calculadas comparando-se as taxas das reações das amostras com a taxa de reação do controle (solvente utilizado para solubilizar as amostras) através da fórmula abaixo.

$$\% \text{ Inibição} = 100 - (\text{taxa da reação amostra} / \text{taxa da reação controle} \times 100)$$

4.8 Análise Estatística

As determinações para composição centesimal e perfil de ácidos graxos foram efetuadas em triplicata e os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). As médias dos três lotes analisados para composição centesimal foram submetidas à análise de variância e Teste Tukey de comparação de médias ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software SAEG versão 8.0. A atividade antimicrobiana e de inibição de acetilcolinesterase realizada com os extratos hexânico e hidroetanólico das amostras de cogumelos comestíveis foi executada em quintuplicata e a diferença entre os extratos foi avaliada a partir de análise de variância, utilizando o software SAEG versão 8.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da Composição Química

Os resultados obtidos nas determinações realizadas para a composição química em sete diferentes espécies de cogumelos estão dispostos nas Tabelas de 1 a 6. Os resultados estão apresentados em base seca, com exceção dos teores de umidade que estão apresentados em base úmida.

Os teores de umidade variaram entre 83,1 e 91,9%, com menor teor para o cogumelo Hiratake Salmão e maior teor para o Shimeji Branco, respectivamente (Tabela 1). Os cogumelos apresentaram teores elevados de umidade, todos acima de 80%, não havendo diferença entre eles ($p > 0,05$). Estas espécies de fungos macroscópicos são conhecidas por possuírem elevado teor de umidade, um dos fatores mais importantes quando se trata de valor nutricional, pois este influencia diretamente na quantidade de matéria seca, e, desta forma, também na quantidade dos nutrientes presentes (MATTILA *et. al.*, 2001).

Tabela 1. Teor de umidade em sete espécies distintas de cogumelos (%)

Espécies	Lotes ^a			Médias ^b
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	
Shitake	88,9 ± 1,68	93,3 ± 0,09	92,8 ± 0,40	91,6 ± 2,41a
Hiratake salmão	66,6 ± 1,34	90,0 ± 0,11	92,7 ± 0,20	83,1 ± 14,35a
Eryngui	85,2 ± 1,20	92,2 ± 0,55	89,9 ± 0,17	89,1 ± 3,56a
Shimeji Preto	92,1 ± 0,15	91,1 ± 0,27	91,7 ± 0,21	91,6 ± 0,50a
Shimeji Branco	89,9 ± 0,60	92,2 ± 0,35	93,6 ± 0,28	91,9 ± 1,86a
Champignon Paris	83,0 ± 1,25	92,8 ± 0,34	92,5 ± 0,15	89,5 ± 5,66a
Champignon Portobello	89,7 ± 0,77	92,3 ± 0,16	92,4 ± 0,05	91,6 ± 1,30a

^aMédias e estimativa de desvio padrão (n=3). Valores expressos em base úmida. ^bMédias e estimativa de desvio padrão das análises de três diferentes lotes. Valores assinalados com a mesma letra na mesma coluna para resultados finais, não diferem significativamente ($p > 0,05$), segundo teste de Tukey.

Observou-se que o 1º lote das amostras de cogumelos comestíveis, obtidas no mês de novembro do ano de 2011, apresentou um menor teor de umidade em relação aos outros lotes avaliados, com exceção do Shimeji Preto. Esta diferença pode estar

ligada ao fato das amostras terem sido transportadas de Belo Horizonte, onde foram adquiridas, para a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, em Itapetinga – Bahia. O mesmo não aconteceu com os 2º e 3º lotes, que foram adquiridos em Belo Horizonte nos meses de maio e junho, respectivamente, e seus teores de umidade foram avaliados na Universidade Federal de Minas Gerais, na mesma cidade. O transporte não adequado dessas amostras adquiridas frescas pode ter causado a perda de água desses cogumelos, diminuindo assim os teores de umidade. Para que se mantenham frescos, os cogumelos devem ser armazenados por períodos curtos a 0-5°C de temperatura e 95-98% de umidade relativa. O tempo de vida a 1,5°C é de 5 a 7 dias e a 4,5°C é reduzido para 2 dias (FONSECA e MORAIS, 2000).

O cogumelo *Hiratake Salmão* apresentou uma grande diferença entre os lotes, com um teor de 66,6% para o 1º lote e 90,0%, 92,7% para os 2º e 3º lotes respectivamente. Esta discrepância pode estar associada também, além do transporte inadequado, a diversos fatores ambientais que podem afetar o conteúdo de umidade nos cogumelos durante o crescimento e armazenamento, como a temperatura e a umidade relativa do ar durante a produção e acondicionamento (MATTILA et. al., 2002b), considerando que estes cogumelos foram obtidos em diferentes fornecedores da cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais e em diferentes épocas do ano.

Valores semelhantes aos encontrados neste estudo foram observados por PAULI (2010) em estudos realizados com cogumelos comestíveis comercializados na cidade de Salto, região de Campinas, que encontrou valores superiores a 80% de umidade para as espécies. Segundo Chang (2008), o teor de umidade dos cogumelos frescos varia entre 70 - 95%, dependendo do momento da coleta e das condições ambientais.

Os teores médios de proteína total variaram de 20,3 a 36,3%, com menor teor proteico para o *Shimeji Preto* e maior teor para o *Shimeji Branco*, respectivamente (Tabela 2). Os cogumelos *Shimeji Preto*, *Champignon Portobello* e *Champignon Paris* destacaram-se dentre as espécies estudadas com teores de 36,3, 33,7 e 26,5% ($p > 0,05$), respectivamente. Estes teores correspondem a aproximadamente 50% do valor diário de referência (VDR) para as proteínas (75 gramas), segundo a Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Estas espécies podem ser consideradas como de “alto teor” de proteína, pois fornece teor superior a 30% da Ingestão Diária Recomendada do nutriente por 100 gramas do alimento, assim como o cogumelo *Eryngui* com um teor de 23,2%.

Os cogumelos Shitake, Hiratake Salmão e Shimeji Branco com teores médios de proteína total de 21,4; 21,5 e 20,3% ($p > 0,05$) podem ainda ser considerados como “fonte” de proteínas, pois seus teores perfazem o mínimo de 15% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) (BRASIL, 1998).

Tabela 2. Teor de proteínas em sete espécies distintas de cogumelos (%)

Espécies	Lotes ^a			Médias ^b
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	
Shitake	20,9 ± 0,63	23,8 ± 0,21	19,5 ± 0,56	21,4 ± 0,75b
Hiratake salmão	31,2 ± 1,03	16,7 ± 0,45	16,5 ± 0,58	21,5 ± 8,42b
Eryngui	22,3 ± 0,58	23,5 ± 0,13	23,9 ± 0,84	23,2 ± 0,83b
Shimeji Preto	36,0 ± 1,07	35,4 ± 0,38	37,6 ± 1,34	36,3 ± 1,13a
Shimeji Branco	23,4 ± 0,68	20,8 ± 0,20	18,3 ± 0,99	20,3 ± 2,55b
Champignon Paris	35,5 ± 0,15	17,4 ± 0,70	26,6 ± 0,83	26,5 ± 9,05ab
Champignon Portobello	36,9 ± 0,64	34,8 ± 0,46	26,8 ± 0,56	33,7 ± 5,95ab

^a Médias e estimativa de desvio padrão (n=3). Valores expressos em base seca. ^b Médias e estimativa de desvio padrão das análises de três diferentes lotes. Valores assinalados com a mesma letra na mesma coluna para resultados finais, não diferem significativamente ($p > 0,05$), segundo teste de Tukey.

Os cogumelos apresentaram divergência entre os teores médios nos três lotes avaliados. Isto pode ser explicado pelo fato de os cogumelos terem sido obtidos em diferentes fornecedores, o que implica em condições de cultivo distintas, principalmente as relacionadas ao tipo de substrato, um fator importante que pode influenciar diretamente o valor proteico dos cogumelos (FURLANI e GODOY, 2005). Fatores como local de cultivo e idade do corpo de frutificação são relevantes na composição proteica desses cogumelos também (PEDROSO e TAMAI, 2012).

Se comparados com alimentos de origem animal com alto teor de proteínas, como a carne (aproximadamente 25%), e àqueles comumente consumidos como leite (3%) e ovos (12%), os cogumelos apresentam quantidade superior dessas macromoléculas, além de apresentarem valores que se assemelham aos teores encontrados na soja (33 a 42%), podendo ser adotados como fontes alternativas de proteínas. Diversas espécies de cogumelos comestíveis possuem ainda teores de proteínas superiores à maioria dos vegetais (LEMOS, 2009).

Os teores médios de cinzas totais variaram entre 4,2 e 10,9% (Tabela 3), com menor teor para o Shimeji Preto e maior teor para o Champignon Portobello,

respectivamente. O cogumelo Champignon Paris também apresentou teor considerável de cinzas (9,8%), se comparado ao Champignon Portobello ($p > 0,05$).

Tabela 3. Teor de cinzas em sete espécies distintas de cogumelos (%)

Espécies	Lotes ^a			Médias ^b
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	
Shitake	5,2 ± 0,14	4,9 ± 0,14	4,7 ± 0,06	4,9 ± 0,22c
Hiratake salmão	8,0 ± 0,08	7,8 ± 0,06	7,3 ± 0,08	7,7 ± 0,38bc
Eryngui	6,5 ± 0,76	6,5 ± 0,14	7,1 ± 0,03	6,7 ± 0,37bc
Shimeji Preto	2,7 ± 0,24	4,4 ± 0,45	5,5 ± 0,32	4,2 ± 1,41c
Shimeji Branco	6,2 ± 0,16	7,1 ± 0,15	7,2 ± 0,13	6,8 ± 0,55bc
Champignon Paris	11,2 ± 0,14	10,4 ± 0,07	7,9 ± 0,03	9,8 ± 1,66ab
Champignon Portobello	13,3 ± 0,25	10,5 ± 0,03	8,9 ± 0,09	10,9 ± 2,19a

^a Médias e estimativa de desvio padrão (n=3). Valores expressos em base seca. ^b Médias e estimativa de desvio padrão das análises de três diferentes lotes. Valores assinalados com a mesma letra na mesma coluna para resultados finais, não diferem significativamente ($p > 0,05$), segundo teste de Tukey.

Os resultados encontrados para cinzas estão de acordo com dados compilados da literatura que indicam teores entre 5,27 e 10,5% para cogumelos comestíveis (YANG *et al.* 2001; MANZI *et al.* 1999). O teor de cinzas em um alimento representa o conteúdo mineral presente em sua composição, constituído de macro, micronutrientes e elementos traços, além de constituir o ponto de partida para a análise de minerais específicos. Os elementos fósforo, sódio e magnésio podem constituir cerca de 50 a 70% do teor total em cinzas dos cogumelos, enquanto o potássio, isoladamente, pode constituir 45% das cinzas totais (WANI *et al.*, 2010).

Geralmente os principais constituintes minerais quantificados em cogumelos são cálcio, magnésio, potássio, ferro, zinco e cobre (MATTILA *et al.*, 2001; CHYE *et al.*, 2009; GENÇCELEP *et al.*, 2009; OUZOUNI *et al.*, 2009). Metais pesados como arsênio, cádmio, mercúrio (BORCHERS *et al.*, 2004), chumbo e cobre podem estar presentes, principalmente quando não houver adequado cuidado nas áreas de cultivo e com a água utilizada (NOVAES e NOVAES, 2005). O conteúdo mineral presente nos cogumelos sofre influência, principalmente, das condições utilizadas no seu cultivo, estando diretamente relacionada a fatores como espécie, área de cultivo, tempo de crescimento do corpo de frutificação e distância de fontes poluidoras (GENÇCELEP *et al.*, 2009).

O teor médio de extrato etéreo dos cogumelos comestíveis estudados variou entre 9,4 e 14,8% (Tabela 4), com menor teor para o cogumelo Shimeji Branco e maior teor para o Champignon Paris, respectivamente, não havendo diferença entre as amostras ($p > 0,05$). Os cogumelos estudados apresentaram um teor de aproximadamente 30% da ingestão diária recomendada de lipídios (35 g/dia), segundo o Institute of Medicine (2005).

Os teores médios encontrados nesse estudo divergiram dos estudos realizados com estas espécies que apresentaram teores relativamente baixos para o conteúdo de lipídios presentes em cogumelos. Geralmente os cogumelos apresentam uma baixa quantidade de lipídios, numa faixa de 1,1 a 8,0%, segundo dados compilados na literatura (FURLANI, 2004), entretanto, este trabalho apresentou valores superiores a esta faixa. O Champignon Paris apresentou teor considerável de lipídeos com 14,8 %, valor superior aos encontrados por Furlani e Godoy (2007), com uma média de 5,5%, Pauli (2010), com teor de 5,0% e Vetter (2003), com uma quantidade de 2,3%.

Tabela 4. Teor de extrato etéreo em sete espécies distintas de cogumelos (%)

Espécies	Lotes ^a			Médias ^b
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	
Shitake	12,7 ± 1,08	15,7 ± 0,96	12,1 ± 0,29	13,5 ± 1,92 ^a
Hiratake salmão	14,4 ± 0,45	13,0 ± 0,08	13,3 ± 0,27	13,6 ± 0,73 ^a
Eryngui	12,4 ± 0,67	12,8 ± 0,13	13,2 ± 0,55	12,8 ± 0,40 ^a
Shimeji Preto	10,2 ± 0,71	15,6 ± 0,14	14,0 ± 0,46	13,3 ± 2,77 ^a
Shimeji Branco	7,6 ± 0,35	10,7 ± 0,24	9,8 ± 0,29	9,4 ± 1,59 ^a
Champignon Paris	16,0 ± 0,16	17,8 ± 0,37	10,6 ± 0,29	14,8 ± 3,74 ^a
Champignon Portobello	14,8 ± 0,61	13,9 ± 0,06	11,6 ± 0,66	13,4 ± 1,65 ^a

^a Médias e estimativa de desvio padrão (n=3). Valores expressos em base seca. ^b Médias e estimativa de desvio padrão das análises de três diferentes lotes. Valores assinalados com a mesma letra na mesma coluna para resultados finais, não diferem significativamente ($p > 0,05$), segundo teste de Tukey.

As espécies de cogumelos comestíveis estudadas apresentaram teor médio de fibra alimentar total entre 25,8 e 56,3%, com menor teor para o Champignon Paris e maior teor para o Shimeji Branco, respectivamente, evidenciando assim um elevado teor de fibras para as espécies (Tabela 5). O cogumelo Shimeji Branco destacou-se dentre as outras espécies com um maior teor de fibras, assim como os cogumelos Shitake (47,2%), Hiratake (49,4%) e Eryngui (49,6%) ($p > 0,05$).

Os cogumelos avaliados apresentaram teores superiores ao valor diário de referência recomendado para as fibras (25 gramas), segundo a Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2003), devendo, portanto ter seu consumo estimulado. Essa recomendação de ingestão de fibras alimentares diverge, pois segundo a Associação Dietética Americana, as recomendações nutricionais propostas para a população brasileira preconizam o consumo mínimo diário de 20g de fibra alimentar (ADA, 2002), e a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem recomendado uma quantidade ideal de fibra alimentar na dieta, de 27 a 40g/dia (média de 33,5 g/dia) (GARBELOTTI, TORRES e MARSIGLIA, 2003).

Tabela 5. Teor de fibra alimentar total em sete espécies distintas de cogumelos (%)

Espécies	Lotes ^a			Médias ^b
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	
Shitake	43,4 ± 0,48	45,5 ± 0,44	52,8 ± 0,18	47,2 ± 4,93abc
Hiratake salmão	41,8 ± 0,70	63,3 ± 1,28	43,2 ± 0,49	49,4 ± 12,02ab
Eryngui	42,1 ± 0,68	63,2 ± 0,63	43,6 ± 1,52	49,6 ± 11,77ab
Shimeji Preto	28,4 ± 0,77	32,2 ± 1,94	33,2 ± 3,42	31,3 ± 2,48bc
Shimeji Branco	47,7 ± 0,82	61,8 ± 0,79	59,3 ± 0,77	56,3 ± 7,51 ^a
Champignon Paris	23,2 ± 0,86	32,9 ± 0,14	21,4 ± 2,77	25,8 ± 6,18c
Champignon Portobello	33,3 ± 2,10	28,7 ± 6,03	23,2 ± 0,47	28,4 ± 5,05bc

^a Médias e estimativa de desvio padrão (n=3). Valores expressos em base seca. ^b Médias e estimativa de desvio padrão das análises de três diferentes lotes. Valores assinalados com a mesma letra na mesma coluna para resultados finais, não diferem significativamente (p > 0,05), segundo teste de Tukey.

As espécies analisadas, ainda, podem ser consideradas como alimentos com “alto teor” de fibras, pois apresentam valores superiores ao mínimo exigido, segundo a portaria nº 27, da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1998), que estabelece em regulamento técnico referente à informação nutricional complementar que um alimento sólido pode ser considerado fonte de fibra, quando possui um mínimo de fibras (3,0 g. 100 g⁻¹), e como de alto teor de fibras, quando contém, no mínimo, 6,0 g. 100 g⁻¹.

Essa elevada quantidade de fibras confere aos cogumelos importante funcionalidade, pois estas promovem efeitos fisiológicos benéficos incluindo laxação, e/ou atenuação do colesterol e glicose no sangue (AACC, 2003; DUXBURY, 2004). O

consumo desses polissacarídeos também está associado a menor incidência de doenças cardiovasculares (LIU, 2002; PEREIRA *et al.*, 2004) e alguns tipos de câncer (PACHECO e SGARBIERI, 2001) e, ainda, à redução da incidência da obesidade (CHAU e HUANG, 2004) e da constipação (DOHNALEK, 2004).

Estudos realizados com cogumelos comestíveis já apontaram elevado teor desses polissacarídeos. Furlani e Godoy (2007) encontraram valores próximos aos encontrados nesse estudo para os cogumelos Champignon Paris, Shitake e Shimeji (20,44%, 41,92% e 39,62%, respectivamente). Pauli (2010) avaliou seis espécies de cogumelos comestíveis comercializadas na região de Salto, Campinas e encontrou uma variação de 20,00 a 46,00%, com maior teor para o cogumelo Hiratake Salmão, que obteve valor bem próximo ao encontrado nesse estudo (49,4%). Helm e colaboradores (2009), em estudo realizado com cinco espécies comercializadas em Curitiba – Paraná obtiveram teores que variaram de 21,13 a 36,46%, com maior teor para o cogumelo Shitake e menor para o Champignon Paris, valores inferiores aos encontrados este estudo.

O teor médio de carboidratos totais para os três lotes de cogumelos comestíveis variaram entre 34,3 e 54,8%, com menor teor para o cogumelo Champignon Portobello e maior teor para o cogumelo Shimeji Branco. Os cogumelos apresentaram elevado teor de carboidratos totais, um dos principais constituintes nutricionais, com destaque para os cogumelos Shimeji Branco e Shitake ($p > 0,05$). As espécies estudadas podem ainda ser consideradas como “fonte” de carboidratos, pois seus teores garantem o mínimo de 15% da Ingestão Diária Recomendada (IDR), segundo a Resolução – RDC n° 360, de 23 de dezembro de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2003), que recomenda a ingestão de uma quantidade de 300 g de carboidratos diariamente.

Valores semelhantes para o teor de carboidratos já foram relatados. Pauli (2010) encontrou teores para seis espécies de cogumelos comestíveis que variaram de 16,0 a 40,3% com o maior teor para o Champignon Paris. Bonatti e colaboradores (2004) avaliaram as espécies Shimeji e Hiratake Branco e encontraram teores de 47,6 e 42,8%, respectivamente, valores esses semelhantes aos encontrados para os cogumelos do gênero *Pleorotus* avaliados neste estudo. Furlani e Godoy (2007) avaliaram as espécies Champignon Paris, Shitake e Shimeji e obtiveram teores de 54,12; 69,58 e 65,82% respectivamente, evidenciando o elevado teor de carboidratos nestas espécies.

Assim como neste estudo, Liu e colaboradores (2012) não utilizaram o teor de fibras alimentares no cálculo de carboidratos apresentando valores que variaram de

56,76 a 64,72% para cinco espécies de cogumelos cultivadas no Sudoeste da China. Entretanto Helm e colaboradores (2009), que utilizaram a fração de fibras para o cálculo obtiveram valores inferiores aos encontrados neste estudo, variando de 25,71 a 38,08%.

Tabela 6. Teor de carboidratos totais em sete espécies distintas de cogumelos (%)

Espécies	Lotes ^a			Médias ^b
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	
Shitake	50,1 ± 0,56	48,9 ± 0,53	56,5 ± 0,43	51,8 ± 4,08ab
Hiratake salmão	13,0 ± 0,86	52,5 ± 1,53	55,6 ± 0,57	40,4 ± 23,75c
Eryngui	44,0 ± 0,75	49,4 ± 0,79	45,7 ± 1,32	46,4 ± 2,76b
Shimeji Preto	43,2 ± 0,43	35,7 ± 1,65	34,6 ± 2,48	37,8 ± 4,68c
Shimeji Branco	52,7 ± 0,52	53,6 ± 0,64	58,3 ± 0,89	54,8 ± 3,00a
Champignon Paris	20,3 ± 0,39	47,2 ± 0,26	47,4 ± 1,95	38,30 ± 10,58c
Champignon Portobello	24,7 ± 1,60	33,1 ± 2,59	45,1 ± 0,74	34,3 ± 10,25d

^a Médias e estimativa de desvio padrão (n=3). Valores expressos em base seca. ^b Médias e estimativa de desvio padrão das análises de três diferentes lotes. Valores assinalados com a mesma letra na mesma coluna para resultados finais, não diferem significativamente ($p > 0,05$), segundo teste de Tukey.

5.2 Perfil de Ácidos Graxos

As composições de ácidos graxos dos extratos hexânicos das espécies de cogumelos comestíveis estudadas estão dispostas na Tabela 7. Foram indentificados doze ácidos graxos nos extratos dos cogumelos estudados. Os totais de ácidos graxos percentuais encontrados compreendem valores entre 71,2% e 93,9%, com maior teor destes ácidos para o extrato do cogumelo Champignon Portobello, em comparação com o padrão (Tabela 7). Estes resultados se assemelham aos encontrados por Carvalho (2009), que obteve valores totais que variaram entre 40,6 a 92,5% do total de ácidos graxos em sete espécies estudadas de cogumelos comestíveis, com um maior teor para o Champignon Paris. Este mesmo autor apresentou em seus resultados a segunda maior porcentagem de ácidos graxos identificados para o Champignon Portobello, com um teor de 93,7% muito próximo ao encontrado neste estudo.

Verificou-se dentre as espécies um maior teor do ácido graxo linoleico [C18:2] (30,5 - 58,7%), tido como essencial ao bom funcionamento do organismo, pois não são sintetizados endogenamente.

Tabela 7. Composição de ácidos graxos em extratos hexânicos de sete espécies distintas de cogumelos comestíveis (%)

Ácidos Graxos	Cogumelos ^a						
	Shitake	Hiratake	Eryngui	Shimeji Preto	Shimeji Branco	Champignon Paris	Champignon Portobello
Caprílico / C8:0	1,2 ± 0,45	0,7 ± 0,70	1,3 ± 2,25	0,2 ± 0,40	1,0 ± 1,78	0,6 ± 1,15	1,0 ± 1,78
Cáprico / C10:0	0,6 ± 0,60	0,3 ± 0,51	0,1 ± 0,23	0,6 ± 0,65	0,3 ± 0,41	0,4 ± 0,40	0,3 ± 0,41
Láurico / C12:0	2,4 ± 2,08	2,0 ± 1,15	3,0 ± 2,7	1,8 ± 1,76	2,6 ± 2,84	3,6 ± 2,89	2,6 ± 2,84
Mirístico / C14:0	0,3 ± 0,30	0,6 ± 0,60	0,2 ± 0,28	0,2 ± 0,34	0,4 ± 0,75	0,2 ± 0,40	0,4 ± 0,75
Pentadecanóico / C15:0	2,5 ± 1,26	1,9 ± 0,98	2,8 ± 1,17	2,1 ± 0,75	2,3 ± 0,63	1,3 ± 1,48	2,3 ± 0,63
Palmítico / C16:0	12,7 ± 2,19	16,0 ± 4,47	11,2 ± 3,29	11,9 ± 2,35	15,9 ± 2,60	10,4 ± 4,75	15,9 ± 2,60
Palmitoléico / C16:1	0,4 ± 0,63	1,5 ± 1,28	2,3 ± 3,10	3,9 ± 3,35	0,4 ± 0,75	1,7 ± 1,47	0,4 ± 0,75
Heptadecanóico / C17:0	1,3 ± 1,22	0,9 ± 1,01	1,4 ± 1,56	0,9 ± 0,87	0,3 ± 0,57	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,57
Esteárico / C18:0	1,7 ± 1,00	2,5 ± 1,3	3,5 ± 1,68	1,7 ± 0,86	3,9 ± 1,85	5,0 ± 1,65	3,9 ± 1,85
Oléico / C18:1	4,7 ± 4,35	10,9 ± 4,16	21,3 ± 5,35	16,2 ± 3,16	14,8 ± 2,04	6,6 ± 0,90	14,8 ± 2,04
Linoleico / C18:2	58,7 ± 9,73	55,8 ± 2,82	30,5 ± 1,87	49,9 ± 5,40	50,8 ± 3,67	33,9 ± 4,45	50,8 ± 3,67
Linolênico / C18:3	0,9 ± 1,00	0,5 ± 0,70	1,3 ± 1,15	0,7 ± 0,88	0,2 ± 0,34	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,34
% Total^b	87,4 ± 1,45	93,6 ± 3,98	79,8 ± 7,86	91,6 ± 4,39	93,4 ± 0,76	71,2 ± 7,76	93,9 ± 5,97
∑SFA	22,7	24,9	23,5	19,4	26,7	21,5	26,7
∑MUFA	5,1	12,4	23,6	20,1	15,2	8,3	15,2
∑PUFA	59,6	56,3	31,8	50,6	51,0	33,9	51,0
PUFA/SFA	2,85	2,75	2,35	3,64	2,48	1,96	2,47

^a Médias e estimativa de desvio padrão (n=3) ^b Média do percentual total dos 3 lotes avaliados e estimativa de desvio padrão (n=3)
SFA (Ácidos graxos saturados); MUFA (Ácidos graxos monoinsaturados); PUFA (Ácidos graxos poli-insaturados)

Os cogumelos apresentaram ainda teores relevantes do ácido graxo palmítico [C16:0] (10,4 - 16,0%), com maior teor para o cogumelo Hiratake Salmão e menor teor para o Champignon Paris. O ácido oleico [C18:1] (4,7 - 21,3%) também foi encontrado em quantidade considerável nos extratos de hexano dos cogumelos, com menor teor para o cogumelo Shitake e maior teor para o cogumelo Eryngui. Este ácido graxo é o mais importante do grupo dos monoinsaturados, pois auxilia na diminuição plasmática das lipoproteínas de baixa densidade, reduzindo o risco de doenças coronarianas (SALGADO, BIN e CORNÉLIO, 2005).

Outros ácidos graxos, tais como ácido caprílico (C8: 0), cáprico (C10: 0), láurico (C12: 0), mirístico (C14: 0), pentadecanóico (C15: 0), heptadecanóico (C17: 0) e linolênico (C18: 3) também foram encontrados nas espécies de cogumelos comestíveis, entretanto, estes estavam em pequena quantidade (menos de 3,0% na concentração).

Dados obtidos na literatura indicam que os cogumelos da espécie *A. bisporus*, geralmente possuem em sua composição lipídica um alto grau de ácidos graxos insaturados, com destaque para o ácido linoleico (YILMAZ *et al.*, 2006), estando de acordo com os resultados encontrados neste estudo que evidenciaram maior teor deste ácido graxo essencial para o cogumelo Champignon Portobello (58,7%), da mesma espécie. Carvalho (2009) obteve maior teor do ácido graxo linoleico (C 18:2n6c) para o Champignon Paris (41,7%), da espécie *A. bisporus*, entretanto para o Champignon Portobello não foi detectado teor desse ácido graxo. Öztürk e colaboradores (2011) avaliaram o perfil dos cogumelos *Agaricus essettei*, *Agaricus bitorquis* e *Agaricus bisporus* coletados na cidade de Banaz-Usak – Turquia, e observaram predominância do ácido linoleico (61,82-67,29%), seguido pelo ácido palmítico (12,67- 14,71%), esses valores encontram-se superiores aos encontrados neste estudo para cogumelos da mesma espécie.

Os cogumelos Shimeji Branco, Shimeji Preto e Hiratake, da espécie *Pleurotus ostreatus*, também apresentaram teor elevado dos ácidos graxos identificados (93,4%, 91,3% e 93,6% respectivamente), com teores significativos de ácido linoleico (50,8%, 49,9% e 55,8%), palmítico (15,9%, 11,9% e 16,0%) e oleico (10,9%, 16,2% e 14,8%). Tais resultados são similares aos encontrados para cogumelos da espécie *Pleurotus ostreatus* em estudos realizados por Nappi *et al.* (1999), onde foram encontrados teores de 53,03; 15,62 e 19,64% para os ácidos linoleico, palmítico e oleico, respectivamente.

Em estudos realizados com 20 espécies de cogumelos comestíveis colhidas no Nordeste de Portugal, em Bragança, o ácido graxo majoritário em todas as espécies foi o

ácido linoleico (C18:2n6) (contribuindo para a prevalência de PUFA), entretanto, em algumas espécies, o ácido oleico (C18:1n9) foi o ácido graxo predominante. As espécies estudadas revelaram também a presença de ácido palmítico (C16:0) como um dos majoritários (PEREIRA, 2011). Estes resultados se assemelham aos encontrados nesse estudo, evidenciando que os ácidos graxos de maior predominância em espécies de cogumelos comestíveis são os ácidos linoleico, oleico e palmítico.

Os ácidos graxos saturados, presentes nos alimentos, não devem superar o máximo de 10% para evitar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, enquanto que os ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados devem representar o maior aporte de gordura na dieta, para contribuir junto com outros fatores alimentícios e fisiológicos e evitar o surgimento de doenças associadas ao coração e ao sistema cardiovascular (ADITIVOS, 2012). A razão entre esses ácidos graxos e sua distribuição em alimentos é um indicativo de qualidade nutricional dos mesmos (CARVALHO, 2009).

As razões entre ácidos graxos insaturados e saturados estão dispostos na Tabela 7. Essa razão entre os teores de SFAs e PUFAs deve apresentar valores superiores a 0,45. Valores inferiores a esta faixa indicam alimentos pouco saudáveis, especialmente em relação ao surgimento de doenças cardiovasculares (STEVANATO, 2004). Os resultados para os extratos hexânicos dos cogumelos comestíveis avaliados neste estudo ficaram todos acima desta faixa, evidenciando um maior teor de ácidos graxos insaturados em relação aos saturados, com destaque para o cogumelo Shimeji Preto, com uma razão de 3,64. Carvalho (2009) obteve razão PUFA/SFA superior a 0,45 para as espécies de cogumelos comestíveis avaliadas, exceto para o cogumelo Shimeji Branco (0,2), concluindo que este cogumelo, quanto à qualidade lipídica, seria um alimento pouco saudável.

Carvalho (2009) verificou que o cogumelo Shitake foi o único a apresentar teor de SFA superior aos demais ácidos graxos, com uma porcentagem de 35,4%, seguido por 22% de MUFA e 13% de PUFA. No presente estudo, todos os cogumelos apresentaram teor de PUFAs maior que o teor de SFAs, evidenciando a qualidade da composição lipídica dos cogumelos avaliados. Ribeiro e colaboradores (2009) observaram que os PUFAs e MUFAs foram predominantes nas doze espécies de cogumelos coletadas na cidade de Trás-os-Montes - Portugal, variando de 12 a 79% e de 18 a 79% de ácidos graxos totais, respectivamente. Os autores concluíram que o

elevado teor de ácido linoleico, contribui para o aumento global de PUFA's, enquanto o ácido oleico eleva a quantidade de MUFA's presentes nos extratos.

Os ácidos graxos poli-insaturados são conhecidos pelo importante papel no desenvolvimento e homeostase normais (ROYNETTE *et al.*, 2004). Os cogumelos possuem alta porcentagem desses ácidos graxos (PUFA) e baixos teores de ácidos graxos saturados e colesterol (BORCHERS *et al.*, 1999). Comparando-se com os peixes e as aves, os cogumelos apresentam quantidades bem menores de colesterol e gordura saturada (NOVAES; NOVAES, 2005).

Todos os cogumelos analisados apresentaram quantidades consideráveis de ácidos graxos essenciais, apresentando semelhante composição destas substâncias. Em geral, aproximadamente 80% dos ácidos graxos foram os mesmos em todas as espécies. A concentração de ácidos graxos insaturados nestes cogumelos é de interesse do ponto de vista nutricional. Alimentos que contenham em sua composição ácidos graxos tidos como essenciais são recomendados e os cogumelos possuem elevado teor do ácido graxo linoleico, essencial ao organismo e, portanto, é viável a utilização desses na dieta (YILMAZ *et al.*, 2006).

5.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana - Técnica de Microdiluição em Caldo

Os extratos hexânicos e etanólicos das sete espécies estudadas foram avaliados no teste de atividade antimicrobiana, utilizando-se o método de microdiluição em caldo em uma concentração fixa de 1000 µg/mL. Foram utilizadas as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *B. cereus*, as bactérias Gram-negativas *E. coli* e *Salmonella*, e a levedura *C. albicans*. As leituras foram realizadas com 24 horas e 48 horas após a incubação das placas em estufa a 37 °C. Todos os extratos brutos testados apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos avaliados num período de 24 horas, entretanto alguns extratos não foram eficientes depois deste período.

Dentre os extratos estudados, o cogumelo Hiratake apresentou maior percentual de inibição contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* no período de 24 horas (Figura 6) e a atividade contra a bactéria se manteve elevada após 48 horas. O extrato desta espécie apresentou atividade bacteriostática, pois foi capaz de inibir o crescimento dessa bactéria. Os extratos hexânicos e etanólicos das amostras estudadas apresentaram atividade antimicrobiana semelhante ($p > 0,05$), exceto para o cogumelo Shitake, em que o extrato etanólico foi mais eficiente ($p \leq 0,05$), no período de 24

horas. Após 48 horas os extratos hexânicos das espécies Shitake, Eryngui, Shimeji Preto e Champignon Paris tiveram melhor desempenho que os extratos etanólicos contra a bactéria *S. aureus*, com destaque para o extrato hexânico do cogumelo Eryngui (Figura 7). Diante dos resultados é sugestivo dizer que compostos mais apolares podem ser os principais constituintes fitoquímicos atuando como agentes antibacterianos nessas espécies.

Estudos realizados com o micélio do Hiratake Salmão (*P. ostreatus*) crescido sobre grãos de trigo detectaram a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* utilizando o método de comparação (GARCIA *et al.*, 1998). Beltran-Garcia e colaboradores (1997) também observaram a ação antimicrobiana de compostos voláteis contidos nos corpos frutíferos de *P. ostreatus* contra diversas bactérias.

Extratos metanólicos dos cogumelos do gênero *Agaricus* cultivados na Turquia, foram avaliados pelo método de difusão com discos e apresentaram baixa atividade inibidora contra a bactéria *S. aureus* (Öztürk *et al.*, 2011). Os extratos hexânico e etanólico do mesmo gênero, avaliados neste estudo, apresentaram baixa atividade antimicrobiana no período de 24 horas (Figura 6), entretanto, com 48 horas houve um aumento nessa atividade (Figura 7).

A utilização de um agente antimicrobiano natural que possa inibir a atividade da bactéria *Staphylococcus aureus* é viável, pois essa é uma das maiores responsáveis por surtos de toxinfecções, devido à ingestão de enterotoxinas termoestáveis produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento, podendo estar presente no alimento mesmo após sua cocção, o que pode provocar um quadro de intoxicação alimentar (LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

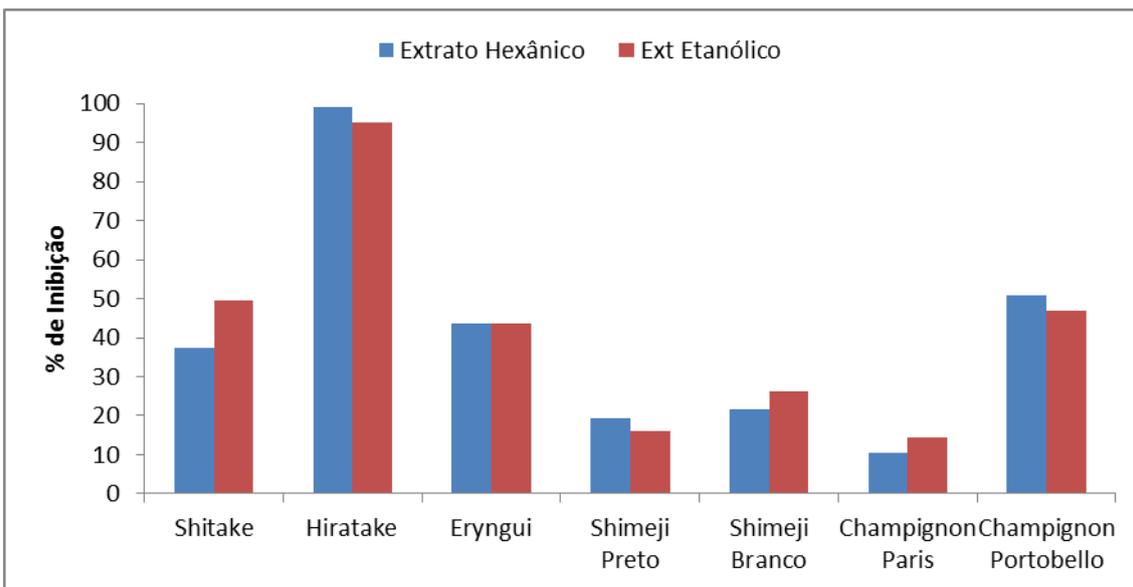


Figura 5. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus*.

Obs: Valores da leitura realizada após 24 horas do início do experimento.

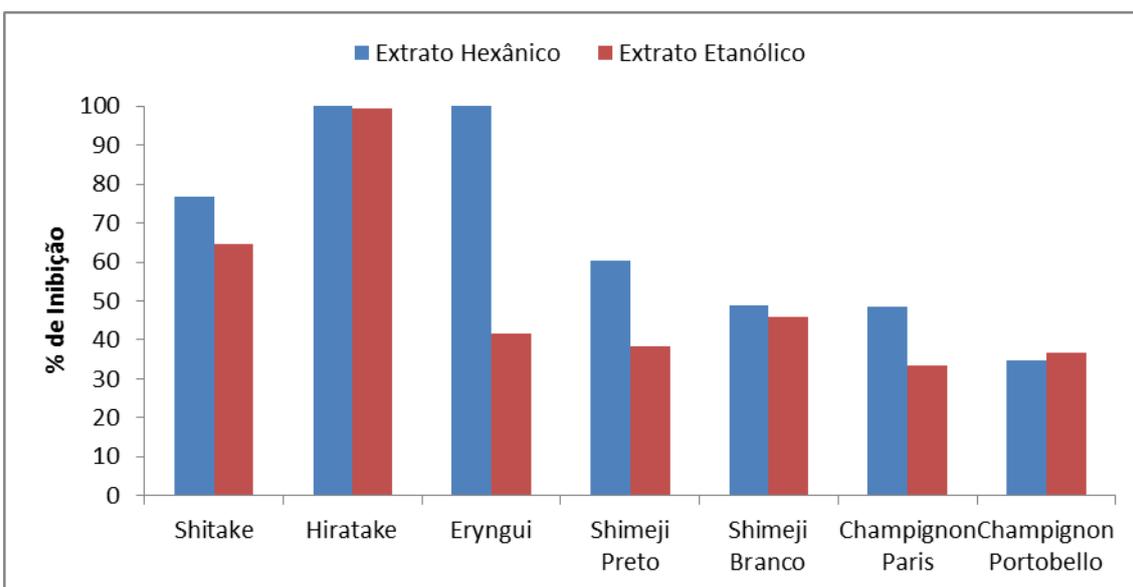


Figura 6. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus*.

Obs: Valores da leitura realizada após 48 horas do início do experimento.

O extrato hexânico do cogumelo Hiratake Salmão apresentou também elevado percentual de inibição no período de 24 e 48 horas contra a bactéria Gram-positiva *Bacillus Cereus*, apresentando efeito bacteriostático frente a essa bactéria, pois foi capaz de inibir seu crescimento. Entretanto, no período de 24 horas, os extratos hexânico e

etanólico desse cogumelo tiveram diferentes desempenhos frente a essa bactéria ($p \leq 0,05$), com baixo percentual de inibição inicialmente para o extrato etanólico (Figura 8) e aumento da atividade deste extrato após o período de 48 horas, apresentando nesse período atividade semelhante ao extrato hexânico ($p > 0,05$) (Figura 9). A utilização desse extrato pode ser viável no controle da proliferação dessa bactéria Gram-positiva, patógeno de veiculação alimentar associado a surtos de intoxicação que deve ser controlado, pois é capaz de produzir toxinas, incluindo enterotoxinas caso esteja em concentração superior a 10^6 *B. cereus*/g (FINLAY *et al.*, 2002) em alimentos crus e processados, entretanto, mais estudos devem ser realizados para avaliar o seu mecanismo de ação em relação a bactéria e sua possível utilização.

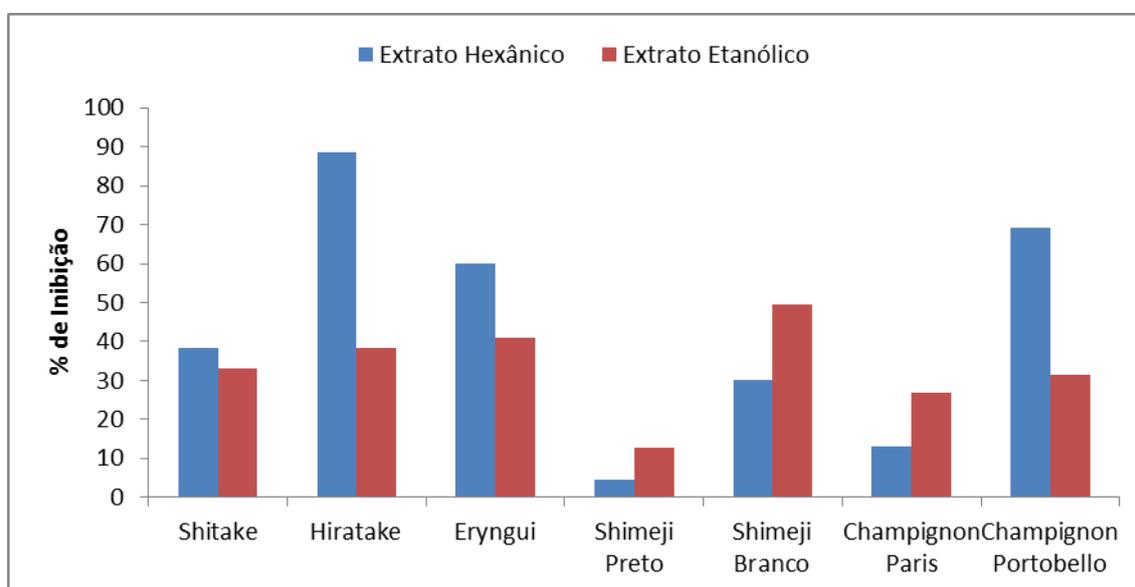


Figura 7. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a bactéria Gram-positiva *B. cereus*.

Obs: Valores da leitura realizada após 24 horas do início do experimento.

A atividade inibitória dos extratos dos cogumelos estudados aumentou com o período de 48 horas, com exceção do Champignon Portobello que teve sua atividade diminuída após esse período. Os extratos hexânicos e etanólicos das espécies Shitake e Shimeji Preto não diferiram ($p > 0,05$) nas primeiras 24 horas, em contrapartida, o extrato hexânico das espécies Eryngui e Champignon Portobello apresentaram melhor desempenho contra a bactéria *B. Cereus* neste mesmo período ($p \leq 0,05$) (Figura 8). Os extratos das espécies Shimeji Branco e Champignon Portobello apresentaram semelhante atividade após o período de 48 horas ($p > 0,05$). Os extratos hexânicos dos

cogumelos Eryngui, Shitake, Champignon Paris e Shimeji Preto foram mais ativos frente a essa bactéria, no período de 48 horas, evidenciando que os constituintes químicos com caráter mais apolar possuem melhor potencial antibacteriano frente à cepa estudada.

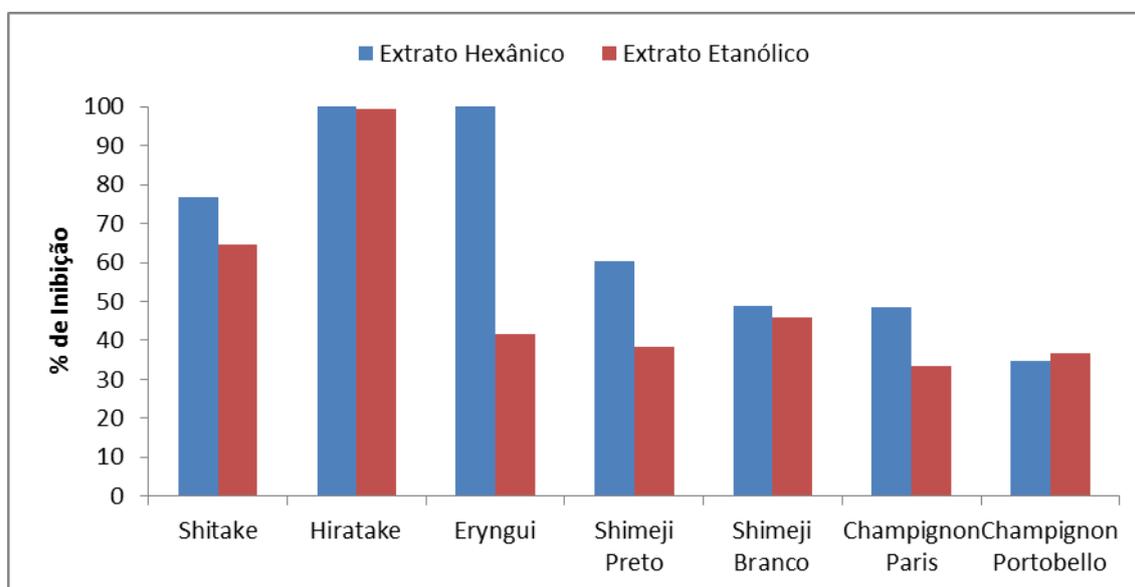


Figura 8. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a bactéria Gram-positiva *B. cereus*.

Obs: Valores da leitura realizada após 48 horas do início do experimento.

Os extratos hexânicos e etanólicos dos cogumelos comestíveis apresentaram elevada atividade inibitória contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* no período de 24 horas. Os cogumelos Eryngui e Shimeji Preto apresentaram alto poder de inibição a essa bactéria para os dois extratos obtidos ($p > 0,05$). Para os cogumelos Shitake, Hiratake, Champignon Paris e Champignon Portobello, os extratos hexânicos tiveram melhor desempenho na inibição da *E. Coli* ($p \leq 0,05$), enquanto para o Shimeji Branco o extrato etanólico apresentou melhor potencial de inibição dessa bactéria (Figura 10). De acordo com estes resultados é sugestivo dizer que as substâncias que estão presentes nas espécies de cogumelos estudadas que contenham caráter mais apolar possuem atividade antibacteriana, principalmente sobre esta bactéria.

Entretanto, após o período de 48 horas houve uma redução na atividade antimicrobiana dos extratos das espécies de cogumelos comestíveis testados, exceto para os extratos hexânicos dos cogumelos Shimeji Preto e Hiratake que se mantiveram constantes (Figura 11). Apesar dessa redução, os extratos dos cogumelos estudados

podem ser considerados como agentes bacteriostáticos, pois apresentam efeito inibitório sobre o crescimento dessa bactéria, mantendo-a retida em uma dada fase do ciclo de crescimento, impedindo sua divisão celular.

Os extratos dos cogumelos apresentaram elevada atividade inibitória contra a bactéria gram-negativa *E. coli*. Este fato pode ser de grande importância, pois as bactérias gram-negativas não são susceptíveis à ação antibacteriana de substâncias presentes em extratos. Estas bactérias possuem em sua parede celular uma estrutura mais complexa, que limitam a passagem de agentes antimicrobianos, além de possuírem um mecanismo que expulsa substâncias estranhas para fora da célula, conhecido como Bomba de efluxo (MOURA *et al.*, 2012), dificultando assim, a ação de substâncias antibacterianas, entretanto, os extratos das espécies de cogumelos estudadas foram eficientes na inibição dessa bactéria.

A bactéria Gram-negativa *E. coli* é um habitante normal do intestino de todos os animais e suas principais fontes de contaminação são animais (em especial bovinos e cervos), homem (trato intestinal e fezes) e água, que se contaminam pelo contato com material fecal durante o processamento de alimentos ou por falhas na manipulação (OPAS, 2003). A referida bactéria causa infecções alimentares, devendo ter sua proliferação controlada. Estudos realizados com micélios de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* já indicaram atividade antimicrobiana contra a *E. coli* (GARCIA *et al.*, 1998).

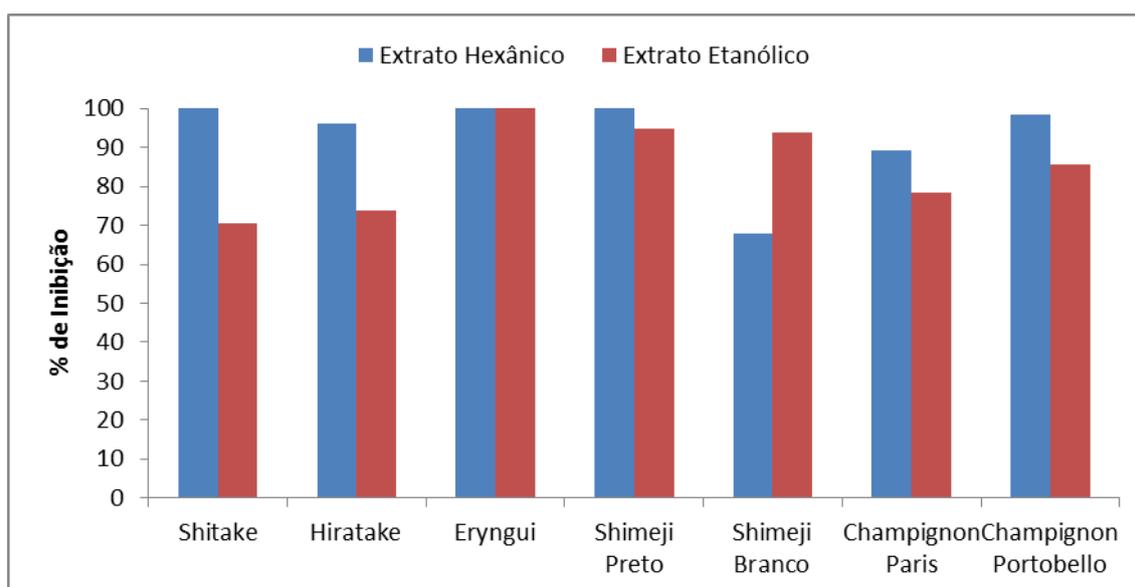


Figura 9. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*.

Obs: Valores da leitura realizada após 24 horas do início do experimento.

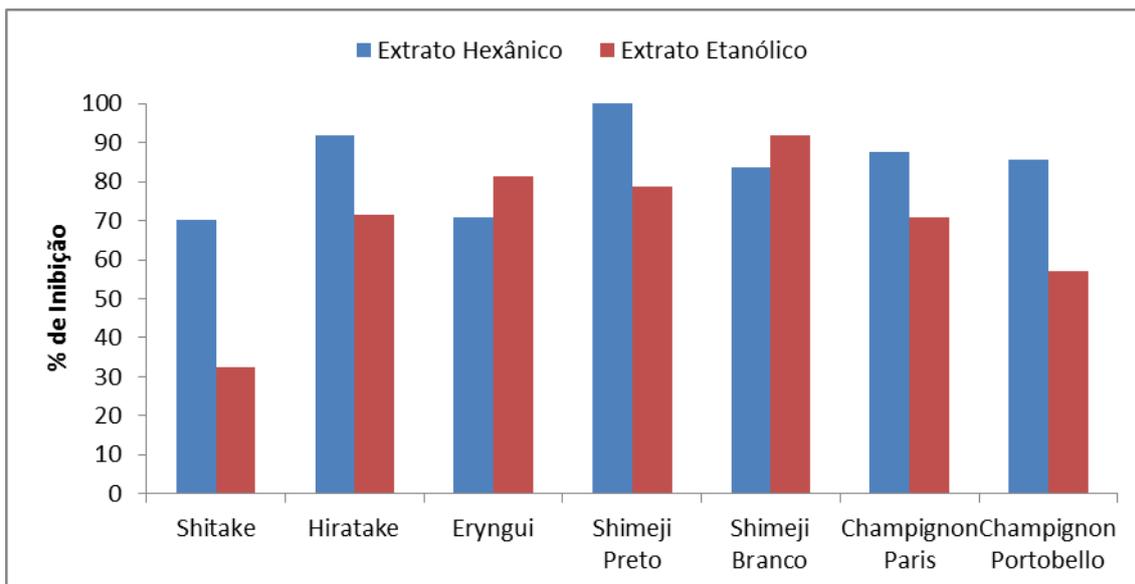


Figura 10. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*.

Obs: Valores da leitura realizada após 48 horas do início do experimento.

Os extratos estudados apresentaram atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-negativa *Salmonella* spp. no período de 24 horas (Figura 12), entretanto, essa atividade só foi mantida após o período de 48 horas para o extrato hexânico do cogumelo Shimeji Preto (Figura 13). Os extratos hexânicos e etanólicos das espécies estudadas não diferiram quanto a sua atividade contra essa bactéria ($p > 0,05$), com exceção dos cogumelos Hiratake e Champignon Portobello que apresentaram uma maior atividade antimicrobiana dos extratos hexânicos.

Houve proliferação desse microrganismo após período de 48 horas para os extratos hexânicos dos cogumelos Champignon Paris e Champignon Portobello (Figura 13), não havendo inibição da bactéria. Os extratos etanólicos dos cogumelos Hiratake, Eryngui e Shimeji Branco também não foram eficientes contra essa bactéria após o período de 48 horas. Este fato pode ser explicado pelas características estruturais das bactérias gram-negativas que dificultam a entrada de substâncias com atividade antibacteriana. Estas bactérias apresentam em sua parede celular um espaço periplasmático onde são encontradas enzimas capazes de inativar as substâncias agressoras a bactéria (MOURA *et al.*, 2012). Öztürk *et al.* (2011) avaliaram extratos metanólicos de cogumelos do gênero *Agaricus* cultivados na Turquia, pelo método da difusão em discos e constatou que estes foram ineficientes na inibição da bactéria *Salmonella* spp..

A *Salmonella* spp. é uma bactéria entérica, responsável por graves intoxicações alimentares, sendo um dos principais agentes envolvidos em surtos registrados em vários países e sua presença em alimentos é um relevante problema de saúde pública (SHINOHARA *et al.*, 2008). Em função disso sua proliferação deve ser controlada.

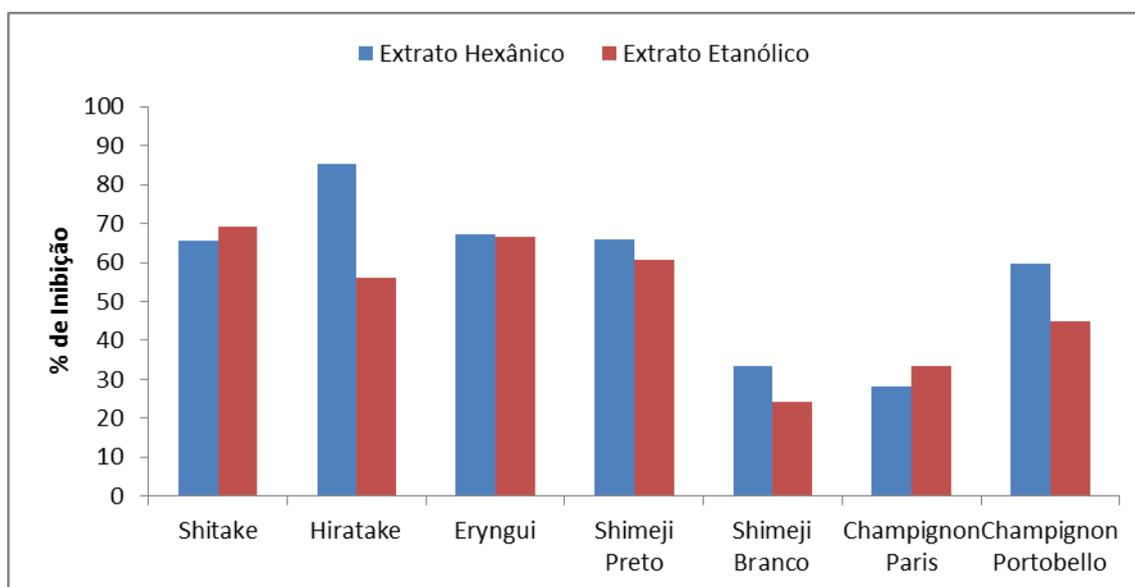


Figura 11. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a bactéria Gram-negativa *Salmonella*.

Obs: Valores da leitura realizada após 24 horas do início do experimento.

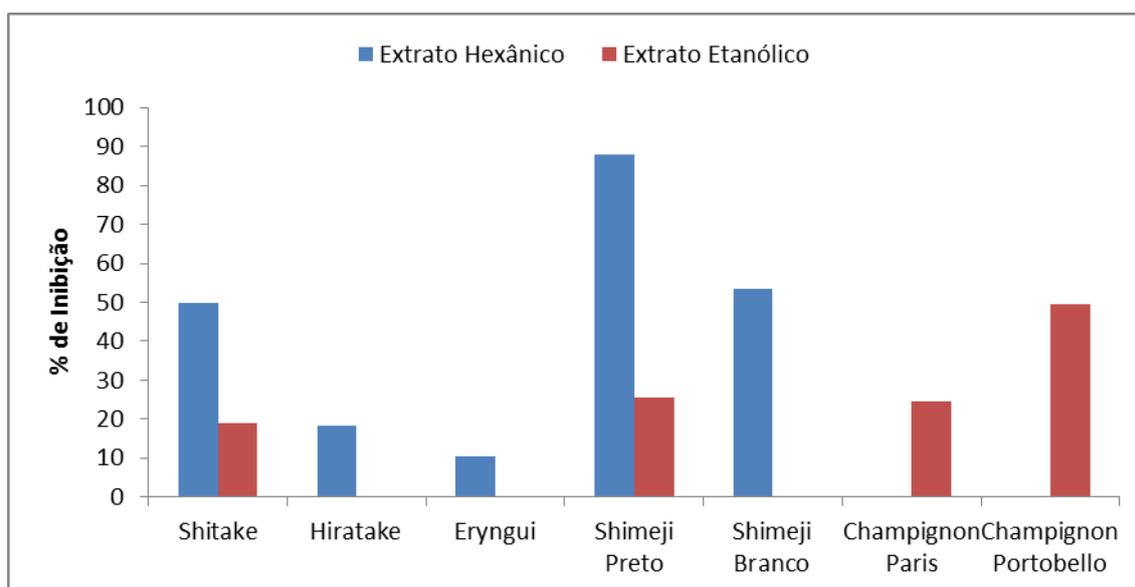


Figura 12. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a bactéria Gram-negativa *Salmonella*.

Obs: Valores da leitura realizada após 48 horas do início do experimento.

Houve inibição dos extratos obtidos das espécies de cogumelos comestíveis estudadas contra a levedura *C. Albicans* no período de 24 horas (Figura 14), com melhor desempenho dos extratos etanólicos dos cogumelos Shitake, Eryngui e Shimeji Preto ($p \leq 0,05$), e maior potencial antimicrobiano dos extratos hexânicos dos cogumelos Hiratake e Champignon Portobello ($p \leq 0,05$). Não houve diferença entre os extratos dos cogumelos Shimeji Branco e Champignon Paris frente a essa levedura ($p \geq 0,05$).

Após o período de 48 horas os extratos etanólicos dos cogumelos foram ineficientes, exceto para o Shimeji Preto e Shimeji Branco, havendo proliferação dessa levedura. Os extratos hexânicos das espécies Hiratake, Eryngui e Champignon Paris tiveram um aumento no seu percentual de inibição a essa levedura após esse período. Em contrapartida, seus extratos etanólicos não apresentaram atividade antimicrobiana (Figura 15). O Cogumelo Shimeji Preto apresentou uma redução no percentual de inibição para o extrato hexânico e um aumento para extrato etanólico havendo diferença entre os extratos ($p \leq 0,05$). Os extratos do cogumelo Shimeji Branco não diferiram ($p > 0,05$), após 48 horas, no entanto, observou-se um aumento no percentual de inibição desses extratos frente à levedura *C. Albicans*.

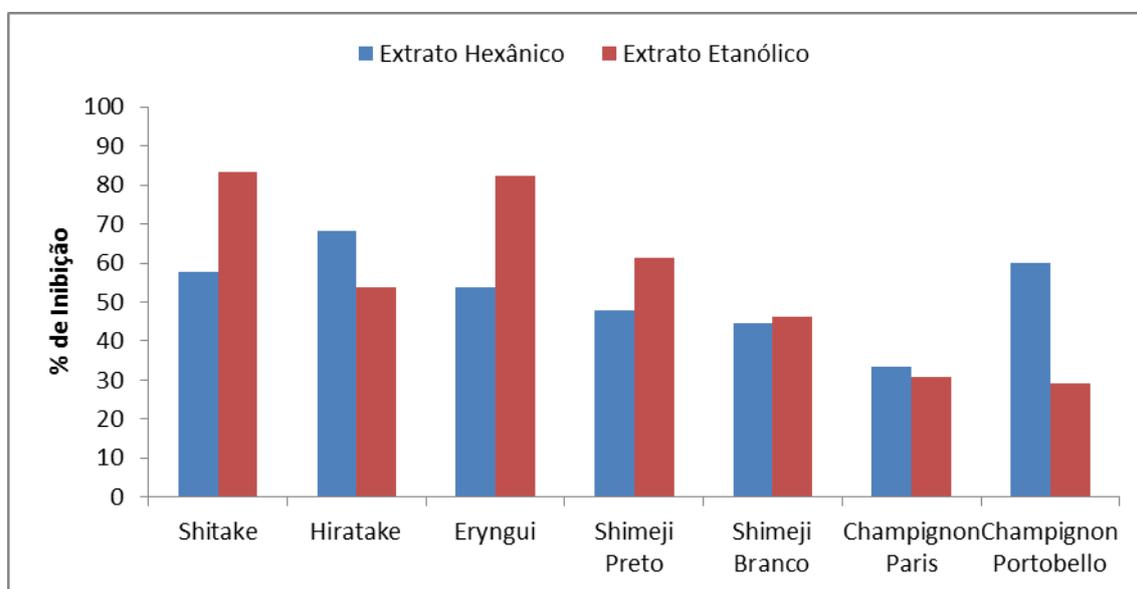


Figura 13. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a levedura *C. Albicans*.

Obs: Valores da leitura realizada após 24 horas do início do experimento.

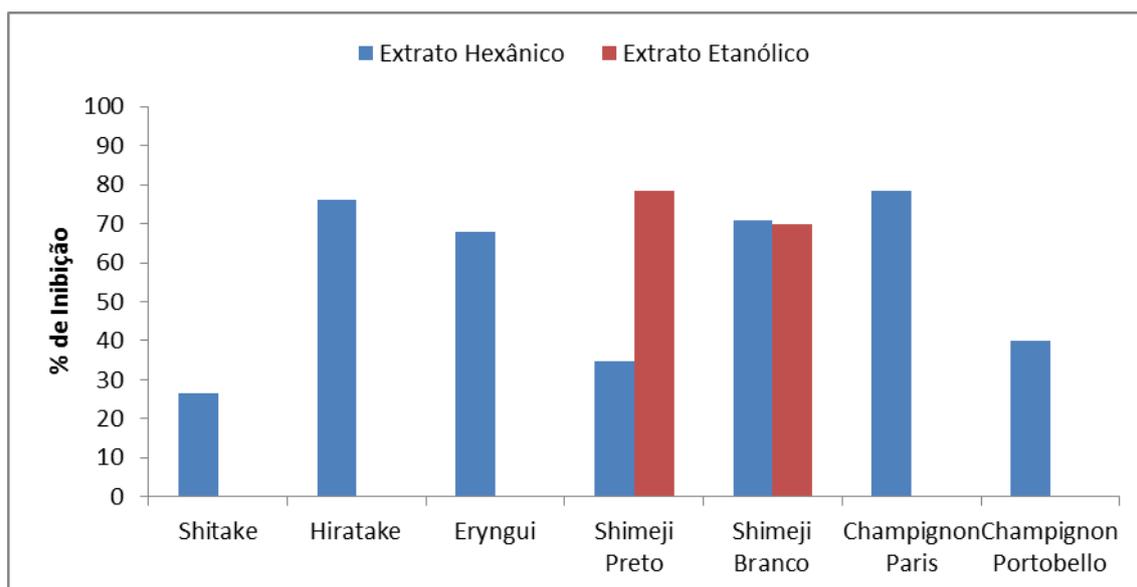


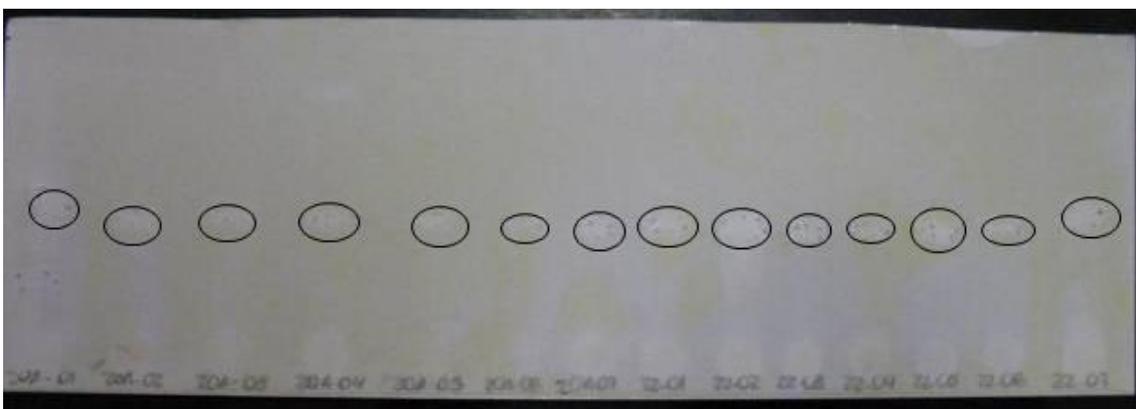
Figura 14. Média do percentual de inibição antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes dos cogumelos contra a levedura *C. Albicans*.

Obs: Valores da leitura realizada após 48 horas do início do experimento.

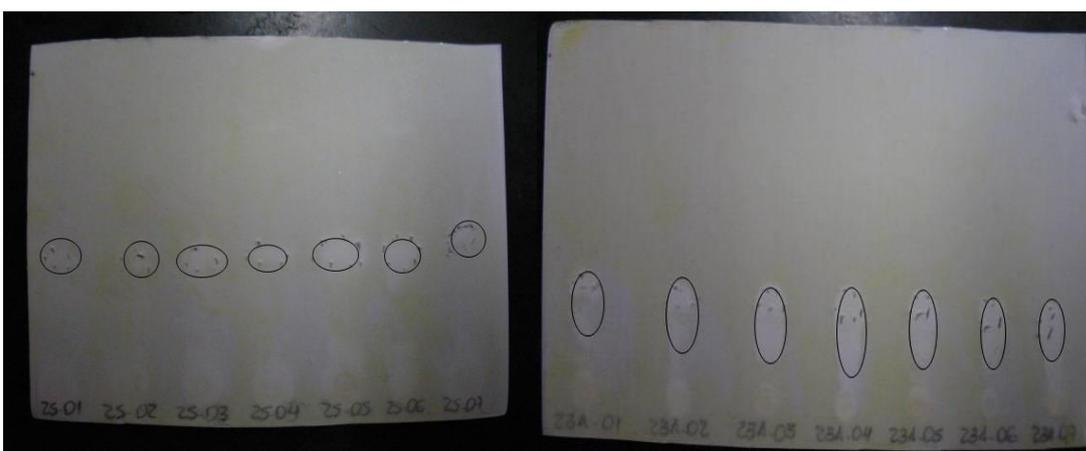
Os extratos obtidos a partir dos cogumelos estudados apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos num período de 24 horas e alguns ainda tiveram sua atividade aumentada após o período de 48 horas. Esse fato pode ser explicado pela presença de uma significativa quantidade de compostos nitrogenados não proteicos, na forma de quitina nas paredes celulares desses cogumelos (BREENE, 1990). A quitina é precursora da quitosana um polissacarídeo amino encontrado especialmente em animais invertebrados e na parede celular de fungos (AZEVEDO *et al.*, 2007). Essa substância apresenta polimorfismo (estruturas α , β e γ) e destaca-se dentre os compostos naturais por apresentar propriedades antimicrobianas frente a diferentes microrganismos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009). Em estudos realizados por Tsai e Hwang (2004) foi avaliada a atividade antibacteriana *in vitro* frente a algumas bactérias patogênicas e probióticas, esses autores relataram que a quitosana com grau de desacetilação entre 70% e 95%, possui uma concentração mínima de 50 a 200 ppm que é letal para *E. coli* e *S. aureus*.

5.4 Avaliação da atividade de inibição de acetilcolinesterase em cromatografia em camada delgada (CCD) – Método Ellmann

Os extratos hexânicos e etanólicos dos três lotes avaliados das espécies de cogumelos comestíveis estudadas, num total de 42 extratos, produziram halos brancos na placa, indicando atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (Figura 16). Os valores obtidos para o Rf foram semelhantes para os diferentes extratos brutos das amostras estudadas. O valor médio de Rf para os extratos hexânicos foi de 0,29, enquanto para os extratos etanólicos foi de 0,43. Esses valores indicam que possivelmente a substância com atividade inibidora presente nos extratos seja a mesma em todas as espécies nos extratos hexânicos, assim como nos extratos etanólicos.

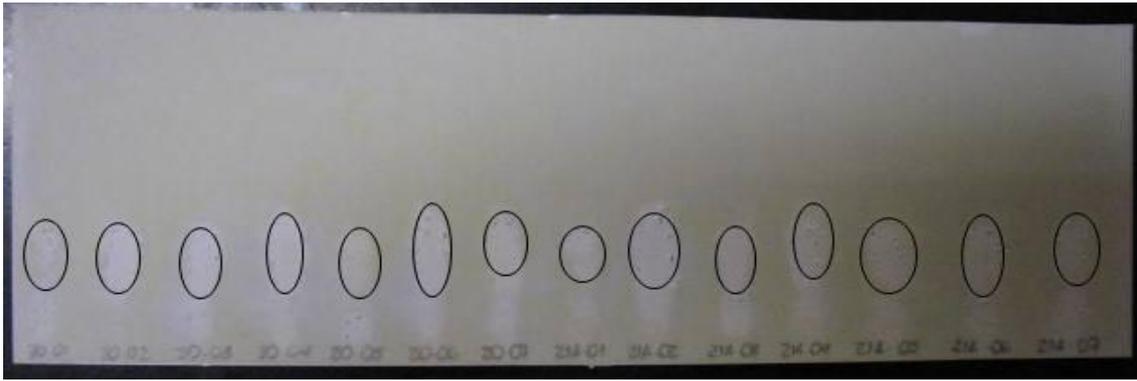


(a)



(a')

(b)



(b')

Figura 15. (a) e (a') Placas cromatográficas dos extratos etanólicos de Inibição da acetilcolinesterase das espécies de cogumelos comestíveis, (b) e (b') Placas cromatográficas dos extratos hexânicos de Inibição da acetilcolinesterase das espécies de cogumelos comestíveis.

A atividade de inibição da acetilcolinesterase também foi observada em cogumelos da espécie *Agaricus*, cultivados na Turquia. Foram avaliadas os cogumelos *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Pilat, *Agaricus bitorquis* (Quel.) Sacc. e *Agaricus essettei* Bom e seus extratos obtidos com acetato de etila foram ativos contra a acetilcolinesterase (OZTURK *et. al.* 2011).

Estudos ainda não foram realizados com extratos de cogumelos comestíveis cultivados no Brasil. Entretanto, metabólitos isolados de fungos tem sido alvo de estudos de pesquisadoras na avaliação da inibição da acetilcolinesterase. Em estudos realizados com metabólitos produzidos por fungos da espécie *Penicillium brasilianum* Batista, foi obtido o ácido penicillic, ativo contra a enzima, com uma zona de inibição clara (SCHÜRMAN *et al.*, 2010).

5.5 Avaliação da atividade de inibição de acetilcolinesterase em microplaca – Método de Ellmann

A quantificação do valor da inibição da enzima AchE apresentado pelos extratos obtidos neste estudo foi realizada de acordo com a metodologia de Ellmann. Todos os extratos avaliados apresentaram atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase pelo método qualitativo. Portanto, apenas os extratos hexânicos e etanólicos do terceiro lote foram testados por este método, pois estes apresentaram mesmo Rf, 0,29 e 0,43

respectivamente, indicando que possivelmente a substância seja a mesma para as espécies de cogumelos estudadas.

Além dos extratos hexânicos e etanólicos, foram mensurados também os percentuais de inibição da eserina, como controle positivo e dos solventes utilizados na obtenção dos extratos, hexano e etanol, como controle negativo (Figura 17). Os resultados para os extratos hexânicos e etanólicos são apresentados a seguir (Tabela 8).

Tabela 8. Percentual (%) de inibição das amostras no ensaio anticolinesterásico em microplaca pelo método de Ellmann.

Espécies	% de Inibição ^a	
	Extratos Hexânicos	Extratos Etanólicos
Shitake	67,8 ± 4,82	11,1 ± 3,04
Hiratake	13,2 ± 0,82	17,3 ± 1,98
Eryngui	0,62 ± 0,24	14,6 ± 2,36
Shimeji Preto	22,8 ± 5,72	30,8 ± 2,05
Shimeji Branco	17,8 ± 4,58	15,6 ± 4,60
Champignon Paris	7,8 ± 0,69	34,7 ± 4,85
Champignon Portobello	21,3 ± 2,09	23,8 ± 2,10
Eserina	88,6 ± 3,51	94,6 ± 0,87
Hexano	0 ± 0	-
Etanol	-	0 ± 0

^a Médias e estimativa de desvio padrão.

Dentre os extratos ensaiados, o extrato hexânico do cogumelo Shitake apresentou alto potencial anticolinesterásico, visto que extratos que apresentam porcentagens de inibição maiores do que 50% são considerados como de elevado potencial anticolinesterásico. Os extratos hexânicos dos cogumelos Shimeji Preto, Shimeji Branco e Champignon Portobello, assim como os extratos etanólicos dos cogumelos Hiratake, Shimeji Preto, Champignon Paris e Champignon Portobello apresentaram porcentagens de inibição entre 15 a 50% podendo ser considerados como de atividade moderada a baixa (SEIDL, 2010).

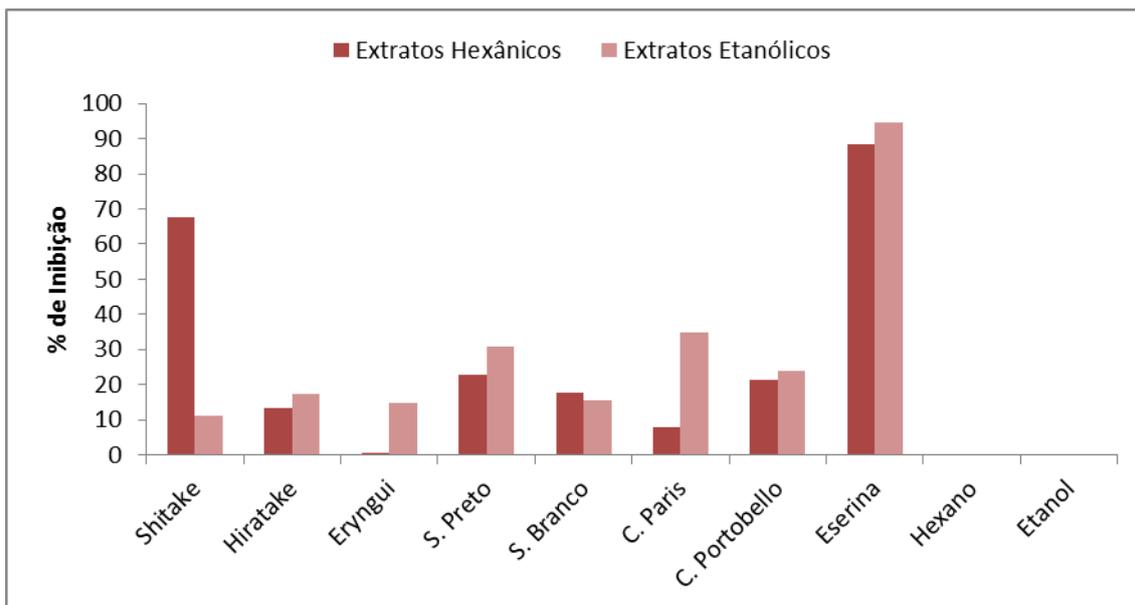


Figura 16. Média do percentual de inibição da enzima acetilcolinesterase dos extratos hexânicos e etanólicos do terceiro lote dos cogumelos em comparação com a eserina (controle positivo) e os solventes hexano e etanol (controles negativos).

Não há relatos de ensaios anticolinesterásicos realizados com cogumelos comestíveis cultivados no Brasil. Entretanto, estudos foram realizados com diferentes espécies de cogumelos coletados na província de Bolu, Turquia e segundo Orhan e Üstün (2011) nenhum dos extratos hidroetanólicos (85%) obtidos apresentou efeito inibitório maior que 50% e o extrato da espécie de cogumelo comestível *P. sulphureus* apresentou maior eficácia no ensaio realizado pelo método de Ellmann, com 37,61%, seguido pelo *P. pinicola* (31,44%) e *T. versicolor* (28,35%).

6 CONCLUSÕES

Os cogumelos comercializados na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais apresentaram excelente valor nutricional, com consideráveis teores de proteína, carboidratos e fibras alimentares, com destaque para os cogumelos do gênero *Pleurotus* e *Agaricus*. O perfil de ácidos graxos dos extratos hexânicos das sete espécies de cogumelos avaliados evidenciou considerável quantidade do ácido graxo linoleico, tido como essencial ao nosso organismo, além dos ácidos graxos oleico e palmítico, com maior porcentagem total de ácidos graxos encontrados para o cogumelo Champignon Portobello. A relação de ácidos graxos poli-insaturados e saturados foi favorável para todos os cogumelos, que apresentaram maior teor de PUFAs em relação aos SFAs, podendo assim ser considerados como alimentos saudáveis.

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos dos cogumelos revelou maior atividade inibitória do cogumelo Hiratake Salmão frente às bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *B. cereus*, nos períodos de 24 e 48 horas, ressaltando sua possível utilização com antimicrobiano natural. Todos os cogumelos avaliados apresentaram ainda excelente atividade inibitória frente à bactéria Gram-negativa *E. coli*, nos períodos de 24 e 48 horas, sendo necessário um estudo mais detalhado dos extratos destas espécies, para sua possível utilização em alimentos, como antimicrobiano natural.

Os extratos hexânicos e etanólicos dos cogumelos quando avaliados qualitativamente quanto a sua atividade inibitória frente à enzima acetilcolinesterase, apresentaram inibição positiva, entretanto, a quantificação do valor de inibição a essa enzima evidenciou apenas o extrato hexânico do cogumelo Shitake como de alto potencial anticolinesterásico, com uma porcentagem de inibição maior que 50%.

A avaliação dos cogumelos comestíveis permitiu afirmar que os fungos macroscópicos cultivados no país e comercializados na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais são alimentos com excelente qualidade nutricional e que seu consumo pode trazer benefícios à saúde humana, devendo ser incluídos na dieta usual dos brasileiros. Este estudo oferece ainda subsídio à divulgação de informações nutricionais favoráveis, auxiliando assim na popularização do consumo desses cogumelos *in natura* no país.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

7.1 Determinação de vitaminas e aminoácidos nas espécies de cogumelos estudadas.

7.2 Determinação dos minerais e metais pesados presentes nos cogumelos.

7.3 Determinar as substâncias presentes no extrato hexânico do cogumelo Shitake que possuam atividade anticolinesterásica.

8 REFERÊNCIAS

AACC. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. Dietary Fiber Technical Committee. **All dietary fiber is fundamentally functional**. Cereal Foods World, St. Paul, v. 48, n. 3, p. 128-131, 2003.

ADA. AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. **Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fibre**. Journal of the American Dietetic Association, Chicago, v. 12, n. 7, p. 814-826, 2002.

ADITIVOS E INGREDIENTES. **Ácidos graxos de cadeia longa na saúde e nutrição**. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/167.pdf> Acesso: novembro, 2012.

ALBUQUERQUE, R. B.; SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, T. C. M. **Perspectiva e potencial aplicação de quitosana como inibidor de *listeria monocytogenes* em produtos cárneos**. Revista Iberoamericana de Polímeros, País Vasco, v. 10, n. 5, p. 260-274, 2009.

AMORIM R. V. S.; SOUZA W.; FUKUSHIMA K.; CAMPOS-TAKAKI G. M. **Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture**. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 20-23, 2001.

AMORIM, R. V. S.; PEDROSA, R. P.; KAZUTAKA, F.; MARTÍNEZ, C. R.; LEDINGHAM, W. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. **Alternative carbon sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan**. Food Technology Biotechnology, Zagreb, v. 44, n. 4, p. 519-523, 2006.

ANDRADE V. S.; NETO B. B.; FUKUSHIMA K.; CAMPOS-TAKAKI G. M. **Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) – A factorial study**. Revista Iberoamericana de Micología, Barcelona, v. 20, p. 149 - 153, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Arlington: Washington, v. 1, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 16 ed. Arlington: Washington, v. 1-2, 1997.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L.; COSTA, A. C. F. M. **Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BARBOSA FILHO, J. M. **Natural Products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase.** Revista Brasileira de Farmacognosia, João Pessoa, v. 16, p. 258-285, 2006.

BAUER-PETROVSKA, B. **Protein fractions in edible Macedonian mushrooms.** European Food Research and Technology, Berlin, v. 212, p. 469–472, 2001.

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, Barking, v. 105, p. 140–145, 2007.

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 Food Chemistry, Washington, v. 55, p. 4781–4788, 2008.

BEELMANN, R. B.; EDWARDS, C. G. **Variability in the compositional nutritional value of the cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*.** Mushroom News, Washington, v. 37, p. 20-26, 1989.

BELTRAN-GARCIA M. J.; ESTARRON-ESPINOSA M.; OGURA T. **Volatile compounds secreted by oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) and their antibacterial activities.** Journal of Agricultural Food Chemistry, Washington, v. 45, p. 4049-4052, 1997.

BOA, E. **Wild edible fungi: a global overview of their use and importance to people.** Disponível em < <http://www.fao.org/docrep/007/y5489e/y5489e00.htm>>. Acesso em: dezembro, 2012.

BONONI, V. L. R.; CAPELARI, M.; MAZIERO R.; TRUFEM, S. F. B. **Cultivo de cogumelos comestíveis.** São Paulo: Icone, 1995. 206p.

BORCHERS A. T.; STERN J. S.; HACKMAN R. M.; KEEN C. L.; GERSHWIN M. E. **Mushroom, tumors, and immunity.** Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, New York, v. 221, n. 4, p. 281-93, 1999.

BORCHERS A. T.; KEEN C. L.; GERSHWIN M. E. **Mushrooms, tumors, and immunity: an update.** Experimental Biology and Medicine, Maywood, v. 229, n.5, p. 393-406, 2004.

BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H. M.; FURLAN, S. A. **Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes.** Food Chemistry, Barking, v. 88, n. 3 p. 425–428, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 27, de 12 de janeiro de 1998. Aprova o “**Regulamento técnico referente à informação nutricional complementar**”. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 13 jan. 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o "**Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados**". Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 dez. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 272, de 22 de setembro de 2005. Aprova o "**Regulamento técnico para produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis**". Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 set. 2005.

BREENE, W. M. **Nutritional and Medicinal Value of Specialty Mushrooms**. Journal Food Protection, Des Moines, v. 53, n. 10, p. 883-894, 1990.

BRYNE, G. J. A. **Treatment of cognitive impairment in Alzheimer's disease**. The Australian Journal of Hospital Pharmacy, v. 28, n. 4, p. 261- 266, 1998.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The fungi**. 2. ed. London: Academic Press, 2001. 587 p.

CARVALHO, S. A. **Avaliação do potencial de fungos filamentosos como fonte de nutrientes e ácidos graxos de interesse para a indústria alimentícia**. 2009. 133f. Tese (Ciências Químicas) – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

CHANG, S. T. Overview of mushroom cultivation and utilization as functional foods. In: CHEUNG, P. C. K. **Mushrooms as functional foods**. New Jersey: Wiley-Interscience. p. 1-33, 2008.

CHANG, S.T.; MILES P.G. **Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact** –2º ed., 1-10, 27-35, 40-47, 2004.

CHAU, C. F.; HUANG, Y. L. **Characterization of passion fruit seed fibres - a potential fibre source**. Food Chemistry, Barking, v. 85, n. 2, p. 189-194, 2004.

CHYE, F. Y.; WONG, J. Y.; LEE, J-S. **Nutritional quality and antioxidant activity of selected edible wild mushrooms**. Food Science and Technology International, Espanha, v. 14, n. 4, p. 375-384, 2009.

COSTA SILVA H. S. R.; SANTOS K. S. C. R.; FERREIRA E. I. **Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços**. Química Nova, São Paulo, vol. 29, n. 4, p. 776-785, 2006

DEMAIN, A. L. **Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms**. Applied Microbiology and Biotechnology, Cambridge, v. 52, n. 4, p. 455–63, 1999.

DOHNALEK, M. H. The role of fibre in clinical nutrition. In: VAN DER KAMP, J. W. *et al.* **Dietary fibre: Bioactive carbohydrates for food and feed**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, p. 271-294, 2004.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J. S. do. **Desenvolvimento in vitro de *Agaricus brasiliensis* em meios suplementados com diferentes farelos**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 41, n. 6, p. 995 – 999, 2006.

DUXBURY, D. **Dietary fiber: still no accepted definition**. Food Technology, Chicago, v. 58, n. 5, p. 70-80, 2004.

EIRA, A. F. **Cultivo do Cogumelo Medicinal *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann ou *Agaricus brasiliensis***. Viçosa: Ed. Aprenda Fácil, 2003. 398p.

ELLMAN, G. L. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity**. Biochemical Pharmacology, Oxford, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

FAEMG. **Cogumelos: mercado e comercialização**. Disponível em: <<http://www.faemg.org.br/Content.aspx?Code=353&ParentCode=13&ParentPath=Non e;13&ContentVersion=C>> Acesso em: 25 de novembro, 2012.

FINLAY, W. J. J.; LOGAN, N. A.; SUTHERLAND, A. D. **Bacillus cereus emetic toxin production in relation to dissolved oxygen tension and sporulation**. Food Microbiology, London, v. 19, n. 5, p. 423–430, 2002.

FIORENTINI, A. M. ERNANI, S. S.; PORTO, A. C. S.; JACIARA, Z. M.; FRANCO, B. D. G. M. **Influence of bacteriocins produced by *Lactococcus plantarum* BN in the shelf-lie of refrigerated bovine meat**. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 42-46, 2001.

FRANCO L. O.; STAMFORD T. C. M.; STAMFORD N. P.; CAMPOS-TAKAKI G. M. ***Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana**. Revista Analytica, São Paulo, n. 14, p. 40-44, 2005.

FURLANI, R. P. Z. **Valor nutricional de cogumelos cultivados no Brasil**. 2004. 99 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

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

FURLANI R. P. Z.; GODOY H. T. **Valor nutricional de cogumelos comestíveis**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 27, n. 1, p. 154-157, 2007.

GARBELOTTI, M. L.; TORRES, E. F.; MARSIGLIA, D. A. P. **Papel da fibra na alimentação**. Boletim Adolfo Lutz, São Paulo, n. 1, p. 3-28, 2003.

GARCIA I.; CISNEROS F.; SEDRÉS J. M. **Estudio de la actividad antimicrobiana en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* HB 184**. Alimentaria, Barcelona, n. 292, p. 63-65, 1998.

GENÇCELEP, H.; UZUN, Y.; TUNÇTÜRK, Y.; DEMIREL, K. **Determination of mineral contents of wild-grown edible mushrooms.** Food Chemistry, Barking, v. 113, n. 4, p. 1033-1036, 2009.

GUEDES P. P., RIBEIRO B., GONÇALVES R. F., BAPTISTA P., VALENTÃO P., SEABRA R. M., ANDRADE P. B. **Correlation between the pattern volatiles and the overall aroma of wild edible mushrooms,** Journal Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 56, n. 5,, p. 1704–1712, 2008.

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

HAAG, M. **Essential fatty acids and the brain.** Canadian Journal of Psychiatry, Ottawa, v. 48, n. 3, p. 195 – 203, 2003.

HARA M, YOCHIDA M, MORIMOTO M, NAKANO H. **6-deoxylludin M, a new antitumor antibiotic:** fermentation, isolation and structural identificacion. The Journal Antibiotics, Tokyo, v. 40, n. 11, p. 1643-1646, 1987.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi.** 8. ed. Wallingford: CAB international, 1995.

HELM, C. V.; CORADIN, J. H.; KESTRING, D. R. **Avaliação da composição química dos cogumelos comestíveis *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus bisporus Portobello*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*.** Comunicado Técnico 235. ISSN 1517 – 5030. Colombo, Paraná. Setembro, 2009.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Food and nutrition board. dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (Macronutrients).** Washignton, D.C: The National Academy Press, 2005. Disponível em:<http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=10490&page=339>. Acesso em dezembro de 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 4. ed. São Paulo, 2004. p. 70 - 71.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 4. ed. São Paulo, 2004. p. 96 - 97.

KALACĀ, P. **Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms:** A review. Food Chemistry, Barking, v. 113, n. 1, p. 9-16, 2009.

KALIPEDIA. **Ciencias Naturales.** Disponível em <www.kalipedia.com/ciencias-vida/tema/basidiom>. Acesso: novembro de 2012.

KHAN T.A.; PEH K. K.; CHING H. S. **Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods.** Journal of Pharmaceutical Science, Amsterdam, v. 5, n. 3, p. 205-212, 2002.

KRÜGER, C. C. H.; SILVA, C. A.; VEDANA, M. I. S.; TIENE, C.; CÂNDIDO, L. M. B. **Atividade antimicrobiana de peptídeos obtidos de caseína bovina.** Alimentação e Nutrição, Araraquara, v. 17, n. 1, p. 7-12, 2006.

LEMOS, F. M. R. **Elaboração e caracterização de produto análogo a hambúrguer de cogumelo *Agaricus brasiliensis*.** 2009. 147f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

LIU, S. **A prospective study of dietary fiber intake and risk of cardiovascular disease among women.** Journal of the American College of Cardiology, New York, v. 39, n. 1, p. 49-56, 2002.

LIU, Y-T.; SUN, J.; LUO, Z-U.; RAO, S-Q.; SU, Y-J.; XU R-R.; YANG, Y-J. **Chemical composition of five wild edible mushrooms collected from Southwest China and their antihyperglycemic and antioxidant activity.** Food and Chemical Toxicology, Oxford, v. 50, n. 5, p. 1238–1244, 2012.

LOIR, Y. L.; BARON, F.; GAUTIER, M. ***Staphylococcus aureus* and food poisoning.** Genetics and Molecular Research, Ribeirão Preto, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

MANZI, P.; AGUZZI, A.; PIZZOFERRATO, L. **Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy.** Food Chemistry, Barking, v. 73, n. 3, p. 321-325, 2001.

MANZI, P., GAMBELLI, L., MARCONI, S., VIVANTI, V. e PIZZOFERRATO, L. **Nutrients in Edible Mushrooms: an inter-species comparative study.** Food Chemistry, Barking, v. 65, n. 4, p. 477-482, 1999.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. **β -glucans in edible mushrooms.** Food Chemistry, Barking, v. 68, n. 3, p. 315-318, 2000.

MANZI P.; MARCONI S.; AGUZZI A.; PIZZOFERRATO L. **Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking.** Food Chemistry, Barking, v. 84, n. 2, p. 201-206, 2004.

MATTILA, P.; KÖNKÖ, K.; EUROLA, M.; PIHLAVA, J.; ASTOLA, J.; VAHTERISTO, L.; HIETANIEMI, V.; KUMPULAINEN, J.; VALTONEN, M.; PIIRONEN, V. **Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 49, n.5, p. 2343-2348, 2001.

MATTILA P.; SUONPAA, P. K.; PIIRONEN, V. **Functional properties of edible mushrooms.** Nutrition, New York, v. 16, n. 7/8, p. 694–696, 2000.

MATTILA, P.; SALO-VÄÄNÄNEN P.; KÖNKÖ, K.; ARO, H.; JALAVA, T. **Basic Composition and Amino Acid Contents of Mushrooms Cultivated in Finland.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 50, n. 22, p. 6419- 6422, 2002b.

MAYSER, P.; MROWIETZ, U.; ARENBERGER, P.; BARTAK, P.; BUCHVALD, J.; CRISTHOPHER, E.; JABLONSKA, S.; SALMOHOFER, W.; SCHILL, W.B.; KRAMER, H.J.; SCHLOTZER, E.; MAYER, K.; SEEGER, W.; GRIMMINGER, F. **Omega-3 fatty acid based lipid infusion in patients with chronic plaque psoriasis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter trial.** Journal of the American Academy of Dermatology, St. Louis, v. 38, n. 4, p. 539-547, 1998.

MESULAM, M. M.; LARRY, R. S. Acetylcholine Neurotransmission in CNS. In: **Encyclopedia of Neuroscience.** Oxford: Academic Press, 2009. p. 1-4.

MONTEIRO, C. S.; KALLUF, V.; PENTEADO, P.T.; WASZCZYNSKYJ, N.; FREITAS, R.; STERTZ, S. C. **Caracterização química do cogumelo *Agaricus Blazei Murriel*.** Visão Acadêmica, Curitiba, v. 6, n. 1, p. 7-13, 2005.

MOURA, C. O.; NASCIMENTO, G. P. V.; PINTO, C. R. G. **Atividade antibacteriana de *Qualea grandiflora* Mart. (VOCHYSIACEAE).** Revista de Biologia e Farmácia, Paraíba, v. 8, n. 2, p. 34-42, 2012.

NAPPI, B. P.; ZILLOTTO, C. H.; RABELLO, G.; GONZAGA, L. V.; MORETTO, E.; CRUZ, R. C. B. **Composição do lipídio presente na biomassa produzida pelos cogumelos comestíveis *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula Edodes* e *Auricularia auricula-judae* em soro de leite.** B.CEPPA, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 93-99, 1999.

NOVAES, M. R. C. G.; NOVAES L. C. G. **Fármaco-nutrientes em cogumelos comestíveis *Agaricales* e outros basidiomicetos.** Revista Brasileira de Nutrição Clínica, Porto Alegre, v. 20, n. 3, p. 181-187, 2005.

OKAWA Y.; KOBAYASHI M.; SUZUKI S.; SUZUKI M. **Comparative study of protective effects of chitin, chitosan, and N-acetyl chitohexaose against *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* infections in mice.** Biological Pharmaceutical Bulletin, Tokyo, v. 26, n. 6, p. 902 - 904, 2003.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **HACCP: Instrumento essencial para a inocuidade de alimentos.** Buenos Aires: OPAS/INPAAZ, 2003. 401 p.

ORHAN, I.; ÜSTÜN, O. **Determination of total phenol content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition in selected mushrooms from Turkey.** Journal of Food Composition and Analysis, San Diego, v. 24, n. 3, p. 386–390, 2011.

OUZOUNI, P.K.; PETRIDIS, D.; KOLLER, W. D.; RIGANAKOS, K.A. **Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece.** Food Chemistry, Barking, v. 115, n. 4, p. 1575–1580, 2009.

ÖZTÜRK, M.; DURU, M. E.; KIVRAKB, S.; MERCAN-DOG˘AN C, N.; TURKOGLU, A.; OZLER, M. A. **In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents:** A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology, Oxford*, v. 49, n. 6, p. 1353–1360, 2011.

PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Fibra e doenças gastrointestinais. In: LAJOLO, F. M. *et al.* **Fibras dietéticas en iberoamérica: tecnologia y salud.** São Paulo: Varela, p. 386-387, 2001.

PARDO, A.; JUAN, J. A.; PARDO, J. E. **Chemical composition and nutritional value of cultivated mushroom, *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach.** *Alimentacion Equipos y Tecnologia, Barcelona*, v. 20 n. 157, p. 115-117, 2001.

PAULI, A. P. **Avaliação da composição química, compostos bioativos e atividade antioxidante em cogumelos comestíveis.** 2010. 73f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP. Araraquara, 2010.

PEDNEAULT, K. P. ANGERS, A. GOSSELIN, R.J. TWEDDELL, **Fatty acid composition of lipids from mushrooms belonging to the family Boletaceae.** *Mycological Research, Cambridge*, v. 110, n. 10, p. 1179–1183, 2006.

PEDROSO, A.; TAMAI, F. **Análise e composição química do *Agaricus Blazei Murriel.*** Apostila de estudo da USP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Disponível em: < <http://www.vidaplana.com.br/cogumelo/p2.htm#análise> >. Acesso em: dezembro, 2012.

PEREIRA, E. A. P. C. **Contribuição para a inventariação química e nutricional de cogumelos do Nordeste de Portugal.** 2011. 70f. Dissertação. Programa de Pós Graduação em Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior Agrária de Bragança. Bragança, 2011.

PEREIRA, M. A.; O'REILLY, E.; AUGUSTSSON, K.; FRASER, G. E.; GOLDBOURT, U.; HEITMANN, B. L.; HALLMANS, G.; KNEKT, P.; LIU, S.; PIETINEN, P.; SPIEGELMAN, D.; STEVENS, J.; VIRTAMO, J.; WILLET, W. C.; ASCHERIO, A. **Dietary fiber and risk of coronary disease: a pooled analysis of cohort studies.** *Archives of International Medicine, Minneapolis*, v. 164, n. 4, p. 370-376, 2004.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal.** 7^o.ed. Coord. Trad. J.E. Kraus. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2007.

RHEE, I. K.; MEENT, M. V.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. **Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity stainin.** *Journal of Chromatography A, New York*, v. 915, n. 1/2, p. 217-223, 2001.

- RIBEIRO B.; GUEDES P. P.; ANDRADE P. B.; BAPTISTA P.; VALENTÃO P. **Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study.** Microchemical Journal, New York, v. 93, n. 1, p. 29–35, 2009.
- RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos (2º Edição revisada).** Editora Edgard Bluncher, São Paulo, 196 p., 2007.
- RISTORI, C. A.; PEREIRA, M. A. dos S.; GELLI, D. S. **The effect in vitro of ground black pepper on contamination with salmonella rubislaw.** Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 62, n. 2, p. 131-133, 2002.
- ROYNETTE C. E.; CALDER P. C.; DUPERTUIS Y. M.; PICHARD C. **n-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention.** Clinical Nutrition, Edinburgh, v. 23, n. 2, p. 139-51, 2004.
- SALES-CAMPOS, C.; OLIVEIRA, L. A.; ARAUJO, L. M.; VAREJÃO, M. J. C.; ANDRADE, M. C. N. **Composição mineral de uma linhagem de *Pleurotus ostreatus* cultivada em resíduos madeireiros e agroindustriais da região amazônica.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 29, n. 4, p. 868-872, 2009.
- SALGADO, J. M.; BIN, C.; CORNÉLIO, A. R. **Efeito do abacate (*Persea americana* Mill) variedade Hass na lipidemia de ratos hipercolesterolêmicos.** Simpósio Latino Americano de Ciências dos Alimentos. Campinas. 2005.
- SANDER, A.B.T. **Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe.** American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda, v. 71, n.1, p. 176-178, 2000.
- SANTOS J. E.; SOARES J. P.; DOCKAL E. R. CAMPANA-FILHO S. P.; CAVALHEIRO E. T. G. **Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens.** Polímeros: Ciência e Tecnologia, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.
- SCHÜRMAN, B. T. M.; SALLUM, W. S. T.; TAKAHASHI, J. A. **Austin, dehydroaustin and other metabolites from *Penicillium brasilianum*.** Química Nova, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 1044-1046, 2010.
- SEIDL, C. **Pesquisa de substâncias naturais inibidoras da acetilcolinesterase.** 2010. 86f. Dissertação. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- SETTANNI, L.; CORSETTI, A. **Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation.** International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 121, n. 2, p. 123-138, 2008.
- SILVA M. C. F.; STAMFORD T. C. M.; FRANCO L. O.; CAMPOS-TAKAKI G. M. **Effect of environmental conditions on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* UCP 542 using factorial design.** Asian Chitin Journal, West Bengal, v. 2, n. 3, p. 15-22, 2006.

SILVA, M. S. S. **Alcalóides de plantas da família Amaryllidaceae: Isolamento e caracterização e testes de inibição de acetilcolinesterase.** 2009. 260f. Tese (Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

SILVA, R. R. da.; COELHO, G. D. **Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas.** Curso de capacitação de monitores e educadores. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. São Paulo, 2006.

SILVEIRA, S.; LUCENA, E. V. de; PEREIRA, T. F.; GARNÉS, F. L. S. dos; ROMAGNOLO, M. B.; TAKEMURA, O. S.; LAVERDEJUNIOR, A. **Atividade anticolinesterásica dos frutos de *myrcianthes pungens* (O.Berg) D.Legrand (Myrtaceae).** Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 127-133, 2011.

SIMÒN A.; GONZALEZ-FANDOS; TOBAR V. **The sensory and microbiological quality of fresh sliced mushroom (*Agaricusbisporus* L.) packaged in modified atmospheres.** International Journal of Food Science and Technology, Oxford, v. 40, n. 9, p. 943–952, 2005.

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. L. ***Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos.** Ciência e saúde coletiva, Rio de Janeiro, v.13, n.5, p.1675 – 1683. 2008.

SMIDERLE, F. R.; CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. **Characterization of a heterogalactan: Some nutritional values of the edible mushroom *Flammulina velutipes*.** Food Chemistry, Barking, v. 108, n. 1, p. 329-333, 2008.

SMITH, M. A. C. **Doença de Alzheimer.** Revista Brasileira de Psiquiatria, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 3-7, 1999.

STEVANATO, F. B. **Aproveitamento de cabeças de tilápias de cativeiro na forma de farinha como alimento para merenda escolar.** 2006. 69f. Dissertação. Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

SUNG, S. H.; KANG S. Y.; LEE K. Y.; PARK M. J.; KIM J. H.; PARK J. H.; KIM Y.C.; KIM J.; KIM Y. C. **(+)- α -Vinifrin, a stilbene trimer from *Caragana chamlague*, inhibits acetylcholinesterase.** Biological and Pharmaceutical Bulletin, Tokyo, v. 25, p. 125-127, 2002.

TAKAHASHI, N. S. **Importância dos ácidos graxos essenciais.** Disponível em < ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/acidoss_graxos.pdf > Outubro, 2005. Acesso em: 26/07/2012.

TBCAUSP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – USP.** Disponível em < <http://www.fcf.usp.br/tabela/qual.asp> > Agosto, 2008. Acesso em: novembro de 2012.

TELES, A. P. C. **Estudo químico e avaliação das atividades antimicrobiana e anticolinesterásica de extratos brutos acetato de etila e metabólitos secundários do fungo *Paecilomyces lilacinus***. 2012. 160f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – CIPHARMA) - Escola de Farmácia. Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 2012.

TIWARI, B. K.; VALDRAMIDIS, V. P.; O' DONNELL, C. P. MUTHUKUMARAPPAN, K. BOURKE, P.; CULLEN, P. J. **Application of natural antimicrobials for food preservation**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 57, n. 14, p. 5987-6000, 2009.

TONIAL, T. M. **Obtenção do crescimento do fungo comestível *Volvariella volvacea* em fermentação no estado sólido e em fermentação submersa a partir de resíduos agroindustriais**. 1997. 93f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1997.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. **Seleção de plantas com atividade colinesterásica para o tratamento da doença de Alzheimer**. Química Nova, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 302-304, 2003.

TSAI, G. J.; HWANG, S. P. **In vitro and in vivo antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bactéria**. Fisheries Science, Tokyo, v. 70, n. 4, p. 675-681, 2004.

UTAMA, J. M. S. WILLS, R. B. H.; BEN-YEHOSHUA, S.; KUESK, C. **In vitro efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetal decay microorganisms**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 50, n. 22, p. 6371-6377, 2002.

VETTER, J. **Chemical composition of fresh and conserved *Agaricus bisporus* mushroom**. European Food Research Technology, Berlin, v. 217, n.1, p. 10-12, 2003.

VIEGAS, C. BOLZANI V. S.; FURLAN M.; FRAGA C. A. M.; BARREIRO E. J. **Natural products as candidates for useful drugs in the treatment of Alzheimer's disease**. Química Nova, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.

WANI, B. A.; BODHA, R. H.; WANI, A. H. **Nutritional and medicinal importance of mushrooms**. Journal of Medicinal Plants Research, v. 4, n. 24, p. 2598-2604, 2010.

WARD, O.P. **Microbial production of long-chain PUFAs**. Biotechnology Information, v. 6, n. 6, p. 683-687, 1995.

WASSER, S. P. **Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides**. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 60, n. 3, p. 258-274, 2002.

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

YANG, J. H.; LIN, H. C.; MAU, J. L. **Non-volatile taste components of several commercial mushrooms.** Food Chemistry, Barking, v. 72, n. 4, p. 465-471, 2001.

YILMAZ, N.; SOLMAZ, M.; TURKEKUL, I.; ELMASTAS, M. **Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey.** Food Chemistry, Barking, v. 99, n. 1, p. 168-174, 2006.