

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS – IBILCE
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

ANA CAROLINA DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE SHIITAKE
(*Lentinus edodes*) E DE COGUMELO DO SOL (*Agaricus blazei*)
APLICADOS EM ÓLEO DE SOJA SOB AQUECIMENTO**

**São José do Rio Preto/SP
2010**

ANA CAROLINA DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE SHIITAKE
(*Lentinus edodes*) E DE COGUMELO DO SOL (*Agaricus blazei*)
APLICADOS EM ÓLEO DE SOJA SOB AQUECIMENTO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos (Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos).

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Neuza Jorge
Professora Assistente Doutora
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Odair Zenebon
Professor Doutor
Instituto Adolfo Lutz

Prof. Dr. Elizeu Trabuço
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 18 de Junho de 2010.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Norma e Bittencourt, pelo incentivo aos
estudos e ao Sandro, pela compreensão
nos momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Neuza Jorge, pelos ensinamentos, dedicação e conselhos concedidos durante a realização deste trabalho;

Às minhas colegas Ângela e Michelle, pela amizade e cumplicidade durante os momentos difíceis e os momentos agradáveis;

Ao técnico Luiz, pela solicitude durante os trabalhos de laboratório e pelos quitutes deliciosos;

À Simara, Débora e Patrícia, pelas dicas e conselhos durante o desenvolvimento do trabalho;

À Dona Regina e Denise, pela doação inestimável das amostras de cogumelos necessárias para o trabalho;

Aos meus pais Norma e Bittencourt, e irmãos, Rodrigo e Danilo, pela força, incentivo e carinho nos momentos difíceis;

Ao meu companheiro Sandro, pela paciência e tolerância em minhas ausências durante vários finais de semana dedicados ao laboratório;

A todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	12
Capítulo 1 – Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes	
RESUMO	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. COGUMELOS	17
2.1. Propriedades nutricionais	18
2.2. Propriedades funcionais	19
2.3. Propriedades medicinais	20
2.4. Propriedades antioxidantes	21
3. ANTIOXIDANTES	22
3.1. Classificação e mecanismo de ação	23
3.2. Antioxidantes sintéticos	24
3.3. Antioxidantes naturais	26
3.3.1. Ácidos fenólicos	26
3.3.2. Flavonóides	27
3.3.3. Tocoferóis	29
4. MÉTODOS <i>IN VITRO</i> PARA AVALIAR A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .	30
5. MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA	31
6. EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS	32
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
Capítulo 2 – Propriedades antioxidantes dos extratos de shiitake (<i>Lentinus edodes</i>) e cogumelo do sol (<i>Agaricus blazei</i>)	
RESUMO	43
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1. Material	46

2.1.1. Cogumelos	46
2.1.2. Óleo	46
2.1.3. Extratos e antioxidantes	46
2.2. Métodos	47
2.2.1. Método do radical livre DPPH* (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	47
2.2.2. Sistema β -caroteno/ácido linoléico	47
2.2.3. Compostos fenólicos totais	48
2.2.4. Estabilidade oxidativa	48
2.3. Análise estatística	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1. Rendimento dos extratos de cogumelos	49
3.2. Atividade antioxidante dos extratos de cogumelos	52
3.2.1. Método do radical livre DPPH*	52
3.2.2. Sistema β -caroteno/ácido linoléico	55
3.3. Compostos fenólicos totais dos extratos de cogumelos	59
3.4. Estabilidade oxidativa do óleo de soja	61
4. CONCLUSÕES	64
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
6. APÊNDICES	68

Capítulo 3 – Estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado dos extratos de shiitake (*Lentinus edodes*) e cogumelo do sol (*Agaricus blazei*) em teste de estocagem acelerada

RESUMO	73
1. INTRODUÇÃO	74
2. MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1. Material	75
2.1.1. Cogumelos	75
2.1.2. Óleo	76
2.1.3. Extratos e antioxidantes	76
2.2. Ensaio Experimental	76
2.3. Métodos	77
2.3.1. Índice de peróxidos	77

2.3.2. Dienos conjugados	77
2.4. Análise estatística	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1. Índice de peróxidos	78
3.2. Dienos conjugados	80
4. CONCLUSÕES	82
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
6. APÊNDICE	85

Capítulo 4 – Influência dos extratos de shiitake (*Lentinus edodes*) e cogumelo do sol (*Agaricus blazei*) sobre a retenção de tocoferóis em óleo de soja em teste de estocagem acelerada

RESUMO	87
1. INTRODUÇÃO	88
2. MATERIAL E MÉTODOS	89
2.1. Material	89
2.1.1. Cogumelos	89
2.1.2. Óleo	90
2.1.3. Extratos e antioxidantes	90
2.2. Ensaio experimental	90
2.3. Métodos	91
2.3.1. Ácidos graxos livres	91
2.3.2. Ganho de massa	91
2.3.3. Tocoferóis	91
2.4. Análise estatística	92
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
3.1. Ácidos graxos livres	92
3.2. Ganho de massa	94
3.3. Tocoferóis	97
4. CONCLUSÕES	102
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
6. APÊNDICES	105

RESUMO

O presente trabalho teve como principais objetivos: conhecer a atividade antioxidante do shiitake (*Lentinus edodes*) e do cogumelo do sol (*Agaricus blazei*) conforme os métodos radical livre DPPH[•] e sistema β -caroteno/ácido linoléico; avaliar a estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado dos extratos que apresentaram maior atividade antioxidante e a influência dos extratos de cogumelos na retenção de tocoferóis em óleo de soja, quando submetido ao teste de estocagem acelerada. Os extratos de cogumelos foram obtidos sob diferentes condições: solventes de diferentes polaridades e dois tipos de extração, lenta (*shaker*, 3 horas, 120 rpm) e rápida (liquidificador, 30 minutos). Os solventes utilizados foram: água, metanol:água (1:1), etanol:água (1:1), metanol e etanol. Independente de qual variedade apresentou maior atividade antioxidante, ambas foram selecionadas para serem aplicadas ao óleo de soja. Os tratamentos: Controle (óleo de soja sem antioxidantes), TBHQ (óleo de soja + 100 mg/kg de TBHQ), BHT (óleo de soja + 100 mg/kg de BHT), Shiitake (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de shiitake) e Cogumelo do sol (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de cogumelo do sol) foram preparados e submetidos ao teste de estabilidade oxidativa por meio do Rancimat (100°C) com fluxo de ar a 20L/h e ao teste de estocagem acelerada em estufa, a 60°C durante 15 dias. As amostras foram recolhidas a cada 3 dias e analisadas quanto ao índice de peróxidos, dienos conjugados, ácidos graxos livres e tocoferóis naturalmente presentes no óleo de soja. Além disso, as amostras também foram analisadas diariamente quanto ao ganho de massa. Os resultados obtidos das determinações analíticas foram submetidos às análises de variância, em esquema fatorial, no delineamento inteiramente casualizado. Os extratos metanólicos, de ambas as variedades, independente do tipo de extração, apresentaram maior atividade antioxidante. De acordo com o método DPPH[•], os extratos de shiitake e de cogumelo do sol apresentaram atividades antioxidantes máximas de 92,84 e 95,10%, respectivamente, ambos obtidos em extração rápida. Para o sistema β -caroteno/ácido linoléico, os valores máximos de atividade antioxidante foram 93,06% para o extrato de shiitake e 78,96% para o de cogumelo do sol quando obtidos em extração lenta. A estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado dos extratos metanólicos da extração lenta de shiitake e de cogumelo do sol

apresentou período de indução médio de 19,85 horas. Ao final de 15 dias de aquecimento, os tratamentos TBHQ, cogumelo do sol e shiitake apresentaram índices de peróxidos e de dienos conjugados de 6,47, 8,81 e 41,53 meq/kg e 0,37, 0,40 e 0,67%, respectivamente. O tempo requerido para se alcançar 0,5% de aumento de massa foi de 13 dias para o TBHQ e 15 dias para o Cogumelo de sol. Os tratamentos TBHQ e Cogumelo do sol contribuíram, também para a retenção dos tocoferóis totais e seus isômeros no óleo submetido à estocagem acelerada, sendo que ao final de 15 dias de estocagem, o teor de tocoferóis totais para o TBHQ foi de 457,50 mg/kg e para o Cogumelo do sol, 477,20 mg/kg. Os resultados revelaram o cogumelo do sol como um potente antioxidante para a estabilidade do óleo de soja.

Palavras-chave: cogumelos, antioxidantes, estabilidade oxidativa, estocagem acelerada, tocoferóis, óleo de soja.

ABSTRACT

The present work had as its main goals: cognize the antioxidant activity of shiitake (*Lentinus edodes*) and cogumelo do sol (*Agaricus blazei*) according to the method of free radicals DPPH[•] and the system β -carotene/acid linoleic; evaluate the oxidative stability of soybean oil added of the extracts that presented higher antioxidant activity and asses the mushroom's extract influence over the retention of tocopherols in soybean oil, when subjected to the accelerated storage test. The mushroom's extracts were obtained under different conditions: solvents of different polarities and two types of extraction, slow (shaker, 3 hours, 120 rpm) and fast (blender, 30 minutes). The solvents used, in decreasing order of polarity, were: water, methanol: water (1:1), ethanol: water (1:1), methanol and ethanol. Irrespective of which variety had shown higher antioxidant activity, both were selected to be applied to the soybean oil. The treatments: Control (soybean oil without antioxidants), TBHQ (soybean oil + 100 mg/kg de TBHQ), BHT (soybean oil + 100 mg/kg of BHT), Shiitake (soybean oil + 3,500 mg/kg of extract of the shiitake) and cogumelo do sol (soybean oil + 3,500 mg/kg of extract of the cogumelo do sol) were prepared and subjected to the oxidative stability's test through the Rancimat (100°C) with airflow at 20 L/h and to the accelerated storage test in an oven, at 60°C for 15 days. The samples were collected every 3 days and analyzed regarding the index of peroxides, conjugated dienes, free fatty acids and tocopherols naturally found in the soybean oil added to the mushroom's extracts. Beyond that, the samples were also analyzed daily regarding the weight gain. The results obtained from the analytics determinations were submitted to the variance analysis, in a factorial scheme, over a full randomized lineation. The methanolic extracts of both varieties, irrespective from the extraction type presented higher antioxidant activity. According to the DPPH[•] method, the shiitake and cogumelo do sol extracts presented maximum antioxidant activities of 92.84 and 95.10%, respectively, both obtained from fast extraction. To the β -carotene/linoleic acid system, the maximum values for antioxidant activity were 93.06% for the shiitake's extract and 78.96% for the cogumelo do sol when obtained in a slow extraction. The oxidative stability of the soybean oil added from the methanolic extracts of the shiitake's slow extraction and cogumelo do sol presented a medium induction period of 19.85 hours. By the end of 15 days of heating, the TBHQ treatments,

cogumelo do sol and shiitake presented peroxides indexes and conjugated diene of 6.47, 8.81 e 41.53 meq/kg and 0.37, 0.40 e 0.67%, respectively. The time required to reach 0.5% weight gain was about 13 days for the TBHQ and 15 days for the cogumelo do sol. The TBHQ treatments and cogumelo do sol contributed also for the total tocopherols retention and its isomers in the oil subjected to accelerated stocking, being that by the end of the 15 days of stocking, the percentage of total tocopherols to the TBHQ were of 457.50 mg/kg and for the cogumelo do sol, 477.20 mg/kg. The results revealed the cogumelo do sol as a powerful antioxidant for the stability of soybean oil.

Keywords: mushroom, antioxidants, oxidative stability, accelerated stocking, tocopherols, soybean oil.

INTRODUÇÃO

Óleos vegetais são vastamente consumidos em todo o mundo porque são fontes de energia e de ácidos graxos essenciais, agem como veículo para vitaminas lipossolúveis, são responsáveis pela palatabilidade, sabor e textura de alimentos, substituem a gordura de origem animal e podem ser obtidos por meio de várias espécies vegetais. No Brasil, o mais consumido é o óleo de soja por apresentar menor preço e pela alta disponibilidade de matéria-prima.

Os óleos vegetais, bem como os alimentos de natureza lipídica, sofrem, durante o processamento e armazenamento, o processo de degradação conhecido como oxidação lipídica que envolve alterações biológicas, físicas e químicas resultando em modificações das características originais do alimento, perda de nutrientes, alteração no odor e sabor, além de perdas econômicas.

Para retardar a oxidação lipídica, a indústria de alimentos utiliza-se de aditivos alimentares como antioxidantes sintéticos que, seguindo normas estabelecidas pela ANVISA, são aplicados com a finalidade de prolongar a vida de prateleira destes tipos de alimentos. No entanto, estudos toxicológicos têm evidenciado os efeitos tóxicos destes aditivos, apontados como possíveis causadores de danos à saúde humana. Portanto, pesquisas recentes têm sido realizadas e buscam demonstrar a eficácia da utilização de antioxidantes naturais na proteção oxidativa.

Os antioxidantes possuem atividade fisiológica porque impedem a ação de radicais livres no organismo e nos alimentos de natureza lipídica retardando a oxidação e mantendo suas características sensoriais.

Os cogumelos, assim como vegetais e frutas, possuem elevado conteúdo de substâncias antioxidantes que são capazes de diminuir os efeitos prejudiciais dos radicais livres. Dentre os antioxidantes presentes nos cogumelos destacam-se os compostos fenólicos como ácidos fenólicos, flavonóides e tocoferóis. Os compostos fenólicos são substâncias de elevada polaridade que podem ser extraídas dos cogumelos por meio de solventes como água, metanol, etanol e suas misturas.

Dentre as espécies de cogumelos, destacam-se o shiitake (*Lentinus edodes*) e o cogumelo do sol (*Agaricus blazei*). O shiitake é o segundo cogumelo mais consumido no mundo, só perdendo para o champignon (*Agaricus bisporus*).

O cogumelo do sol é de origem brasileira e hoje é comercializado em países como China e Japão. Além de antioxidantes, os cogumelos possuem propriedades nutricionais por serem ricos em proteínas, além de propriedades funcionais e medicinais por melhorarem o mecanismo de defesa do organismo pelo do aumento do número de anticorpos.

Diante destes fatos, os objetivos deste trabalho foram avaliar a atividade antioxidante do shiitake e do cogumelo do sol e medir a estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado dos extratos dos cogumelos, além de avaliar a resistência dos tocoferóis naturalmente presentes no óleo de soja após o teste de estocagem acelerada em estufa.

Capítulo 1

Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes

RESUMO

O presente trabalho apresenta uma revisão da literatura que evidencia a importância econômica, nutricional, medicinal e antioxidante dos cogumelos. Foram descritos os principais compostos antioxidantes presentes nos cogumelos como ácidos fenólicos, flavonóides e tocoferóis, assim como seu mecanismo de ação. Foram abordados os principais métodos *in vitro* utilizados para avaliação da atividade antioxidante destes compostos. A ação dos antioxidantes em sistemas lipídicos pode ser avaliada acompanhando a formação de produtos primários da oxidação, como peróxidos e dienos conjugados, quando a amostra lipídica é submetida ao estresse oxidativo. Foi estudada também a influência do tipo de extração na obtenção dos compostos antioxidantes. Verificou-se que a polaridade do solvente utilizado no processo de extração é determinante na obtenção de compostos antioxidantes.

Palavras-chave: cogumelos, compostos fenólicos, antioxidantes, tipos de extração.

1. INTRODUÇÃO

O consumo de cogumelos é uma antiga tradição nos países asiáticos, principalmente na China, onde começaram a ser cultivados cerca de 600 anos a.C. com a espécie *Auricularia auricula*, também conhecida como orelha de pau (AIDA et al., 2009).

Dentre as espécies conhecidas de fungos, 12.000 são consideradas cogumelo, sendo que destas pelo menos 2.000 são comestíveis. Aproximadamente 35 espécies são cultivadas comercialmente e 20 são cultivadas em escala industrial. O cogumelo mais cultivado no mundo é o *Agaricus bisporus* (champignon), seguido do *Lentinus edodes* (shiitake), *Pleurotus* spp (cogumelo ostra), *Auricularia auricula* (cogumelo orelha de pau) e *Volvariella volvacea* (cogumelo palha) (SANCHEZ, 2004).

Segundo *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2009), a produção de cogumelos na China passou de 562.194 para 1.605.000 t em 2007, representando um aumento de 185% em 10 anos. Este crescimento também foi observado em países como Estados Unidos, Canadá, Israel e Índia. Uma justificativa para este aumento na produção de cogumelos é a crescente procura pelos consumidores que buscam os benefícios à saúde proporcionados por este alimento.

Os cogumelos possuem vários compostos biologicamente ativos como polissacarídeos, glicoproteínas e propriedades antioxidantes e antibióticas. Por isso, além de ser apreciado por suas características sensoriais, o cogumelo também é usado como fonte medicinal (NOVAES; FORTES, 2005; TSAI et al., 2009; WONG; CHYE, 2009).

Cheung, Cheung e Ooi (2003) e Elmastas et al. (2007) analisaram extratos metanólicos de várias espécies de cogumelos e encontraram uma correlação direta entre atividade antioxidante e o conteúdo de compostos fenólicos totais e tocoferóis.

A identificação e o isolamento destes compostos bioativos dependem da manipulação da matéria-prima e do tipo de extração. Os cogumelos são comumente consumidos desidratados e, para isso, são expostos a temperaturas elevadas e presença de oxigênio, causando maior susceptibilidade aos danos

oxidativos. Por isso, uma desidratação a vácuo, ao abrigo da luz e em baixa temperatura contribui para a manutenção da atividade antioxidante.

Assim como a identificação dos compostos bioativos é influenciada por diversos fatores, a avaliação da ação antioxidante destes compostos pode ser feita por diversos métodos *in vitro*, cada um com suas particularidades. Segundo Anderson e Phillips (1999), as reações de oxidação e redução são muito sensíveis ao meio no qual elas ocorrem já que os alimentos são matrizes complexas levando, muitas vezes, a resultados contraditórios na avaliação de um único antioxidante, utilizando-se diferentes sistemas *in vitro*.

De acordo com Pokorný (1991), quando comparados com os antioxidantes sintéticos, os naturais apresentam as vantagens de serem considerados seguros, mais aceitos pelos consumidores e, além de protegerem os óleos vegetais contra a oxidação lipídica, também conferem a eles propriedades nutracêuticas. Por isso, a aplicação de antioxidantes extraídos de fontes naturais em óleos vegetais tem sido amplamente investigada (ANGELO; JORGE, 2008; BERA; LAHIRI; NAG, 2006; IQBAL; BHANGER, 2007; LUZIA; JORGE, 2009). Nestes estudos, os óleos vegetais adicionados de antioxidantes naturais são submetidos a altas temperaturas e presença de oxigênio. Desta forma, pode-se avaliar a eficiência dos antioxidantes naturais frente ao processo de oxidação.

O presente estudo apresenta uma breve revisão da literatura sobre os compostos antioxidantes encontrados nos cogumelos bem como os principais testes disponíveis para avaliar suas propriedades antioxidantes e o grau de oxidação lipídica.

2. COGUMELOS

Os cogumelos são consumidos por povos de diversas culturas, tanto pelas suas características gastronômicas, quanto pelo seu apelo medicinal. Porém, seu emprego como alimento funcional é mais notado nas culturas orientais, nas quais o uso de cogumelos para se manter a saúde teve início há milhares de anos com os chineses (CHANG, 1996).

No Brasil não existem dados oficiais sobre a produção de cogumelos, mas a região que mais se destaca é a de Mogi das Cruzes no Estado de São

Paulo. Anualmente, mais de 4 mil t são comercializadas na região representando cerca de 80% da produção nacional. Portanto, estima-se que a produção brasileira se aproxime de 5 mil t anuais (SAMPAIO; QUEIROZ, 2006).

O shiitake é a segunda espécie de cogumelo comestível mais consumida no mundo, ficando atrás somente do Champignon, *Agaricus bisporus* (CHANG, 1996). No Brasil, o cultivo foi introduzido no início da década de 90 (FERREIRA, 1998).

O cogumelo do sol, *Agaricus blazei*, é nativo do Brasil e vem sendo cultivado comercialmente desde o início da década de 90. O estado de São Paulo se destaca na produção, onde o cultivo é feito nas épocas de primavera e verão. É produzido em escala industrial em alguns países como China e Japão (KANENO et al., 2004). Neste último país, o consumo anual chega a 300 t (LEE et al., 2008).

2.1. Propriedades nutricionais

O shiitake *in natura* contém cerca de 90% de água. É fonte de proteínas (13,4 a 17,5% da matéria seca), valores acima dos encontrados em vegetais e um pouco abaixo de carnes e leite. Os carboidratos são os constituintes principais do cogumelo, com exceção da água. O shiitake apresenta de 67,5 a 78% de carboidratos (sendo 44,9% de fibra alimentar) (FURLANI; GODOY, 2005).

O shiitake é também fonte de vitaminas, principalmente C (2,1 mg/100g), B₁₂ (0,07 µg/100g) e D (0,1 µg/100g). É pobre em gordura (2,1% em base seca), sendo que 77,7% dos lipídios são constituídos por ácidos graxos insaturados, com predominância do ácido linolênico (FURLANI; GODOY, 2005).

Os cogumelos contêm alto teor de minerais podendo alcançar de 3,7 a 7% de resíduo mineral. Dentre os minerais presentes no cogumelo shiitake destacam-se: cálcio (0,05 g/kg), potássio (26,7 g/kg), magnésio (1,55 g/kg), fósforo (8,7 g/kg), além do sódio, cobre, ferro, manganês e zinco (MATTILA et al., 2001).

O cogumelo do sol é muito apreciado pelos valores protéico, vitamínico e mineral, sendo que os que mais se destacam nesta última classe são fósforo (0,87%), potássio (2,34%), cálcio (0,07%) e magnésio (0,08%). Os teores de enxofre e zinco são semelhantes aos encontrados no feijão, diferentemente do

ferro e cobre que apresentam quantidades baixas quando comparadas a outros alimentos (OLIVEIRA et al., 1999).

Tsai, Tsai e Mau (2008) analisaram a composição do cogumelo do sol e encontraram 45,52% de carboidratos, 26,74% de proteínas e 2,62% de gordura. O teor de proteínas é superior ao do shiitake e de outras espécies de cogumelos como *Boletus edulis* (18,54%) e *Agrocybe cylindracea* (16,47%). Neste estudo, os autores também quantificaram, por meio de equação derivada de análise sensorial, a concentração equivalente de umami, encontrando, para o cogumelo do sol, 135,90 g/100 g de cogumelo, valor 2,9 vezes maior que o encontrado na espécie *A. cylindracea* e 13 vezes superior ao do *B. edulis*. Este resultado sugere o uso do cogumelo do sol como agente saborizante em alimentos.

Segundo Mizuno et al. (1990), o corpo de frutificação do *A. blazei* apresenta 6-8% de fibras, 5-7% de minerais e 3-5% de gordura, todos medidos em base seca. Contém ainda as vitamina B₁, B₂ e niacina.

Os cogumelos são produtos muito perecíveis e tendem a perder a qualidade logo após a colheita, já que perdem água causando encolhimento e diminuição de peso. Sua vida útil é de 1 a 3 dias na temperatura ambiente, 8 dias em atmosfera modificada (2-5% de O₂ e 3-8% de CO₂) a 3°C e 4 dias em atmosfera controlada (5% O₂ e 10% CO₂) a 2°C (SINGH, 2010).

2.2. Propriedades funcionais

Nos últimos anos, muita atenção tem sido dada aos efeitos fisiológicos provocados pelos alimentos devido à crescente preocupação dos consumidores com a saúde. Eles buscam substituir substâncias artificiais por fontes naturais de nutrientes como ervas e plantas, conhecidos como suplementos dietéticos, nutracêuticos e alimentos funcionais (ARIHARA, 2006).

Para um alimento ser considerado funcional ele deve ter efeitos positivos além do valor básico nutritivo, que pode aumentar o bem estar e a saúde e reduzir o risco de doenças, promovendo benefícios à saúde além de aumentar a qualidade de vida (MORAES; COLLA, 2006).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza que os cogumelos consumidos nas formas dessecadas, inteiras, fragmentadas, moídas

ou em conserva, são considerados alimentos (Resolução ANVS/MS nº 272/2005), enquanto que os cogumelos comercializados em forma de pó, cápsulas e comprimidos são considerados como novo alimento (Resolução ANVS/MS nº 19/2006). Para ambos os casos não são permitidas, em rótulos ou em qualquer outro tipo de material publicitário, alegações medicamentosas ou terapêuticas, prevenção, tratamento e cura de doenças (ANVISA, 2006).

De acordo com Moraes e Colla (2006), o termo nutracêutico define uma ampla variedade de alimentos e componentes alimentícios com apelo médico ou de saúde, sendo que tais produtos podem abranger nutrientes isolados. Os cogumelos podem ser considerados alimentos nutracêuticos porque estudos comprovam eficácia quando consumidos como suplementos dietéticos produzidos a partir da extração de princípios ativos (NOVAES; FORTES, 2005).

Alguns compostos derivados dos cogumelos são comercializados: Lentinan® (*Lentinula edodes*), Krestin® (*Trametes versicolor*), Reishi® (*Gonoderma lucidum*), Grifon® Maitake (*Grifola frondosa*) entre outros (NOVAES; FORTES, 2006).

Dentre os alimentos funcionais estão os prebióticos, definidos como oligossacarídeos fermentáveis que permitem alteração na composição e atividade da microbiota gastrointestinal conferindo benefícios à saúde como redução do câncer do cólon, queda da absorção de colesterol pela corrente sanguínea e queda na incidência de diabete (GIBSON et al., 2004). Os cogumelos são fontes de prebióticos porque contêm carboidratos como quitina, hemicelulose, β e α -glucanas, mananas, galactanas e xilanas. A quitina é um polissacarídeo insolúvel em água e, por não ser hidrolisada pelas enzimas do organismo humano, confere aos carboidratos de cogumelos, a característica de prebiótico (AIDA et al., 2009).

Neste contexto, os cogumelos têm sido utilizados no combate ao estresse físico e emocional, para estimular a imunidade, melhorar a qualidade de vida dos diabéticos, evitar riscos de doenças tais como a osteoporose e a úlcera gástrica e agir como antioxidante efetivo (GUTIERREZ et al., 2004). Porém, mais estudos sobre estas propriedades biológicas ainda são necessários.

2.3. Propriedades medicinais

Os cogumelos medicinais fazem parte da dieta suplementar dos chineses há mais de 2.000 anos. Seus compostos biológicos de interesse são extraídos e comercializados com o apelo de melhorar as funções biológicas do corpo humano (AIDA et al., 2009).

De acordo com Mahajna et al. (2009), os cogumelos possuem compostos como polissacarídeos, glicoproteínas e triterpenos. Dentre os polissacarídeos mais encontrados e estudados estão os grupos das β -glucanas. Pesquisas indicam que elas possuem propriedade de ativação do sistema imune, aumentando o teor de anticorpos e fortalecendo os mecanismos de defesa fisiológica (LEE et al., 2008; LIU et al., 2007). Para corroborarem com sua atividade antitumoral, as β -glucanas devem apresentar em sua estrutura ligações $\beta(1-3)$ e pontos de ramificações com ligações $\beta(1-6)$. A atividade antitumoral também dependerá da solubilidade das β -glucanas em água, tamanho das moléculas e número de ramificações (AIDA et al., 2009).

Além destes benefícios, Hearst et al. (2009) revelaram em seus estudos que o shiitake (*L. edodes*) e o cogumelo ostra (*P. ostreatus*) apresentaram propriedades antibacterianas e antifúngicas. O extrato de shiitake demonstrou maior atividade antimicrobiana quando comparado à ciprofloxacina, um quimioterápico sintético.

2.4. Propriedades antioxidantes

Os extratos de cogumelo também são estudados por apresentarem propriedades antioxidantes. Estudos feitos por Tsai et al. (2009) apontaram propriedade antioxidante para *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus ferulae* e *Clytocybe maxima*. Jayakumar, Thomas e Geraldine (2009) pesquisaram a atividade antioxidante do cogumelo ostra e demonstraram que na concentração de 10 mg/mL, o extrato etanólico de cogumelo ostra mostrou atividade antioxidante superior ao antioxidante sintético BHT.

Elmastas et al. (2007) analisaram os extratos metanólicos de várias espécies de cogumelos. Por apresentarem significativa atividade antioxidante *in vitro*, os autores sugerem que os cogumelos podem ser usados como fonte natural de antioxidantes, como suplemento alimentar ou na indústria farmacêutica,

sendo os compostos fenólicos os principais responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos.

A capacidade antioxidante, baseada no método de seqüestro do radical livre DPPH*, foi medida nas diversas espécies de cogumelos comercializados em Taiwan: *Dictyophora indusiata*, *Grigola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Tricholoma giganteum*. Em uma concentração de 6,4 mg/mL, o resultado encontrado foi 92,1% para a espécie *Dictyophora indusiata* e 63,2-67,8% para as demais. Essa atividade foi atribuída ao alto conteúdo de compostos fenólicos encontrado nos extratos metanólicos, já que para a espécie *Dictyophora indusiata*, não foi detectada a presença de tocoferóis (MAU; LIN; SONG, 2002).

Yang, Lin e Mau (2002) realizaram estudo com cogumelo shiitake desidratado e moído. No extrato metanólico, os autores encontraram teores de 0,12 mg/g de tocoferol e 6,27 mg/g de compostos fenólicos totais.

Componentes antioxidantes, incluindo tocoferóis e compostos fenólicos, foram quantificados em extratos etanólicos e aquosos de diferentes espécies: *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* e *Boletus edulis*. O conteúdo de compostos fenólicos totais variou de 5,67-5,81 mg/g e não apresentou diferença significativa entre as espécies e entre os extratos. No entanto, o conteúdo de tocoferóis variou de 5,27-6,18 mg/g nos extratos etanólicos e 3,18-4,4 mg/g nos extratos aquosos (TSAI; TSAI; MAU, 2007). Este estudo sugere que, além da quantidade de compostos antioxidantes variar de acordo com a espécie de cogumelo, o tipo de solvente utilizado na extração é um fator importante para a quantificação destes compostos, interferindo diretamente na atividade antioxidante de cada espécie.

Diversos trabalhos são dedicados à avaliação da eficácia antioxidante dos compostos químicos e extratos naturais. Por isso, é importante conhecer quais são os compostos de interesse e as melhores técnicas para isolá-los.

3. ANTIOXIDANTES

A formação de radicais livres está associada ao metabolismo normal do organismo. Estudos indicam correlação entre estes radicais e doenças degenerativas como o câncer. A ingestão de antioxidantes exógenos de fontes como frutas e vegetais pode minimizar a ação destes radicais livres e, conseqüentemente, reduzir os riscos destas doenças. Por isso, nos últimos anos,

o aumento do consumo de fontes naturais de antioxidantes e os estudos destes compostos têm sido observados (ALVAREZ-PARRILLA, 2007).

Para uma substância ser definida como antioxidante, deve prevenir ou retardar a oxidação mesmo estando em baixa concentração relativamente ao substrato a ser oxidado e, além disso, deve formar radicais estáveis após a reação (BORGUINI; TORRES, 2006).

Dentre os antioxidantes naturais destacam-se os compostos fenólicos, tocoferóis e carotenóides, todos com propriedades redutoras, além de ações biológicas importantes como seqüestro de radicais livres, quelantes de metais e inibição da oxidação do LDL (ALVAREZ-PARRILLA, 2007).

Nos últimos anos, a suspeita dos efeitos tóxicos de alguns compostos sintéticos usados em alimentos fez crescer o interesse em produtos naturais. Algumas indústrias, como as produtoras de aditivos alimentares, farmacêuticas e cosméticas, têm investido em pesquisas de compostos bioativos extraídos e purificados de fontes naturais (BARROS et al., 2007).

3.1. Classificação e mecanismo de ação

Antioxidantes são compostos com potencial de neutralizar os radicais livres, retardando ou inibindo a ação de oxidação. Os antioxidantes estão em constante atividade nos organismos vivos, necessitando estar em quantidades suficientes para neutralizar os efeitos tóxicos dos radicais livres que são constantemente produzidos (DUBOST; OU; BEELMAN, 2007).

O antioxidante para ser empregado em alimentos, além de ser efetivo em baixa concentração, deve atender aos seguintes requisitos: ser compatível com o substrato; não conferir odor ou sabor estranho ao produto; ser efetivo durante o período de estocagem do produto alimentício; ser estável ao processo de aquecimento e ser facilmente incorporado ao alimento (MELO; GUERRA, 2002).

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos por meio de dois mecanismos. Neste sentido, são classificados em primários e secundários (SOARES, 2002). Os antioxidantes primários, representados pelos compostos fenólicos, podem atuar de duas formas: pelo mecanismo de transferência de hidrogênio ou pelo mecanismo de transferência de elétrons. A

Figura 1 representa o mecanismo de transferência de hidrogênio dos antioxidantes primários.

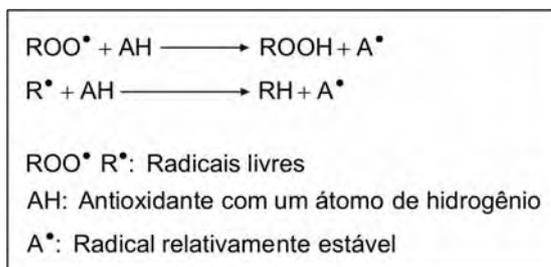


Figura 1 – Mecanismo de ação dos antioxidantes primários.

Dentre os antioxidantes primários, destacam-se o butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), galato de propila (GP), *terc* butil hidroquinona (TBHQ), e tocoferóis (DUBINSKY, 2000). Os radicais livres R[•] e ROO[•] seqüestram com maior facilidade o átomo de hidrogênio ativo do antioxidante do que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas. Desta forma, formam-se espécies inativas para a reação em cadeia (ROOH e RH) e um radical (A[•]) que não apresenta capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas (ARAÚJO, 2006).

Os antioxidantes secundários retardam a reação de autooxidação por meio da complexação de metais, remoção de oxigênio, decomposição dos hidroperóxidos com formação de compostos mais estáveis e regeneração dos antioxidantes primários. Os agentes quelantes, como o ácido cítrico, seqüestram íons metálicos como cobre e ferro que catalisam a oxidação lipídica. Já os removedores de oxigênio, como o ácido ascórbico, são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio através de reações químicas tornando-o indisponível para propagar a autooxidação (GORDON, 1990).

3.2. Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos mais usados na indústria de alimentos são: BHA, BHT, TBHQ e GP. Eles apresentam estrutura fenólica (Figura 2) e, portanto, reduzem a propagação da reação de oxidação. Não possuem cor, sabor nem

odor e perdem sua atividade antioxidante em temperaturas elevadas tais como as de fritura, 180°C (ZHANG; WU; WENG, 2004).

O BHA é um antioxidante mais efetivo na redução da oxidação de gorduras animais que de óleos vegetais e apresenta pouca estabilidade frente a elevadas temperaturas (JORGE, 2009).

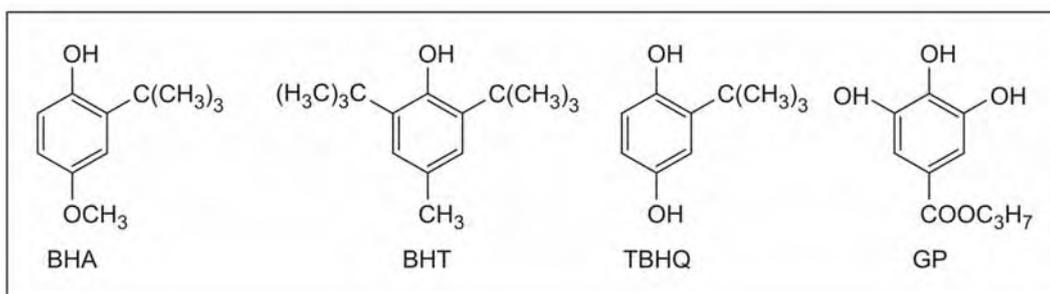


Figura 2 – Estrutura dos antioxidantes sintéticos.

O BHT tem qualidades similares ao BHA como solubilidade em gorduras animais e óleos vegetais e pouca resistência a elevadas temperaturas. Seu odor é um pouco desagradável (ORDÓÑEZ et al., 2005).

O TBHQ é muito efetivo na estabilização de óleos e gorduras, especialmente em óleos vegetais poliinsaturados. Os dois grupos hidroxila na posição *para* são responsáveis pela atividade antioxidante. É estável à temperatura elevada e menos volátil que o BHA e o BHT, sendo considerado o melhor antioxidante para óleos de fritura e produtos fritos. É ligeiramente solúvel em água (ARAÚJO, 2006).

O GP é pouco eficiente para alimentos que sofrem tratamentos térmicos porque não é resistente ao calor. Quando usado em níveis elevados pode atuar como pró-oxidante (RAMALHO; JORGE, 2006).

Nos últimos anos, pesquisas têm demonstrado efeitos toxicológicos decorrentes da ingestão diária dos antioxidantes sintéticos. Estudos têm demonstrado que os antioxidantes sintéticos BHA e BHT podem causar tumores em animais. O GP pode provocar anemia, retardo no crescimento e hiperplasia no estômago. O TBHQ demonstrou potencial mutagênico em determinados ensaios (ZHANG; WU; WENG, 2004).

Por isso, o consumo destes antioxidantes é restrito. No Brasil, o uso é controlado pelo Ministério da Saúde que limita as concentrações máximas de 200 mg/kg tanto para BHA quanto para TBHQ e de 100 mg/kg para BHT e GP, sendo obrigatória a declaração do uso no rótulo (BRASIL, 2001). O TBHQ não é permitido no Canadá e Comunidade Econômica Européia. O *Codex Alimentarium* limita em 200 mg/kg o uso de BHT e TBHQ em óleos vegetais (FAO, 2010).

Com a finalidade de minimizar os efeitos negativos causados pelos antioxidantes sintéticos, os pesquisadores procuram encontrar produtos naturais com atividade antioxidante que poderão substituir os sintéticos ou se associarem a eles com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos. As pesquisas estão voltadas para os compostos fenólicos de origem vegetal (SOARES, 2002).

3.3. Antioxidantes naturais

Do ponto de vista químico, os antioxidantes naturais assemelham-se aos sintéticos por apresentarem estruturas fenólicas, moléculas que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos que interagem com radicais livres e são consumidas durante a reação (LEE et al., 2008). Muitos pesquisadores têm se dedicado à busca de compostos naturais a partir de subprodutos como bagaços de uva (LAFKA; SINANOGLU; LAZOS, 2007; PINELO et al., 2005), casca de laranja (XU et al., 2008), casca de romã (LI et al., 2006) e carambola (SHUI; LEONG, 2006).

Dentre os antioxidantes naturais destacam-se os ácidos fenólicos, os flavonóides e os tocoferóis.

3.3.1. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupos hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes para os alimentos. Eles são divididos em dois grupos (Figura 3). O primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza e dentre os quais se destacam o ácido siríngico, gálico e vanílico. O segundo grupo é formado pelos ácidos cinâmicos, com nove átomos

de carbono (C6-C3), dentre os quais encontram-se os ácidos o-cumárico, p-cumárico, ácido caféico, ferúlico e sináptico (SOARES, 2002).

Marinova e Yanishlieva (1992) fizeram uma comparação quantitativa do comportamento cinético da inibição da oxidação de alguns ácidos fenólicos. Concluíram que, no caso dos ácidos benzóicos, a hidroxila presente na molécula do ácido *p*-hidroxibenzóico não confere a este nenhuma propriedade antioxidante. Já a metoxila presente com a hidroxila no ácido vanílico confere a ele uma pequena atividade antioxidante. No caso do ácido siríngico, o qual possui dois grupamentos de metoxila, a ação é ainda maior.

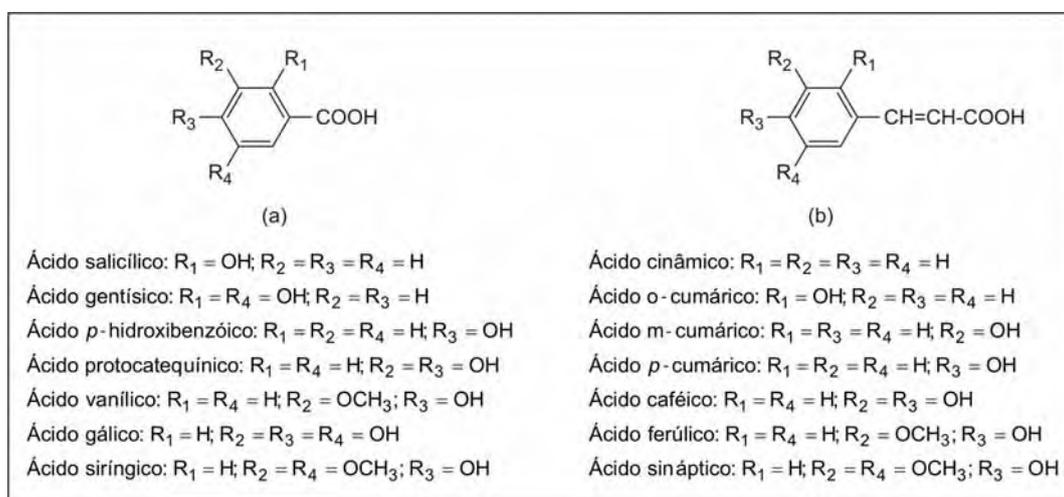


Figura 3 – Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).

Com relação aos ácidos cinâmicos, a presença de uma metoxila adjacente à hidroxila, como ocorre no ácido ferúlico, aumenta o poder antioxidante do composto. Essa atividade é ainda maior com a presença de dois radicais metoxilas, como ocorre no ácido sináptico. Entretanto, o maior potencial antioxidante foi encontrado quando há duas hidroxilas nas porções 2 e 3, estrutura apresentada pelo ácido caféico. Portanto, a atividade antioxidante dos compostos estudados pelos autores possui a seguinte ordem: ácido caféico > sináptico > siríngico > ferúlico > vanílico.

3.3.2. Flavonóides

Os flavonóides possuem uma estrutura básica formada por C6-C3-C6, sendo os compostos mais diversificados do reino vegetal (Figura 4). Os flavonóides dividem-se em 14 classes, sendo que os que se incluem na dieta humana são divididos em 6 grupos: flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanóis, flavonóis e antocianidinas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula (BORGUINI; TORRES, 2006).

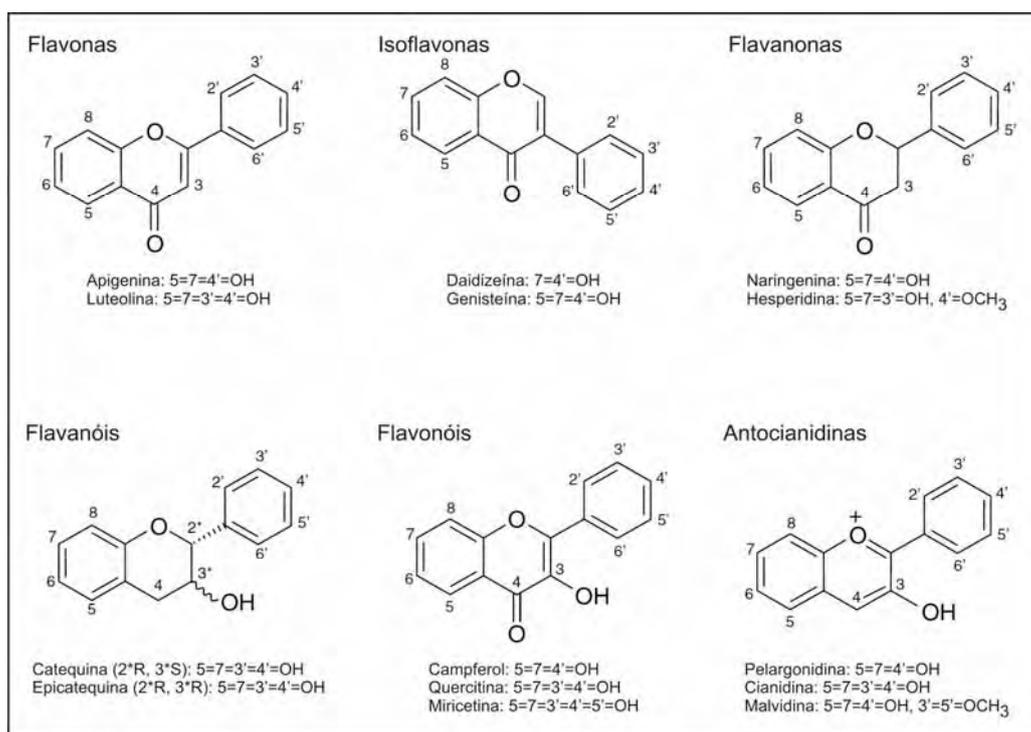


Figura 4 – Principais flavonóides encontrados no reino vegetal.

A posição e o número de hidroxilas presentes na molécula são responsáveis pela atividade antioxidante desses compostos. Os flavonóides atuam como antioxidantes primários, reagindo com radicais livres, e também como quelante de metais, a exemplo dos flavonóis. A ação quelante dos flavonóis deve-se à presença da hidroxila do carbono 3 e do grupo carbonila do carbono 4 do anel pirano. A quercitina, que possui hidroxilas nas posições 5, 7, 3' e 4', apresenta maior atividade antioxidante se comparada ao campferol, que possui hidroxilas somente nas posições 5, 7 e 4' (MELO; GUERRA, 2002).

Os flavonóides são polifenóis bioativos que contribuem para a prevenção da aterosclerose e do câncer, além de possuírem ação protetora contra a oxidação *in vitro* da LDL (HOLLMAN; KATAN, 1999).

3.3.3. Tocoferóis

Ao contrário dos flavonóides, os tocoferóis apresentam estrutura monofenólica. Exibem atividade antioxidante e de vitamina E. São agrupados em duas séries de compostos que possuem estrutura química semelhante e recebem o nome genérico de tocóis e tocotrienóis (Figura 5).

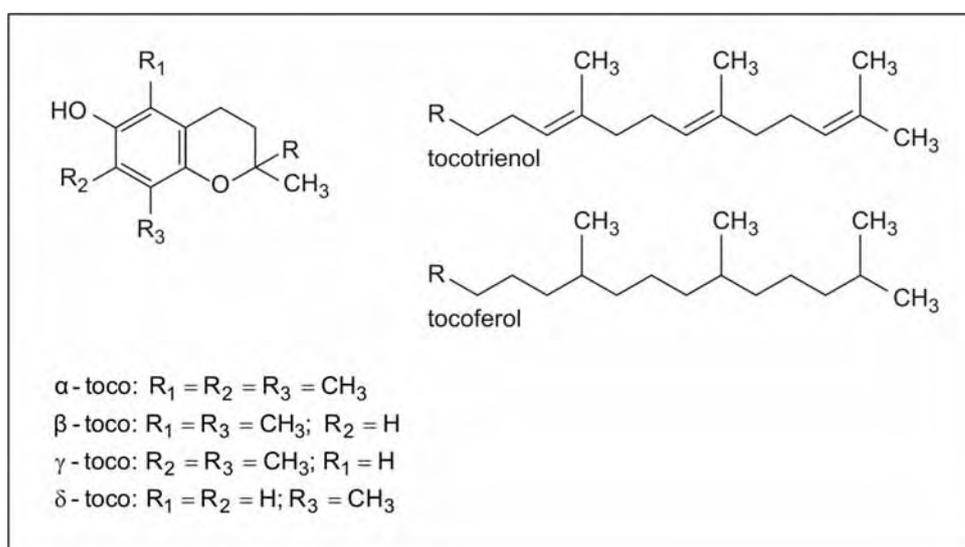


Figura 5 – Estrutura química do tocoferol e tocotrienol.

Os tocóis possuem cadeia saturada ligada ao anel e são denominados tocoferóis. Já os tocotrienóis possuem cadeia insaturada. Os tocoferóis atuam como antioxidantes primários e a atividade antioxidante decresce do composto δ para o α -tocoferol, sendo que o β e γ -tocoferol apresentam atividades intermediárias (HEMEDA; KLEIN, 1990; SIX, 1994).

A atividade antioxidante dos tocoferóis depende do tipo de alimento a que foi adicionado, da concentração usada, da presença de metais e de compostos sinérgicos. Em elevadas concentrações e na presença de traços de ferro e de sais de cobre, os tocoferóis podem atuar como pró-oxidantes. Apresentam atividade antioxidante satisfatória quando usados em sinergia com ácido

ascórbico, ácido cítrico, agentes quelantes ou antioxidantes sintéticos (POKORNÝ, 1991).

4. MÉTODOS *IN VITRO* PARA AVALIAR A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Vários métodos analíticos têm sido propostos para determinar a atividade antioxidante total de extratos naturais, com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante das amostras utilizando diferentes sistemas *in vitro*.

Segundo Niki (2002), para se mensurar a atividade antioxidante dois pontos devem ser observados: (a) a eficiência do seqüestrador de radicais livres, que é determinada não apenas pela reatividade do antioxidante com o radical livre, mas também pela sua concentração; (b) a eficácia do seqüestrador do radical livre depende da localização do antioxidante no substrato. Por exemplo, a vitamina C é um potente seqüestrador de radical hidrofílico, mas não de radical lipofílico. Normalmente são utilizados métodos indiretos que medem a capacidade de uma molécula em reduzir um radical livre.

O método da atividade antioxidante pela captação do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi inicialmente proposto por Blois (1958), e tem sido amplamente utilizado para se determinar a atividade antioxidante de alimentos (LEE et al., 2008; SOARES et al., 2009; TSAI et al., 2009).

O radical livre disponível comercialmente DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é solúvel em metanol e apresenta coloração violeta. Quando um antioxidante é misturado à solução metanólica de DPPH•, o radical livre é reduzido e, com isso, a coloração da solução muda de violeta para amarela. Essa mudança é medida espectrofotometricamente em 515 nm, indicando a eficiência do antioxidante adicionado em remover o radical (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER; BERSSET, 1995). Trata-se de um método rápido, que não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação.

Portanto, o efeito dos antioxidantes sobre o seqüestro do radical DPPH• é atribuído à habilidade destes compostos de doar hidrogênio.

O método β -caroteno/ácido linoléico consiste na descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico. Estima a habilidade dos compostos antioxidantes dos extratos naturais de seqüestrar o radical peróxido do ácido linoléico (LOO•), que oxida o β -caroteno

presente em uma emulsão. Como não ocorre a altas temperaturas, pode ser utilizado para determinar a atividade antioxidante de compostos termolábeis. A determinação é feita espectrofotometricamente em 470nm (BORGUINI; TORRES, 2006).

Segundo Silva, Borges e Ferreira (1999), a ausência de correlação entre os diferentes métodos deve-se, por um lado, aos indicadores usados na avaliação da atividade antioxidante, os quais não refletem o mesmo estado de evolução do processo oxidativo e, por outro, às condições experimentais em que se efetuam as avaliações, como temperatura, presença de catalisadores metálicos, exposição à luz e solventes envolvidos na reação.

5. MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA

A oxidação lipídica é um fenômeno complexo induzido pelo oxigênio na presença de iniciadores como calor, radicais livres, luz, pigmentos fotossensíveis e íons metálicos (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

A avaliação do estado de oxidação é uma determinação importante em nível industrial porque controla e garante a qualidade das matérias-primas e dos produtos comercializados. Vários métodos estão descritos, sendo que cada um fornece um estado particular de processo oxidativo, variável em função das condições aplicadas e dos substratos lipídicos usados. Existem dois modos de avaliação: (a) testes de estabilidade em tempo real que ocorrem em condições normais de armazenamento; (b) testes de estabilidade acelerados que ocorrem em condições padronizadas de oxidação. A segunda forma permite estimar, de forma rápida, a estabilidade oxidativa de um óleo vegetal ou a eficácia de um antioxidante. Uma vez que os fenômenos naturais de oxidação são muito lentos, os testes de estabilidade acelerada assumem maior importância analítica (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Para se avaliar os primeiros estados do processo oxidativo faz-se a determinação do índice de peróxidos, expresso em miliequivalentes de oxigênio ativo por kg de matéria graxa. Um baixo nível de peróxidos não indica uma garantia de boa estabilidade oxidativa, uma vez que estes compostos são degradados ao longo do processo de oxidação, podendo, pelo contrário, ser sinônimo de alteração pronunciada. Para acelerar a produção de peróxidos é

comum o uso do teste de estufa, que consiste no aquecimento da amostra a 60-70°C em estufa até o aparecimento dos primeiros sinais da oxidação. As amostras são examinadas periodicamente verificando-se o estado de oxidação do produto sensorialmente ou pelo índice de peróxidos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Assim como os peróxidos, os dienos conjugados são produtos primários da oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados formados pelo deslocamento de duplas ligações. Os dienos conjugados absorvem a 232 nm, enquanto os produtos secundários a 272 nm. Esta diferença permite diferenciar estados de evolução oxidativa com base na relação $A_{272 \text{ nm}}/A_{232 \text{ nm}}$. Quanto menor o valor da razão, mais elevado será o conteúdo em peróxidos, correspondendo, portanto, ao início da oxidação. Pelo contrário, quanto maior a razão, maior será o teor de produtos secundários presentes (HAMILTON et al., 1983).

Para a avaliação dos produtos secundários da oxidação, um dos testes utilizados é o teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído (MA), um aldeído com três átomos de carbono (ST. ANGELO, 1996). Neste ensaio, a molécula de MA reage com duas moléculas de TBA para formar um complexo de cor vermelha, que absorve em 532-535 nm. A reação ocorre em meio ácido (pH 1,0-2,0) a alta temperatura (100°C) para aumentar a rapidez da reação e sua sensibilidade. Os resultados são expressos em “valor de TBA”, definido como o peso, em mg, de MA por kg de amostra (JORGE, 2009).

A decomposição de produtos primários da oxidação pode levar à formação de compostos voláteis como hidrocarbonetos e aldeídos. A determinação destes compostos voláteis pode ser feita por meio do Rancimat, que mede as variações da condutividade da água destilada. Neste aparelho, o fluxo de ar passa através da amostra de óleo, mantido sob aquecimento, arrastando os compostos voláteis gerados do processo de oxidação, que se solubilizam em água destilada aumentando sua condutividade elétrica (ANTONIASSI, 2001).

6. EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS

Dentre os métodos mais utilizados para a extração de compostos antioxidantes está a utilização de solventes de diferentes polaridades, como água, etanol, éter de petróleo, metanol e suas misturas, que permitem a obtenção de compostos com atividade antioxidante. No entanto, outras técnicas como a extração supercrítica, têm sido sugeridas por melhorar a qualidade dos extratos e reduzir a quantidade de solventes orgânicos (LEAL et al., 2003; REHMAN; HABIB; SHAH, 2004). Devido à sua baixa viscosidade e alta capacidade de difusão, os fluidos supercríticos podem se difundir através dos materiais sólidos, resultando em melhores rendimentos nas extrações. A extração supercrítica representa uma alternativa viável para a extração porque produz extratos livres de resíduos e pode ser conduzida em baixas temperaturas, preservando a qualidade de compostos termo-sensíveis. Porém, o grande inconveniente da extração supercrítica reside na alta pressão necessária para a operação que requer equipamentos excessivamente caros, elevando o custo final do produto (ANDREO; JORGE, 2006).

Kitzberger et al. (2007) compararam os extratos de shiitake obtidos por extração supercrítica e da extração com solventes, n-hexano, diclorometano, acetato de etila e água. Os melhores rendimentos ocorreram para as fases n-hexano e aquosa, 1,25 e 0,94%, respectivamente, valores próximos aos da extração supercrítica a 30°C/300 bar e 40°C/300 bar que foram de 0,96 e 1,00%, respectivamente.

O rendimento da extração de compostos antioxidantes a partir de fontes naturais é influenciado principalmente pelas condições em que o processo de extração sólido-líquido é realizado. Como cada fonte natural tem características únicas em termos de estrutura e composição, quando combinada com solventes o resultado da interação soluto-solvente tem comportamento imprevisível (SOUSA et al., 2008).

Além do solvente, outros fatores podem contribuir para a eficiência do processo de extração. Por exemplo, altas temperaturas são relatadas para melhorar a eficiência da extração, devido à maior taxa de difusão e solubilidade dos analitos em solventes, embora temperaturas elevadas também possam afetar a atividade dos extratos devido à degradação dos compostos antioxidantes. Desta forma, as extrações de compostos antioxidantes são conduzidas, de maneira geral, entre 20 e 60 °C (PINELO et al., 2005).

Segundo Spigno, Tramelli e De Faveri (2007), a cinética de extração acontece em dois estágios. O primeiro, mais rápido, envolve a transferência direta do soluto da superfície da matéria-prima; o segundo estágio corresponde à difusão molecular do soluto do interior da matéria-prima para o solvente, que acontece de maneira mais lenta. Os fatores que interferem nestes estágios são: coeficiente de difusão, coeficiente de partição dos componentes extraídos do sólido para o solvente, o tipo de solvente, assim como seu volume, tamanho e geometria das partículas sólidas.

Para maximizar o processo de extração e conservar os compostos antioxidantes, é importante que algumas etapas preliminares sejam realizadas (CHEUNG; GHEUNG; OOI, 2003; CHOI et al. 2006; KITZBERGER et al., 2007; TSAI; TSAI; MAU, 2007). Nestes estudos, os cogumelos foram desidratados e moídos antes da extração, aumentando, assim, a superfície de contato com o solvente.

Para o isolamento de compostos antioxidantes naturais obtidos de frutas, sementes e especiarias, faz-se necessária a extração com solventes de polaridades diferentes. Julkunen-Tiitto (1985) alega que alimentos com predominância de compostos fenólicos apresentam maior rendimento no processo de extração com solventes polares, devido à solubilidade.

Os compostos antioxidantes possuem polaridade bem variada. Por isso, não existe sistema de extração com solvente que seja totalmente satisfatório para o isolamento de todos os antioxidantes naturais.

Substâncias com atividade biológica normalmente estão presentes em plantas e cogumelos e, portanto, o uso de técnicas de extração é importante para selecionar estas substâncias ou grupos de componentes de interesse.

Cheung, Cheung e Ooi (2003) investigaram a atividade antioxidante e os compostos fenólicos de extratos de diversos cogumelos, dentre eles o shiitake. Para a obtenção do extrato utilizaram solventes com os seguintes resultados de rendimento: metanol (33,5%), água (16,2%), acetato de etila (3,65%) e éter de petróleo (2,4%), comprovando a eficiência dos solventes de maior polaridade.

Em estudos realizados com a variedade cogumelo do sol, Tsai, Tsai e Mau (2007) avaliaram o rendimento da extração, a atividade antioxidante e o teor de fenóis totais no extrato. A extração foi realizada com água quente para simular a infusão de chá e com etanol. O extrato aquoso apresentou rendimento de 47%

e o extrato etanólico 16%, comprovando a eficiência do solvente mais polar. Em relação à atividade antioxidante, o extrato etanólico foi mais eficiente que o aquoso. Portanto, apesar do rendimento do extrato aquoso ter sido maior, a extração etanólica conseguiu retirar do cogumelo os compostos fenólicos com maior poder antioxidante.

Com base nestes estudos, conclui-se que a solubilidade em um determinado solvente é uma característica de cada composto, o que explica a inexistência de um único método universal, para a separação de todos os antioxidantes naturais. Além da solubilidade dos compostos fenólicos variar de acordo com a polaridade do solvente, o grau de polimerização dos fenólicos e suas interações com outros constituintes dos alimentos, também interferem no grau de obtenção destes compostos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os cogumelos são fonte de proteínas, vitaminas, minerais e, sobretudo, de compostos bioativos como os compostos fenólicos. Estes compostos conferem aos cogumelos propriedades antioxidantes para agir em sistemas lipídicos, mesmo que estes sejam submetidos a processos de estresse oxidativo. A obtenção dos compostos antioxidantes dependerá dos métodos de extração e do solvente utilizado, sendo necessário o conhecimento das técnicas disponíveis para otimizar o processo.

8. REFERÊNCIAS BOBLIOGRÁFICAS

AIDA, F. M. N. A. et al. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 20, n. 11-12, p. 567-575, 2009.

ALVAREZ-PARRILLA, E. et al. Total phenols and antioxidant activity of commercial and wild mushrooms from Chihuahua, Mexico. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, Reynosa, v. 5, n. 5, p. 329-334, 2007.

ANDERSON, D.; PHILLIPS, J. B. Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 37, n. 9-10, p. 1015-1025, 1999.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Antioxidant evaluation of extract and ascorbyl palmitate in sunflower oil under thermoxidation. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, Chicago, v. 85, n. 11, p. 1045-1049, 2008.

ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 353-380, 2001.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Informe técnico 19**. Brasília, 2006. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/19_300806.htm> Acesso em 27 Jun. 2009.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3ª ed., Viçosa: UFV, 2006. 478 p.

ARIHARA, K. Strategies for designing novel functional meat products. **Meat Science**, Barking, v. 74, n. 1, p. 219-229, 2006.

BARROS, L. et al. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, London, v. 103, n. 2, p. 413-419, 2007.

BERA, D.; LAHIRI, D.; NAG, A. Studies on a natural antioxidant for stabilization of edible oil and comparison with synthetic antioxidants. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 74, n. 4, p. 542-545, 2006.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, n. 118, p. 1199-1200, 1958.

BORGUINI, R. G.; TORRES, E. F. S. Tomatoes and tomato products as dietary sources of antioxidants. **Food Reviews International**, New York, v. 25, n. 4, p. 313-325, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie – Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 04/88. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO, **Compêndio da Legislação de Alimentos**. São Paulo: ABIA, 2001. v. 1, p. 3-26.

CHANG, R. Functional properties of edible mushrooms. **Nutrition Reviews**, Washington, v. 54, n. 11, p. 91-93, 1996.

CHEUNG, L. M.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, V. E. C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushrooms extracts. **Food Chemistry**, London, v. 81, n. 2, p. 249-255, 2003.

CHOI, Y. et al. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. **Food Chemistry**, London, v. 99, n. 2, p. 381-387, 2006.

DUBINSKY, E. Utilización de antioxidantes en aceites y grasas. **Aceites y Grasas**, Sevilla, v. 12, n. 1, p. 191-199, 2000.

DUBOST, N. J.; OU, B.; BEELMAN, R. B. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushroom and correlation to total antioxidant capacity. **Food Chemistry**, London, v. 105, n. 2, p. 727-735, 2007.

ELMASTAS, M. et al. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Compounds and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 3-4, p. 337-345, 2007.

FAO – **Food and Agriculture Organization** Disponível em: <<http://www.fao.org/corp/statistics/en/>>. Acesso em: 28 dez. 2009.

FAO – **Food and Agriculture Organization**. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/additives/details.html?id=189>>. Acesso em: 02 maio 2010.

FERREIRA, J. E. **Produção de cogumelos**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 1998. 135 p.

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

GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 259-275, 2004.

GORDON, M. H. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In: HUDSON, B. J. F. (Ed.). **Food antioxidants**. London: Elsevier Applied Science, 1990. p. 1-18.

GUTIERREZ, Z. R. et al. Variation of antimutagenicity of water extracts of *Agaricus blazei* Murril *in vitro*. **Toxicology in vitro**, Oxon, v. 18, n. 3, p. 301-309, 2004.

HAMILTON, R. J. et al. **Rancidity in Foods**. Ed. Applied Science Publishers LTD.; London, 1983, p. 1.

HEARST, R. et al. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of shiitake (*Lentinus edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushroom. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, Macclesfield, v. 15, n.1, p. 5-7, 2009.

HEMEDA, H. M.; KLEIN, B. P. Effects of naturally antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 1, p. 184-185, 1990.

HOLLMAN, P. C. H. C.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 937-942, 1999.

IQBAL, S.; BHANGER, M. I. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 1, p. 246-254, 2007.

JAYAKUMAR, T.; THOMAS, P. A.; GERALDINE, P. *In vitro* antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Essex, v. 10, n. 2, p. 228-234, 2009.

JORGE, N. **Química e tecnologia de óleos vegetais**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2009. 165 p.

JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 33, n. 2, p. 213-217, 1985.

KANENO, R. et al. Effects of extract from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of ehrlich tumor-bearing mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 42, n. 16, p. 909-916, 2004.

KITZBERGER, C. S. G. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extract obtained by organic solvents and supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 80, n. 2, p. 631-638, 2007.

LAFKA, T. I.; SINANOGLU, V.; LAZOS, E. S. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes, **Food Chemistry**, London, v. 104, n. 3, p. 1206-1214, 2007.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 244-282, 2007.

LEAL, P. F. et al. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 9, p. 2520-2525, 2003.

LEE, I. P. et al. Lack of carcinogenicity of lyophilized *Agaricus blazei* Murill in a F344 rat two year bioassay. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 87-95, 2008.

LI, Y. et al. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. **Food Chemistry**, London, v. 96, n. 2, p. 254-260, 2006.

LIU, C. H. et al. Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 67, n. 3, p. 313-318, 2007.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Ação antioxidante do extrato de semente de limão (*Citrus lemon*) adicionado ao óleo de soja sob termoxidação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 219-223, 2009.

MAHAJNA, J. et al. Pharmacological values of medicinal mushrooms for prostate cancer therapy: the case of *Gonoderma lucidum*. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 61, n. 1, p. 16-26, 2009.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. Inhibited oxidation of lipids II: Comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 94, n. 11, p. 428-432, 1992.

MATTILA, P. et al. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 5, p. 2343-2348, 2001.

MAU, J. L.; LIN, H. C.; SONG, S. F. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. **Food Research International**, Toronto, v. 35, n. 6, p. 519-526, 2002.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MIZUNO, T. et al. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokio, v. 54, n. 11, p. 2889-2896, 1990.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

NIKI, E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly? **Journal Nutrition**, Burbank, v. 18, n. 6, p. 524-525, 2002.

NOVAES, M. R. C. G.; FORTES, R. C. Efeitos antitumorais de cogumelos comestíveis da família agaricaceae. **Nutrição Brasil**, São Paulo, v. 4, n. 4, p. 207-217, 2005.

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

OLIVEIRA, E. C. M. et al. Composição centesimal do cogumelo do sol (*Agaricus blazei*). **Revista da Universidade de Alfenas**, Alfenas, v. 5, n. 1, p. 169-172, 1999.

ORDÓÑEZ, J. A. P. et al. **Tecnologia de alimentos**: componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artmed, 2005. 294 p.

PINELO, M. et al. Effect of solvent, temperature and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 2111-2117, 2005.

POKORNÝ, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 2, n. 9, p. 223-227, 1991.

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

REHMAN, Z.; HABIB, F.; SHAH, W. H. Utilization of potato peels extract as a natural antioxidant in soy bean oil. **Food Chemistry**, London, v. 85, n. 2, p. 215-220, 2004.

SAMPAIO, S. M.; QUEIROZ, M. R. Influência do processo de secagem na qualidade do cogumelo shiitake. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 570-577, 2006.

SANCHEZ, C. Mini review: modern aspects of mushroom culture technology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, n. 1, p. 756-762, 2004.

SHUI, G.; LEONG, L. P. Residue from star as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. **Food Chemistry**, London, v. 97, n. 2, p. 277-284, 2006.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SINGH, P. et al. Recent advances in extending the shelf life of fresh *Agaricus* mushrooms: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, n.8, p.903-911, 2010.

SIX, P. Current research in natural food antioxidants. **Food Technology**, Chicago, v. 5, n. 6, p. 679-687, 1994.

SOARES, A. A. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. **Food Chemistry**, London, v. 112, n. 4, p. 775-781, 2009.

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

SOUSA, A. et al. Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives "alcaparras". **Lebensmittel Wissenschaft Technologie – Food Science and Technology**, London, v. 41, n. 1, p. 739-745, 2008.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 81, n. 1, p. 200-208, 2007.

ST. ANGELO, A. J. Lipid oxidation on foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 36, n. 3, p. 175-224, 1996.

TSAI, S. Y. et al. Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. **Food Chemistry**, London, v. 113, n. 2, p. 578-584, 2009.

TSAI, S. Y.; TSAI, H.; MAU, J. L. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie – Food Science and Technology**, London, v. 40, n. 8, p. 1392-1402, 2007.

TSAI, S. Y.; TSAI, H.; MAU, J. L. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. **Food Chemistry**, London, v. 107, n. 3, p. 977-983, 2008.

WONG, J. Y.; CHYE, F. Y. Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 22, n. 4, p. 269-277, 2009.

XU, G. H. et al. Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 1, p. 11-18, 2008.

YANG, J. H.; LIN, H. C.; MAU, J. L. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. **Food Chemistry**, London, v. 77, n. 2, p. 229-235, 2002.

ZHANG, C. X.; WU, H.; WENG, X. C. Two novel synthetic antioxidants for deep frying oils. **Food Chemistry**, London, v. 84, n. 2, p. 219-222, 2004.

Capítulo 2

Propriedades antioxidantes dos extratos de shiitake (*Lentinus edodes*) e cogumelo do sol (*Agaricus blazei*)

RESUMO

O presente trabalho teve como principais objetivos conhecer a atividade antioxidante de duas variedades de cogumelo: shiitake (*Lentinus edodes*) e cogumelo do sol (*Agaricus blazei*), medir o teor de compostos fenólicos totais e avaliar a estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado dos extratos que apresentaram maior atividade antioxidante, conforme os métodos do radical livre DPPH[•] e do sistema β -caroteno/ácido linoléico. Os extratos de cogumelos foram obtidos sob diferentes condições: solventes de diferentes polaridades e dois tipos de extração, lenta (*shaker*, 3 horas, 120 rpm) e rápida (liquidificador, 30 minutos). Os solventes de diferentes polaridades utilizados foram: água, metanol:água (1:1), etanol:água (1:1), metanol e etanol. Os extratos metanólicos, de ambas as variedades, independente do tipo de extração, apresentaram maior atividade antioxidante. De acordo com o método DPPH[•], os extratos de shiitake e cogumelo do sol apresentaram atividades antioxidantes máximas de 92,84% (2,5 mg/mL) e 95,10% (0,5 mg/mL), respectivamente, ambos obtidos em extração rápida. Para o sistema β -caroteno/ácido linoléico, os valores máximos de atividade antioxidante foram 93,06% para o extrato de shiitake (20 mg/mL) e 78,96% para o de cogumelo do sol (16 mg/mL) quando obtidos em extração lenta. Os teores de compostos fenólicos totais, determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, variaram de 7,21 a 128,44 e 26,67 a 134,67 mg EAG/g para os extratos de shiitake e cogumelo do sol, respectivamente. A estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado dos extratos metanólicos da extração lenta de shiitake e cogumelo do sol foi medida por meio do Rancimat, sendo que a concentração de extrato mais eficiente foi de 3.500 mg/kg, com um período de indução médio de 19,85 horas. Estes resultados evidenciam que os extratos metanólicos de shiitake e cogumelo do sol apresentaram atividade antioxidante podendo ser aplicados em óleo de soja.

Palavras-chave: cogumelos, antioxidantes naturais, compostos fenólicos, estabilidade oxidativa

1. INTRODUÇÃO

A formação de radicais livres está associada ao metabolismo normal do organismo. Estudos indicam a correlação entre estes radicais e doenças degenerativas como o câncer. A ingestão de antioxidantes exógenos de fontes como frutas e vegetais pode, minimizar a ação destes radicais livres e, conseqüentemente, reduzir os riscos destas doenças (ALVAREZ-PARRILLA et al., 2007).

Pesquisas têm demonstrado efeitos toxicológicos decorrentes da ingestão diária dos antioxidantes sintéticos (HAKKIM; SHANKAR; GIRIJA, 2007; ZHANG, et al., 2010). Com a finalidade de minimizar os efeitos negativos causados por estes compostos, pesquisadores procuram encontrar produtos naturais com atividade antioxidante que poderão substituir os sintéticos ou se associarem a eles com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos. As pesquisas estão voltadas para os compostos fenólicos de origem vegetal (SOARES, 2002).

Elmastas et al. (2007) analisaram os extratos metanólicos de várias espécies de cogumelos. Por apresentarem significativa atividade antioxidante *in vitro*, os autores sugerem que os cogumelos podem ser usados como fonte natural de antioxidantes, como suplemento alimentar ou na indústria farmacêutica, sendo os compostos fenólicos os principais responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos.

Vários métodos analíticos têm sido propostos para determinar a atividade antioxidante total de extratos naturais, com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante das amostras utilizando diferentes sistemas *in vitro*.

Segundo Niki (2002), para se mensurar a atividade antioxidante dois pontos devem ser observados: (a) a eficiência do seqüestrador de radicais livres, que é determinada não apenas pela reatividade do antioxidante com o radical livre, mas também pela sua concentração; (b) a eficácia do seqüestrador do radical livre depende da localização do antioxidante no substrato. Por exemplo, a vitamina C é um potente seqüestrador de radical hidrofílico, mas não para o radical lipofílico.

O método da atividade antioxidante pela captação do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi inicialmente proposto por Blois (1958), e tem sido

amplamente utilizado para se determinar a atividade antioxidante de alimentos (LEE et al., 2008; SOARES et al., 2009; TSAI et al., 2009).

O radical livre DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), disponível comercialmente, é solúvel em metanol e apresenta coloração violeta. Quando um antioxidante é misturado à solução metanólica de DPPH[•], o radical livre é reduzido e, com isso, a coloração da solução muda de violeta para amarela. Essa mudança é medida espectrofotometricamente a 515 nm, indicando a eficiência do antioxidante adicionado em remover o radical (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER; BERSET, 1995). Trata-se de um método rápido, que não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação. Portanto, o efeito dos antioxidantes sobre o seqüestro do radical DPPH[•] é atribuído à habilidade destes compostos de doar hidrogênio.

O método β -caroteno/ácido linoléico consiste na descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico. Estima a habilidade dos compostos antioxidantes dos extratos naturais de seqüestrar o radical peróxido do ácido linoléico (LOO[•]), que oxida o β -caroteno presente em uma emulsão. Como não ocorre a altas temperaturas, pode ser utilizado para determinar a atividade antioxidante de compostos termolábeis. A determinação é feita espectrofotometricamente em 470 nm (BORGUINI; TORRES, 2006).

Segundo Silva, Borges e Ferreira (1999), a ausência de correlação entre os diferentes métodos deve-se, por um lado, aos indicadores usados na avaliação da atividade antioxidante, os quais não refletem o mesmo estado de evolução do processo oxidativo e, por outro, às condições experimentais em que se efetuam as avaliações, como temperatura, presença de catalisadores metálicos, exposição à luz e solventes envolvidos na reação.

Assim, os principais objetivos deste trabalho foram conhecer a atividade antioxidante dos extratos de shiitake e cogumelo do sol obtidos sob diferentes condições, medir o teor de compostos fenólicos totais e avaliar a estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado dos extratos que apresentaram maior atividade antioxidante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Cogumelos

Cerca de 4,0 kg do cogumelo shiitake *in natura*, produzido e comercializado na região de Salto/SP, no mês de abril/2009, depois de embalado e resfriado, foi enviado diretamente ao Laboratório de Óleos e Gorduras do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da UNESP. O cogumelo do sol *in natura* foi adquirido na região de São José do Rio Preto/SP durante os meses de abril, maio e setembro/2009 totalizando cerca de 3,0 kg. Imediatamente após sua colheita foi lavado e encaminhado ao Laboratório de Óleos e Gorduras do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da UNESP.

As amostras foram congeladas a -30°C por um tempo mínimo de 24 horas, liofilizadas em liofilizador da marca Liotop, modelo L101 e trituradas em um moinho marca Eberle, modelo 2508.001-2. O pó obtido foi armazenado em recipientes plásticos escuros, vedados com tampas de rosca e devidamente rotulados, para análises posteriores. Depois de trituradas, as amostras de cogumelo do sol foram homogeneizadas a fim de minimizar possíveis variações entre os lotes.

2.1.2. Óleo

Para a análise da estabilidade oxidativa utilizou-se o óleo de soja refinado sem adição de antioxidantes sintéticos (TBHQ e ácido cítrico), da marca Cargil Agrícola S/A, adquirido em embalagens de 900 mL no comércio local de São José do Rio Preto/SP.

2.1.3. Extratos e antioxidantes

A obtenção dos extratos de cogumelo foi feita com diferentes solventes: água, metanol:água (1:1), etanol:água (1:1), metanol e etanol, por 3 horas em *shaker* (extração lenta/120 rpm) e por 30 minutos em liquidificador (extração rápida). Ambas as extrações foram feitas numa proporção de 1:10 (8 g de cogumelo e 80 mL de solvente), ao abrigo de luz e à temperatura ambiente. Em

seguida, a mistura foi centrifugada a 3.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante filtrado com bomba a vácuo e submetido ao evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40-60°C com vistas a determinar, por pesagem direta, o rendimento em matéria seca do extrato.

Os antioxidantes sintéticos *Terc* butil hidroquinona (TBHQ) (100 mg/kg) e butil hidroxitolueno (BHT) (100 mg/kg) foram utilizados na forma comercial, fornecidos pela empresa Danisco S/A.

2.2. Métodos

2.2.1. Método do radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

A atividade antioxidante foi determinada, em triplicata, por meio do método proposto por Hatano et al. (1988). Este método baseia-se na remoção do radical estável DPPH• do meio de reação por ação dos antioxidantes presentes na amostra. Os extratos de cogumelo foram diluídos nas concentrações de 0,5 a 2,5 mg/mL. Uma alíquota de 3,0 mL da diluição foi adicionada a 1,0 mL de solução de DPPH• ($2 \cdot 10^{-4}$ mol/L). Após o tempo de reação de 30 minutos em ausência de luz, a absorbância foi lida a 517 nm em espectrofotômetro, marca Shimadzu, modelo UV visível mini 1240, e convertida em atividade antioxidante, em porcentagem (%). O controle foi realizado com 1,0 mL de DPPH• acrescido de 3,0 mL de solvente.

2.2.2. Sistema β -caroteno/ácido linoléico

A atividade antioxidante também foi avaliada, em triplicata, pelo método de descoloramento do β -caroteno descrito por Marco (1968) e modificado por Miller (1971). Este método baseia-se na descoloração do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico. Uma alíquota da solução de β -caroteno (0,2 mg/mL em clorofórmio) foi misturada ao ácido linoléico e ao Tween 40, sendo o clorofórmio, em seguida, completamente evaporado com nitrogênio. Após adição de 100 mL de água deionizada incorporada com oxigênio, alíquotas de 5,0 mL da emulsão β -caroteno/ácido linoléico foram misturadas a 1,0 mL da solução do extrato de cogumelo em tubos de ensaio. As soluções de

extratos de cogumelo foram preparadas em concentrações de 4,0 a 20,0 mg/mL. O BHT (0,08 mg/mL) foi utilizado como padrão. A absorbância a 470 nm foi monitorada a cada 20 minutos, durante 2 horas com os tubos mantidos em banho-maria a 50°C durante as leituras. A atividade antioxidante foi calculada em termos de percentual de inibição, relativa ao controle.

Os extratos que apresentaram maior atividade antioxidante segundo os métodos DPPH• e β-caroteno/ácido linoléico foram selecionados para serem aplicados no óleo de soja.

2.2.3. Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram quantificados, em triplicata, colorimetricamente pelo método de Folin-Ciocalteu. Este método baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstico em solução alcalina, e é o mais utilizado para a determinação de compostos fenólicos totais em alimentos. A cor azul produzida pela redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos fenólicos é medida espectrofotometricamente (SINGLETON; ROSSI, 1965). Neste procedimento pipetou-se 100 µL da solução de extrato e adicionou-se 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de solução saturada de carbonato de sódio 20% e 6,0 mL de água destilada. Esta mistura permaneceu em repouso por duas horas em temperatura ambiente e a absorbância foi determinada a 765 nm. Para a quantificação, foi feita uma curva analítica utilizando ácido gálico em concentrações de 0 a 500 mg/L. O coeficiente de determinação da curva analítica foi $R^2 = 0,9999$. Os teores de compostos fenólicos totais foram expressos como miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g).

2.2.4. Estabilidade oxidativa

O extrato, de cada variedade de cogumelo, que apresentou maior atividade antioxidante pelos métodos DPPH• e β-caroteno/ácido linoléico foi aplicado ao óleo de soja em diferentes concentrações (0, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000 e 3.500 mg/kg) com o objetivo de avaliá-lo quanto à estabilidade oxidativa.

A estabilidade de óleos é definida como o tempo para se atingir nível de rancidez detectável ou surpreendente mudança na taxa de oxidação. As amostras foram analisadas segundo o método proposto pela *American Oil Chemists' Society* Cd 12b-92 (AOCS, 1993) que é baseado na determinação da condutividade elétrica dos produtos voláteis de degradação utilizando o equipamento Rancimat[®] modelo 743, marca Metrohm.

A determinação foi realizada em duplicata a 100°C, com fluxo de ar de 20 L/h, utilizando 3,0 g de amostra e volume de água destilada de 60 mL nos frascos contendo os eletrodos. Por este método, uma curva de condutividade elétrica x tempo é automaticamente registrada com o decorrer da reação e o período de indução é determinado em horas.

2.3. Análise estatística

O experimento foi realizado em esquema fatorial no delineamento inteiramente casualizado (BANZATTO; KRONKA, 2006), cujos resultados obtidos das determinações analíticas foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5%, obtidos através do programa ESTAT, versão 2.0 (UNESP, 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Rendimento dos extratos de cogumelos

A Tabela 1 apresenta o rendimento percentual dos extratos obtidos após a remoção do solvente orgânico aplicado no processo de extração. Os solventes usados para a extração lenta do cogumelo shiitake apresentaram a seguinte ordem em rendimento: água > metanol:água > etanol:água > metanol > etanol. Este resultado indica a presença de compostos de elevada polaridade nos extratos de shiitake. Observa-se também que esta seqüência foi a mesma para a extração rápida, sugerindo que, para o shiitake, o tipo de extração não interferiu no rendimento dos extratos.

Para o shiitake, os valores de rendimentos encontrados na literatura apresentam-se superiores. Cheung, Cheung e Ooi (2003) e Yang, Lin e Mau (2002) encontraram rendimentos de 33,5 e 18,8%, respectivamente, para os

extratos metanólicos. A diferença entre os resultados encontrados pode ser justificada pelos diferentes métodos utilizados para a extração.

Tabela 1 – Rendimento (%) dos extratos de shiitake e de cogumelo do sol, utilizando diferentes solventes.

Solventes	Variedades	
	Shiitake	Cogumelo do sol
Lenta		
Água	30,57	33,70
Metanol:água	29,30	37,22
Etanol:água	22,62	34,86
Metanol	13,47	7,47
Etanol	4,26	2,40
Rápida		
Água	29,92	42,86
Metanol:água	29,65	32,60
Etanol:água	23,44	34,46
Metanol	16,85	9,78
Etanol	11,46	7,03

Na extração lenta do cogumelo do sol, os solventes constituídos pelas misturas, metanol:água e etanol:água, apresentaram maiores rendimentos, seguidos pela água, metanol e etanol enquanto que, na extração rápida, o solvente aquoso foi mais eficiente, seguido pelas misturas e finalmente pelo metanol e etanol.

Em estudo realizado por Silva et al. (2009), a obtenção do extrato de cogumelo do sol foi realizada durante 6 e 12 horas em *shaker* e os respectivos rendimentos foram 15,4 e 16% nos extratos metanólicos e 41,4 e 34,1% nos extratos metanólico:aquosos, reforçando o fato de que o fator solvente foi mais efetivo que o tempo de extração. Tsai, Tsai e Mau (2007) usaram água quente para extrair compostos solúveis do cogumelo do sol, simulando o preparo do chá, e obtiveram rendimento de 47,3%.

Comparando os rendimentos dos extratos das duas variedades pode-se observar que, independente do tipo de extração, os solventes de menor polaridade, metanol e etanol, foram os que apresentaram menor rendimento. Os rendimentos dos extratos de cogumelo do sol foram maiores quando comparados aos do shiitake para os solventes aquosos e misturas, enquanto que os rendimentos dos extratos de shiitake foram maiores somente com os solventes metanol e etanol.

O tempo de duração para a obtenção dos extratos ainda é controverso entre os pesquisadores. Spigno e De Faveri (2007) estudaram o efeito do tempo no rendimento da extração do bagaço de uva e verificaram que este fator teve pouca influência quando comparado ao tipo de solvente e temperatura empregada. Em contrapartida, Lapornik, Prosek e Wondra (2005) verificaram, para o extrato aquoso de uva, pequeno aumento no rendimento com o aumento do tempo de extração, enquanto que o rendimento do extrato etanólico aumentou surpreendentemente com o tempo. Porém, na maioria dos trabalhos consultados na literatura, o efeito do tempo no rendimento da extração não é um fator amplamente investigado, sendo que a duração das extrações, de maneira geral, varia de menos de 1 a 48 horas.

O rendimento da extração de compostos antioxidantes a partir de fontes naturais é influenciado principalmente pelas condições em que o processo de extração líquido-sólido é realizado. Como cada fonte natural tem características únicas de estrutura e composição, quando são combinados com solventes o resultado da interação soluto-solvente tem comportamento imprevisível (SOUSA et al., 2008).

Vários estudos têm investigado sobre fatores que podem afetar a eficiência da extração de compostos antioxidantes como: solvente, temperatura e tempo de extração (GONZÁLEZ-MONTELONGO; LOBO; GONZÁLEZ, 2010; SPIGNO; DE FAVERI, 2007). Altas temperaturas são relatadas por melhorar a eficiência da extração devido à maior taxa de difusão e à melhor solubilidade dos analitos no solvente; embora temperaturas elevadas também possam afetar a atividade dos extratos devido à degradação dos compostos antioxidantes, além destes compostos poderem reagir com outros componentes do material vegetal impedindo a extração. Desta forma, as extrações de compostos antioxidantes são conduzidas, de maneira geral, entre 20 e 60 °C (PINELO et al., 2005).

Segundo Spigno, Tramelli e De Faveri (2007), a cinética de extração acontece em dois estágios. O primeiro, mais rápido, envolve a transferência direta do soluto da superfície da matéria-prima; o segundo estágio corresponde à difusão molecular do soluto do interior da matéria-prima para o solvente, que acontece de maneira mais lenta. Os fatores que interferem nestes estágios são: coeficiente de difusão, coeficiente de partição dos componentes extraídos do sólido para o solvente, o tipo de solvente, assim como seu volume, tamanho e geometria das partículas sólidas.

Herodez et al. (2003) investigaram a influência do solvente na extração de compostos antioxidantes de folhas de bálsamo. Concluíram que a composição química final do extrato depende da quantidade de solvente usada por quilograma de matéria-prima, sendo que o rendimento da extração aumenta com o volume de solvente num intervalo de 6 a 10 L/kg de matéria-prima.

3.2. Atividade antioxidante dos extratos de cogumelos

A atividade antioxidante é uma medida da capacidade das substâncias extraídas da matriz do alimento de seqüestrar radicais livres (método do DPPH[•]) ou de retardar o processo de oxidação lipídica em um sistema controlado (sistema β -caroteno/ácido linoléico) (BORGUINI; TORRES, 2006). Apesar dos diferentes mecanismos, o termo antioxidante foi utilizado para referir-se a ambas as atividades.

3.2.1. Método do radical livre DPPH[•]

O Apêndice 1 apresenta a análise de variância para a atividade antioxidante dos extratos de shiitake e cogumelo do sol pelo método do seqüestro do radical livre DPPH[•]. Como observado, o teste foi significativo ($p < 0,01$) para os fatores solventes, concentrações e sua interação. Dessa forma, procedeu-se ao desdobramento da interação, cujos resultados encontram-se nas Tabelas 2 e 3.

Na Tabela 2 observa-se que, para a extração lenta, a atividade antioxidante aumentou com a concentração do extrato de shiitake para a maioria dos solventes testados. A exceção foi a água, onde o aumento da concentração

do extrato reduziu a atividade antioxidante. Isso pode ser justificado pelo fato do solvente aquoso arrastar, juntamente com as substâncias antioxidantes, outros compostos de ação pró-oxidante. O melhor extrato foi o metanólico com 91,34% de atividade antioxidante, seguido do metanólico:aquoso (89,90%) e etanólico:aquoso (86,23%).

Tabela 2 – Médias da atividade antioxidante (%) dos extratos de shiitake.

Solventes	Concentrações (mg/mL)				
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Lenta					
Água	29,95 ^{aC}	22,70 ^{bD}	13,00 ^{cD}	3,23 ^{dE}	1,11 ^{dD}
Metanol:água	54,14 ^{CA}	89,76 ^{aA}	88,54 ^{abA}	89,90 ^{aA}	86,05 ^{bB}
Etanol:água	48,40 ^{CB}	81,60 ^{CB}	86,23 ^{aA}	84,72 ^{aB}	83,70 ^{abB}
Metanol	18,55 ^{eD}	41,86 ^{dC}	63,26 ^{cB}	81,63 ^{bC}	91,34 ^{aA}
Etanol	8,46 ^{eE}	18,70 ^{dE}	27,73 ^{cC}	37,53 ^{bD}	44,78 ^{aC}
Rápida					
Água	28,83 ^{aB}	13,63 ^{bE}	2,70 ^{cD}	2,62 ^{cC}	1,27 ^{cD}
Metanol:água	46,36 ^{dA}	83,36 ^{CB}	88,79 ^{aA}	87,40 ^{abA}	86,07 ^{bB}
Etanol:água	46,46 ^{CA}	86,08 ^{abA}	87,80 ^{aA}	87,13 ^{abA}	85,76 ^{bB}
Metanol	24,60 ^{eC}	44,05 ^{dC}	70,24 ^{cB}	87,21 ^{ba}	92,84 ^{aA}
Etanol	8,28 ^{eD}	19,17 ^{dC}	30,23 ^{cC}	39,53 ^{bB}	47,34 ^{aC}

a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A, B... (coluna): médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Dentro da extração rápida, observou-se o mesmo comportamento, ou seja, com exceção da água, todos os solventes resultaram em crescente atividade antioxidante com o aumento da concentração. Novamente, o solvente que mais se destacou foi o metanol com 92,84% de atividade antioxidante, seguido das misturas metanol:água e etanol:água. Independente do tipo de extração, a melhor atividade antioxidante foi verificada para o extrato metanólico.

Utilizando concentrações de 1,5 a 9 mg/g, Cheung, Cheung e OOi (2003) encontraram, para as atividades antioxidantes de shiitake, uma variação de 3,39 a 29,4% para o extrato metanólico e de 38,3 a 40,4% para o extrato aquoso.

A Tabela 3 mostra as médias da atividade antioxidante dos extratos de cogumelo do sol.

Tabela 3 – Médias da atividade antioxidante (%) dos extratos de cogumelo do sol.

Solventes	Concentrações (mg/mL)				
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Lenta					
Água	25,28 ^{aD}	23,04 ^{bD}	14,91 ^{cD}	8,82 ^{dD}	4,48 ^{eD}
Metanol:água	88,97 ^{bcB}	90,75 ^{aB}	90,15 ^{abB}	89,43 ^{bcAB}	88,70 ^{cB}
Etanol:água	89,18 ^{bB}	90,70 ^{aB}	89,80 ^{abB}	89,07 ^{bB}	88,40 ^{bB}
Metanol	93,40 ^{aA}	93,00 ^{aA}	92,04 ^{abA}	90,82 ^{bcA}	90,47 ^{cA}
Etanol	42,73 ^{dC}	45,00 ^{cC}	45,61 ^{cC}	47,13 ^{bC}	49,81 ^{aC}
Rápida					
Água	24,53 ^{aE}	20,37 ^{bE}	15,16 ^{cE}	8,79 ^{dE}	4,54 ^{eE}
Metanol:água	75,68 ^{cC}	86,36 ^{aC}	81,77 ^{bC}	76,43 ^{cC}	71,57 ^{dC}
Etanol:água	84,97 ^{cB}	87,89 ^{aB}	87,18 ^{abB}	86,34 ^{abB}	84,85 ^{cB}
Metanol	95,10 ^{aA}	94,86 ^{aA}	94,05 ^{abA}	93,30 ^{bA}	92,93 ^{bA}
Etanol	46,22 ^{dD}	47,80 ^{cD}	51,46 ^{bD}	52,64 ^{aD}	53,14 ^{aD}

a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).
A, B... (coluna): médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Na extração lenta verifica-se que, com exceção da água, o aumento das concentrações exerceu pouca influência sobre a atividade antioxidante dos extratos. Dentre os solventes, as misturas também não interferiram nos resultados. O metanol foi estatisticamente superior aos demais, com atividade máxima de 93,40%.

O comportamento dos extratos na extração rápida foi semelhante aos da lenta, ou seja, o aumento da atividade antioxidante não foi proporcional ao aumento das concentrações. O melhor solvente foi o metanol, seguido das misturas etanol:água, metanol:água, etanol e água. A concordância entre os resultados da extração lenta e rápida conduz ao fato de que o tipo de extração pouco interferiu na atividade antioxidante dos extratos.

Em estudo realizado por Soares et al. (2009), o extrato metanólico do cogumelo do sol apresentou 90% de atividade antioxidante em concentração de

6,0 mg/mL. Tsai, Tsai e Mau (2007) encontraram, para o extrato etanólico de cogumelo do sol, uma variação de 15,7 a 94,9% para concentrações de 0,5 a 5,0 mg/mL, e para o extrato aquoso, 45,6 a 51,6% para as mesmas concentrações.

Para outras variedades de cogumelos, os extratos metanólicos apresentaram elevada atividade antioxidante. Elmastas et al. (2007) avaliaram o poder seqüestrador de radicais livres de variedades como *Lepista nuda*, *Russula delica*, *Polyporus squamosus*, *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus*, *Verpa conica* e *Boletus edulis*, encontrando, respectivamente, 91,3; 86,1; 82,8; 81,3; 77,5; 75,7 e 68,7%.

González-Montelongo, Lobo e González (2010) estudaram os efeitos da temperatura (25 e 55°C), do tempo (0 e 120 minutos) e do número de extrações na atividade antioxidante de cascas de banana. O número de extrações foi o fator que mais influenciou no seqüestro dos radicais livres DPPH•, enquanto a temperatura teve efeito positivo na redução do descoramento do β-caroteno. O tempo de extração, no entanto, praticamente não apresentou impacto sobre a atividade antioxidante. O efeito do tempo, porém, ainda é controverso. O prolongamento do tempo de extração não aumentou a atividade antioxidante dos extratos da casca de laranja (XU et al., 2008) nem dos extratos de bagaço de uva (PINELO et al., 2005). Contudo, um ligeiro aumento no seqüestro de radicais livres ABTS•, foi determinado aumentando-se o tempo de extração de subprodutos de carambola de 30 para 60 minutos (SHUI; LEONG, 2006).

3.2.2. Sistema β-caroteno/ácido linoléico

O sistema β-caroteno/ácido linoléico consiste de uma matriz aquosa-lipídica, sendo considerada assim uma emulsão. Neste método, a atividade antioxidante é avaliada pela capacidade de um antioxidante em inibir o processo de oxidação no sistema durante 2 horas.

O Apêndice 2 apresenta a análise de variância para a atividade antioxidante dos extratos de shiitake e cogumelo do sol pelo método β-caroteno/ácido linoléico. Como observado, o teste foi significativo ($p < 0,01$) para os fatores solventes, concentrações e sua interação. Dessa forma, procedeu-se ao desdobramento da interação, cujos resultados encontram-se nas Tabelas 4 e 5.

O antioxidante sintético BHT, que foi usado como referência, apresentou atividade antioxidante de 94,66% em concentração de 0,08 mg/mL. Esta concentração equivale à 100 mg/kg, que é o limite máximo permitido pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2001). Todos os extratos analisados tiveram atividade antioxidante inferior ao BHT. A Tabela 4 mostra as médias da atividade antioxidante dos extratos de shiitake.

Tabela 4 – Médias da atividade antioxidante (%) dos extratos de shiitake.

Solventes	Concentrações (mg/mL)					
	4	6	8	10	16	20
Lenta						
Água	44,87 ^{aC}	46,87 ^{aB}	46,14 ^{aB}	45,36 ^{aBC}	45,80 ^{aB}	46,47 ^{aC}
Metanol:água	78,33 ^{cA}	80,24 ^{bA}	81,20 ^{abA}	82,26 ^{aA}	81,72 ^{aA}	81,75 ^{aB}
Etanol:água	39,14 ^{bC}	39,57 ^{bBC}	45,45 ^{abB}	48,63 ^{aB}	50,28 ^{aB}	52,37 ^{aC}
Metanol	67,06 ^{dB}	76,87 ^{cA}	83,87 ^{bA}	85,72 ^{abA}	91,41 ^{aA}	93,06 ^{aA}
Etanol	30,31 ^{cD}	35,72 ^{bcC}	39,76 ^{bB}	39,33 ^{bC}	43,27 ^{bB}	51,18 ^{aC}
Rápida						
Água	58,16 ^{aB}	53,60 ^{abB}	50,28 ^{bB}	43,88 ^{bC}	31,27 ^{dE}	23,43 ^{eE}
Metanol:água	68,70 ^{cA}	75,28 ^{bA}	78,13 ^{aA}	78,90 ^{aA}	78,53 ^{aB}	78,06 ^{aB}
Etanol:água	47,67 ^{cC}	52,71 ^{bB}	54,10 ^{abB}	55,32 ^{aB}	55,13 ^{aC}	54,86 ^{aC}
Metanol	68,13 ^{fA}	76,08 ^{eA}	80,58 ^{dA}	82,40 ^{cA}	85,73 ^{bA}	87,58 ^{aA}
Etanol	35,28 ^{cD}	35,55 ^{cC}	34,67 ^{cC}	35,90 ^{cD}	40,90 ^{bD}	49,10 ^{aD}

a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).
A, B... (coluna): médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Para a extração lenta, o aumento da concentração não foi significativo para o extrato aquoso. Para os demais extratos, a atividade foi crescente com o aumento das concentrações. Dentre os solventes, a água e a mistura etanol:água não diferiram estatisticamente e o metanol apresentou atividade antioxidante máxima de 93,06% para a concentração 20 mg/mL.

Analisando a extração rápida, nota-se que o solvente que mais sofreu interferência da concentração foi o metanol, para o qual a atividade antioxidante variou de 68,13% para a concentração de 4 mg/mL a 87,58% para 20 mg/mL, sendo esta última a maior atividade antioxidante dentre as demais. Em relação

aos solventes, a diferença de atividade antioxidante entre o metanol:água e o metanol só foi evidenciada estatisticamente a partir da concentração de 16 mg/mL. Não foi possível verificar a influência do tipo de extração sobre a atividade antioxidante.

Os dados obtidos no presente estudo diferem com os da literatura. Cheung, Cheung e Ooi (2003) encontraram, para o extrato metanólico de shiitake, 13,1 a 45,8% de atividade antioxidante para concentrações de 4,0 a 20 mg/mL, e para o extrato aquoso, 52,7 a 75,9% de atividade antioxidante.

A Tabela 5 apresenta as médias da atividade antioxidante dos extratos de cogumelo do sol. Verifica-se na extração lenta a maior influência dos solventes frente às concentrações.

Tabela 5 – Médias da atividade antioxidante (%) dos extratos de cogumelo do sol.

Solventes	Concentrações (mg/mL)					
	4	6	8	10	16	20
Lenta						
Água	57,22 ^{ab}	58,38 ^{ab}	58,34 ^{ab}	56,51 ^{aC}	52,80 ^{cC}	53,44 ^{bC}
Metanol:água	52,15 ^{bC}	54,93 ^{aC}	53,54 ^{abC}	54,30 ^{abC}	53,61 ^{abC}	53,02 ^{abC}
Etanol:água	68,28 ^{cA}	70,82 ^{abA}	71,80 ^{aA}	72,30 ^{aB}	68,90 ^{cB}	67,32 ^{cB}
Metanol	69,40 ^{dA}	72,00 ^{cdA}	74,18 ^{bcA}	76,45 ^{abA}	78,96 ^{aA}	78,70 ^{aA}
Etanol	44,70 ^{cD}	46,19 ^{bcD}	46,58 ^{bcD}	48,77 ^{bD}	48,33 ^{bD}	51,88 ^{aC}
Rápida						
Água	46,73 ^{bCD}	50,51 ^{abC}	55,27 ^{ab}	53,38 ^{abC}	49,35 ^{abC}	48,22 ^{abC}
Metanol:água	42,26 ^{aD}	47,06 ^{aC}	45,28 ^{aC}	47,68 ^{aCD}	45,46 ^{aC}	47,78 ^{aC}
Etanol:água	61,39 ^{abB}	62,24 ^{ab}	61,12 ^{abcB}	61,60 ^{ab}	59,64 ^{bcB}	50,27 ^{cC}
Metanol	77,03 ^{abA}	77,86 ^{aA}	76,06 ^{abA}	75,32 ^{abA}	73,00 ^{abA}	72,34 ^{ba}
Etanol	52,05 ^{abC}	49,48 ^{abC}	39,95 ^{cC}	45,02 ^{bcD}	51,75 ^{abC}	55,45 ^{ab}

a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).
A, B... (coluna): médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A maior atividade antioxidante foi do extrato metanólico, 78,96% em 16 mg/mL. Observando o comportamento do solvente dentro de cada concentração, em 20 mg/mL a mistura etanol:água e metanol diferiram estatisticamente, sendo

que entre as concentrações 4 e 8 mg/mL estes dois solventes apresentaram mesma atividade antioxidante.

Na extração rápida, o aumento da concentração não interferiu na atividade antioxidante da mistura metanol:água que ficou, em média, em 45,92%. O metanol apresentou atividade antioxidante máxima de 77,86%, seguido pela mistura etanol:água, 62,24%. Estudando os solventes dentro de cada concentração, o metanol foi significativamente melhor que os demais solventes. Ao analisar a influência do tipo de extração e dos solventes, conclui-se que este último foi mais significativo na atividade antioxidante dos extratos.

Soares et al. (2009) examinaram a atividade antioxidante dos extratos metanólicos de cogumelo do sol em extração lenta. Para 2, 5 e 10 mg/mL, as atividades antioxidantes foram 45, 80 e 90%, respectivamente. Estes resultados demonstram que os extratos sofreram maior influência das concentrações quando comparados aos resultados do presente estudo.

Barros et al. (2007) pesquisaram outras variedades de cogumelos como *L. giganteus*, *S. imbricatus* e *A. arvensis* e as atividades antioxidantes dos respectivos extratos metanólicos foram 61,4, 54,3 e 46,7% a 5 mg/mL. O cogumelo *Boletus edulis*, muito consumido na Europa, apresentou atividade antioxidante, quando extraído com metanol, de 97,80% para a concentração de 20 mg/mL, portanto, superior ao extrato metanólico de cogumelo do sol (SARIKURKCU; TEPE; YAMAC, 2008).

De acordo com os dados obtidos, observou-se que, independente do tipo de extração, os extratos metanólicos das duas variedades de cogumelos apresentaram maior atividade antioxidante em ambos os métodos, DPPH[•] e sistema β -caroteno/ácido linoléico. Porém, de acordo com Silva, Borges e Ferreira (1999), a comparação da atividade antioxidante só será legítima se for levado em consideração o solvente utilizado para a extração dos compostos, a concentração do extrato e as condições do método analítico escolhido.

Portanto, os extratos metanólicos do shiitake e do cogumelo do sol foram selecionados para serem aplicados em óleo de soja nos estudos sobre estabilidade oxidativa e retenção de tocoferóis em teste de estocagem acelerada. A extração lenta foi escolhida para a obtenção dos extratos por se tratar de uma forma menos enérgica quando comparada à extração rápida que, devido à alta rotação, provocou o aquecimento dos extratos.

3.3. Compostos fenólicos totais dos extratos de cogumelos

O Apêndice 3 apresenta a análise de variância para o teor de compostos fenólicos totais dos extratos de shiitake e cogumelo do sol. Como observado, o teste foi significativo ($p < 0,01$) para os fatores variedades, solventes e sua interação. Assim, procedeu-se ao desdobramento da interação, cujos resultados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 – Teor de compostos fenólicos totais (mg/g) para os extratos de shiitake e cogumelo do sol.

Solventes	Variedades	
	Shiitake	Cogumelo do sol
Lenta		
Água	128,44 ^{aA}	134,67 ^{aA}
Metanol:água	36,43 ^{bC}	76,88 ^{aB}
Etanol:água	49,80 ^{bB}	74,22 ^{aB}
Metanol	7,21 ^{bD}	34,44 ^{aC}
Etanol	10,00 ^{bD}	26,67 ^{aC}
Rápida		
Água	120,44 ^{bA}	130,22 ^{aA}
Metanol:água	43,13 ^{bB}	76,45 ^{aB}
Etanol:água	45,33 ^{bB}	72,45 ^{aB}
Metanol	22,77 ^{bC}	37,80 ^{aC}
Etanol	20,00 ^{bC}	28,89 ^{aC}

a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).
A, B... (coluna): médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os resultados demonstram que a extração de compostos fenólicos é fortemente influenciada pelo solvente utilizado. Avaliando a extração lenta do shiitake, nota-se que a água extraiu maior quantidade de compostos fenólicos totais, seguida das misturas etanol:água, metanol:água e, finalmente, do etanol e metanol. Na extração rápida, a única alteração ocorreu entre os extratos metanólico e etanólico.

Para variedade cogumelo do sol, independente do tipo de extração, a ordem decrescente no teor de compostos fenólicos foi: água, metanol:água, etanol:água, metanol e etanol, comprovando que quanto maior a polaridade do solvente de extração, maior a quantidade de compostos fenólicos totais extraídos.

Com relação às variedades dentro de cada solvente, houve diferença significativa no teor de compostos fenólicos para as duas variedades, exceto na extração lenta com água. O cogumelo do sol apresentou maior teor destes compostos quando comparado ao shiitake. A maior diferença encontrada foi para o extrato metanólico:aquoso da extração lenta, no qual o teor de compostos fenólicos do cogumelo do sol foi 52,62% maior que o do shiitake. Na extração lenta, apesar do teor de compostos fenólicos do extrato aquoso do cogumelo do sol ter sido superior ao do shiitake, não houve diferença significativa entre eles. Quanto ao tipo de extração, lenta e rápida, finda-se que sua influência foi pouco impactante frente ao solvente, cujas polaridades variadas interferiram intensamente na extração de compostos fenólicos totais.

González-Montelongo, Lobo e González (2010) avaliaram o efeito do tempo e do número de extrações na obtenção de compostos fenólicos. Não encontraram relação entre o tempo de extração e o teor destes compostos, porém, ao aumentar o número de etapas de extrações de 1 para 3, o teor de compostos fenólicos extraídos aumentou em 80%.

Yang, Lin e Mau (2002) encontraram para o extrato metanólico de shiitake teor de 6,27 mg/g, enquanto Tsai, Tsai e Mau (2007) obtiveram para o cogumelo do sol 5,67 e 5,80 mg/g de compostos fenólicos nos extratos aquoso e etanólico, respectivamente, obtidos numa extração lenta de 24 horas de duração. Estes valores são inferiores aos correspondentes extratos do presente estudo, demonstrando que o teor de compostos fenólicos não é proporcional ao tempo de extração. Soares et al. (2009) avaliaram o efeito do estágio de maturação do cogumelo do sol no teor de compostos fenólicos totais. Os cogumelos foram colhidos ainda jovens com o píleo fechado e, maduros, com o píleo já aberto. Os teores de fenólicos não apresentaram mudanças significativas em ambos os estádios de maturação: 29,64 e 28,82 mg/g para os extratos jovem e maduro, respectivamente. Ribeiro et al. (2008) compararam o teor de fenólicos entre o píleo e a estirpe do cogumelo *Boletus edulis*, porém não encontraram diferença significativa no teor de fenólicos entre as duas partes do basidiocarpo.

Diversas variedades de cogumelos já tiveram seus teores de compostos fenólicos determinados. O extrato metanólico do champignon (*Agaricus bisporus*) apresentou 45,6 mg/g de compostos fenólicos totais, segundo estudo de Alvarez-Parrilla et al.(2007). Barros et al. (2008) quantificaram os fenólicos do *A. silvaticus* e *A. silvicula* e encontraram 8,95 e 6,40 mg/g, respectivamente. Para as espécies *Higrocybe conica* e *Pleurotus florida*, os valores encontrados foram 42,21 e 23,84 mg/g, respectivamente, para extratos metanólicos (WONG; CHYE, 2009).

Com base nestes estudos, conclui-se que a solubilidade em um determinado solvente é uma característica de cada composto, o que explica a inexistência de um único método universal para a separação de todos os antioxidantes naturais. Além da solubilidade dos compostos fenólicos variar de acordo com a polaridade do solvente, o grau de polimerização dos fenólicos e suas interações com outros constituintes dos alimentos, também interferem no grau de obtenção destes compostos.

3.4. Estabilidade oxidativa do óleo de soja

A finalidade de se avaliar a estabilidade oxidativa de uma amostra de óleo é acompanhar os seus sinais de deterioração durante o armazenamento, simulando a vida de prateleira do produto, além de verificar a resistência de antioxidantes. Para que a oxidação seja acelerada, o procedimento mais comum é o aumento da temperatura da amostra de óleo e sua exposição ao oxigênio.

O Apêndice 4 apresenta a análise de variância para a determinação da estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de extratos de shiitake e cogumelo do sol. Como observado o teste foi significativo ($p < 0,01$) para o efeito concentrações, porém variedades e interação (variedades x concentrações) não foram significativas ($p > 0,05$). A Tabela 7 mostra as médias da estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de extratos de cogumelos.

Observa-se que, dentre as variedades estudadas, não houve diferença significativa entre os extratos de shiitake e cogumelo do sol sendo que, em média, a estabilidade oxidativa apresentada foi de 17,74 horas. Este valor foi 16,85% superior ao controle, demonstrando o efeito protetor da adição dos extratos de cogumelo ao óleo de soja. Verifica-se que, dentre as concentrações, a mais

efetiva foi de 3.500 mg/kg, que diferiu estatisticamente das demais concentrações.

O teste da estabilidade oxidativa também foi conduzido com os antioxidantes sintéticos TBHQ e BHT nas concentrações 100 mg/kg. O TBHQ apresentou-se mais efetivo com 29,12 horas de proteção contra a oxidação do óleo de soja. Já o BHT teve ação semelhante ao controle (óleo de soja sem adição de antioxidante) com apenas 15,35 horas. Portanto, o antioxidante sintético TBHQ, que é o mais usado nos óleos vegetais comercializados no Brasil, ainda é mais eficiente que os antioxidantes naturais extraídos dos cogumelos, apesar destes apresentarem-se eficientes quando comparados ao controle.

Tabela 7 – Médias da estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de extratos de shiitake e cogumelo do sol.

Fatores	Estabilidade oxidativa (horas)
Variedades	
Shiitake	17,60 ^a
Cogumelo do sol	17,88 ^a
Concentrações (mg/kg)	
0	14,75 ^e
1.000	16,88 ^{cd}
1.500	17,72 ^{cd}
2.000	17,84 ^{bc}
2.500	18,71 ^b
3.000	18,73 ^b
3.500	19,85 ^a

Valores médios seguidos de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os Apêndices 5 e 6 apresentam as análises de variância da regressão polinomial para a estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado dos extratos de shiitake e cogumelo do sol, respectivamente. Observa-se que a regressão linear foi significativa e os coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,9. Portanto, a partir da regressão, ficou comprovado que o comportamento do óleo de soja adicionado de extratos naturais frente à estabilidade oxidativa é linear, ou

seja, quanto maior a concentração do extrato, maior a proteção contra a oxidação do óleo.

Por meio da regressão linear (Figura 1), observa-se que a maior atividade antioxidante, medida pela estabilidade oxidativa, coincidiu com a maior concentração dos extratos de shiitake e cogumelo do sol, ou seja, 3.500 mg/kg, obedecendo, respectivamente, as equações do 1º grau: $y = 0,0012x + 15,363$ ($R^2 = 0,9165$) e $y = 0,0014x + 15,206$ ($R^2 = 0,9572$), onde y é a estabilidade oxidativa (horas) e x as concentrações dos extratos de cogumelos (mg/kg).

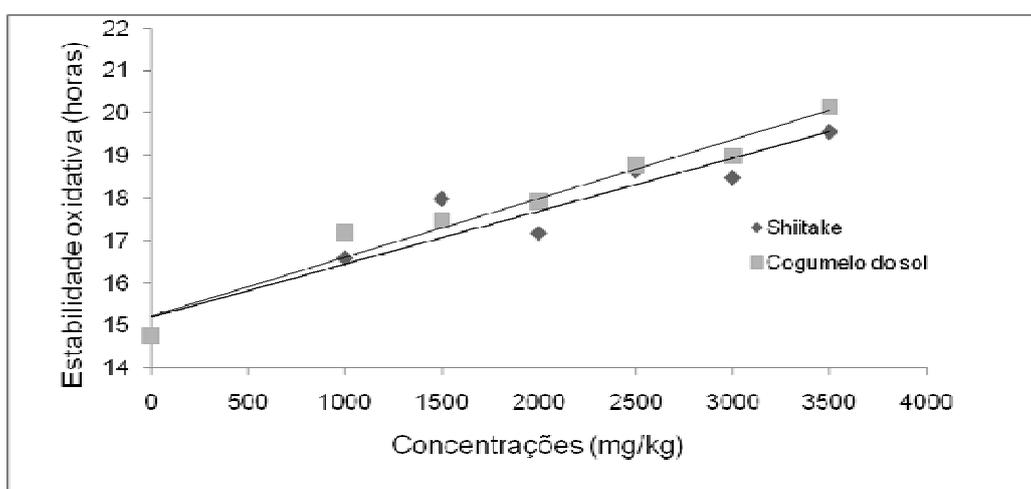


Figura 1 – Regressão linear para as concentrações dos extratos de cogumelos.

Gómez-Meza et al. (1999) testaram a estabilidade oxidativa do óleo de soja com extratos naturais de bagaço de uva. Aplicaram concentrações com 0,1, 0,3 e 0,5% de compostos fenólicos, obtendo 6,24 15,20 e 48,00 horas de proteção contra a oxidação, comprovando a tendência do aumento da ação antioxidante com o aumento da concentração do extrato.

A Tabela 8 apresenta o fator de proteção para os extratos aplicados ao óleo de soja. O fator de proteção compara as médias de estabilidade oxidativa dos extratos com o controle.

Observa-se na Tabela 8 que o shiitake aumentou a proteção do óleo de soja em 84,85% comparando-se a menor e maior concentração do extrato. Para o cogumelo do sol, o aumento no fator de proteção foi de 85,30%. Conclui-se que, apesar da diferença entre os fatores de proteção do óleo de soja terem sido

pequenas, pode-se observar que o cogumelo do sol apresentou maior proteção quando aplicado ao óleo de soja.

Tabela 8 – Fator de proteção para o óleo de soja.

Concentrações (mg/kg)	Fator de proteção	
	Shiitake	Cogumelo do Sol
1.000	1,12	1,16
1.500	1,22	1,18
2.000	1,16	1,21
2.500	1,26	1,27
3.000	1,25	1,28
3.500	1,32	1,36

4. CONCLUSÕES

Diante dos dados obtidos, concluiu-se que entre os fatores estudados nas extrações, os solventes de diferentes polaridades exerceram maior influência no rendimento, atividade antioxidante e compostos fenólicos dos cogumelos quando comparados aos tipos de extração, lenta e rápida. Os extratos metanólicos das duas variedades de cogumelo apresentaram maior atividade. Além disso, as duas variedades de cogumelos foram capazes de promover boa estabilidade oxidativa ao óleo de soja. Portanto, os extratos metanólicos dos cogumelos shiitake e sol apresentam-se como uma fonte alternativa de antioxidantes naturais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-PARRILLA, E. et al. Total phenols and antioxidant activity of commercial and wild mushrooms from Chihuahua, Mexico. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, Reynosa, v. 5, n. 5, p. 329-334, 2007.

AOCS. AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Chicago: AOCS, 1993.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**, 4. ed. Jaboticabal: Editora Funep, 2006, 237p.

BARROS, L. et al. Antioxidant activity of *Agaricus* sp. Mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. **Food Chemistry**, London, v. 111, n. 1, p. 61-66, 2008.

BARROS, L. et al. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushroom and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, London, v. 103, n. 2, p. 413-419, 2007.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, n. 118, p. 1199-1200, 1958.

BORGUINI, R. G.; TORRES, E. F. S. Tomatoes and tomato products as dietary sources of antioxidants. **Food Reviews International**, New York, v. 25, n. 4, p. 313-325, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel - Wissenschaft Technologie**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 04/88. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO, **Compêndio da Legislação de Alimentos**. São Paulo: ABIA, 2001. v.1, p. 3-26.

CHEUNG, L. M.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, V. E. C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushrooms extracts. **Food Chemistry**, London, v. 81, n. 2, p. 249-255, 2003.

ELMASTAS, M. et al. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Compounds and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 3-4, p. 337-345, 2007.

GÁMEZ-MEZA, N. et al. Antioxidant activity in soybean oil of extracts from Thompson grape bagasse. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 76, n. 12, p. 1445-1447, 1999.

GONZÁLEZ-MONTELONGO, R., LOBO, M. G., GONZÁLEZ, M. The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. **Separation and Purification Technology**, New York, v. 71, n. 1, p. 347-355, 2010.

HAKKIM, F. L.; SHANKAR, C. G.; GIRIJA, S. Chemical composition and antioxidant property of holy basil (*Ocimum sanctum* L.) leaves, stems, and inflorescence and their in vitro callus cultures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 22, p. 9109-9117, 2007.

HATANO, T. et al. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 36, n. 6, p. 2090-2097, 1988.

HERODEZ, S. S. et al. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. **Food Chemistry**, London, v. 80, n. 2, p. 275-282, 2003.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 71, n. 2, p. 214-222, 2005.

LEE, I. P. et al. Lack of carcinogenicity of lyophilized *Agaricus blazei* Murill in a F344 rat two year bioassay. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 87-95, 2008.

MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 45, n. 9, p. 594-598, 1968.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 48, n. 2, p. 91, 1971.

NIKI, E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly? **Journal Nutrition**, Burbank, v. 18, n. 6, p. 524-525, 2002.

PINELO, M. et al. Effect of solvent, temperature and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 2111-2117, 2005.

RIBEIRO, B. et al. Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. **Food Chemistry**, London, v. 110, n. 1, p. 47-56, 2008.

SARIKURKCU, C.; TEPE, B.; YAMAC, M. Evaluation of the antioxidant activity of four edible mushrooms from Central Anatolia, Eskisehir – Turkey: *Lactarius deterrimus*, *Suillus collitinus*, *Boletus edulis*, *Xerocomus chrysenteron*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 14, p. 6651-6655, 2008.

SHUI, G.; LEONG, L. P. Residue from star as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. **Food Chemistry**, London, v. 97, n. 2, p. 277-284, 2006.

SILVA, A. C. et al. Utilização do extrato de cogumelo como antioxidante natural em óleo vegetal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 4, p. 1103-1108, 2009.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SINGLETON, V. L.; ROSSI JR, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOARES, A. S. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. **Food Chemistry**, London, v. 112, n. 4, p. 775-781, 2009.

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

SOUSA, A. et al. Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives "alcaparras". **Lebensmittel Wissenschaft Technologie – Food Science and Technology**, London, v. 41, n. 1, p. 739-745, 2008.

SPIGNO, G.; DE FAVERI, D. M. Antioxidants from grape stalks and marc: influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 78, n. 3, p. 793-810, 2007.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 81, n.1, p. 200-208, 2007.

TSAI, S. Y. et al. Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. **Food Chemistry**, London, v. 113, n. 2, p. 578-584, 2009.

TSAI, S.; TSAI, H.; MAU, J. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie – Food Science and Technology**, London, v. 40, n. 8, p. 1392-1402, 2007.

UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, **ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 2.0, Jaboticabal, 1999, 1 disquete.

WONG, J. Y.; CHYE, F. Y. Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 22, n. 4, p. 269-277, 2009.

XU, G. H. et al. Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 1, p. 11-18, 2008.

YANG, J. H.; LIN, H. C.; MAU, J. L. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. **Food Chemistry**, London, v. 77, n. 2, p. 229-235, 2002.

ZHANG, Y. et al. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. **Food Chemistry**, London, v. 118, n. 3, p. 656-662, 2010.

6. APÊNDICES

Apêndice 1 – Análise de variância para a atividade antioxidante dos extratos de shiitake e cogumelo do sol pelo método do seqüestro do radical livre DPPH*.

Causas de Variação	G. L.	Quadrados médios			
		Shiitake		Cogumelo do sol	
		Lenta	Rápida	Lenta	Rápida
Solventes	4	13.541,4837**	14.459,3530**	17.798,8158**	15.835,4176**
Concentrações	4	2.110,7944**	2.471,3263**	47,1272**	81,4096**
Solventes x concentrações	16	774,7944**	787,4568**	55,5143**	63,6714**
Resíduo	50	1,3788	0,6063	0,3953	0,4173
Desvio padrão		1,1742	0,7786	0,6287	0,6460
Coef. de variação (%)		2,26	1,50	0,95	0,99

** Significativo (p < 0,01).

Apêndice 2 – Análise de variância para a atividade antioxidante dos extratos de shiitake e cogumelo do sol pelo método β -caroteno/ácido linoléico.

Causas de Variação	G. L.	Quadrados médios					
		Shiitake			Cogumelo do sol		
		Lenta	Rápida	Lenta	Rápida	Lenta	Rápida
Solventes	4	8.081,0610**	6.446,9469**	2.370,1600**	2.559,4314**		
Concentrações	5	345,4268**	30,2242**	18,7540**	22,8712**		
Solventes x concentrações	20	49,1319**	209,3243**	19,0631**	31,1399**		
Resíduo	60	9,6454	4,0131	1,3955	7,5342		
Desvio padrão		3,1057	2,0033	1,1822	2,7449		
Coef. de variação (%)		5,25	3,43	1,96	4,86		

** Significativo ($p < 0,01$).

Apêndice 3 – Análise de variância para o teor de compostos fenólicos totais dos extratos de shiitake e cogumelo do sol.

Causas de variação	G. L.	Quadrado médio	
		Lenta	Rápida
Variedades	1	3.968,6501**	2.656,4430**
Solventes	4	12.574,6787**	9.625,8723**
Variedades x solventes	4	242,3704**	177,6336**
Resíduo	20	15,0648	24,6375
Desvio padrão		3,8755	4,9612
Coef. de variação (%)		6,71	8,31

** Significativo ($p < 0,01$).

Apêndice 4 – Análise de variância para a determinação da estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de extratos de cogumelos.

Causas de variação	G. L.	Quadrados médios
Variedades	1	0,2962 ^{NS}
Concentrações	6	10,7069**
Variedades x concentrações	6	0,1611 ^{NS}
Resíduo	14	0,1399
Desvio padrão		0,3741
Coef. variação (%)		2,10

** Significativo ($p < 0,01$).

^{NS} Não significativo ($p > 0,05$).

Apêndice 5 – Análise de variância da regressão polinomial para a estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de extrato de shiitake.

Causas de Variação	G.L.	Q.M.	F	R ²
Regressão linear	1	25,6973	290,6930**	0,9165
Regressão quadrática	1	0,8943	10,1169*	0,9484
Regressão cúbica	1	0,2779	3,1435 ^{NS}	0,9583
Desvios de regressão	3	0,3893	4,4035*	
Resíduo	7	0,0884		

Desvio padrão = 0,2973

Coefficiente de variação (%) = 1,6795

** Significativo ($p > 0,01$).

^{NS} Não Significativo ($p > 0,05$).

Apêndice 6 – Análise de variância da regressão polinomial para a estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de extrato de cogumelo do sol.

Causas de Variação	G.L.	Q.M.	F	R²
Regressão linear	1	33,7353	178,3320**	0,9575
Regressão quadrática	1	0,3787	2,0003 ^{NS}	0,9682
Regressão cúbica	1	0,7980	4,2182 ^{NS}	0,9909
Desvios de regressão	3	0,1892	0,5670 ^{NS}	
Resíduo	7			

Desvio padrão = 0,4349

Coefficiente de variação (%) = 2,4322

** Significativo ($p > 0,01$)

^{NS} Não Significativo ($p > 0,05$).

Capítulo 3

Estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado dos extratos de shiitake (*Lentinus edodes*) e de cogumelo do sol (*Agaricus blazei*) em teste de estocagem acelerada

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado dos extratos metanólicos de shiitake e de cogumelo do sol, em teste de estocagem acelerada. Os tratamentos: Controle (óleo de soja sem antioxidantes), TBHQ (óleo de soja + 100 mg/kg de TBHQ), BHT (óleo de soja + 100 mg/kg de BHT), Shiitake (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de shiitake) e Cogumelo do sol (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de cogumelo do sol) foram preparados e submetidos ao teste de estocagem acelerada em estufa, a 60°C durante 15 dias. As amostras foram recolhidas a cada 3 dias e analisadas quanto ao índice de peróxidos e dienos conjugados. Os resultados demonstraram que, ao final de 15 dias, os tratamentos TBHQ, cogumelo do sol, shiitake, Controle e BHT apresentaram índices de peróxidos de 6,47, 8,81, 41,53, 71,28 e 78,40 meq/kg, respectivamente. Os tratamentos TBHQ e cogumelo do sol também foram os mais efetivos em proteger o óleo de soja contra a formação de dienos conjugados, reduzindo a formação destes compostos em 65,42 e 62,62%, respectivamente, em relação ao controle.

Palavras-chave: cogumelos, oxidação, índice de peróxidos, dienos conjugados.

1. INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais são fontes de ácidos graxos essenciais e desempenham funções energética e hormonais no organismo sendo, portanto, indispensáveis na dieta humana.

Segundo a *Food and Agriculture Organization*, os principais países produtores de soja são: Estados Unidos, Brasil, Argentina, China e Índia, totalizando 90% da produção mundial (FAO, 2010). O óleo de soja é o principal óleo comestível consumido no Brasil, com 5,08 milhões t em 2009/2010 (ABIOVE, 2010).

O óleo de soja é rico em ácidos graxos insaturados dos quais fazem parte o linoléico e linolênico, considerados essenciais ao organismo. No entanto, o alto nível de insaturação é responsável pela oxidação lipídica que resulta na perda de nutrientes, alteração no odor e sabor, além de perdas econômicas (FARHOOSH; EINAFSHAR; SHARAYEI, 2009).

Para retardar ou prevenir a oxidação lipídica, antioxidantes sintéticos tais como butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroxianisol (BHA) e *Terc* butil hidroquinona (TBHQ) são utilizados como aditivos alimentares. No entanto, estudos têm revelado a possibilidade de estes compostos apresentarem riscos à saúde humana (ZHANG et al., 2010). Por este motivo, alguns países restringem o uso de antioxidantes sintéticos como o TBHQ, que não é permitido no Canadá e na Comunidade Européia (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002). No Brasil, o uso de antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde que limita em 100 mg/kg a concentração máxima permitida para BHT e 200 mg/kg para TBHQ (BRASIL, 2001).

A preocupação quanto à inocuidade dos antioxidantes sintéticos tem motivado a busca de antioxidantes naturais que possam substituí-los total ou parcialmente.

Diversas espécies de cogumelos são estudadas por apresentarem significativa atividade antioxidante. Elmastas et al. (2007) sugerem que os compostos fenólicos são os principais compostos responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos de cogumelos.

De acordo com Pokorný (1991), quando comparados com os antioxidantes sintéticos, os naturais apresentam as vantagens de serem

considerados seguros e, por isso, mais aceitos pelos consumidores. Além de protegerem os óleos vegetais contra a oxidação lipídica, também conferem propriedades nutraceuticas. Por isso, a aplicação de antioxidantes extraídos de fontes naturais em óleos vegetais tem sido amplamente investigada (ANGELO; JORGE, 2008; BERA; LAHIRI; NAG, 2006; IQBAL; BHANGER, 2007; LUZIA; JORGE, 2009). Nestes estudos, os óleos vegetais adicionados de antioxidantes naturais foram submetidos a altas temperaturas. Desta forma, pôde-se avaliar a eficiência dos antioxidantes naturais frente ao processo de oxidação.

Geralmente, para acompanhar o processo oxidativo do óleo faz-se a determinação do índice de peróxidos e dienos conjugados, produtos primários da oxidação. Um nível baixo de peróxidos não indica garantia de estabilidade oxidativa, uma vez que estes compostos são degradados ao longo do processo oxidativo. A formação de dienos conjugados está relacionada com a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados do óleo, formados pelo deslocamento de duplas ligações (HAMILTON et al., 1983; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado dos extratos metanólicos de shiitake e cogumelo do sol, em teste de estocagem acelerada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Cogumelos

Cerca de 4,0 kg do cogumelo shiitake *in natura*, produzido e comercializado na região de Salto/SP, no mês de abril/2009, depois de embalado e resfriado, foi enviado diretamente ao Laboratório de Óleos e Gorduras do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da UNESP. O cogumelo do sol *in natura* foi adquirido na região de São José do Rio Preto/SP durante os meses de abril, maio e setembro/2009 totalizando cerca de 3,0 kg. Imediatamente após sua colheita foi lavado e encaminhado ao Laboratório de Óleos e Gorduras do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da UNESP.

As amostras foram congeladas a -30°C por um tempo mínimo de 24 horas, liofilizadas em liofilizador da marca Liotop modelo L101 e trituradas em um moinho marca Eberle, modelo 2508.001-2. O pó obtido foi armazenado em recipientes plásticos escuros, vedados com tampas de rosca e devidamente rotulados, para análises posteriores. Depois de trituradas, as amostras de cogumelo do sol foram homogeneizadas a fim de minimizar possíveis variações entre os lotes.

2.1.2. Óleo

Para a análise da estabilidade oxidativa utilizou-se o óleo de soja refinado sem adição de antioxidantes sintéticos (TBHQ e ácido cítrico), da marca Cargil Agrícola S/A, adquirido em embalagens de 900 mL no comércio local de São José do Rio Preto/SP.

2.1.3. Extratos e antioxidantes

De acordo com as análises de atividade antioxidante realizadas pelos métodos DPPH[•] e β -caroteno/ácido linoléico, o extrato metanólico obtido por extração lenta (120 rpm, 3 horas em *shaker*) foi aplicado ao óleo de soja por apresentar maior atividade antioxidante. A obtenção do extrato foi feita numa proporção de 1:10 (8 g de cogumelo e 80 mL de metanol), ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 3.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante filtrado com bomba a vácuo e submetido ao evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40°C . O extrato seco foi pesado e ressuspenso em metanol, obtendo-se uma solução-estoque contendo 1,0 grama de extrato para cada 10,0 mL de solvente metanol (1:10), utilizada para aplicação direta no óleo de soja.

Os antioxidantes sintéticos *Terc* butil hidroquinona (TBHQ) (100 mg/kg) e butil hidroxitolueno (BHT) (100 mg/kg) foram utilizados na forma comercial, fornecidos pela empresa Danisco S/A.

2.2. Ensaio experimental

Foram submetidos ao teste acelerado em estufa os seguintes tratamentos: Controle (óleo de soja sem antioxidantes), TBHQ (óleo de soja + 100 mg/kg de TBHQ), BHT (óleo de soja + 100 mg/kg de BHT), Shiitake (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de shiitake) e Cogumelo do sol (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de cogumelo do sol). Os tratamentos foram mantidos por 15 dias em estufa aquecida a 60°C, utilizando-se béqueres de 50 mL contendo 30 mL de amostra com relação superfície/volume 0,4 cm⁻¹. Todas as amostras, em diferentes intervalos de tempo (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias), foram recolhidas e inertizadas com nitrogênio gasoso e armazenadas à temperatura aproximada de -18°C até o momento das análises de índice de peróxidos e dienos conjugados.

2.3. Métodos

2.3.1. Índice de peróxidos

O índice de peróxidos determina todas as substâncias que oxidam o iodeto de potássio (KI), em miliequivalentes de oxigênio ativo por quilograma de matéria graxa. Estas substâncias são geralmente consideradas como peróxidos ou outros produtos similares da oxidação de gorduras. Este índice foi determinado segundo a norma da *American Oil Chemists' Society* Cd 8-53 (AOCS, 1993), a qual mede o iodo produzido a partir da reação do iodeto de potássio com os peróxidos.

2.3.2. Dienos conjugados

Este método determina dienos conjugados, presentes na matéria graxa, expressos como porcentagem de ácidos dienóicos conjugados, após leitura da absorbância a 233 nm. Para esta determinação foi utilizado o método AOCS Ti 1a-64 (AOCS, 1993).

2.4. Análise estatística

Os resultados obtidos em duplicata para índice de peróxidos e dienos conjugados foram submetidos às análises de variância para determinar a

influência dos fatores (tratamentos e tempos de aquecimento) sobre a alteração dos óleos submetidos ao teste acelerado em estufa. O experimento foi realizado em esquema fatorial 5 x 6, no delineamento inteiramente casualizado (BANZATTO; KRONKA, 2006). A análise de variância e o teste de Tukey para as médias a 5% foram obtidos por meio do programa ESTAT, versão 2.0 (UNESP, 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Índice de peróxidos

O Apêndice 1 apresenta a análise de variância para a determinação do índice de peróxidos, utilizando os valores obtidos ao longo do período de estocagem acelerada. Observa-se que o teste foi significativo ($p < 0,01$) para os tratamentos, tempos de aquecimento e sua interação. Dessa forma, procedeu-se ao desdobramento da interação, cujos resultados estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Médias de índice de peróxidos (meq/kg) para a interação tratamentos x tempos de aquecimento.

Tratamentos	Tempos de aquecimento (dias)					
	0	3	6	9	12	15
Controle	1,45 ^{fA}	2,48 ^{eA}	17,95 ^{dA}	42,40 ^{CA}	65,02 ^{bA}	71,28 ^{aB}
TBHQ	1,44 ^{eA}	2,26 ^{dA}	2,84 ^{dB}	4,17 ^{cC}	5,63 ^{bD}	6,47 ^{aE}
BHT	1,73 ^{eA}	2,33 ^{eA}	18,16 ^{dA}	38,90 ^{cB}	60,62 ^{bB}	78,40 ^{aA}
Shiitake	1,34 ^{fA}	2,06 ^{eA}	2,90 ^{dB}	4,43 ^{cC}	23,01 ^{bC}	41,53 ^{aC}
Cogumelo do sol	1,31 ^{dA}	2,00 ^{dA}	2,80 ^{cB}	3,45 ^{cD}	5,16 ^{bD}	8,81 ^{aD}

Controle (óleo de soja); TBHQ (óleo de soja + 100 mg/kg de TBHQ); BHT (óleo de soja + 100 mg/kg de BHT); Shiitake (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de shiitake); Cogumelo do sol (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de cogumelo do sol).

a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$);

A, B... (coluna): médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Verifica-se que, para todos os tratamentos, o índice de peróxidos aumentou ao longo do período de estocagem, havendo diferença significativa entre os tempos de aquecimento. Os tratamentos Controle e BHT sofreram

drástico aumento dos compostos primários da oxidação entre o 3º e o 6º dia de aquecimento, sendo que o índice de peróxidos do Controle aumentou 7,23 vezes e do BHT 7,80, no mesmo período. Para o tratamento Shiitake, o maior aumento foi identificado entre o 9º e 12º dia, com acréscimo de 5,20 vezes no índice de peróxidos. Apesar de o Shiitake ter apresentado melhor desempenho na proteção do óleo quando comparado com o Controle e BHT, ele não conseguiu manter a proteção até o final do período de estocagem. O Cogumelo do sol apresentou menor formação de peróxidos, já que ao longo de toda a estocagem o aumento destes compostos foi de apenas 6,76 vezes.

Analisando os tratamentos dentro de cada tempo de aquecimento, observa-se que até 3 dias de aquecimento não houve diferença significativa entre as médias dos índices de peróxidos. Ao final dos 15 dias, o melhor tratamento na proteção do óleo contra a formação dos compostos primários da oxidação foi o TBHQ, com 90,92% de proteção, seguido pelo tratamento Cogumelo do sol que reduziu em 87,64% a formação de peróxidos. Nota-se que o tratamento Shiitake não foi tão eficiente quanto o TBHQ e o Cogumelo do sol contra a formação de peróxidos, diferindo estatisticamente de ambos, mas ainda assim retardou a formação destes compostos em 41,75%.

A Portaria 482/99-ANVISA preconiza o máximo de 10 meq/kg de índice de peróxidos para o óleo de soja refinado (BRASIL, 1999). No presente estudo, o Controle e o tratamento BHT, a partir de 6 dias de estocagem, apresentaram valores acima deste limite. No entanto, o óleo de soja com extrato de shiitake foi eficiente até o 9º dia, enquanto o TBHQ e o extrato de cogumelo do sol protegeram o óleo durante os 15 dias de estocagem.

Andreo e Jorge (2007) observaram que o extrato etanólico de gengibre, TBHQ e a mistura (antioxidante TBHQ e extrato de gengibre) adicionados ao óleo de soja reduziram, em 57, 90 e 92%, respectivamente, a formação de peróxidos após 12 dias de estocagem acelerada a 60°C.

Bera, Lahiri e Nag (2006) avaliaram a estabilidade oxidativa do óleo de linhaça adicionado do extrato da semente de orégano. Ao final de 7 horas de oxidação a 30°C, o índice de peróxidos para o óleo de linhaça sem antioxidantes foi de 200 meq/kg, enquanto a adição do extrato da semente de orégano reduziu este valor para 20 meq/kg. Apesar de a proteção ter ocorrido, observou-se que o

índice de peróxidos ainda se manteve elevado ao final do teste, demonstrando a susceptibilidade do óleo de linhaça à oxidação.

Em estudo realizado por Silva et al. (2009) observou-se que a adição de extrato metanólico de cogumelo do sol reduziu em 80% a formação de peróxidos em um período de estocagem de 16 dias.

Para avaliar o comportamento antioxidante do alho, Iqbal e Bhanger (2007) adicionaram o extrato desta especiaria em óleo de girassol em concentrações de 250, 500 e 1.000 mg/kg e compararam com os antioxidantes sintéticos BHT e BHA (200 mg/kg). Verificaram que a partir do 4º dia de estocagem a 65°C houve um aumento drástico no índice de peróxidos para todos os tratamentos. Este aumento continuou até o 20º dia, seguido de um pequeno decréscimo nos 4 últimos dias de estocagem. Esta queda no índice de peróxidos pode ser justificada pela decomposição dos peróxidos em produtos secundários da oxidação.

Zhang et al. (2010) também avaliaram a estabilidade oxidativa do óleo de girassol quanto ao índice de peróxidos. Os autores verificaram a proteção do extrato de alecrim (200 mg/kg) sobre o óleo de girassol estocado durante 21 dias a 60°C, comparando com os antioxidantes sintéticos BHA, BHT e TBHQ, todos com concentração de 200 mg/kg. A inibição na formação de peróxidos foi 85,5, 24,8, 41,2, e 92,6%, respectivamente, demonstrando que, apesar do extrato de alecrim ter protegido o óleo de girassol contra a oxidação, o antioxidante sintético TBHQ ainda foi mais eficiente.

Portanto, observa-se neste estudo, que o tratamento em que ocorreu maior formação de peróxidos foi o BHT, seguido do Controle, Shiitake, Cogumelo do sol e do TBHQ.

3.2. Dienos conjugados

O Apêndice 1 apresenta a análise de variância para a determinação de dienos conjugados, empregando os valores obtidos ao longo do período de estocagem acelerada. Observa-se que o teste foi significativo ($p < 0,01$) para os tratamentos, tempos de aquecimento e sua interação. Assim, procedeu-se ao desdobramento da interação, cujos resultados estão representados na Tabela 2.

Observa-se que houve aumento gradual e progressivo na formação de dienos conjugados ao longo do tempo para os tratamentos Controle, BHT, Shiitake e Cogumelo do sol. A única exceção foi o tratamento TBHQ que não sofreu influência do tempo na formação de dienos conjugados, que pode ser justificado pelo maior poder antioxidante desta substância. O Shiitake e o Cogumelo do sol, apesar de apresentarem aumento de dienos conjugados, sofreram menos influência do tempo de aquecimento se comparados ao Controle e BHT, que tiveram os teores de dienos crescentes desde os primeiros dias de aquecimento. Para o Shiitake e o Cogumelo do sol, a formação de dienos conjugados só aumentou de forma significativa a partir do 9º dia de aquecimento.

Tabela 2 – Médias de dienos conjugados (%) para a interação tratamentos x tempos de aquecimento.

Tratamentos	Tempos de aquecimento (dias)					
	0	3	6	9	12	15
Controle	0,34 ^{fA}	0,49 ^{eA}	0,54 ^{dA}	0,69 ^{cA}	0,83 ^{bA}	1,07 ^{aA}
TBHQ	0,35 ^{aA}	0,36 ^{aC}	0,35 ^{aC}	0,37 ^{aC}	0,37 ^{aD}	0,37 ^{aE}
BHT	0,35 ^{fA}	0,38 ^{eB}	0,48 ^{dB}	0,65 ^{cB}	0,79 ^{bB}	1,00 ^{aB}
Shiitake	0,35 ^{cA}	0,36 ^{cC}	0,36 ^{cC}	0,37 ^{cC}	0,50 ^{bC}	0,67 ^{aC}
Cogumelo do sol	0,35 ^{cA}	0,37 ^{bcBC}	0,36 ^{bcC}	0,36 ^{cC}	0,38 ^{bD}	0,40 ^{aD}

Controle (óleo de soja); TBHQ (óleo de soja + 100 mg/kg de TBHQ); BHT (óleo de soja + 100 mg/kg de BHT); Shiitake (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de shiitake); Cogumelo do sol (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de cogumelo do sol).

a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$);

A, B... (coluna): médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Para cada tempo de aquecimento verifica-se que, inicialmente, não houve diferença significativa entre os teores dos dienos em todos os tratamentos. Até o 9º dia de estocagem, não houve diferença significativa nos valores de dienos conjugados nos tratamentos TBHQ, Shiitake e Cogumelo do sol, representando o efeito protetor destes antioxidantes frente à formação dos produtos da oxidação. Ao final do período de estocagem, o TBHQ reduziu a formação de dienos conjugados em 65,42%, seguido pelo Cogumelo do sol com redução de 62,62%, Shiitake, 37,38% e BHT, 6,54%, medidos em relação ao controle.

A determinação de dienos conjugados por Iqbal e Bhangar (2007) demonstrou maior eficiência para o BHT e BHA (200 mg/kg), seguido pelos

extratos de alho a 1.000, 500 e 250 mg/kg ao final de 24 dias de estocagem, ficando este último com valor de dienos conjugados em torno de 12%. A formação de dienos conjugados pode estar relacionada ao alto conteúdo de ácido graxos poliinsaturados no óleo de girassol.

Coimbra, Del Ré e Jorge (2009) também estudaram o efeito da adição do extrato de alho em óleo de soja e constataram que, no tempo de estocagem de 12 dias, o extrato de alho, nas concentrações de 1.000, 1.500 e 2.000 mg/kg, mostrou efeito antioxidante superior ao BHT, porém inferior ao TBHQ nas concentrações de 100 e 50 mg/kg, respectivamente.

Luzia e Jorge (2009) estudaram o teor de dienos conjugados em óleo de soja adicionado de extrato de limão (2.400 mg/kg) submetido à estocagem acelerada por 12 dias. Ao final do processo, o extrato de limão apresentou apenas 7% de redução na formação de dienos conjugados, enquanto a mistura de extrato de limão com o antioxidante sintético TBHQ (2.400 mg/kg de extrato de limão + 50 mg/kg de TBHQ) reduziu em 49% a formação destes compostos indesejáveis, demonstrando a eficácia do sinergismo entre os dois tipos de antioxidantes.

Em estudo realizado por Angelo e Jorge (2008), o extrato de coentro, palmitato de ascorbila e mistura destes antioxidantes, quando adicionados ao óleo de girassol, apresentaram capacidade em retardar a formação de dienos conjugados em 11,2, 59,9 e 60,9%, respectivamente, após 10 dias de estocagem acelerada a 60°C.

Ao final dos 15 dias de estocagem acelerada, os resultados obtidos nos testes de índice de peróxidos e dienos conjugados apresentaram elevado coeficiente de correlação ($r = 0,974$) para as médias dos tratamentos utilizados.

4. CONCLUSÕES

Ao final deste ensaio pode-se concluir que o antioxidante sintético TBHQ conferiu maior estabilidade oxidativa ao óleo de soja submetido à estocagem acelerada. No entanto, o extrato metanólico de cogumelo do sol também foi eficiente na proteção do óleo de soja contra a oxidação lipídica, seguido pelo extrato de shiitake. Desta forma, ambos os extratos naturais mostraram-se eficazes antioxidantes quando aplicados em óleo de soja.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE – **Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais**. Disponível em: <http://www.abiove.com.br/estatistica_br.html>. Acesso em 26 jun. 2010.

ANDREO, D.; JORGE, N. Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de gengibre (*Gengiber officinale*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 2, p. 152-157, 2007.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Antioxidant evaluation of extract and ascorbyl palmitate in sunflower oil under thermoxidation. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, Chicago, v. 85, n. 11, p. 1045-1049, 2008.

AOCS. AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Chicago: AOCS, 1993.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**, 4. ed. Jaboticabal: Editora Funep, 2006, 237p.

BERA, D.; LAHIRI, D.; NAG, A. Studies on a natural antioxidant for stabilization of edible oil and comparison with synthetic antioxidants. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 74, n. 4, p. 542-545, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 04/88. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO, **Compêndio da Legislação de Alimentos**. São Paulo: ABIA, 2001. v.1, p. 3-26.

BRASIL. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, v. 196, 13 out. 1999. Seção I, p. 82-87.

COIMBRA, M. C.; DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Influência do extrato de alho na estabilidade oxidativa do óleo de soja refinado. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 5, p. 547-550, 2009.

ELMASTAS, M. et al. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Compounds and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 3-4, p. 337-345, 2007.

FAO – **Food and Agriculture Organization**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/010/ah876e/ah876e06.htm>>. Acesso em: 26 jun. 2010.

FARHOOSH, R.; EINAFSHAR, S.; SHARAYEI, P. The effect of commercial refining steps on the measures of soybean and canola oils. **Food Chemistry**, London, v. 115, n. 3, p. 933-938, 2009.

HAMILTON et al. **Rancidity in Foods**. Ed. Applied Science Publishers LTD.;

London, 1983, p.1.

IQBAL, S.; BHANGER, M. I. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 1, p. 246-254, 2007.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Ação antioxidante do extrato de semente de limão (*Citrus lemon*) adicionado ao óleo de soja sob termoxidação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 219-223, 2009.

POKORNÝ, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science and Technology**, Chicago, v. 2, n. 9, p. 223-227, 1991.

REISCHE; D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R. Antioxidants. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 489-516.

SILVA, A. C. et al. Utilização do extrato de cogumelo como antioxidante natural em óleo vegetal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 4, p. 1103-1108, 2009.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, **ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 2.0, Jaboticabal, 1999, 1 disquete.

ZHANG, Y. et al. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. **Food Chemistry**, London, v. 118, n. 3, p. 656-662, 2010.

6. APÊNDICE

Apêndice 1 – Análise de variância para as determinações de índice de peróxidos (IP) e dienos conjugados (DC).

Causas de Variação	G. L.	Quadrados médios	
		IP	DC
Tratamentos	4	2.705,2047**	0,2312**
Tempos de aquecimento	5	2.678,0090**	0,1734**
Tratamentos x tempos de aquecimento	20	443,4370**	0,0316**
Resíduo	30	0,0594	0,0000
Desvio padrão		0,2343	0,0059
Coeficiente de variação (%)		1,35	1,22

** Significativo ($p < 0,01$).

Capítulo 4

Influência dos extratos de shiitake (*Lentinus edodes*) e cogumelo do sol (*Agaricus blazei*) sobre a retenção de tocoferóis em óleo de soja em teste de estocagem acelerada

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência dos extratos metanólicos de shiitake e cogumelo do sol sobre a retenção de tocoferóis em óleo de soja, quando submetido ao teste de estocagem acelerada. Os tratamentos: Controle (óleo de soja sem antioxidantes), TBHQ (óleo de soja + 100 mg/kg de TBHQ), BHT (óleo de soja + 100 mg/kg de BHT), Shiitake (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de shiitake) e Cogumelo do sol (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de cogumelo do sol) foram preparados e submetidos ao teste de estocagem acelerada em estufa, a 60°C durante 15 dias. As amostras foram recolhidas a cada 3 dias e analisadas quanto aos teores de ácidos graxos livres e de tocoferóis naturalmente presentes no óleo de soja adicionado de extratos de cogumelo. Além disso, as amostras também foram analisadas diariamente quanto ao ganho de massa. Os resultados demonstraram que tanto os antioxidantes sintéticos quanto os naturais foram eficientes contra a formação de ácidos graxos livres, pois, ao final do aquecimento, apresentaram teor de ácidos graxos livres inferior a 0,3%, limite estabelecido pela legislação brasileira. Quanto ao ganho de massa, o tempo requerido para se alcançar 0,5% de aumento de massa foi de 13 dias para o TBHQ e 15 para o Cogumelo de sol. Os tratamentos TBHQ e Cogumelo do sol contribuíram, também para a retenção dos tocoferóis totais e seus isômeros no óleo submetido à estocagem acelerada, sendo que ao final de 15 dias de aquecimento, o teor de tocoferóis totais para o TBHQ foi de 457,50 mg/kg e para o Cogumelo do sol, 477,20 mg/kg. Os resultados revelaram o cogumelo do sol como um potente antioxidante para a estabilidade do óleo de soja.

Palavras-chave: cogumelos, ácidos graxos livres, ganho de massa, teor residual de tocoferóis.

1. INTRODUÇÃO

A oxidação lipídica é a principal causa da perda de qualidade dos alimentos gordurosos durante o processamento e estocagem. Esta degradação pode causar alterações do sabor, odor e coloração além de destruir vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos poliinsaturados. A indústria de alimentos tenta minimizar esta deterioração com o uso de antioxidantes sintéticos como BHA, BHT e TBHQ. No entanto, o uso destes aditivos é estritamente controlado devido aos danos que podem causar à saúde humana (GONZÁLEZ-MONTELONGO; LOBO; GONZÁLEZ, 2010).

No Canadá e Comunidade Européia o uso de TBHQ não é permitido (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002); o *Codex Alimentarium* limita em 200 mg/kg o uso de BHT e TBHQ em óleos vegetais (FAO, 2010) e, no Brasil, o uso de antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde que preconiza 100 mg/kg a concentração máxima permitida para BHT e 200 mg/kg para TBHQ (BRASIL, 2001).

A crescente preocupação sobre a segurança alimentar por parte dos consumidores induz a indústria alimentícia a buscar alternativas mais seguras e naturais que possam substituir os antioxidantes sintéticos.

Muitos pesquisadores têm se dedicado à busca de compostos naturais a partir de sub-produtos como bagaços de uva (LAFKA; SINANOGLU; LAZOS, 2007; PINELO et al., 2005), casca de laranja (XU et al., 2008), casca de romã (LI et al., 2006) e carambola (SHUI; LEONG, 2006).

Cogumelos também têm sido alvo de pesquisas por apresentarem quantidades significativas de compostos fenólicos além de algumas variedades, como o shiitake e o cogumelo do sol, proporcionarem o fortalecimento do sistema imunológico quando consumidos freqüentemente (CHOI et al., 2006; HUANG; MAU, 2006). A ação *in vivo* dos cogumelos também foi avaliada no tratamento de diabetes, hipertensão e hepatite (FORTES, NOVAES, 2006). Porém, poucas pesquisas são dedicadas em avaliar a ação antioxidante dos extratos de cogumelos frente à oxidação lipídica.

Uma das medidas de qualidade é o teor de ácidos graxos livres presentes em óleos vegetais. A acidez de um óleo é uma das suas principais características e tem importante impacto sobre seu preço e qualidade e seu aumento deve-se à

hidrólise de triacilgliceróis (ARAÚJO, 2006). O ganho de massa sofrido pela amostra lipídica também é uma medida da oxidação, já que determina a assimilação de oxigênio pelas insaturações dos ácidos graxos (IQBAL; BHANGER, 2007).

Os tocoferóis são compostos monofenólicos, existentes em vegetais, principalmente em sementes de oleaginosas e folhas, que possuem atividade antioxidante e de vitamina E. A nomenclatura desses compostos recebe o prefixo de α , β , γ e δ , dependendo do número e posição do grupo metila ligado ao anel aromático. O α -tocoferol é o composto que apresenta maior atividade de vitamina E (MAU et al., 2004; YANG; LIN; MAU, 2002).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos extratos metanólicos de shiitake e de cogumelo do sol sobre a retenção de tocoferóis em óleo de soja, quando submetido ao teste de estocagem acelerada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Cogumelos

Cerca de 4,0 kg do cogumelo shiitake *in natura*, produzido e comercializado na região de Salto/SP, no mês de abril/2009, depois de embalado e resfriado, foi enviado diretamente ao Laboratório de Óleos e Gorduras do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da UNESP. O cogumelo do sol *in natura* foi adquirido na região de São José do Rio Preto/SP durante os meses de abril, maio e setembro/2009 totalizando cerca de 3,0 kg. Imediatamente após sua colheita foi lavado e encaminhado ao Laboratório de Óleos e Gorduras do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da UNESP.

As amostras foram congeladas a -30°C por um tempo mínimo de 24 horas, liofilizadas em liofilizador da marca Liotop modelo L101 e trituradas em um moinho marca Eberle, modelo 2508.001-2. O pó obtido foi armazenado em recipientes plásticos escuros, vedados com tampas de rosca e devidamente rotulados, para análises posteriores. Depois de trituradas, as amostras de

cogumelo do sol foram homogeneizadas a fim de minimizar possíveis variações entre os lotes.

2.1.2. Óleo

Para a análise da estabilidade oxidativa utilizou-se o óleo de soja refinado sem adição de antioxidantes sintéticos (TBHQ e ácido cítrico), da marca Cargil Agrícola S/A, adquirido em embalagens de 900 mL no comércio local de São José do Rio Preto/SP.

2.1.3. Extratos e antioxidantes

De acordo com as análises de atividade antioxidante realizadas pelos métodos DPPH[•] e β -caroteno/ácido linoléico, o extrato metanólico obtido por extração lenta (*shaker*, 3 horas, 120 rpm) foi aplicado ao óleo de soja por apresentar maior atividade antioxidante. A obtenção do extrato foi feita numa proporção de 1:10 (8 g de cogumelo e 80 mL de metanol), ao abrigo de luz e à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 3.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante filtrado com bomba a vácuo e submetido ao evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40°C. O extrato seco foi pesado e ressuspenso em metanol, obtendo-se uma solução-estoque contendo 1,0 grama de extrato para cada 10,0 gramas de solvente metanol (1:10), utilizada para aplicação direta no óleo de soja.

Os antioxidantes sintéticos *Terc* butil hidroquinona (TBHQ) (100 mg/kg) e butil hidroxitolueno (BHT) (100 mg/kg) foram utilizados na forma comercial, fornecidos pela empresa Danisco S/A.

2.2. Ensaio experimental

Foram submetidos ao teste acelerado em estufa os seguintes tratamentos: Controle (óleo de soja sem antioxidantes), TBHQ (óleo de soja + 100 mg/kg de TBHQ), BHT (óleo de soja + 100 mg/kg de BHT), Shiitake (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de shiitake) e Cogumelo do sol (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de cogumelo do sol). Os tratamentos foram mantidos por 15 dias

em estufa aquecida a 60°C, utilizando-se béqueres de 50 mL contendo 30 mL de amostra com relação superfície/volume 0,4 cm⁻¹. Todas as amostras, em diferentes intervalos de tempo (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias), foram recolhidas e inertizadas com nitrogênio gasoso e armazenadas à temperatura aproximada de -18°C até o momento das análises de teores de ácidos graxos livres e de tocoferóis presentes naturalmente no óleo de soja adicionado de extratos de cogumelos. Simultaneamente foi conduzido o teste de ganho de massa, no qual placas de Petri contendo as amostras de óleos eram retiradas diariamente da estufa para pesagem.

2.3. Métodos

2.3.1. Ácidos graxos livres

Denomina-se grau de acidez a porcentagem de ácidos graxos livres que estão contidos em um óleo, expressos como ácido oléico. Óleos e gorduras, na presença de umidade e calor são susceptíveis à hidrólise provocando a quebra do triacilglicerol, liberando ácidos graxos. Esta hidrólise é acelerada na presença de minerais metálicos, luz e temperatura elevada. O método usado é o proposto pela *American Oil Chemists' Society Cd 8-53* (AOCS, 1993).

2.3.2. Ganho de massa

Na análise de ganho de massa, 2,0 g de cada amostra de óleo foram pesados em placas de Petri e colocados em estufa a 60°C. A taxa de oxidação, em termos de ganho de massa, foi medida a cada 24 horas num intervalo de 16 dias. O índice de estabilidade foi definido como o tempo requerido para um aumento de massa de 0,5% (IQBAL; BHANGER, 2007).

2.3.3. Tocoferóis

Para a análise cromatográfica de tocoferóis, realizada segundo o método AOCS Ce 8-89 (1997), foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Varian, modelo Pro Star 210, equipado com detector de fluorescência. De

acordo com as condições da análise, foi utilizada a coluna de sílica de 250 x 4,6 mm com poros de 5 µm, fluxo de 1,2 mL/min, comprimento de onda de excitação em 290 nm e de emissão em 330 nm e como fase móvel a mistura de 99,5% de n-hexano e 0,5% de isopropanol, todos com grau de pureza para CLAE. A identificação de tocoferóis foi feita por comparação com o tempo de retenção dos padrões marca Sigma grau de pureza 95%. Estes foram quantificados por padronização externa e os teores de tocoferóis expressos em termos de mg/kg.

2.4. Análise estatística

Os resultados obtidos para ácidos graxos livres, ganho de massa e tocoferóis, em duplicata, foram submetidos à análise de variância para estudar a influência dos fatores (tratamentos e tempos de aquecimento) sobre a alteração das amostras de óleos submetidos à estocagem acelerada. O experimento foi realizado em esquema fatorial no delineamento inteiramente casualizado (BANZATTO; KRONKA, 2006). A análise de variância e o teste de Tukey para as médias a 5% foram obtidos por meio do programa ESTAT, versão 2.0 (UNESP, 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ácidos graxos livres

O Apêndice 1 apresenta a análise de variância para a determinação de ácidos graxos livres, utilizando os valores obtidos ao longo do período de estocagem acelerada. Observa-se que o teste foi significativo ($p < 0,01$) para os tratamentos, tempos de aquecimento e sua interação. Dessa forma, procedeu-se ao desdobramento da interação, cujos resultados estão representados na Tabela 1.

Observa-se que para os tratamentos Controle, TBHQ e BHT houve aumento no valor de ácidos graxos livres ao longo do tempo de aquecimento. O Shiitake apresentou maior porcentagem de ácidos graxos livres no tempo zero e, nos demais tempos a porcentagem permaneceu constante. O teor de ácidos graxos livres do tratamento Cogumelo do sol também foi elevado no tempo zero,

porém sofreu uma redução significativa no 3º dia e prosseguiu com aumento ao longo do tempo de aquecimento.

Tabela 1 – Médias de ácidos graxos livres (% em ácido oléico) para a interação tratamentos x tempos de aquecimento.

Tratamentos	Tempos de aquecimento (dias)					
	0	3	6	9	12	15
Controle	0,201 ^{dC}	0,211 ^{cdA}	0,220 ^{bcA}	0,229 ^{bcA}	0,236 ^{abA}	0,250 ^{aA}
TBHQ	0,194 ^{cC}	0,201 ^{bcA}	0,209 ^{abcA}	0,214 ^{abA}	0,222 ^{aA}	0,227 ^{aB}
BHT	0,194 ^{cC}	0,206 ^{bcA}	0,207 ^{bcA}	0,212 ^{abcA}	0,218 ^{abA}	0,228 ^{aB}
Shiitake	0,275 ^{aB}	0,217 ^{ba}	0,221 ^{ba}	0,213 ^{ba}	0,229 ^{ba}	0,227 ^{baB}
Cogumelo do sol	0,343 ^{aA}	0,201 ^{da}	0,204 ^{cdA}	0,217 ^{bcdA}	0,220 ^{bcA}	0,224 ^{baB}

Controle (óleo de soja); TBHQ (óleo de soja + 100 mg/kg de TBHQ); BHT (óleo de soja + 100 mg/kg de BHT); Shiitake (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de shiitake); Cogumelo do sol (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de cogumelo do sol).

a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$);

A, B... (coluna): médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Analisando os tratamentos para cada tempo, verifica-se que entre o 3º e o 12º dia não houve diferença significativa entre as médias de ácidos graxos livres. Esta diferença foi verificada no último dia de aquecimento, sendo que apenas o controle diferiu dos demais tratamentos, demonstrando a eficiência de todos os antioxidantes na prevenção do aumento da acidez.

O limite máximo de acidez para óleo de soja refinado estabelecido pela ANVISA é de 0,3 g de ácido oléico/100 g de amostra (Brasil, 1999). Verifica-se, pela Tabela 1, que todos os tratamentos permaneceram dentro do limite estabelecido ao final dos 15 dias de aquecimento.

Em estudo realizado por Iqbal e Bhager (2007), o teor de ácidos graxos livres foi determinado. Os autores adicionaram extrato de alho em óleo de girassol em concentrações de 250, 500 e 1.000 mg/kg e compararam com os antioxidantes sintéticos BHT e BHA (200 mg/kg). Ao submeterem as amostras à estocagem acelerada por 24 dias observaram que, com exceção do controle, todas as amostras apresentaram ácidos graxos livres inferiores a 0,2 mg de ácido oléico/100 g.

A qualidade do óleo de girassol também foi avaliada por Zhang et al. (2010). Os autores verificaram que após 21 dias de estocagem do óleo a 60°C, o

teor de acidez no tratamento com o extrato de alecrim (200 mg/kg) foi 0,38 mg/100 g, enquanto os tratamentos BHA, BHT e TBHQ (200 mg/kg) apresentaram 0,46, 0,34 e 0,2 mg/100 g de ácidos graxos livres, demonstrando que o antioxidante sintético TBHQ protegeu mais o óleo contra os efeitos da oxidação.

3.2. Ganho de massa

A verificação do ganho de massa é empregada para estimar a quantidade de oxigênio adicionada às moléculas insaturadas da amostra lipídica e também para acompanhar a formação de hidroperóxidos durante a oxidação. O ganho de massa foi medido para todas as amostras em intervalos de tempo de 24 horas durante 16 dias e os resultados, em porcentagem, estão na Figura 1.

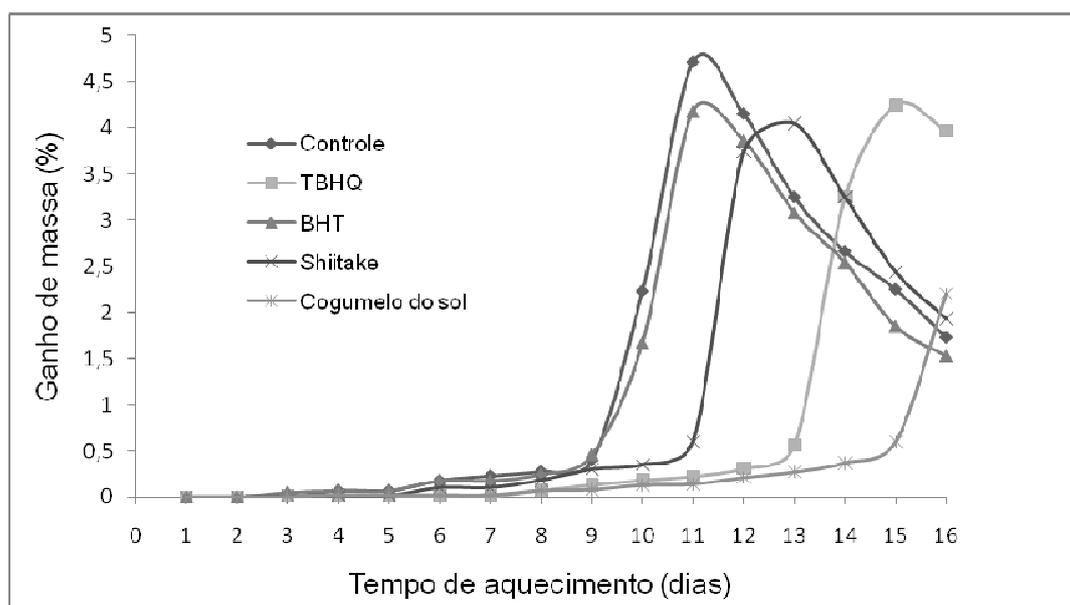


Figura 1 – Ganho de massa dos tratamentos submetidos à estocagem acelerada.

Na Figura 1 observa-se que os tempos requeridos para alcançar 0,5% de aumento de massa foram 10, 13, 10, 11 e 15 dias para o Controle, TBHQ, BHT, Shiitake e Cogumelo do sol, respectivamente. Segundo Evans et al. (1973), cada dia de estocagem em estufa a 60°C equivale a um mês de estocagem em temperatura ambiente. Inicialmente, o ganho de massa não foi significativo, mas

um aumento repentino pôde ser observado em todas as amostras seguido de declínio para Controle, TBHQ, BHT e Shiitake ao longo da estocagem. O declínio do ganho de massa se deve ao fato de que os peróxidos, produtos primários da oxidação formados durante o período de estocagem acelerada, podem ser degradados em compostos de baixa massa molecular inclusive substâncias voláteis.

O Controle manteve-se estável até o 9º dia, seguido de repentino aumento até o 11º dia assumindo o máximo de 4,71% de aumento de massa, com posterior decréscimo até o final do período de estocagem. O tratamento BHT apresentou comportamento similar ao Controle, assumindo maior ganho de massa em 11 dias de aquecimento, com 4,18%. O Shiitake mostrou-se eficiente contra a oxidação até o 11º dia de aquecimento, sendo que o máximo valor apresentado foi 4,05% após 13 dias de estocagem. O TBHQ não apresentou aumento significativo da massa até o 13º dia, já o Cogumelo do sol conseguiu esta proteção até o 15º dia, seguido de aumento súbito, mostrando-se mais eficiente na proteção do óleo contra a oxidação frente aos demais tratamentos.

O Apêndice 2 apresenta a análise de variância para o ganho de massa, utilizando os valores obtidos ao longo da estocagem acelerada. Observa-se que o teste foi significativo ($p < 0,01$) para os tratamentos, tempos de aquecimento e sua interação. Dessa forma, procedeu-se ao desdobramento da interação, cujos resultados estão representados na Tabela 2.

É possível constatar que entre os tempos 12 e 14 dias o tratamento TBHQ sofreu aumento de 10,5 vezes em sua massa, demonstrando a limitação do antioxidante comercial em prolongar a vida de prateleira do óleo de soja. Até o 8º dia de aquecimento não houve diferença significativa entre os tratamentos. No tempo correspondente a 10 dias somente o Controle e o BHT diferiram estatisticamente dos demais tratamentos. Portanto, conforme a Figura 1 e Tabela 2, pôde-se observar que a proteção contra a oxidação do óleo de soja foi mais bem evidenciada pelo Cogumelo do sol, seguido do TBHQ e Shiitake.

Iqbal e Bhanger (2007) acompanharam o ganho de massa do óleo de girassol adicionado de extrato de alho (250, 500 e 1.000 mg/kg) submetido à estocagem acelerada durante 14 dias a 65°C. Como comparação utilizaram BHT a 200 mg/kg. Verificaram que o extrato de alho a 1.000 mg/kg foi o mais eficiente

Tabela 2 – Médias de ganho de massa (%) para a interação tratamentos x tempos de aquecimento.

Tratamentos	Tempos de aquecimento (dias)							
	2	4	6	8	10	12	14	16
Controle	0,00 ^{Ea}	0,09 ^{eA}	0,13 ^{eA}	0,28 ^{eA}	2,23 ^{cA}	4,15 ^{aA}	2,66 ^{bB}	1,73 ^{dCD}
TBHQ	0,00 ^{Ca}	0,01 ^{cA}	0,01 ^{cA}	0,07 ^{cA}	0,18 ^{cC}	0,31 ^{cC}	3,25 ^{bA}	3,97 ^{aA}
BHT	0,00 ^{dA}	0,07 ^{dA}	0,18 ^{dA}	0,25 ^{dA}	1,67 ^{cB}	3,86 ^{aAB}	2,54 ^{bB}	1,53 ^{cD}
Shiitake	0,00 ^{Da}	0,01 ^{dA}	0,10 ^{dA}	0,18 ^{dA}	0,35 ^{dC}	3,74 ^{aB}	3,25 ^{bA}	1,93 ^{cBC}
Cogumelo do sol	0,00 ^{Ba}	0,02 ^{bA}	0,02 ^{bA}	0,07 ^{bA}	0,13 ^{bC}	0,21 ^{bC}	0,37 ^{bC}	2,20 ^{aB}

Controle (óleo de soja); TBHQ (óleo de soja + 100 mg/kg de TBHQ); BHT (óleo de soja + 100 mg/kg de BHT); Shiitake (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de shiitake); Cogumelo do sol (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de cogumelo do sol).

a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$);

A, B... (coluna): médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

na proteção do óleo, seguido pelo BHT. O óleo de girassol sem adição de antioxidantes, ao contrário do óleo de soja, apresentou ganho de massa logo nos primeiros dias de estocagem. Isto mostra que o óleo de girassol é mais suscetível à oxidação já que o seu teor de insaturação (89%) é maior em relação ao óleo de soja (83,4%).

3.3. Tocoferóis

A retenção de tocoferóis no óleo de soja é uma maneira de se avaliar a eficiência dos extratos de cogumelos adicionados ao óleo durante a estocagem acelerada e compará-los com os antioxidantes sintéticos.

O Apêndice 3 mostra a análise de variância para a retenção de tocoferóis ao longo da estocagem acelerada. Como observado, o teste foi significativo ($p < 0,01$) para os efeitos tratamentos, tempos de aquecimento e sua interação. Desta forma procedeu-se ao desdobramento da interação, cujos resultados estão expressos na Tabela 3.

Observa-se que os teores de α -tocoferol permaneceram constantes nos tratamentos TBHQ e Cogumelo do sol, enquanto nos demais tratamentos os teores deste isômero decresceram com o tempo de aquecimento. Ao final de 15 dias verificou-se que não houve diferença significativa no teor de α -tocoferol para os tratamentos TBHQ e Cogumelo do sol assim como para o Controle e o BHT.

O único tratamento que efetivamente protegeu os teores de β -tocoferol foi o Cogumelo do sol. Para os demais tratamentos, foi observado um leve decaimento da quantidade do referido isômero, principalmente ao final do processo de estocagem. O TBHQ e Cogumelo do sol foram estatisticamente iguais aos 15 dias, da mesma forma como foram o Controle, o BHT e o Shiitake.

Os teores de γ -tocoferol foram mantidos ao longo do aquecimento por todos os tratamentos, exceto pelo Shiitake que apresentou queda significativa nos tempos 12 e 15 dias. Do mesmo modo como foi observado no isômero anterior, ao final dos 15 dias, o TBHQ e Cogumelo do sol foram estatisticamente iguais assim como o Controle, BHT e Shiitake.

Tabela 3 – Médias dos teores de tocoferóis e de seus homólogos (mg/kg) para a interação tratamentos x tempos de aquecimento.

Tratamentos	Tempos de aquecimento (dias)					
	0	3	6	9	12	15
α-tocoferol						
Controle	55,75 ^{aC}	57,35 ^{aB}	49,45 ^{bD}	33,20 ^{cD}	21,90 ^{dD}	12,10 ^{eC}
TBHQ	60,10 ^{aBC}	60,20 ^{aAB}	55,30 ^{aCD}	55,50 ^{aB}	57,95 ^{aA}	57,65 ^{aA}
BHT	60,50 ^{aBC}	61,40 ^{aAB}	58,60 ^{aBC}	48,55 ^{bC}	31,20 ^{cC}	17,05 ^{dC}
Shiitake	62,75 ^{aAB}	65,20 ^{aA}	63,30 ^{aAB}	62,15 ^{aA}	45,25 ^{bB}	44,45 ^{bB}
Cogumelo do Sol	66,20 ^{aA}	65,30 ^{aA}	64,70 ^{aA}	63,85 ^{aA}	61,90 ^{aA}	63,00 ^{aA}
β-tocoferol						
Controle	5,5 ^{bB}	6,40 ^{aA}	5,05 ^{bB}	5,00 ^{bB}	4,90 ^{bB}	5,15 ^{bB}
TBHQ	6,30 ^{abAB}	6,15 ^{abA}	6,40 ^{aA}	5,95 ^{abA}	6,20 ^{abA}	5,5 ^{bA}
BHT	6,25 ^{aAB}	6,15 ^{aA}	6,30 ^{aA}	6,45 ^{aA}	6,15 ^{aA}	5,05 ^{bB}
Shiitake	6,50 ^{aA}	6,25 ^{aA}	6,30 ^{aA}	6,26 ^{aA}	6,25 ^{aA}	4,70 ^{bB}
Cogumelo do sol	5,7 ^{aB}	5,80 ^{aA}	5,75 ^{aAB}	6,2 ^{aA}	5,96 ^{aA}	6,00 ^{aA}
γ-tocoferol						
Controle	266,30 ^{aB}	283,15 ^{aC}	256,80 ^{aB}	269,70 ^{aC}	261,00 ^{aB}	254,65 ^{aB}
TBHQ	303,6 ^{aA}	289,90 ^{abC}	294,35 ^{aA}	284,40 ^{abC}	305,70 ^{aA}	304,90 ^{aA}
BHT	317,75 ^{aA}	317,30 ^{aAB}	320,95 ^{aA}	300,05 ^{aAB}	284,20 ^{aAB}	269,45 ^{aB}
Shiitake	311,95 ^{abA}	321,50 ^{aA}	317,10 ^{abA}	317,95 ^{abA}	289,55 ^{abB}	241,10 ^{cB}
Cogumelo do sol	324,25 ^{aA}	316,35 ^{aAB}	322,80 ^{aA}	323,55 ^{aA}	305,65 ^{aA}	317,75 ^{aA}
δ-tocoferol						
Controle	81,15 ^{aB}	82,20 ^{aB}	80,10 ^{aC}	82,75 ^{aB}	80,05 ^{aA}	80,05 ^{aA}
TBHQ	85,15 ^{aAB}	85,20 ^{aAB}	83,25 ^{aBC}	80,85 ^{aB}	86,35 ^{aA}	89,45 ^{aA}
BHT	88,45 ^{aAB}	88,85 ^{aAB}	89,55 ^{aAB}	90,20 ^{aA}	87,70 ^{aA}	86,55 ^{aA}
Shiitake	92,50 ^{aA}	93,15 ^{aA}	92,00 ^{aA}	88,40 ^{aA}	87,35 ^{aA}	72,80 ^{bB}
Cogumelo do sol	93,05 ^{aA}	83,70 ^{bB}	89,60 ^{abAB}	89,90 ^{abA}	87,85 ^{abA}	90,45 ^{abA}
Tocoferóis Totais						
Controle	408,70 ^{abB}	429,10 ^{aC}	391,40 ^{abC}	390,65 ^{abC}	367,85 ^{bC}	351,95 ^{cB}
TBHQ	455,25 ^{aA}	441,45 ^{abC}	439,30 ^{aB}	426,70 ^{abC}	456,20 ^{aA}	457,50 ^{aA}
BHT	472,50 ^{aA}	473,70 ^{aAB}	475,40 ^{aAB}	445,25 ^{abAB}	409,25 ^{bcBC}	378,10 ^{cB}
Shiitake	473,70 ^{abA}	486,10 ^{aA}	478,50 ^{aAB}	474,75 ^{aA}	428,40 ^{abAB}	363,05 ^{cB}
Cogumelo do sol	489,45 ^{aA}	466,20 ^{aABC}	482,85 ^{aA}	483,34 ^{aA}	461,35 ^{aA}	477,20 ^{aA}

Controle (óleo de soja); TBHQ (óleo de soja + 100 mg/kg de TBHQ); BHT (óleo de soja + 100 mg/kg de BHT); Shiitake (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de shiitake); Cogumelo do sol (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de cogumelo do sol).

a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$);

A, B... (coluna): médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Todos os tratamentos exerceram proteção também para o δ -tocoferol. No Controle, TBHQ e BHT, os teores deste isômero permaneceram constantes. Já no Shiitake foi observada queda somente no 15^o dia, enquanto para o Cogumelo do sol houve queda no 3^o dia de aquecimento, mas o teor foi mantido no restante da estocagem.

Para os teores de tocoferóis totais, verificou-se que o efeito protetor do Controle e do BHT foram decrescentes ao longo da estocagem, sendo que ao final de 15 dias o óleo apresentou 351,95 e 378,10 mg/kg de tocoferóis totais, respectivamente. O Shiitake foi efetivo na proteção dos tocoferóis totais do óleo de soja até o 9^o dia de estocagem, apresentando 363,05 mg/kg de tocoferóis no tempo 15 dias, estatisticamente igual ao Controle e BHT. Para os tratamentos TBHQ e Cogumelo do sol não houve redução do teor de tocoferóis totais ao longo do tempo de estocagem apresentando, em média, 446,07 e 476,73 mg/kg de tocoferóis totais, respectivamente.

De maneira geral, observou-se que o efeito dos tratamentos sobre o teor de tocoferóis totais e seus homólogos foi mais significativo se comparado ao efeito dos tempos de aquecimento. Isso se deve ao fato do ensaio ter sido conduzido em temperatura branda, ou seja, 60°C. Trabalhos em que são realizadas termoxidações do óleo, onde são simulados os processos de fritura, temperaturas mais severas são aplicadas ao óleo, chegando a 180°C. Nestes casos, é possível observar de maneira mais explícita a perda do efeito protetor dos tocoferóis por parte dos antioxidantes (ANGELO; JORGE, 2008; RAMALHO; JORGE, 2005).

Para melhor avaliação da proteção dos tocoferóis presentes naturalmente em óleo de soja, foi calculado o teor residual (%) dos tocoferóis ao longo do período de estocagem. Estes valores estão representados na Figura 2.

Observa-se que a degradação dos tocoferóis só foi significativa, ou seja, menor que 50%, para os tratamentos Controle e BHT no homólogo α -tocoferol. Com exceção do Controle, todos os tratamentos protegeram o α -tocoferol do óleo de soja até o 6^o dia de estocagem e, a partir do 9^o dia já foi observada a perda de α -tocoferol para o BHT. Ao final do ensaio, o antioxidante que se mostrou mais eficaz na retenção de α -tocoferol foi o TBHQ (95,18%), seguido pelo extrato de cogumelo do sol (95,17%), extrato de shiitake (70,84%), BHT (28,18%) e, finalmente o controle (21,17%).

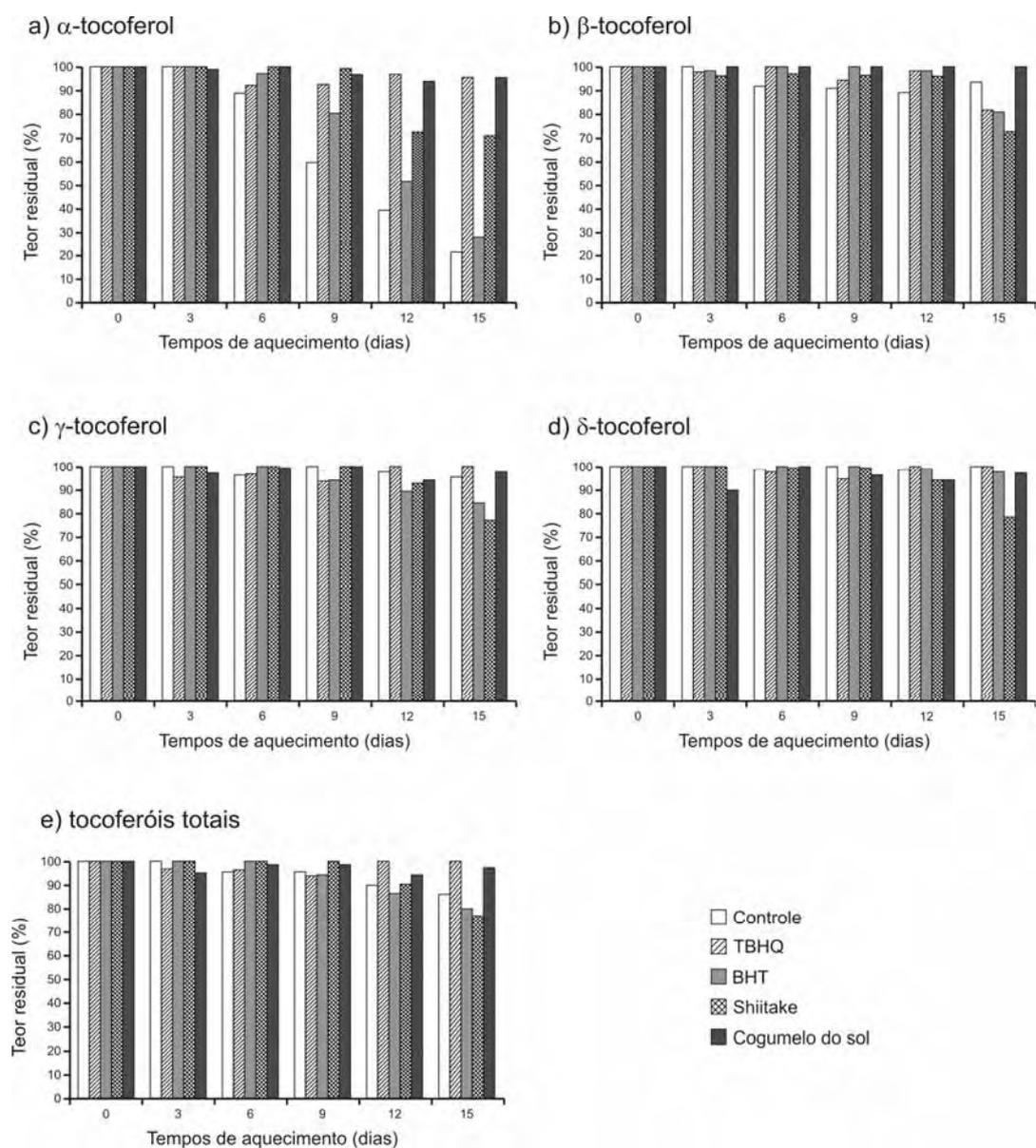
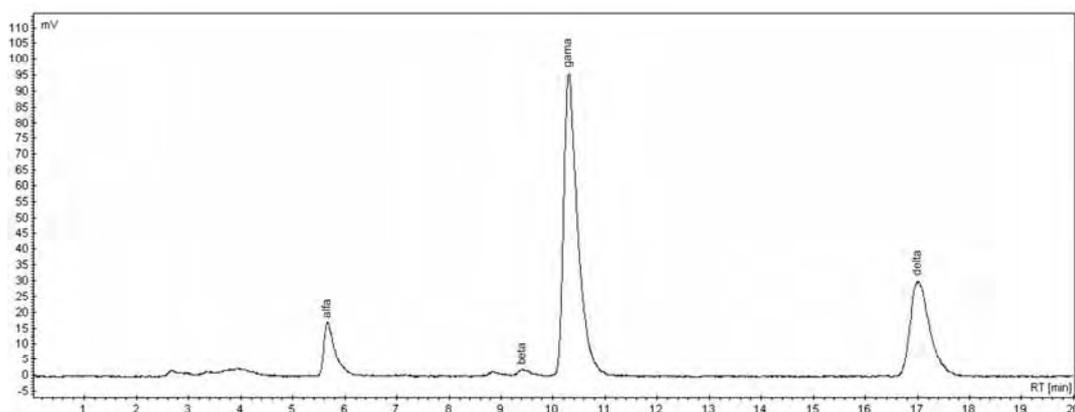


Figura 2 – Teor residual (%) de tocoferóis totais e seus homólogos em óleo de soja adicionado de antioxidantes.

Dentre todos os tratamentos, o que menos promoveu a retenção dos tocoferóis totais e dos isômeros β , γ e δ no óleo de soja ao final do tempo de estocagem foi o Shiitake que, em média, apresentou 76,23% de tocoferóis residuais. Para o teor de tocoferóis totais, os tratamentos que mais se destacaram foram TBHQ e Cogumelo do sol, com 100 e 97,5% de teor residual de tocoferóis, seguidos do Controle, 86,11%, BHT, 80,02% e Shiitake, 76,64%.

A Figura 3 representa os cromatogramas do Cogumelo do sol nos tempos 0 dia (a) e 15 dias (b) de aquecimento, respectivamente.

a) Cogumelo do sol (0 dia)



b) Cogumelo do sol (15 dias)

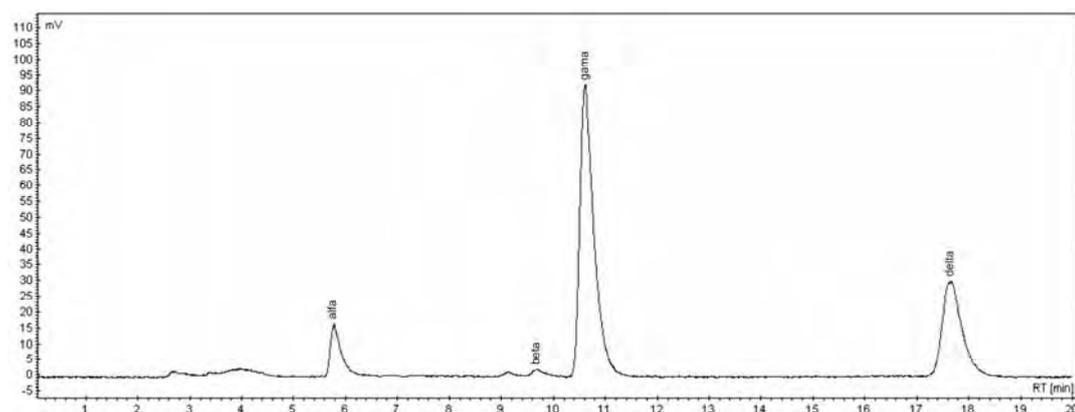


Figura 3 – Cromatogramas do Cogumelo do sol nos tempos 0 (a) e 15 dias (b) de aquecimento.

Ramalho e Jorge (2008) encontraram fator de retenção de 95% para o óleo de soja adicionado de extrato de alecrim (1.000 mg/kg) submetido ao tempo

de 10 horas de termoxidação e de 70% para o óleo de soja natural, mostrando boa eficiência do alecrim em proteger o óleo de soja. Para o mesmo período de termoxidação, Angelo e Jorge (2008) determinaram 26,70% de retenção de α -tocoferol para o óleo de girassol, sendo que ao final de 30 horas, este valor caiu para 4,0%.

4. CONCLUSÕES

O extrato de cogumelo do sol e o TBHQ foram os antioxidantes mais eficientes na retenção de α -tocoferol presente naturalmente no óleo de soja. Em todos os tratamentos, os isômeros β , γ e δ -tocoferol apresentaram-se mais resistentes ao período de estocagem quando comparados ao α -tocoferol, com teores residuais elevados ao final de 15 dias de estocagem. Com relação à retenção dos teores de tocoferóis totais, o TBHQ e o Cogumelo do sol foram os mais eficientes, seguidos do BHT, Shiitake e Controle. Sendo assim, os extratos naturais de cogumelos podem ser aplicados em óleos vegetais como uma forma de reduzir a degradação provocada pela oxidação lipídica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Antioxidant evaluation of extract and ascorbyl palmitate in sunflower oil under thermoxidation. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, Chicago, v. 85, n. 11, p. 1045-1049, 2008.

AOCS. AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign: AOCS, 1997.

AOCS. AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign: AOCS, 1993.

ARAÚJO, J. M. A. Oxidação de lipídios em alimentos. In.: Araújo, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3 ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 1-67.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**, 4. ed. Jaboticabal: Editora Funep, 2006, 237p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 04/88. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS

INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO, **Compêndio da Legislação de Alimentos**. São Paulo: ABIA, 2001. v.1, p. 3-26.

BRASIL. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, v. 196, 13 out. 1999. Seção I, p. 82-87.

CHOI, Y. et al. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. **Food Chemistry**, London, v. 99, n. 2, p. 381-387, 2006.

EVANS, C. D. et al. Long-term storage of soybean and cotton salad oil. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 50, n. 28, 218-222, 1973.

FAO – **Food and Agriculture Organization**. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/additives/details.html?id=189>>. Acesso em: 02 maio 2010.

FORTES, R. C.; NOVAES, M. R. C. G. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos *Agaricales* e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 54, n. 4, p. 363-371, 2006.

GONZÁLEZ-MONTELONGO, R., LOBO, M. G., GONZÁLEZ, M. The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. **Separation and Purification Technology**, New York, v. 71, n. 1, p. 347-355, 2010.

HUANG, S. J.; MAU, J. L. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of γ -irradiation. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie – Food Science and Technology**, London, v. 39, n. 7, p. 707-716, 2006.

IQBAL, S.; BHANGER, M. I. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 1, p. 246-254, 2007.

LAFKA, T. I.; SINANOGLU, V.; LAZOS, E. S. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes, **Food Chemistry**, London, v. 104, n. 3, p. 1206-1214, 2007.

LI, Y. et al. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. **Food Chemistry**, London, v. 96, n. 2, p. 254-260, 2006.

MAU, J. L. et al. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *termitomyces albus* mycelia. **Food Chemistry**, London, v. 87, n. 1, p. 111-118, 2004.

PINELO, M. et al. Effect of solvent, temperature and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton v., 53, n. 6, p. 2111-2117, 2005.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidant action of Rosemary extract in soybean oil submitted to the thermoxidation. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, Chicago, v. 59, n. 2, p. 128-131, 2008.

REISCHE; D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R. Antioxidants. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 489-516.

SHUI, G.; LEONG, L. P. Residue from star as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. **Food Chemistry**, London, v. 97, n. 2, p. 277-284, 2006.

UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, **ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 2.0, Jaboticabal, 1999, 1 disquete.

XU, G. H. et al. Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 1, p. 11-18, 2008.

YANG, J. H.; LIN, H. C.; MAU, J. L. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. **Food Chemistry**, London, v. 77, n. 2, p. 229-235, 2002.

ZHANG, Y. et al. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. **Food Chemistry**, London, v. 118, n. 3, p. 656-662, 2010.

6. APÊNDICES

Apêndice 1 – Análise de variância para a determinação de ácidos graxos livres.

Causas de Variação	G. L.	Quadrados Médios
Tratamentos	4	0,0014**
Tempos de aquecimento	5	0,0016**
Tratamentos x tempos de aquecimento	20	0,0016**
Resíduo	30	0,0000
Desvio padrão		0,0061
Coef. de variação (%)		2,75

** Significativo ($p < 0,01$).

Apêndice 2 – Análise de variância para a determinação do ganho de massa.

Causas de Variação	G. L.	Quadrados Médios
Tratamentos	4	2,6313**
Tempos de aquecimento	7	13,0526**
Tratamentos x tempos de aquecimento	28	1,7313**
Resíduo	40	0,0170
Desvio padrão		0,1305
Coef. de variação (%)		12,51

** Significativo ($p < 0,01$).

Apêndice 3 – Análise de variância para teores de tocoferóis ao longo da estocagem acelerada.

Causas de variação	G. L.	Quadrados médios				
		Alfa	Beta	Gama	Delta	Total
Tratamentos	4	1.284,9369**	1,1978**	4.477,8154**	118,9478**	11.402,4929**
Tempos de aquecimento	5	915,5634**	0,98223**	1.222,4950**	13,9375 ^{NS}	5.302,5043**
Tratamentos x tempos de aquecimento	20	163,5726**	0,3203**	512,0867**	39,0717**	1.170,2412**
Resíduo	30	4,1948	0,0867	108,7605	9,3498	222,1912
Desvio padrão		2,0481	0,2944	1,4288	3,0577	3,9061
Coef. de variação (%)		3,88	5,00	3,51	3,53	3,38

** Significativo (p < 0,01).
^{NS} Não significativo (p > 0,05).