

JOÃO BENHUR MOKOCHINSKI

**CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DAS FERMENTAÇÕES SUBMERSAS E DO
ESTADO SÓLIDO PRODUZIDAS PELO *Agaricus brasiliensis* EM DIFERENTES
SUBSTRATOS**

GUARAPUAVA

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE - UNICENTRO

**CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DAS FERMENTAÇÕES SUBMERSAS E DO
ESTADO SÓLIDO PRODUZIDAS PELO *Agaricus brasiliensis* EM DIFERENTES
SUBSTRATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JOÃO BENHUR MOKOCHINSKI

Guarapuava - PR

2013

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da UNICENTRO, Campus Guarapuava

	Mokochinski, João Benhur
M716c	Características químicas das fermentações submersas e do estado sólido produzidas pelo <i>Agaricus brasiliensis</i> em diferentes substratos / João Benhur Mokochinski. -- Guarapuava, 2013
	ix, 73 f. : il. ; 28 cm
	Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, área de concentração em metodologias analíticas e aplicações, 2013
	Orientadora: Yohandra Reyes Torres Co-orientadora:Herta Dalla Santa Banca examinadora: Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya, Maria de Lurdes Felsner
	Bibliografia
	1. Química aplicada. 2. <i>Agaricus brasiliensis</i> . 3. Ergosterol. 4. Fermentação submersa. 5. Fermentação no estado sólido. I. Título. II.Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada .
CDD 542	

JOÃO BENHUR MOKOCHINSKI

**CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DAS FERMENTAÇÕES SUBMERSAS E DO
ESTADO SÓLIDO PRODUZIDAS PELO *Agaricus brasiliensis* EM DIFERENTES
SUBSTRATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Química Aplicada, área de concentração em Metodologias Analíticas e Aplicações, para obtenção do título de Mestre.

Prof^a. Dr^a. Yohandra Reyes Torres

Orientadora

Prof^a. Dr^a Herta Dalla Santa

Co-orientadora

GUARAPUAVA - PR

2013

Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo.

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai João, que é minha referencia de caráter e força, que mesmo não estando presente diariamente ao meu lado me proporciona a oportunidade de crescimento contínuo. Por conquistar tudo o que temos trabalhando muito e por muitas vezes acabar abrindo mão das suas vontades para nos oferecer conforto.

A minha mãe Cleoni, que dedica total atenção a mim, que mesmo jovem abriu mão dos seus sonhos para cuidar dos filhos. Por estar presente em todos os momentos oferecendo amor incondicional.

A minha avó Neiva, que pela primeira vez segurando a minha mão me levou a escola e hoje continua ao meu lado me apoiando e incentivando. Por ser a pessoa mais generosa e bondosa que eu conheço, por não criticar meus erros e por entender que não sou perfeito.

A minha avó Terezinha, por me ensinar a viver sempre sorrindo, com alegria e bom humor. Por ser um exemplo de mulher forte e lutadora.

Aos meus avôs, Manolo e Moacir, que não estão mais presentes aqui, mas permanecem vivos na minha memória e certamente estariam orgulhosos de mim.

Ao meu irmão Filemom, por tudo o que vivemos, fizemos e ainda faremos juntos, por ser meu amigo e meu companheiro. Por apoiar minhas escolhas e entender nossas diferenças.

A minha cunhada Ticy, que considero minha irmã, pelo apoio em todos os momentos. Por estar sempre alegre e animada.

A Bruna, por estar sempre presente, pela ajuda no experimentos, por rir comigo e enxugar minhas lágrimas, por puxar minha orelha quando preciso e fazer parte da minha vida.

A Barbara, por ser minha parceira e sempre aceitar meus convites, não importando onde nem quando, sempre ao meu lado.

A Profa. Yohandra, que antes de ser minha orientadora é minha mãe, por não se preocupar só com assuntos acadêmicos, mas por mostrar-se interessada nos meus problemas pessoais. Por ouvir meus desabafos, por tolerar atrasos e pela pronta ajuda em tudo. Por apoiar minhas ideias e me incentivar a continuar crescendo. Por ser tão compreensiva, por me ensinar tanta coisa, pelo cuidado com que faz ciência. Jamais esquecerei de frases como: “No Joan, no és bem assim, no és tan simples como parece...”

A Profa. Herta, por ser a pessoa mais alto astral que eu conheço, por sempre trabalhar sorrindo, mesmo quando não está em um bom dia. Por acreditar no meu potencial e sempre

me incentivar. Por me ajudar a reduzir o trabalho quando eu reclamava que tinha muita coisa a fazer.

A Profa. Alexandra, por estar sempre pronta a ajudar quem precisa, por me receber em seu laboratório mesmo sendo tão ocupada, por me ajudar nas análises e no tratamento de dados. Pela paciência em explicar diversas vezes a mesma coisa até que eu entenda, por ser um doce, mais doce que o mel que ela analisa!

Ao Prof. Eberlin e a Gio, pelo espaço disponibilizado no laboratório Thomson e pela ajuda na identificação do esteróis.

A Daiane, Chris e Dani, pelo excelente ambiente de trabalho, pela ajuda que sempre é oferecida. Pelas risadas que damos por ouvirem todos os meus pecados e pelo apoio em todos os momentos.

A Vanessa, por trabalhar até tarde comigo e por me ajudar nos experimentos.

Aos colegas e funcionários, que auxiliaram o desenvolvimento desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ANEXOS	xiv
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiii
1. Introdução	1
2. Objetivos.....	3
2.1. Objetivo Geral	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. Referencial Teórico.....	4
3.1. Fungos	4
3.2. História do Cultivo de Cogumelos	5
3.3. <i>Agaricus brasiliensis</i>	6
3.3.1. Nomes e classificação taxonômica	6
3.3.2. Produção de <i>Agaricus brasiliensis</i>	7
3.3.3. Potencial medicinal do <i>Agaricus brasiliensis</i>	11
3.3.4. Composição química do <i>Agaricus brasiliensis</i>	13
4. Materiais e Métodos	17
4.1. Local dos Experimentos	17
4.2. Obtenção da Biomassa de <i>Agaricus brasiliensis</i>	17
4.2.1. Micro-organismo	17
4.2.2. Preparo do inóculo.....	17
4.2.3. Substratos.....	18
4.2.4. Cultivo submerso	18
4.2.5. Cultivo sólido	18

4.3. Obtenção dos Extratos Apolares e Polares a partir dos Cultivados de <i>Agaricus brasiliensis</i>	18
4.3.1. Extração de compostos apolares.....	18
4.3.2. Extração de compostos polares.....	20
4.4. Caracterização do Extrato Apolar.....	21
4.4.1. Validação da metodologia analítica para quantificação do ergosterol por HPLC e esteróis totais por UV-Vis	21
4.4.2. Quantificação do ergosterol por HPLC e esteróis totais por UV-Vis.....	22
4.4.3. Identificação dos componentes do extrato apolar por GC-MS.....	24
4.5. Caracterização do Extrato Polar	25
4.5.1. Atividade antirradicalar por ensaio de DPPH.....	25
4.5.2. Determinação do teor de fenólicos totais	26
4.5.3. Determinação do teor de flavonoides	26
4.5.4. Análise do extrato polar por UPLC-MS/MS	27
4.6. Análise Estatística.....	28
5. Resultados e Discussões.....	28
5.1. Extrato Apolar	28
5.1.1. Otimização do procedimento de extração	28
5.1.2. Validação do método por HPLC e UV-Vis.....	31
5.1.3. Determinação dos teores de ergosterol produzidos pelo <i>Agaricus brasiliensis</i> por HPLC e esteróis totais por UV-Vis	35
5.1.4. Correlação entre as quantificações por HPLC e UV-Vis	39
5.1.5. Identificação dos compostos apolares por GC-MS	44
5.2. Extrato Polar	47
5.2.1. Otimização do procedimento de extração	47
5.2.2. Determinação da atividade antirradicalar dos extratos polares dos fermentados de <i>Agaricus brasiliensis</i>	51
5.2.3. Determinação do teor de fenólicos totais e de flavonoides	52
5.2.4. Análise do extrato polar por UPLC-MS/MS	54
6. Conclusões	57
7. Referências Bibliográficas	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>A. brasiliensis</i>	<i>Agaricus brasiliensis</i>
a.C.	Antes de Cristo
ANOVA	Análise de Variância
CID	Dissociação Induzida por Colisão
CEDETEG	Centro de Desenvolvimento Educacional e Tecnológico de Guarapuava
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massas
CIMPE	Centro Institucional Multi-Disciplinar de Pesquisa Científica e Tecnológica
Cronat	Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais
DEALI	Departamento de Engenharia de Alimentos
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EI	Ionização por Ionização de elétrons
ESI	Ionização por Eletrospray
eV	Elétron Volt
FES	Fermentação Estado Sólido
FS	Fermentação Submersa
g	Gramas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
L	Litro
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
m/z	Massa/carga
NIST	Banco de Dados de Referência de Padrões
pH	Potencial Hidrogeniônico
PDA	Detector UV com arranjo de diodos
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RSD%	Desvio Padrão Relativo

s	Segundos
SP	São Paulo
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNICENTRO	Universidade Estadual do Centro Oeste
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
UV	Ultra Violeta
UV-VIS	Ultra Violeta Visível
V	Volts
W	Watts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Corpo de frutificação do <i>Agaricus brasiliensis</i> (Burden, 2012).....	6
Figura 2 - Fermentação típica do <i>A. brasiliensis</i> em estado sólido. (Fonte: Arquivo pessoal). .	9
Figura 3 - Fermentação típica do <i>A. brasiliensis</i> em fase submersa (Fonte: Arquivo pessoal).	11
Figura 4 - Estrutura química do ergosterol.....	15
Figura 5 - Mecanismo de conversão do ergosterol em vitamina D ₂ (Fonte: Havinga, 1973; Horst & Reinhardt, 1997).	15
Figura 6 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado na separação e quantificação do ergosterol.	23
Figura 7 - Espectrofotômetro UV-Vis utilizado na quantificação dos esteróis totais.	24
Figura 8 - GC-MS utilizado na identificação dos componentes apolares no extrato hexânico de <i>A. brasiliensis</i>	24
Figura 9 - Cromatógrafo líquido de ultra eficiência empregado nas análises de identificação dos componentes polares no extrato metanólico de <i>A. brasiliensis</i>	27
Figura 10 - Gráfico de Pareto com as respostas do planejamento fatorial para otimização do procedimento de extração da fração apolar no nível de 95% de confiança.....	30
Figura 11 - Fluxograma com as etapas otimizadas para a extração de ergosterol em substratos fermentados e não fermentados.	31
Figura 12 - Comparação entre o método de adição de padrão e o método de padrão externo nas quantificações de ergosterol.	32
Figura 13 - Curva analítica construída em triplicata para a quantificação do ergosterol através do método de calibração por padrão externo para HPLC (a) e UV-Vis (b).	32
Figura 14 - Cromatogramas do padrão analítico de ergosterol (a) e ergosterol na amostra (b). Em detalhe o espectro UV do pico.	34
Figura 15 - Cromatogramas para a fermentação em triplicata do bagaço da maçã na fase submersa (a) e na fase sólida (b).	36
Figura 16 - Gráfico de dispersão dos valores de esteróis totais determinados pela metodologia UV-Vis e de ergosterol pela metodologia HPLC para os fermentados em fase submersa - FS (■) e fermentados no estado sólido FES (●).....	40

Figura 17 - Gráfico da reta de regressão, intervalos de confiança (I.C.) e intervalos de predição (I.P.) no nível de 95% de confiança para a relação quantitativa entre os teores de esteróis totais determinados por UV-Vis e teores de ergosterol obtidos por HPLC para fermentados de <i>A. brasiliensis</i> cultivados por FS (a) e FES (b).....	43
Figura 18 - Reação geral para a formação do derivado trialquilsilil.	44
Figura 19 - Reação de derivatização de esteróis utilizando BSTFA.	45
Figura 20 - Gráfico de Pareto com os resultados do planejamento fatorial para a otimização do procedimento de extração da fração polar utilizando o rendimento percentual (a) e o valor de EC ₅₀ (b) como respostas no nível de 95% de confiança.	49
Figura 21 - Efeito do aumento do tempo (a) e adição de solvente fresco (b) no rendimento da extração.....	50
Figura 22 - Correlação entre o rendimento de extração dos componentes polares dos fermentados de <i>A. brasiliensis</i> e os valores de EC ₅₀ encontrados para o extrato resultante. ...	50
Figura 23 - Esquema da reação entre substâncias antirradicalares o radical DPPH.....	51
Figura 24 - Teor de fenólicos totais (a) e flavonoides (b) para os extratos polares dos fermentados obtidos com diferentes substratos e meios de fermentação.	53
Figura 25 - Fingerprints da amostra de bagaço de abacaxi sem fermentar (a), na fase submersa (b) e no estado sólido (c).	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de minerais presentes em 100g de biomassa seca.....	13
Tabela 2 - Variáveis e níveis do planejamento fatorial 2^3 para otimização da extração de ergosterol de fermentados de <i>Agaricus brasiliensis</i>	19
Tabela 3 - Variáveis do planejamento fatorial 2^3 e seus valores codificados para a extração da fração polar.....	21
Tabela 4 - Matriz de planejamento fatorial 2^3 e resultados para os teores de ergosterol extraídos de fermentados de <i>A. brasiliensis</i>	29
Tabela 5 - Valores dos limites de detecção e quantificação para as determinações de ergosterol por HPLC e UV-VIS.....	34
Tabela 6 - Valores do desvio padrão relativo e percentual de recuperação para as médias das determinações por HPLC e por UV-Vis.....	35
Tabela 7 - Valores médios e desvio padrão de esteróis totais determinados pela metodologia de UV-Vis e de ergosterol obtidos pela metodologia de HPLC para diferentes amostras de fermentados de <i>A. brasiliensis</i> . Dados são apresentados em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	37
Tabela 8 - Análise de variância para a regressão linear simples entre os teores de ergosterol determinados por HPLC e os teores de esteróis totais obtidos por UV-Vis no nível de 95% de confiança para os fermentados cultivados por fermentação submersa (FS).....	41
Tabela 9 - Análise de variância para a regressão linear simples entre os teores de ergosterol determinados por HPLC e os teores de esteróis totais obtidos por UV-Vis no nível de 95% de confiança para os fermentados cultivados por fermentação submersa (FES).....	41
Tabela 10 - Equação da reta, erros-padrão (E.P.) dos coeficientes e valores de t observado (t_{obs}) e de p para a relação entre os teores de ergosterol determinados por HPLC e os teores de esteróis totais obtidos por UV-Vis no nível de 95% de confiança para os fermentados cultivados por fermentação submersa (FS).....	42
Tabela 11 - Equação da reta, erros-padrão (E.P.) dos coeficientes e valores de t observado (t_{obs}) e de p para a relação entre os teores de ergosterol determinados por HPLC e os teores de esteróis totais obtidos por UV-Vis no nível de 95% de confiança para os fermentados cultivados por fermentação no estado sólido (FES).....	42
Tabela 12 - Análise semi-quantitativa (%) dos esteróis identificados por GC-MS nos substratos cultivados com <i>A. brasiliensis</i>	46

Tabela 13 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 e resultados para o rendimento da extração e a atividade antirradicalar do extrato obtido expressa como EC_{50}	47
Tabela 14 - Valores de EC_{30} obtidos pelo método de DPPH para os extratos polares dos fermentados obtidos com diferentes substratos e meios de fermentação.	51
Tabela 15 - Íons marcadores dos cultivados de <i>A. brasiliensis</i> analisados por UPLC-MS/MS.	56

LISTA DE ANEXOS	Página
Cromatogramas da Quantificação de Ergosterol por HPLC	61
Maçã FS	61
Maçã FS	61
Maçã FES	61
Casca de abacaxi FS	62
Casca de abacaxi FES	62
Bagaço de uva FS	62
Bagaço de uva FES	62
Trigo FS	63
Trigo FES	63
Bagaço de abacaxi FS	63
Bagaço de abacaxi FES	64
Malte FS	64
Malte FES	64
Casca de abacaxi substrato	65
Malte substrato	65
Bagaço de abacaxi substrato	65
Bagaço de uva substrato	66
Maçã substrato	66
Trigo substrato	66
Fingerprints Extrato Polar	67
Fingerprint bagaço de abacaxi substrato	67
Fingerprint bagaço de abacaxi FS	67
Fingerprint bagaço de abacaxi FES	67
Fingerprint casca de abacaxi substrato	67
Fingerprint casca de abacaxi FS	68
Fingerprint casca de abacaxi FES	68
Fingerprint bagaço de maçã substrato	68
Fingerprint bagaço de maçã FS	68
Fingerprint bagaço de maçã FES	68

Fingerprint bagaço de uva substrato	69
Fingerprint bagaço de uva FS	69
Fingerprint bagaço de uva FES	69
Fingerprint malte substrato	69
Fingerprint malte FS	69
Fingerprint malte FES	70
Fingerprint trigo substrato	70
Fingerprint trigo FS	70
Fingerprint trigo FES	70
MS/MS dos íons selecionados como marcadores do <i>A. brasiliensis</i>	71
<i>m/z</i> 147	71
<i>m/z</i> 165	71
<i>m/z</i> 179	71
<i>m/z</i> 195	71
<i>m/z</i> 255	72
Esteróis identificados por CG-MS	72
Dehidroergosterol	75
Ergosterol	75
Campesterol	75
Estigmasterol	76
Fungisterol	76
β-Sitosterol	76
Estigmastanol	76

RESUMO

Diversas atividades farmacológicas são atribuídas ao *Agaricus brasiliensis*, principalmente atividade antitumoral e imunestimulante, além de ser uma fonte de antioxidantes. Neste estudo *A. brasiliensis* foi cultivado em seis substratos através de fermentações submersas e do estado sólido. O objetivo foi determinar qual é o melhor hospedeiro e/ou técnica de fermentação para o crescimento do micro-organismo e obtenção de fermentados ricos em antioxidantes naturais. Os fermentados foram extraídos separadamente com hexano e com metanol. No extrato apolar foram quantificados o teor de ergosterol por HPLC e o teor total de esteróides por UV-Vis. Os resultados sugeriram que existe uma correlação linear positiva significativa entre os teores de esteróis totais determinados por UV-Vis e os valores de ergosterol obtidos por HPLC para os fermentados de *A. brasiliensis* obtidos pelos cultivos de FS e FES. A descrição quantitativa da relação entre estas variáveis mostrou que a metodologia de UV-Vis poderia ser usada para prever os teores de ergosterol dos fermentados. A extração apolar foi otimizada através de planejamento fatorial 2^3 . Os resultados indicam efeito significativo da fonte de aquecimento utilizada, na adição de ácido/base, uso de agente secante e na interação dessas últimas variáveis, fornecendo menores teores de ergosterol. A metodologia de determinação do ergosterol por HPLC e UV-Vis usando padrão externo foi validada através dos parâmetros de seletividade, precisão, exatidão, linearidade, sensibilidade e robustez. Não foi observado efeito da matriz nas quantificações por HPLC. Todos os substratos se mostraram como bons hospedeiros para o *A. brasiliensis*. Os esteróis presentes no extrato apolar foram identificados por CG-MS. Para a obtenção do extrato polar, também foi empregado um planejamento fatorial 2^3 , sendo analisados os efeitos do solvente, temperatura e tempo de extração no rendimento da extração e na atividade antirradicalar dos extratos. Solvente e tempo de extração foram os principais efeitos significativos observados na otimização do procedimento. Os resultados mostraram boa atividade antirradicalar para as amostras analisadas. Os teores de fenólicos totais e flavonoides mostraram-se superiores para as amostras fermentadas quando comparados aos teores dos substratos vegetais, indicando que *A. brasiliensis* produz fermentados ricos em substâncias nutraceuticas. Os extratos polares foram analisados por UPLC-MS/MS e alguns íons foram sugeridos como marcadores do *A. brasiliensis*.

PALAVRAS-CHAVE

Agaricus brasiliensis; Ergosterol; Fermentação submersa; Fermentação no estado sólido.

ABSTRACT

Several pharmacological activities are attributed to *Agaricus brasiliensis*, mainly antitumor activity and immunostimulating, besides being a source of antioxidants. In this study *A. brasiliensis* was grown on six substrates by submerged and solid-state fermentation. The goal was to determine which is the best host and/or fermentation technique for the growth of microorganisms and getting fermented substrates rich in natural antioxidants. The fermented substrates were separately extracted with hexane and methanol. In the nonpolar extract, ergosterol content was quantified by HPLC and the total sterols content by UV-Vis. The results suggested that there is a significant positive linear correlation between the levels of total sterols determined by UV-Vis and ergosterol values obtained by HPLC for fermentation of *A. brasiliensis* by cultivation of SF and SSF. The quantitative relationship between these variables showed that the UV-Vis methodology could be used to predict the levels of ergosterol fermented. The nonpolar extraction was optimized by 2^3 factorial design. The results indicate significant effect of heat source, addition of acid/base, use of drying agent and the interaction of these latter variables, giving smaller amounts of ergosterol. The methodology applied at the ergosterol determination by HPLC and UV-Vis using external standard was validated through the parameters of selectivity, precision, accuracy, linearity, sensitivity and robustness. There was no effect of the matrix on quantification by HPLC. All substrates were shown as good hosts for *A. brasiliensis*. The sterols present in nonpolar extract were identified by GC-MS. To obtain the polar extract a 2^3 factorial design was also employed and it was analyzed the effects of solvent, temperature and extraction time on the extraction yield and antiradicalar activity of extracts were also analyzed. Solvent and extraction time were the main significant effects observed in the optimization procedure. The results showed good antiradicalar activity. The total phenolics and flavonoids contents were shown to be superior to the samples fermented compared to levels of vegetable substrates, indicating that *A. brasiliensis* produces fermented substrates rich in nutraceutical substances. The polar extracts were analyzed by UPLC-MS/MS and some ions have been suggested as markers of *A. brasiliensis*.

KEY-WORDS

Agaricus brasiliensis; Ergosterol; Submerged fermentation; Solid-state fermentation.

1. Introdução

O *Agaricus brasiliensis*, também conhecido como cogumelo do sol, é comestível e medicinal, tradicionalmente usado como um alimento saudável no Brasil, Japão e outros países na prevenção de doenças como diabetes, câncer, arteriosclerose e hepatite crônica (Zou, 2006). Suas propriedades imunostimulantes e forte atividade antitumoral também têm sido reportadas (Stamets, 2000; Wasser, 2011). A considerável atividade farmacológica faz esse cogumelo despertar interesse nas indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de imunostimulantes e drogas antitumorais ou nutracêuticos (Okwulehie, Nwosu & Johnpaul, 2007).

Este fungo produz várias biomoléculas importantes, tais como proteoglicanos, lecitinas e ergosterol, os quais são encontrados no corpo de frutificação e micélio. Os polissacarídeos e o ergosterol são as moléculas bioativas mais estudadas produzidas pelo *Agaricus brasiliensis* (Hamedi, Vahid & Ghanati, 2007; Leifa, Soccol, Pandey & Soccol, 2007; Lima et al., 2008). Takaku e colaboradores (2001) mostraram a relação entre o ergosterol do *Agaricus brasiliensis* e sua atividade antitumoral pela inibição de angiogênese e redução do crescimento do tumor.

O ergosterol é bem conhecido como um indicativo químico de massa fúngica porque é um dos esteróis mais abundantes nos cogumelos de diferentes espécies (Czub e Baginski, 2006). No corpo humano, ele desempenha um papel importante como precursor da vitamina D₂, que é formada como resposta à radiação ultravioleta do sol nos esteróis presentes na pele (Mattila, Lampi, Ronkainen, Toivo & Piironen, 2002; Jasinghe & Perera, 2005).

Mundialmente existe uma demanda crescente de ergosterol com o objetivo de se obter produtos de grau farmacêutico e alimentícios a base de vitamina D₂. Devido a essa demanda, a fermentação submersa (FS) do *Agaricus brasiliensis* foi recentemente aplicada na otimização da produção de ergosterol e polissacarídeos (Fan et al., 2003; Zou, 2005; Gao & Gu, 2007; Hamedi et al., 2007). A FS é reportada como o melhor processo de obtenção do micélio fúngico e outras moléculas desejadas, devido ao seu pequeno tempo de fermentação, menor espaço exigido e melhor controle dos parâmetros de fermentação (Leifa et al., 2007; Gao et al., 2007).

Por outro lado, a fermentação do estado sólido (FES) também é uma boa opção para obter moléculas bioativas. Ela geralmente proporciona um bom ambiente para o crescimento

fúngico. O processo de FES é simples, usa poucos equipamentos e pequeno consumo de água. É rentável uma vez que pode utilizar resíduos agroindustriais e também fornece produtos altamente concentrados (Pandey, 2008).

Diferentes métodos têm sido empregados por vários autores na extração de ergosterol (Seitz, Mohr, Burroughs & Sauer, 1977; Young, 1995; Mattila et al., 2002; Yuan, Wang, Liu, Kuang & Zhao, 2007; Tardieu, Bailly, Bernard & Guerre, 2007). No entanto, não há um consenso sobre qual metodologia deve ser utilizada. Assim, uma das propostas desse trabalho é otimizar o processo de extração de ergosterol produzido pelo cultivo do *Agaricus brasiliensis* em diferentes substratos.

Uma vez que a extração foi otimizada, todas as amostras obtidas por FS e FES foram extraídas e tiveram seu teor de ergosterol determinado por HPLC. O teor total de esteróis foi determinado pela técnica de UV-Vis. A finalidade dessa etapa é verificar qual é a melhor combinação de substrato vegetal e tipo de fermentação para se obter maiores teores de ergosterol e também consequentemente, maior produção de biomassa.

Além do extrato apolar dos fermentados, também foram investigadas características importantes da fração polar do fermentado como a atividade antirradicalar, teor de fenólicos totais e de flavonoides. A partir desses dados é possível não só determinar qual substrato é mais eficiente para o rendimento da fermentação, mas também, qual combinação de substrato vegetal e tipo de fermentação que produz fermentados ricos em antioxidantes naturais.

Os componentes presentes no extrato apolar e polar foram identificados e/ou caracterizados por CG-MS e UPLC-MS/MS, respectivamente. Os resultados permitem uma interpretação ampla sobre as espécies geradas durante o processo de crescimento do micro-organismo. Alguns componentes, mesmo não identificados, servem como parâmetro de caracterização do *Agaricus brasiliensis*. Novos estudos para o reconhecimento dessas espécies mostram-se pertinentes.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Determinar qual substrato vegetal e tipo de fermentação de *A. brasiliensis* que produz fermentados com alto rendimento e ricos em antioxidantes naturais.

2.2. Objetivos Específicos

- Otimizar a metodologia de extração dos fermentados (parte polar e apolar) através do emprego de planejamento fatorial;
- Validar a metodologia analítica para determinação do ergosterol em cultivados de *Agaricus brasiliensis* por HPLC e UV-Vis;
- Quantificar os teores de ergosterol e esteróis totais, como medida do crescimento do *Agaricus brasiliensis*, por HPLC e UV-Vis, respectivamente;
- Verificar a existência de correlação entre os valores de ergosterol determinados por HPLC com os valores de esteróis totais obtidos por UV-Vis.
- Caracterizar os extratos dos fermentados através de parâmetros de qualidade importantes como atividade antirradicalar, teor de fenólicos totais e flavonoides;
- Identificar por métodos cromatográficos acoplados a espectrometria de massas os constituintes químicos dos extratos.

3. Referencial Teórico

3.1. Fungos

Com mais de um milhão e meio de espécies, algumas delas microscópicas, pode-se dizer que pouco se sabe sobre o reino dos fungos (Raven, Evert & Eichhorn, 2007). Mesmo assim reconhece-se que há muitas espécies que já se tornaram imprescindíveis para a saúde humana e contribuem de forma decisiva para a preservação da diversidade biológica.

Os fungos estão presentes em inúmeras situações do cotidiano. Seja no pão como fermento biológico, na cerveja e todas as bebidas alcoólicas feitas por fermentação, ou até mesmo em refrigerantes, que utilizam ácido cítrico, substância esta produzida comercialmente pelo fungo *Aspergillus lividus* (Stamets, 1993).

Os fungos têm um reino próprio devido as suas características peculiares. Ao contrário das plantas, eles não apresentam clorofila nem outros pigmentos semelhantes, o que impossibilita a realização da fotossíntese, dependendo de fontes externas de carbono para produzir energia. Assim, se assemelham aos animais, que são organismos heterotróficos (buscam matéria orgânica provinda do ambiente) e quimiotróficos (obtem energia da oxidação de substâncias orgânicas). A alimentação dos fungos é realizada através da absorção pelas hifas que formam o basidiocarpo (Raven, Evert & Eichhorn, 2007).

Eles são classificados de acordo com os alimentos que utilizam, podendo ser: saprobióticos, parasitas e simbióticos. Os saprobióticos utilizam material morto para a alimentação. É o caso dos mofos, bolores e vários fungos comestíveis, como o *Agaricus brasiliensis*. Os parasitas fazem ataque a outro ser vivo. Eles se desenvolvem na pele humana, de animais e na superfície de alguns vegetais. Nos humanos e animais, os fungos se nutrem da queratina que é uma proteína encontrada na pele e causam infecções como micoses. Os simbióticos são aqueles que crescem em estreita associação com outros organismos, como em raízes de árvores, onde a planta cede ao fungo parte das substâncias orgânicas que produz, fornecendo alimentos. Este mecanismo não gera danos ao hospedeiro (Alexopoulos, Mims & Blackwell, 1996; Raven, Evert & Eichhorn, 2007).

Associados à bactérias, os fungos atuam no ambiente como reguladores naturais da população de outros organismos, atuando como agentes de decomposição, permitindo a reciclagem de nutrientes e a manutenção da biosfera.

3.2. História do Cultivo de Cogumelos

O que a maioria das pessoas conhecem por cogumelos são os corpos frutificados dos fungos. Eles são conhecidos desde a antiguidade onde seu uso transcende as finalidades terapêuticas, alimentares e religiosas. Alguns apresentam propriedades alucinógenas e afrodisíacas. Outros foram incorporados apenas como parte de uma dieta saudável, por apresentar agradável aroma e sabor (Largeteau et al., 2011).

As primeiras referências escritas sobre cogumelos estão datadas de 450 a.C., num epigrama de Eurípedes, no qual é relatada a morte de uma mãe e seus três filhos, que foram envenenados após a ingestão de cogumelos tóxicos. Mas os relatos históricos vão além, hieróglifos registram que os egípcios utilizavam os cogumelos em suas práticas religiosas, acreditando que eles asseguravam a imortalidade. Alguns registros indicam que os faraós os proclamaram como “comida real” e ao cidadão comum era proibido até mesmo tocá-los. Existem relatos históricos que afirmam que os gregos e romanos também fizeram a utilização dos cogumelos em sua dieta e em rituais. Outras civilizações da América Central e Latina também empregaram o uso de cogumelos em seu cotidiano (Stamets, 1993, Chen, 2001).

De acordo com Stamets (1993), a primeira técnica de cultivo para produção de cogumelos foi feita pelos chineses, onde eles colocavam troncos de árvores próximos aos troncos frutificados, sendo expostos ao vento para capturar os esporos e permitir o ciclo de reprodução. Eventualmente, alguns pedaços de cogumelos também eram inseridos no interior dos troncos.

Em 1650, em Bonnefons - França, iniciou-se a produção de cogumelos a partir de camas feitas com esterco de cavalos e resíduos úmidos, pois acreditava-se que a “semente” dos cogumelos estava presente no esterco dos cavalos. Mas foi somente no início do século XVIII que a produção comercial de cogumelos foi formalizada (Stamets, 1993).

No Brasil, não existe uma documentação que permita localizar cronologicamente o início do cultivo de cogumelos. O que sabe-se é que a primeira espécie cultivada no país foi o *Agaricus bisporus*, também conhecido como champignon de Paris, cuja produção em escala comercial começou em meados da década de 50 (Coutinho, 2001).

3.3. *Agaricus brasiliensis*

Diversas espécies de cogumelos existentes na natureza recebem o nome genérico de *Agaricus*. Este micro-organismo foi identificado como uma nova espécie há mais de 80 anos atrás pelo micologista norte americano, Dr. W. A. Murril, mediante coleta de amostras na propriedade rural do Sr. R. W. Blaze, em Gainesville - Flórida (Herrera, 2001). A figura 1 mostra uma foto típica do corpo frutificado do *Agaricus brasiliensis*.



Figura 1 - Corpo de frutificação do *Agaricus brasiliensis* (Burden, 2012).

3.3.1. Nomes e classificação taxonômica

Vários nomes populares são atribuídos para esta espécie. No Brasil ele é comumente conhecido como cogumelo piedade; cogumelo medicinal; cogumelo do sol; cogumelo de Deus; e por sua fragrância e sabor, cogumelo de amêndoa. No Japão ele é conhecido como Himematsutake, Agarikusutake e Kawariharatake. Na China é chamado de Ji Song Rong (Herrera, 2001; Dalla Santa, 2006).

Na década de 1950, em Piedade - São Paulo, essa espécie foi encontrada por imigrantes japoneses radicados na região, que passaram a consumir esse cogumelo por lembrar muito o matsutake (*Tricholoma matsutake*), um cogumelo popularmente conhecido no Japão. Por esta razão, o *Agaricus brasiliensis* é também conhecido como cogumelo piedade (Dalla Santa, 2006).

A longevidade da população de Piedade, motivou estudos liderados pelo Dr. W. J. Cinden, da Universidade da Pensilvânia. Após alguns meses de estudos na região, eles

comprovaram que o consumo regular dessa espécie de cogumelo contribuía para o aumento da longevidade (Herrera, 2001).

O *Agaricus brasiliensis* era inicialmente conhecido no meio científico por *Agaricus blazei* ss. Murill e *Agaricus blazei* ss, Heinem (Dalla Santa, 2006). Recentemente, vários estudos foram conduzidos com o objetivo de padronizar um nome botânico para esta espécie. Através do estudo das espécimes e cepas cultivadas, dois nomes foram propostos: *Agaricus subrufescens* e *Agaricus brasiliensis* (Herrera, 2001). Ainda existem divergências sobre a classificação taxonômica atual dessa espécie. Wasser e colaboradores, realizaram um estudo sobre esse basidiomiceto e propuseram a seguinte classificação taxonômica (Wasser et al., 2002):

Reino: Fungi

Divisão: Basidiomycota

Subdivisão: Homobasidiomycetidae

Ordem: Agaricales

Família: Agaricaceae

Gênero: *Agaricus*

Subgênero: *Flavoagaricus*

Seção: *Majores*

Subseção: *Flavescentes*

Espécie: *brasiliensis*

A maioria das publicações recentes referem-se à espécie como *Agaricus brasiliensis*. Assim, nesse trabalho foi adotado a mesma terminologia e ele será citado como *A. brasiliensis*.

3.3.2. Produção de *Agaricus brasiliensis*

A produção do *A. brasiliensis* começou em escala no início da década de 90, em regiões próximas a costa atlântica, onde têm-se temperaturas que variam de moderadas a quentes, além da alta umidade, especialmente nos meses entre setembro e abril (Braga et al., 2006). O Japão se tornou o maior importador de *A. brasiliensis* produzido no Brasil. Em

2001, aproximadamente 37 toneladas do cogumelo desidratado foram exportadas para o país. Fontes indicam que a exportação atual supera 3 vezes esse valor (Burden, 2012).

Nos países em desenvolvimento e com altos índices de desnutrição, os cogumelos são apontados como uma alternativa para incrementar a oferta de proteínas, uma vez que estes apresentam elevado teor proteico.

A possibilidade de reciclar resíduos agrícolas e agroindustriais é um dos fatores que fortemente tem contribuído para aumentar o cultivo dos fungos e, conseqüentemente, seu consumo. Além de promover a proteção do meio ambiente, a fungicultura é uma opção de incremento de renda de pequenas propriedades rurais, pois não demanda grandes áreas de cultivos e exige baixo investimento, sendo uma opção de negócio em vários países. No entanto requer muito treinamento e preparo do produtos (Chen, 2001).

O cultivo tradicional de *A. brasiliensis* é empregado quando busca-se a obtenção dos corpos frutificados desse micro-organismo. Esse cultivo é complexo e envolve etapas de pré-cultivo como a compostagem do substrato e a produção do inóculo. Na etapa de crescimento existem riscos de contaminações, além de requerer um período de cultivo longo (120 dias). O micélio que fica fixado no substrato é descartado após a colheita das frutificações (Brum, 2005; Chen, 2003). O substrato, rico em espécies antioxidantes e com atividade biológica, recebe uma destinação pouco nobre, é geralmente utilizado com adubo em processos agrícolas.

Para a produção da biomassa fúngica, dois processos de fermentação podem ser empregados, a fermentação no estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS). Estes processos são industrialmente empregados quando busca-se a produção do inoculante para o cultivo tradicional, ou na área alimentícia e farmacêutica, para obtenção de agentes flavorizantes, polissacarídeos, vitaminas, enzimas, ácidos orgânicos e antibióticos (Hölker, Höfer & Lenz, 2004). Estes processos podem ser empregados para a obtenção do micélio, que apresenta as mesmas características do corpo de frutificação, no entanto sem a necessidade de esperar longo tempo de crescimento.

3.3.2.1. Cultivo no estado sólido

A FES acontece espontaneamente no meio ambiente, em locais úmidos e sombrios, sendo a responsável pela reciclagem contínua de compostos orgânicos na natureza. Os micro-

organismos presentes na FES sintetizam enzimas que são responsáveis pela degradação de substâncias poliméricas, tornando-as menores e facilitando a digestão (Camelini, 2010).

Esse tipo de cultivo oferece algumas vantagens em relação a FS, pois demanda pouca utilização de água no processo e de energia para manter o aquecimento da base usada como suporte, simulando as condições naturais. Esse processo é geralmente realizado em sacolas plásticas, o que reduz os custos de produção. A figura 2 exemplifica uma fermentação típica do *A. brasiliensis* em estado sólido. A parte de coloração esbranquiçada corresponde ao micélio do micro-organismo crescido sobre o substrato vegetal. Outra vantagem é que substratos insolúveis em água podem ser utilizados nesse processo (Hölker, Höfer & Lenz, 2004). No entanto, a FES apresenta a desvantagem de separar e quantificar a massa fúngica produzida no cultivo, pois o micro-organismo cresce entre o substrato o que impossibilita sua separação. Esse fato também impossibilita a separação dos polissacarídeos presentes na sua parede celular, o que torna mais viável a obtenção de matéria prima para a indústria alimentícia, que não exige a separação dos produtos da fermentação para a formulação de nutracêuticos (Holiday, 2003; Wasser & Weis, 1999).



Figura 2 - Fermentação típica do *A. brasiliensis* em estado sólido. (Fonte: Arquivo pessoal).

Algumas características devem ser observadas na escolha do micro-organismo utilizado na FES. Eles devem apresentar tolerância à baixas concentrações de água e morfologia específica. Além de elevado potencial de secretar enzimas hidrolíticas. Os fungos filamentosos apresentam a morfologia adequada para a FES, pois apresentam uma alta

capacidade de colonização, permeando o substrato com facilidade (Camelini, 2010). No entanto, esses micro-organismos são aeróbios e produzem calor proporcionalmente ao consumo de oxigênio, dificultando a remoção do calor nesses substratos e limitando a difusão do oxigênio no interior do substrato (Rahardjo, 2005). O *A. brasiliensis* mostra-se como uma ótima opção tanto para a FES quanto para FS.

Como existe uma dificuldade em separar a massa fúngica produzida na FES, uma das formas de avaliar o rendimento da produção é através de métodos indiretos, que avaliam constituintes específicos, como o ergosterol, glucosamina, proteínas, conteúdo de DNA e também a evolução de CO₂, permitindo estimar relações entre a biomassa e esses indicadores (Crueger, 1990).

3.3.2.2. Cultivo submerso

A FS é o cultivo de micro-organismo a partir de um caldo com nutrientes solúveis em líquido. Enzimas também são liberadas por este processo. A FS passou por inúmeros processos de melhoramento durante os últimos anos. Isso possibilitou um maior controle do processo num menor período de tempo (7 dias) (Camelini, 2010). Os melhoramentos também são observados na eficiência de transferência de O₂, remoção do CO₂ e menor risco de contaminação. Como a biomassa é facilmente separada do meio de cultivo (através de filtração), este procedimento oferece vantagens em relação a FES quando busca-se o micélio isolado, podendo ser utilizado pela indústria farmacêutica. A figura 3 mostra uma fermentação típica do *A. brasiliensis* em fase submersa. Os polissacarídeos secretados pelo micro-organismo durante a etapa de formação, podem ser recuperados do meio de cultura, aumentando o rendimento das espécies com propriedades bioativas (Camelini, 2010).

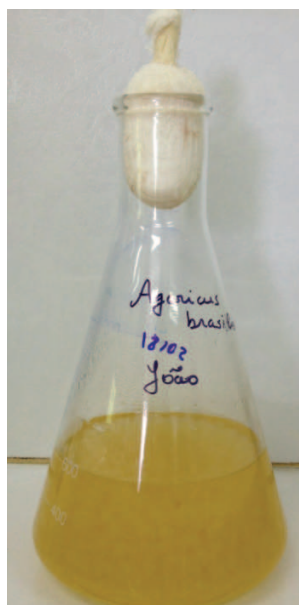


Figura 3 - Fermentação típica do *A. brasiliensis* em fase submersa (Fonte: Arquivo pessoal).

Assim, a escolha do tipo de fermentação depende de uma série de fatores como os ecológicos, qualidade do produto final, características do micro-organismo, condições econômicas para implantar o processo, além de regulamentações governamentais no que diz respeito ao descarte de resíduos sólidos e líquidos. Desse modo, o cultivo tradicional do *A. brasiliensis* para obtenção do corpo de frutificação é realizado no estado sólido.

3.3.3. Potencial medicinal do *Agaricus brasiliensis*

Em 1972 foi apresentado a conclusão do primeiro estudo sobre as propriedades anticancerígenas do *A. brasiliensis*, em trabalho intitulado como “Atividade Antitumoral de Basidiomicetos¹” (Itoh, 1972).

Os primeiros estudos sobre as propriedades nutraceuticas do *A. brasiliensis* relatam o isolamento e propriedades da lecitina obtida a partir dos corpos de frutificação desse cogumelo (Kawagishi et al., 1988). No ano seguinte, os mesmos autores publicaram um trabalho sobre o fracionamento e a atividade antitumoral dos resíduos insolúveis em água dos corpos frutificados de *A. brasiliensis* (Kawagishi et al., 1989).

¹ Antitumor activity of basidiomycetes

Osaki e colaboradores (1994) estudaram as substâncias antimutagênicas e antibactericidas do corpo de frutificação do *A. brasiliensis*, obtendo resultados positivos. O mecanismo antitumoral de fibrosarcomas em ratos foi avaliado através da ação inibitória de um complexo proteico isolado do *A. brasiliensis*. Os resultados indicam uma significativa remissão desses tumores (Itoh et al., 1994). Os mesmos autores verificaram os efeitos antitumorais de uma nova classe de compostos preparados a partir do *A. brasiliensis* e também verificaram a inibição do crescimento tumoral (Itoh et al., 1997).

Existem relatos que comprovam os efeitos positivos do *A. brasiliensis* em quadros de hipertensão, dermatite e diabetes (Higaki et al., 1997). Os autores estabeleceram uma nova metodologia de colheita dos corpos de frutificação e as conclusões sobre os efeitos positivos foram decorrentes desse novo método.

Os polissacarídeos do *A. brasiliensis* foram analisados e concluiu-se que eles estimulam a produção das células T em linfócitos de ratos (Mizuno et al., 1998). Em 1999, os mesmos autores extraíram um polissacarídeo antitumoral a partir da cultura líquida do micélio do *A. brasiliensis* (Mizuno et al., 1999).

Okamura e colaboradores (2001), produziram um “vinho” por meio da fermentação do *A. brasiliensis*, contendo 0,68% de β -D-glucan, que foi utilizado na prevenção de câncer. Os resultados mostram-se positivos frente a diferentes linhagens tumorais.

Diversas substâncias anticancerígenas do *A. brasiliensis* foram isoladas, dentre elas o ergosterol. Essa substância foi administrada em ratos com carcinoma pulmonar, e concluiu-se que o ergosterol contido nesse cogumelo apresenta efeito antiangiogênico (Takaku et al., 2001). O ergosterol e suas propriedades serão discutidos em outra seção.

Os polissacarídeos isolados do *A. brasiliensis* apresentam uma atividade antitumoral mais forte contra o Sarcoma 180² em ratos do que os isolados a partir de outras espécies (*Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* e *Coriolus versicolor*). Os estudos apontam que os polissacarídeos atuam no organismo aumentando as funções imunológicas, evitando a regeneração e a metástase do câncer (Zou et al., 2006).

O *A. brasiliensis* tem uma alta concentração de glucanas (componentes químicos pertencentes à classe dos carboidratos), em média 38%. Uma de suas características é estimular o sistema imunológico, ou seja, o sistema responsável pela defesa dos organismos. Essas substâncias são também chamadas de imunoestimulantes (Camelini, 2010).

² Linhagem tumoral

Em pesquisas recentes, foi observado que os polissacarídeos presentes nesse cogumelo aumentam a quantidade de células imunológicas. Além disso, os extratos de *A. brasiliensis* apresentaram alta toxicidade sobre células cancerosas e também sobre o HIV (Camelini, 2010).

3.3.4. Composição química do *Agaricus brasiliensis*

Os resultados de análises de composição química do corpo de frutificação fresco do *A. brasiliensis* indicam que este contém 90% a 95% de água. Quando seco, contém 40% a 45% de proteínas, 38% a 45% de carboidratos, 6% a 8% de fibras, 5% a 7% de cinzas e 3% a 4% de lipídios (Herrera, 2001). Assim, verifica-se que o *A. brasiliensis* é rico tanto em proteínas, quanto em açúcares. Além disso, apresenta ainda em sua constituição as vitaminas B1 e B2, niacina e uma quantidade relativamente grande de ergosterol, um precursor da vitamina D₂ (Pedroso & Tamai, 2001).

Dentre os componentes minerais o que está presente em maior abundância é o fósforo (3,36% do total das cinzas), embora ainda façam parte da composição potássio, magnésio, cálcio, sódio, cobre entre outros. Na tabela 1, verifica-se o teor de minerais em função do corpo de frutificação seco do *A. brasiliensis*. (Pedroso & Tamai, 2001).

Tabela 1 - Teor de minerais presentes em 100g de biomassa seca.

Mineral	Teor (em 100g desidratado)
Fósforo	830,00 mg
Ferro	6,94 mg
Cálcio	10,50 mg
Sódio	6,60 mg
Potássio	2,52 mg
Magnésio	76,30 mg
Cobre	5,64 mg
Zinco	7,42 mg
Manganês	0,68 µg

Mineral	Teor (em 100g desidratado)
Cobalto	0,20 mg
Cloro	537,00 mg
Silício	0,24 µg
Alumínio	0,19 µg
Enxofre	0,30 mg

Foram identificados na fração lipídica os ácidos oléico, esteárico e linoléico, os principais lipídios com atividade antimutagênica (Osaki et al., 1994). Também foram isolados alguns lipídios neutros, como fosfolipídios e glicolipídios. Os polissacarídeos analisados revelaram a presença de seis moléculas com alto peso molecular e alta atividade antitumoral com estruturas conhecidas. De acordo com Mizuno et al. (1998), os polissacarídeos com potencial de atividade antitumoral são: o β -(1→6)D-glucan, o α -(1→6)(1→3)(1→4)D-glucan, o β -(1→6)(1→3)D-glucan e um complexo RNA proteico, que também foi encontrado nas amostras analisadas.

Pedroso & Tamai (2001) analisaram os efeitos das seguintes substâncias contidas no *A. brasiliensis*:

Ácidos Nucléicos: A fração purificada mostrou alta atividade antitumoral, entretanto, a atividade dos ácidos nucléicos isolados é muito rara.

Esteróides: Esteróides obtidos com base em frutificação do *A. brasiliensis* mostraram ser eficientes bloqueadores do crescimento das células cancerosas. Esse fato foi comprovado através do teste HeLa, utilizando células de câncer do colo do útero, onde, apesar da baixa concentração de esteróides, foi possível impedir seu crescimento.

Lipídios: A completa diminuição no tamanho de tumores em camundongos, por injeção intraperitoneal, foi observada quando frações lipídicas foram administradas.

Ação – uso terapêutico: Cabe, especialmente, aos polissacarídeos, em particular β -glucan, os efeitos antitumorais (poder de atacar as células cancerosas que já surgiram e se desenvolveram), e efeitos preventivos e anti-metastáticos (impedem que células

normais se transformem em cancerosas, além de bloquearem sua distribuição por outras partes do organismo).

Segundo os autores, o β -glucan contido nos cogumelos ainda aumenta a potência do sistema imunológico, auxiliando no combate a bactérias e corpos estranhos que penetram no organismo, além de bloquear o aparecimento de doenças que já estejam instaladas.

3.3.4.1. Ergosterol

O ergosterol é sintetizado pelos fungos e por algumas espécies de microalgas. Ele é principalmente encontrado nas camadas fosfolipídicas da membrana celular no estado livre, no entanto, pode também estar esterificado com ácidos graxos (Montgomery et al., 2000). A figura 4 representa a estrutura da molécula de ergosterol.

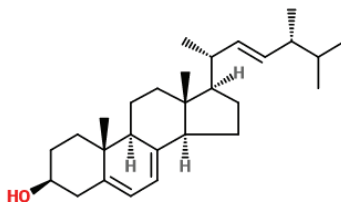


Figura 4 - Estrutura química do ergosterol.

Também conhecido como precursor da vitamina D₂, o ergosterol sofre um processo de conversão quando exposto a radiação UV, cujo mecanismo é descrito na figura 5.

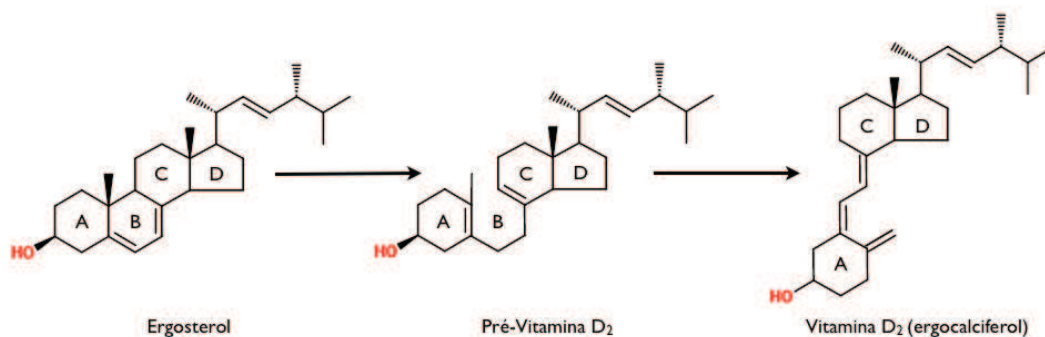


Figura 5 - Mecanismo de conversão do ergosterol em vitamina D₂ (Fonte: Havinga, 1973; Horst & Reinhardt, 1997).

A clivagem fotoquímica do anel B do ergosterol ocorre sob radiação UV e em seguida, o intermediário (pré-vitamina D₂) é formado. Após isso, a molécula sofre um rearranjo térmico para formar a vitamina D₂ (ergocalciferol). No entanto, essa conversão pode originar produtos secundários, a pré-vitamina D₂ também absorve radiação UV e sob irradiação prolongada pode produzir subprodutos indesejáveis, tais como taquisterol e luminesterol por fotoisomerização (Havinga et al. 1960; Havinga, 1973; Braun et al. 1991).

Por apresentar um papel importante na indústria química e farmacêutica, as condições de produção do ergosterol são bastante estudadas. Ele é comercialmente produzido pela fermentação de leveduras, como o *Saccharomyces cerevisiae*, num processo conhecido por batelada-alimentada³ (Zou, 2006).

A mesma técnica foi empregada por Zou (2006) para a produção de polissacarídeos bioativos e ergosterol em larga escala, no entanto a matéria prima utilizada foi o *A. brasiliensis* ao invés de leveduras. O efeito da fonte de carbono e a concentração inicial de açúcar foram investigados para otimizar as condições de produção. Os resultados indicam que dentre as diferentes fontes de carbono utilizadas (sacarose, maltose, frutose e glicose), os melhores valores de rendimento foram obtidos a partir da glicose na concentração de 40 g.L⁻¹. Assim, a produção de polissacarídeos bioativos e ergosterol mostrou-se comercialmente viável através da técnica de batelada alimentada.

O teor de ergosterol varia de acordo com a composição do meio e a espécie de micro-organismo cultivada (Trigos, 1996; Trigos 1997; Mau et al., 1998). Mattila e colaboradores, demonstraram que o ergosterol é o esterol mais abundante encontrado em cogumelos e o seu teor é superior em espécies cultivadas do que em espécies silvestres (Mattila et al., 2001).

Segundo Takaku, kimura e Okuda (2001), o ergosterol isolado a partir do corpo de frutificação do *A. brasiliensis* atuou como uma substância anti-angiogênica, inibindo diretamente o crescimento de tumores induzidos. Tal constatação corrobora com a necessidade de novos estudos no que diz respeito as condições de otimização da produção desse micro-organismo.

³ Fed-batch

4. Materiais e Métodos

4.1. Local dos Experimentos

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais (CRONAT) localizado no CIMPE, Campus CEDETEG, da UNICENTRO. As análises por Espectrometria de Massas foram realizadas no Departamento de Biologia Vegetal e no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, ambos na Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas - SP.

4.2. Obtenção da Biomassa de *Agaricus brasiliensis*

4.2.1. Micro-organismo

A cepa de *A. brasiliensis* foi previamente isolada por Fan Leifa em 2002 a partir de uma cultura comercial deste cogumelo, e se encontra depositada no cepário do Laboratório de Cultivo de Cogumelos – DEALI – UNICENTRO. A cepa foi mantida em meio Batata Dextrose Ágar (PDA⁴), com repiques trimestrais. O micélio foi repicado em placas de Petri contendo PDA e incubado a 30 °C durante 15 dias.

4.2.2. Preparo do inóculo

O meio de cultura padrão para o preparo do inóculo foi composto de: glicose (20 g.L⁻¹), extrato de levedura (3,95 g.L⁻¹), MgSO₄ x 7H₂O (0,3 g.L⁻¹), e K₂HPO₄ x 3H₂O (0,5 g.L⁻¹). O pH foi ajustado a 6,0 (± 0,2) com NaOH 0,1 mol.L⁻¹, sendo esterilizado a 120 °C por 15 minutos (Fan et al., 2003). Foram inoculados cinco pedaços (1 cm²) de ágar com micélio em 50 mL de meio e incubados a 30 °C, com agitação de shaker (120 rpm) por 7 dias. O micélio foi separado do caldo por filtração em tela (malha de 0,5 mm²) e lavado com 50 mL de água destilada esterilizada (Dalla Santa et al., 2010). Após o procedimento descrito acima, o micélio foi utilizado como inóculo.

⁴ Potato Dextrose Agar

4.2.3. Substratos

Os cultivos foram realizados em triplicata, usando seis diferentes substratos vegetais. A umidade foi ajustada para o cultivo do estado sólido de acordo com a absorção máxima do substrato: trigo (60%), malte (70%), bagaço de maçã (80%), bagaço de uva (80%), casca de abacaxi (80%) e bagaço de abacaxi (a umidade não é ajustada pois o bagaço permanece congelado até o momento do inóculo e é retirado somente o excesso de água).

4.2.4. Cultivo Submerso

Para o cultivo submerso foi aplicada a metodologia desenvolvida por Fan et al. (2003). Todos os substratos foram secos e moídos em granulometria menor que 60 mesh (0,250 mm). O cultivo foi conduzido em erlenmeyers (250 mL) contendo 5% (m/v) dos substratos. O pH foi ajustado a 6,0 (\pm 0,2) com NaOH 0,1 mol.L⁻¹ e inoculado com a suspensão de micélio na concentração de 5% (v/v). O meio foi incubado a 30 °C, sob agitação constante (120 rpm) por 7 dias. Após o tempo de incubação o material resultante foi filtrado em papel filtro e seco a 60 °C até atingir peso constante.

4.2.5. Cultivo Sólido

O cultivo no estado sólido foi conduzido com a granulometria dos substratos entre 14 e 18 mesh (1,00 e 1,50 mm) e pH ajustado a 6,0 (\pm 0,2) com solução de CaCO₃ (10% m/v). Foi adicionada água para obter a absorção máxima de cada substrato, e em seguida o meio foi esterilizado a 120 °C durante 15 minutos. O inóculo foi realizado com a suspensão do micélio na concentração de 5% (m/v) e incubado por 20 dias em incubadora B.O.D. (Dalla Santa, 2006).

4.3. Obtenção dos Extratos Apolares e Polares a partir dos Cultivados de *Agaricus brasiliensis*

4.3.1. Extração de compostos apolares

Para otimizar a extração do ergosterol foi aplicado um planejamento fatorial 2^3 para verificar o efeito simultâneo das variáveis fonte de aquecimento, uso de ácido e base e agente secante. Foram realizadas oito corridas aleatórias, em duplicata, para determinar qual procedimento é o mais eficiente na extração de ergosterol a partir de diferentes substratos cultivados com *A. brasiliensis*. A tabela 2 mostra os parâmetros experimentais utilizados. Como resposta foi utilizado o teor de ergosterol produzido pelo micro-organismo.

Tabela 2 - Variáveis e níveis do planejamento fatorial 2^3 para otimização da extração de ergosterol de fermentados de *Agaricus brasiliensis*.

Nível da variável	Fonte de aquecimento	Ácido e base	Agente secante
-1	Micro-ondas	Com HCl 1,0 mol.L ⁻¹ e KHCO ₃ 1,0 mol.L ⁻¹	Com Na ₂ SO ₄
1	Banho termostático	Sem HCl 1,0 mol.L ⁻¹ e KHCO ₃ 1,0 mol.L ⁻¹	Sem Na ₂ SO ₄

Os efeitos dos fatores considerados no planejamento fatorial foram calculados por:

$$E_f = (\bar{R}_+) - (\bar{R}_-)$$

Onde (\bar{R}_+) e (\bar{R}_-) são as diferenças entre os valores médios para os níveis (+) e (-), respectivamente de cada fator. Os efeitos das variáveis nos teores de ergosterol extraído de *A. brasiliensis* foram avaliados para a significância estatística no nível de 95% pelo cálculo do erro padrão. A análise estatística dos dados foi realizada empregando-se o “Minitab for Windows v.14”.

Todas as amostras de cultivados foram secas e moídas, em granulometria menor que 60 mesh. A umidade inicial foi determinada para reportar os valores do teor de ergosterol em função da massa seca. Para o procedimento de extração foram pesados 250 mg de biomassa.

Os ésteres de ergosterol naturalmente presentes nos fermentados foram hidrolisados através da reação de saponificação, com 2,0 mL de metanol e 0,5 mL de NaOH 2 mol.L⁻¹ para a obtenção de ergosterol livre. As amostras foram homogeneizadas por 30 segundos em agitador de tubos. Como fonte de aquecimento foram testados o uso de micro-ondas e banho-maria termostático. Para o aquecimento em micro-ondas foi utilizado, com alterações, o

procedimento descrito por Young (1995). Todos os tubos de ensaio com rosca foram tampados e vedados com teflon e colocados dentro de um recipiente plástico com tampa. Para o procedimento foi utilizado um forno de micro-ondas convencional (Consul MU31A0) operando em potência média (450 W) durante 20 segundos. Após resfriamento a temperatura ambiente por 15 minutos, o conjunto foi novamente aquecido por mais 20 segundos.

Para o aquecimento em banho-maria, os tubos também foram fechados e vedados com teflon. A temperatura foi termostaticamente mantida a 60 °C durante 1 hora. Após os períodos de aquecimento, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e o procedimento foi seguido pela adição ou não de ácido e base (0,85 mL de HCl e 2,0 mL de KHCO₃, ambos 1 mol.L⁻¹). A próxima etapa foi a adição de 2,0 mL de hexano, seguida de agitação por 30 segundos e centrifugação (3000 rpm durante 2 minutos) para coleta do sobrenadante. Essa última etapa de extração com hexano foi repetida 3 vezes com 2,0 mL de hexano em cada extração.

Finalmente investigou-se a necessidade de uso ou não de agente secante. Foram empregados 2,0 g de sulfato de sódio anidro, seguido de nova agitação por 30 segundos e repouso por 30 minutos. A solução extratora foi filtrada em papel Whatmann e o hexano foi evaporado em estufa com circulação de ar a 45 °C.

Os frascos contendo os extratos apolares dos fermentados foram fechados e armazenados a -18 °C em local escuro até o momento de sua análise quantitativa.

4.3.2. Extração de compostos polares

Para obtenção da fração polar na forma de extrato dos cultivados, uma nova otimização do procedimento de extração foi realizada. Empregou-se o planejamento fatorial 2³ para verificar o efeito simultâneo do solvente, temperatura e tempo de agitação, bem como a interação desses fatores. A tabela 3 mostra as variáveis utilizadas em dois níveis. O procedimento foi realizado em duplicata. Como respostas ao planejamento fatorial foram utilizados o rendimento da extração e a atividade antirradicalar dos extratos. Essa última foi avaliada no ensaio do DPPH e expressa como concentração do extrato necessária para diminuir em 50% a concentração inicial da solução de trabalho do DPPH (EC₅₀) (Sanchez-Moreno, Larrauri & Saura-Calixto, 1998).

Tabela 3 - Variáveis do planejamento fatorial 2^3 e seus valores codificados para a extração da fração polar.

Nível da variável	Solvente	Temperatura	Tempo
-1	Metanol	25 °C	4 horas
1	Etanol	50 °C	8 horas

Para a realização do procedimento, foram utilizados 2,0 gramas de biomassa em 40 mL de solvente. O conteúdo ficou sob agitação em shaker (130 rpm) na temperatura e tempo estabelecidos pelo planejamento fatorial. Ao final do procedimento foram feitas novas adições de solvente fresco nas mesmas condições (temperatura e tempo) com o objetivo de aumentar o rendimento da extração.

As melhores respostas nos ensaios de rendimento e atividade antirradicalar foram utilizadas como critérios para a escolha da metodologia que foi empregada para a extração das outras amostras.

4.4. Caracterização do Extrato Apolar

4.4.1. Validação da metodologia analítica para quantificação do ergosterol por HPLC e esteróis totais por UV-Vis

O método de quantificação de ergosterol por HPLC e UV-Vis foi avaliado quanto aos parâmetros seletividade, precisão, exatidão, linearidade, sensibilidade e robustez. Para tal preparou-se uma solução estoque de ergosterol na concentração 500 mg.L⁻¹ em etanol. As curvas de calibração, os testes de recuperação e todos os parâmetros investigados na validação do método foram realizados em triplicata pela diluição da solução estoque.

O método de calibração usado foi o do padrão externo e a curva de calibração foi construída usando solução de ergosterol em concentrações que variaram de 2 a 80 mg.L⁻¹ onde a linearidade foi investigada. A seletividade do método foi avaliada pelo teste de adição de padrão e por comparação do espectro UV e dados cromatográficos obtidos a partir do padrão puro de ergosterol e o ergosterol presente nas amostras (Brito et al., 2003).

Para HPLC, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados considerando a razão entre o desvio padrão do coeficiente linear e o coeficiente angular da curva de calibração (3:1 LD e 10:1 LQ). Para a técnica de UV-Vis, o LD e o LQ foram determinados pela razão entre o desvio padrão de dez quantificações do branco (metanol) e o coeficiente angular da curva de calibração, seguindo as mesmas razões acima citadas (Brito et al., 2003).

A precisão foi calculada pelo desvio padrão relativo (%RSD) para cada medida, através da multiplicação do desvio padrão por 100 e divisão do produto pela média.

A exatidão foi determinada através de testes de recuperação, onde as amostras de biomassa foram enriquecidas com quantidades conhecidas do padrão puro de ergosterol em três diferentes níveis de concentração e em triplicata. Nesse procedimento, foram adicionados soluções de mesmo volume e concentrações diferentes nos substratos. Todo solvente foi evaporado e então foi aplicada a metodologia de extração previamente otimizada para a extração do ergosterol dos fermentados (fig. 9). Os substratos não fermentados também foram extraídos para subtrair eventuais valores de ergosterol que poderiam estar presentes nas amostras antes do processo de fermentação.

A robustez foi avaliada pelo aumento do fluxo de solvente ($\pm 0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e pelo uso ou não de pré-coluna (Water μ Bondapak C_{18}).

4.4.2. Quantificação do ergosterol por HPLC e esteróis totais por UV-Vis

A quantificação do ergosterol por HPLC foi realizada no cromatógrafo líquido Waters Series 600 equipado com sistema de detecção por arranjo de diodos. Todas as amostras foram preparadas com etanol (grau HPLC) e filtradas previamente por membranas $0,22 \mu\text{m}$ de acetato de celulose.

Foi empregada uma pré-coluna (Water μ Bondapak, $20 \text{ mm} \times 3,9 \text{ mm d.i.}$, $10 \mu\text{m}$) e uma coluna analítica do tipo C_{18} (Macherey-Nagel Nucleosil $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm d.i.}$, $5 \mu\text{m}$). O conjunto permaneceu em temperatura ambiente. A cromatografia foi realizada em fase reversa no modo isocrático com 100% de etanol na fase móvel e fluxo de $0,65 \text{ mL}/\text{min}$. Também foi utilizado um loop de $20 \mu\text{L}$. A figura 6 exhibe o cromatógrafo líquido utilizado na realização do procedimento.



Figura 6 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado na separação e quantificação do ergosterol.

Inicialmente o detector por arranjo de diodos foi programado no modo de varredura de 210 a 400 nm, para determinar o comprimento de onda de absorvância máxima para a detecção do ergosterol. O comprimento de onda de 283 nm foi escolhido para melhor sensibilidade na quantificação do ergosterol.

A identidade do ergosterol foi verificada e garantida com base no tempo de retenção (7,35 minutos) do padrão puro de ergosterol e pelo seu espectro UV. A quantificação foi feita através da curva de calibração por padrão externo traçando a área do pico em função da concentração do padrão analítico.

As análises por UV-Vis foram executadas também em triplicata no espectrofotômetro Varian Cary 50. Inicialmente foi feita varredura na amostra para determinar o comprimento de onda que proporciona a melhor absorvância e foi escolhido 282 nm. Para as quantificações foi empregada uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico e etanol como branco. O método de calibração por padrão externo foi novamente empregado. A figura 7 mostra o espectrofotômetro empregado nas análises de quantificação dos esteróis totais.



Figura 7 - Espectrofotômetro UV-Vis utilizado na quantificação dos esteróis totais.

4.4.3. Identificação dos componentes do extrato apolar por CG-MS

A identificação dos compostos presentes no extrato apolar foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso (Agilent 7890A) acoplado ao espectrômetro de massas (Agilent 5975C). Os componentes foram separados em uma coluna capilar Agilent (HP-1 30 m × 0,25 mm d.i., 0,25 μm). A figura 8 exibe o cromatógrafo gasoso empregado na análise do extrato apolar.



Figura 8 - GC-MS utilizado na identificação dos componentes polares no extrato hexânico de *A. brasiliensis*.

A temperatura do forno foi inicialmente mantida em 50 °C por 5 minutos e sendo aumentada até 300 °C sob uma taxa de 5 °C/min, depois mantido por um período de 2 minutos em isoterma. A temperatura do injetor e detector foi de 250 e 300 °C, respectivamente. Foi utilizado hélio como gás de arraste no fluxo de 1,5 mL/minuto no modo sem divisão de fluxo (splitless). O volume de injeção foi de 1,0 µL. Os componentes foram identificados através de comparação entre os tempos de retenção obtidos pelas injeções de padrões puros e por comparação dos fragmentos com os dados armazenados na biblioteca de espectros (NIST 2008). Foi utilizada ionização por elétrons (EI⁵) como fonte de ionização, com potencial ajustado em 70 eV. Todas as amostras foram derivatizadas através de reação com N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA). Para o procedimento, foram adicionados 50 µL de BSTFA, reagindo por uma hora a 60 °C. Os compostos identificados foram semi-quantificados através de normalização interna da área de cada pico com a soma das áreas de todos os picos.

4.5. Caracterização do Extrato Polar

4.5.1. Atividade antirradicalar por ensaio de DPPH

A atividade antirradicalar dos extratos polares foi avaliada usando o 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH[•]) pelo método proposto por Blois (2002), com modificações. A partir de uma solução padrão estoque de DPPH (1000 mg.L⁻¹) foi preparada uma solução de trabalho de concentração conhecida (40 mg.L⁻¹). Alíquotas em diferentes concentrações do extrato foram adicionadas à solução de trabalho e o volume foi ajustado para 5,0 mL. Metanol foi utilizado como branco e a absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-Vis em $\lambda = 515$ nm. A capacidade antirradicalar dos extratos foi expressa através dos valores de EC₃₀ pois os substratos sem fermentação não apresentaram o valor mínimo para cálculo de EC₅₀. Para tal, um gráfico foi construído a partir da porcentagem de inibição versus a concentração do extrato em mg/L. A porcentagem de inibição é dada por:

⁵ Electron Ionization

$$\% \text{inibicao} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100$$

Onde, A_0 é a absorvância inicial da solução de trabalho de DPPH em metanol na ausência de extrato e A_1 é a absorvância final dessa solução na presença da amostra após 30 minutos de reação (Sanchez-Moreno et al., 1998).

4.5.2. Determinação do teor de fenólicos totais

Os teores de fenólicos totais foram medidos de acordo com o método de Folin-Ciocalteu, proposto por Rossi e Singleton (1965), com modificações. Os resultados são expressos como equivalentes de ácido gálico. Foi preparada uma solução padrão estoque de ácido gálico (1000 mg.L^{-1}) em metanol e 100,0 mL de solução tampão de carbonato e tartarato de sódio (20,0 e 1,2 g, respectivamente) em meio aquoso com $\text{pH} = 11,0 \pm 0,2$. Antes da leitura das amostras, foi feita uma varredura para determinar se as amostras não absorviam no comprimento de onda utilizado na quantificação. As leituras da absorvância foram feitas em espectrofotometro UV-Vis (figura 5) em $\lambda = 760 \text{ nm}$. A partir de diluições da solução estoque, foi construída a curva de calibração, adicionando 300 μL do padrão de ácido gálico em diferentes concentrações com 500,0 μL do reagente Folin-Ciocalteu e 500,0 μL de solução saturada de tampão. O volume foi ajustado com água ultra-pura para 5,0 mL.

Para as amostras foi empregado o mesmo procedimento descrito anteriormente, substituindo apenas a solução estoque de ácido gálico por soluções metanólicas dos extratos polares. Após avolumar todas as amostras foi esperado uma hora (tempo determinado através da análise da variação de absorvância no tempo) para que a reação fosse completa. Em seguida foi feita a leitura no espectrofotômetro.

4.5.3. Determinação do teor de flavonoides

Para a determinação do teor de flavonoides foi utilizado o método de complexação com cloreto de alumínio em metanol. Para isto, foi preparada uma solução estoque de quercetina 0,01 % (m/v) e solução de cloreto de alumínio 5,0 % (m/v), ambas em metanol (Bors, Heller, Michel & Saran, 1990).

Para a construção da curva de calibração foram adicionadas alíquotas de 500,0 μL de concentração conhecida da solução padrão de quercetina e 250,0 μL da solução de AlCl_3 . O volume foi ajustado com metanol para 5,0 mL. Esperou-se 30 minutos e fez-se a leitura da absorbância no espectrofotômetro UV-Vis (figura 5) no comprimento de onda de 425 nm.

Para as amostras, foi utilizado o mesmo procedimento, apenas substituindo o padrão de quercetina pelas soluções metanólicas dos extratos polares.

4.5.4. Análise do extrato polar por UPLC-MS/MS

Os extratos polares foram analisados no cromatógrafo líquido de ultra eficiência (Waters Acuity) equipado com espectrômetro de massas. Os fingerprints foram obtidos pela inserção direta de 10,0 μL de amostra com ionização por eletrospray (ESI) no modo negativo. A figura 7 mostra o equipamento de UPLC utilizado na identificação dos componentes polares.



Figura 9 - Cromatógrafo líquido de ultra eficiência empregado nas análises de identificação dos componentes polares no extrato metanólico de *A. brasiliensis*.

Outra etapa de caracterização foi a separação cromatográfica dos componentes em coluna analítica Waters Acuity C_{18} BEH (50 mm \times 2,1 mm d.i., 1,7 μm) com temperatura termostaticada em 30 $^{\circ}\text{C}$. Como fase móvel foi utilizado água com 0,1 % de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila (solvente B), no fluxo de 0,2 mL/min. A condição inicial foi 95%

de A e 5% de B, mudando em gradiente linear para 100% B aos 9 minutos, mantendo essa condição até 10 minutos. Então foi retornada à condição inicial e estabilizada em 12 min. Nitrogênio e argônio foram utilizados como gases de nebulização e colisão, respectivamente. A ionização por eletrospray foi conduzida através das seguintes condições: voltagem de capilar -3,5 KV, cone -30 V, temperatura da fonte e de dessolvatação, 150 e 350 °C, respectivamente. Como gás de colisão foi utilizado argônio e a energia de colisão para dissociação induzida (CID⁶) foi de 25 eV. Os dados espectrais foram obtidos na faixa de 100 - 800 m/z.

4.6. Análise Estatística

O desenho experimental e a estatística básica foram conduzidos através do software Matlab&Simulink-R2006. Diferenças estatísticas entre os resultados experimentais foram verificadas por ANOVA para um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). O teste de Pearson foi empregado para comparação entre resultados significativos. A análise de correlação entre as duas metodologias empregadas para a determinação de ergosterol em fermentados de *A. brasiliensis* - UV-Vis e HPLC foi realizada e empregou-se um *teste-t* no nível de 95% de confiança para verificar se a correlação entre estas variáveis era significativa. Para obter uma relação quantitativa entre estas variáveis foi aplicada uma análise de regressão linear no nível de 95% de confiança e construídos intervalos de confiança e de predição para o modelo gerado. Toda a análise estatística dos dados foi realizada usando o pacote estatístico Minitab for Windows v. 16.

5. Resultados e Discussões

5.1. Extrato Apolar

5.1.1. Otimização do procedimento de extração

Para otimização do procedimento foi realizada a extração de acordo com os critérios estabelecidos no planejamento fatorial 2³. Como resposta à otimização, obteve-se por HPLC o

⁶ Collision Induced Dissociation

teor de ergosterol em função da massa inicial de biomassa. A matriz de planejamento bem como as respostas médias obtidas e os efeitos calculados estão representados na tabela 4.

Tabela 4 - Matriz de planejamento fatorial 2³ e resultados para os teores de ergosterol extraídos de fermentados de *A. brasiliensis*.

Enasio	Fonte de aquecimento	Ácido e base	Agente secante	Teores de ergosterol (Média ± SD) (µg/g)
1	-1	-1	-1	126,72 ± 4,67
2	1	-1	-1	121,03 ± 1,84
3	-1	1	-1	205,86 ± 4,84
4	1	1	-1	191,08 ± 5,57
5	-1	-1	1	210,04 ± 3,27
6	1	-1	1	199,41 ± 2,72
7	-1	1	1	366,79 ± 16,59
8	1	1	1	334,14 ± 16,67
Efeitos			Estimativa ± Desvio Padrão*	
Média			219,38 ± 1,28	
Média dos efeitos				
Fonte de aquecimento (1)			15,94 ± 2,55	
Ácido e base (2)			-110,16 ± 2,55	
Agente secante (3)			-116,42 ± 2,55	
Interações entre dois fatores				
(1)×(2)			7,78 ± 2,55	
(1)×(3)			5,71 ± 2,55	
(2)×(3)			-35,78 ± 2,55	
Interação entre três fatores				
(1)×(2)×(3)			3,23 ± 2,55	

* O erro padrão dos efeitos foi calculado a partir do desvio padrão apresentados no topo da tabela.

A análise do valor obtido pelo *teste-t* e o *teste-F* indicam efeito significativo para todas as variáveis qualitativas (fonte de aquecimento, uso de ácido/base e agente secante), bem como os efeitos de interação entre os fatores (2) × (3) (Tabela 4). Esses fatores apresentaram uma influência negativa no teor de ergosterol extraído durante o procedimento, diminuindo o rendimento da extração. A etapa de adição de ácido e base, bem como a de agente secante, requerem processos de separação e filtragem da fase aquosa e orgânica. Durante essas etapas, parte do ergosterol é perdido, o que resulta na diminuição do rendimento da extração. Assim, os melhores resultados foram obtidos na ausência de ácido e base, e agente secante (corridas 7 e 8). A figura 9 mostra o gráfico de Pareto para o planejamento fatorial.

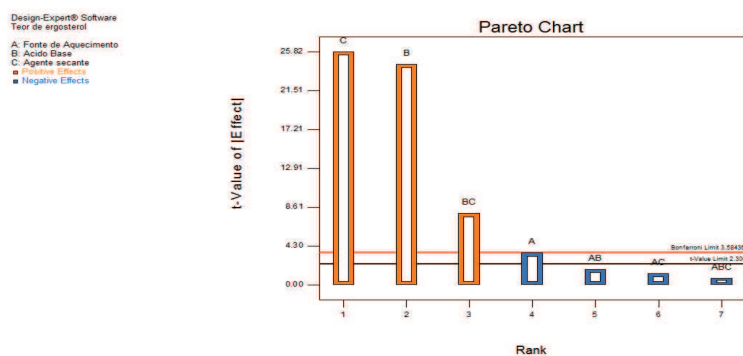


Figura 10 - Gráfico de Pareto com as respostas do planejamento fatorial para otimização do procedimento de extração da fração apolar no nível de 95% de confiança.

Os resultados da otimização da extração demonstram que é necessária apenas a hidrólise dos ésteres de ergosterol com base para liberar o ergosterol e em seguida sua extração do meio fermentado através da partição líquido-líquido com o hexano. Quando comparado com o banho termostático, o micro-ondas apresentou um rendimento superior, assim ele foi escolhido devido a sua simplicidade e o menor tempo de extração. Desse modo, todas as extrações foram conduzidas de acordo com fluxograma mostrado na figura 11.

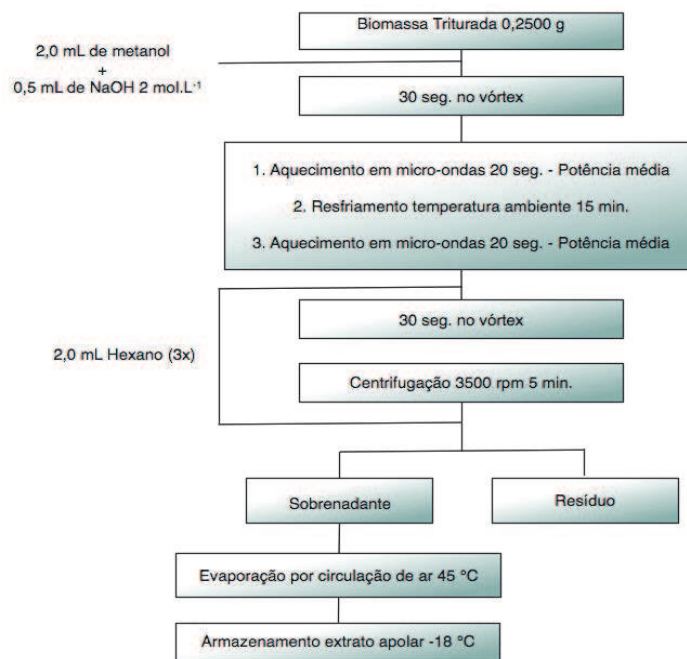


Figura 11 - Fluxograma com as etapas otimizadas para a extração de ergosterol em substratos fermentados e não fermentados.

5.1.2. Validação do Método por HPLC e UV-Vis

Primeiramente, o método de adição de padrão foi empregado para verificar possíveis efeitos de matriz sobre os resultados. A biomassa foi dopada com concentrações de ergosterol variando de 10 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e seguidamente extraída segundo o método otimizado. Cada extrato foi analisado por HPLC e UV-Vis para a determinação do seu conteúdo de ergosterol. Na figura 12

são mostradas as curvas analíticas obtidas por adição de padrão e por padrão externo, ($A = 35685,09C + 531222,85$, $r = 0,9969$ e $A = 38959,97C + 37601,74$, $r = 0,9998$), respectivamente. A resposta analítica A corresponde à área sob o pico cromatográfico do ergosterol e C a concentração. As linhas paralelas demonstram a semelhança entre os coeficientes angulares (razão = 1,09) e portanto, que não há redução de sensibilidade na presença da matriz. Pode-se concluir então que não há influência da matriz na quantificação do ergosterol. Assim, o método de calibração por padrão externo foi escolhido devido a sua simplicidade.

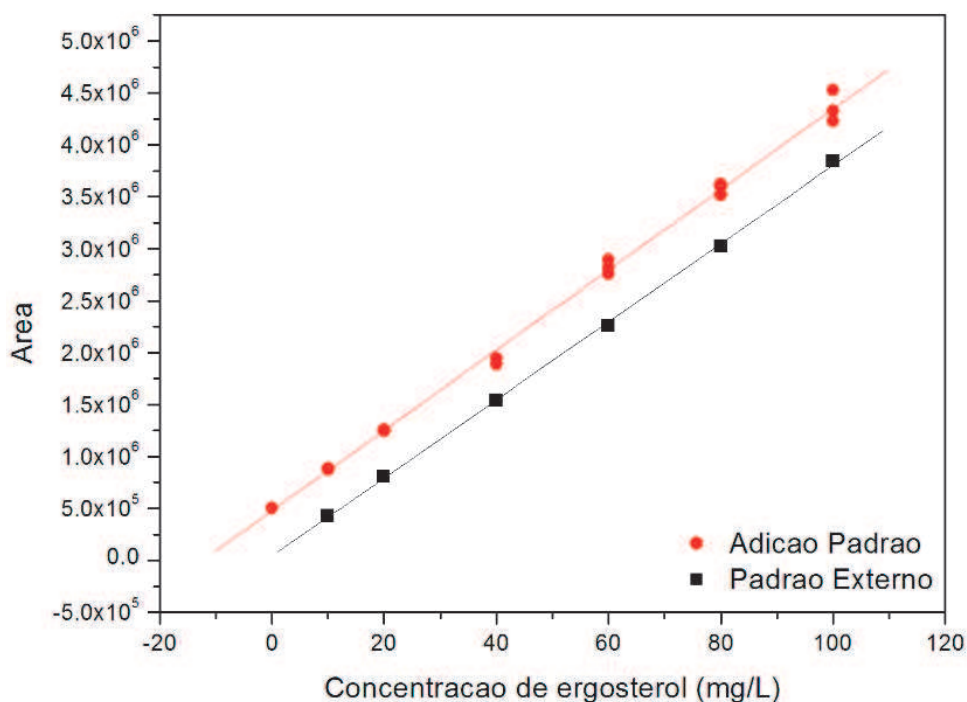


Figura 12 - Comparação entre o método de adição de padrão e o método de padrão externo nas quantificações de ergosterol.

Na figura 13 são mostradas as curvas de calibração externa para a determinação de ergosterol nos diferentes extratos apolares por HPLC (fig. 13a) e UV-Vis (fig. 13b). Cada ponto da curva foi injetado em triplicata. A linearidade foi sempre obedecida na faixa de concentração aplicada e todos os coeficientes de correlação foram superiores a 0,999.

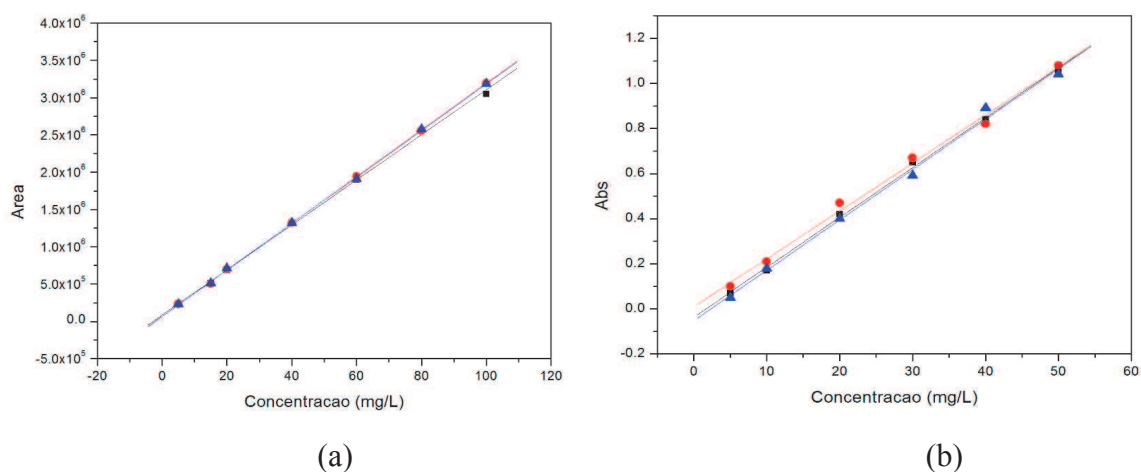
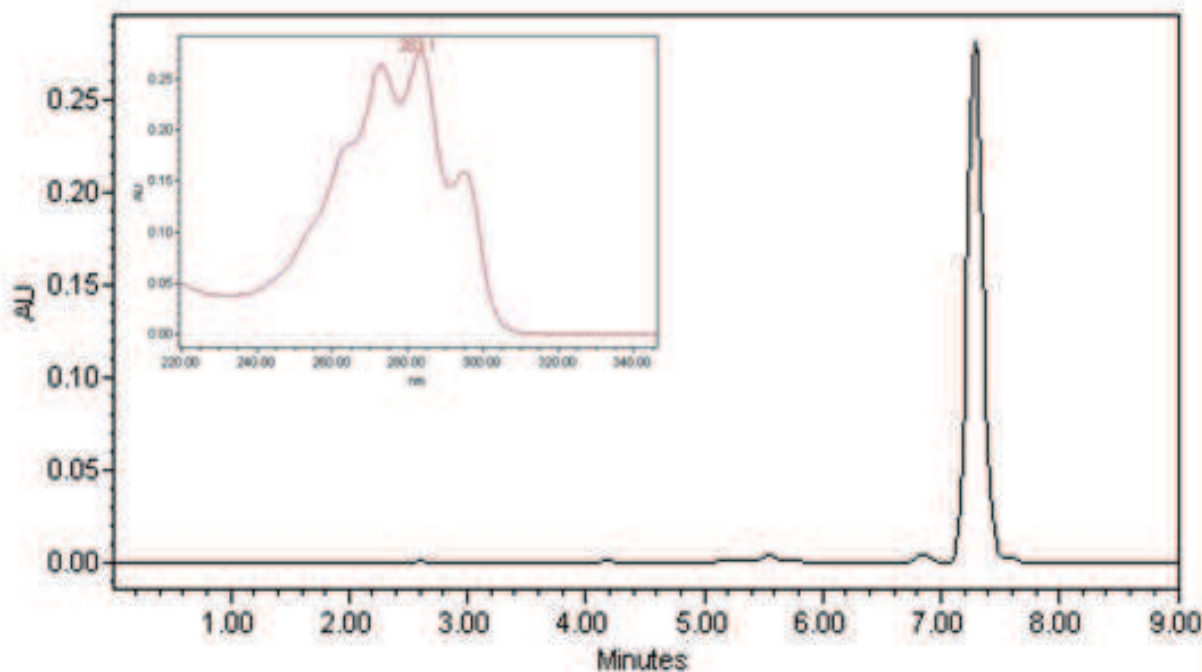


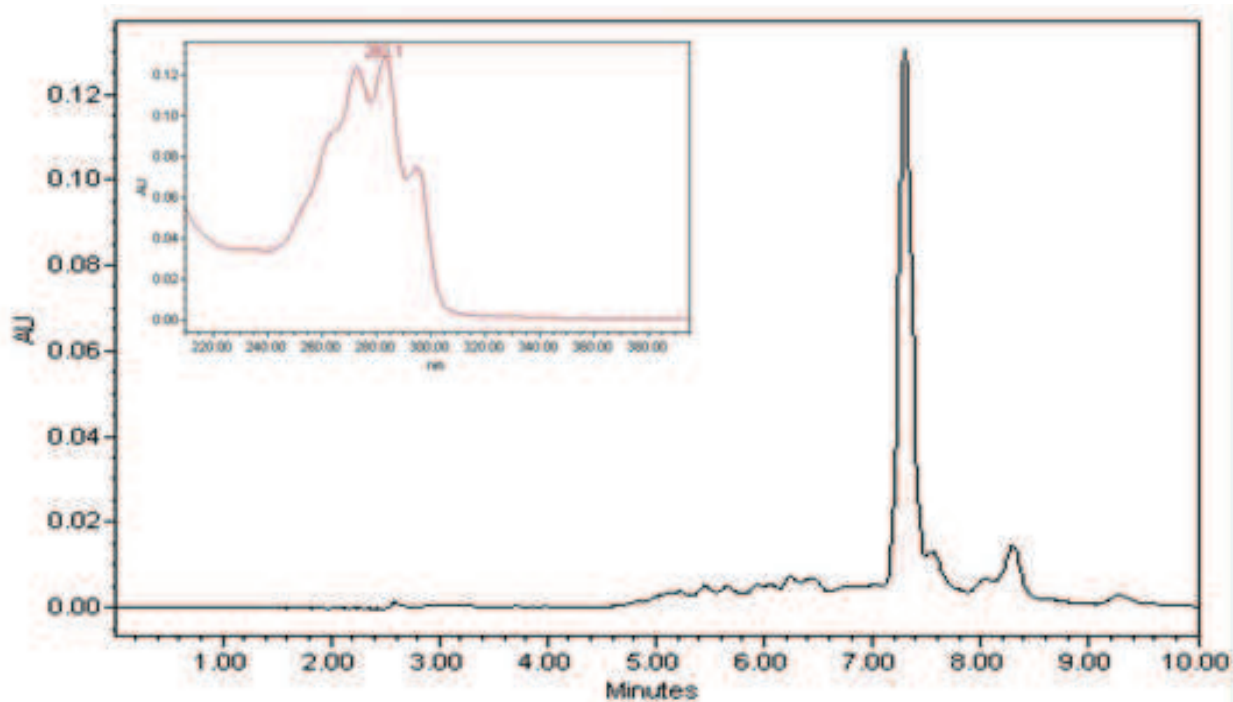
Figura 13 - Curva analítica construída em triplicata para a quantificação do ergosterol através do método de calibração por padrão externo para HPLC (a) e UV-Vis (b).

A equação da reta utilizada para o cálculo dos valores de ergosterol por HPLC e esteróis totais por UV-Vis foi obtida por regressão linear e são definidas respectivamente por: $A = 41203,382C + 40471,656$, $r^2 = 0,9994$ e $A = 0,02191C - 0,02653$, $r^2 = 0,9996$.

Outro parâmetro avaliado foi a seletividade. Esta foi garantida pela comparação do tempo de retenção do ergosterol (7,35 minutos) e de seu espectro UV no padrão puro e nas amostras. Verifica-se nos cromatogramas que o tempo de retenção permaneceu o mesmo durante as quantificações. A identidade do pico foi confirmada pelo espectro UV/PDA nas mesmas condições de eluição. Na figura 14 é possível observar a similaridade entre o tempo de retenção e o espectro UV para o padrão (fig. 14a) e para o ergosterol no extrato (fig. 14b). Também foi possível comparar a seletividade do método analítico, pelo teste de adição de padrão, uma vez que os outros compostos do extrato não coeluíram com o ergosterol e não interferiram na sua determinação. No entanto, não foi possível observar esse efeito nas análises por UV-Vis. A técnica não demonstra seletividade para o ergosterol, uma vez que existem outros esteróis presentes no extrato que absorvem no mesmo comprimento de onda do analito (283 nm).



(a)



(b)

Figura 14 - Cromatogramas do padrão analítico de ergosterol (a) e ergosterol na amostra (b).

Em detalhe o espectro UV do pico.

O LD e o LQ foram calculados através dos parâmetros obtidos nas curvas analíticas e estão reportados na tabela 5.

Tabela 5 - Valores dos limites de detecção e quantificação para as determinações de ergosterol por HPLC e UV-VIS.

Ergosterol (mg.L ⁻¹)	HPLC	UV-Vis
LD	1,529	1,283
LQ	5,098	4,276

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação por adição de padrão. Uma amostra de biomassa foi enriquecida com padrão de ergosterol em três níveis: 5,0; 25,0 e 50,0 µg/mL. O experimento foi executado em triplicata. Todas as amostras foram extraídas e quantificadas,

conforme o procedimento otimizado (fig. 11). Os valores de recuperação para o ergosterol ficaram entre 97,61 e 99,88% para o método de quantificação por HPLC e entre 94,89 e 105,26% para o UV-Vis. Esta alta porcentagem de recuperação evidencia que um método de extração simplificado é apropriado para a extração do ergosterol e também que o método analítico proposto aqui é sensível a pequenas variações de concentração de ergosterol, mostrando-se exato durante as determinações. Os resultados obtidos para o teste de recuperação são mostrados na tabela 6.

De acordo com Brito e colaboradores (2003), é possível relacionar o valor da recuperação em função do nível da concentração de analito na amostra. Para concentrações menores ou iguais a 0,1%, a faixa de recuperação aceitável deve estar entre 95 a 105%. Tanto na determinação por HPLC quanto por UV-Vis, os valores obtidos estão dentro da faixa tolerável.

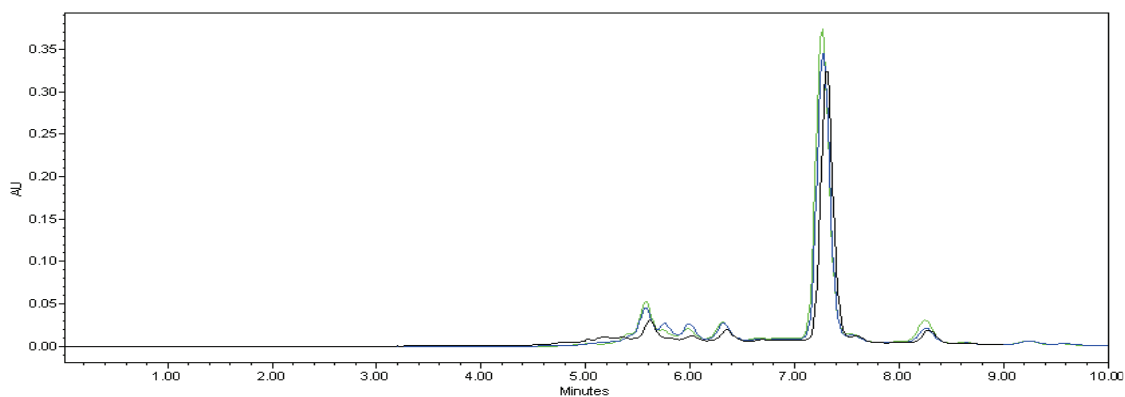
Tabela 6 - Valores do desvio padrão relativo e percentual de recuperação para as médias das determinações por HPLC e por UV-Vis.

Nível de dopagem (mg.L ⁻¹)	HPLC		UV-Vis	
	RSD %	Recuperação %	RSD %	Recuperação %
5	25,63	99,88	24,24	94,89
25	16,42	99,85	16,24	102,74
50	15,30	97,61	14,81	105,26

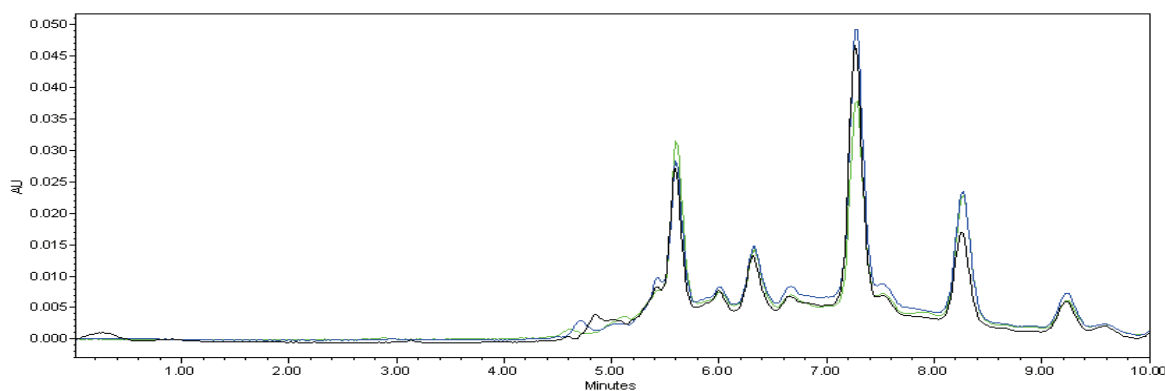
Não foram observadas alterações significativas no método de quantificação de ergosterol quando o fluxo da fase móvel foi alterado ou quando foi usado pré-coluna. Este resultado indica que pequenas alterações nos parâmetros do sistema de operação não influenciarão os resultados analíticos, indicando a robustez do método analítico.

5.1.3. Determinação dos teores de ergosterol produzidos pelo *Agaricus brasiliensis* por HPLC e UV-Vis

A metodologia desenvolvida para quantificações de ergosterol por HPLC permite cromatogramas com picos estreitos, boa resolução e pequeno tempo de retenção (7,35 minutos). A figura 15 mostra um cromatograma típico de extratos obtido a partir de fermentados do bagaço da maçã em triplicata, para o substrato na fase submersa (fig. 15a) e na fase sólida (fig. 15b).



(a)



(b)

Figura 15 - Cromatogramas para a fermentação em triplicata do bagaço da maçã na fase submersa (a) e na fase sólida (b).

Pode-se observar através do comportamento cromatográfico que tanto as fermentações em ambas as fases como o processo de extração são reproduzíveis.

Na tabela 7 são mostrados os valores médios de concentração do ergosterol em função do valor da biomassa inicial para cada substrato vegetal avaliado nas fermentações submersas e no estado sólido. Os valores de ergosterol encontrados nos substratos antes do processo de

fermentação para a casca de abacaxi e malte, $5,5 \pm 0,6 \mu\text{g g}^{-1}$ e $8,8 \pm 0,3 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, foram subtraídos dos valores reportados na tabela 6. Para as determinações por UV-Vis os valores foram, respectivamente, $11,0 \pm 1,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $24,2 \pm 0,9 \mu\text{g.g}^{-1}$. Para todos os outros substratos o teor de ergosterol ficou abaixo do limite de detecção, confirmando a hipótese que o ergosterol pode ser utilizado como uma ferramenta útil na estimativa do crescimento fúngico (Seitz et al., 1977; Newell & Fallon, 1991; Montgomery et al., 2000; Tardieu et al., 2007).

Tabela 7 - Valores médios e desvio padrão de esteróis totais determinados pela metodologia de UV-Vis e de ergosterol obtidos pela metodologia de HPLC para diferentes amostras de fermentados de *A. brasiliensis*. Dados são apresentados em $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Amostras de Fermentados	Metodologia HPLC	Metodologia UV-Vis
Bagaço de maçã (FS)	$587,22 \pm 46,86$	$1684,33 \pm 151,16$
Bagaço de maçã (FES)	$60,22 \pm 8,13$	$421,11 \pm 47,63$
Casca de Abacaxi (FS)	$577,33 \pm 20,58$	$990,11 \pm 32,90$
Casca de Abacaxi (FES)	$153,22 \pm 23,68$	$515,33 \pm 66,24$
Bagaço de Uva (FS)	$519,78 \pm 11,54$	$838,11 \pm 49,64$
Bagaço de Uva (FES)	$995,00 \pm 58,84$	$4097,78 \pm 107,45$
Trigo (FS)	$318,11 \pm 30,31$	$812,78 \pm 68,04$
Trigo (FES)	$476,56 \pm 79,89$	$1190,22 \pm 104,36$
Bagaço de Abacaxi (FS)	$527,89 \pm 44,14$	$896,67 \pm 74,23$
Bagaço de Abacaxi (FES)	$227,22 \pm 28,64$	$517,44 \pm 91,40$
Malte (FS)	$2427,11 \pm 191,42$	$4952,11 \pm 382,23$
Malte (FES)	$105,89 \pm 18,23$	$365,33 \pm 74,84$

*Valores representados como média \pm desvio padrão para as três quantificações de cada fermentado, expressos por grama de substrato.

Para comparar os resultados, foi realizada análise da variância (ANOVA), seguida de comparação múltipla de médias e verificar os efeitos simultâneos do tipo de fermentação e do tipo de substrato, no teor de ergosterol, assim foi realizada uma análise de variância de dois fatores (two way ANOVA). A fermentação FS produz valores médios de ergosterol mais do que o dobro do obtido com a fermentação do estado sólido FES independente do tipo de substrato utilizado. Os valores médios de ergosterol para os substratos malte e uva foram mais elevados do que os demais substratos independentemente do tipo de fermentação adotada. Isto pode ser explicado devido aos nutrientes estarem mais disponíveis no meio submerso.

Para os teores de ergosterol dos substratos maçã, casca de abacaxi, bagaço de abacaxi e trigo não foram observadas diferenças significativas a 95% de confiança devido a sobreposição dos intervalos de confiança. Os resultados da ANOVA sugerem que existem efeitos muito significativos do tipo de fermentação ($p < 0,05$), tipo de substrato ($p < 0,05$) bem como um efeito de interação entre estas variáveis ($p < 0,05$). O efeito de interação pode ser explicado pelo fato do substrato malte apresentar maiores valores de ergosterol na fermentação submersa (FS) em relação a fermentação FES. No entanto, o substrato uva permite maiores valores de ergosterol quando se utiliza a fermentação FES. Assim, observa-se que o substrato malte na fase submersa mostrou-se como o melhor meio para o crescimento do *A. brasiliensis*. Isto deve-se ao processo de malteação pelo qual a cevada é submetida para a produção do malte. Durante esse processo as enzimas quebram o amido do substrato, através de uma germinação controlada, o que facilita a fermentação e crescimento do micro-organismo.

Os valores obtidos para a quantificação por UV-Vis são superiores aos que foram encontrados por HPLC, uma vez que a absorção no $\lambda = 282,1$ nm não pode ser seletivamente atribuída ao ergosterol. Outros esteróis presentes na amostra podem absorver nesse comprimento de onda, mascarando o valor real do ergosterol. Conseqüentemente, os valores encontrados pela determinação por UV-Vis podem ser considerados como o teor total de esteróis presentes nos extratos, um parâmetro que também é útil na quantificação do crescimento de biomassa (Mattila et al, 2002; Teichmann, Dutta, Staffas & Jagerstad, 2007).

Os resultados da ANOVA para os esteróis totais mostraram a mesma tendência observada para os valores de ergosterol obtidos com relação ao tipo de fermentação e de

substrato e interação entre estas variáveis. No entanto, as diferenças entre os teores médios de esteróis totais para o tipo de fermentação e de substrato foram menos pronunciadas.

Com relação aos teores de esteróis totais não foram observadas diferenças significativas entre os substratos de uva e malte, entre os substratos de casca e bagaço de abacaxi e entre os substratos de maçã e trigo independente do tipo de fermentação aplicado. No entanto, os substratos de uva e malte foram os que apresentaram os maiores valores de esteróis totais enquanto que os substratos de casca e bagaço de abacaxi os valores mais baixos.

Os valores para o desvio padrão relativo (RSD%) entre 2 e 20% indicam boa repetitividade entre as fermentações, processo de extração e precisão aceitável para o método de quantificação empregado, considerando a faixa de concentração que o ergosterol esta presente nas amostras (Brito et al., 2003).

Os valores elevados do desvio padrão relativo são atribuídos ao processo de fermentação, pois este configura um sistema biológico sujeito a variabilidades não controladas. Os resultados foram obtidos a partir de fermentações em triplicata.

5.1.4. Correlação entre as quantificações por HPLC e UV-Vis

As determinações de ergosterol por UV-Vis não são seletivas, o que proporciona um desvio dos resultados nas análises quantitativas, pois a absorção no comprimento de onda de 282,1 nm não pode ser seletivamente atribuída ao ergosterol.

No entanto, a técnica de UV-Vis é extremamente simples, rápida, de baixo custo e de fácil acesso. Assim, busca-se conhecer uma relação que permita estimar o valor real do ergosterol nas amostras através da análise por UV-Vis, fornecendo um resultado rápido e mais próximo do valor verdadeiro, o que não dispensaria o uso de HPLC para obtenção de um resultado exato. Esta correlação facilitará as análises rotineiras (no acompanhamento da evolução da fermentação, por exemplo), quando não há necessidade de se obter um valor exato.

Os valores médios de esteróis totais determinados pela metodologia UV-Vis e de ergosterol obtidas por HPLC e seus respectivos desvios-padrão para as amostras de fermentados de *A. brasiliensis* são apresentados na Tabela 7. Os valores médios obtidos para a

quantificação de ergosterol pela metodologia UV-Vis foram superiores aos que foram encontrados pela metodologia de HPLC.

Para verificar se é possível relacionar os valores de ergosterol determinados por HPLC com os valores de esteróis totais obtidos por UV-Vis foi aplicada uma análise de correlação linear no nível de 95% de confiança e aplicado um *teste-t* para cada tipo de cultivo adotado (FS e FES) para os substratos apresentados na Tabela 7 (Figura 16).

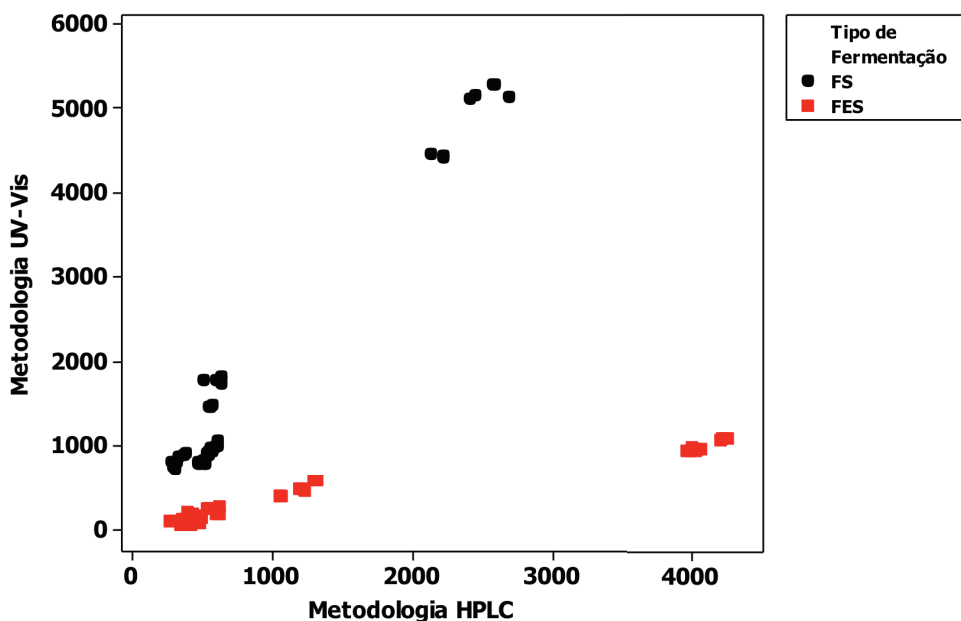


Figura 16 - Gráfico de dispersão dos valores de esteróis totais determinados pela metodologia UV-Vis e de ergosterol pela metodologia HPLC para os fermentados em fase submersa - FS (●) e fermentados no estado sólido FES (■).

A análise do gráfico de dispersão entre os valores de esteróis totais determinados pela metodologia de UV-Vis e de valores de ergosterol obtidos pela metodologia de HPLC para os fermentados derivados dos diferentes substratos cultivados nos dois tipos de fermentação (FS e FES) indicou uma forte correlação linear positiva com $r = 0,984$ ($p = 0,000$) entre estas variáveis para o cultivo FS e $r = 0,970$ ($p = 0,000$) para o cultivo FES, significativas no nível de 95% de confiança, de acordo com os resultados do *teste-t*. Na Figura 16, observa-se que com o aumento dos teores de ergosterol determinados por HPLC, há proporcionalmente um aumento nos valores de esteróis totais obtidos pela metodologia de UV-Vis.

Para descrever quantitativamente a relação linear positiva entre os teores de ergosterol determinados por HPLC e os esteróis totais obtidos por UV-Vis para os dois tipos de cultivo

dos substratos foi aplicada uma análise de regressão linear simples para estas variáveis no nível de 95% de confiança. Os resultados da ANOVA são apresentados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Análise de variância para a regressão linear simples entre os teores de ergosterol determinados por HPLC e os teores de esteróis totais obtidos por UV-Vis no nível de 95% de confiança para os fermentados cultivados por fermentação submersa (FS).

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{obs}
Regressão	1	1175046014	117046014	1598,59 ^a
Resíduo	52	3807353	73218	
Total	53	120853368		R ² = 96,7%

^a significativo: $F_{obs} > F_{crit(0,05;1,52)} = 4,0$

Tabela 9 - Análise de variância para a regressão linear simples entre os teores de ergosterol determinados por HPLC e os teores de esteróis totais obtidos por UV-Vis no nível de 95% de confiança para os fermentados cultivados por fermentação submersa (FES).

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{obs}
Regressão	1	90336664	90336664	819,36 ^a
Resíduo	52	5733115	110252	
Total	53	96069779		R ² = 93,9%

^a significativo: $F_{obs} > F_{crit(0,05;1,52)} = 4,0$

Os resultados da ANOVA (Tabelas 8 e 9) sugerem que a análise de regressão linear envolvendo as variáveis, teor de ergosterol determinado por HPLC e teores de esteróis totais obtidos por UV-Vis para os dois tipos de cultivo (FS e FES) dos substratos são significativas no nível de 95% de confiança. Estas apresentaram porcentagens de variação explicada (R²) iguais a 96,7% para o cultivo FS e 93,9% para o cultivo FES indicando que somente 2,3% e

6,1%, respectivamente, da variação nos valores podem ser atribuídas aos resíduos. Estes dados sugerem que se poderia utilizar equações de reta para prever os teores de ergosterol por HPLC a partir de medidas de esteróis totais pela metodologia UV-Vis dos fermentados *A. brasiliensis* investigados para cada tipo de cultivo empregado.

Os coeficientes das retas de regressão, bem como seus erros-padrão, valores de t observado e valores de p no nível de 95% de confiança são apresentados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Equação da reta, erros-padrão (E.P.) dos coeficientes e valores de t observado (t_{obs}) e de p para a relação entre os teores de ergosterol determinados por HPLC e os teores de esteróis totais obtidos por UV-Vis no nível de 95% de confiança para os fermentados cultivados por fermentação submersa (FS).

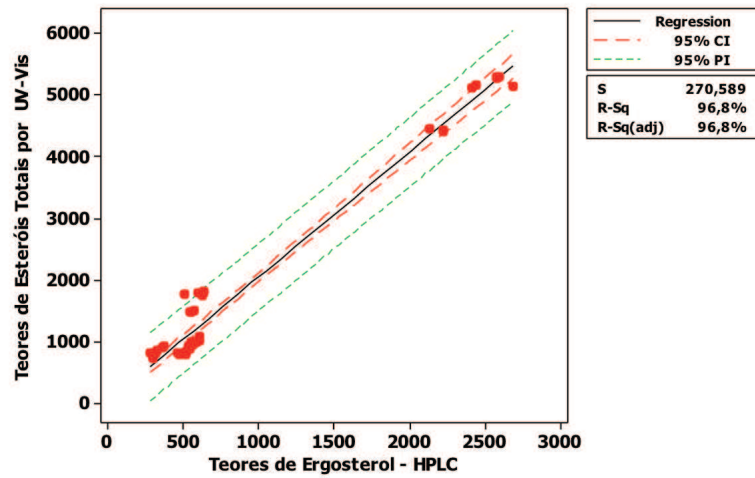
Equação da Reta	Coeficientes \pm E.P.	t_{obs}	Valor p
Esteróis totais UV-Vis = 2,03*Ergosterol-HPLC	20,28 \pm 55,78	0,36	0,718
	2,03 \pm 0,05	39,98	0,000

Tabela 11 - Equação da reta, erros-padrão (E.P.) dos coeficientes e valores de t observado (t_{obs}) e de p para a relação entre os teores de ergosterol determinados por HPLC e os teores de esteróis totais obtidos por UV-Vis no nível de 95% de confiança para os fermentados cultivados por fermentação no estado sólido (FES).

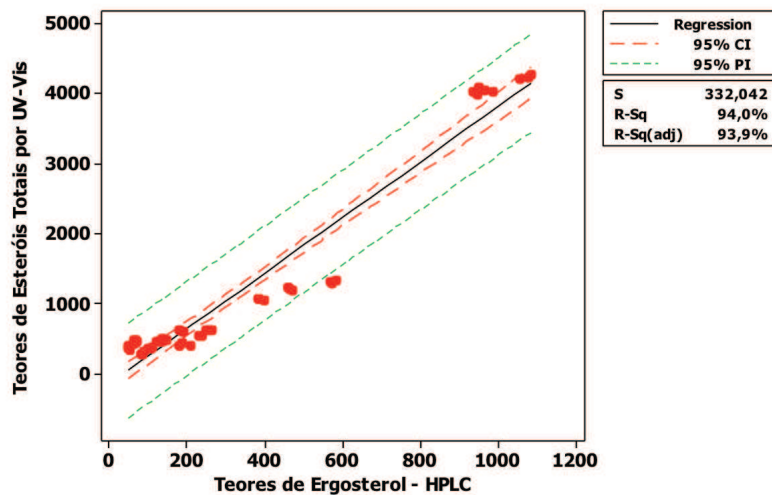
Equação da Reta	Coeficientes \pm E.P.	t_{obs}	Valor p
Esteróis totais UV-Vis = -148,27 + 3,96*Ergosterol-HPLC	-147,27 \pm 64,88	-2,29	0,026
	3,96 \pm 0,14	28,62	0,000

Para a relação descrita na Tabela 9 foi observada que a equação da reta passa pela origem, pois o coeficiente linear não é significativo ($p > 0,05$) e, portanto, não deve ser inserido no modelo. Para o coeficiente angular das duas equações de reta apresentadas nas Tabelas 10 e 11 os erros-padrão foram bem inferiores aos valores encontrados para os coeficientes e valores de $p < 0,05$ sugerindo que estes são significativos à 95% de confiança e devem ser inseridos no modelo. As retas de regressão bem como seus respectivos intervalos

de confiança e intervalos de predição para os fermentados cultivados por FS e FES são apresentadas na Figura 17(a) e 17(b), respectivamente.



(a)



(b)

Figura 17 - Gráfico da reta de regressão, intervalos de confiança (I.C.) e intervalos de predição (I.P.) no nível de 95% de confiança para a relação quantitativa entre os teores de esteróis totais determinados por UV-Vis e teores de ergosterol obtidos por HPLC para fermentados de *A. brasiliensis* cultivados por FS (a) e FES (b).

Os intervalos de confiança para as retas de regressão (Figuras 17a e 17b) apresentaram amplitudes relativamente pequenas, devido ao bom ajuste das retas ($R^2 = 96,7\%$ e $93,9\%$) demonstrando que se pode conseguir uma boa precisão das estimativas a partir dos modelos

gerados. Comportamento similar foi observado para as bandas de predição de fermentados de *A. brasiliensis* cultivados por FS (Figura 17a). As bandas de predição para a equação de reta obtida para os fermentados cultivados por FES foram mais amplas do que a determinada para os fermentados derivados do cultivo FS. Isto poderia ser explicado pela própria variabilidade natural dos dados, a qual poderia dificultar o ajuste perfeito do modelo (Figura 17b). Para a FS (fig. 17a) verifica-se que o modelo é mais ajustado, pois têm-se maior controle sobre os parâmetros de fermentação. As bandas de predição mais largas para FES (fig. 17b) podem ser atribuídas a uma fermentação mais difícil de reproduzir.

5.1.5. Identificação dos compostos apolares por CG-MS

As amostras foram analisadas por CG-MS para identificação dos compostos presentes no extrato hexânico. Inicialmente as amostras foram derivatizadas através de reação com BSTFA. O objetivo dessa etapa é aumentar o caráter apolar das moléculas. Este procedimento é necessário para que os esteróis sejam identificados na cromatografia gasosa. Os reagentes derivatizantes promovem a trimetilsilanização de composto orgânicos polares, trocando hidrogênios ativos pelo grupo trimetilsilil (-Si(CH₃)₃). A reação de derivatização é exibida na figura 18.

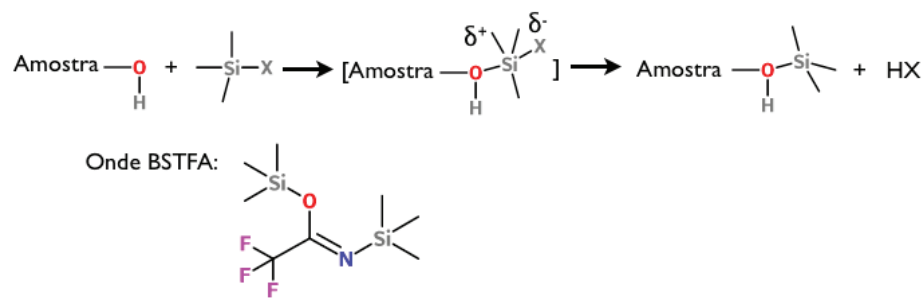


Figura 18 - Reação geral para a formação do derivado trialquilsilil.

O BSTFA reage mais rapidamente, é termodinamicamente mais estável e é menos suscetível à hidrólise que outros reagentes sililantes, além de causar menos interferências cromatográficas por ser mais volátil. A figura 19 mostra o produto da reação entre um esterol e o BSTFA.

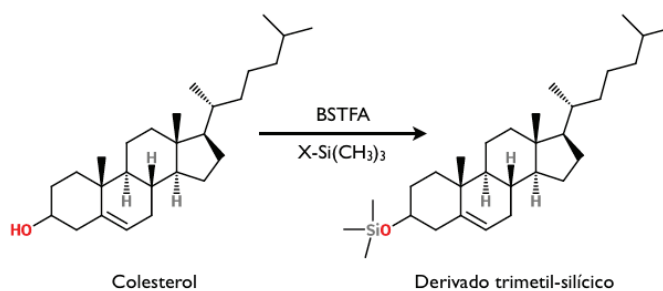


Figura 19 - Reação de derivatização de esteróis utilizando BSTFA.

A identificação dos esteróis foi feita por comparação entre o tempo de retenção dos padrões puros e por comparação dos espectros de massas característicos produzidos pelos esteróis. Sete esteróis foram identificados nas amostras fermentadas. O teor de ergosterol encontrado por CG-MS é proporcional ao encontrado nas quantificações por HPLC, onde os cultivados por FS produzem um maior teor de ergosterol quando comparados com os cultivados por FES. Os resultados são exibidos na tabela 12.

Tabela 12 - Análise semi-quantitativa (%) dos esteróis identificados por GC-MS nos substratos cultivados com *A. brasiliensis*.

Esterol	m/z*	Tempo retenção (min)	Malte FS	Malte FES	Trigo FS	Trigo FES	Casca abacaxi FS	Casca abacaxi FES	Bagaço uva FS	Bagaço uva FES	Bagaço abacaxi FS	Bagaço abacaxi FES	Bagaço maçã FS	Bagaço maçã FES
Dehidroergosterol	466	53,269	2,66	1,77	2,68	3,51	1,67	3,99	0,86	3,23	1,36	0,49	2,18	2,47
Ergosterol	468	53,783	62,39	23,47	64,87	44,11	41,96	32,7	16,34	34,26	35,67	12,78	20,91	5,66
Campesterol	472	53,998	11,41	20,53	9,14	11,27	8,53	11,95	5,00	5,76	11,45	14,76	4,37	4,78
Estigmasterol	484	54,386	0,00	3,92	0,00	2,03	5,32	3,94	4,28	3,33	0,00	1,42	0,00	0,00
Fungisterol	472	54,722	9,53	6,51	5,76	1,04	4,47	4,11	3,36	2,85	7,02	1,14	2,34	1,586
β -Sitosterol	486	55,083	14,02	43,81	17,55	33,07	30,89	34,87	68,23	50,57	37,84	57,27	70,21	83,73
Estigmastanol	488	55,874	0,00	0,00	0,00	4,96	7,17	8,43	1,94	0,00	6,66	12,14	0,00	0,00

*m/z referente ao composto sililado.

Nos cromatogramas obtidos por HPLC para os cultivados de *A. brasiliensis* (anexos), nota-se que o pico correspondente ao ergosterol é o de maior intensidade. Isso deve-se a seleção do comprimento de onda característico do ergosterol (283 nm) que foi empregado durante as quantificações. No entanto, observa-se que o esterol presente em maior concentração na maioria dos extratos analisados por CG-MS é o β -sitosterol. Este por sua vez, possui um máximo de absorção em um comprimento de onda menor (208 nm) e por isso não é exibido nos cromatogramas adquiridos por HPLC (Dutta, 2003).

5.2. Extrato Polar

5.2.1. Otimização do procedimento de extração

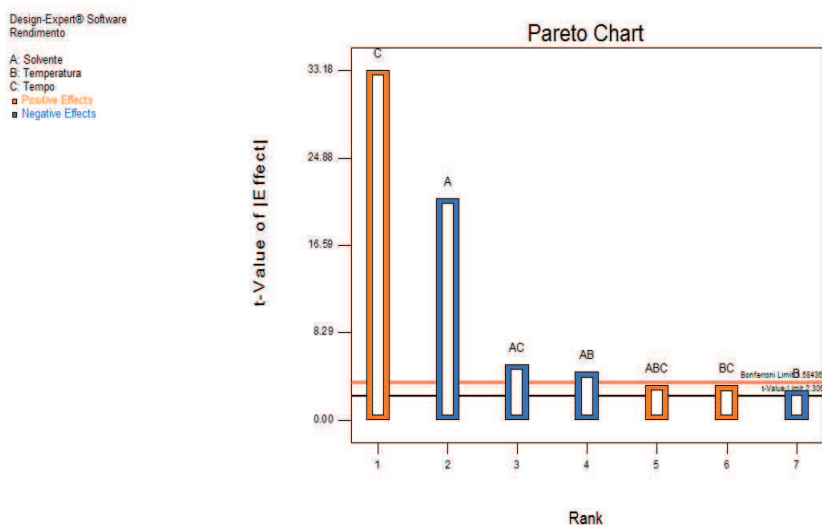
Duas respostas foram analisadas durante o planejamento fatorial, o rendimento percentual da extração e o valor de EC_{50} , que indica qual é a concentração de extrato necessária para que o teor de radicais livres seja inibido em 50% do valor inicial (Sanchez-Moreno et al., 1998). Para ambas as respostas, o procedimento foi executado em duplicata e os valores referem-se a suas médias \pm desvio padrão. Os resultados e a matriz de planejamento estão expressos na tabela 13.

Tabela 13 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 e resultados para o rendimento da extração e a atividade antirradicalar do extrato obtido expressa como EC_{50} .

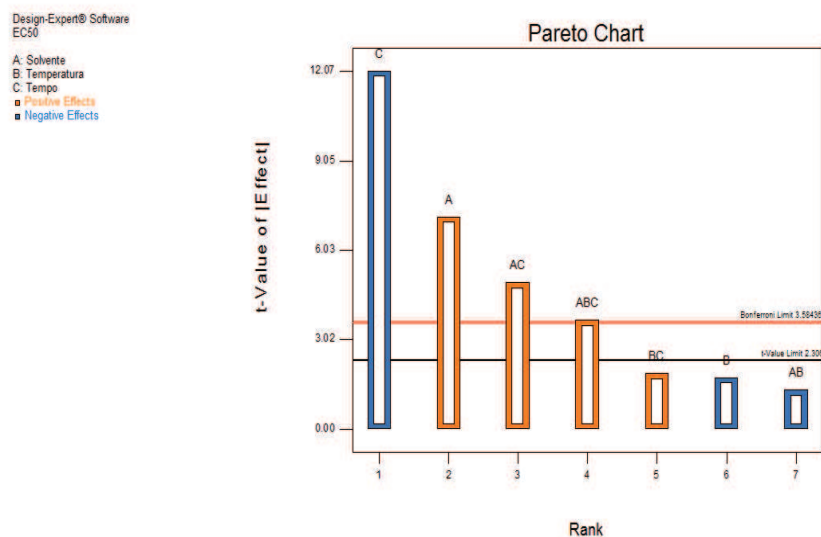
Ensaio	Solvente	Temperatura	Tempo de agitação	Rendimento (%)	EC_{50} (g.L ⁻¹)
1	-1	-1	-1	9,36 \pm 0,26	2,32 \pm 0,15
2	1	-1	-1	8,10 \pm 0,27	2,95 \pm 0,18
3	-1	1	-1	9,64 \pm 0,26	2,44 \pm 0,25
4	1	1	-1	5,85 \pm 0,43	2,19 \pm 0,25
5	-1	-1	1	15,54 \pm 0,02	0,97 \pm 0,04
6	1	-1	1	11,52 \pm 0,35	1,83 \pm 0,10
7	-1	1	1	15,81 \pm 0,55	0,77 \pm 0,18

Ensaio	Solvente	Temperatura	Tempo de agitação	Rendimento (%)	EC ₅₀ (g.L ⁻¹)
8	1	1	1	11,39 ± 0,06	2,05 ± 0,16

Os resultados obtidos foram verificados pela ANOVA ($p < 0,05$) e indicam o tempo de extração como maior efeito significativo. O solvente e as interações entre solvente e tempo, também foram significativas. Como pode ser observado, os melhores resultados obtidos são os que apresentam metanol como solvente e maior tempo de extração (corridas 5 e 7). Não houve influência da temperatura sobre os resultados. O efeito de interação entre o solvente e a temperatura está no limite de significância. Os dados reportados estão de acordo com a literatura. Soares e colaboradores (2009) também verificaram que o metanol é melhor solvente extrator quando comparado ao etanol, no entanto eles não verificaram outros parâmetros, como temperatura, tempo e as interações dos efeitos. A figura 20(a) mostra o gráfico de Pareto para o rendimento percentual da extração, e 20(b) para o valor de EC₅₀ para os resultados do planejamento fatorial.



(a)



(b)

Figura 20 - Gráfico de Pareto com os resultados do planejamento fatorial para a otimização do procedimento de extração da fração polar utilizando o rendimento percentual (a) e o valor de EC_{50} (b) como respostas no nível de 95% de confiança.

Para maximizar os resultados obtidos nas extrações subsequentes, foi estudado o efeito do tempo para aumentar o rendimento das extrações. Para isto, foram feitas novas extrações com tempos superiores aos utilizados no planejamento. Verificou-se que tempos maiores que 10 horas não trazem contribuições significativas para as respostas analisadas. Outro parâmetro estudado foi a adição de solvente fresco no meio de extração. Foram realizadas consecutivas adições, obedecendo as melhores respostas obtidas pelo planejamento (temperatura 25°C e tempo 10 horas). Verificou-se que não é necessário mais que uma segunda adição de solvente para aumentar o rendimento. A figura 21 mostra o efeito no rendimento da extração com o aumento do tempo (fig. 21a) e da adição de solvente fresco (fig. 21b).

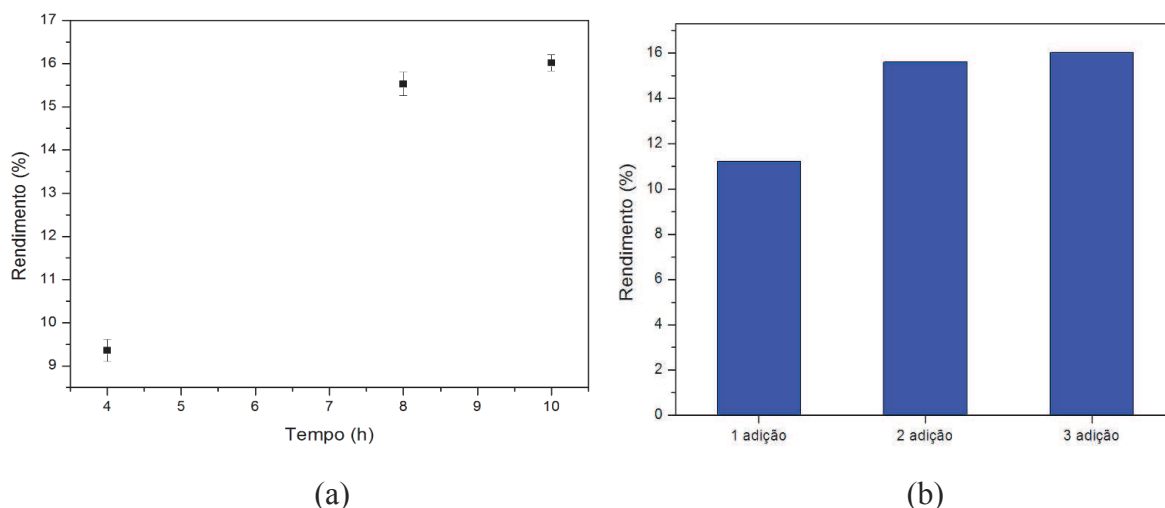


Figura 21 - Efeito do aumento do tempo (a) e adição de solvente fresco (b) no rendimento da extração.

Também foi possível observar que existe uma correlação entre as respostas estudadas. A figura 22 mostra o gráfico entre o rendimento de extração dos componentes polares dos fermentados e os valores de EC_{50} encontrados para o extrato resultante. A equação da reta para a distribuição linear é dada por: $Y = 4,92138 - 0,25958X$, $r = -0,9901$.

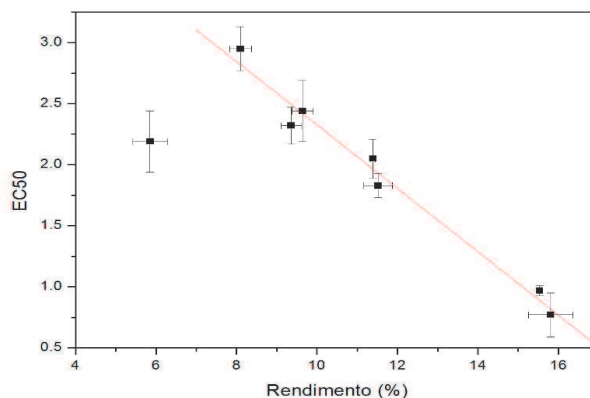


Figura 22 - Correlação entre o rendimento de extração dos componentes polares dos fermentados de *A. brasiliensis* e os valores de EC_{50} encontrados para o extrato resultante.

A medida que o rendimento da extração aumenta, o valor de EC_{50} diminui. Apenas um ponto apresenta comportamento anômalo, podendo ser decorrente de um erro experimental. O resultado mostrou-se coerente pois indica que o aumento do rendimento de extração está relacionado com o aumento da concentração de espécies antirradicais presentes no extrato.

Tsai, Tsai e Mau (2007) usaram etanol e água quente para a extração, atingindo rendimentos de 15,6% e 47,3%, respectivamente. O solvente água quente consegue extrair espécies solúveis polares, aumentando o rendimento. No entanto, uma extração de alto rendimento de compostos solúveis não implica necessariamente uma alta extração de compostos antioxidantes (Soares et al., 2009).

5.2.2. Determinação da atividade antirradicalar dos extratos polares dos fermentados de *Agaricus brasiliensis*

As substâncias antirradicalares reagem com o radical livre DPPH, convertendo-o no 1,1-difenil-2-picril-hidrazina, através da transferência de um átomo de hidrogênio. A reação é monitorada pela mudança de coloração, mudando do violeta para o amarelo (Bondet, Brand-Williams & Berset, 1997). A figura 23 esquematiza a reação do DPPH.

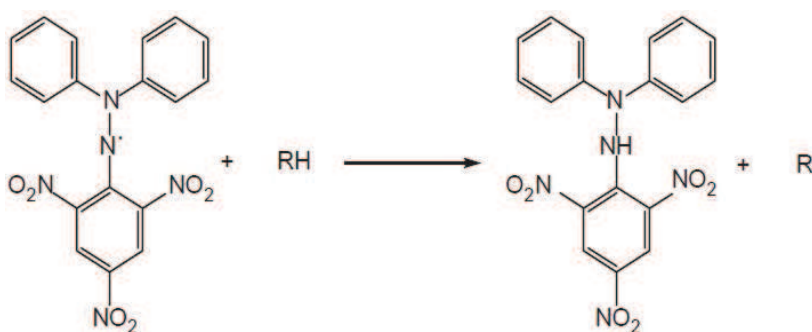


Figura 23 - Esquema da reação entre substâncias antirradicalares o radical DPPH.

Os resultados obtidos pelo método do radical DPPH são mostrados na tabela 14 em função do valor de EC₃₀. Os valores estão reportados como média ± desvio padrão de três quantificações independentes para cada amostra.

Tabela 14 - Valores de EC₃₀ obtidos pelo método de DPPH para os extratos polares dos fermentados obtidos com diferentes substratos e meios de fermentação.

	Substrato	FS	FES
	Média ± SD (g.L ⁻¹)	Média ± SD (g.L ⁻¹)	Média ± SD (g.L ⁻¹)
Bagaço de maçã	1,76 ± 0,07	0,13 ± 0,02	0,08 ± 0,02
Trigo	0,39 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,16 ± 0,03
Malte	1,70 ± 0,09	0,63 ± 0,04*	0,17 ± 0,05
Casca de abacaxi	0,24 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,03 ± 0,01*
Bagaço de uva	-	0,31 ± 0,01	0,19 ± 0,04
Bagaço de abacaxi	1,10 ± 0,04	0,16 ± 0,02	0,12 ± 0,02

* Valores com diferenças estatísticas significativas no nível de 95% (ANOVA $p < 0,05$).

Pelo método de DPPH, não foi possível determinar a atividade antirradicalar na amostra bagaço de uva, utilizada como substrato. Em varredura realizada antes da leitura das absorvâncias, a amostra apresenta outros componentes que absorvem no comprimento de onda $\lambda = 515$ nm, interferindo na quantificação. Para determinar qual fermentado apresentou melhor resposta frente a atividade antirradicalar, foi aplicada a análise de variância de um fator (One way ANOVA), e o teste Tukey de comparação múltipla. Os resultados mostram diferenças significativas para a amostra casca de abacaxi FES e malte FS, fornecendo respectivamente a melhor e pior resposta.

Também foram observadas diferenças significativas entre os valores médios das amostras fermentadas e não fermentadas. Ao comparar os valores obtidos, verifica-se que a ação do micro-organismo *A. brasiliensis* aumenta a atividade antirradicalar (menores valores de EC₃₀) pela biossíntese de metabólitos com atividade antioxidante. A identificação química desses produtos naturais encontra-se em andamento.

5.2.3. Determinação do teor de fenólicos totais e de flavonoides

O teor de fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu que se baseia em uma reação de óxido-redução, na qual o íon fenolato é oxidado em meio alcalino, enquanto reduz o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico no reagente em uma solução de coloração azul (Singleton & Rossi, 1965).

Para a determinação de flavonoides o método utilizado foi o de complexação por cloreto de alumínio onde ocorre a formação de quelatos entre o alumínio e os flavonoides, originando um efeito batacrômico no espectro de absorção dos flavonoides, com alteração da cor (Bors et al., 1990). Na figura 24, os resultados obtidos para o teor de fenólicos totais (fig. 24a) e flavonoides (fig. 24b) estão reportados por grama de substrato, como média das quantificações.

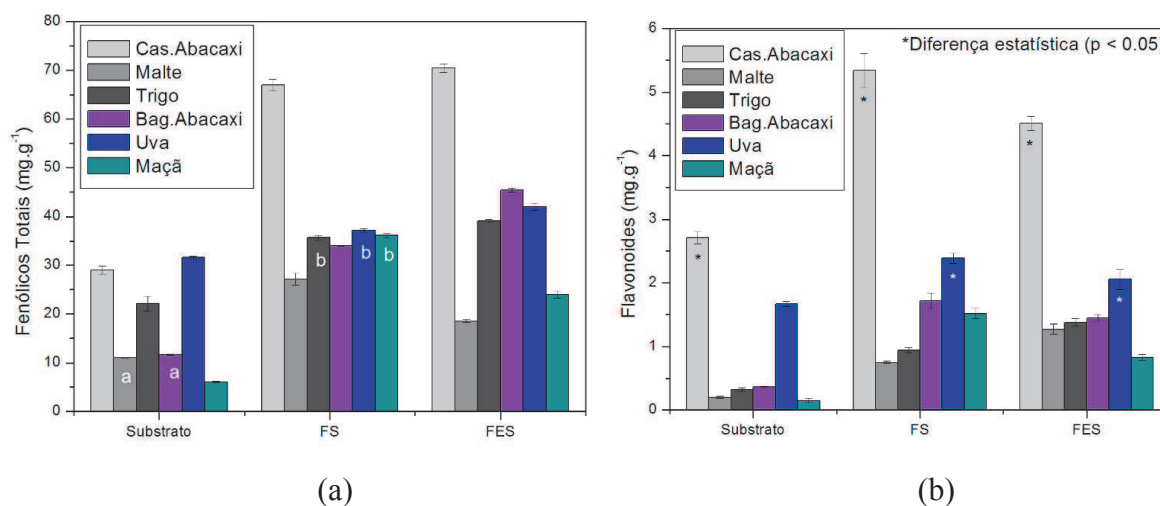


Figura 24 - Teor de fenólicos totais (a) e flavonoides (b) para os extratos polares dos fermentados obtidos com diferentes substratos e meios de fermentação.

Verifica-se que os valores obtidos para o teor de fenólicos totais e flavonoides não seguem um padrão. No entanto, para todas as amostras, observa-se que os teores de fenólicos totais e flavonoides são superiores para as espécies fermentadas quando comparadas ao substrato sem fermentação, indicando que o crescimento do micro-organismo favorece a elevação dos teores de fenólicos e flavonoides.

Para comparar os valores obtidos para o teor de fenólicos totais, foi empregada análise de variância (ANOVA). As respostas indicam diferenças significativas para todos os substratos e seus respectivos fermentados. Os resultados marcados com letras idênticas são equivalentes (fig. 24a) para a significância estatística de nível de 95% de confiança. Os maiores teores de fenólicos são encontrados para os fermentados de casca de abacaxi.

A ANOVA também foi utilizada para o ensaio de flavonoides. As melhores respostas obtidas advêm da casca do abacaxi e seus fermentados, seguida do bagaço de uva. Nesse caso,

os resultados marcados representam diferenças significativas entre todas as amostras (fig. 24b).

5.2.4. Análise do extrato polar por UPLC-MS/MS

5.2.4.1. Caracterização dos extratos polares por fingerprints através de ESI-MS

Inicialmente foi realizado um estudo para verificar quais as melhores condições de análise. Foi escolhido o eletrospray (ESI⁷) como fonte de ionização. Os extratos foram diluídos em metanol e as soluções foram inseridas diretamente na fonte, sendo analisadas tanto no modo positivo quanto no negativo. Os resultados sugerem que para a maioria dos compostos a ionização é favorecida no modo negativo, indicando a presença possível de grupos ácidos ou fenólicos nas espécies analisadas, o que condiz com os resultados dos ensaios de flavonoides e fenólicos totais. Assim, foi escolhido o modo negativo para a aquisição dos fingerprints.

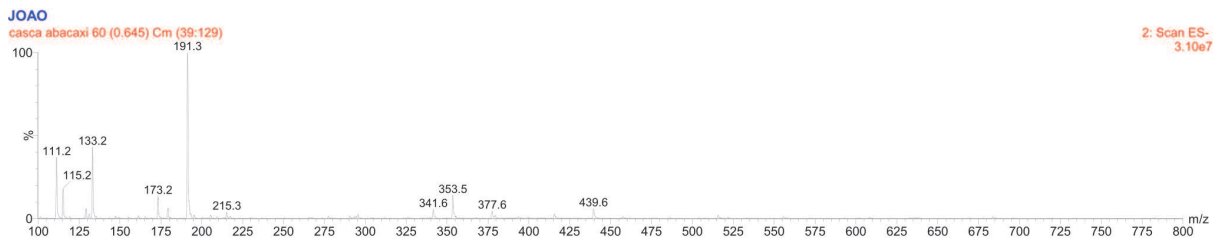
Os fingerprints foram adquiridos para os substratos sem fermentação e para os cultivados na fase submersa e do estado sólido. Também foram feitas corridas cromatográficas para todas as amostras.

Para identificar os íons marcadores do *A. brasiliensis* nas amostras cultivadas foram subtraídos os íons encontrados nos substratos sem fermentação. Esse procedimento permitiu encontrar os íons característicos formados pelo micro-organismo nos meios de cultura.

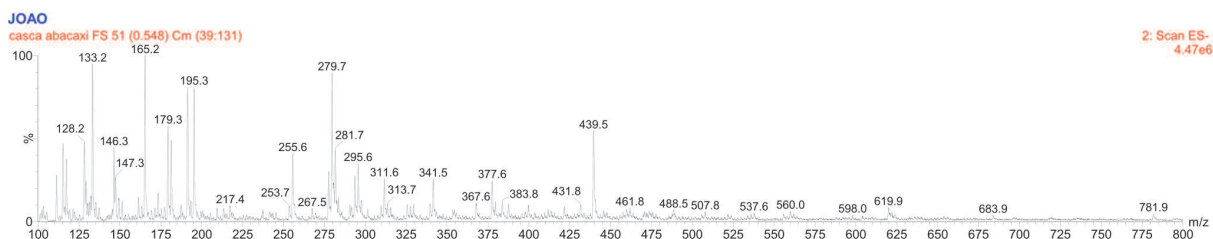
Para os íons que estão presentes tanto nos fermentados quanto nos substratos sem fermentação, foi comparado o tempo de retenção nas corridas cromatográficas. O objetivo foi verificar se os íons que apresentaram mesma razão massa/carga eram iguais. Os resultados indicaram que se tratava das mesmas espécies, ou seja, elas não podem ser utilizadas como marcadores pois já estavam presentes nas amostras antes do cultivo do micro-organismo.

A modo de exemplo na figura 25 são mostrados os fingerprints da amostra casca de abacaxi.

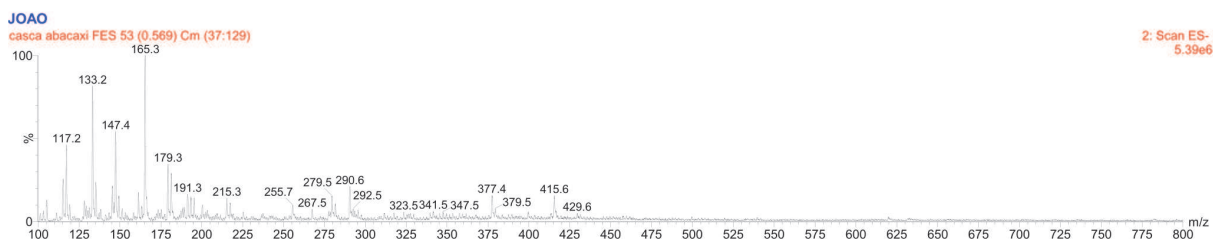
⁷ Electrospray Ionization



(a)



(b)



(c)

Figura 25 - Fingerprints da amostra de bagaço de abacaxi sem fermentar (a), na fase submersa (b) e no estado sólido (c).

Os fingerprints de todas as amostras estão exibidos em anexos. Para as amostras de casca de abacaxi, verifica-se que os íons de m/z 147, 165, 179, 195, 255, entre outros, estão presentes apenas nos cultivados (fig. 25b e 25c), indicando que estas espécies podem ser originadas no processo de formação do micro-organismo e como tal podem ser utilizadas para caracteriza-lo.

5.2.4.2 - Análise dos íons marcadores do *Agaricus brasiliensis* por UPLC-MS/MS

Após a etapa de seleção dos íons marcadores, separação cromatográfica por UPLC e determinação dos tempos de retenção, também foi realizado o MS/MS dos íons selecionados para obter o padrão de fragmentação dessas espécies. As corridas cromatográficas, bem como

o espectro de massas de todas as amostras encontram-se em anexo. A tabela 15 relaciona os íons marcadores, com o tempo de retenção e seus principais fragmentos (em função da abundância relativa).

Tabela 15 - Íons marcadores dos cultivados de *A. brasiliensis* analisados por UPLC-MS/MS.

[M - H] ⁻	Tempo de Retenção (minutos)	Principais fragmentos <i>m/z</i> (%)
147	2,97	147 (53); 146 (65); 140 (37); 127 (39); 115 (41); 103 (100); 77 (62)
165	1,32	165 (59); 164 (100); 162 (87); 151 (49); 144 (30); 102 (55); 98 (38); 84 (30); 74 (71)
179	0,76	179 (51); 177 (49); 116 (30); 112 (32); 89 (71); 84 (42); 71 (53); 59 (100)
195	0,81	195 (100); 193 (78); 167 (51); 139 (90); 137 (71); 129 (50); 86 (70); 85 (73); 81 (50); 59 (51)
255	10,10	255 (100); 234 (56); 186 (30); 107 (28)

A identificação desses componentes foi comprometida pois não existem trabalhos na literatura que relacionam as espécies marcadoras produzidas pelo *A. brasiliensis*. Os poucos trabalhos disponíveis buscaram apenas a identificação dos polissacarídeos originários do micro-organismo (Zhang et al., 2010). Futuros estudos de isolamento e caracterização são necessários. A identificação dessas espécies é uma lacuna que deve ser preenchida.

6. Conclusões

A partir do estudo realizado, conclui-se que:

- O método otimizado através do planejamento fatorial para a extração de ergosterol a partir de fermentados de *A. brasiliensis* foi simples e eficiente, permitindo recuperações entre 94,89 e 105,26%;
- A metodologia analítica para a quantificação do ergosterol por HPLC foi validada tendo em conta os parâmetros de seletividade, precisão, exatidão, linearidade, sensibilidade e robustez.
- Usou-se o método do padrão externo uma vez que não foi observado interferência da matriz na análise;
- Valores desconsideráveis de ergosterol foram encontrados nos substratos sem fermentação, confirmando que este pode ser um parâmetro de quantificação do crescimento fúngico;
- Tendo em conta os teores de ergosterol, todos os substratos se mostraram como bons hospedeiros, com excelente resultado para o malte na fase submersa;
- Foram identificados sete esteróis presentes no extrato apolar, sendo o ergosterol e o β -sitosterol, os mais abundantes.
- A extração dos componentes polares dos fermentados também foi otimizada e os melhores resultados foram obtidos utilizando metanol como solvente extrator durante 10 horas, não sendo necessário mais que duas lavagens com solvente fresco;
- Ao avaliar a atividade antirradicalar, fenólicos totais e flavonoides nos extratos polares, verificou-se que as amostras fermentadas apresentaram melhores resultados que os substratos vegetais sem fermentação, indicando que o micro-organismo produz substâncias com potencial antioxidante;
- O substrato casca de abacaxi, tanto na fermentação submersa quanto em estado sólido, favoreceu a produção de substâncias fenólicas e, portanto a obtenção de fermentados com maior capacidade antirradicalar.
- Não foi possível identificar os componentes do extrato polar, no entanto, foram detectados cinco íons que podem ser utilizadas como marcadores nos fingerprints ESI-MS do *A. brasiliensis*.

7. Referências Bibliográficas

Alexopoulos, C. J, Mims, C. W., & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. 4 ed. Nova York, *John Wiley & Sons*. 869 p.

Blois, M. S. (2002). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1200.

Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method. *LWT - Food Science and Technology*, 30, 609-615.

Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants - Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, 186, 343-355.

Brito, N. M., Amarante, O.P. de, Polese, L., & Ribeiro, M. L. (2003). Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 13, 129-146.

Brum, A. A. (2005). Perfil enzimático e degradação lignocelulósica durante o crescimento vegetativo de *Agaricus brasiliensis* em diferentes substratos. Florianópolis, 112 p. Dissertação (Programa de Pós- graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Burden, D. (2012). Mushrooms profile. Agricultural Marketing resource center. Disponível em: http://www.agmrc.org/commodities__products/specialty_crops/mushrooms-profile/ Acesso em 09/01/2013.

Camelini, C. M. (2010). Produção de biomassa do fungo *Agaricus subrufescens* por processos fermentativos sólido e submerso para obtenção de polissacarídeos bioativos. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Chen, A. W. (2001). A practical Guide to the Cultivation of *Agaricus blazei*: A Mushroom of Culinary and Biomedical Importance. *The Mushroom Growers' Newsletter*.

Chen, A. W. (2003).cA practical guide to the cultivation of *Agaricus blazei*, a mushroom of culinary and biomedical importance. 2003. Disponível em: <http://www.mushworld.com>. Acesso em: 10/01/2013.

Coutinho, L. N. (2001).Doenças fúngicas e fungos competidores de cogumelos comestíveis do gênero *Agaricus*. Palestra da XI Reunião Anual do Instituto Biológico – São Paulo – SP. Disponível em: <http://www.geocities.com/~esabio/cogumelo/agaricus.htm> Acesso em: 22/01/2013.

Czub, J., & Baginski, M. (2006). Comparative molecular dynamics study of lipid membranes containing cholesterol and ergosterol. *Biophysical Journal*, 90, 2368-2382.

Dalla Santa, H. S. (2006). Efeitos no metabolismo e ação imunomoduladora em camundongos do micélio de *Agaricus brasiliensis* produzido por cultivo no estado sólido. Tese de doutorado em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Saúde Humana e Animal; 192 p.

Dalla Santa, H.S., Rubel, R., Fernandes, L.C., Bonatto, J.R., Bello, S.R., Monteiro, M.C., Khalil, N.M., Dalla Santa, O.R., Soccol, C.R., Gern, J.C., & Santos, C.A.M. (2010) *Agaricus brasiliensis*-enriched functional product promotes in mice increase in HDL levels and immunomodulate to Th1 CD4+T subsets. *A. brasiliensis* functional product and biological benefits. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 4, 957-970.

Fan, L., Soccol, A.T., Pandey, A., Germano, S., Rau, R., Pedroso, A.A.L., & Soccol, C.R. (2003). Production of polysaccharide by culinary-medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. LPB 03 (Agaricomycetidae) in submerged fermentation and its antitumor effect. *International Journal for Medicinal Mushrooms*, 5, 17–23.

Gao, H., & Gu, W.Y. (2007). Optimization of polysaccharide and ergosterol production from *Agaricus brasiliensis* by fermentation process. *Biochemical Engineering Journal*, 33, 202–210.

Hamedi, A., Vahid, H., & Ghanati, F. (2007). Optimization of the Medium Composition for Production of Mycelial Biomass and Exo-Polysaccharide by *Agaricus blazei* Murill DPPH 131 Using Response-Surface Methodology. *Biotechnology*, 6, 456-464.

Havinga, E (1973) Vitamin D, example and challenge. *Experientia* 29, 1181-93. Health Promotion Board (2004).

Herrera, O. M. (2001). Produção, Economicidade e Parâmetros Energéticos do Cogumelo *Agaricus blazei*: Um Enfoque de Cadeia Produtiva. Tese de doutorado.

Horst RL, & Reinhardt TA (1997) Vitamin D metabolism. In Vitamin D. (Feldman D., Glorieux F. H., Pike J. W., eds.), p. 13 – 31, Academic Press, New York.

Jasinghe, V.J., & Perera, C.O. (2005). Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D₂ by UV irradiation. *Food Chemistry*, 92, 541-546.

Largeteau, M. L., Llarena-Hernández, R. C. & Regnault-Roger, C., & Savoie, J-M. (2011). The medicinal *Agaricus* mushroom cultivated in Brazil: biology, cultivation and non-medicinal valorisation. *Applied microbiology and biotechnology*, 92, 897-907.

Leifa, F., Soccol, A.T., Pandey, A., & Soccol, C.R. (2007). Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. *Food Science and Technology*, 40, 30–35.

Lima, L.F.O., Habu, S., Gern, J.C., Nascimento, B.M., Parada, J.L., Nosedá, M.D., Gonçalves, A.G., Nisha, V.R., Pandey, A., Soccol, V.T., & Soccol, C.R. (2008). Production and characterization of the exopolysaccharides produced by *Agaricus brasiliensis* in submerged fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151, 283–294.

Mattila, P.H., Lampi, A.M., Ronkainen, R., Toivo, J., & Piironen, V. (2002). Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 76, 293-298.

Montgomery, H.J., Monreal, C.M., Young, J.C., & Seifert, K.A. (2000). Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. *Soil Biology & Biochemistry*, 32, 1207-1217.

Newell, S.Y., & Fallon, R.D. (1991). Toward a method for measuring fungal instantaneous growth rates in field samples. *Ecology*, 72, 1547-1559.

Okwulehie, I.C., Nwosu, C.P., & Johnpaul, O.C. (2007). Pharmaceutical and Nutritional Prospects of Two Wild Macro-Fungi Found in Nigeria. *Biotechnology*, 6, 567-572.

Pandey, A. (2008). Solid-state fermentation. SciTopics. Disponível em: http://www.scitopics.com/Solid_state_fermentation.html. Acesso em 10/01/2013.

Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, E. S. (2007). *Biologia Vegetal*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.

- Seitz, L.M., Mohr, H.E., Burroughs, R., & Sauer, D.B. (1977). Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chemistry*, 54, 1207-1217.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. Jr., (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Soares, A. A., Souza, C. G. M., Daniel, F. M., Ferrari, G. P., Costa, S. M. G., & Peralta, R. M. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. *Food Chemistry*, 112, 775-781.
- Stamets, P. (1993). The Himematsutake Mushroom of the Genus *Agaricus*: *Agaricus blazei* Murrill. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Washington: Ten Speed Press.
- Stamets, P. (2000). Techniques for the cultivation of the medicinal mushroom Royal Sun *Agaricus-blazei* Murr. (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2, 151–160.
- Takaku, T., Kimura, Y., & Okuda, H. (2001). Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murril and its mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 131, 1409–1413.
- Tardieu, D., Bailly, J.D., Bernard, G., & Guerre, P. (2007). Comparison of two extraction methods for ergosterol determination in vegetal feeds. *Revue de Medecine Veterinaire*, 158, 442-446.
- Teichmann, A., Dutta, P.C., Staffas, A., & Jagerstad, M. (2007). Sterol and vitamin D₂ concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: Effects of UV irradiation. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 815-822.

Tsai, S. Y., Tsai, H. L., & Mau, J. L. (2007). Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 1392-1402.

Wasser, S.P. (2011). Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 1323-1332.

Young, J.C. (1995). Microwave-assisted extraction of the fungal metabolites ergosterol and total fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2904-2910.

Yuan, J.P., Wang, J.H., Liu, X., Kuang, H.C., & Zhao, S.Y. (2007). Simultaneous determination of free ergosterol and ergosteryl esters in *Cordyceps sinensis* by HPLC. *Food Chemistry*, 105, 1755-1759.

Zhang, S., He, B., Ge, J., Zhai, C., Liu, X., Liu, P. (2010). Characterization of chemical composition of *Agaricus brasiliensis* polysaccharides and its effect on myocardial SOD activity, MDA and caspase-3 level in ischemia-reperfusion rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 363-366.

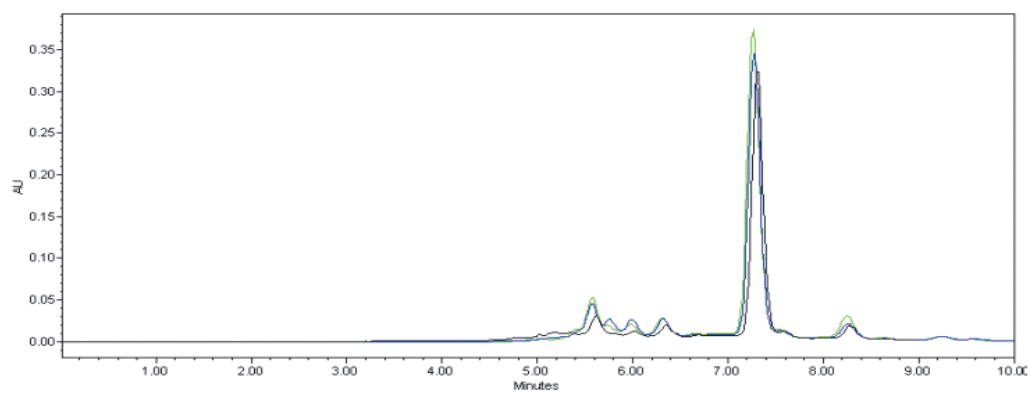
Zou, X. (2005). Effects of Zn supplementation on the growth, amino acid composition, polysaccharide yields and anti-tumor activity of *Agaricus brasiliensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 261-264.

Zou, X. (2006). Fed-batch fermentation for hyperproduction of polysaccharide and ergosterol by medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochemistry*, 41, 970-974.

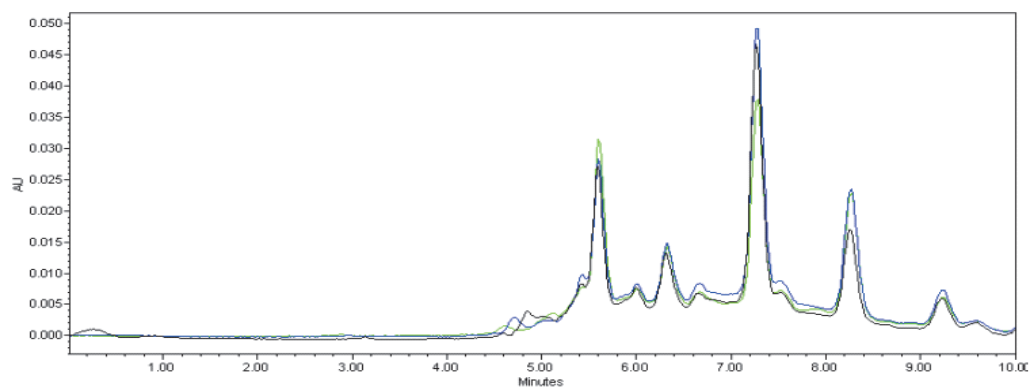
Anexos

Cromatogramas da Quantificação de Ergosterol por HPLC

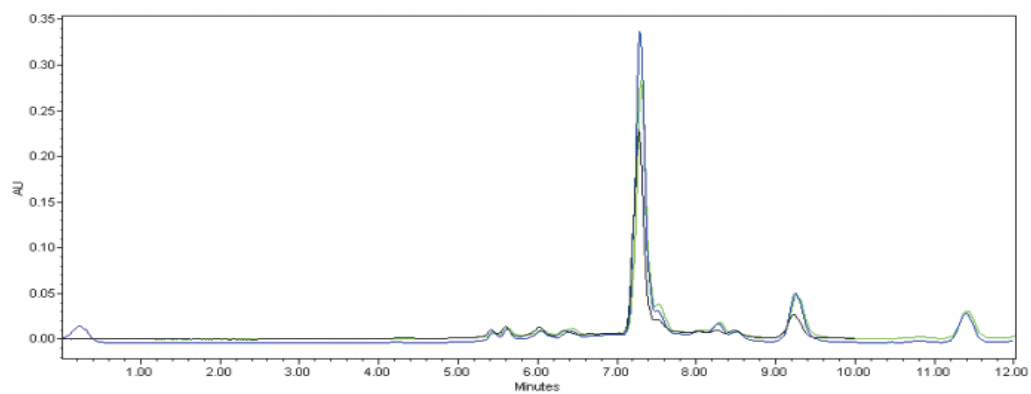
Maçã FS



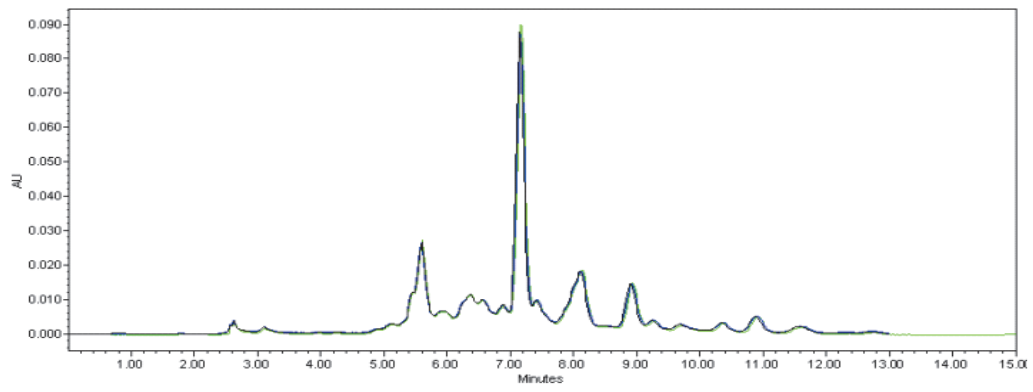
Maçã FES



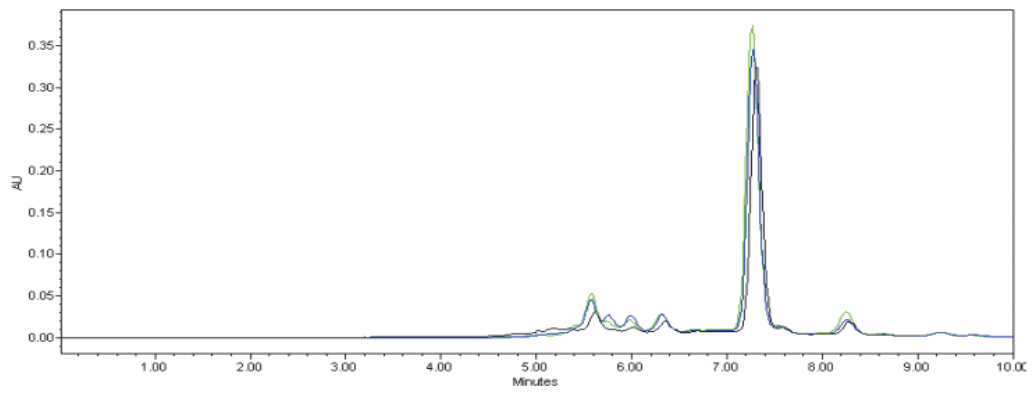
Casca de abacaxi FS



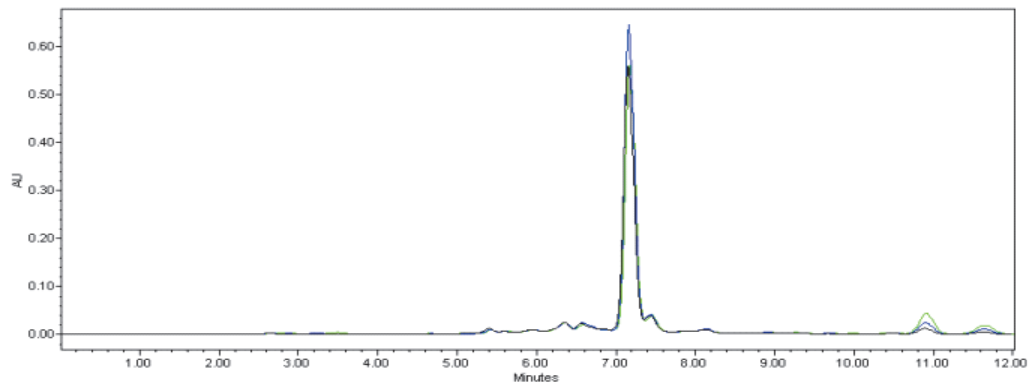
Casca de abacaxi FES



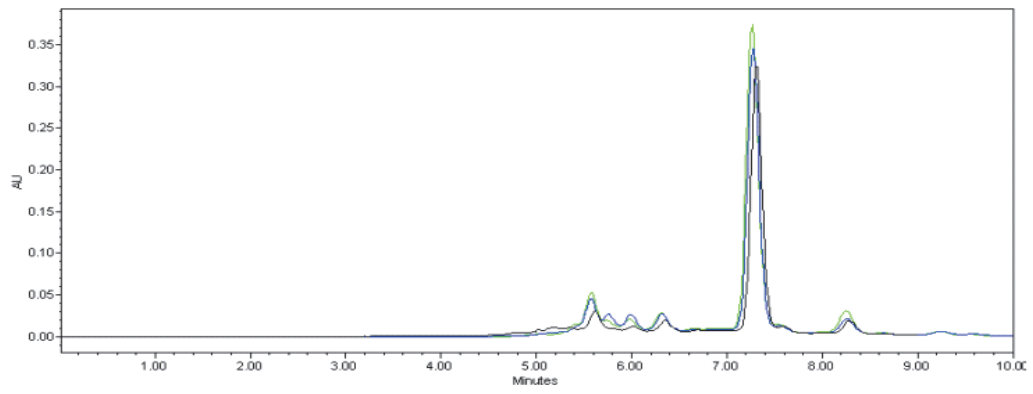
Bagaço de uva FS



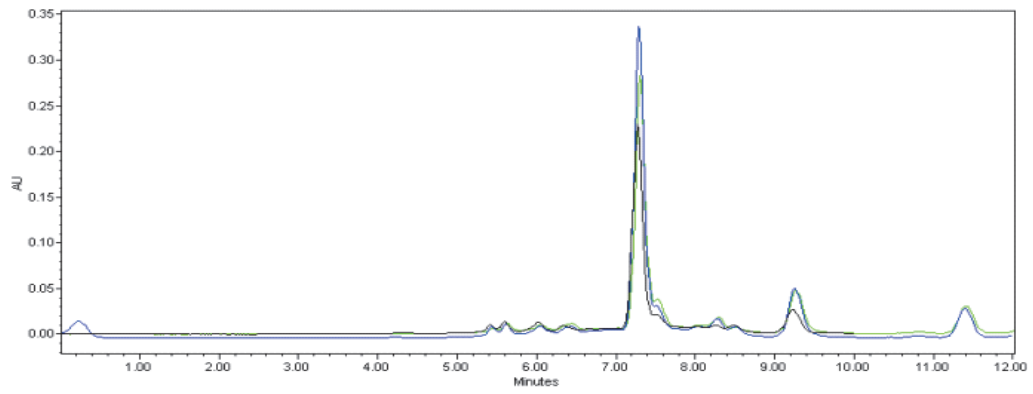
Bagaço de uva FES



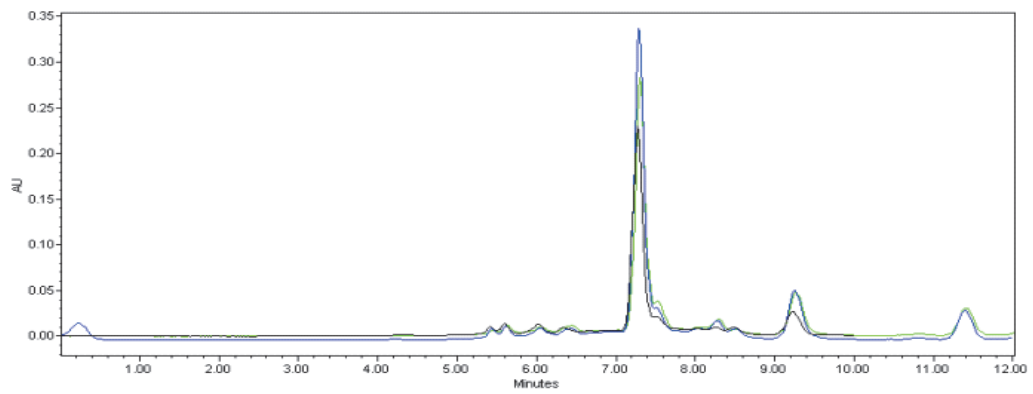
Trigo FS



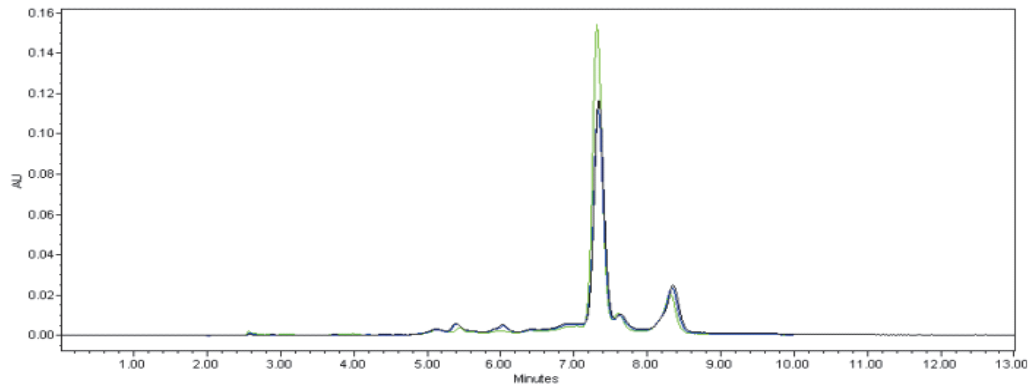
Trigo FES



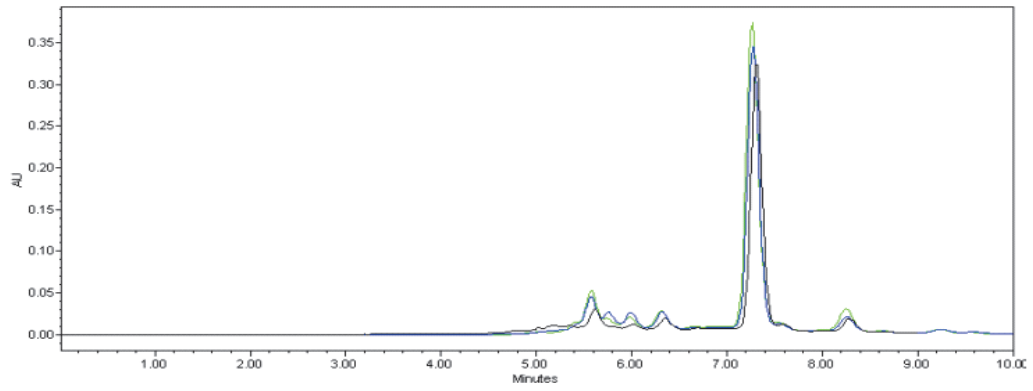
Bagaço de abacaxi FS



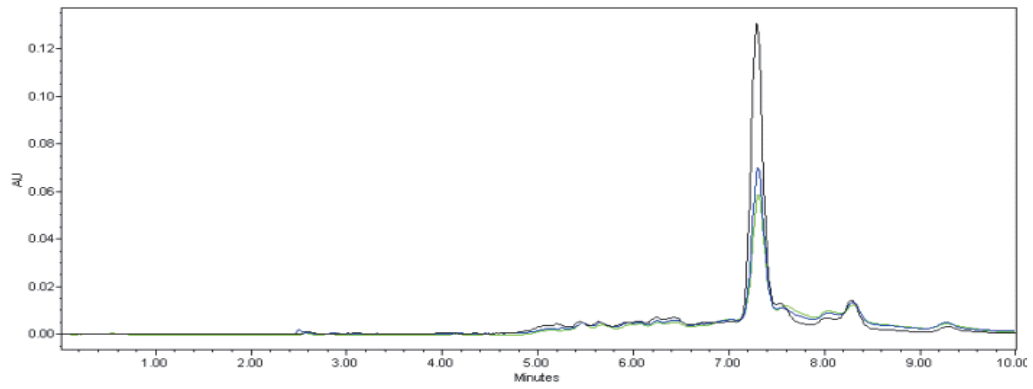
Bagaço de abacaxi FES



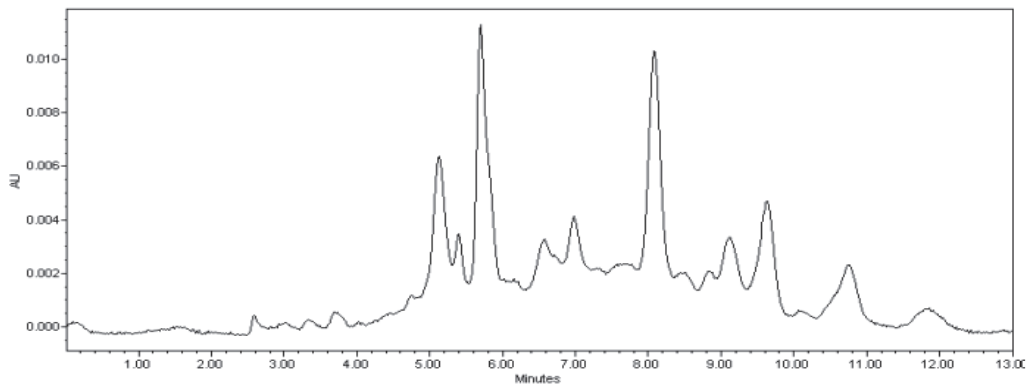
Malte FS



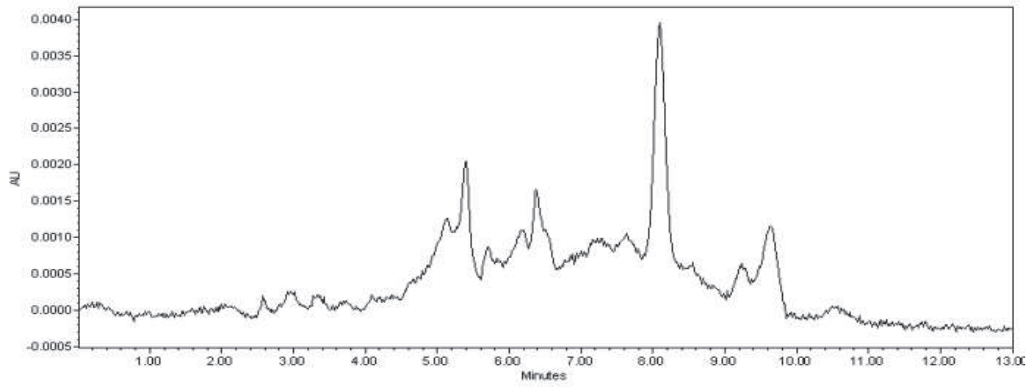
Malte FES



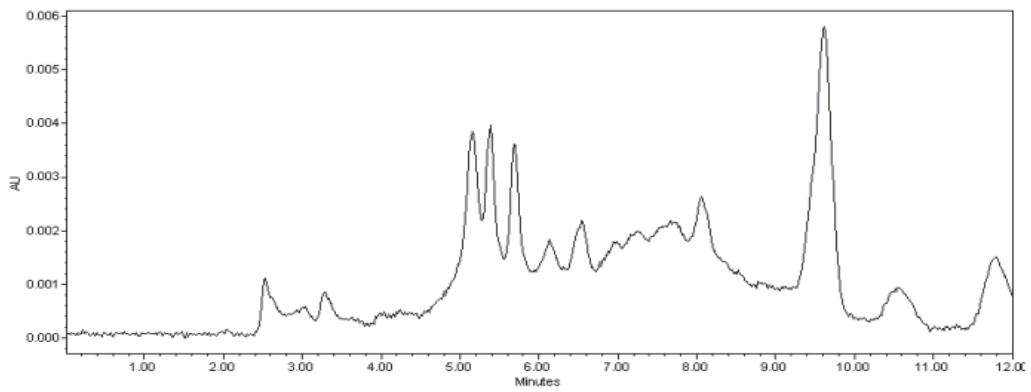
Casca de abacaxi substrato



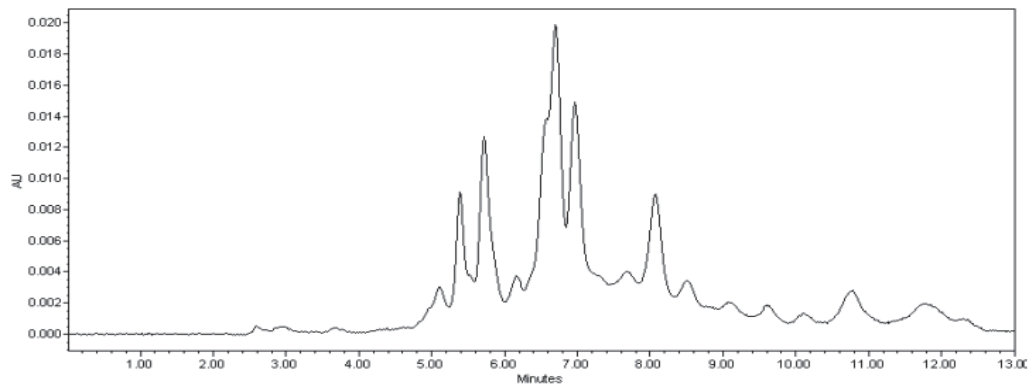
Malte substrato



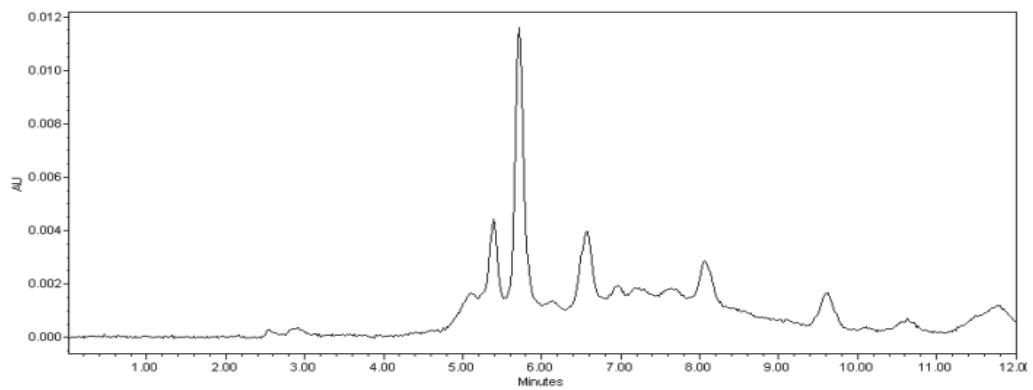
Bagaço de abacaxi substrato



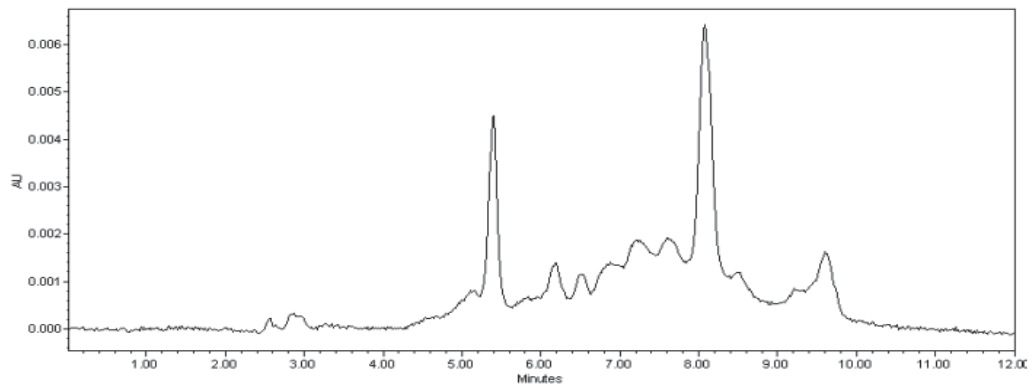
Bagaço de uva substrato



Maçã substrato

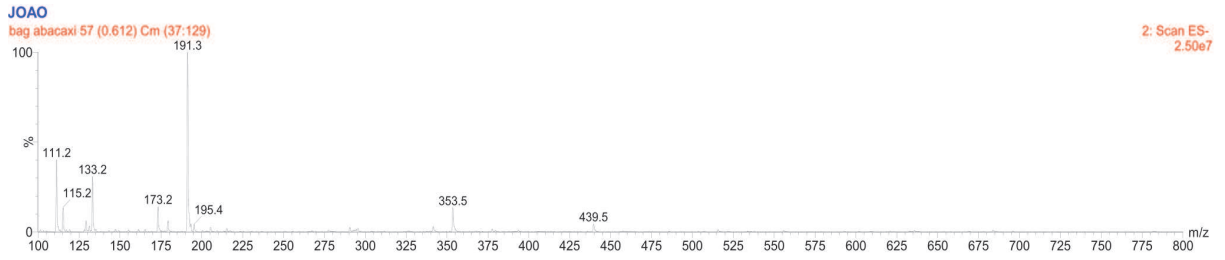


Trigo substrato

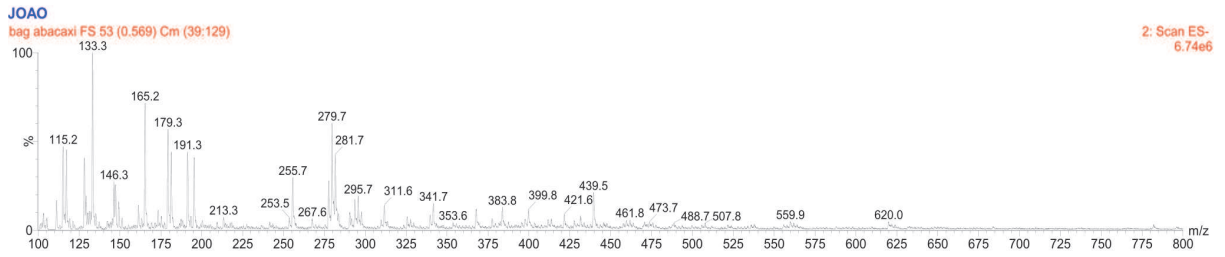


Fingerprints Extrato Polar

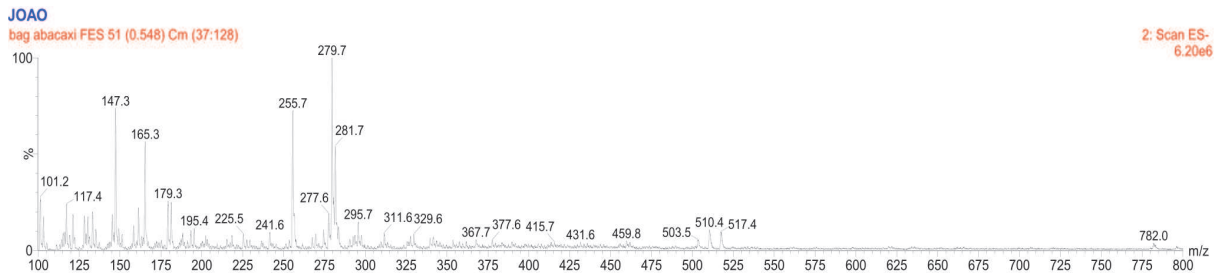
Fingerprint bagaço de abacaxi substrato



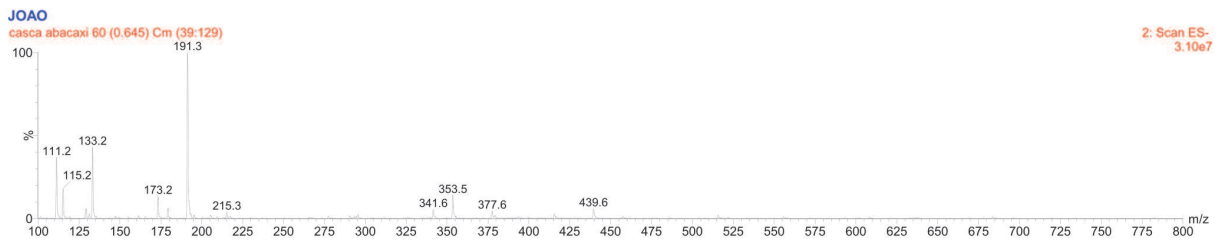
Fingerprint bagoço de abacaxi FS



Fingerprint bagoço de abacaxi FES



Fingerprint casca de abacaxi substrato

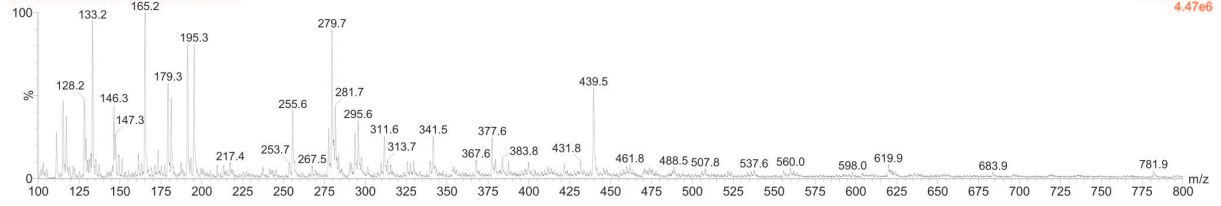


Fingerprint casca de abacaxi FS

JOAO

casca abacaxi FS 51 (0.548) Cm (39:131)

2: Scan ES-
4.47e6

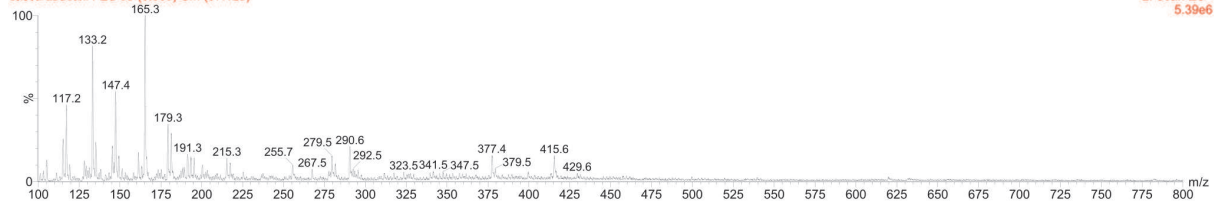


Fingerprint casca de abacaxi FES

JOAO

casca abacaxi FES 53 (0.569) Cm (37:129)

2: Scan ES-
5.39e6

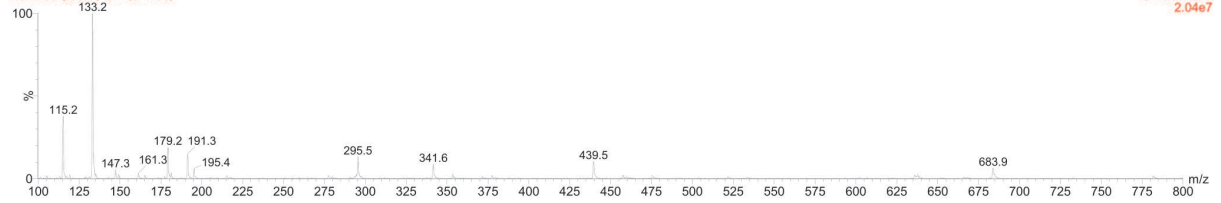


Fingerprint bagoço de maçã substrato

JOAO

maca 55 (0.591) Cm (37:131)

2: Scan ES-
2.04e7

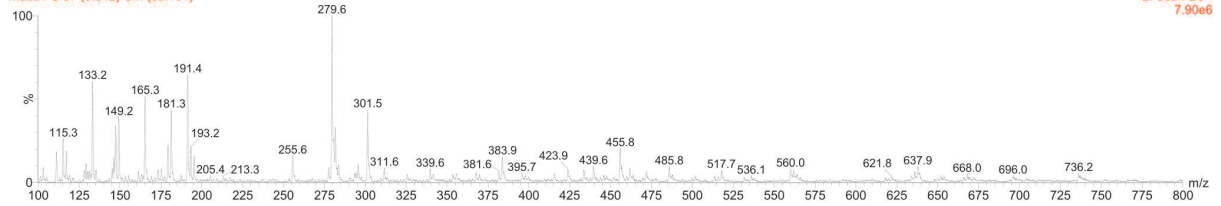


Fingerprint bagoço de maçã FS

JOAO

maca FS 57 (0.612) Cm (39:131)

2: Scan ES-
7.90e6

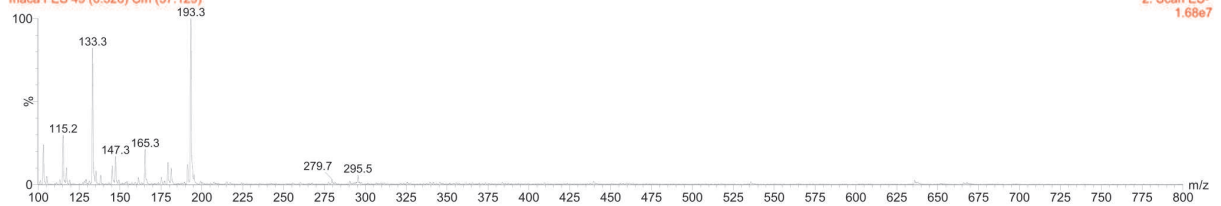


Fingerprint bagoço de maçã FES

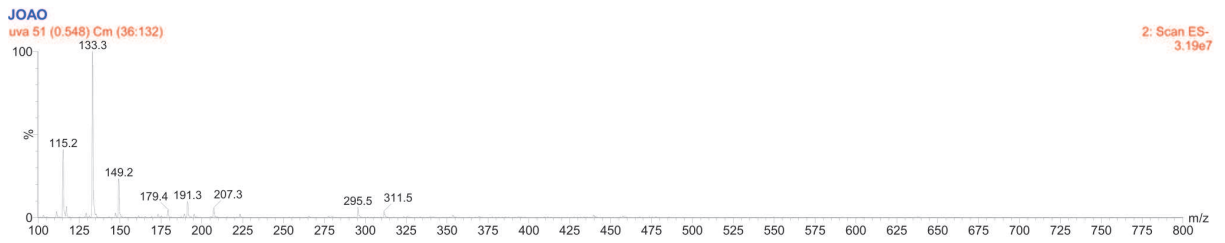
JOAO

maca FES 49 (0.526) Cm (37:129)

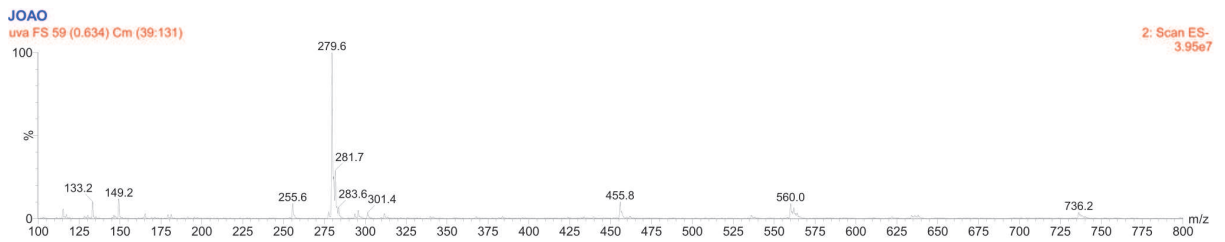
2: Scan ES-
1.68e7



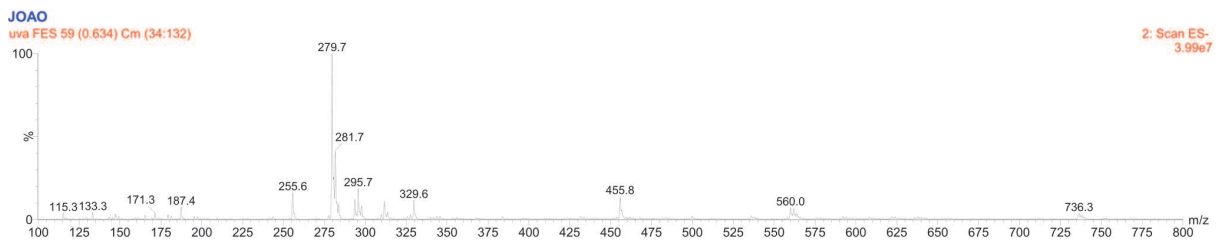
Fingerprint bagaço de uva substrato



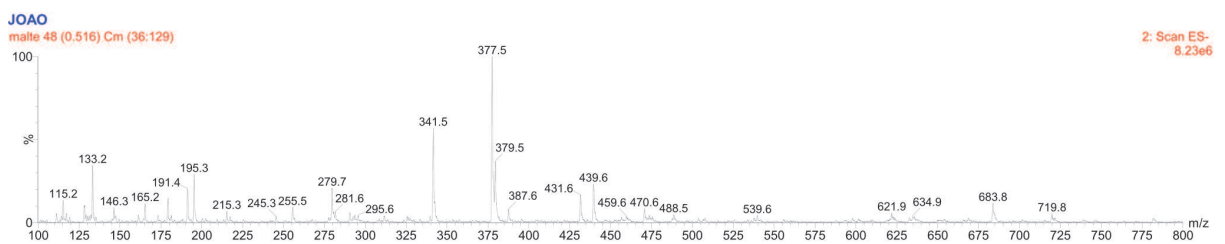
Fingerprint bagaço de uva FS



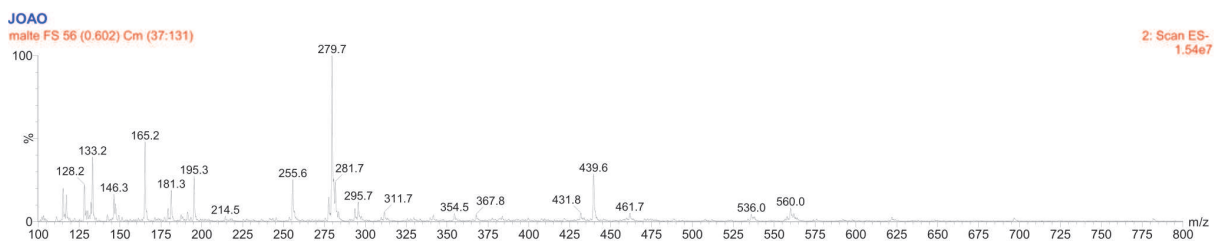
Fingerprint bagaço de uva FES



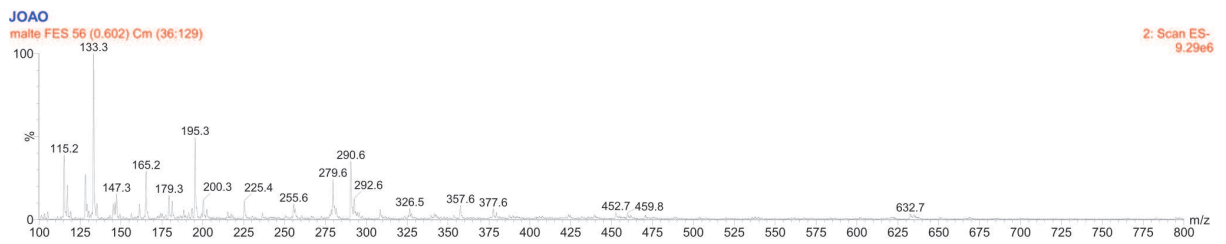
Fingerprint malte substrato



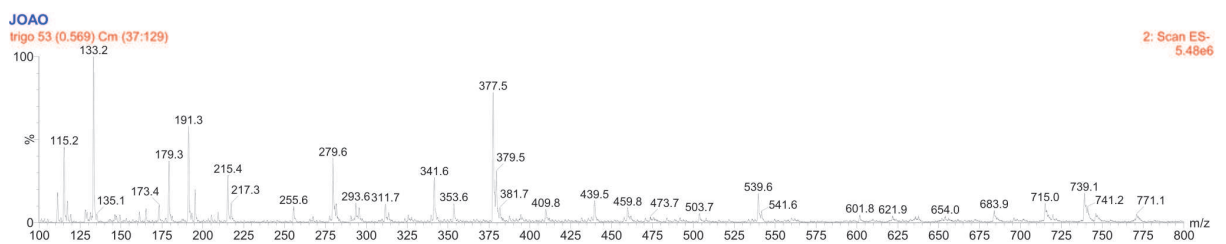
Fingerprint malte FS



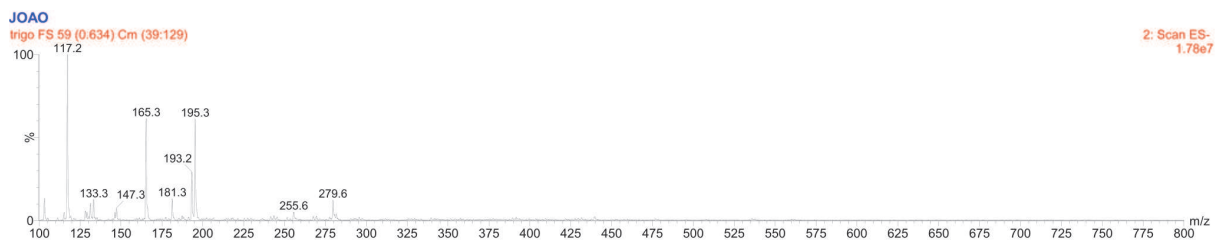
Fingerprint malte FES



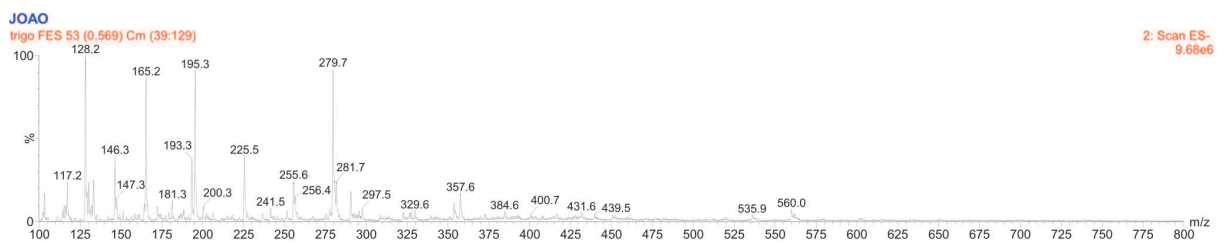
Fingerprint trigo substrato



Fingerprint trigo FS

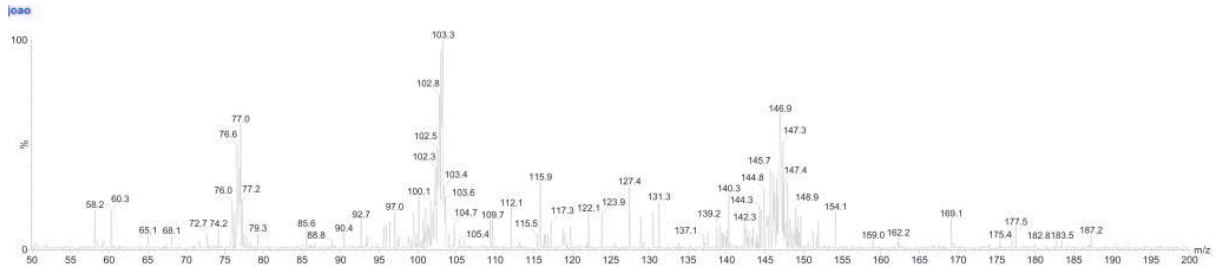


Fingerprint trigo FES

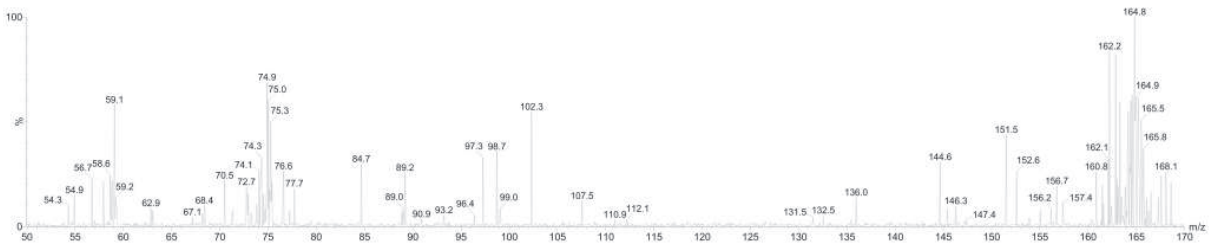


MS/MS dos íons selecionados como marcadores do *A. brasiliensis*

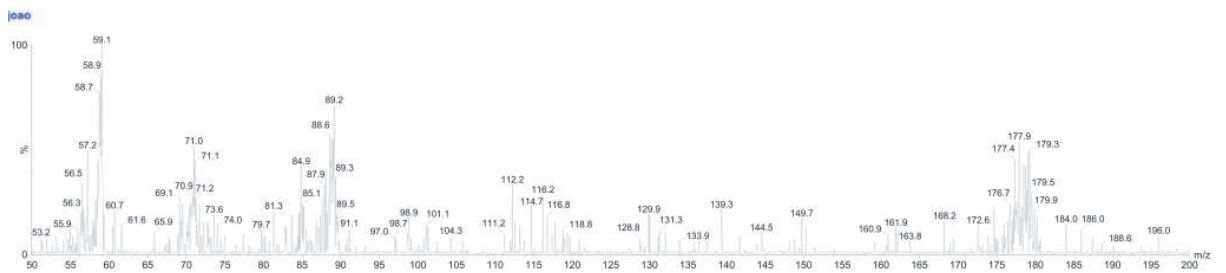
m/z 147



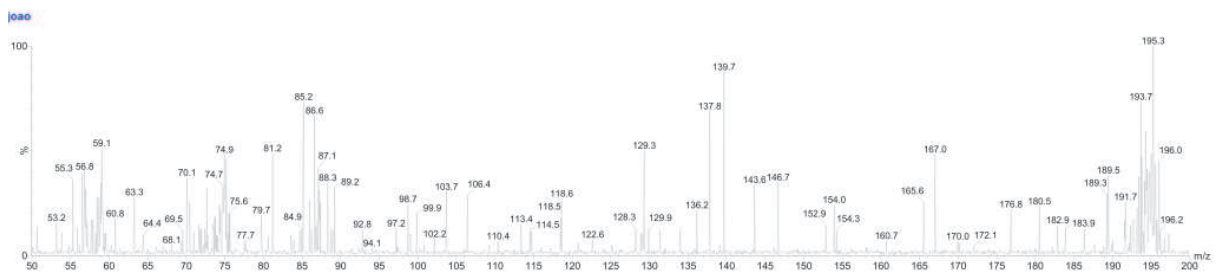
m/z 165



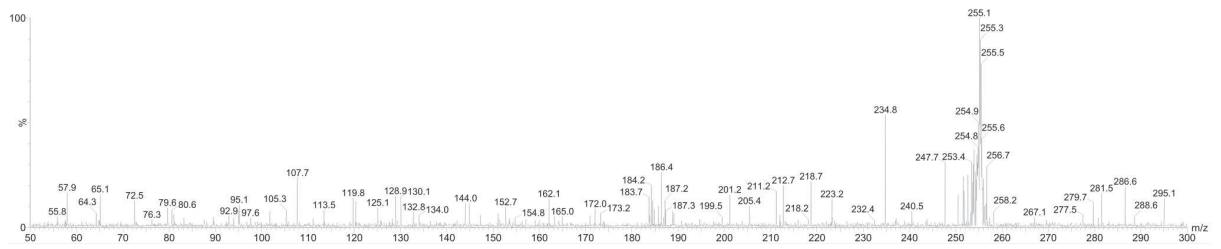
m/z 179



m/z 195

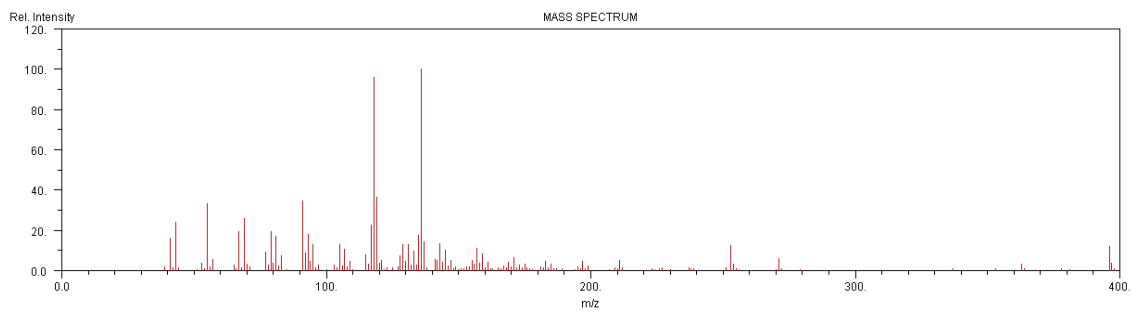


m/z 255

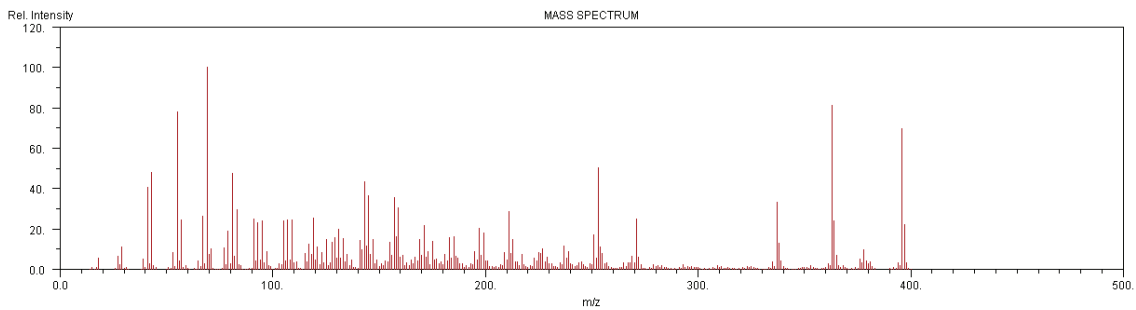


Esteróis identificados por CG-MS

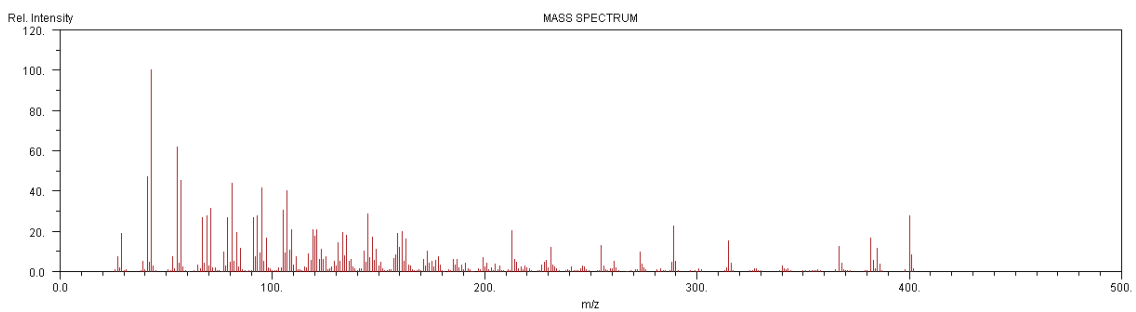
Dehidroergosterol m/z 466



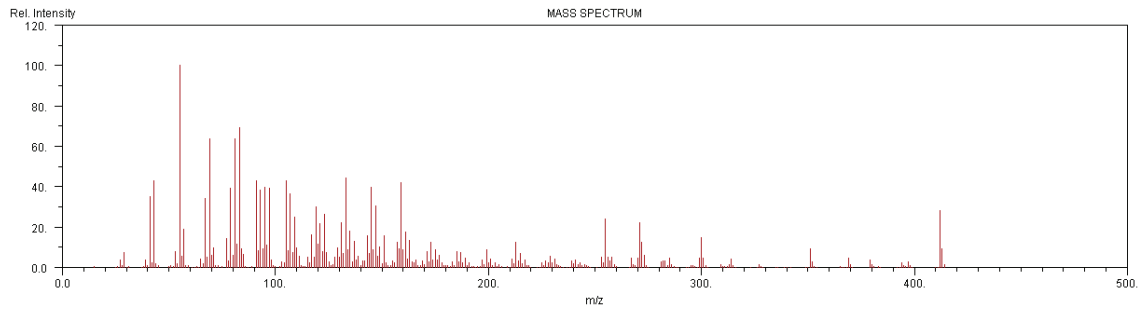
Ergosterol m/z 468



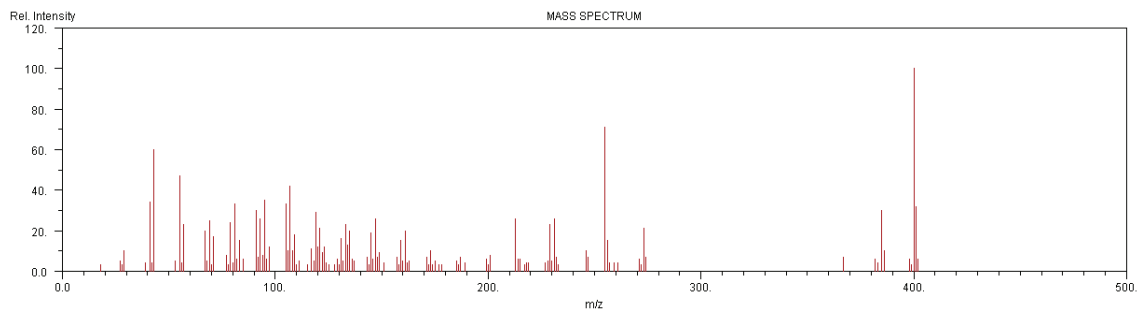
Campesterol m/z 472



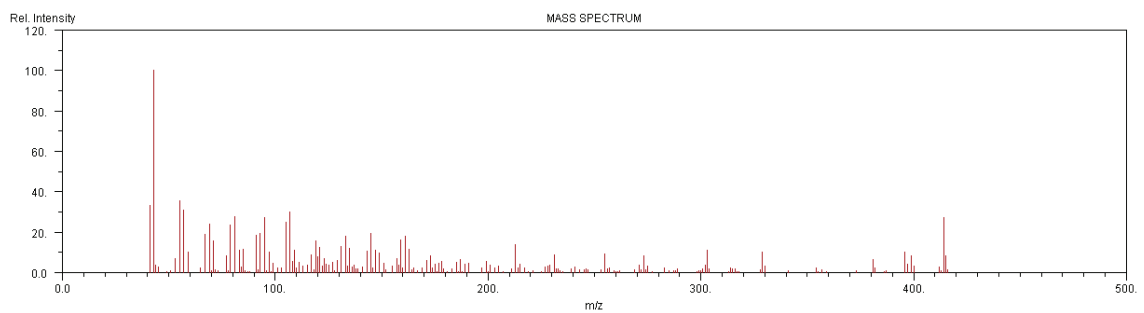
Estigmasterol m/z 484



Fungisterol m/z 472



β -sitosterol m/z 486



Estigmastanol m/z 488

