



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO TIPO DE SUBSTRATO E MÉTODOS DE
EXTRAÇÃO NAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DE
COGUMELOS: *PLEUROTUS CITRINOPILEATUS* VAR. *CORNUCOPIAE* E
PLEUROTUS SALMONEO STRAMINEUS

Mariana Branco Antunes

[Outubro 2015]



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO TIPO DE SUBSTRATO E MÉTODOS DE
EXTRAÇÃO NAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DE
COGUMELOS: *PLEUROTUS CITRINOPILEATUS* VAR. *CORNUCOPIAE* E
PLEUROTUS SALMONEO STRAMINEUS

IMPACT EVALUATION OF SUBSTRATE TYPE AND EXTRACTION METHODS ON
THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF MUSHROOM EXTRATCTS: *PLEUROTUS*
CITRINOPILEATUS VAR. *CORNUCOPIAE* E *PLEUROTUS SALMONEO STRAMINEUS*

Tese apresentada à *Escola Superior de Biotecnologia da*
Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia e Inovação

por

Mariana Branco Antunes

Local: Bioinvitro, Biotecnologia, Lda.; CBQF/Escola Superior de Biotecnologia

Orientação: Eng^a Sandra Ferrador

Co-orientação: Prof. Doutora Ana Maria Gomes e Prof. Doutora Ana Cristina Freitas

[Outubro 2015]

Resumo

A utilização e o consumo dos cogumelos têm vindo a aumentar devido à constatação de que estes contêm compostos bioativos com propriedades biológicas (atividade antioxidante, antimicrobiana, antidiabética, anti-hipertensiva, prebióticas, entre outras). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto do tipo de substrato e métodos de extração nas propriedades antioxidante, antidiabética, anti-hipertensiva e prebiótica de extratos de duas espécies de cogumelos, o *Pleurotus citrinopileatus* var. *cornucopiae* e o *Pleurotus salmoneo stramineus*. Ambas as espécies foram produzidas recorrendo a dois métodos de produção distintos: cultivo no substrato padrão (I) e cultivo no substrato alternativo (II) composto por mistura de substrato padrão com borras de café, 1:1. Os cogumelos resultantes foram colhidos, desidratados e submetidos a três métodos de extração diferentes, designadamente extração aquosa, enzimática e etanólica, para avaliar o impacto do método de extração nas propriedades biológicas dos extratos de cogumelos.

Na produção do cogumelo *P. salmoneo stramineus* verificou-se uma quebra de 86% no rendimento de produção no substrato II e uma produção morfológicamente atípica. A sua composição (teor em proteínas, gordura, açúcares e matéria orgânica) não variou em função do método de produção. Por outro lado o rendimento de produção, a morfologia e a composição não variou para o *Pleurotus citrinopileatus* var. *cornucopiae*.

Na preparação dos extratos, o rendimento foi mais elevado nas extrações aquosa (60-67%) e enzimática (58-63%). Na extração etanólica houve um rendimento mais baixo (25-32%), no entanto foi este extrato que apresentou o maior teor de açúcares totais (191 - 299 µg/mg de extrato). Os extratos das duas espécies de cogumelos não apresentaram atividade antidiabética (30%) em comparação com o controlo positivo (89%), no entanto o extrato aquoso de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* I apresentou uma boa atividade anti-hipertensiva ($IC_{50} = 123,3 \mu\text{g/mL}$). Nos extratos etanólicos de *P. salmoneo stramineus* não se detetou esta atividade. Os extratos aquosos e etanólicos das duas espécies de cogumelos apresentaram atividade prebiótica semelhante à do controlo positivo frutooligosacarídeo (FOS) e não se verificou diferenças entre métodos de produção (I e II).

Verificou-se a presença de atividade antioxidante, e esta foi mais elevada em extratos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* I (2,37 - 11,86 mg de ácido equivalente por gramas de extrato liofilizado).

Abstract

The use and consumption of mushrooms have been increasing due to the fact that they contain bioactive compounds with biological properties (antioxidant activity, antimicrobial, antidiabetic, antihypertensive, prebiotic, among others). In this context, the aim of this study was to evaluate the impact of substrate type and extraction methods in antioxidant properties, anti-diabetic, anti-hypertensive and prebiotic extracts of two species of mushrooms, *Pleurotus citrinopileatus* var. *cornucopiae* and *Pleurotus salmoneo stramineus*. Both species were produced using two different production methods: growing in standard substrate (I) and the alternative cultivation substrate (II) composed of standard substrate mixture with coffee grounds, 1: 1. The resulting mushrooms were collected, dried and subjected to three different extraction methods , particularly aqueous, enzymatic-assisted and ethanolic, to evaluate the impact of the extraction method on the biological properties of mushroom extracts.

In the production of *P. salmoneo stramineus* mushrooms there was a decrease of 86 % in the production yield from substrate II and a morphologically atypical production. Its composition (protein, fat, sugars and organic matter contents) did not vary according to the type of production. Moreover the production yield, morphology and composition did not change for the *Pleurotus citrinopileatus* var. *cornucopiae*. When preparing the extracts, the yield was higher in aqueous (60 - 67 %) and enzyme-assisted (58 - 63 %) extractions. In the ethanol extraction a lower yield (25 - 32 %) was reported, however it was this extract that had the highest total sugars content (191 - 299 mg / mg extract).

The extracts of the two species of mushrooms did not show antidiabetic activity (30 %) compared to the positive control (89 %), however an aqueous extract of *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* I had a good anti-hypertensive activity (IC₅₀ = 123,3 mg/mL). This activity was not detected in ethanol extracts of *P. salmoneo stramineus*. The water and ethanol extracts of the two mushroom species under study showed prebiotic activity similar to that of commercial positive control fructooligosaccharides (FOS), and there was no difference between production methods (I and II).

Antioxidant activity was detected in all extracts, and it was higher in *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* I extracts (2.37 to 11.86 mg equivalent acid per gram of lyophilized extract).

Agradecimentos

Durante a realização deste trabalho pude contar com o apoio e suporte de muitas pessoas, todas elas importantes, das quais não me posso esquecer e prestar um enorme agradecimento.

Começo por agradecer à Bioinvitro por esta grande oportunidade, pois permitiu-me alargar a minha experiência a nível profissional bem como académica, não esquecendo cada um dos seus colaboradores e a sua paciência ☺ À Cláudia e ao Daniel que me acompanharam sendo fundamentais na ajuda da realização de tarefas práticas.

Às minhas orientadoras, Engenheira Sandra Margarida Ferrador, Doutora Ana Maria Gomes e Doutora Ana Cristina Freitas por terem aceitado orientar a realização deste trabalho aplicando assim sempre o seu esforço e dedicação.

Aos colaboradores do laboratório do 6º piso da Escola Superior de Biotecnologia (UCP), ao Sérgio Silva, Dina Rodrigues e Manuela Amorim pelo enorme apoio durante a minha passagem pelo laboratório.

Aos meus amigos refugiados que sempre me propuseram enormes momentos de boa disposição e descontração, nunca esquecendo as conversas “sérias” e os seus comentários pertinentes ☼ Às amigas MCD que estiveram lá quando foi preciso.

Ao Rúben Pereira, pela sua paciência, suporte incansável e ajuda para que este trabalho fosse desenvolvido de uma maneira ou de outra ☺

Por último, mas não menos importante, a toda a minha família que me permitiu a realização deste mestrado e me apoiou incondicionalmente. Pai, mãe, irmão, avôs, avós, tios, tias e primos um agradecimento especial ♪

Índice

Resumo	iii
Abstract.....	v
Agradecimentos	vii
1. Introdução.....	1
1.1 A empresa: Bioinvitro - Biotecnologia, Lda.	1
1.2 Os cogumelos ao longo da História.....	2
1.3 <i>Pleurotus</i> sp.: produção e valor nutritivo	5
1.4 <i>Pleurotus citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i> e <i>Pleurotus salmoneo stramineus</i>	8
1.5 Propriedades biológicas e compostos bioativos em <i>Pleurotus</i> sp.	11
1.6 Métodos de extração de compostos bioativos	12
1.7 Objetivos.....	14
2. Materiais e Métodos	15
2.1 Produção de Cogumelos	15
2.2 Desidratação	17
2.3 Composição dos cogumelos	18
2.4 Preparação de Extratos	19
2.4.1 Extração Aquosa	19
2.4.2 Extração Enzimática	20
2.4.3 Extração com solvente orgânico etanol	20
2.5 Determinação dos açúcares totais nos extratos.....	20
2.6 Atividade antidiabética	21
2.7 Atividade anti-hipertensiva.....	21
2.8 Atividade prebiótica	23
2.8.1 Microrganismos	23
2.8.2 Meio de cultura	23

2.8.3	Seleção dos diferentes extratos por avaliação do crescimento dos microrganismos em microplaca.....	24
2.8.4	Avaliação da atividade prebiótica através da determinação do número de células viáveis dos microrganismos em macro placa e da sua atividade metabólica	24
2.8.5	Análise de ácidos orgânicos e açúcares por HPLC.....	25
2.1	Atividade antioxidante.....	26
2.1.1	ABTS ⁺⁺	26
2.1.2	ORAC	27
2.1.3	FRAP	27
2.1.4	TPC	28
2.2	Análise Estatística	28
3.	Resultados e Discussão	29
3.1	Substratos	29
3.2	Produção e composição	30
3.3	Extração.....	35
3.4	Atividade antidiabética.....	38
3.5	Atividade anti-hipertensiva.....	40
3.6	Atividade prebiótica	41
3.6.1	Seleção dos extratos com maior potencial prebiótico.....	41
3.6.2	Avaliação da atividade prebiótica dos extratos selecionados	48
3.7	Atividade antioxidante.....	54
4.	Conclusões gerais.....	57
5.	Trabalho futuro.....	59
6.	Anexos.....	61
6.1	Curva de calibração do método Fenol-Ácido-Sulfúrico.....	61
6.2	Curva de calibração do método ABTS ⁺⁺	61

6.3	Curva de calibração do método ORAC	61
6.4	Curva de calibração do método FRAP	62
6.5	Curva de calibração do método TPC	62
7.	Bibliografia.....	63

Lista de Figuras

Figura 1.1: Logótipo da empresa Bioinvitro - Biotecnologia, Lda.....	2
Figura 1.2: Forma generalizada da estrutura de um macrofungo (Adaptado de Silva <i>et al.</i> , 2015).....	3
Figura 1.3: Forma generalizada do ciclo de vida de um fungo produtor de cogumelos – reprodução assexuada (Adaptado de Silva et al. 2015).....	4
Figura 1.4: Esquema genérico da produção de <i>Pleurotus ostreatus</i> (Adaptado de Ferrador, 2015).....	8
Figura 1.5: <i>Pleurotus citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i> . (Fonte: Antunes, 2015).....	9
Figura 1.6: <i>Pleurotus salmoneo stramineus</i> (Fonte: Antunes, 2015).....	9
Figura 2.1: Fluxograma de todas as etapas da produção de <i>P. salmoneo stramineus</i> I e II.....	16
Figura 2.2: Fluxograma de todas as etapas da produção de <i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i> I e II.....	17
Figura 2.3: Cogumelos <i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i> dispersos num tabuleiro de desidratação.....	18
Figura 3.1: Sacos com substrato padrão para a produção de cogumelos <i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i> I e <i>P. salmoneo stramineus</i> I.....	29
Figura 3.2: Sacos com substrato alternativo, designado por substrato teste, para a produção de cogumelos <i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i> II e <i>P. salmoneo stramineus</i> II.....	29
Figura 3.3: Fotografias de cogumelos de <i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i> e <i>P. salmoneo stramineus</i> produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II).....	30
Figura 3.4: Rendimentos (% p/p) da extração aquosa, enzimática com Alcalase e etanólica de <i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i> e <i>P. salmoneo stramineus</i> produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II); Para cada tipo extração, valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).....	36
Figura 3.5: Inibição (%) da α -glucosidase determinada em <i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i> e <i>P. salmoneo stramineus</i> produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II); Para cada tipo extração, valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).....	38

Figura 3.6: Curvas de crescimento em MRS com (○) e sem (●) glucose, com FOS (●) e com os diferentes extratos (a) aquosos, (b) enzimáticos e (c) etanólicos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* (■; □) e de *P. salmoneo stramineus* (▲; △) produzidos em substrato padrão (I) (■; ▲) ou em substrato teste (II) (□; △) e (d) respectivos números de células viáveis (Log ufc/mL) de *Lactobacillus casei* L26 após 24h de incubação a 37 °C.....43

Figura 3.7: Curvas de crescimento em MRS com (○) e sem (●) glucose, com FOS (●) e com os diferentes extratos (a) aquosos, (b) enzimáticos e (c) etanólicos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* (■; □) e de *P. salmoneo stramineus* (▲; △) produzidos em substrato padrão (I) (■; ▲) ou em substrato teste (II) (□; △) e (d) respectivos números de células viáveis (Log ufc/mL) de *Lactobacillus acidophilus* Ki após 24h de incubação a 37 °C.....44

Figura 3.8: Curvas de crescimento em MRS com (○) e sem (●) glucose, com FOS (●) e com os diferentes extratos (a) aquosos, (b) enzimáticos e (c) etanólicos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* (■; □) e de *P. salmoneo stramineus* (▲; △) produzidos em substrato padrão (I) (■; ▲) ou em substrato teste (II) (□; △) e (d) respectivos números de células viáveis (Log ufc/mL) de *Bifidobacterium animalis* Bo após 24h de incubação a 37 °C.....45

Figura 3.9: Curvas de crescimento em MRS com (○) e sem (●) glucose, com FOS (●) e com os diferentes extratos (a) aquosos, (b) enzimáticos e (c) etanólicos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* (■; □) e de *P. salmoneo stramineus* (▲; △) produzidos em substrato padrão (I) (■; ▲) ou em substrato teste (II) (□; △) e (d) respectivos números de células viáveis (Log ufc/mL) de *Bifidobacterium lactis* BB12 após 24h de incubação a 37 °C.....47

Figura 3.10: Variação do número de células viáveis de *B. animalis* Bo em MRS com (○) e sem (●) glucose, com FOS (●) e com os diferentes extratos etanólicos (a) e aquosos (b) e respectiva variação de pH (c) e (d), de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* (■; □) e de *P. salmoneo stramineus* (▲; △) produzidos em substrato padrão (I) (■; ▲) ou em substrato teste (II) (□; △) ao longo de 48h de incubação a 37 °C.....49

Figura 3.11: Variação do número de células viáveis de *L. acidophilus* Ki em MRS com (○) e sem (●) glucose, com FOS (●) e com extratos etanólicos (a) e respectiva

variação de pH (b), de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* (--■--;--□--) e de *P. salmoneo stramineus* (--▲--;--△--) produzidos em substrato padrão (I) (--■--;--▲--) ou em substrato teste (II) (--□--;--△--) ao longo de 48h de incubação a 37 °C.....51

Figura 3.12: Evolução das concentrações de glucose e FOS (i), ácido láctico (ii) e ácido acético (iii) ao longo do tempo de incubação nos diferentes meios de MRS basal suplementados com extratos etanólicos (a, c) e aquosos (b) de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* (--■--;--□--) e *P. salmoneo stramineus* (--▲--;--△--) produzidos em substrato padrão (I) (--■--;--▲--) e em substrato teste (II) (--□--;--△--) e inoculados com *Bifidobacterium animalis* Bo (a, b) e *Lactobacillus acidophilus* Ki (c).....53

Figura 3.13: Teor em fenólicos totais (TPC) (a); poder redutor férrico (FRAP) (b); captura do radical ABTS^{•+} (ABTS) (c) e capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) determinados nos diferentes extractos aquosos, enzimáticos e etanólicos de cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus* produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II); Para cada extração, valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa (p<0.05).....54

Figura 6.1: Curva de calibração obtida usando a glucose como padrão para calcular os valores de açúcar no método Fenol-Ácido-Sulfúrico.....61

Figura 6.2: Curva de calibração obtida usando o ácido ascórbico como padrão para calcular os valores no método de ABTS^{•+}.....61

Figura 6.3: Curva de calibração obtida usando o ácido ascórbico como padrão para calcular os valores no método de FRAP.....62

Figura 6.4: Curva de calibração obtida usando o ácido ascórbico como padrão para calcular os valores no método de TPC.....62

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Composição de algumas espécies de <i>Pleurotus</i> (Fonte: Khan & Tania 2012).....	5
Tabela 1.2: Características de produção de <i>Pleurotus</i> sp em termos de fase, condições a controlar e respectivos valores (Fonte: Mycelia, 2015).....	7
Tabela 1.3: Características de produção de <i>Pleurotus citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i> e <i>Pleurotus salmoneo stramineus</i> (Adaptado de Ferrador, 2015).....	10
Tabela 1.4: Diferentes mecanismos de ação anti tumoral de diversas espécies de <i>Pleurotus</i> sp. (Adaptado de Khan & Tania, 2012).....	11
Tabela 1.5: Índice de polaridade (P') e ponto de ebulição (°C) de alguns solventes (Adaptado de Mendes, 2012).....	13
Tabela 2.1: Percentagem de humidade (%) removida nos cogumelos desidratados.....	18
Tabela 2.2: Tipos de extração realizadas às diferentes espécies de cogumelos vs. tipos de substrato (I e II) usados na produção.....	19
Tabela 2.3: Extratos selecionados para avaliação do seu potencial prebiótico através do crescimento de microrganismos em macroplaca.....	25
Tabela 3.1: Rendimento (%) e peso (g) da produção dos cogumelos <i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i> e em <i>P. salmoneo stramineus</i> produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II).....	31
Tabela 3.2: Presença de cafeína (%) nos substratos (I e II) e respetivos cogumelos <i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i> e <i>P. salmoneo stramineus</i>	31
Tabela 3.3: Composição em matéria orgânica (%), proteína (%), gordura (%) e açúcares (%) determinada em <i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i> e em <i>P. salmoneo stramineus</i> produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II).....	34
Tabela 3.4: Médias e desvio-padrão dos açúcares totais (µg/mg de extrato) determinados nos diferentes tipos de extratos em <i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i> e <i>P. salmoneo stramineus</i> produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II).....	37
Tabela 3.5: Valores de IC ₅₀ (µg/mL) determinados em <i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i> e <i>P. salmoneo stramineus</i> e nos seus diferentes extratos e modos de produção (I e II).....	40

Tabela 3.6: Médias e desvio-padrão da taxa de crescimento específica (h^{-1}) para as duas estirpes prebióticas em MRS suplementado com extratos etanólicos e aquosos de <i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i> e <i>P. salmoneo stramineus</i> produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II).....	51
Tabela 6.1: Dados da reta da curva de calibração obtida usando o trolox como padrão para calcular os valores no método de ORAC.....	61

1. Introdução

Os cogumelos fazem parte da alimentação humana desde tempos primordiais. De facto, afirma-se que assumiriam um papel preponderante na era pré-agrícola, como alimento facilmente disponível na prática recolectora. A produção de cogumelos é uma atividade em expansão que visa um futuro promissor, demonstrado pelo aumento da procura por parte dos consumidores, e por todas as suas qualidades nutracêuticas e organolépticas, sendo de todo o interesse aprofundar o estudo da sua composição, visionando a utilização dos seus compostos benéficos para um melhoramento na alimentação contribuindo positivamente para a saúde geral da população. Porém, a composição dos cogumelos pode variar com o tipo de substrato de cultivo, condições e metodologia de cultivo e espécie cultivada (Chang & Quimio, 1982). O consumo de cogumelos está a aumentar na cultura ocidental, envolvendo um grande número de espécies: em 1995, a produção anual mundial foi de 2,0 milhões de toneladas e, em 2005, aumentou para 3,3 milhões de toneladas, ou seja, mais de 60% em 10 anos (FAOSTAT, 2015).

Numa parceria entre a Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa e a empresa Bioinvitro – Biotecnologia, Lda. procedeu-se ao estudo em duas espécies de cogumelos saprófitas com elevado valor comercial.

Este trabalho foi realizado no âmbito do mestrado em Biotecnologia e Inovação tendo como principal objetivo avaliar o impacto do tipo de substrato e métodos de extração nas propriedades biológicas de extratos dos seguintes cogumelos: *Pleurotus citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *Pleurotus salmoneo stramineus*.

1.1 A empresa: Bioinvitro - Biotecnologia, Lda..

Uma parte da dissertação foi desenvolvida na empresa Bioinvitro – Biotecnologia, Lda. (Figura 1.1). A atividade da empresa iniciou em setembro de 2010 e está sediada na Rua do Pindelo, bloco 2, loja 4/5 Urbanização do Pindelo, 4480-047 Árvore, Vila do Conde, apresentando o CAE: 01300 – Cultura de materiais de propagação vegetativa.



Figura 1.1: Logótipo da empresa Bioinvitro – Biotecnologia, Lda..

A empresa é pioneira na área da micologia que se apresenta como uma referência no mercado nacional e intervém nas seguintes áreas de negócio:

- Plantas – multiplicação de espécies e variedades selecionadas;
- Fungos – produção e comercialização de inóculos, substratos e troncos de produção de cogumelos saprófitas;
- Alimentar – produção e comercialização de cogumelos frescos, desidratados e transformados em produtos de valor acrescentado;
- Serviços – serviços personalizados conforme as necessidades dos produtores agroflorestais e apoio técnico e consultoria prestados aos produtores de cogumelos.

A Bioinvitro tem vindo a estabelecer parcerias com várias instituições de forma a atingir certos objetivos, tais como I&D de outras aplicações para além da alimentar (aplicações têxteis e cosméticas), comercialização, formação, divulgação, entre outras. Desta forma, a empresa visa a consolidação da sua posição no mercado como empresa biotecnológica através de parcerias e de equipas I&D.

Relativamente aos valores da empresa, esta pretende satisfazer os seguintes princípios:

- Responsabilidade no desenvolvimento económico, social e ambiental de forma sustentável;
- Melhoria contínua dos serviços e produtos;
- Satisfação e fidelização do cliente;
- Criação de condições para o sucesso da empresa através da motivação dos recursos humanos.

1.2 Os cogumelos ao longo da História

Há muitos séculos que o reino dos fungos suscita um grande interesse no Homem pela sua diversidade fisiológica e morfológica. No entanto na Europa somente nas últimas décadas é que os fungos têm sido mais explorados devido ao seu potencial económico.

Certas espécies de fungos que pertencem às divisões *Basidiomycota* e *Ascomycota* frutificam dando origem a um corpo frutífero ou carpóforo. Todos os macrofungos são constituídos por duas partes: o micélio e o carpóforo. O micélio constitui a parte vegetativa do fungo sendo composta por um conjunto de filamentos ou hifas, geralmente de cor branca, que vivem de baixo da terra entre o húmus ou rodeando as raízes, sobre folhas ou madeira morta e inclusive sobre outros fungos, plantas ou animais. Estes filamentos ou hifas crescem de forma radial e indefinidamente em todas as direções. O cogumelo, denominação comum para carpóforo, surge no extremo do micélio como resposta a um ou mais fatores bióticos ou abióticos e é formado na sua maioria por um tecido estéril (pé). Apenas uma pequena parte do cogumelo é fértil: o himénio que se encontra no chapéu e que corresponde à estrutura produtora de esporos e que pode ter a forma de lâminas, tubos ou agulhas. São os esporos produzidos que permitem a disseminação da espécie. A maioria dos macrofungos com interesse comercial é constituída por pé, chapéu e estruturas formadoras de esporos (Figura 1.2) (Rodrigues *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2015).

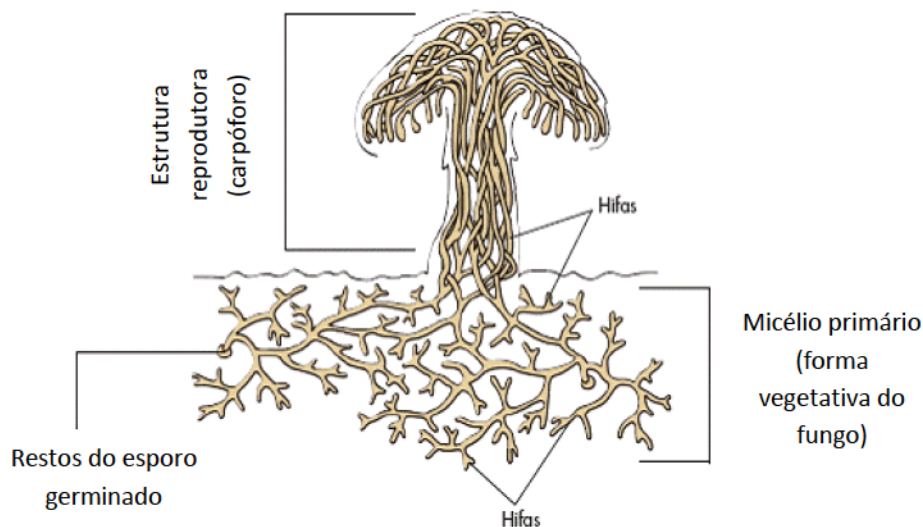


Figura 1.2: Forma generalizada da estrutura de um macrofungo (Adaptado de Silva *et al.*, 2015).

Quando o esporo maduro cai sobre um substrato e encontra condições adequadas, o mesmo pode germinar e dar origem ao cogumelo. O fungo alimenta-se por absorção do substrato, retirando os nutrientes e as fontes de carbono e de azoto necessárias ao seu metabolismo de modo a se desenvolver e frutificar (Kalač, 2009). Na figura 1.3 apresenta-se, em resumo, o ciclo de vida de um fungo produtor de cogumelos, fase assexuada de reprodução.



Figura 1.3: Forma generalizada do ciclo de vida de um fungo produtor de cogumelos – reprodução assexuada (Adaptado de Silva *et al.*, 2015).

Os cogumelos comestíveis são conhecidos e consumidos desde tempos pré-históricos, no entanto, foram os chineses e os japoneses os primeiros povos a cultivar cogumelos para consumo próprio. Na China há registos com 2000 anos em que os cogumelos têm sido utilizados para suplemento de dietas (Ferrador, 2015; Kalač, 2009; Guillamón *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2008).

Atualmente os cogumelos suscitam um grande interesse a nível mundial pelas suas propriedades químicas e nutricionais associadas. Ambas têm sido muito exploradas e nesse sentido os cogumelos têm sido indicados como alimentos que ajudam a prevenir algumas doenças, tais como: hipertensão, hipercolesterolemia e cancro (Khan e Tania, 2012).

Mais recentemente os compostos que podem ser extraídos dos cogumelos (carotenoides, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, oligo e polissacarídeos) (Kalač, 2009) estão a ter uma grande atenção devido ao seu potencial biológico. Estes compostos são promissores e podem ser incorporados noutras matrizes alimentares ou nutracêuticas com a perspetiva de melhorar funções biológicas nos humanos (Aida *et al.*, 2009).

Os cogumelos mais cultivados em todo o mundo são: *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes* e *Pleurotus ostreatus*. Nos últimos anos, o cultivo de espécies de *Pleurotus* sp. tem sido economicamente importante em todo o mundo principalmente na indústria alimentar por se caracterizar como o terceiro grupo de cogumelos mais cultivado em todo o mundo (Cohen

et al., 2002), principalmente no leste Asiático, Índia, Europa e África (Ferrador, 2015). A empresa Bioinvitro, Biotecnologia Lda. tem focado uma fração significativa do seu investimento no cultivo de distintas espécies de *Pleurotus*, justificando o enquadramento do estado da arte subsequente enquanto alvo principal desta dissertação.

1.3 *Pleurotus* sp.: produção e valor nutritivo

Os cogumelos do género *Pleurotus* sp., conhecidos normalmente por cogumelos pleurotos são um grupo diverso de cogumelos. Existem várias espécies de *Pleurotus*, algumas das quais descritas na tabela 1.1, que podem ser facilmente cultivados e têm demonstrado muitas potencialidades para além do seu valor nutricional nomeadamente propriedades terapêuticas, aplicações biotecnológicas e ambientais (Cohen *et al.*, 2002; Khan & Tania, 2012).

Tabela 1.1: Composição de algumas espécies de *Pleurotus* (Fonte: Khan & Tania 2012)

Espécie	Proteínas*	Hidratos de Carbono*	Lípidos*	Fibras*	Minerais*
<i>Pleurotus ostreatus</i>	17 – 42	37 – 48	0.5 – 5	24 – 31	4 – 10
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	16 – 38	37 – 40	1 – 5	22 – 31	5 – 9
<i>Pleurotus florida</i>	15 – 21	40 – 43	1– 5	23 – 27	8 –12
<i>Pleurotus cystidiosus</i>	17 – 18	43 – 45	5 – 6	25 – 26	7 – 8
<i>Pleurotus highking 51</i>	20 – 21	36 – 37	5 – 6	30 – 31	5 – 6
<i>Pleurotus gesstaranus</i>	19 – 20	45 – 46	3 – 4	26 – 27	5 – 6
<i>Pleurotus eryngii</i>	11 – 12	39 – 40	7 – 8	28 – 29	4 – 5
<i>Pleurotus tuber-regium</i>	13 – 17	53 – 54	0.2 – 2	15 – 16	4 – 10
<i>Pleurotus flabellatus</i>	21 – 22	59 – 60	1 – 2	10 – 12	6 – 7
*g/100 g de cogumelo desidratado					

Os cogumelos têm sido associados a uma boa fonte alternativa na alimentação humana pelo seu valor nutritivo, características organolépticas e, principalmente, por poder complementar ou equilibrar dietas ricas em lípidos – são reconhecidos pelo seu valor calórico baixo, por exemplo o *Pleurotus ostreatus* é caracterizado por um valor calórico de 360 kcal/kg parte edível (Jaworska & Bernas, 2009). Os cogumelos podem conter um teor

de proteínas entre 25 – 44 % de proteína sobre o seu peso desidratado, por outro lado, são pobres em lípidos apresentando apenas cerca de 1 – 3 % de lípidos sobre o seu peso desidratado (Tabela 1.1). De notar que os cogumelos apresentam também um apreciável teor em fibra. No que diz respeito a vitaminas e minerais nos cogumelos, os mais frequentes são: as vitaminas tiamina (B1); riboflavina (B2); piridoxina (B6); vitamina D; vitamina B12; vitamina C; ácido Nicotínico; ácido fólico; ácido pantoténico e os minerais potássio; ferro; cálcio e fósforo.

A produção de cogumelos *Pleurotus* sp. é relativamente mais fácil de produzir comparativamente a outros tipos de cogumelos como são o *Macrolepiota procera*, a *Lepista nuda* e a *Morchella esculenta*) (Pereira, 2014). O seu cultivo em grande escala deve-se ao facto de resistir a contaminações e invasores devido ao seu crescimento rápido não permitindo que contaminações inibam o crescimento do micélio, sendo possível a sua produção através de pasteurização do substrato e não esterilização como a maioria das espécies de outros cogumelos. Os *Pleurotus* sp. conseguem desenvolver-se bem em uma grande variedade de substratos orgânicos como matéria-prima nomeadamente em substratos à base de palha (Mishra *et al.*, 2013), serrim (Pereira, 2014), aparas de madeira (Khan *et al.*, 2013), aveia, trigo, centeio (Mycelia, 2015), resíduos de bananeira (Carvalho *et al.*, 2014) e polpa de café (Fan *et al.*, 2003; Salmones *et al.*, 2005). Como a sua produção deve ocorrer em salas climatizadas, controlando temperatura, humidade relativa e presença/ausência de luz torna-se possível o seu cultivo ao longo de todo o ano (Tabela 1.2).

Tabela 1.2: Características de produção de *Pleurotus* sp em termos de fase, condições a controlar e respectivos valores (Fonte: Mycelia, 2015)

Fases de Produção	Parâmetros	Valores
Incubação	Temperatura (°C)	20-22
	Humidade Relativa (%)	90-95
	Tempo (dias)	20-30
	Luz	Não aplicável
Frutificação	Temperatura (°C)	18-20
	Humidade Relativa (%)	80-90
	Tempo (dias)	4-7
	Luz	Fotoperíodo

Antes da frutificação (formação do cogumelo), a propagação do micélio passa por uma série de etapas nomeadamente na formação de micélio primário a partir da remoção de um fragmento do cogumelo, ou seja, retirando uma pequena porção estéril de uma zona do cogumelo que nunca esteve em contacto com o meio exterior e a sua posterior inoculação em meio nutritivo adequado (Potato Dextrose Agar, PDA). Depois de obtida a cultura pura, é realizado um cultivo em grão de cereal (trigo, centeio, aveia, etc) para a obtenção do *spawn-mother*, o qual permite obter o *spawn*, que será usado para inocular o substrato. Após a inoculação o substrato ficará em incubação durante 4 semanas dando-se de seguida a frutificação e obtém-se o corpo frutífero (cogumelo) (Figura 1.4) (Pereira, 2014).



Figura 1.4: Esquema genérico da produção de *Pleurotus ostreatus* (Adaptado de Ferrador, 2015).

Como já foi mencionado, várias espécies de cogumelos *Pleurotus* são produzidas e consumidas em todo o mundo, tendo-se tornado alvo de muitos estudos (Cohen *et al.*, 2002; Aida *et al.*, 2009; Kalač, 2009; Guillamón *et al.*, 2010; Khan & Tania, 2012). Assim, muitas investigações realizadas em diferentes partes do mundo têm vindo a afirmar a importância destes cogumelos tanto pelo seu interesse nutricional como pelas suas propriedades biológicas (Khan & Tania, 2012). Sendo várias as espécies de *Pleurotus* (Tabela 1.1) estas distinguem-se entre si em algumas destas propriedades sendo importante destacar as diferenças, particularmente de espécies menos estudadas como são o *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus*.

1.4 *Pleurotus citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *Pleurotus salmoneo stramineus*

A espécie *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* tem origem no leste Asiático, também conhecida e denominada de *Pleurotus* amarelo ou repolga amarela, pertence à família *Pleurotaceae* e é característica pela sua coloração amarela e pela sua semelhança morfológica ao *Pleurotus ostreatus*, com crescimento em cacho de pétalas pequenas e em

forma de funil (Figura 1.5). Esta espécie de fungo é considerada de crescimento rápido e com tolerância a temperaturas elevadas, permitindo ciclos de produção rápidos e de elevado rendimento.

Trata-se de um cogumelo comestível que tem vindo a ser bastante apreciado devido aos seus elevados valores de proteína (15 - 21 g/100 g de cogumelo desidratado), hidratos de carbono (40 - 43 g/100 g de cogumelo desidratado) e minerais (8 - 12 g/100 g de cogumelo desidratado) (Khan & Tania, 2012). Recentemente estes cogumelos têm sido usados pelas suas propriedades biológicas associadas à prevenção de algumas doenças (cancro próstata, leucemia, cancro da mama e hipertensão) (Khan & Tania, 2012), pois têm apresentado atividades fisiológicas interessantes, tais como: atividades antioxidante, antitumoral e imunorreguladora, onde aparentemente os polissacáridos presentes neste cogumelo são responsáveis pela maior parte da sua atividade biológica (Zhang *et al.*, 2014).



Figura 1.5: *Pleurotus citrinopileatus* var. *cornucopiae*. (Fonte: Antunes, 2015).

A espécie *P. salmoneo stramineus* também conhecida e denominada por *Pleurotus djamor* ou *Pleurotus flabellatus*, é um fungo que pertence à família *Pleurotaceae* com origem no sul da Ásia e Índia. Apresenta semelhanças morfológicas com o *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *Pleurotus ostreatus*, com crescimento em cacho e formação de pétala de tamanho variável. A coloração rosa a salmão torna este cogumelo muito característico e único sendo, por isso, denominado normalmente de cogumelo cor-de-rosa. No entanto, a baixas temperaturas de cultivo apresenta desvios morfológicos de coloração e forma.



Figura 1.6: *Pleurotus salmoneo stramineus* (Fonte: Antunes, 2015).

A espécie *P. salmoneo stramineus*, por pertencer a um género de cogumelos tão estudado mundialmente, também tem sido referida em vários estudos, existindo evidências de que este cogumelo apresenta propriedades imunoreguladoras, antioxidantes e anti tumorais no combate a cancros em fase inicial no fígado (Wang *et al.*, 2000; Gern *et al.*, 2008).

Os substratos para a produção destes cogumelos (*P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus*) são à base de palha e serrim de madeira. Desta maneira, é possível obter ciclos de cultivo rápidos e com elevado rendimento (cerca de 25% do seu peso inicial), este tipo de substratos já foram descritos como ideais para estes cogumelos (Ferrador, 2015). As características de produção mais adequadas para estas duas espécies de cogumelos são apresentadas na Tabela 3, não havendo diferenças de cultivo entre elas (Ferrador, 2015).

Tabela 1.3: Características de produção de *Pleurotus citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *Pleurotus salmoneo stramineus* (Adaptado de Ferrador, 2015)

Fases de Produção	Parâmetros	<i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i>	<i>P. salmoneo</i> <i>stramineus</i>
Incubação	Temperatura (°C)	22	22
	Humidade Relativa (%)	90 – 95	90 – 95
	Tempo (dias)	20 – 30	20 – 30
	Luz	Não aplicável	Não aplicável
Frutificação	Temperatura (°C)	18 – 20	20 – 22
	Humidade Relativa (%)	80 – 90	80 – 90
	Tempo (dias)	4 – 7	8
	Luz	Fotoperíodo	Fotoperíodo
	CO ₂ (ppm)	< 800	< 800
Ciclos (frutificações)		2 – 3	4 – 7
Rendimento total (%)		25	25
Cuidados de colheita		Colocar luvas previamente desinfectadas e colher o cacho pela sua base. Armazenar os cogumelos a 4 °C	

1.5 Propriedades biológicas e compostos bioativos em *Pleurotus* sp.

Conforme já foi referido em seções anteriores, ao longo dos anos os cogumelos têm sido tradicionalmente mais utilizados na China, Coreia e Japão devido às suas propriedades nutricionais e biológicas. Este tipo de utilização e aplicação dos cogumelos na saúde foi registado pela primeira vez na China 100 aC. Muitas destas formas de medicina tradicional utilizavam extratos aquosos de cogumelos para o tratamento de doenças. Havendo vários relatos, em particular na Ásia, em que extratos de cogumelos continuam a ser utilizados com eficácia em tratamentos de doenças como o cancro, infeções ou simples alergias (Gonçalves & Lima, 2011).

Atualmente, por todo o mundo, parece existir um renascimento pelo interesse deste tipo de “remédios” tradicionais e naturais associados ao uso dos cogumelos. Vários estudos têm relatado que os extratos de cogumelos e o micélio de *Pleurotus* sp. possuem atividades anti tumorais (Cohen *et al.*, 2002), anti-hipertensivas (Kwon *et al.*, 2008), antioxidantes (Mishra *et al.*, 2013), antidiabéticas (Hu *et al.*, 2006), antimicrobianas (Smolskaitė *et al.*, 2015), pré-bióticas (Aida *et al.*, 2009) e ajudam no combate à obesidade (Khan e Tania, 2012). Estudos recentes têm demonstrado que este género *Pleurotus* sp. apresenta diversos mecanismos anti tumorais nas suas mais variadas espécies conforme já referido anteriormente e aqui detalhado (Tabela 1.4) (Khan & Tania, 2012).

Tabela 1.4: Diferentes mecanismos de ação anti tumoral de diversas espécies de *Pleurotus* sp. (Adaptado de Khan & Tania, 2012)

Espécie	Tipo de cancro	Modo de ação
<i>P. ostreatus</i>	Cancro da próstata	Indução da apoptose
	Leucemia	Regulação de genes por atividade da RNase
	Cancro da mama	Interrupção do ciclo celular
<i>P. pulmonarius</i>	Cancro do cólon	Regulação da adesão celular
<i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i>	Leucemia	Através da ação da proteína anti proliferativa
	Hepatoma	Proliferação da atividade inibidora da lacase
<i>P. salmoneo</i> <i>stramineus</i>	Hepatoma	Regulação de genes da proliferação da atividade da RNase

Para além da existência de propriedades anti tumorais, existem também outros estudos que evidenciam a existência de compostos com propriedades biológicas em extratos de cogumelos, tais como polissacarídeos, ácido nicotínico, ergosterol, terpenos e compostos fenólicos. Há um estudo que relata a atividade antioxidante de extratos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e a sua relação com funções anti-hiperlipidémicas que podem ajudar a combater o colesterol e a combater o risco cardiovascular (Guillamón *et al.*, 2010).

Os efeitos anti-diabéticos também já foram descritos na espécie *Pleurotus* sp., onde extratos aquosos ricos em polissacarídeos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* demonstraram baixar os níveis de glucose no sangue entre 16 a 23 % em ratos experimentais. Este mecanismo pode estar ligado à inibição dos transportadores da glucose, inibição da enzima α -glucosidase responsável pela sua absorção ou pela estimulação dos recetores de insulina. Em *P. ostreatus* também já foi descrito o mesmo efeito, onde os níveis de glucose no sangue de ratos experimentais baixaram, mas neste caso os investigadores não usaram extratos mas sim cogumelos. Estes resultados parecem indicar o uso promissor dos *Pleurotus* sp. na modulação da absorção dos níveis de glucose, mas mais estudos clínicos são necessários para comprovar este potencial anti diabético (Khan & Tania, 2012).

Os cogumelos *Pleurotus* sp. também apresentam substâncias com capacidade antimicrobiana e antiviral. Vários estudos (Smolskaitè *et al.* 2015; Khan & Tania, 2012; Aida *et al.*, 2009) descrevem algumas substâncias, provenientes de extratos aquosos, com propriedades chave em *P. ostreatus* com ação inibidora de algumas bactérias tais como *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Do mesmo modo, em *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* inclusive já foi isolada a enzima lacase que demonstrou ter um papel importante na inibição do vírus da hepatite C (El-Fakharany *et al.*, 2010).

1.6 Métodos de extração de compostos bioativos

Na consequência destes estudos há assim a necessidade de recorrer a métodos de extração para extrair e concentrar os compostos provenientes dos cogumelos, assim pode-se avaliar as suas propriedades biológicas.

A extração de compostos bioativos com interesse biológico divide-se geralmente em dois grandes grupos de extração, as técnicas convencionais e não convencionais. Dentro das técnicas convencionais existem as extrações por maceração, infusão, decocção e ebulição sob refluxo. Por outro lado, nas técnicas não convencionais temos as extrações assistidas por micro-ondas, por ultrassons, extração com fluido supercrítico, líquido pressurizado, extração hidrotópica e extração assistida por enzimas (Brusotti *et al.*, 2014). Na maior parte dos casos, as extrações aquosas por ação da água quente são complementadas com extrações com álcoois para que se consiga isolar compostos insolúveis em água (Gonçalves & Lima, 2011).

Assim, da mesma forma que existem métodos para extrair compostos de plantas e algas, existem metodologias adaptadas para os cogumelos. Verificando-se muitos métodos utilizados e adaptados para extrair compostos dos cogumelos (Gonçalves & Lima, 2011). A eficiência dos processos de extração culminam na escolha do solvente a usar consoante os compostos que se pretende extrair. Assim, a polaridade do solvente é uma das propriedades fundamentais a considerar uma vez que um solvente com uma certa polaridade irá apenas dissolver eficientemente compostos com a mesma polaridade. Entre os solventes mais utilizados estão presentes água, hexano, metanol, etanol, clorofórmio e acetato de etilo cuja polaridade já é conhecida. Na Tabela 1.5 apresentam-se os índices de polaridade e o ponto de ebulição de alguns dos solventes.

Tabela 1.5: Índice de polaridade (P') e ponto de ebulição (°C) de alguns solventes (Adaptado de Mendes, 2012)

Solvente	Índice de Polaridade (P')	Ponto de Ebulição (°C)
Hexano	0.0	69
Etanol	5.2	78
Metanol	5.1	65
Clorofórmio	4.1	61
Acetato de etilo	4.4	77
Água	9.0	100

Impõe-se, assim, a necessidade de combinar abordagens diferentes que permitam retirar o máximo partido das espécies utilizadas com o objetivo de obter determinado composto (Gonçalves & Lima, 2011).

1.7 Objetivos

Este estudo teve como principal objetivo avaliar o impacto do tipo de substrato e de métodos de extração nas propriedades biológicas de extratos de duas espécies de cogumelos: o *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e o *P. salmoneo stramineus*. Para tal, estes cogumelos foram produzidos sob modos de produção diferentes no que diz respeito à constituição do seu substrato. De modo a alcançar este objetivo, foi necessário estabelecer objetivos mais específicos: (i) produzir *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus* em modo de produção padrão e modo de produção alternativo na presença de borras de café; (ii) caracterizar a composição nutricional dos cogumelos resultantes dos dois métodos de produção; (iii) aplicar três métodos diferentes de extração usando solventes diferentes ou combinado com enzimas e (iv) analisar a composição dos diferentes extratos obtidos assim como avaliar as suas atividades prebiótica, antioxidante, anti-hipertensiva e antidiabética.

2. Materiais e Métodos

2.1 Produção de Cogumelos

A produção dos cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus* utilizados neste estudo foi realizada nas instalações da empresa Bioinvitro, Biotecnologia Lda. sob as condições recomendadas para a produção, nomeadamente com temperatura compreendida entre os 22 e 24 °C, humidade relativa do ar (HR) de 57 a 59 % e com o fotoperíodo de 12 horas dia e 12 horas noite.

Para obter os cogumelos, usaram-se sacos produtores com 2 formulações: substrato padrão (I) composto por serrim, palha e grãos de cereais e substrato teste (II) suplementado com borras de café. O substrato padrão é um substrato otimizado para o cultivo de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e de *P. salmoneo stramineus* produzido por uma empresa especializada (Mycelia, Bélgica).

O substrato teste foi obtido a partir da mistura de substrato padrão com borras de café na proporção 1:1 (p/p), sendo assim constituído por 50 % de substrato padrão e 50 % de borras de café. A mistura do substrato teste (inoculação) foi realizado em condições de assepsia em câmara de fluxo laminar, após as borras de café serem esterilizadas em autoclave a 121 °C durante 120 min.

Cada saco produtor de cogumelos pesava 3.5 kg, tendo sido colocados em frutificação 4 sacos com substrato padrão e 4 sacos com substrato teste para cada espécie de cogumelo, num total de 16 sacos produtores.

Os sacos, após inoculação, foram a incubar numa sala com ausência de luz, temperatura entre os 22 e os 25 °C. Este período é fundamental para que o fungo cresça e o micélio cubra todo o substrato.

Após 4 a 5 semanas, apareceram os primórdios dos cogumelos que indicam que os sacos produtores devem ser abertos para que a frutificação seja plena. A abertura dos sacos para as espécies em estudo só é realizada na fase inicial de frutificação, uma vez que o CO₂ favorece o crescimento do micélio e o O₂ a formação dos primórdios e o desenvolvimento do cogumelo. Nas figuras 2.1 e 2.2 apresentam-se os fluxogramas gerais de produção de *P. salmoneo stramineus* e de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* respetivamente.

O rendimento teórico total de cada saco produtor é de 25 % do seu peso inicial, distribuído por 3 frutificações por ciclo de produção das espécies *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e de *P. salmoneo stramineus*. No fim do ciclo produtivo, os sacos foram eliminados.



Figura 2.1: Fluxograma de todas as etapas da produção de *P. salmoneo stramineus* I e II.



Figura 2.2: Fluxograma de todas as etapas da produção de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* I e II.

2.2 Desidratação

Após a frutificação, os cogumelos foram colhidos e de seguida procedeu-se à respetiva secagem no sentido de reduzir o elevado teor de água (cerca de 90 % (p/p)) para valores mínimos de modo a concentrar ao máximo o teor de sólidos totais e consequentemente reduzir a atividade de água. Este processo visa permitir a sua conservação e a posterior preparação de extratos. Os cogumelos foram colocados de forma dispersa sobre os tabuleiros forrados com papel de alumínio e com pequenos buracos para ajudar a uma maior ventilação equivalente em todo o tabuleiro (Figura 2.3).



Figura 2.3: Cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* dispersos num tabuleiro de desidratação.

Os cogumelos foram pesados antes e após secagem para determinar o teor de água perdido durante a desidrataação. Posteriormente à desidrataação, todos os cogumelos foram moídos para facilitar as suas futuras extrações recorrendo a um moinho de café (Tabela 2.1).

Tabela 2.1: Percentagem de humidade (%) removida nos cogumelos desidratados

Cogumelos	Peso húmido (kg)	Peso seco (kg)	Humidade (% p/p)
<i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i>	0.62	0.06	90.32
<i>P. salmoneo stramineus</i>	1.24	0.22	82.25

2.3 Composição dos cogumelos

O teor de humidade, matéria orgânica e cinzas foram determinados em triplicado de acordo com os métodos AOAC (Official Methods of Analysis of AOAC International). O teor de proteína foi determinada pelo método adaptado de Kjeldahl (US ISSO 5983-1) utilizando 4.38 como fator de conversão e o teor de gordura total foi determinada pelo procedimento de extração em Soxhlet. Por fim o teor de açúcares totais foi determinado indiretamente pela subtração do teor de proteína e de gordura ao conteúdo em matéria orgânica.

2.4 Preparação de Extratos

As suas espécies de cogumelos desidratados provenientes dos dois modos de produção (I e II) foram extraídas usando três tipos de extração: extração aquosa, extração aquosa assistida com a enzima Alcalase (Sigma-Aldrich, EUA) e extração com solvente orgânico (etanol a 70%) de acordo como planeamento listado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Tipos de extração realizadas às diferentes espécies de cogumelos vs. tipos de substrato (I e II) usados na produção

Espécie	Tipo de substrato	Extracção
<i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i>	Substrato – padrão (I)	Aquosa
		Enzimática (Água + Alcalase)
		Solvente orgânico: Etanol
	Substrato – teste (II)	Aquosa
		Enzimática (Água + Alcalase)
		Solvente orgânico: Etanol
<i>P. salmoneo</i> <i>stramineus</i>	Substrato – padrão (I)	Aquosa
		Enzimática (Água + Alcalase)
		Solvente orgânico: Etanol
	Substrato – teste (II)	Aquosa
		Enzimática (Água + Alcalase)
		Solvente orgânico: Etanol

2.4.1 Extração Aquosa

Para a preparação dos extratos aquosos, 1 g de cogumelo desidratado e moído foi colocado em 50 mL de água desionizada e colocada num banho termostatizado a 50 °C durante 24h. De seguida, centrifugou-se mistura a 5000 g durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi filtrado com um filtro de vidro (porosidade 1). O valor de pH dos extratos foi ajustado para 7,0 com HCl 1 M e/ou NaOH 1M. Por fim, foram congelados de imediato a -80 °C para posterior liofilização. Foram realizadas sete réplicas desta extração que após a liofilização, foram pesadas e armazenadas em exsiccadores à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

2.4.2 Extração Enzimática

A extração enzimática foi realizada com 1g de cogumelo desidratado em 50 mL de água desionizada e depois de se ajustar as condições ótimas da enzima específica (valor de pH = 8,0 e temperatura de 50 °C) foram adicionados 10 mg da enzima Alcalase (endopeptidase de *Bacillus licheniformis*, Sigma-Aldrich, EUA). A mistura foi colocada num banho termostatizado a 50 °C durante 24 h. A atividade enzimática foi interrompida pela ação do aquecimento da amostra entre 95 a 100 °C durante 10 min seguido de arrefecimento imediato em banho de gelo. De seguida, centrifugou-se a mistura a 5000 g durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi filtrado com um filtro de vidro (porosidade 1). O valor de pH dos extratos foi ajustado para 7,0 com HCl 1 M e/ou NaOH 1 M. Por fim, os extratos resultantes foram congelados de imediato a -80 °C para posterior liofilização. Foram realizadas sete réplicas desta extração que após a liofilização, foram pesadas e armazenadas em exsiccadores à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

2.4.3 Extração com solvente orgânico etanol

Esta extração foi realizada com 5 g de cogumelo desidratado e moído em 45 mL de etanol a 70 % (v/v). De seguida a mistura foi colocada num banho termostatizado a 25 °C com uma agitação de 150 rpm durante 14 h. Após este período a mistura foi centrifugada a 5000 g durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para um balão de fundo redondo para ser evaporado até à secura num rotavapor. Estas extrações foram realizadas em triplicado. Os extratos resultantes foram resuspendidos em 5 mL de água desionizada e congeladas de imediato a -80 °C para posterior liofilização. Os extratos, após liofilização, foram pesados e armazenados em exsiccadores à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

2.5 Determinação dos açúcares totais nos extratos

O teor de açúcares totais nos extratos foi determinado de acordo com o método modificado de (Dubois *et al.*, 1956) recorrendo a uma curva de calibração (Anexo 6.1) com glucose e concentrações de 0, 10, 25, 50, 75, 100 µg/mL. Para cada extrato, foram misturados 400 µL da amostra em triplicado (10 mg/mL), 400 µL de fenol (5 %) e 2 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado. Esta mistura foi agitada num vortex durante 1 min e incubada

durante 30 min a 30 °C. Posteriormente foram realizadas leituras espectrofotométricas num espectrofotómetro UV-Vis (UVmini-1240; Shimadzu, Japan a 490 nm. Todas as medições foram realizadas em triplicado para cada amostra.

2.6 Atividade antidiabética

A atividade antidiabética foi determinada pela inibição da enzima α -glucosidase em placas de 96 poços conforme o método descrito por Kwon *et al.*, (2008). A enzima utilizada neste método foi obtida a partir da levedura *Saccharomyces cerevisiae* adquirida à Sigma Chemical Co (St. Louis, EUA). Para tal, foram misturados 50 μ L de cada um dos diferentes extratos em triplicado, a uma concentração de 10 mg/mL, com 100 μ L de tampão fosfato a 0.1 M (pH 6.9) contendo solução da enzima α -glucosidase (1.0 U/mL) e pré-incubados a 25 °C durante 10 min. De seguida foi adicionado a cada poço da microplaca 50 μ L da solução p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (5 mM) em tampão fosfato a 0.1 M (pH 6.9). A mistura foi então incubada a 25 °C durante 5 min, a sua absorvância foi registada a 405 nm por um fluorómetro leitor de microplacas (FLUOstar optima, BMG Labtech, Offenburg, Germany) e comparada com o controlo que em vez do extrato levou 50 μ L da solução tampão na mistura. Para o controlo positivo foi utilizada a acarbose (Sigma, St. Louis, EUA) numa concentração equivalente ao do extrato (10 mg/mL). A atividade inibidora da α -glucosidase foi expressa em percentagem de inibição (%) (Equação 2.1):

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{controlo}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{controlo}}} \quad \text{Equação (2.1)}$$

2.7 Atividade anti-hipertensiva

A atividade inibitória da angiotensina determinou-se de acordo com o método descrito por Sentandreu & Toldrá (2006) com algumas modificações. Na realização do ensaio, misturaram-se 160 μ L do substrato, com 40 μ L de cada um dos extratos em triplicado nos quais se pretendia determinar a atividade inibitória da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA) e adicionou-se 2 mU da enzima ECA, dissolvida em glicerol a 50 % e preparada numa solução tampão Tris-HCl a 150 mM com 0,1 μ M de ZnCl₂ a pH 8,3 numa microplaca de poliestireno preta (Nunc, Dinamarca). A reação foi levada a cabo a 37 °C

durante 30 min. Mediu-se a fluorescência ao fim de 30 min num fluorímetro FluoSTAR OPTIMA (BMG Labtech, Offenburg, Alemanha), tendo sido o comprimento de onda de excitação 350 nm e o de emissão 420 nm. O software utilizado foi Fluostar Control versão 1.32 R2.

A atividade inibitória da ECA foi calculada como a quantidade de proteína solúvel necessária para inibir 50 % da enzima (IC_{50}) (μg de proteína/mL). Para ser realizado esse cálculo, foi feito um ajuste não linear dos dados com o software PRISM versão 4.02 para Windows (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, EUA). A atividade de cada amostra foi determinada em triplicado para calcular a atividade inibitória de cada extrato (Equação 2.2):

$$\% \text{ Atividade IACE} = \frac{(F_{\text{controlo}} - F_{\text{branco}}) - (F_{\text{amostra}} - F_{\text{branco da amostra}})}{F_{\text{controlo}} - F_{\text{branco}}} \times 100$$

Equação (2.2)

Em que:

F_{controlo} : Fluorescência emitida pelo grupo *o*-aminobenzoilglicina através da acção da ECA sobre o substrato fluorescente Abz-Gly-Phe(NO_2)-Pro sem inibidor.

F_{branco} : Fluorescência emitida pelo substrato fluorescente Abz-Gly-Phe(NO_2)-Pro.

F_{amostra} : Fluorescência emitida pelo grupo *o*-aminobenzoilglicina através da acção da ECA sobre o substrato fluorescente Abz-Gly-Phe(NO_2)-Pro na presença de inibidor.

$F_{\text{branco amostra}}$: Fluorescência emitida pelo substrato fluorescente Abz-Gly-Phe(NO_2)-Pro na presença de inibidor.

O branco recebeu o mesmo tratamento que as amostras, só que em vez de se adicionar a enzima, adicionou-se água destilada, e o controlo positivo foi também submetido ao mesmo tratamento colocando-se 40 μL de água destilada em vez da amostra.

2.8 Atividade prebiótica

2.8.1 Microrganismos

As estirpes utilizadas para avaliar a potencial atividade prebiótica dos diferentes extratos provenientes das duas espécies de cogumelos obtidos em modos de produção diferente (substrato-padrão e substrato-teste) foram *Lactobacillus acidophilus* Ki, *Lactobacillus casei* L26, *Bifidobacterium animalis* Bo e *Bifidobacterium lactis* BB12. A estirpe de *L. casei* L26 foi obtida da DSM (Moorebank, NSW, Australia), a estirpe de *B. lactis* BB12 foi obtida da Christian Hansen (Dinamarca) e as estirpes de *L. acidophilus* Ki e de *B. animalis* Bo foram previamente isoladas a partir de leite fermentado e obtidas a partir da CSK (Holanda) ultracongeladas. Estes microrganismos foram reativados e incubados em meio MRS (Man-Rogosa-Sharpe) (MRS, Biokar Diagnostics, França) durante a noite a 37 °C. Para o cultivo de *B. animalis* Bo e *B. lactis* BB12 foi adicionado ao meio MRS 0.5 g/L de L-cisteína-HCl (Fluka, Suíça), previamente esterilizado através de um filtro 0,22 µm, para reduzir o potencial redox. Após inoculação estes meios suplementados foram incubados numa jarra de anaerobiose contendo um sistema de geração de atmosfera anaeróbia (AnaeroGen, Inglaterra). A incubação de *Lactobacillus acidophilus* Ki e de *Lactobacillus casei* L26 foi efetuada sob condições de aerobiose.

2.8.2 Meio de cultura

O meio utilizado para a avaliação do potencial prebiótico dos diferentes extratos foi MRS preparado através da mistura de 10 g/L de peptona (Sigma-Aldrich, EUA), 10 g/L de extrato de carne (Merck, Alemanha), 5 g/L de extrato de levedura (Biokar, Diagnostics, França), 1.08 g/L de tween 80 (Merck), 2 g/L de fosfato de di-potássio (Merck), 5 g/L de acetato de sódio (Merck), 2 g/L de citrato de amónio (Sigma-Aldrich), 0.2 g/L de sulfato de magnésio (Merck), 0.04 g/L de sulfato de manganésio (Sigma-Aldrich) e 20 g/L da respetiva fonte de carbono. Baseada nesta composição do meio MRS foram preparados quatro tipos de meio de cultura: (i) MRS sem fonte de carbono (controlo negativo), (ii) MRS com 2 % (p/v) de glucose, (iii) MRS com 2 % (p/v) de Frutooligossacarídeo (FOS) (Orafti® P95; Orafti, Belgium) (controlos positivos) e (iv) MRS com 2 % (p/v) dos diferentes extratos. A concentração a 2 % da fonte carbono foi escolhida com base na

composição do meio MRS comercial que contém 2 % (p/v) de glicose. O FOS foi selecionado com controle positivo na medida em que é um prebiótico reconhecido e já comercializado.

2.8.3 Seleção dos diferentes extratos por avaliação do crescimento dos microrganismos em microplaca

Os diferentes meios de cultura MRS foram inoculados com 2% (v/v) de uma cultura *overnight* de *Lactobacillus acidophilus* Ki, de *Lactobacillus casei* L26, de *Bifidobacterium animalis* Bo ou de *Bifidobacterium lactis* BB12 (previamente inoculados e incubados em meio MRS com 2% (v/v) de glicose). No caso de *L. acidophilus* Ki e *L. casei* L26 foram transferidos 300 µL de cada meio de cultura inoculado, em triplicado, para uma microplaca de 96 poços (Nunc, Dinamarca), enquanto que para *B. animalis* Bo e *B. lactis* BB12 foram transferidos apenas 250 µL do meio inoculado, em triplicado, e 50 µL de parafina para garantir as condições anaeróbias necessárias. A microplaca foi incubada durante 24 h a 37 °C e programada para medir a absorvância (Abs) a 660 nm a cada hora (680 Microplate Reader, Bio-Rad, EUA) usando o programa Microplate Manager 5.2.1 (Bio-Rad). As diferentes curvas de crescimento que foram determinadas serviram para avaliar quais os extratos com maior potencial prebiótico e quais os microrganismos mais viáveis para mais tarde se realizar este estudo em macro escala. Adicionalmente procedeu-se à contagem do número de células viáveis ao fim de 24 h de incubação com o objetivo de se confirmar o potencial dos diferentes extratos. As contagens foram obtidas em placas de petri com MRS, com ou sem cisteína, incubadas a 37 °C sob anaerobiose ou aerobiose, para as estirpes de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, respetivamente.

2.8.4 Avaliação da atividade prebiótica através da determinação do número de células viáveis dos microrganismos em macro placa e da sua atividade metabólica

Com o objetivo de se avaliar e confirmar o potencial prebiótico dos extratos selecionados (Tabela 2.3) procedeu-se à obtenção das curvas de crescimento *B. animalis* Bo e *L. acidophilus* Ki, as duas estirpes selecionadas para esta segunda parte do estudo do potencial da atividade prebiótica dos extratos, através da contagem do número de células

viáveis em placas de Petri com MRS. Adicionalmente efetuou-se a avaliação da atividade metabólica através da medição do valor de pH e da determinação da produção dos ácidos orgânicos e consumo dos açúcares, através de análise cromatográfica por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) ao longo do tempo.

Para as curvas de crescimento, procedeu-se à inoculação de *B. animalis* Bo e de *L. acidophilus* Ki (2% (v/v)) em MRS sem fonte de carbono (controlo negativo), com fonte de carbono: 2% (p/v) de glucose e 2% (p/v) de FOS; e por último com 2% (p/v) dos diferentes tipos de extratos, em duplicado, a 37 °C sob agitação ao longo de 48 horas com os seguintes pontos de amostragem: 0, 4, 6, 8, 10, 12, 24 e 48 horas.

Tabela 2.3: Extratos selecionados para avaliação do seu potencial prebiótico através do crescimento de microrganismos em macroplaca

Cogumelo	Produção	Extração	Microrganismo
<i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i>	Substrato-Padrão (I)	Etanólica	<i>B. animalis</i> Bo <i>L. acidophilus</i> Ki
		Aquosa	<i>B. animalis</i> Bo
	Substrato-Teste (II)	Etanólica	<i>B. animalis</i> Bo <i>L. acidophilus</i> Ki
		Aquosa	<i>B. animalis</i> Bo
<i>P. salmoneo</i> <i>stramineus</i>	Substrato-Padrão (I)	Etanólica	<i>B. animalis</i> Bo <i>L. acidophilus</i> Ki
		Aquosa	<i>B. animalis</i> Bo
	Substrato-Teste (II)	Etanólica	<i>B. animalis</i> Bo <i>L. acidophilus</i> Ki
		Aquosa	<i>B. animalis</i> Bo

2.8.5 Análise de ácidos orgânicos e açúcares por HPLC

A análise de ácidos orgânicos e açúcares por HPLC foi efetuada segundo o método descrito por Zeppa *et al.*, (2001) com algumas modificações. De cada meio foram recolhidas alíquotas de 500 µL às 0, 6, 12, 24 e 48 horas de incubação, estas foram centrifugadas a 18.000 rpm durante 10 min a 4 °C (Universal 32R; Hettich, Alemanha), e subsequentemente foram retirados 400 µL do sobrenadante e diluídos em 400 µL de ácido sulfúrico 13 mM (97%, Merck) e homogeneizados num Ultra-Turrax (T18 Basic; IKA Works, Inc, EUA).

As análises foram efetuadas num HPLC constituído por uma bomba LaChrom L-7100 (Merck-Hitachi, Alemanha), uma coluna de permuta iónica Aminex HPX-87H,(300 × 7.8 mm) (Bio-Rad), que foi mantida a 55 °C (L-7350 Column Oven; LaChrom, Merck-Hitachi), um detetor de índice de refração (L-7490 RI Detector; LaChrom, Merck-Hitachi) para detetar os açúcares e um detetor de ultravioletas (L-7400 UV Detector; LaChrom, Merck-Hitachi) para detetar ácidos orgânicos a um comprimento de onda de 200 nm. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico 13 mM com um fluxo de 0.4 mL/min. O tempo de corrida foi de 30 min com um volume de injeção de 50 µL. Os dados foram recolhidos por uma D-700 Interface (LaChrom, Merck-Hitachi) e analisados pelo programa HPLC System Manager 3.1.1 (Merck-Hitachi). Para cada condição foram testadas e analisadas duas amostras, e cada amostra foi injetada em duplicado.

2.1 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos diferentes extratos provenientes dos cogumelos obtidos em modos de produção diferentes foi determinada através dos seguintes métodos: ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity* - Capacidade de absorção de radicais de oxigénio), FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power* - Poder redutor férrico) e TPC (*Total Phenolic Content* – Teor em fenólicos totais).

2.1.1 ABTS^{•+}

Foi determinada a capacidade antioxidante através de medidas espectrofotométricas utilizando o método do radical catião ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) de Re *et al.*, (1999) com algumas alterações. A solução stock de ABTS foi preparada através da mistura de uma solução de 7mM de ABTS (0,0384 g de reagente ABTS a 10 mL de água ultrapura num gobelé protegido com papel de alumínio) e uma solução de 2,45 mM de persulfato de potássio (adicionar 0,0066 g de K₂O₈S₂ a 10 mL de água ultrapura num gobelé protegido com papel de alumínio). Esta solução ficou em repouso no escuro durante a noite à temperatura ambiente. Posteriormente foram filtrados 5 mL desta solução-stock para 100 mL de água ultrapura e de seguida foi ajustada a sua absorvância a 734 nm para 0,700 ± 0,020. Para cada extrato, foi misturado 1 mL da

solução ABTS^{•+} com 20 µL de extrato e transferidos para uma microplaca de 96 poços (em triplicado). O tampão fosfato (PBS) 0,075 M a pH 7,4 foi utilizado como branco neste método. A curva de calibração (Anexo 6.2) foi determinada usando concentrações de 5,5; 13,75; 27,5; 55; 82,5 e 110 µg/mL Equivalente Ácido Ascórbico (EAA) /g de extrato liofilizado pesado.

2.1.2 ORAC

O método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) (Dávalos *et al.*, 2004) foi utilizado com algumas alterações, onde a fluoresceína foi utilizada como sonda fluorescente e a reação foi realizada num tampão fosfato (pH 7,4).

Preparou-se a microplaca preta com 25 µL das amostras/padrões e adicionou-se 150 µL de fluoresceína a todos os poços e deixou-se a incubar durante 30 min. Após este período de incubação adicionou-se 25 µL de Cloreto de 2,2'-Azobisisobutiramidínio (AAPH) (40,0 g/L) a todos os poços na ausência de luz, uma vez que esta é degradada pela presença de luz, e a placa ficou a incubar tendo sido realizadas medições subsequentes de 5 em 5 min. Estas medições foram feitas num leitor de microplacas (Synergy HT W/TRF Multi Mode Microplate Reader; BioTek Instruments, EUA) a 37 ° C. A fluorescência de cada poço foi medida durante 100 min e com uma definição de sensibilidade de 60, um filtro de excitação a 485 nm e o filtro de emissão a 528 nm. Os valores ORAC foram calculados usando o programa Gen5 2.0 (BioTek Instruments). Todas as amostras foram avaliadas em triplicado e comparadas com a curva de calibração (Anexo 6.3) para a qual foram utilizadas concentrações de 12,5; 25; 50; 75 e 100 µM/L Equivalente Trolox (ET) / g de extrato liofilizado pesado.

2.1.3 FRAP

Este método de acordo com Smolskaitė *et al.*, (2015) com algumas modificações é baseado na redução do Fe³⁺ para a sua forma de Fe²⁺ (que apresenta cor azul). Os resultados foram expressos em µM EAA / g de cogumelo desidratado. O reagente FRAP foi preparado com tampão acetato (3.6 pH), 10 mM de solução de 2,4,6-Tripiridil-s-Triazina TPTZ em 40 mM HCl e 20 mM de Ferro (III) e solução de cloreto nas proporções de 10:1:1 (v/v) respetivamente. Este reagente foi preparado diariamente e aquecido a 37 °C num banho

antes da sua utilização. De seguida foram adicionados 20 µL das amostras (em forma de extrato) a 180 µL do reagente FRAP, no caso da amostra branco foram adicionados 20 µL de água desionizada na vez do extrato. Após 4 minutos de reação as absorvâncias das amostras foram lidas a 593 nm. Todas as amostras foram avaliadas em triplicado e comparadas com a curva de calibração (Anexo 6.4) para a qual foram utilizadas concentrações de 5, 10, 20, 50, 75 e 100 µM/L EAA / g de extrato liofilizado pesado.

2.1.4 TPC

O teor de compostos fenólicos totais foi medido com o reagente Folin-Ciocalteu de acordo com o descrito por *Smolskaitė et al.*, (2015). Para tal, foram misturados 25 µL da amostra com 25 µL do reagente Folin-Ciocalteu (diluído 10 x) e com 100 µL de Na₂CO₃ (7.5 %) e 75 µL de água destilada em microplaca. De seguida, a microplaca foi inserida no leitor e incubada durante 90 min. à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após este período de tempo, foram realizadas leituras de absorvância a 765 nm. Todas as leituras foram realizadas em triplicado para cada amostra. A curva de calibração (Anexo 6.5) foi determinada usando concentrações de 5,5; 13,75; 27,5; 55; 82,5 e 110 µg/mL EAA / g de extrato liofilizado pesado.

2.2 Análise Estatística

Os resultados das várias análises em cada ponto de amostragem são apresentados sob a forma de média e respetivo desvio padrão de réplicas verdadeiras.

Foi realizada a análise de variância com um fator (*one-way* ANOVA), com efeitos fixos, em associação com o teste Tukey com um intervalo de confiança a 95% entre as diferenças em grupos de amostras para os diferentes tipos de extração.

Todos os testes foram realizados com um nível de significância de 5%, e utilizando o software SPSS (v 23,0, da SPSS, Chicago, IL, E.U.A.).

3. Resultados e Discussão

3.1 Substratos

A suplementação do substrato padrão de cogumelos com borras de café teve como objetivo avaliar o seu potencial como matéria-prima para substratos produtores de cogumelos, uma vez que é um resíduo com impacto ambiental devido ao consumo elevado de café a nível mundial (Fan *et al.*, 2002). Por outro lado, aferir sobre a influência das borras de café nas propriedades biológicas dos cogumelos e extrato de cogumelos.

Nas figuras 3.1 e 3.2 apresenta-se o aspeto dos sacos de substrato (I e II respetivamente) que foram usados na produção dos cogumelos das espécies de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e de *P. salmoneo stramineus*.



Figura 3.1: Sacos com substrato padrão para a produção de cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* I e *P. salmoneo stramineus* I.



Figura 3.2: Sacos com substrato alternativo, designado por substrato teste, para a produção de cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* II e *P. salmoneo stramineus* II.

Um dos aspetos fundamentais na produção de cogumelos está relacionada com o tipo de embalagem a utilizar (recipiente de produção), uma vez que a mesma deve permitir trocas

gasosas de dióxido de carbono e oxigênio garantindo uma taxa de respiração adequada ao fungo, evitar a entrada de contaminantes e manter os níveis de humidade no substrato. As embalagens devem ser resistentes ao calor, ao frio e a choques mecânicos, para que possam ser manuseados sem risco de rasgar durante o processo de esterilização. A composição dos sacos, por norma, é de polipropileno e devem ser transparentes de modo a possibilitar a visualização do crescimento do micélio no substrato e identificar qualquer contaminação ou degradação do substrato.

3.2 Produção e composição

Na figura 3.3 apresentam-se as fotografias da produção dos cogumelos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus* obtidos nos dois tipos substratos: padrão (I) e teste (II).

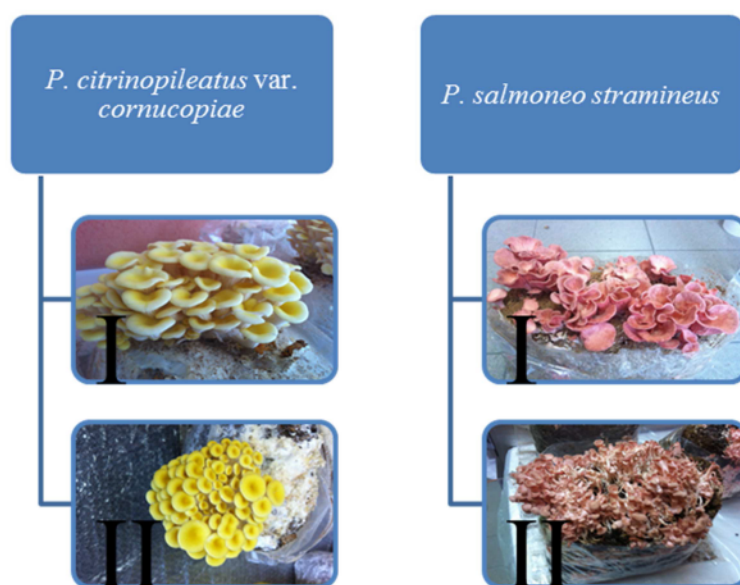


Figura 3.3: Fotografias de cogumelos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus* produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II).

O aspeto morfológico dos cogumelos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* produzidos nos dois substratos não diferiu muito, ao contrário do que se observou nos cogumelos de *P. salmoneo stramineus*. Pelo que se pode constatar que a presença de borras de café no substrato II parece ter influenciado o processo de frutificação dando origem a cogumelos com características morfológicas alteradas influenciado a produção típica de *P. salmoneo stramineus*.

A partir das pesagens dos cogumelos obtidos em cada frutificação foi possível construir a tabela 3.1. Pode-se verificar que o rendimento da produção de cogumelos na espécie *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* não apresentou diferenças consideráveis, sendo até ligeiramente superior ao rendimento teórico (25% do peso total do substrato – 875 g de cogumelos) (Mycelia, 2015). No entanto, para os cogumelos da espécie *P. salmoneo stramineus* verificou-se uma redução de 86% do rendimento teórico esperado, indicando mais uma vez que as borras de café influenciaram o desenvolvimento e crescimento do cogumelo desta espécie.

Tabela 3.1: Rendimento (%) e peso (g) da produção dos cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e em *P. salmoneo stramineus* produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II)

Cogumelos	Produção	Peso (g)	Rendimento (%)
<i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i>	Controlo	880	100,0
	Teste	877	99,7
<i>P. salmoneo stramineus</i>	Controlo	874	99,3
	Teste	128	14,3

Para verificação da presença de cafeína foram efetuadas análises aos substratos e aos cogumelos produzidos, apresentando-se os resultados obtidos na tabela 3.2. Estas análises foram efetuadas por uma empresa contratada para o efeito, as amostras foram enviadas apenas com códigos e sem conhecimento das designações e respetiva correspondência.

Tabela 3.2: Presença de cafeína (%) nos substratos (I e II) e respetivos cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus*

Cogumelos	Produção	Cafeína - Substrato (%)	Cafeína - Cogumelo (%)
<i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i>	Controlo	<0,005	<0,005
	Teste	0,11	0,08
<i>P. salmoneo stramineus</i>	Controlo	<0,005	<0,005
	Teste	0,07	0,06

Dos resultados obtidos, verifica-se que de facto o substrato padrão não continha cafeína assim como os cogumelos colhidos desses substratos. Do mesmo modo, verifica-se que os substratos teste continham cafeína assim como os cogumelos produzidos a partir dos

mesmos. Sendo a diferença de teor de cafeína entre os substratos e os cogumelos mínima, embora ligeiramente maior na espécie de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae*. De referir que as análises ao teor de cafeína foram efetuadas aos substratos esterilizados. No entanto, da análise dos resultados pode-se afirmar que a espécie *P. salmoneo stramineus* poderá ser mais sensível a substratos com borras de café, uma vez que apresentaram morfologia diferente e baixo rendimento produtivo. Em 2005, foi realizado um estudo por Salmones *et al.* com o objetivo de comparar o cultivo de diferentes espécies de *Pleurotus* sp. em substratos em palhas de trigo e substratos com polpa de café. As espécies estudadas foram *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* e *Pleurotus djamor*. Os resultados obtidos sugerem que nas espécies de *Pleurotus* sp. a capacidade das espécies crescerem em novos substratos está relacionado com a atividade metabólica durante o desenvolvimento inicial do micélio e da capacidade da espécie em utilizar os nutrientes disponíveis no substrato, alguns dos quais são indispensáveis para a morfogénese dos carpóforos (cogumelos). Este estudo demonstrou também que as espécies cultivadas em substratos de palha de trigo apresentam maior atividade biológica do que as cultivadas em substratos com polpa de café, os resultados obtidos sugerem que a complexa composição química da polpa de café impede uma conversão eficiente pelo micélio. Neste estudo, foi também verificado que o teor de cafeína nos substratos de polpa de café decresceu durante o ciclo de produção, principalmente na fase de frutificação durante o desenvolvimento dos cogumelos, atingindo reduções superiores a 50%. Esta redução foi porque a cafeína degradou-se durante o processo, mas porque passa para o cogumelo devido ao tipo de alimentação dos fungos – absorção, uma vez que os cogumelos analisados apresentavam teores de cafeína entre 0,17 e 0,22 %. Estes resultados estão de acordo com outros estudos realizados em espécies de *Pleurotus* (0,20 e 0,25 %) (Fan *et al.*, 2003). Na tabela 3.2 verifica-se que as % de cafeína nos cogumelos produzidos em borras de café são próximos das % de cafeína dos substratos, o que em certa medida revela a passagem da cafeína do substrato para o cogumelo (Fan *et al.*, 2003; Salmones *et al.*, 2005). Estes trabalhos demonstraram que as espécies de *Pleurotus* não têm capacidade de degradar a cafeína mas de a acumular. A diferença do teor de cafeína que se encontra entre os trabalhos de Fan *et al.* (2003) e Salmones *et al.* (2005) e os obtidos (0,08 e 0,06 %) pode estar relacionada com dois fatores, a composição do substrato teste, uma vez que apenas apresenta 50% de borras de café, e o tempo de esterilização ser diferente. Nos trabalhos referidos, os substratos eram

compostos apenas por polpa de café, no entanto, Fan *et al.*, (2003) pasteurizaram os substratos a 70°C durante 15 minutos, enquanto que Salmones *et al.*, (2005) esterilizaram os substratos a 121°C durante 60 minutos. Ou seja, o tipo de tratamento para eliminação de microrganismos contaminantes nos substratos para produção de cogumelos parece ter influência no teor de cafeína, uma vez que as condições de esterilização deste trabalho foram de 121 °C durante 120 minutos: 0,20 – 0,25; 0,17 – 0,22 e 0,08 – 0,06 %, respetivamente. Por isso, torna-se necessário investigar se a capacidade de acumular a cafeína nos cogumelos é transversal ou se existe grupos mais restritos, quais as implicações na qualidade nutricional dos cogumelos e possíveis efeitos no consumidor.

As borras de café são de facto uma matéria-prima com custos muito baixos e com impacto ambiental, no entanto, é necessário avaliar os efeitos da pasteurização ou da esterilização dos substratos no teor de cafeína e redimensionar o delineamento experimental deste trabalho para que se possa avaliar a evolução da cafeína em todo o ciclo de produção. Outros estudos demonstraram a capacidade bio-acumuladora de diversos nutrientes em diferentes cogumelos saprófitas e silvestres, constituindo um importante papel na teoria de que os cogumelos poderão ser suplementos alimentares em populações com dieta alimentar à base de cereais, mas poderá ser problemático se na composição dos substratos existirem nutrientes nocivos ou com efeitos menos positivos para os humanos (Kalač, 2009; Mallikarjuna *et al.*, 2013).

O estudo de Salmones *et al.*, (2005) revelou ainda que a espécie *Pleurotus djamor* em substratos com polpa de café apresentou baixos rendimentos quando comparado com as outras espécies de *Pleurotus* em estudo. Deste modo, os resultados obtidos no presente trabalho são semelhantes, embora no estudo de Salmones *et al.*, (2005) não haja uma referência direta à morfologia do cogumelo, mas referem que o número de colheitas e o peso dos cogumelos foi metade do obtido em palhas de trigo.

Na bibliografia consultada não existe informações sobre a produção da espécie *Pleurotus citrinopileatus* var. *cornucopiae* em borras de café ou em polpa de café. No entanto, poderá existir algum paralelismo com os resultados obtidos por Fan *et al.*, (2003) e Salmones *et al.*, (2005) com o *Pleurotus ostreatus*, dado que a produção e o comportamento fisiológico são semelhantes nestas duas espécies. Da mesma forma, em trabalhos futuros deverá ser estudada a evolução do teor de cafeína e de outros nutrientes nos ciclos de produção dos cogumelos, inclusive proceder-se à análise e comparação de

substratos com borras de café que são comercializados das espécies *Pleurotus ostreatus*, *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *Pleurotus djamor*.

A composição em matéria orgânica (% p/p), proteína (% p/p), gordura (% p/p) e açúcares (% p/p) determinada em *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus* produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II) podem ser observados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Composição em matéria orgânica (%), proteína (%), gordura (%) e açúcares (%) determinada em *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e em *P. salmoneo stramineus* produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II)

Cogumelos	Produção	Matéria Orgânica (%)	Proteína (%)	Gordura (%)	Açúcares (%)
<i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i>	Controlo	93,4 ± 0,1	23,5 ± 1,1	2,0 ± 0,0	67,9 ± 1,0
	Teste	92,5 ± 0,2	24,1 ± 2,6	2,5 ± 0,3	65,9 ± 2,8
<i>P. salmoneo stramineus</i>	Controlo	90,5 ± 0,1	32,8 ± 0,4	2,1 ± 0,6	55,6 ± 0,1
	Teste	91,5 ± 0,0	27,4 ± 0,5	2,1 ± 0,4	62,1 ± 0,9

Embora a composição dos cogumelos das duas espécies não difiram muito entre si, observou-se algumas diferenças que devem ser destacadas. Os cogumelos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* possuem maior teor de açúcares, menor teor proteico e um teor de gordura variável em comparação com os cogumelos *P. salmoneo stramineus*. O tipo de substrato teve à partida efeito variável na composição dos cogumelos das duas espécies de acordo com os resultados obtidos. Nos cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* resultou numa pequena redução de teor de açúcares e num aumento do teor de proteína e de gordura. Nos cogumelos *P. salmoneo stramineus*, observou-se um efeito oposto no que respeita ao teor de açúcares e de proteína, não se observando alteração do teor de gordura. Deste modo, verifica-se um efeito variável na composição do cogumelo de acordo com o tipo de substrato. No entanto, para se confirmar este efeito será necessário no futuro proceder a mais bateladas de produção com a respetiva determinação da sua composição.

No trabalho realizado por Khan *et al.*, (2013), foram estudados 6 tipos de substrato para a produção de cogumelos da espécie *Pleurotus (flabellatus) djamor* tendo revelado que os diversos parâmetros em estudo, proteína, gordura, cinzas, fibras, matéria seca e humidade, diferiam conforme o tipo de substrato tendo sido obtido um valor máximo de proteína de

21,89 % em cogumelos produzidos em substratos de algodão, valor inferior ao obtido neste estudo (32,8%). Os valores de teor proteico aproximam-se mais do trabalho realizado por Rodrigues *et al.*, (2015) em que o teor proteico é de 26,6 % em *P. salmoneo stramineus* e 23,8% para *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae*. A diferença no teor proteico é resultado direto do tipo de substrato (Khan *et al.*, 2013) mas também poderá ser influenciada pela estirpe do fungo (Rodrigues *et al.*, 2015). No que diz respeito, aos açúcares nos cogumelos, no trabalho realizado por Rodrigues *et al.* (2015), os valores obtidos são superiores (55,6 - 67,9 %) aos obtidos por Rodrigues *et al.* (2015) para os cogumelos de *P. salmoneo stramineus* e *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* indicando que as borras de café como matéria-prima influenciam o teor de açúcares nos cogumelos produzidos. O teor de gordura embora seja mais baixo nos resultados obtidos neste trabalho (2,0 - 2,5 %) são muito semelhantes aos obtidos por Rodrigues *et al.*, (2015) (2,3 - 3,5 %). No entanto, em comparação com o trabalho efetuado por Khan *et al.*, (2013) (0,80 %), o teor de gordura é muito superior, tal facto pode dever-se à estirpe, aos tipos de substrato usados e ao método de extração. Em ambas as espécies *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus*, o teor de matéria orgânica obtidos (90,5 - 93,4 %) é superior aos obtidos por Rodrigues *et al.*, (2015) (81,63 - 82,03 %). Não tendo sido encontrado na bibliografia consultada outras referências, as diferenças existentes poderão ser devidas às condições de cultivo, quantidade e qualidade da luz, trocas gasosas, humidade relativa do ar e temperatura (Ferrador, 2015).

3.3 Extração

Após a produção e secagem dos respetivos cogumelos, procedeu-se aos diferentes tipos de extração. Na figura 3.4 encontram-se os valores de rendimento (p/p) obtido em cada tipo de extração para os diferentes cogumelos produzidos nos dois tipos de substratos (I e II).

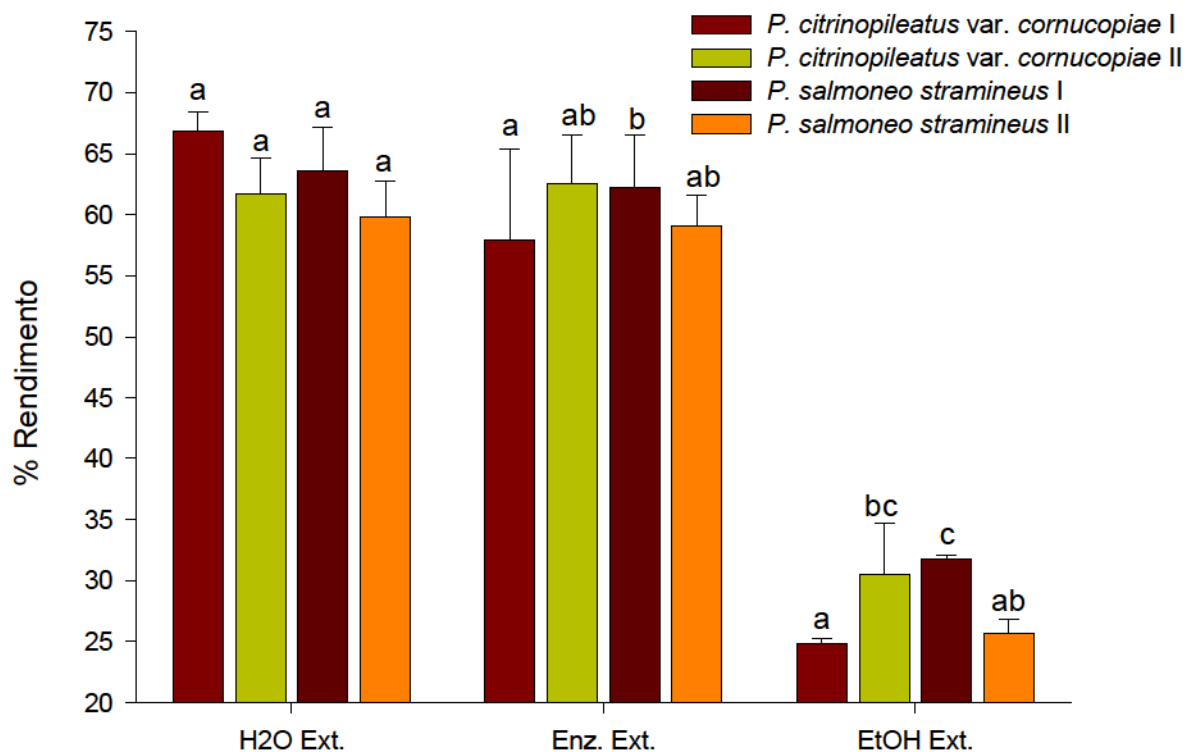


Figura 3.4: Rendimentos (% p/p) da extração aquosa, enzimática com Alcalase e etanólica de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus* produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II); Para cada tipo extração, valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).

De acordo com os valores de rendimento obtidos verifica-se que as extrações aquosas e enzimáticas foram as mais eficientes com valores de rendimento entre 57 e 66% não diferindo de forma significativa ($p > 0,05$) entre os extratos aquosos obtidos de diferentes cogumelos e diferentes substratos. A extração etanólica mostrou-se a menos eficiente, tendo-se obtido valores de rendimento entre 24 e 31 %. Neste tipo de extração observou-se que o rendimento foi significativamente ($p < 0,05$) mais elevado nos extratos de cogumelos *P. salmoneo stramineus* produzidos em substrato padrão (I), ao contrário do observado com cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae*. Nestes últimos, o rendimento mais elevado foi registado nos extratos de cogumelos produzidos no substrato teste com borras de café (II). Na extração enzimática e etanólica verificaram-se diferenças significativas de rendimento ($p < 0,05$) entre os diferentes tipos de cogumelos e tipos de substratos.

Os rendimentos das extrações aquosas (60 - 67 %) e etanólicas (25 - 32 %) dos cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* foram mais elevadas do que as publicadas por Lee *et al.*, (2007) em que o rendimento para extratos aquosos obtidos com água fria foi 52 %,

para água quente foi 41 % e para extratos etanólicos foi 20 %, nos cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* produzidos em substrato padrão.

O teor de açúcares total em cada extrato foi avaliado e os respectivos valores encontram-se na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Médias e desvio-padrão dos açúcares totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de extrato) determinados nos diferentes tipos de extratos em *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus* produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II)

Cogumelo	Substrato	Açúcares Totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto)		
		Aquosa	Enzimática	Etanólica
<i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i>	Controlo (I)	117 \pm 5 ^a	89 \pm 3 ^a	299 \pm 2 ^a
	Teste (II)	109 \pm 3 ^a	75 \pm 4 ^b	365 \pm 9 ^b
<i>P. salmoneo</i> <i>stramineus</i>	Controlo (I)	79 \pm 1 ^b	57 \pm 2 ^c	233 \pm 12 ^c
	Teste (II)	87 \pm 5 ^b	51 \pm 3 ^c	191 \pm 9 ^d

Nota: Para cada tipo de extração, valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$)

Como se pode verificar, o teor de açúcares totais é mais elevado nos extratos etanólicos, diminuindo nos extratos aquosos e nos enzimáticos, respetivamente. Os valores mais elevados nos extratos obtidos pela extração etanólica eram expectáveis uma vez que este tipo de extração é um passo comum aos procedimentos de extração e purificação de polissacarídeos (Vaz *et al.*, 2011; Barros *et al.*, 2007). A precipitação com etanol, de grandes moléculas com carga negativa a partir de solução aquosa é um procedimento bioquímico comum para polissacarídeos. O teor de açúcares nos extratos aquosos foi mais elevado nos cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* do que em *P. salmoneo stramineus* verificando-se diferenças significativas ($p < 0,05$), não se verificando no entanto diferenças significativas para os dois tipos de substratos (I e II) ($p > 0,05$). Na extração enzimática, o teor de açúcares foi mais elevado em cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* do que em *P. salmoneo stramineus* verificando-se diferenças significativas ($p < 0,05$), entre substratos apenas nos cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae*.

No geral, valores mais elevados e estatisticamente significativos foram obtidos nos extratos dos cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* do que nos extratos de *P. salmoneo stramineus*.

O tipo de substrato revelou novamente um efeito com repercussões variáveis. No geral, os extratos de cogumelos produzidos com substrato teste possuem menor teor de açúcares (Tabela 3.4) exceto nos extratos etanólicos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e nos

extratos aquosos de *P. salmoneo stramineus*. Nos extratos etanólicos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* II registou-se o valor de açúcares total mais elevado (365 ± 9) o que pode indicar que as borras de café tenham tido uma influência positiva no teor de polissacarídeos dos extratos mas que não se repercutiu no teor de açúcar nos cogumelos (Tabela 3.3).

Tendo em conta os resultados de rendimento de extração, poder-se-á afirmar que a extração etanólica não é a mais vantajosa, mas se o objetivo passar por se obter extratos mais ricos em polissacarídeos sem dúvida que as extrações aquosas e enzimáticas são as menos favoráveis.

3.4 Atividade antidiabética

Com o objetivo de se avaliar o potencial inibidor da enzima α -glucosidase dos diferentes tipos de extratos procedeu-se à sua comparação com um controlo positivo (acarbose, utilizado como fármaco para reduzir os níveis de glucose). No geral, a atividade inibidora de α -glucosidase foi menor em todos os extratos (Figura 3.5) em comparação com o da acarbose que foi de aproximadamente de 89 %.

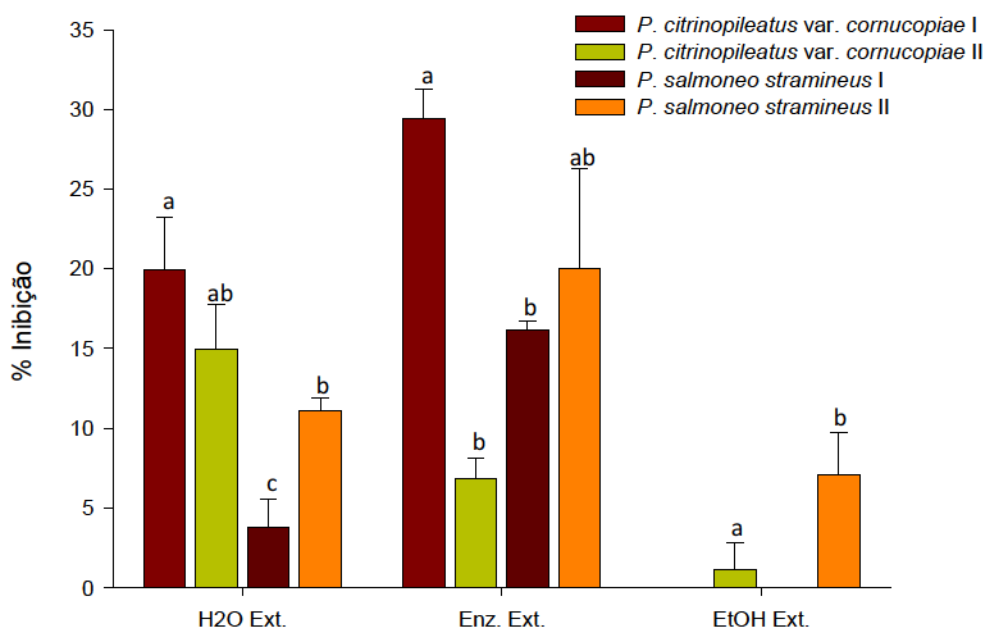


Figura 3.5: Inibição (%) da α -glucosidase determinada em *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus* produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II); Para cada tipo extração, valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos, a atividade antidiabética foi muito variável entre os diferentes extratos, espécie de cogumelo e tipo de substrato usado na sua produção. Os extratos que demonstraram menor potencial foram os extratos etanólicos evidenciando que um teor elevado de polissacarídeos não será o fator principal na atividade inibidora da enzima α -glucosidase.

Poder-se-á dizer de uma forma geral que os extratos enzimáticos, e em particular o extrato enzimático dos cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae*, produzidos no substrato padrão (I), demonstraram ser os que possuíam maior potencial antidiabético. Em termos de espécie de cogumelo, valores mais elevados foram obtidos com *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* nomeadamente nos extratos aquosos e no enzimático obtido de cogumelos produzido com substrato padrão (I). No que respeita ao tipo de substrato usado na produção, verificou-se no geral que os extratos de cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* produzidos em substrato padrão apresentaram valores mais elevados. O oposto foi observado para os extratos *P. salmoneo stramineus* com o substrato teste (II).

Tendo em conta a variabilidade observada é difícil estabelecer um critério sobre qual a melhor combinação de fatores, no entanto o valor mais elevado e estatisticamente significativo foi o obtido no extrato enzimático de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* produzidos em substrato padrão (I) em comparação com os restantes.

Pode-se afirmar que os diferentes extratos resultantes das diferentes espécies de cogumelos (*P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. stramineus salmoneo*) produzidos em substratos diferentes (I e II) possuem um potencial antidiabético relativamente reduzido em comparação à acarbose. Estes resultados contrariam resultados publicados por Khan & Tania, 2012 em ensaios *in vivo*. De acordo com estes autores os extratos aquosos de cogumelos *Pleurotus* sp. demonstraram-se promissores nesta atividade uma vez que a sua administração em ratos promoveu a redução de níveis de glucose no sangue (16 - 23 %).

No entanto face ao potencial antidiabético observado nos extratos estudados, mais estudos deverão ser efetuados com as espécies estudadas e não só, envolvendo outros tipos de ensaio para se determinar que espécies de *Pleurotus* sp. possuem maior potencial antidiabético, otimizando a sua extração e analisando quais os compostos que são responsáveis por esta mesma atividade.

3.5 Atividade anti-hipertensiva

Os resultados obtidos para a determinação da IC₅₀ - concentração de proteína (extrato peptídico), em µg/mL, que inibe 50 % da atividade da ECA obtida nos diferentes extratos encontram-se descritos na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Valores de IC₅₀ (µg/mL) determinados em *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus* e nos seus diferentes extratos e modos de produção (I e II)

Espécie	Substrato de produção	Extração	IC ₅₀ (µg/mL)	Atividade
<i>P. citrinopileatus</i> var. <i>cornucopiae</i>	Padrão (I)	Aquosa	123,3	Boa
		Enzimática	178,1	Intermédia
		Etanólica	-	-
	Teste (II)	Aquosa	276,0	Intermédia
		Enzimática	243,2	Intermédia
		Etanólica	-	-
<i>P. salmoneo</i> <i>stramineus</i>	Padrão (I)	Aquosa	-	-
		Enzimática	-	-
		Etanólica	-	-
	Teste (II)	Aquosa	-	-
		Enzimática	-	-
		Etanólica	-	-
* -: Não foi detetada atividade				

Os péptidos anti-hipertensivos identificados ou aplicados em alimentos, demonstram que valores de IC₅₀ menor do que 50 são indicadores de excelente atividade anti-hipertensiva, valores entre 50 e 150 são por sua vez indicadores de uma atividade considerada boa enquanto valores entre 150 e 400 são indicadores de uma atividade intermédia e superiores a 400 de uma baixa atividade.

Da análise dos resultados obtidos na Tabela 3.5, podemos verificar que somente os extratos aquosos e enzimáticos obtidos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* possuem potencial anti-hipertensivo. Esta observação demonstra que a atividade da enzima Alcalase durante a extração não se repercutiu à partida num maior teor de péptidos anti-hipertensivos em cogumelos *P. salmoneo stramineus*, apesar do seu teor mais elevado de proteína (Tabela 3.3).

Nos extratos com atividade anti-hipertensiva, esta oscilou entre uma boa atividade (50 < IC₅₀ < 150) para o extrato aquoso de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* produzidos em substrato padrão e uma atividade intermédia (150 < IC₅₀ < 400) para os restantes extratos. Os

extratos de cogumelos produzidos com substrato padrão apresentaram um maior potencial anti-hipertensivo do que os produzidos pelo substrato teste com borras de café.

De acordo com a literatura (Khan & Tania, 2012), estes resultados vão de acordo com os publicados para cogumelos *Pleurotus* sp. uma vez que a administração de 6 % de extrato aquoso de cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e de *P. nebrodensis* resultou numa redução da pressão sanguínea em ratos. Tendo em consideração os resultados obtidos, poder-se-á afirmar que os extratos aquosos ou enzimáticos (Alcalase) de cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* produzidos em substrato padrão são os que evidenciam maior potencial anti-hipertensivo provavelmente pela presença de possíveis péptidos nos extratos, cuja concentração não parece ter sido afetada pela ação da enzima Alcalase durante o processo de extração .

O fator que leva a que os cogumelos sejam considerados como anti hipertensores está relacionado com a composição dos minerais, baixa concentração em sódio e elevada concentração de potássio (Guillamón *et al.*, 2010). De facto o *Pleurotus djamor* (*P. salmoneo stramineus*) deveria apresentar atividade anti-hipertensiva uma vez que apresenta uma concentração elevada de potássio (3634 mg/100 g) e baixa concentração em sódio (61,6 mg/100 g) (Mallikarjuna *et al.*, 2013). Os resultados obtidos podem estar relacionados com possíveis efeitos da composição química das borras de café nos nutrientes habitualmente presentes, como acontece com a polpa de café (Salmones *et al.*, 2005).

3.6 Atividade prebiótica

3.6.1 Seleção dos extratos com maior potencial prebiótico

A seleção dos extratos com maior potencial prebiótico foi realizada recorrendo à análise de curvas de crescimento de quatro estirpes probióticas (*L. casei* L26, *L. acidophilus* Ki, *B. animalis* Bo e *B. lactis* Bb12) realizadas em microplaca com meios suplementados com os diferentes extratos em estudo (Figuras 3.6 - 3.9). Da análise das curvas de crescimento de *L. casei* L26, *L. acidophilus* Ki e *B. animalis* Bo (Figuras 3.6a-c - 3.8a-c, respetivamente) observou-se que os extratos etanólicos das duas espécies de cogumelos produzidas nos dois tipos de substratos revelaram um maior potencial prebiótico. A presença destes extratos etanólicos no meio MRS, enquanto fonte de carbono, originou valores mais elevados de

absorvância e mais próximos dos meios de cultura controles positivos (MRS com glucose e FOS) ao longo de 24 h de incubação. Os números de células viáveis registados ao fim de 24h de incubação nos diferentes meios (Figuras 3.6d-3.8d) estão de acordo com as tendências observadas nas curvas de crescimento para o mesmo tempo de incubação; números de células viáveis acima dos 9 log ufc/mL foram registados pelas três estirpes probióticas incubadas nos meios contendo os extratos etanólicos.

O maior potencial prebiótico observado com os extratos etanólicos dever-se-á certamente ao seu elevado teor de açúcares totais em comparação com os valores registados para os extratos aquosos e enzimáticos. De realçar que o teor de açúcares nos extratos etanólicos foi, em média, superior em 4 vezes em relação aos extratos enzimáticos e 2.5-2.6 vezes em relação aos extratos aquosos, independentemente da espécie de cogumelo e tipo de substrato usado na produção (Tabela 3.4).

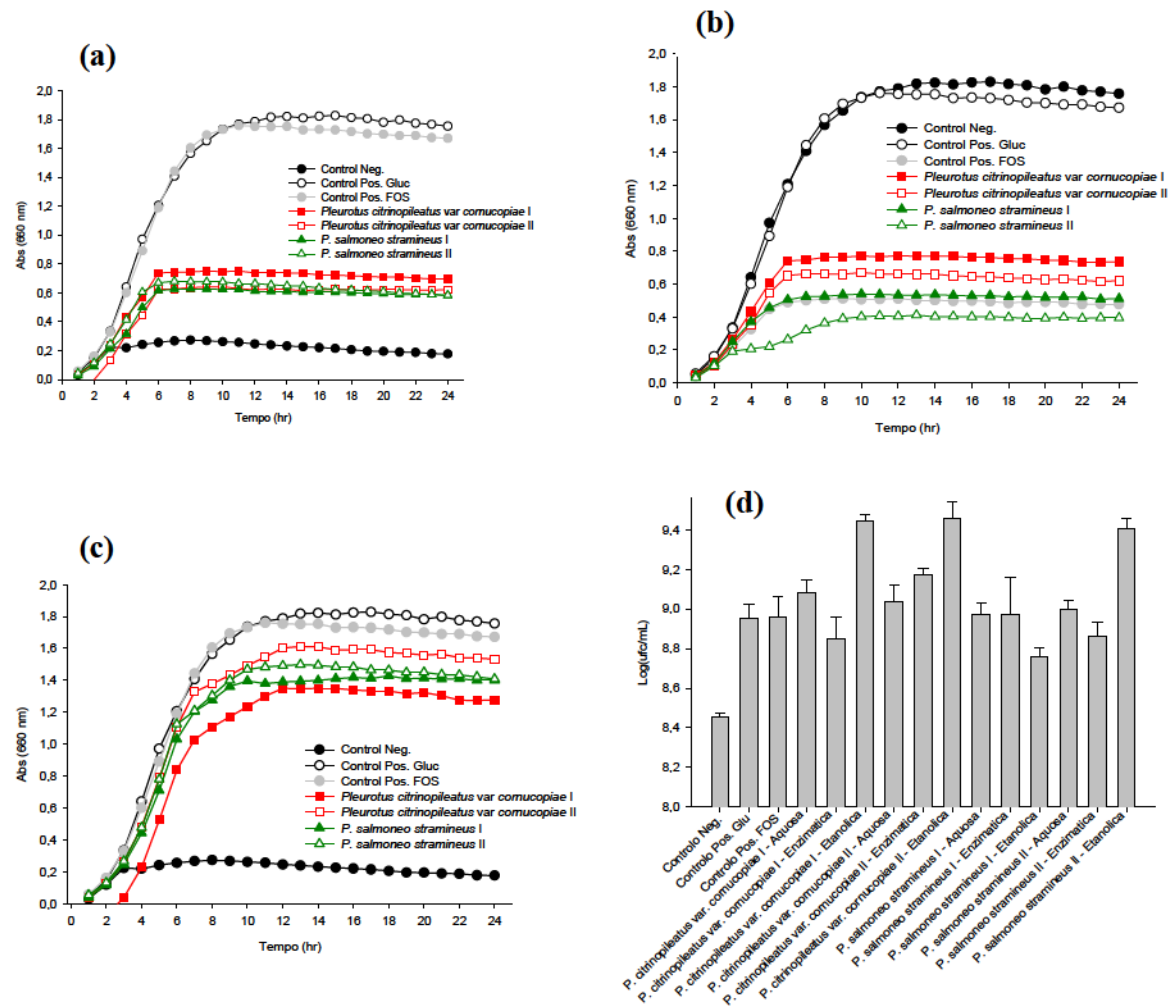


Figura 3.6: Curvas de crescimento em MRS com (--O--) e sem (--●--) glucose, com FOS (--●--) e com os diferentes extratos (a) aquosos, (b) enzimáticos e (c) etanólicos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* (--■--;--□--) e de *P. salmoneo stramineus* (--▲--;--△--) produzidos em substrato padrão (I) (--■--;--▲--) ou em substrato teste (II) (--□--;--△--) e (d) respectivos números de células viáveis (Log ufc/mL) de *Lactobacillus casei* L26 após 24h de incubação a 37 °C.

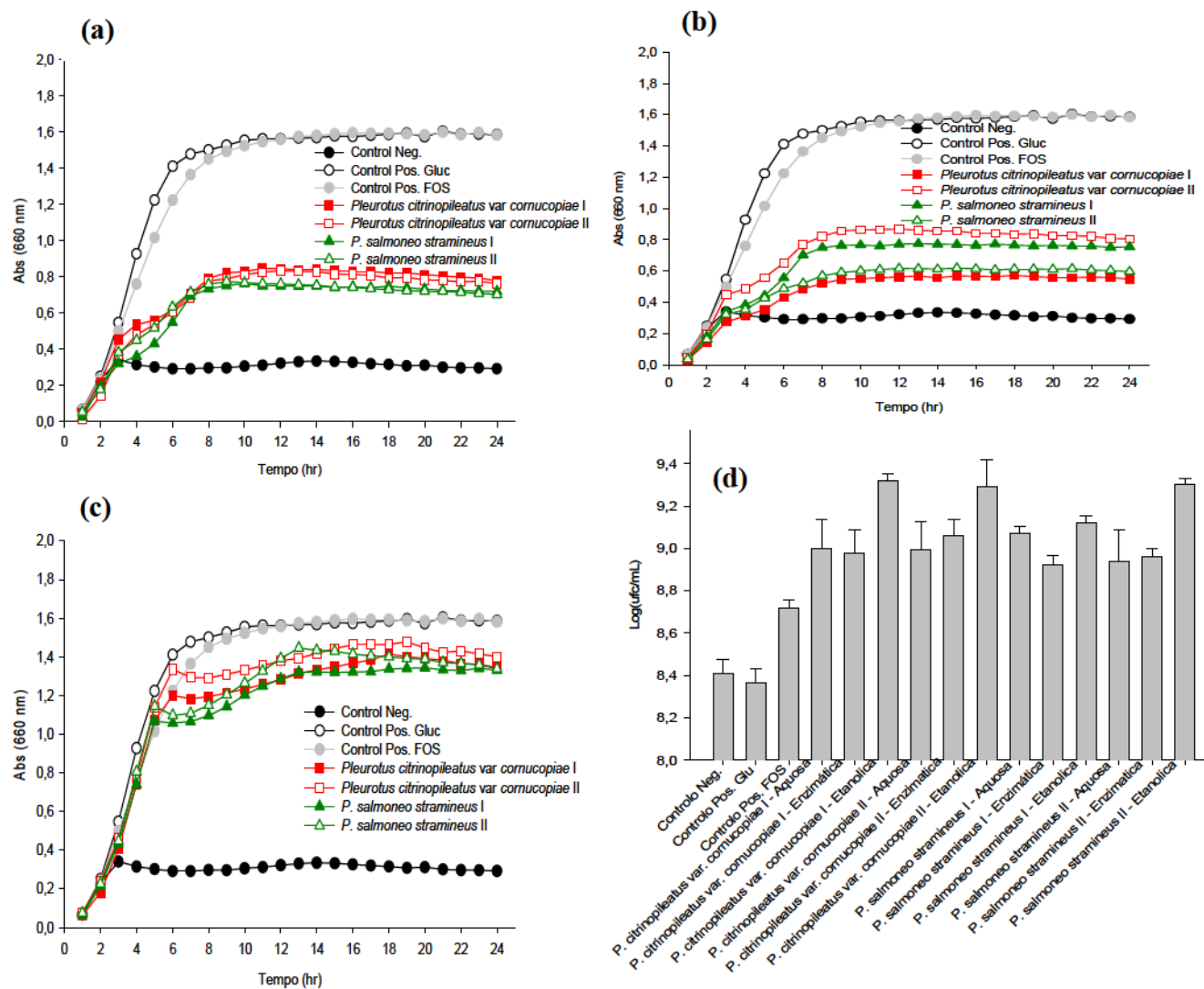


Figura 3.7: Curvas de crescimento em MRS com (--O--) e sem (--●--) glucose, com FOS (--●--) e com os diferentes extratos (a) aquosos, (b) enzimáticos e (c) etanólicos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* (--■--; --□--) e de *P. salmoneo stramineus* (--▲--; --△--) produzidos em substrato padrão (I) (--■--; --▲--) e (d) respectivos números de células viáveis (Log ufc/mL) de *Lactobacillus acidophilus* Ki após 24h de incubação a 37 °C.

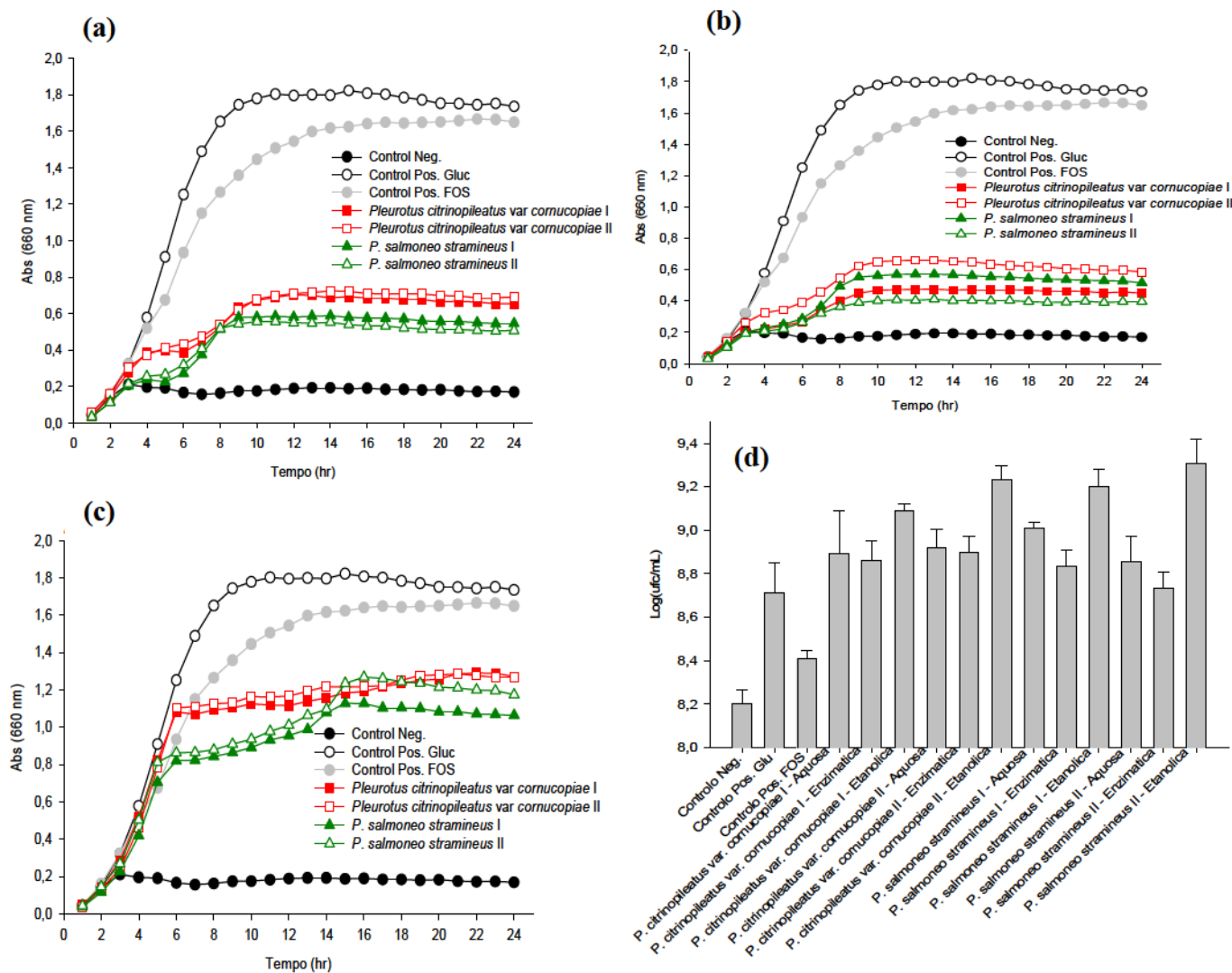


Figura 3.8: Curvas de crescimento em MRS com (--O--) e sem (--●--) glucose, com FOS (--●--) e com os diferentes extratos (a) aquosos, (b) enzimáticos e (c) etanólicos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* (--■--; --□--) e de *P. salmoneo stramineus* (--▲--; --△--) produzidos em substrato padrão (I) (--■--; --▲--) ou em substrato teste (II) (--□--; --△--) e (d) respectivos números de células viáveis (Log ufc/mL) de *Bifidobacterium animalis* Bo após 24h de incubação a 37 °C.

No que diz respeito às curvas de crescimento de *B. lactis* Bb12 (Figura 3.9a-c), valores reduzidos de absorvância foram observados em todos os meios suplementados com os diferentes extratos sob análise ao longo de 24h de incubação. Adicionalmente, apesar dos valores mais elevados de absorvância nos controlos positivos, estes também se revelaram inferiores ao esperado e estão correlacionados com os valores baixos de \log_{10} UFC/mL (Figura 3.9d). Pelo que se presume que algum problema possa ter ocorrido nomeadamente com a viabilidade de *B. lactis* Bb12.

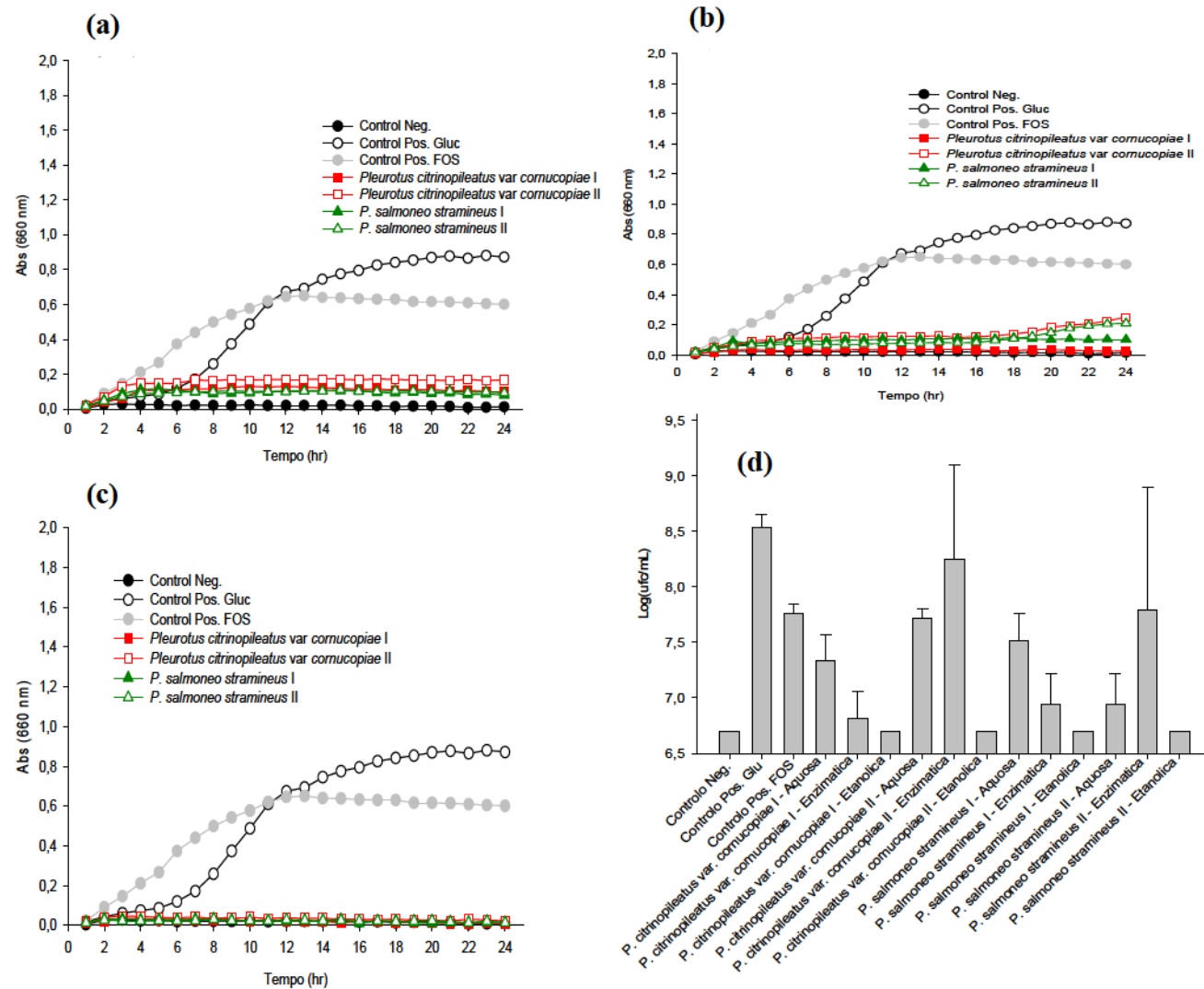


Figura 3.9: Curvas de crescimento em MRS com (○) e sem (●) glucose, com FOS (●) e com os diferentes extratos (a) aquosos, (b) enzimáticos e (c) etanólicos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* (■; □) e de *P. salmoneo stramineus* (▲; △) produzidos em substrato padrão (I) (■; ▲) ou em substrato teste (II) (□; △) e (d) respectivos números de células viáveis (Log UFC/mL) de *Bifidobacterium lactis* BB12 após 24h de incubação a 37 °C.

Tendo em conta os resultados obtidos em microplaca e com a objetivo de se confirmar o efeito prebiótico em macro escala (contagens em placa de petri), selecionaram-se dois microrganismos e dois tipos de extratos de acordo com os seguintes princípios:

- *Bifidobacterium animalis* Bo (Extratos Aquosos e Etanólicos): entre as estirpes de *Bifidobacterium* foi esta a que apresentou resultados mais promissores independentemente de considerar as curvas de crescimento ou o número de células viáveis alcançadas ao fim de 24 h de incubação. Pelas mesmas razões selecionaram-se os extratos etanólicos e os extratos aquosos em detrimento dos extratos enzimáticos que apresentaram um crescimento exponencial mais lento e um número de células viáveis às 24 h de incubação mais baixo de todos;
- *Lactobacillus acidophilus* Ki (Extratos Etanólicos): pese embora o crescimento apresentado pelas duas estirpes de *Lactobacillus* ter sido equivalente, optou-se por selecionar o *L. acidophilus* Ki por esta estirpe ser, em geral, mais fastidiosa do que a *L. casei* L26. Neste caso optou-se por selecionar apenas o grupo de extratos com o melhor potencial prebiótico considerando tanto as curvas de crescimento como o número de células viáveis às 24 h de incubação, critérios cumpridos pelos extratos etanólicos.

3.6.2 Avaliação da atividade prebiótica dos extratos selecionados

A evolução do número de células viáveis de *B. animalis* Bo e de *L. acidophilus* Ki em MRS suplementado com os extratos etanólicos e aquosos assim como a respetiva variação de pH ao longo de 48h de incubação a 37 °C podem ser observados nas figuras 3.10 e 3.11, respetivamente. A título complementar foram também calculadas as taxas de crescimento específicas (h^{-1}) para cada microrganismo probiótico em MRS basal adicionado de extratos etanólicos ou aquosos de cada tipo de cogumelo em cada tipo de substrato e comparadas com as taxas de crescimento em meio MRS convencional (com glucose) ou em MRS contendo FOS, enquanto controlos positivos (Tabela 3.6).

De facto, podemos observar que a evolução do número de células viáveis de *B. animalis* Bo em MRS suplementado com os extratos etanólicos e aquosos de ambas as espécies de cogumelos produzidos com os dois tipos de substratos foi muito semelhante à observada em MRS suplementado com os controlos positivos glucose e FOS durante a fase exponencial (entre as 0 e 8 horas), e início da fase estacionária (entre as 8 e 12 horas) (Figura 3.10). Após 10 horas de incubação valores ligeiramente mais elevados de células viáveis de *B. animalis*

Bo foram registados em MRS suplementado com os extratos, particularmente após 24 e 48h com os extratos de *P. salmoneo stramineus*, em comparação com MRS suplementado com glucose e com FOS. De notar, igualmente, que os números de células viáveis de *B. animalis* Bo em MRS suplementado com os extratos aquosos, independentemente da espécie de cogumelo e do substrato, se mantiveram mais estáveis após 24 e 48 h de incubação (Figura 3.10-b), do que com os extratos etanólicos que registaram um declínio a partir das 24 h de incubação. Assim, os extratos etanólicos e aquosos de ambas as espécies de cogumelos mostraram-se ser uma fonte alternativa bastante eficaz no crescimento de *B. animalis* Bo (Figura 3.10) evidenciando um bom potencial prebiótico. De notas as ligeiras diferenças das taxas de crescimento de *B. animalis* Bo em MRS suplementado com extratos aquosos ou etanólicos ao longo das 48h de incubação não se mostrou concordante com as curvas de crescimento obtidas em microplaca. Este facto realça que não será somente o teor de açúcares totais presente nestes dois tipos de extratos o possível fator preponderante para a formação de novas células viáveis.

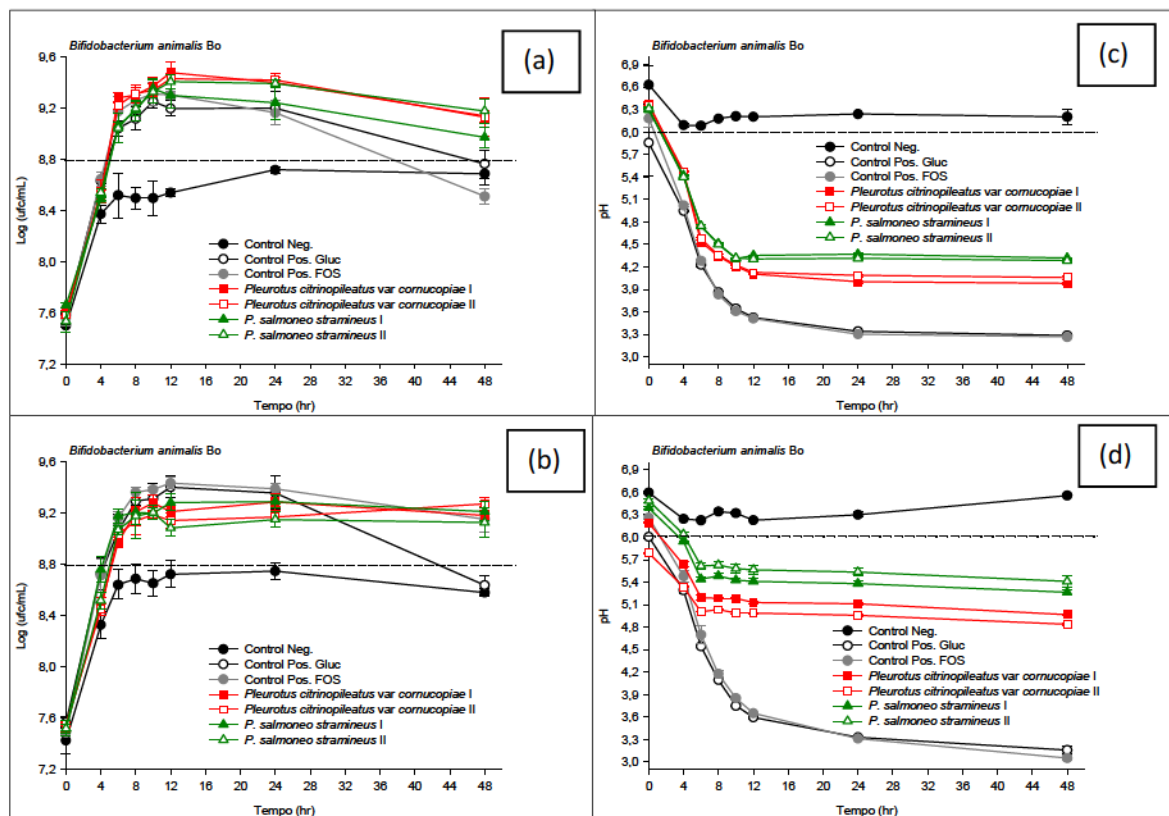


Figura 3.10: Variação do número de células viáveis de *B. animalis* Bo em MRS com (○) e sem (●) glucose, com FOS (●) e com os diferentes extratos etanólicos (a) e aquosos (b) e respetiva variação de pH (c) e (d), de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* (■) e de *P. salmoneo stramineus* (▲) produzidos em substrato padrão (I) (■) ou em substrato teste (II) (□) ao longo de 48h de incubação a 37 °C.

No que respeita à variação de pH nos vários meios ao longo de 48 h de incubação, pode-se observar um maior efeito do tipo de fonte de carbono. Valores de redução de pH foram muito mais acentuados em MRS suplementado com glucose e FOS logo após 4h de incubação. Redução intermédia foi observada em MRS suplementado com extratos de *P.citrinopileatus* var. *cornucopiae* enquanto a menor redução de pH se verificou em MRS suplementado com extratos de *P. salmoneo stramineus*. Esta tendência foi mais acentuada em MRS com extratos etanólicos onde se verificaram valores de pH inferiores ao longo do tempo em comparação com os obtidos em MRS com extratos aquosos. Este facto terá certamente a ver com a maior disponibilidade de açúcares fermentáveis presentes nos extratos etanólicos. Não se verificou um efeito por parte do tipo de substrato em que os cogumelos foram produzidos. De notar a semelhança entre as tendências na variação de pH e as tendências anteriormente observadas relativas às taxas de crescimento, refletindo um certo acoplamento entre o crescimento e a acidificação.

No que respeita ao número de células viáveis de *L. acidophilus* Ki em MRS suplementado com os extratos etanólicos e respetiva variação de pH ao longo de 48 h de incubação (Figura 3.11) observa-se no geral um semelhante cenário ao obtido com *B. animalis* Bo. No entanto alguns aspetos podem ser destacados: i) após 12 h de incubação observou-se um decréscimo mais acentuado do número de células viáveis de *L. acidophilus* Ki em MRS suplementado com extracto etanólico de *P. salmoneo stramineus* produzido em substrato padrão; ii) observou-se uma diferença maior entre o número de células viáveis de *L. acidophilus* Ki em MRS suplementado com os outros três extratos etanólicos em comparação com MRS suplementado com glucose e com FOS, particularmente após 24 e 48 h de incubação; iii) A variação de pH em MRS com os quatro extratos etanólicos foi semelhante ao obtido com *B. animalis* Bo, não se tendo repercutido na variação de pH a diminuição do número de células viáveis de *L. acidophilus* Ki em MRS suplementado com extracto etanólico de *P. salmoneo stramineus* produzido em substrato padrão.

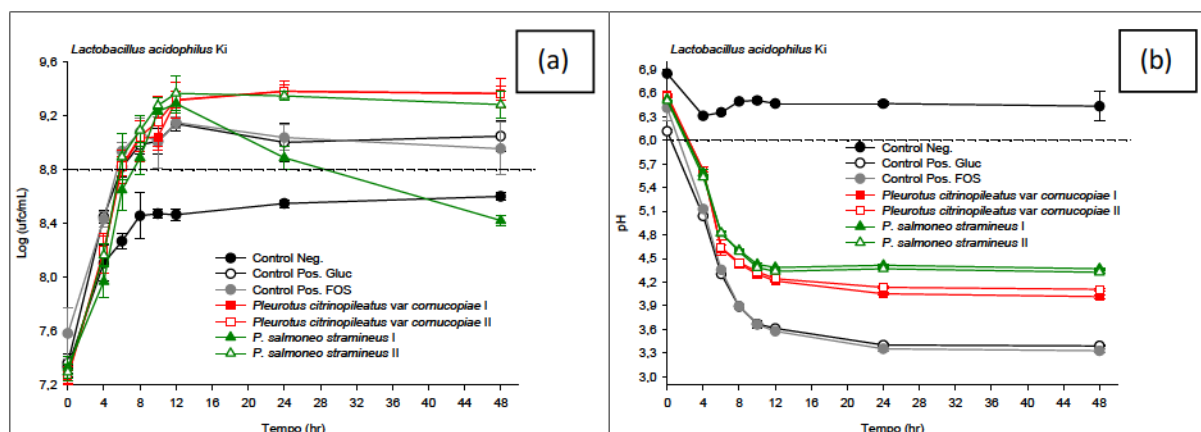


Figura 3.11: Variação do número de células viáveis de *L. acidophilus* Ki em MRS com (---○---) e sem (---●---) glucose, com FOS (---●---) e com extratos etanólicos (a) e respetiva variação de pH (b), de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* (---■---; ---□---) e de *P. salmoneo stramineus* (---▲---; ---△---) produzidos em substrato padrão (I) (---■---; ---▲---) ou em substrato teste (II) (---□---; ---△---) ao longo de 48h de incubação a 37 °C.

No geral, os extratos etanólicos e aquosos selecionados demonstraram ser uma boa fonte de carbono alternativa evidenciando um bom potencial prebiótico em comparação com o FOS. No entanto, podemos observar que os extratos etanólicos promoveram um crescimento ligeiramente mais acentuado de *B. animalis* Bo (Figura 3.10) do que de *L. acidophilus* Ki (Figura 3.11). De acordo com Aida *et al.*, (2009) diferentes estudos provaram um significativo efeito prebiótico nomeadamente com extratos de *P. ostreatus* e *P. eryngii* no crescimento de *Lactobacillus* sp. e de *Bifidobacterium* sp. (Synytsya *et al.*, 2008).

Desta forma, verifica-se que os extratos em estudo possuem atividade prebiótica, o que pode trazer benefícios para a saúde humana se estes começarem a ser incluídos em alimentos, produzindo assim alimentos funcionais.

Tabela 3.6: Médias e desvio-padrão da taxa de crescimento específica (h^{-1}) para as duas estirpes prebióticas em MRS suplementado com extratos etanólicos e aquosos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus* produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II)

	Taxa de crescimento específica (h^{-1})		
	<i>Bifidobacterium animalis</i> Bo		<i>Lactobacillus acidophilus</i> Ki
	H ₂ O	EtOH	EtOH
Controlo Pos. Glu	0,169 ± 0,025 ^a	0,167 ± 0,007 ^a	0,169 ± 0,012 ^{bc}
Controlo Neg.	0,126 ± 0,009 ^c	0,098 ± 0,009 ^b	0,011 ± 0,011 ^a
Controlo Pos. FOS	0,190 ± 0,012 ^{ab}	0,181 ± 0,008 ^{ab}	0,152 ± 0,023 ^b
<i>P. cornucopiae</i> I	0,182 ± 0,005 ^b	0,187 ± 0,005 ^c	0,190 ± 0,013 ^{cd}
<i>P. cornucopiae</i> II	0,172 ± 0,003 ^b	0,186 ± 0,003 ^c	0,198 ± 0,012 ^{cd}
<i>P. stramineus</i> I	0,171 ± 0,004 ^{ab}	0,175 ± 0,007 ^{ab}	0,196 ± 0,013 ^{cd}
<i>P. stramineus</i> II	0,176 ± 0,009 ^{ab}	0,184 ± 0,009 ^{ab}	0,207 ± 0,010 ^d

Nota: Para cada extração, valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$)

Através da Tabela 3.6 em *B. animalis* Bo, verifica-se que a taxa de crescimento específica em MRS e FOS é superior em termos absolutos do que em MRS convencional (glucose) tanto na experiência realizada com os extratos aquosos como com os extratos etanólicos mas não é estatisticamente significativo ($p > 0,05$). A Taxa de crescimento em MRS com os extratos aquosos são equivalentes à taxa observada para o MRS e FOS. A taxa de crescimento em MRS com extrato de *P. cornucopiae* var. *cornucopiae* I é a mais elevada de entre os 4 extratos embora não seja estatisticamente significativa esta diferença ($p > 0,05$).

A mesma tendência é observada para o crescimento na presença dos extratos etanólicos embora a ordem de grandeza das taxas registadas sejam superiores, e mais uma vez a maior taxa de crescimento é observada em MRS contendo o extrato de *P. cornucopiae* var. *cornucopiae* I.

Em *L. acidophilus* Ki, a taxa de crescimento específica em MRS com glucose é superior em termos absolutos do que em MRS com FOS mas não é estatisticamente significativo ($p > 0,05$). A ordem de grandeza das taxas de crescimento em MRS com extratos etanólicos é superior para cada extrato quando comparado com o mesmo no impacto sobre *B. animalis* Bo.

Na figura 3.12 pode-se visualizar a variação das concentrações de glucose e FOS, ácido láctico e ácido acético ao longo do tempo de incubação nos diferentes meios de MRS suplementados com extratos aquosos e etanólicos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus* produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II) e inoculados com *Bifidobacterium animalis* Bo e *Lactobacillus acidophilus* Ki.

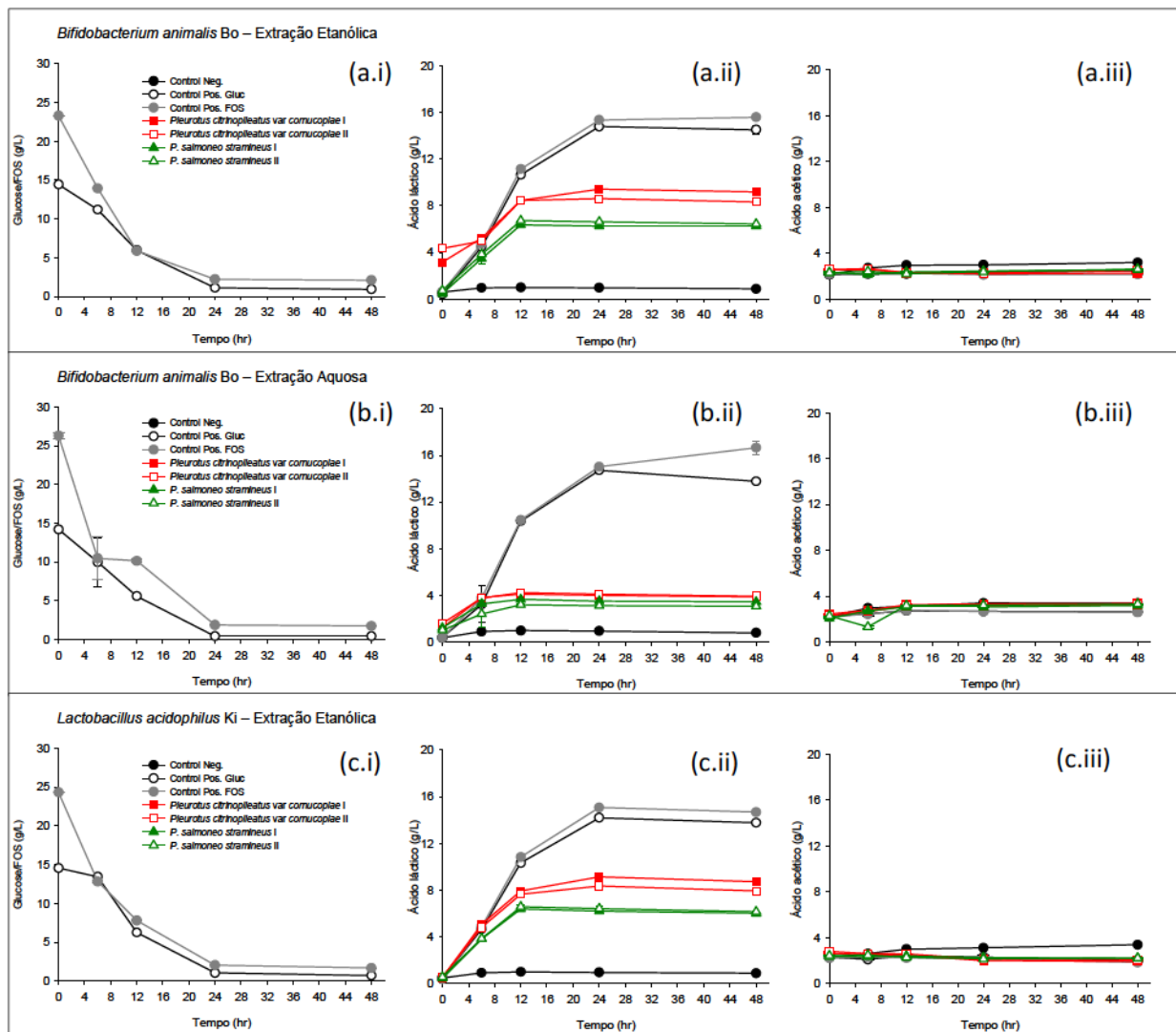


Figura 3.12: Evolução das concentrações de glucose e FOS (i), ácido láctico (ii) e ácido acético (iii) ao longo do tempo de incubação nos diferentes meios de MRS basal suplementados com extratos etanólicos (a, c) e aquosos (b) de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* (---■---;---□---) e *P. salmoneo stramineus* (---▲---;---△---) produzidos em substrato padrão (I) (---■---;---▲---) e em substrato teste (II) (---□---;---△---) e inoculados com *Bifidobacterium animalis* Bo (a, b) e *Lactobacillus acidophilus* Ki (c).

Através da observação da Figura 3.12, pode-se observar que o consumo de glucose e FOS foi semelhante por parte das duas estirpes probióticas atingindo valores próximos de zero ao fim de 24 horas (Figura 3.12 a.i-c.i). O consumo de glucose e FOS foi acompanhado pela produção de ácidos orgânicos, em particular, de ácido láctico (Figura 3.12 a.ii-c.ii). A concomitante produção esperada de ácido acético para o *B. animalis* Bo, dada a sua característica de ser heterofermentativo, não foi verificada, independentemente da condição de crescimento (Figura 3.12 a.iii-b.iii). A ausência de produção apreciável de ácido acético pela estirpe *L. acidophilus* Ki (Figura 3.12 c.iii) era esperada pela sua natureza homofermentativa (Becker, 2009). No que respeita à produção de ácido láctico, em particular, pode-se observar um aumento ao longo das primeiras 24 h em MRS suplementado com glucose e com FOS e ao longo de 12h em MRS suplementado com extratos aquosos e

etanólicos de cogumelos das duas espécies. Esta produção progressiva de ácido láctico é inversamente proporcional à variação de pH observada e discutida anteriormente.

3.7 Atividade antioxidante

Segundo a literatura, os cogumelos são ricos em compostos antioxidantes, sendo os compostos fenólicos os principais componentes antioxidantes encontrados nos extratos de cogumelos. O teor em fenólicos totais (TPC), poder redutor férrico (FRAP), captura do radical ABTS^{•+} (ABTS) e capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) analisados nos diferentes extratos de cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus* produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II) estão apresentados na Figura 3.13.

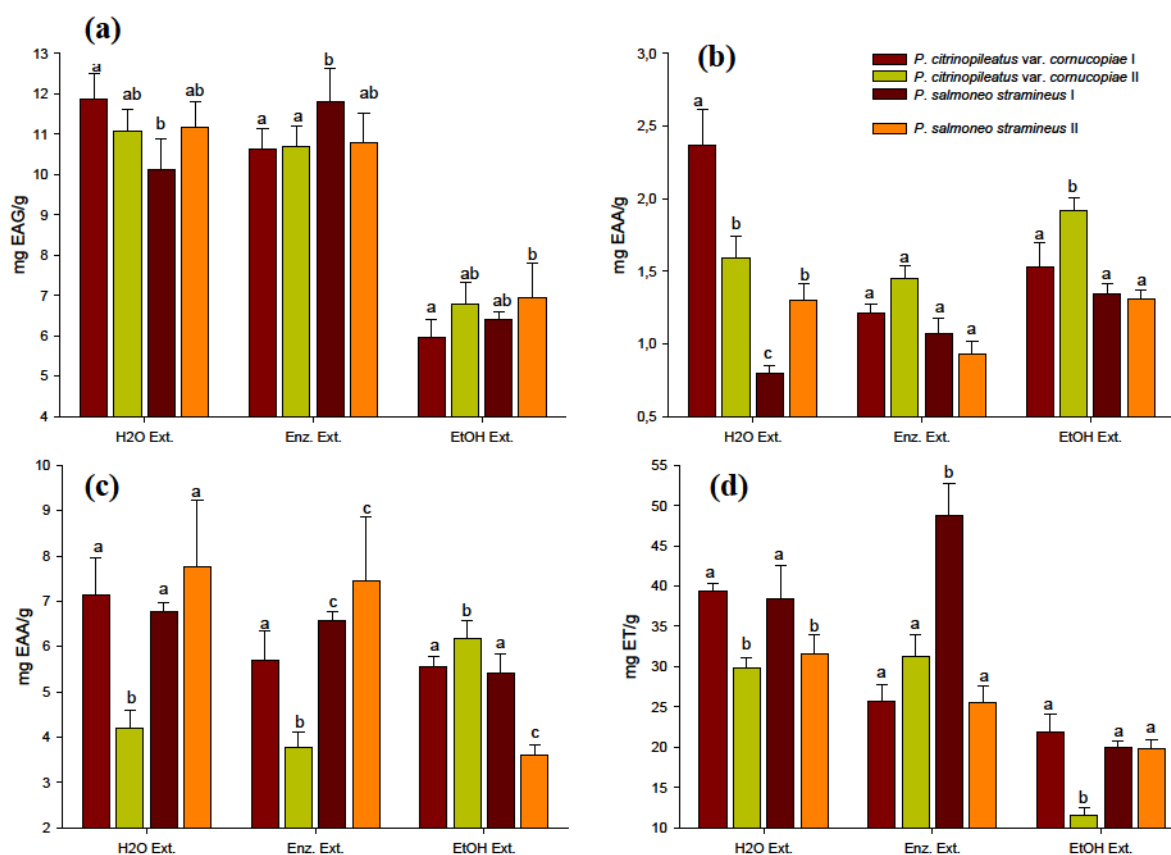


Figura 3.13: Teor em fenólicos totais (TPC) (a); poder redutor férrico (FRAP) (b); captura do radical ABTS^{•+} (ABTS) (c) e capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) (d) determinados nos diferentes extratos aquosos, enzimáticos e etanólicos de cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus* produzidos em substrato padrão (I) e em substrato teste (II); Para cada extração, valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa (p < 0.05).

Os resultados representados na Figura 3.13 (a) refletindo o teor de fenólicos totais em cada extrato sugerem que a extração aquosa ou extração enzimática favorecem uma maior extração dos compostos fenólicos totais presentes nas duas espécies de cogumelos, em comparação com a extração etanólica. Por outro lado, e independentemente do tipo de extração empregue,

o teor de fenólicos totais variou consoante o tipo de cogumelo e o tipo de substrato usado na produção, não apresentando uma tendência generalizada. Por exemplo na extração aquosa, valores mais elevados foram registados com *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* produzido em substrato I ($11,86 \pm 0,63$ mg de GAE/ g de matéria seca) e com *P. salmoneo stramineus* produzido em substrato II ($11,18 \pm 0,63$ mg de GAE/ g de matéria seca), respetivamente. Na extração enzimática, o valor mais elevado foi registado com *P. salmoneo stramineus* produzido em substrato I ($6,95 \pm 0,86$ mg de GAE/ g de matéria seca). O conteúdo total em compostos fenólicos determinados para as duas espécies de cogumelos extraídos com água, sem ou com enzima, variou entre $10,11 \pm 0,78$ e $11,86 \pm 0,63$ mg de GAE/ g de matéria seca. Estes valores são semelhantes aos obtidos por (Mishra *et al.*, 2013) os quais referem uma concentração de 3.94 e 21.67 mg ET/g de matéria seca para extratos preparados a partir de cogumelos destas espécies.

É bem estabelecido que a capacidade antioxidante varia com as condições da metodologia podendo ser influenciada por diversos fatores. Assim, de forma a proceder a uma análise mais precisa e complementar devem ser utilizados mais do que um método para a determinação da capacidade antioxidante. No presente trabalho, a capacidade antioxidante dos diferentes extratos aquosos, enzimáticos e etanólicos das espécies *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus* produzidos no substrato I e substrato II, foi avaliada através de três métodos diferentes: o poder redutor férrico (FRAP) (Figura 3.13b), a captura do radical ABTS^{•+} (ABTS) (Figura 3.13c) e a capacidade de absorção de radicais de oxigénio (ORAC) (Figura 3.13d). A capacidade antioxidante dos extratos aquosos em termos de poder redutor (FRAP) e captura do radical ABTS^{•+} foi superior nas duas espécies face ao obtido para os extratos enzimáticos e etanólicos, que foram aqueles que também originaram extratos com uma maior quantidade de compostos fenólicos (Figura 3.13a). Os extratos aquosos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* I destacaram-se em relação aos restantes, apresentando elevado teor de fenólicos totais ($11,86 \pm 0,63$ mg EAG/g), elevado poder redutor férrico ($2,37 \pm 0,24$ mg EAA/g) e capacidade de captura do radical ABTS^{•+} ($7,12 \pm 0,84$ mg EAA/g) respetivamente. A capacidade de absorção de radicais de oxigénio foi superior nos extratos enzimáticos, mas desta vez em *P. salmoeno stramineus* I ($48,72 \pm 4,06$ mg ET/g).

O poder redutor no extrato aquoso e a capacidade de captura do radical ABTS^{•+} no extrato etanólico de *P. salmoeno stramineus* apresentaram valores diferentes e estatisticamente significativos ($p < 0,05$), o que sugere a influência da composição do substrato no potencial antioxidante do cogumelo em estudo.

Em *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* verificaram-se valores diferentes e estatisticamente significativos ($p < 0,05$) no poder redutor e captação da absorção dos radicais livres de oxigénio pelos extratos aquosos e etanólicos e na capacidade de captura do radical ABTS⁺⁺ por todos os extratos (aquosos, enzimáticos e etanólicos), o que sugere a influência da composição do substrato no potencial antioxidante do cogumelo em estudo. De facto, verifica-se que os extratos etanólicos dos cogumelos cultivados em borras de café (II) apresentaram superiores poderes redutor e capacidade de captura do radical ABTS⁺⁺ mas menor capacidade de absorção de radicais livres de oxigénio (Fig. 3.13 b, c e d). Pese embora, esta tendência parecer demonstrar que estes extratos possuem maior atividade antioxidante, a menor capacidade de absorção de radicais de oxigénio impede uma confirmação absoluta. Por outro lado, os extratos aquosos e os extratos enzimáticos apresentaram, geralmente, capacidade antioxidante equivalente ou inferior, independentemente do método utilizado.

Os extratos aquosos e os extratos etanólicos dos dois cogumelos cultivados no substrato padrão I apresentaram capacidade de captura do radical ABTS⁺⁺ e dos radicais livres de oxigénio bastante próximos entre si, apesar de serem de diferentes espécies. No entanto, os valores correspondentes dos cogumelos cultivados no substrato II são essencialmente inferiores.

Com o objetivo de se avaliar a relação entre o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante determinada por três métodos diferentes procedeu-se à determinação da sua correlação. Obteve-se um coeficiente de correlação de 0,728 entre o teor total de fenólicos totais e ORAC, o que sugere que a natureza dos compostos fenólicos presentes possuem uma boa capacidade de absorção de radicais oxigenados, relacionando-se de forma positiva com o tipo de cogumelos, produção e extração. Menores valores de correlação foram obtidos para os dois restantes métodos.

4. Conclusões gerais

Após realização deste trabalho, cujo objetivo principal foi avaliar o impacto do substrato e métodos de extração nas propriedades biológicas de extratos de cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *P. salmoneo stramineus*, é possível concluir que:

- A produção dos dois cogumelos em estudo foi concluída com sucesso, embora o rendimento de produção do cogumelo *P. salmoneo stramineus* no substrato teste (II) tenha sofrido uma quebra de 86%, tendo também se verificado uma produção atípica o que indica que as borras de café tiveram influência na sua produção.

- A composição dos cogumelos em estudo não apresentou variabilidade entre os diferentes métodos de produção (I e II).

- O método de extração com maior rendimento foi a extração aquosa, no entanto a nível de açúcares nos diferentes extratos verificou-se que foi a extração etanólica a mais eficaz na extração de polissacarídeos embora tenha sido o método de extração que apresentou menor rendimento.

- Os cogumelos em estudo não apresentaram atividade antidiabética em comparação com o controlo positivo que é utilizado como fármaco.

- Apenas os cogumelos *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae* apresentaram atividade anti-hipertensiva, tendo sido no extrato aquoso dos cogumelos produzidos pelo método de produção I que se verificou o melhor resultado.

- Os extratos aquosos e etanólicos dos diferentes cogumelos e produzidos pelos dois métodos de produção apresentaram uma importante atividade prebiótica similar ao controlo positivo, o que indica que as borras de café não afetaram esta atividade.

- Os extratos das duas espécies de cogumelos obtidos por extração enzimática e/ou extração aquosa mostraram ser os mais eficazes na avaliação da capacidade antioxidante, tendo-se verificado que os cogumelos apresentaram um bom conteúdo em fenólicos totais, independentemente do substrato de produção. Os extratos aquosos e etanólicos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae*, para além de apresentarem uma maior capacidade redutora total, demonstraram um efeito de captação do radical ABTS^{•+} e dos radicais livres de oxigénio equivalente ou mais elevados do que os correspondentes de *P. salmoneo stramineus*. Em relação aos extratos enzimáticos, os extratos de *P. salmoneo stramineus* evidenciaram-se face aos de *P. citrinopileatus* var. *cornucopiae*.

Assim, verificou-se que os três métodos de extração devem continuar a ser explorados com o objetivo de se identificar e isolar os compostos responsáveis por estas atividades, que podem

ser uma fonte de compostos bioativos com aplicações nutricionais, nutracêuticas e cosméticas.

5. Trabalho futuro

Após a realização deste trabalho, e tendo em conta os resultados neles obtidos, é possível enumerar vários e possíveis trabalhos futuros, que possam complementar ou explicar os resultados obtidos até ao momento. Será importante avaliar a produção de *Pleurotus citrinopileatus* var. *cornucopiae* e *Pleurotus salmoneo stramineus* noutros substratos testando outras matérias-primas e perceber de que maneira estas podem alterar a composição química e as propriedades biológicas dos cogumelos. Adicionalmente este estudo pode ser alargado à produção de outras espécies de cogumelos que podem ser afetadas pela presença de borras de café no seu substrato.

Numa vertente funcional, será importante enriquecer cada um dos substratos propositadamente em minerais e nutrientes (por exemplo com selénio, cobre ou potássio devido à sua crescente procura e interesse) e perceber até que ponto os cogumelos resultantes desta produção são ou não mais enriquecidos em sabor, nutrientes e minerais valorizando assim o produto final com maior interesse para o consumidor. Pese embora os benefícios esperados será crucial avaliar a eventual absorção de componentes prejudiciais para a saúde devido à alteração destes substratos padronizados.

Os extratos obtidos das duas espécies de cogumelos podem ser avaliadas em mais propriedades biológicas, como por exemplo propriedades anti-tumorais, anti-alérgicas, antimicrobianas, antivirais e imonoreguladoras, caracterizando os compostos que podem ser efetivamente responsáveis por estas ações.

De futuro será ainda interessante perceber a importância destes compostos na saúde humana e de que forma poderão começar a serem incluídos em alimentos, produzindo assim alimentos funcionais.

6. Anexos

6.1 Curva de calibração do método Fenol-Ácido-Sulfúrico

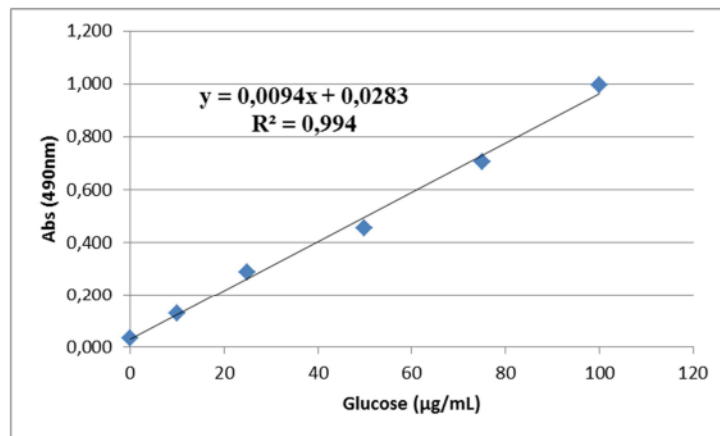


Figura 6.1: Curva de calibração obtida usando a glucose como padrão para calcular os valores de açúcar no método Fenol-Ácido-Sulfúrico.

6.2 Curva de calibração do método ABTS⁺⁺

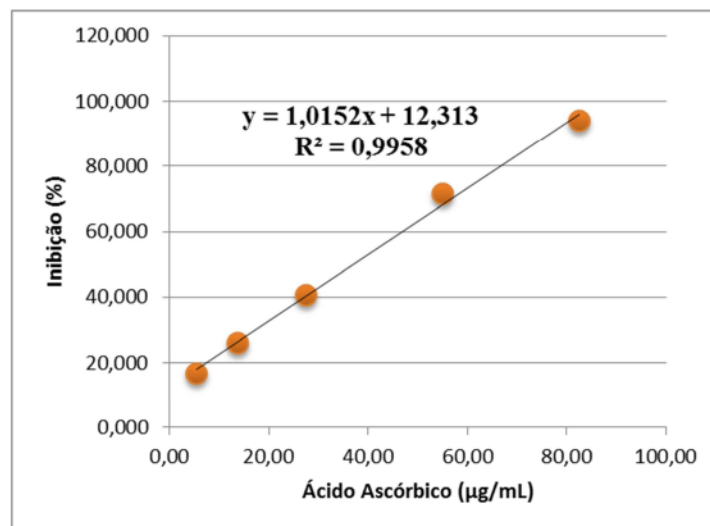


Figura 6.2: Curva de calibração obtida usando o ácido ascórbico como padrão para calcular os valores no método de ABTS⁺⁺.

6.3 Curva de calibração do método ORAC

Tabela 6.1: Dados da reta da curva de calibração obtida usando o trolox como padrão para calcular os valores no método de ORAC

Nome da Curva de Calibração	Fórmula	A	B	R ²
Curva Trolox	Y=A*X+B	0,254	5,02	0,945

6.4 Curva de calibração do método FRAP

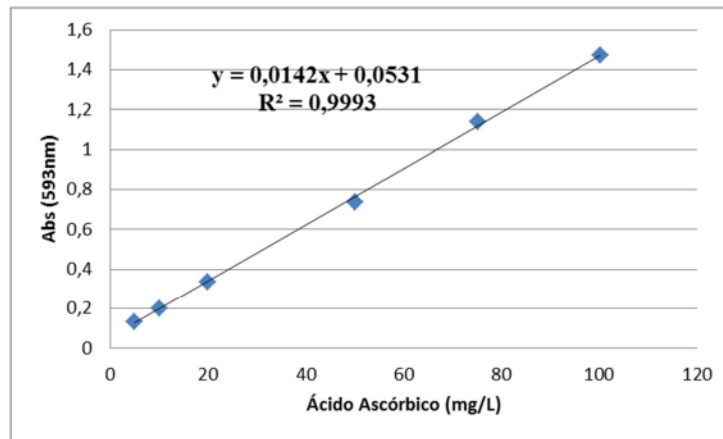


Figura 6.3: Curva de calibração obtida usando o ácido ascórbico como padrão para calcular os valores no método de FRAP.

6.5 Curva de calibração do método TPC

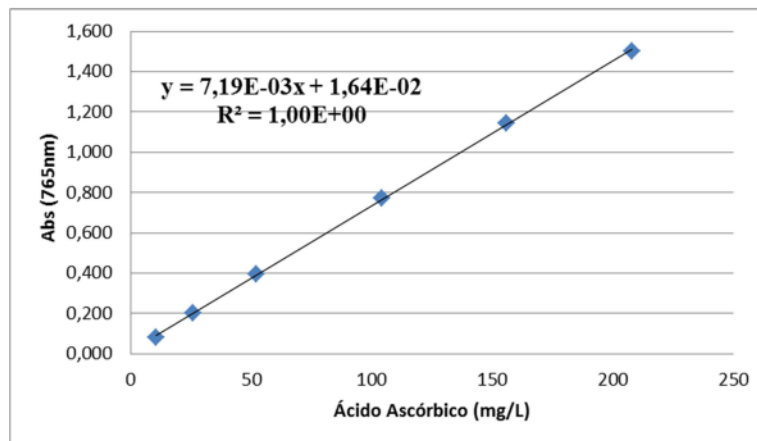


Figura 6.4: Curva de calibração obtida usando o ácido ascórbico como padrão para calcular os valores no método de TPC.

7. Bibliografia

- Aida, F. M. N. a., Shuhaimi, M., Yazid, M., & Maaruf, a. G. (2009). Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(11-12), 567–575. doi:10.1016/j.tifs.2009.07.007
- Antunes, M. (2015). *Produção de Pleurotus citrinopileatus var. cornucopiae e Pleurotus salmoneo stramineus em substrato padrão e alternativo com borras de café*. Porto.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Casal, S., Oliveira, B., & Ferreira, I. C. F. R. (2007). Food Chemistry Fatty acid and sugar compositions , and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal, 105, 140–145. doi:10.1016/j.foodchem.2007.03.052
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, I. M., & I, F. (2008). Wild and comercial mushroom as source of nutrientes and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxilogy*, 46, 2742–2747.
- Becker, L. V. (2009). Iogurte probiótico com teor reduzido de lactose adicionado de óleo de linhaça.
- Brusotti, G., Cesari, I., Dentamaro, A., Caccialanza, G., & Massolini, G. (2014). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 218–228. doi:10.1016/j.jpba.2013.03.007
- Chang, S. T., & Quimio, T. H. (1982). Tropical mushrooms: Biological nature and cultivation methods, 363 – 376.
- Cohen, R., Persky, L., & Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus Pleurotus. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(5), 582–94. doi:10.1007/s00253-002-0930-y
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 48–54. doi:10.1021/jf0305231

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). açúcares_totais_Dubois et al_1956.pdf.
- El-Fakharany, E. M., Haroun, B. M., Ng, T., & Redwan, E. R. (2010). Oyster mushroom laccase inhibits hepatitis C virus entry into peripheral blood cells and hepatoma cells. *Protein Pept. Lett.*, *17*, 1031 – 1039.
- Fan, L., Soccol, A., Pandey, A., & Soccol, C. (2003). Cultivation of Pleurotus mushrooms on Brazilian coffee husk and effects of caffeine and tannic acid. *Micologia Aplicada Internacional*, *15*, 15 – 21.
- FAOSTAT. (2015). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Retrieved from <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>
- Ferrador, S. (2015). *Bioinvitro, Biotecnologia Lda*. Retrieved January 10, 2015, from <http://www.bioinvitro.com/>
- Ferrador, S. (2015). *Formação Jovem Agricultor - Produção de Cogumelos Módulo II*. Vila do Conde.
- Gern, R., Wisbeck, E., Rampinelli, J., Ninow, J., & Furlan, S. (2008). Alternative medium for production of Pleurotus ostreatus biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresour Technol*, *99*, 76 – 82.
- Gonçalves, C., & Lima, N. (2011). *Extracção de propriedades medicinais de cogumelos - Métodos de extracção, caracterização e quantificação* (p. 20). Braga.
- Guillamón, E., García-Lafuente, A., Lozano, M., D'Arrigo, M., Rostagno, M. a, Villares, A., & Martínez, J. A. (2010). Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*, *81*(7), 715–23. doi:10.1016/j.fitote.2010.06.005
- Hu, S., Wang, J., & Juang, L. (2006). Antihyperglycemic effect of polysaccharide from fermented broth of Pleurotus citrinopileatus. *Applied Microbial and Cel Physiology*, *70*, 107 – 113.

- Jaworska, G., & Bernas, E. (2009). Qualitative changes in *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. mushrooms resulting from different methods of preliminary processing and periods of frozen storage., *89*, 1066 – 107.
- Kalač, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*, *113*(1), 9–16. doi:10.1016/j.foodchem.2008.07.077
- Khan, M. A., & Tania, M. (2012). Nutritional and Medicinal Importance of *Pleurotus* Mushrooms: An Overview. *Food Reviews International*, *28*(3), 313–329. doi:10.1080/87559129.2011.637267
- Khan, N., Ajmal, M., Nicklin, J., Aslam, S., & Ali, M. (2013). Nutricional value of *Pleurotus* (flabellatus) djamor (R-22) cultivated on sawdusts of different woods, *45*(3), 1105–1108.
- Kwon, Y. I., Apostolidis, E., & Shetty, K. (2008). In vitro studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Bioresource Technology*, *99*, 2981–2988. doi:10.1016/j.biortech.2007.06.035
- Lee, Y.-L., Huang, G.-W., Liang, Z.-C., & Mau, J.-L. (2007). Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *LWT - Food Science and Technology*, *40*, 823–833. doi:10.1016/j.lwt.2006.04.002
- Mendes, M. (2012). *Functional Activity of Seaweed Extracts From the North Portuguese*.
- Mishra, K. K., Pal, R. S., Arunkumar, R., Chandrashekhara, C., Jain, S. K., & Bhatt, J. C. (2013). Antioxidant properties of different edible mushroom species and increased bioconversion efficiency of *Pleurotus eryngii* using locally available casing materials. *Food Chemistry*, *138*(2-3), 1557–63. doi:10.1016/j.foodchem.2012.12.001
- Mycelia. (2015). *Mycelia - Mushroom spawn laboratory*. Retrieved from <http://www.mycelia.be/>
- Pereira, C. N. (2014). *Produção de Morchella esculenta e de Macrolepiota procera e estudo de novos substratos para a produção de cogumelos saprófitas*. Universidade do Minho.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL.pdf, 26(98), 1231–1237.
- Rodrigues, J., Serrano, J., Fernández, J., Burton, B., & Suárez, M. (2004). *Los Hongos: Manual y guía didáctica de Micología* (1st ed.). León: IRMA, S.L.
- Salmones, D., Mata, G., & Waliszewski, K. (2005). Comparative culturing of spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource Technology*, 96, 537–544. doi:10.1016/j.biortech.2004.06.019
- Sentandreu, M. Á., & Toldrá, F. (2006). A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chemistry*, 97, 546–554. doi:10.1016/j.foodchem.2005.06.006
- Silva, C., Calado, M., & Louro, R. (2015). *Vem conhecer os cogumelos - Uma riqueza do Alentejo*. Retrieved from http://info.uevora.pt/cogumelo/index.php?option=com_frontpage&Itemid=3
- Smolskaitė, L., Venskutonis, P. R., & Talou, T. (2015). Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 462–471. doi:10.1016/j.lwt.2014.08.007
- Synytsya, A., Mickova, K., Synytsya, A., Jablonsky, I., Spevacek, J., & Erban, V. (2008). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*.
- Vaz, J. A., Barros, L., Martins, A., Santos-buelga, C., Vasconcelos, M. H., & Ferreira, I. C. F. R. (2011). Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. *Food Chemistry*, 126(2), 610–616. doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.063
- Wang, H., Gao, J., & Ng, T. (2000). A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*., 275, 810 – 816.

Zeppa, G., Conterno, L., & Gerbi, V. (2001). Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 2722–2726. doi:10.1021/jf0009403

Zhang, J., Ma, Z., Zheng, L., Zhai, G., Wang, L., Jia, M., & Jia, L. (2014). Purification and antioxidant activities of intracellular zinc polysaccharides from *Pleurotus cornucopiae* SS-03. *Carbohydrate Polymers*, *111*, 947–54. doi:10.1016/j.carbpol.2014.04.074