

Otimização da Extração de Compostos Fenólicos em uma Biofarinha de Maçã Enriquecida com *Agaricus brasiliensis*

Optimization of Phenolic Compounds Extraction in an Apple Pomace Flour Enriched With *Agaricus brasiliensis*

Claudia Benetti

Departamento de Farmácia

Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO, Guarapuava, PR

claudia_benetti90@hotmail.com

Tábata Cristina Colussi

Departamento de Farmácia

Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO, Guarapuava, PR

tabata_colussi@yahoo.com.br

Fernanda Bovo

Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, PR

fernanda_bovo@yahoo.com.br

Herta Stutz Dalla Santa

Departamento de Engenharia de Alimentos

Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO, Guarapuava, PR

hdalsanta@yahoo.com.br

Elisa Perez

Departamento de Farmácia

Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO, Guarapuava, PR

eperez@unicentro.br

Resumo: *Agaricus brasiliensis* tem sido muito estudado por suas propriedades nutracêuticas. Como essas propriedades podem estar relacionadas a componentes fenólicos, o objetivo deste trabalho foi otimizar o preparo de amostra, para a determinação de compostos fenólicos totais em uma biofarinha de bagaço de maçã fermentada de

Recebido em 14/08/2013 - Aceito em 11/04/2014.

RECEN 15(2) p. 255-273 jul/dez 2013 DOI: 10.5935/RECEN.2013.02.06

forma submersa com *A. brasiliensis*. Utilizou-se um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} , com as variáveis: composição do líquido extrator, concentração do álcool no líquido extrator, tempo e método de extração, utilizando-se o método Folin-Denis. Outras otimizações foram realizadas com as variáveis significativas. O melhor método de extração utilizou etanol a 70%, em homogeneizador por 15 min. O teor de fenólicos totais, em amostras de biofarinhas de bagaço de maçã fermentadas com *A. brasiliensis*, foi menor ($0,04852 \pm 0,001458$) que o teor encontrado na biofarinha sem fermentar ($0,1098 \pm 0,001246$) ($p=3,331 \cdot 10^{-16}$). O sistema de planejamento fatorial foi eficaz para otimização dos resultados. A menor concentração de fenólicos encontrados na biofarinha fermentada é devido a, provavelmente, o fungo ter metabolizado esses compostos.

Palavras-chave: *Agaricus blazei*; cogumelo; micélio; planejamento fatorial.

Abstract: *Agaricus brasiliensis* have been studied for their nutraceutical properties. Given that these properties can be related to phenolic components, the aim of this work was to optimize the sample preparation for determination of total phenolic content in a flour, obtained from apple pomace submerged fermented with *A. brasiliensis*. Fractional factorial design 2^{4-1} was used, with the variables: liquid extractor composition, alcohol concentration in liquid extractor, time of extraction and method of extraction, using Folin-Denis method. Other optimizations were performed with the significant variables. The best method of extraction used 70% ethanol in homogenizer for 15 min. The total phenolic content in flours of apple pomace fermented with *A. brasiliensis* was lower (0.04852 ± 0.001458) that the content found in unfermented flour (0.1098 ± 0.001246) ($p=3,331 \cdot 10^{-16}$). The factorial design system was effective to optimize results. The lowest concentration of phenolics in fermented flour is probably due to fungus has metabolized these compounds.

Key words: *Agaricus blazei*; factorial design; mycelium; mushroom.

1 Introdução

O cultivo e a exploração de cogumelos comestíveis é de grande interesse comercial. O *Agaricus brasiliensis* (*A. blazei* Murrill [1]), ou cogumelo do sol [2], cultivado e comercializado no Brasil, tem sido focado por apresentar propriedade imunomoduladora [1], anti-inflamatória, anticancerígena [3], no combate ao estresse físico e emocional, por evitar riscos de doenças como a osteoporose e úlcera gástrica e pela ação antioxidante [4].

Os cogumelos são considerados como alimentos nutracêuticos, pois apresentam eficácia quando consumidos como suplementos alimentares [4]. O uso de *A. brasiliensis* como nutracêutico é porque sua ingestão aumenta as defesas imunológicas do organismo [3]. Essa espécie é comercializada desidratada, em pó ou fatiada, e é indicada como suplemento alimentar e nutracêutico, considerando suas propriedades nutricionais (alimento funcional) [3]. Há interesse, na indústria nacional, em comercializar essa espécie sob outras formas, como em farinhas fermentadas com esse fungo (biofarinhas) para, por exemplo, enriquecer alimentos com compostos antioxidantes.

Tendo em vista que alguns antioxidantes sintéticos, tais como BHA (butil hidroxi-anisol) e BHT (butil hidroxitolueno), possuem propriedades tóxicas e carcinogênicas [5], pesquisadores têm-se dirigido no sentido de encontrar antioxidantes naturais, que são mais seguros e aceitos pelo consumidor. Além de que, podem substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, diminuindo sua concentração nos alimentos, cosméticos, medicamentos e correlatos [4].

O organismo produz, normalmente, radicais livres que são átomos ou moléculas produzidos de forma contínua e que apresentam um elétron desemparelhado. Em virtude disso, são entidades químicas extremamente reativas, apesar de, no organismo humano, desempenharem importantes funções. Entretanto, em demasia podem causar danos às células, sendo, inclusive, esse excesso relacionado com o desenvolvimento de várias doenças [6]. Nessa situação, os antioxidantes podem controlar ou prevenir as lesões causadas pelos radicais livres. Os antioxidantes são encontrados em vários alimentos e podem neutralizar a ação dos radicais ou, ainda diretamente, reagir com esses, extinguindo-os. Esses mecanismos de ação dos antioxidantes dividem-se em

dois grandes grupos: aqueles que inibem a formação de radicais livres que iniciam o processo oxidativo (etapa de iniciação), ou ainda, aqueles que impedem a propagação da sequência oxidativa, por inibirem radicais chave (etapa de propagação) pela doação de átomos de hidrogênio, interrompendo a reação em cadeia [7].

Os cogumelos possuem grande quantidade de antioxidantes, dentre os quais, podemos destacar os compostos fenólicos, que agem como sequestradores de radicais livres e bloqueadores de reações em cadeia [8]. Esses parecem ser os principais responsáveis pela atividade antioxidante do *A. brasiliensis* por sua alta concentração [9]. O *A. brasiliensis* fresco contém vitaminas B1 (Tiamina), B2 (Riboflavina), B3 (Niacina), D3 (Ergosterol), além de compostos fenólicos. A alta concentração de tocoferóis no *A. brasiliensis* também pode estar relacionada à sua propriedade antioxidante [10].

Para a determinação de compostos fenólicos, é necessário otimizar o preparo da amostra, que pode ser feito por método univariado (uma variável por vez), ou por método multivariado (relacionando todas as variáveis). Este último pode ser efetuado por meio de planejamento fatorial (PF), que permite a otimização simultânea de vários fatores envolvidos no sistema com menor número de experimentos, rapidez, eficiência e diminuição de custos [11], analisando a significância de variáveis e indicando as condições ótimas para obtenção dos melhores resultados [12]. Portanto, o presente trabalho objetivou otimizar o preparo de amostra, para a determinação de fenólicos totais em uma biofarinha de bagaço de maçã fermentada com *A. brasiliensis*.

2 Materiais e métodos

2.1 Obtenção da biofarinha do cultivo submerso

O material foi cedido pelo laboratório de microbiologia do departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO. O inóculo foi cultivado em erlenmeyers com meio Padrão contendo (g.L⁻¹): glicose (20), extrato de levedura (3,95), MgSO₄.7H₂O (0,3), e K₂HPO₄.3H₂O (0,5); com pH ajustado a 6,0 (±0,2) em potenciômetro com NaOH 0,1N, esterilizados a 121°C por 15 min. Foram inoculados cinco pedaços (1cm²) de ágar com micélio do cogumelo em 50 mL de meio e incubados a 30°C a 120 rpm por 7 dias. O micélio foi separado

do caldo por filtração em tela (malha de 0,5 mm²), dividido em duas partes. Uma parte foi passada através da tela com auxílio de uma espátula com 50 mL de água destilada esterilizada. Essa suspensão de micélio foi usada na concentração de 5% (v/v) para produção de micélio por cultivo submerso e inocular o substrato sólido.

Foram utilizados 4,0 kg de maçãs da cultivar Gala, selecionadas, lavadas e sanitizadas (50 mg/L durante 20 minutos seguido de enxágue com água potável). As frutas foram cominuídas em processador de alimentos (METVISA-MPA). A massa triturada foi prensada a 3,0 kgf/cm² durante 1 minuto (Prensa Hidráulica Eureka, 15 ton). Após a operação de prensagem, o material sólido resultante, denominado de bagaço de maçã, foi lavado em água corrente e colocado para desidratação em estufa de circulação de ar (60°C/12h, MA-035 Marconi), em seguida triturado (METVISA-MP200) e condicionado em embalagens plásticas.

O cultivo submerso foi conduzido em Erlenmeyers (volume de 250 mL) contendo 10% de bagaço de maçã em meio aquoso, com pH de 6,0, esterilizado a 121°C por 15 min e inoculado com 5% da suspensão de micélio do inóculo, incubado a 30°C por 7 dias a 120 rpm. Em seguida, o micélio foi filtrado em papel filtro Whatmann, seco em estufa a 45-50°C e moído a pó, armazenado em frascos fechados a -18 °C para mensuração do conteúdo fenólico. Esse material foi definido como biofarinha fermentada. Bagaço de maçã do mesmo lote foi submetido ao mesmo processo de fermentação, porém sem o fungo e igualmente tratado, originando a biofarinha não fermentada.

2.2 Moagem e determinação da granulometria do material vegetal

O mosto seco passou por processo de moagem em moinho do tipo copo. A biofarinha fermentada e não fermentada obtida foi peneirada em tamis com abertura de malha de 0,25 mm, com o rendimento de cada granulometria calculado.

2.3 Determinação de umidade

O método gravimétrico [13] utilizou cerca de 1,0 g da biofarinha fermentada e não fermentada (n=3).

2.4 Curva analítica

Usou-se padronização externa com o ácido 4-hidroxicinâmico (ácido *p*-cumárico - APC) e o método de Folin-Denis para determinação de fenólicos totais [14]. Diferentes volumes de uma solução de APC 0,214 mg.mL⁻¹ foram tratados com 0,5 mL de reagente Folin-Denis e 1 mL de Na₂CO₃ 15% p/v, sendo o volume final completado com água para 10 mL, originando concentrações finais de 0,428 a 5,136 µg.mL⁻¹. Após 30 min foram realizadas leituras em 720 nm, em triplicata, de cada concentração. O branco constou dos mesmos reagentes e procedimento sem APC. Os resultados foram plotados no programa Origin® obtendo-se equação de reta, intervalo e coeficiente de correlação linear (R²).

2.5 Otimização do preparo de amostra e doseamento das biofarinhas

Usou-se planejamento fatorial fracionário 2⁴⁻¹ com ponto central (n=5). As variáveis testadas foram: composição do líquido extrator (metanol ou etanol); concentração do álcool no líquido extrator (50% ou 70%); tempo de extração (5 ou 15 min); e método de extração (vórtex ou ultrassom), conforme a matriz de contrastes, exemplificada na tabela 1.

Tabela 1. Matriz de contrastes do planejamento fatorial fracionário 2⁴⁻¹ com ponto central.

Ensaio	Composição do líquido extrator	Concentração do álcool no líquido extrator	Tempo de extração	Método de extração
1	-1 (metanol)	-1 (50%)	-1 (5 min)	-1 (vórtex)
2	1 (etanol)	-1	-1	1 (ultrassom)
3	-1	1 (70%)	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1 (15 min)	1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1
Ponto central (n=5)	mistura de metanol a 50% (0,75 mL) mais etanol a 70% (0,75 mL)		Extração com ultrassom (5 min) mais vórtex (5 min)	

Exatamente 0,200 g das amostras de biofarinha (granulometria maior que 0,250 mm) tiveram a adição de 1,5 mL de líquido extrator com o método de extração e tempo definidos pela matriz de contrastes. A mistura foi centrifugada a 4000 rpm /15 min e o sobrenadante recolhido. Alíquotas (250 μ L) desse sobrenadante foram secas em banho-maria (60 °C) por 40 min e o material foi ressuspensão com três lavagens com água destilada (1,0 mL cada). As lavagens foram recolhidas em balão volumétrico (10 mL), tratadas pelo método Folin-Denis, o volume completado com água destilada e o resultado expresso conforme a curva analítica. O branco constou de todos os componentes da amostra original, exceto o extrato da biofarinha.

Definidas as variáveis significativas e o melhor método obtido no PF, realizou-se nova otimização univariada somente para o método de extração, utilizando-se dois métodos: com vórtex ou homogeneizador por inversão (n=9 para cada grupo), sendo que, em ambos, a extração foi por 15 min, com etanol 70%. Com a metodologia otimizada, realizou-se a determinação de fenólicos da biofarinha fermentada com *A. brasiliensis* e não fermentada (n=10), usando-se, para a extração da farinha fermentada, 3 mL de líquido extrator e para a não fermentada 3,5 mL, em função de resultados em relação à curva analítica.

2.6 Tratamento dos dados

Os resultados da análise de umidade e do PF foram tratados com o teste de rejeição Q a 95 % [15], além de serem analisados pelas planilhas de quimiometria [16]. Avaliou-se o PF por meio do desvio do efeito (DE) – Equação (1), onde

$$DE = t.dp \quad (1)$$

sendo t o valor da distribuição t de Student com $\alpha=0,05$, com quatro graus de liberdade, bem como dp é o desvio padrão dos valores do ponto central. O DE foi contrastado com o efeito calculado (ef) - Equação (2) - para cada variável, onde

$$\frac{\sum_{i=1}^{n/2} y_{i(+)} - \sum_{i=1}^{n/2} y_{i(-)}}{n/2} \quad (2)$$

sendo ef o efeito calculado para as variáveis e interações usando a diferença entre as médias das observações no nível mais ($y_{i(+)}$) e as médias das observações no nível menos ($y_{i(-)}$), para n ensaios e y_i observações individuais [16]. Para a avaliação dos resultados da otimização univariada e comparações, utilizaram-se os testes estatísticos ANOVA, Bonferroni e Tukey com $\alpha=0,05$.

3 Resultados e discussões

3.1 Determinação da granulometria do material vegetal

O rendimento da biofarinha de maçã fermentada com *A. brasiliensis* foi de 17,73% para partículas com diâmetro superior a 0,25 mm, e de 23,08% para biofarinha não fermentada, em partículas com diâmetro superior a 0,25 mm. A definição de uma granulometria tem por objetivo uniformizar o teste, para que as repetições não apresentem variações em função de diferentes tamanhos de partículas.

3.2 Curva analítica

O APC foi empregado em sete concentrações diferentes, de 0,428 a 5,136 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A equação obtida pode ser expressa como $y = 108,0568 \cdot x + 0,07543$, com $R^2 = 0,99128$. A legislação brasileira recomenda que, para métodos analíticos, seja construída uma curva com, no mínimo, cinco concentrações diferentes e que a mesma apresente um R^2 superior a 0,99 no mínimo [17]. No presente estudo, a curva foi elaborada com sete concentrações e o R^2 superior a 0,99, de acordo com o exigido.

3.3 Otimização do preparo de amostra e doseamento das biofarinhas

No PF 2^{4-1} , o DE obtido foi de 0,052245, com efeito de 1ª ordem para o método de extração. Quando o método de extração é alterado de vórtex para ultrassom, há uma diminuição no teor extraído de compostos fenólicos. Entretanto, foram percebidos efeitos de 2ª ordem entre "composição do líquido extrator + concentração do álcool no líquido extrator", "composição do líquido extrator + método de extração", "concentração do álcool no líquido extrator + tempo de extração" e "tempo de extração + método de extração" (Tabela 2). Os melhores resultados foram obtidos com o

uso de etanol a 70%, em extração por 15 min em vórtex – no caso dessa última variável, como o ef de 1ª ordem do método de extração foi maior que o ef de 2ª ordem ($0,08245 > 0,06861$, pois os valores são analisados em módulo), optou-se pelo vórtex.

Tabela 2. Resultado da significância das variáveis do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para determinação de compostos fenólicos ($DE = 0,052245$).

Variável	Ef	Resultado
Composição do líquido extrator	-0,04816	VNS
Concentração do álcool no líquido extrator	-0,01818	VNS
Tempo de extração	-0,03159	VNS
Método de extração	-0,08245	VS, melhores valores com vórtex
Composição do líquido extrator + concentração do álcool no líquido extrator	0,06861	VS, melhores resultados com etanol a 70%
Composição do líquido extrator + tempo de extração	0,01595	VNS
Composição do líquido extrator + método de extração	0,06991	VS, melhores resultados para etanol em ultrassom
Concentração do álcool no líquido extrator + tempo de extração	0,06991	VS, melhores resultados com álcool em 70% e 15 min de extração
Concentração do álcool no líquido extrator + método de extração	0,01595	VNS
Tempo de extração + método de extração	0,06861	VS, melhores resultados para 15 min de extração em ultrassom

Legenda: DE: desvio do efeito; ef: efeito calculado para cada variável, VS: variável significativa; VNS: variável não significativa.

Mediante esses resultados, definiu-se a extração por 15 min, com etanol 70% como a mais eficaz. Como a extração com vórtex apresentou melhores resultados do que com o ultrassom, a próxima etapa de otimização foi univariada, em dois grupos ($n=9$), sendo eles vórtex e homogeneizador por inversão. O método de extração mais eficiente foi o que usou o homogeneizador, apresentando diferença significativa por ANOVA ($p= 9,41.10^{-4}$) com a extração por vórtex. O método de extração otimizado então foi definido com etanol a 70%, em homogeneizador por 15 min.

O PF é uma importante e simples ferramenta estatística, que permite a análise dos

resultados considerando todos os parâmetros experimentais envolvidos, bem como fornece o efeito das possíveis interações entre as variáveis analisadas [18]. Essa ferramenta ajuda a definir as melhores condições operacionais de um sistema, ou seja, faixas que maximizem os resultados, realizando-se um número reduzido de ensaios experimentais e, também, avalia quando as associações de variáveis possuem um efeito sinérgico ou antagônico. Sem o uso de PFs, importantes interações entre as variáveis não são detectadas, levando-se mais tempo para se determinarem as condições ótimas, além de gerar mais gastos por aumentar o número de ensaios [19]. Para a realização do planejamento, são selecionadas variáveis que, provavelmente influenciaram no sistema, e são executados experimentos variando-se os níveis, que podem ser quantitativos (por exemplo: concentrações de uma substância, valores de pH etc.) ou qualitativos (tipos de ácidos, tipos de agitação, etc.). Estes são nomeados pelos sinais - (menos) ou + (mais), não sendo um critério definido a nomeação dos sinais, sendo importante apenas a relação inicial entre o sinal dado e o efeito obtido [16].

Considerando que os efeitos de altas ordens são quase sempre não significativos, a utilização de PFs fracionários apresenta a vantagem de um número reduzido de experimentos, de forma mais rápida (nv^{-x} , onde x é a redução, sendo o valor 1 para metade dos experimentos, por exemplo), fornecendo as informações com os efeitos mais importantes (primeira e segunda ordem). Retira, na maioria das vezes, as mesmas conclusões caso fosse realizado um planejamento completo [16].

A extração de compostos fenólicos em produtos naturais sofre influência da natureza química da matriz, solventes extratores, condições de extração, bem como método, tempo e temperatura de extração [5] o que justifica a grande variedade de resultados obtidos por diferentes pesquisadores. Para quantificação de compostos antioxidantes de fontes naturais, é essencial a realização da extração com solventes de polaridades diferentes [4]. Os compostos fenólicos são substâncias de elevada polaridade, que podem ser extraídos por meio de solventes como metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações [20]. Quando se trata de solventes orgânicos, o metanol, por conseguir extrair maiores quantidades de metabólitos, tem sido indicado como o mais efetivo [21]. Por isso, a escolha foi entre dois álcoois de fácil acesso, o metanol e etanol, em proporções diferentes, com

água. A água é considerada o solvente universal que, quando combinada com outros solventes orgânicos, ajuda a tornar o meio um pouco mais polar, o que favorece a extração de compostos fenólicos [22].

Estudos anteriores apontam que extratos metanólicos de *Lentinus edodes* e *A. brasiliensis*, independente do tipo de extração, apresentaram maior atividade antioxidante do que os extratos etanólicos [4]. Como os compostos fenólicos são substâncias antioxidantes, esperava-se a mesma resposta; entretanto, em nossa análise, percebeu-se que, ao diminuir a polaridade - ao acrescentar etanol e diminuir o percentual de água -, a quantidade extraída de substâncias fenólicas aumenta.

Em outro trabalho, o corpo de frutificação de *A. blazei* Murill foi extraído sob a forma de decocção e de maceração, com água. Verificou-se, *in vitro*, a resistência à oxidação por meio de três mecanismos: inibição do processo oxidativo enzimático (por inibição de 100% das enzimas horseradish peroxidase e mieloperoxidase); inibição do estresse oxidativo celular (por meio da inibição de 80% da ruptura oxidativa de neutrófilos polimorfonucleares); e ação direta em espécies reativas (pela supressão de 62% de HOCl e 87% do radical ânion superóxido $O_2^- \bullet$) [23].

Porém, ainda não foi desenvolvido um sistema satisfatório de extração com solventes para a quantificação de todos os antioxidantes ou uma classe específica desses compostos por vários fatores. Os resultados obtidos podem ser justificados devido à grande variedade e quantidade de compostos presentes nos cogumelos (compostos fenólicos como ácidos fenólicos, flavonoides e tocoferóis), possibilidade de interação com carboidratos, proteínas e outros componentes dos alimentos, além do fato de esses compostos variarem do simples ao altamente polarizado [24].

O efeito da variável tempo no rendimento da extração não é um fator amplamente analisado [4]. Quando se trata de tempo de extração, várias metodologias utilizadas consideram um fator importante o período de maceração melhorando a eficiência da extração [22]. Outros estudos afirmam que o tempo de extração tem pouca influência quando comparado ao tipo de solvente utilizado [4]. Por exemplo, para o extrato aquoso de uva, ocorre um pequeno aumento no rendimento com o aumento do tempo de extração, enquanto que, para o extrato etanólico, o rendimento aumentou significativamente com o tempo. Em outra análise, extratos de frutas vermelhas

foram preparados com etanol, metanol e água e tempos de extração de 1, 12 e 24 h. Analisando-se os resultados, o conteúdo de polifenóis diminuiu no extrato aquoso com maior tempo de extração, mas, nos extratos metanólicos e etanólicos, houve aumento do conteúdo desses compostos com o aumento do tempo [25].

Neste caso, uma hipótese seria que a alteração do rendimento em função do tempo de extração depende de todas as variáveis envolvidas no processo, não podendo ser analisado mediante cada variável isoladamente, pois pode ter alteração em função da matriz de extração, bem como na classe de substância fenólica envolvida (ácidos orgânicos, flavonoides, alcaloides etc). Nesse sentido, o PF é a ferramenta que mais se adequa a esse tipo de investigação.

Substâncias fenólicas são passíveis de oxidação [26], ou seja, sistemas que propiciem maior contato com o oxigênio podem desencadear reações de oxidação nesses compostos. Dessa forma, tal fator pode ter influenciado na otimização do método de extração (ultrassom, vórtex, homogeneizador). O ultrassom propicia a implosão de bolhas de cavitação, gerando grande quantidade de energia, oxidando os compostos, explicando a menor quantidade de fenólicos obtida. O vórtex provoca agitação com bastante aeração, ou seja, incorporando oxigênio no sistema [27]. Já a agitação por inversão promove o choque das partículas com o líquido em função da gravidade, podendo ser entendida como um sistema que, possivelmente, desencadeie menor oxidação que os anteriores, explicando, assim, os resultados obtidos.

A partir da extração otimizada (etanol a 70%, em homogeneizador por 15 min), mensurou-se o teor de fenólicos totais nas biofarinhas de bagaço de maçã. A amostra de biofarinha fermentada apresentou teores de fenólicos totais menores ($0,04852 \pm 1,458 \cdot 10^{-3}\%$ em APC, $n=7$ após o teste Q, Desvio Padrão Relativo - DPR=4,34%) que o teor encontrado na biofarinha sem fermentar ($0,1098 \pm 1,246 \cdot 10^{-3}\%$, $n=7$ após o teste Q, DPR=1,53%) (ANOVA $p=3,331 \cdot 10^{-16}$; Bonferroni $p=2,910 \cdot 10^{-16}$; Tukey $p=1,252 \cdot 10^{-7}$) – apresentado na figura 1.

Compostos fenólicos apresentam excelentes propriedades antioxidantes. Antioxidantes são compostos que previnem ou reduzem os efeitos nocivos dos processos ou das reações que levam à oxidação de estruturas celulares, protegendo os sistemas biológicos [5]. Agem através de diferentes mecanismos, tais como quelantes de metais,

sequestradores de radicais livres, decomposição de peróxidos, inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio entre outros [21], sendo que os produtos intermediários formados pela ação desses compostos são relativamente estáveis, pois o anel aromático dessas estruturas apresentam ressonância [5].

A quantificação de compostos fenólicos é realizada por vários métodos, todavia, o reagente de Folin-Denis é simples e comumente mais utilizado [28]. Este baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas em meio alcalino, produzindo um complexo de coloração azul, medindo espectrofotometricamente entre 620 e 740 nm. Porém este método não é específico, pois determina todos os fenólicos presentes, mais substâncias redutoras adicionadas aos alimentos ou presentes naturalmente, interferindo nos resultados [20].

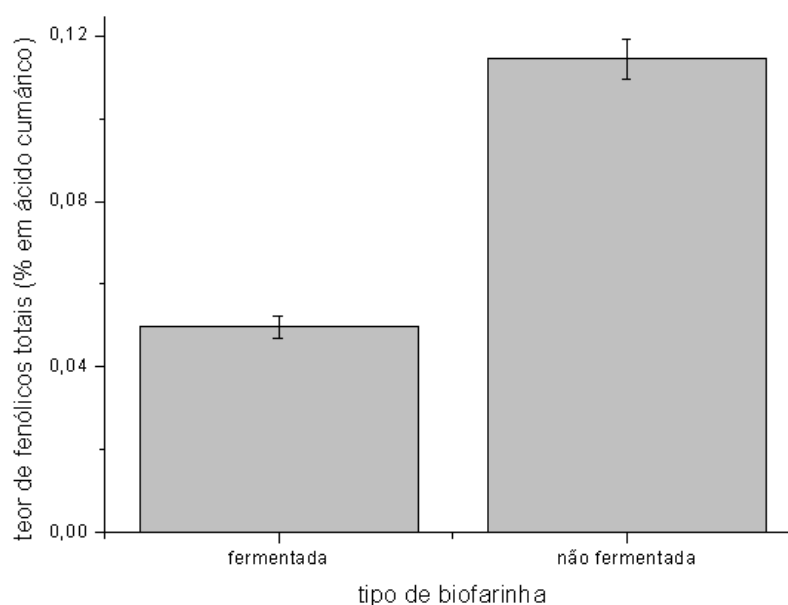


Figura 1. Teores de fenólicos totais em amostras de biofarinha fermentada com *A. brasiliensis* e não fermentada.

Para doseamentos, a legislação brasileira preconiza um máximo de 5% para o DPR [17]; portanto, os valores obtidos nos doseamentos estão dentro do exigido.

No processamento da maçã para obtenção de suco, ocorre a formação de uma

quantidade razoável de resíduo industrial, composto pela mistura heterogênea de polpa, casca, semente, haste e cálice, chamado de bagaço. O bagaço permanece com seus componentes bioativos em sua biomassa fresca, mesmo após o processo de produção do suco. A maçã apresenta elevado teor de metabólitos, tais como flavonóides, polifenóis e ácidos fenólicos, encontrados na polpa e, principalmente, em sua casca, que fornece as propriedades antioxidantes dessa fruta [29].

O conteúdo de fenólicos totais que permanece no bagaço de maçã é elevado (134,45 a 522,74 mg em ácido gálico.100 g⁻¹), o que indica o potencial antioxidante desse subproduto. Com isso, são importantes estudos que avaliem os descartes da indústria alimentícia [29]. Além de que, a incorporação de *A. brasiliensis*, ao bagaço, pode ser útil para potencializar, ainda mais, a atividade antioxidante, pois esse cogumelo também apresenta metabólitos com tais propriedades. Pesquisa anterior realizou o doseamento de fenólicos totais em basidiomas jovens (corpo de frutificação) de *A. brasiliensis* com etanol a 70%, sob agitação por 3 h. A concentração de fenólicos totais, de acordo com o método de Folin-Ciocalteu, foi de 1,94 ± 0,39 mg de catequina.mL⁻¹ de extrato ou 1,94% em catequina [5], ou seja, há fenólicos presentes no corpo de frutificação. Em outro trabalho, foi mensurado o teor de fenólicos totais em extratos de basidiomas de *A. brasiliensis*, obtidos por extrações de forma rápida (em liquidificador por 30 min) ou de forma lenta (em shaker, por 3 h) em diferentes solventes: água, metanol:água, etanol:água, metanol e etanol. O experimento utilizou esquema fatorial no delineamento inteiramente casualizado. Nesse, o melhor solvente de extração foi a água, sem diferença estatística entre a extração rápida e lenta (em torno de 130 mg de ácido gálico.g⁻¹) [4]. Já outros estudos em extratos etanólicos de grãos de trigo fermentados com micélio de *A. brasiliensis* (2% p/v), apresentaram 0,576 mmol de ácido gálico 100 g⁻¹ (98,03 mg.100 g⁻¹) no resíduo seco (os grãos de trigo sem fermentar tiveram concentração significativamente inferior) [30]. Com base nisso, o resultado obtido neste experimento não foi o esperado, pois o ideal seria que a biofarinha fermentada com *A. brasiliensis* tivesse fornecido um maior rendimento de fenólicos totais em relação à biofarinha não fermentada. Porém, o fungo pode ter utilizado essas substâncias fenólicas, tanto da maçã quanto as próprias que ele produz, para seu crescimento e desenvolvimento. Deve-se levar em consideração o fato

de que fungos secretam enzimas durante seu desenvolvimento e degradam compostos orgânicos e outros nutrientes para o seu crescimento [31], podendo ter desencadeado um processo de degradação e/ou alteração das estruturas fenólicas (por exemplo, a estrutura molecular do composto passou a ter uma metoxila no lugar de uma hidroxila, ocasionando uma falsa diminuição na concentração de compostos fenólicos, pois o método utilizado para o doseamento usa as hidroxilas fenólicas). Pode-se garantir que ocorreram as mesmas perdas desses compostos durante o processo, pois a biofarinha fermentada e não fermentada foram submetidas às mesmas condições de fermentação.

É importante salientar que, em nosso grupo de trabalho, resultados anteriores de avaliação antioxidante com a mesma biofarinha fermentada indicou uma capacidade antioxidante expressa como $74,581 \pm 0,0225$ mmol de ácido ascórbico.100 g⁻¹, mediante a extração com metanol a 70% em vórtex por 15 min, na proporção de 50 mg de farinha para 1,5 mL de líquido extrator. Inclusive, ocorreu diferença significativa ($p = 0,0132$) entre a biofarinha fermentada *versus* a não fermentada ($69,152 \pm 0,0314$ mmol de ácido ascórbico.100 g⁻¹) [32].

4 Conclusões

O sistema de planejamento fatorial destaca-se como um instrumento eficaz para otimização de resultados. A melhor metodologia de extração para compostos fenólicos da biofarinha com granulometria superior a 0,25 mm utilizou como solvente extrator o etanol a 70% em homogeneizador por 15 min. Com isso, obteve-se, para a amostra de biofarinha não fermentada com *A. brasiliensis*, $0,1098 \pm 1,246.10^{-3}$ % de fenólicos totais expressos em APC, e na fermentada $0,04852 \pm 1,458.10^{-3}$ %, sendo que este valor foi inferior ao da biofarinha não fermentada, provavelmente em função de o fungo ter utilizado esses compostos para o seu crescimento. Com base nos resultados obtidos, trabalhos futuros, com cromatografia acoplada à espectrometria de massas, podem auxiliar no real doseamento de substâncias fenólicas de forma individualizada.

5 Agradecimentos

À UNICENTRO.

Referências

- [1] HENRIQUES, G.S.; SIMEONE, M.L.F.; AMAZONAS, M.A.L.A. Avaliação in vivo da qualidade protéica do champignon do Brasil (*Agaricus brasiliensis* Wasser et al.). *Rev Nutr*, v. 21, p. 535-543, 2008.
- [2] KUROZAWA, L.E.; EL-AOUAR, Â.A.; MURR, F.E.X. Obtenção de isotermas de dessecção de cogumelo in natura e desidratado osmoticamente. *Ciênc Tecnol Aliment*, v. 25, p. 828-834, 2005.
- [3] SIQUEIRA, F.G. Efeito do teor de nitrogênio, inoculantes e métodos de compostagem para cultivo de *Agaricus blazei*. Dissertação de Mestrado. Minas Gerais, UFLA 2006.
- [4] SILVA, A.C. Atividade antioxidante dos extratos de shiitake (*Lentinus edodes*) e de cogumelo do sol (*Agaricus blazei*) aplicados em óleo de soja sob aquecimento. Dissertação de Mestrado. São Paulo, UNESP 2010.
- [5] SOARES, A.A. Atividade antioxidante e compostos fenólicos do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill. Dissertação de Mestrado. Maringá, UEM 2007.
- [6] SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr*, v. 15, p. 71-81, 2012.
- [7] PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. Análise da aptidão industrial de seis cultivares de maçãs, considerando suas avaliações físico-químicas (dados da safra 2001/2002). *Ciênc Agrotec*, v. 28, p. 1336-1343, 2004.
- [8] MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. *Rev Nutr*, v. 17, p. 411-424, 2004.

- [9] SILVA, A.C.; OLIVEIRA, M.C.; DEL RÉ, P.V.; JORGE, N. Utilização de extrato de cogumelo como antioxidante natural em óleo vegetal. *Ciênc Agrotec*, v. 33, p. 1103-1108, 2009.
- [10] MONTEIRO, C.S. Desenvolvimento de molho de tomate *Lycopersicon esculentum Mill* formulado com cogumelo *Agaricus brasiliensis*. Tese de Doutorado. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2008. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/15780/Microsoft%20Word%20-%20TESE%2001-junho202008.pdf;jsessionid=F8C4021F351B62D92FE4610556DE9A8?sequence=1>>. Acesso em: set/2012.
- [11] SCHNITZLER, D.C.; GRASSI, M.T.; QUINÁIA, S.P. Aplicação de planejamento fatorial a protocolo de extração e fixação de sulfetos volatilizáveis por acidificação (SVA) em amostras de sedimento. *Quím Nova*, v. 32, p. 1315-1320, 2009.
- [12] ZANONI, T.B.; CARLOS, I.Z.; TOGNOLLI, J.O.; YAMANAKA, H.; FERREIRA, A.A.P. Otimização de ELISA empregando uma proteína Tc85-11 e planejamento fatorial. *Eclét Quím*, v. 31, p. 63-71, 2006.
- [13] ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira 5.ed. vol. 1, Brasília: ANVISA, 2010. p. 194.
- [14] FOLIN, O.; DENIS, W. Tyrosine in proteins as determined by a new colorimetric method. *J Biol Chem* v.12, p. 245-251, 1912.
- [15] SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J. Fundamentals of analytical chemistry. 7^a ed. Ford Worth: Saunders, 1996. Application of statistics to data treatment and evaluation; p. 47-70.
- [16] TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Quím Nova*, v. 29, p. 338-350, 2006.

- [17] ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução nº 889, de 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, de 02 jun 2003.
- [18] COSTA, L.M.; KORN, M.G.A.; CASTRO, J.T.; SANTOS, W.P.C.; CARVALHO, E.V.; NOGUEIRA, A.R.A. Planejamento fatorial aplicado à digestão de amostras de feijão assistida por radiação micro-ondas. *Quím Nova*, v. 29, p. 149-152, 2006.
- [19] BRASIL, J.L.; VAGHETTI, J.C.P.; ROYER, B.; SANTOS JR., A.A.; SIMON, N.M.; PAVAN, F.A.; DIAS, S.L.P.; LIMA, E.C. Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de biossorção de Cu (II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como biossorvente. *Quím Nova*, v. 30, p. 548-553, 2007.
- [20] ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. *Rev Insti Adolfo Lutz*, v. 66, p. 1-9, 2007.
- [21] OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quím Nova*, v. 32, p. 689-702, 2009.
- [22] VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M.C. Amora-preta (*Rubus* sp.): Otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. *Rev Bras Frutic*, v. 33, p. 1209-1214, 2011.
- [23] HAKIME-SILVA, R.A.; VELLOSA, J.C.R.; KHALIL, N.M.; KHALIL, O.A.K.; BRUNETTI, I.L.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Chemical, enzymatic and cellular antioxidant activity studies of *Agaricus blazei* Murrill. *An. Acad. Bras. Cienc.* v. 85, p. 1073-1081, 2013.
- [24] ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: Técnicas de extração. *Bol Cent Pesqui Process Aliment*, v. 24, p. 319-336, 2006.

- [25] LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A.G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J Food Eng Essex*, v. 71, p. 214-222, 2005.
- [26] RODRIGUES, L.M. Estudo da corrosão do aço para dutos API 5L X56 em solos do RS. Tese de Doutorado. Porto Alegre, UFRGS 2006.
- [27] KALAMUCK, K.M.; CHAHINE, G.L.; HISIAO, C. T.; CHIO, J. K. Remediation and disinfection of water using jet generated cavitation. *Proceedings of 5th International Symposium on Cavitation*, Osaka, Japan, 2003.
- [28] FUNARI, C. S.; FERRO, V.O. Análise de própolis. *Ciênc Tecnol Aliment*, v. 26, p. 171-178, 2006.
- [29] SOARES, M.; WELTER, L.; GONZAGA, L.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. *Ciênc Tecnol Alimen.*, v. 28, p. 727-732, 2008.
- [30] CÓRDOVA, K.R.V.; DALLA SANTA, H.S.; DALLA SANTA, O.R.; PEREZ, E.; WASZCZYNSKYJ, N. Antioxidantes e beta-glucanas em barras de cereais com *Agaricus brasiliensis*. *Bol Cent Pesqui Process Aliment*, v. 30, p. 209-220, 2012.
- [31] DONINI, L.P; BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J.S. Desenvolvimento in vitro de *Agaricus brasiliensis* em meios suplementados com diferentes farelos. *Pesq Agropec Bras*, v. 41, p. 995-999, 2006.
- [32] COLUSSI, T.C.; BENETTI, C.; BOVO, F. DALLA-SANTA, H.S.; PEREZ, E. Avaliação da capacidade antioxidante de uma biofarinha de Macã obtida com *Agaricus brasiliensis* frente ao complexo fosfomolibdênico. *Rev cienc exatas nat*, v. 15, p. 95-112, 2013.