

**Avaliação da Capacidade Antioxidante de uma Biofarinha  
de Maçã Obtida com *Agaricus brasiliensis* Frente ao  
Complexo Fosfomolibdênio**

**Evaluation of the Antioxidant Capacity of an Apple  
Pomace Flour Obtained from *Agaricus brasiliensis* in  
Face of Complex Phosphomolybdenum**

**Tábata Cristina Colussi**

Departamento de Farmácia

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

*tabata\_colussi@yahoo.com.br*

**Cláudia Benetti**

Departamento de Farmácia

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

*claudia\_benetti90@hotmail.com*

**Fernanda Bovo**

Departamento de Farmácia

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

Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos - CPPI, Piraquara, PR

*eperez@unicentro.br*

Recebido em 29/09/2013 - Aceito em 26/11/2013.

RECEN 15(1) p. 95-112 jan/jun 2013 DOI: 10.5935/RECEN.2013.01.06

**Resumo:** O *Agaricus brasiliensis* tem sido muito estudado por suas propriedades nutraceuticas. Como essas propriedades podem estar relacionadas a componentes antioxidantes, o objetivo deste trabalho foi otimizar um método de extração de compostos com capacidade antioxidante em farinhas de bagaço de maçã fermentadas com *Agaricus brasiliensis* e não fermentadas, além de comparar os resultados da capacidade antioxidante dessas farinhas. O método de extração foi otimizado com auxílio de planejamento fatorial, e os extratos obtidos analisados por método de análise de capacidade antioxidante com complexo fosfomolibdênico. O método de extração otimizado utilizou metanol a 70% em vórtex por 15 min, na proporção de 50 mg de farinha para 1,5 mL de líquido extrator, tanto para a biofarinha fermentada como para a não fermentada. Na comparação, a capacidade antioxidante da biofarinha fermentada com *A. brasiliensis* pode ser expressa como  $74,58 \pm 2,25 \cdot 10^{-2}$  mmol de ácido ascórbico por 100 g, significativamente maior que a capacidade antioxidante da biofarinha não fermentada ( $69,15 \pm 3,14 \cdot 10^{-2}$  mmol de ácido ascórbico.100 g<sup>-1</sup>).

**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 antioxidant compounds, the aim of this work was to optimize the extraction method of apple pomace flour fermented (and unfermented) with *Agaricus brasiliensis* aimed at determining antioxidant capacity with phosphomolybdenum complex. Optimization was performed with the aid of factorial design, with the analysis of antioxidant capacity by phosphomolybdenum method. The best method of extraction used was 70% methanol by vortexing for 15 min at the rate of 50 mg of flour to 1.5 ml of liquid extractor. In comparison, the antioxidant capacity of apple pomace flour fermented with *A. brasiliensis* can be expressed as  $74.58 \pm 2.25 \cdot 10^{-2}$  mmol per 100 g ascorbic acid, significantly higher than the antioxidant capacity of unfermented apple pomace flour ( $69.15 \pm 3.14 \cdot 10^{-2}$  mmol of ascorbic acid.100<sup>-1</sup>).

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

## 1 Introdução

Como decorrência da fusão de outras espécies de fungos oriundos da Mata Atlântica do Estado de São Paulo, surgiu, na década de 1960, o *Agaricus blazei Murriel*, popularmente conhecido como cogumelo do sol [1].

Enquanto a maioria dos cogumelos possui grande afinidade por lugares escuros e úmidos, o cogumelo do sol se desenvolve em locais com alta incidência solar, onde, juntamente com o solo, absorve seus nutrientes. É rico em proteínas, vitaminas, sais minerais e inúmeros princípios ativos [3]. O *A. blazei*, também conhecido por *Agaricus brasiliensis*, é composto por uma enorme variedade de substâncias químicas, como os polissacarídeos que funcionam como estimuladores do sistema imunológico [4], além de metabólitos secundários como terpenos, compostos fenólicos, policetídeos e esteroides que, provavelmente, estão relacionados com os efeitos medicinais e funcionais [5].

Radicais livres são átomos ou moléculas continuamente produzidos no organismo humano que possuem um elétron isolado livre para ligar a outro. São altamente reativos e apresentam importantes funções metabólicas. O excesso de radicais livres pode causar danos celulares, sendo que sua cronicidade pode estar relacionada com o desenvolvimento de diversas doenças tais como o diabetes, Alzheimer e outras doenças inflamatórias crônicas [6]. Essas lesões provocadas pelos radicais livres podem ser controladas ou prevenidas com o uso de antioxidantes, substâncias que podem ser encontradas em muitos alimentos. Os antioxidantes podem participar de sistemas enzimáticos com a função de neutralizar diretamente os radicais livres ou a sua ação. Isso pode ser feito por dois mecanismos: inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; ou eliminação de radicais importantes na etapa de propagação por meio da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia [7].

Em média, de 15 a 30% das maçãs comercializadas são descartadas no processo de classificação. Isto ocorre quando essas frutas apresentam algum defeito físico, fisiológico e/ou fisiopatológico, não se adequando aos requisitos exigidos pelos consu-

midores. As maçãs desprezadas são destinadas à indústria a fim de serem utilizadas como matéria-prima na fabricação de sucos, vinhos, destilados e vinagres [8, 9]. O bagaço da maçã representa de 20 a 40% do resíduo do processamento da maçã. Ele é constituído de casca, semente e polpa, sendo que, na casca, encontram-se os compostos fenólicos, tais como flavonoides e antocianinas. Por possuírem compostos fermentáveis, como açúcares em quantidade considerável, o bagaço é considerado um produto instável microbiologicamente, acarretando um impacto ambiental quando descartado [10–12]. Portanto, os bagaços teriam características importantes para o crescimento de *A. brasiliensis*, e esse material fermentado poderia ser utilizado como matéria-prima para a fabricação de produtos nutracêuticos.

Por isso, o objetivo deste trabalho foi otimizar o método de extração de compostos com capacidade antioxidante frente ao complexo fosfomolibdênico de biofarinhas de bagaço maçã, fermentadas ou não por *A. brasiliensis*, avaliando a interferência do fungo na propriedade em questão.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Obtenção da biofarinha do cultivo submerso

O fermentado foi produzido segundo Thomaz [11] na forma de cultivo submerso (mosto). O cogumelo *Agaricus brasiliensis* foi isolado por Fan Leifa em 2000, a partir de uma cultura comercial desse cogumelo no PR e, gentilmente, cedida pelo professor Dr. Carlos Ricardo Soccol, UFPR- cepa LPB-03. Essa cepa encontra-se depositada no cepário do laboratório de Microbiologia - DEALI - UNICENTRO. O inóculo foi cultivado em erlenmeyers com meio Padrão contendo (g.L<sup>-1</sup>): glicose (20), extrato de levedura (3,95), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,3), e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O (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 (1cm<sup>2</sup>) 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 mm<sup>2</sup>), dividido em duas partes. Uma parte foi passada pela 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/cm<sup>2</sup> durante 1 minuto (Prensa Hidráulica Eureka, 15 ton). Após a operação de prensagem, o material sólido resultante, denominado 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 acondicionado 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 moídos a pó, armazenado em frascos fechados a -18 °C, para mensuração da capacidade antioxidante. Esse foi peneirado e o resíduo foi transferido para placas de Petri. Centrifugou-se o líquido peneirado por cinco minutos a 4000 rpm e o precipitado foi reunido ao resíduo da tamisação. Esse material foi seco em estufa a 60 °C por 24 horas, originando a biofarinha. A biofarinha sem a fermentação com *A. brasiliensis* foi obtida da mesma forma, inclusive com o mesmo lote de maçãs.

## 2.2 Moagem e determinação da granulometria do material vegetal

O mosto seco passou por processo de moagem em moinho do tipo copo, marca Ika, mod. A11 basic. O pó obtido foi tamisado em tamis com abertura de malha de 0,25 mm, com o rendimento de cada granulometria calculado.

## 2.3 Determinação de umidade

O teor de umidade foi determinado por perda de massa por dessecação em estufa a 105 °C até peso constante, a partir de 1 g de amostra, em triplicata [13].

## 2.4 Determinação da capacidade antioxidante

### 2.4.1 Determinação da curva analítica

Utilizou-se, como padrão externo, o ácido L-ascórbico PA (AA), para a construção da curva analítica. Uma solução-estoque de ácido ascórbico 3,577 mM foi preparada e tratada conforme a metodologia antioxidante de avaliação por complexo fosfomolibdênico [14]. Diferentes volumes de solução estoque foram adicionados a 1500  $\mu$ L de solução reagente oxidante (0,6 M de ácido sulfúrico com 28 mM fosfato de sódio e 4 mM molibdato de amônio), aquecidos em banho-maria a 95°C por 90 min. As soluções resultantes foram centrifugadas por 10 min a 3996 rpm e, a seguir, fez-se a leitura das absorvâncias em 696 nm, para a obtenção da equação da reta, intervalo e coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) [15].

### 2.4.2 Obtenção dos extratos e determinação da capacidade antioxidante

Amostras de biofarinha fina fermentada e não fermentada (granulometria maior que 0,250 mm e menor que 0,8 mm de tamanho de partícula) foram submetidas à extração dos compostos com capacidade antioxidante, com auxílio de planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  (ponto central  $n = 5$ ) para otimização do processo.

Para a avaliação da capacidade antioxidante, neste trabalho, utilizou-se o método com complexo fosfomolibdênico, o qual compreende a redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) na presença de substâncias antioxidantes, resultando em um complexo de cor verde compreendido por fosfato/molibdênio (V). Esse complexo é compatível com solventes orgânicos (metanol, etanol, dimetil sulfóxido e n-hexano)[14].

As amostras foram pesadas (0,050 g) e tiveram a adição de 1,5 mL de diferentes tipos de solventes de extração (metanol ou etanol, a 50% ou 70% v/v), sendo processadas em vórtex ou ultrassom em tempos pré-determinados (5 ou 15 min), conforme a matriz de contrastes (Tabela 1). A mistura, em seguida, foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos. Uma alíquota do sobrenadante de 75 mL dos extratos obtidos pelo planejamento fatorial foi adicionada a 1500  $\mu$ L de SRO e 325  $\mu$ L de água destilada. Submeteu-se a mistura a aquecimento por 90 min a 95 °C. Após resfriamento, a mistura foi centrifugada nas mesmas condições e absorvância da solução do

sobrenadante foi medida em espectrofotômetro a 696 nm. Os resultados foram tabulados conforme uma macro do programa Excel® para planejamentos fatoriais [16]. O branco constou de SRO submetida às mesmas condições.

Tabela 1. : Matriz de contrastes do planejamento fatorial fracionário 24-1 com ponto central ( $n = 5$ )

Ensaio	Tipo de solvente	% de solvente	Tempo de extração	Tipo 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 ( $n = 5$ )	75 $\mu$ L de metanol a 60% mais 75 $\mu$ L de etanol a 60%		5 min em ultrassom mais 5 min em vórtex	

Os resultados foram investigados com o teste Q a 95% para rejeição dos resultados e expressos na forma de intervalo de confiança com  $\alpha = 0,05$  [17, 18], além de serem analisados por meio de planilhas de quimiometria [16] com  $\alpha = 0,05$  ou, alternativamente, obteve-se o desvio do efeito (DE) pela equação 1:, onde:

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

sendo t o valor da distribuição t de Student com  $\alpha = 0,05$ , com n-1 graus de liberdade, e dp o desvio padrão dos valores do ponto central, contrastando-se com o efeito calculado (ef) pela equação 2 para cada variável, onde:

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

sendo ef o efeito calculado para cada variável ou interações pela 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].

Com as variáveis significativas e efeitos de 2ª ordem, realizaram-se outros planejamentos fatoriais. Posteriormente, a otimização foi finalizada por método univariado ( $n = 6$ ). Os resultados das comparações univariadas foram avaliados por ANOVA,

Bonferroni e Tukey com  $\alpha = 0,05$  [17, 18].

### 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.

#### 3.2 Determinação de umidade

A umidade obtida da biofarinha de maçã fermentada foi de  $0,59 \pm 1,44.10^{-3}$  %, e da não fermentada foi de  $1,37 \pm 3,09.10^{-3}$  %. A quantidade de água na biofarinha é de grande importância para a conservação da droga, pois, dependendo de sua quantidade, pode facilitar a proliferação de bactérias, fungos e potencializar a atividade de enzimas [19]. Ambas as farinhas, fermentada e não fermentada apresentaram teores de umidade muito abaixo do limite máximo estipulado para farinha de trigo (15%) pela legislação brasileira (incluir o número da referência corrigido). Na literatura foram encontrados valores de umidade variando de 5,14% [20] a 12,00% [21]. O baixo teor de umidade indica maior estabilidade quanto ao desenvolvimento microbiano [22].

#### 3.3 Curva analítica

Foi utilizado o AA em oito concentrações diferentes, e a seguinte equação linear foi obtida:  $Y = 6,8964 \cdot X + 0,0198$  com o intervalo de  $4,1735.10^{-2}$  a  $3,1989.10^{-1}$  mmol.mL<sup>-1</sup> e  $R^2 = 0,99723$ . A legislação brasileira preconiza um valor igual ou superior a 0,99 para o coeficiente de correlação linear, além de uma curva analítica construída por no mínimo cinco pontos [15]; portanto, os resultados obtidos estavam adequados às determinações legais.

### 3.4 Obtenção dos extratos

A cada início de pesquisa se faz necessária uma análise criteriosa para estabelecer as condições experimentais, uma vez que, no Brasil, poucos são os recursos financeiros e laboratoriais disponíveis devido às restrições de verbas. Para tanto, a etapa mais crítica do experimento é a otimização dos parâmetros experimentais de relevância, pois estes visam desenvolver procedimentos aplicáveis a grande escala que resultem em resultados confiáveis [23]. Para verificar o efeito de duas ou mais variáveis que influenciam no experimento, o melhor método dentre todos os disponíveis é o planejamento fatorial, pois, assim, podem-se verificar todas as combinações possíveis dos níveis de cada variável a cada tentativa [24]. Com o uso deste método, pode-se reduzir o número de ensaios sem prejudicar a qualidade da informação; analisar concomitantemente diversas variáveis, separando seus efeitos; determinar a confiabilidade dos resultados; realizar a pesquisa em etapas; representar o experimento por expressões matemáticas e tirar conclusões a partir de resultados qualitativos [25].

O planejamento fatorial  $2^{4-1}$  indicou efeito de 1ª ordem para o tipo de solvente, percentual de solvente e método de extração. Nesse caso, a análise foi executada por desvio de efeito (DE) e efeito de cada variável (ef). O ponto central, após tratamento com o teste Q, apresentou rejeição de um resultado, sendo portanto, trabalhado com  $n = 4$ . O DE obtido que, para esse experimento, foi de  $DE = 0,3602$ . Para o tipo de solvente, notou-se que, quando se usa metanol como líquido extrator, ao invés de etanol, há um aumento na quantidade extraída de antioxidante ( $ef_{metanol \rightarrow etanol} = -2,3137$ ). Em relação ao percentual de solvente, quanto maior a apolaridade do sistema, maior é a extração ( $ef_{5\% \rightarrow 70\%} = +1,0648$ ). Quando alterada a extração de vórtex para ultrassom, o teor de antioxidante se reduz ( $ef_{vortex \rightarrow ultrassom} = -2,8939$ ) (Figura 1).

Foram percebidos efeitos de 2ª ordem significativos entre todas as combinações possíveis, entretanto, todos de impacto inferior aos de 1ª ordem. Destaca-se a associação entre tipo de solvente e tempo, na qual há um efeito deletério sobre a quantidade de antioxidante extraída no uso de etanol em 15 min ( $ef_{etanol+15min} = -1,3373$ ).

Como as demais variáveis significativas eram passíveis de otimizações, seguiu-se

um novo planejamento fatorial  $2^3$  (ponto central  $n = 5$ ) com as variáveis: percentual de solvente (metanol 70% ou 90%); tempo de extração (15 ou 25 min); e tipo de extração (vórtex ou homogeneizador), conforme a matriz de contrastes da tabela 2.

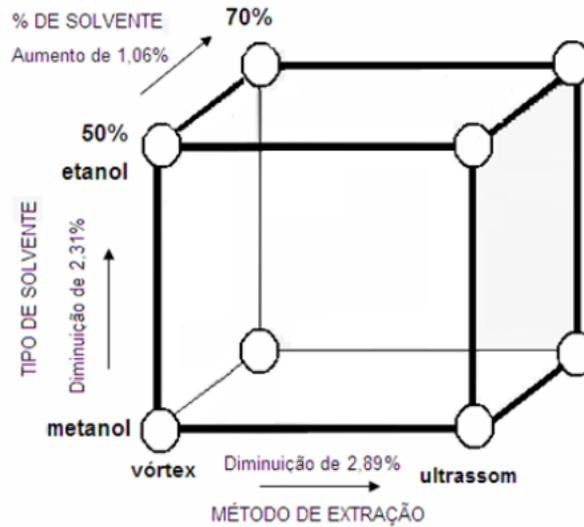


Figura 1. Interpretação geométrica dos efeitos de 1ª ordem para o planejamento fatorial  $2^{4-1}$  com ponto central ( $n = 5$ )

Tabela 2. Matriz de contrastes para o planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central ( $n = 5$ )

Ensaio	% de solvente	Tempo	Método de extração
1	-1 (70%)	-1 (15 min)	-1 (vórtex)
2	1 (90%)	-1	-1
3	-1	1 (25 min)	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1 (homogeneizador)
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
Ponto central ( $n = 5$ )	80% de metanol	10 minutos em vórtex mais 10 minutos de homogeneizador	

Nesse experimento, o DE foi de 3,0231. Observou-se efeito de 1ª ordem somente com o percentual de solvente: com o aumento desse, a quantidade de antioxidantes

extraída reduziu (ef70% → 90% = -7,6642). Quando o tempo de extração foi aumentado, não houve variação significativa; portanto, optou-se pelo menor tempo a fim de reduzir o tempo de realização do experimento. Com relação ao método de extração, não houve variação significativa. Em relação aos efeitos de 2ª ordem, nenhuma das associações foi significativa. Como somente uma variável foi significativa, a próxima otimização foi univariada. Nessa otimização, testaram-se as porcentagens de 65%, 70% e 75% (v/v), utilizando-se metanol, vórtex como método de extração, com tempo de 15 min. Os efeitos obtidos não foram significativos ( $p = 0,6742$  para ANOVA;  $p = 1$  para Bonferroni e  $p > 0,65$  para Tukey), sendo então adotada a porcentagem de 70%.

A extração sólido-líquido de compostos antioxidantes oriundos de fontes naturais tem seu rendimento influenciado pelas condições em que a extração ocorre. A estrutura e composição de substâncias provenientes de fontes naturais são únicas. Isso faz com que, quando postas em contato com solventes, o resultado da interação entre soluto e solvente seja imprevisível [26]. Em extrações líquido-líquido, o uso de solventes com polaridades distintas se faz necessário quando se deseja obter compostos antioxidantes naturais isolados. Entretanto, não há nenhum solvente que seja completamente satisfatório para o isolamento de antioxidantes naturais; isso se deve à polaridade bem variada dos mesmos [27]. Isso também pode ser explicado pela grande variedade da natureza química desses compostos, bem como da sua quantidade presente no alimento; há, também, a possibilidade de interação entre as substâncias antioxidantes e carboidratos, proteínas e outros compostos. Alguns desses compostos, como os compostos fenólicos, são insolúveis em água e, por isso, possuem maior rendimento quando extraídos com solventes polares [28].

Em um trabalho realizado anteriormente com uma biofarinha de trigo fermentada com micélio de *A. brasiliensis*, visando à capacidade antioxidante da mesma, o processo extrativo que obteve a melhor resposta foi com o solvente etanol [29]. Em outra pesquisa realizada com o basidiocarpo de *A. brasiliensis*, houve significância para o tipo do solvente, sendo a melhor resposta obtida com metanol [30]. Ao testar a atividade antioxidante da biofarinha de maçã fermentada com o micélio de *A. brasiliensis* foi notado que o solvente que teve o melhor desempenho também foi o

metanol. Esse comportamento foi devido ao fato de que foram extraídas substâncias antioxidantes polares solúveis em metanol, mas não tão polares a ponto de serem melhor extraídas com etanol. Quanto à porcentagem do solvente, foi observado que quanto menos água o solvente apresentar, melhor a capacidade da extração. Entretanto, se aumentarmos exacerbadamente a apolaridade do mesmo, há um efeito deletério na extração sendo, portanto, necessária uma quantidade intermediária de água no solvente para que se obtenha o máximo da capacidade extrativa.

O tempo de maceração, no qual a amostra fica em contato com a solução extratora, pode ser considerado como importante, melhorando a eficiência da extração. No entanto, se o tempo de contato entre a amostra e o líquido extrator for muito grande, pode haver oxidação da amostra [27]. Estudos feitos com bagaço de uva apontaram que o tempo tem pouca importância na metodologia da extração de antioxidantes quando comparada à importância do tipo de solvente [31]. Portanto, em nossos experimentos, ficou preconizado o tempo de 15 min, para reduzir o tempo de extração, como observado no planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

A agitação da mistura de solvente com a amostra permite a sua homogeneização, melhorando o desempenho da extração pela exposição da superfície de contato das partículas. Em vista disso, o vórtex foi o método extrativo escolhido, pois, neste sistema, a amostra e o líquido extrator são agitados vigorosamente, aumentando com isso a capacidade extrativa. Estudo realizado para o doseamento de antioxidantes em uma biofarinha fermentada com o micélio de *A. brasiliensis* demonstrou efeito de primeira ordem para o método de extração, sendo vórtex o melhor método [29].

### 3.5 Experimentos com a biofarinha fermentada e não fermentada

Com a otimização do método finalizada, partiu-se para a realização dos experimentos comparativos entre a biofarinha de maçã fermentada com *A. brasiliensis* e a biofarinha de maçã não fermentada. Após a obtenção e tratamento estatístico dos resultados, percebeu-se que a melhor ação antioxidante foi a oriunda da biofarinha fermentada ( $13,13 \pm 3,97 \cdot 10^{-3} \%$  ou  $74,58 \pm 2,25 \cdot 10^{-2}$  mmol de ácido ascórbico por 100 g de biofarinha fermentada), sendo que esta difere significativamente da não fermentada ( $12,18 \pm 5,53 \cdot 10^{-3} \%$  ou  $69,15 \pm 3,14 \cdot 10^{-2}$  mmol de ácido ascórbico por

100 g de biofarinha) com um  $p = 0,0132$  por ANOVA, Bonferroni e Tukey.

A maçã traz benefícios à saúde pelo alto teor de componentes bioativos, como os polifenóis que possuem ação antioxidante e as pectinas e ácidos que contribuem para o bom funcionamento do trânsito intestinal [32].

O *A. brasiliensis* fresco é composto por vitaminas B1 (Tiamina), B2 (Riboflavina), B3 (Niacina), D3 (Ergosterol), além de compostos fenólicos, sendo que esses podem ser os principais componentes responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos do cogumelo. A alta concentração de tocoferóis no *A. brasiliensis* também pode estar relacionada à sua propriedade antioxidante [33]. Pesquisas relatam o uso de nutrientes isolados para prevenir doenças deflagradas pelos radicais livres. Porém, nos alimentos, há várias substâncias, como flavonoides, ácidos orgânicos e terpenos que atuam em sinergismo a fim de proteger o organismo do estresse oxidativo [34].

Estudos realizados com o micélio de *A. brasiliensis* em uma biofarinha de trigo demonstraram atividade antioxidante com complexo fosfomolibdênico de  $6,28 \pm 0,14$  mmol de AA por 100 g de biofarinha [29]. Em outros estudos, também realizado com biofarinha de trigo fermentada com micélio de *A. brasiliensis*, a capacidade antioxidante foi testada pelo método ABTS (0,14 mmol de Trolox por 100 g de biofarinha [12] e 0,34 mmol Trolox por 100 g de resíduo seco, advindo de um extrato etanólico a 2% m/v [35]). Esses valores, bem abaixo do encontrado neste trabalho, nos levam a crer que a maçã potencializa a ação antioxidante do cogumelo. As pesquisas realizadas com o micélio de *A. brasiliensis* são escassas, sendo realizada, neste trabalho, uma análise inédita visando à capacidade antioxidante do micélio de *A. brasiliensis* com uma biofarinha de bagaço de maçã que se mostrou com potencial para formulação de nutracêuticos.

## 4 Conclusões

O planejamento fatorial mostrou-se como uma ferramenta útil na otimização de experimentos, através da avaliação da importância e influência de variações em determinados parâmetros. A melhor condição de extração, nesse estudo, incluiu metanol 70%, vórtex como método de extração, com tempo de 15 min; na proporção de 50 mg de biofarinha para 1,5 mL de líquido extrator.

A capacidade antioxidante da biofarinha fermentada foi considerada significativamente maior que a obtida da biofarinha não fermentada ( $p = 0,0132$ ), comprovando-se o efeito da fermentação na capacidade antioxidante da biofarinha. Os resultados indicam que a biofarinha fermentada pode ser avaliada como um possível ingrediente na formulação de alimentos; entretanto, mais experimentos são necessários para avaliar o custo x benefício da biofarinha fermentada.

## 5 Agradecimentos

À UNICENTRO pela concessão de bolsas de Iniciação Científica.

## Referências

- [1] MIZUNO, T. K. Agaricus blazei Murrill medicinal and dietary effects. *Food Rev Int*, v. 11, p. 167-72, 1995.
- [2] FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The Medicinal Mushroom Agaricus blazei Murrill: review of literature and pharmaco-toxicological problems. *Evid Based Complement Alternat Med*, v. 5, p. 3-15, 2008.
- [3] SANTA, H. S. D.; RUBEL, R.; VITOLA, F. M. D.; LEIFA, F.; TARRATHUCH, A. L.; LIMA FILHO, C. J. H.; FIGUEIREDO, B. C.; DALLA SANTA, O. R.; RAYMUNDO, M. S.; SASHA, H.; SOCCOL, C. R. Kidney Function Indices in Mice after Long Intake of Agaricus brasiliensis Mycelia (=Agaricus blazei, Agaricus subrufescens) produced by Solid State Cultivation. *Int J Biol Sci*, v. 9, p. 21-28, 2009.
- [4] SOARES, A. A. Atividade antioxidante e compostos fenólicos do cogumelo Agaricus blazei Murril. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, 2007
- [5] SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. *Rev Nutr* v. 17, p. 227-236, 2012.
- [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] KENNEDY, M.; LIST, D.; LU, Y.; FOO, L. Y.; NEWMAN, R. H.; SIMS, L. M.; BAIN, P. J. S.; HAMILTON, B.; FENTON, G. Apple pomace and products derived from apple pomace: uses, composition and analysis. In: Liskens, H.F.; Jackson, J.F. *Modern methods of plant analysis*. Berlin. Springer. 1999.
- [9] NOGUEIRA, A.; TEIXEIRA, S. H.; DEMIAT, I. M.; WOSIACKI, G. Influência do processamento no teor de minerais em sucos de maçãs. *Ciênc Tecnol Aliment*, v. 27, p. 259-264, 2007.
- [10] ALBUQUERQUE, P. M. Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã. Dissertação de Mestrado. Florianópolis. UFSC. 2003.
- [11] THOMAZ, A. C.; SOSTISSO, C. F.; SANTA, H. S. D.; CÓRDOVA, K. R. V.; RAYMUNDO, M. S. Atividade antioxidante do micélio de *Agaricus brasiliensis*. Anais da II SIEPE - Semana de Integração, Ensino, Pesquisa e Extensão da UNICENTRO. Guarapuava. PR. 2011. .
- [12] OLIVEIRA, M. C. S. Avaliação do processo de fermentação alcoólica de Suco de maçã obtido por liquefação enzimática. Dissertação de Mestrado. UEPG, Ponta Grossa, PR, 2006.
- [13] ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. 5 ed. vol. 1, Brasília. ANVISA, p. 194, 2010.
- [14] PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, v. 269, p. 337-341, 1999.
- [15] 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.

- [16] TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Planilhas Eletrônicas para Cálculos de Planejamentos Experimentais. 2006. Disponível em <http://lqta.iqm.unicamp.br>. Acesso em Set/2012.
- [17] SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. Fundamentals of analytical chemistry. 7 ed. Ford Worth. Saunders, p. 47-70, 1996.
- [18] VIEIRA, S. Estatística experimental. 2 ed. São Paulo. Atlas. 1999.
- [19] OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Farmacognosia. São Paulo. Atheneu. 2005.
- [20] PROTZEK, E. C.; FREITAS, R. J. S.; WASCZYNSKJ, N. Aproveitamento do Bagaço de Maçã na Elaboração de Biscoitos Ricos em Fibras Alimentar. *Bol Cent Pesqui Process Aliment*, v. 16, p. 263-275, 1998.
- [21] FERTONANI, H. C. R.; SCABIO, A.; SCHEMIN, M. H. C.; CARNEIRO, E. B. B.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Influência da concentração de ácidos no processo de extração e na qualidade de pectina de bagaço de maçã. *Semina. Ciênc Agrar*, v. 27, p. 599-612, 2006.
- [22] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil). Instrução Normativa nº 8, de 2 de junho de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade da farinha de trigo. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, de 3 jun 2005. Seção 1.
- [23] PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? *Eng Sanit Ambient*, v. 10, p. 106-110, 2005.
- [24] BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. 2 ed. Campinas. Editora da UNICAMP; 1996.
- [25] BUTTON, S. T. Metodologia para planejamento experimental e análise de resultados, 2005. Disponível em: <http://pessoal.utfpr.edu.br/lincolnusmao/arquivos/Planejamento%20Experimental.pdf>. Acesso em Set/2012.

- [26] SOUSA, A.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L.; BENTO, A.; PEREIRA, J. A. Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives "alcaparras". *Food Sci Technol*, v. 41, p. 739-745, 2008.
- [27] 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 José do Rio Preto. UNESP. 2010.
- [28] ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Bol Cent Pesqui Process Aliment*, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.
- [29] ÁVILA, F. P.; BECKMANN, C; SANTA, H. D.; CÓRDOVA, K. R. B.; REBECCA, R.; PEREZ, E. Ação antioxidante in vitro frente ao reativo fosfomolibdênico - uma investigação com biofarinha fermentada. Anais do XX EAIC- Encontro Anual de Iniciação Científica. Ponta Grossa. PR. 2011.
- [30] MOURÃO, F.; UMEO, S. H.; TAKEMURA, O. S.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B. Antioxidant activity of *Agaricus brasiliensis* basidiocarps on different maturation phases. *Braz J Microb*, v. 42, p. 197-202, 2011.
- [31] SPIGNO, G.; DE FAVERI, D. M. Antioxidants from grape stalks and Marc: influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *J Food Eng*, v. 78, p. 793-810, 2007.
- [32] NEVES, L. S. Fermentado probiótico de suco de maçã. Doutorado. Curitiba. UFPR. 2005. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/20378/tese%20Luciana%20Neves%20Ellendersen.pdf?sequence=1>. Acesso em Set/2012.
- [33] MONTEIRO, C. S. Desenvolvimento de molho de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill formulado com cogumelo *Agaricus brasiliensis*. Doutorado. Curitiba. UFPR. 2008. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/15780/Microsoft%20Word%20-%20TESE%2001->

junho%202008.pdf;jsessionid=F8C4021F351B62D92FE461D0556DE9A8?sequence=1. Acesso em Set/2012.

- [34] BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr*, v. 12, p. 123-130, 1999.
- [35] CÓRDOVA, K. R. V.; SANTA, H. S. D.; SANTA, O. R. D.; 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.