

# Efeito da extração de compostos fenólicos sobre a atividade antioxidante e antibacteriana *in vitro* de cogumelo-do-sol

## *Effect of extraction of phenolic compounds on the in vitro antioxidant and antibacterial activity of sun mushroom*

Flávia Santi Stefanello<sup>1\*</sup>, Carlos Pasqualin Cavalheiro<sup>1</sup>, Fernanda Luísa Ludtke<sup>1</sup>, Mariana Santos da Silva<sup>1</sup>, Liana Inês Guidolin Milani<sup>1</sup>, Ernesto Hashime Kubota<sup>1</sup>

**RESUMO:** O cogumelo-do-sol (*Agaricus blazei* Murril) é amplamente consumido, por conta de suas propriedades medicinais. Este estudo teve como objetivo determinar a atividade antioxidante e antibacteriana *in vitro* dos extratos de cogumelo do sol, mediante diferentes tempos e temperaturas de extração. As amostras foram analisadas quanto à composição centesimal, determinação do teor de fenólicos totais e atividade antioxidante e antibacteriana *in vitro*. Os resultados demonstram que esse tipo de cogumelo aparece como um agente antioxidante potencial, obtendo-se melhores resultados na temperatura de 70°C durante 60 minutos de extração hidroetanólica. Esse extrato não aponta atividade antibacteriana para os micro-organismos em teste.

**PALAVRAS-CHAVE:** extratos; tempo; temperatura; agente antioxidante; micro-organismos.

**ABSTRACT:** The sun mushroom (*Agaricus blazei* Murril) is widely consumed due its medicinal properties. This study aimed to determine *in vitro* antibacterial and antioxidant activities of sun mushroom, through different times and temperatures of extraction. The samples were analyzed for proximate composition, determination of total phenolic content and *in vitro* antibacterial and antioxidant activities. The results show that this kind of mushroom appears as a potential antioxidant agent, obtaining best results in the temperature of 70°C for 60 minutes in hydroethanol extraction. This extract shows no antibacterial activity for microorganisms under test.

**KEYWORDS:** extracts; time; temperature; antioxidant factor; microorganisms.

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos; Centro de Ciências Rurais; Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – Santa Maria (RS), Brasil.

\*Autor correspondente: flaviass\_vet@hotmail.com

Recebido em: 26/05/2014. Aceito em: 30/08/2016

## INTRODUÇÃO

A implicação do estresse oxidativo na etiologia e na progressão de várias doenças, tais como o câncer e doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, leva à sugestão de que os antioxidantes naturais podem ter benefícios à saúde como agentes profiláticos (FERREIRA *et al.*, 2009). Além disso, podem ser usados em aplicações dermatológicas, como cosméticos e também como suplementos na indústria de alimentos (HELENO *et al.*, 2010).

Da mesma forma, extratos naturais com ação antimicrobiana apresentam-se como uma alternativa terapêutica, em razão de nas últimas décadas o uso irracional de antimicrobianos ter determinado o surgimento de cepas de micro-organismos multirresistentes, impulsionando a comunidade científica para a descoberta de novas opções desses agentes (LUND *et al.*, 2009).

Nesse contexto, vários estudos têm evidenciado os potenciais antioxidantes e antimicrobianos de uma grande variedade de frutas e de vegetais. Consequentemente, compostos obtidos de fontes naturais, tais como grãos, sementes oleaginosas, especiarias, frutas, vegetais e cogumelos comestíveis, têm sido investigados (ASOLINI *et al.*, 2006, VAZ *et al.*, 2011).

Os cogumelos são alimentos de alto valor nutricional, com baixos níveis energéticos e grandes quantidades de minerais, aminoácidos essenciais, vitaminas e fibras (FIRENZUOLI *et al.*, 2008). Ademais, acumulam uma variedade de metabólitos secundários, tais quais compostos fenólicos, polipeptídeos, terpenos e esteroides possivelmente envolvidos em seus efeitos medicinais (TURKOGLU *et al.*, 2007). Perante esse cenário, a possibilidade de incluir cogumelos na dieta pode fornecer benefícios desejáveis para a saúde, para além da nutrição básica.

O cogumelo brasileiro *Agaricus blazei* Murill (AbM) provoca interesse da mídia e da comunidade científica, já que atingiu o topo do *ranking* dos melhores cogumelos medicinais (FIRENZUOLI *et al.*, 2008). Conhecido como cogumelo-do-sol no Brasil, é consumido pela população como alimento e chá medicinal para combater diversas doenças (LUIZ *et al.*, 2003). O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de cogumelo-do-sol (AbM) — este é espécie nativa do país —, apresentando condições climáticas favoráveis (TOMIZAWA *et al.*, 2007), de maneira que a expansão do cultivo do cogumelo tem sido verificada em várias regiões do país, visando abastecer o mercado internacional e nacional, o qual vem aumentando motivado pelo interesse da população brasileira em seus benefícios (MENDONÇA *et al.*, 2005).

Esse cogumelo tem sido amplamente estudado nas áreas de ciência dos alimentos, medicina, biotecnologia e farmacologia (LARGETEAU *et al.*, 2011). Trabalhos têm relatado que o AbM apresenta atividade antibacteriana, como, por exemplo, na avaliação *in vitro* contra agentes patogênicos orais para humanos, tais como *Streptococcus mutans* (LUND *et al.*, 2009), além de atividade antioxidante (SOARES *et al.*, 2009), antidiabética (KIM *et al.*, 2005), forte atividade imunoestimulante (YUMINAMOCHI *et al.*, 2007), bem como efeitos antitumorais e anticâncer (YU *et al.*, 2009), entre outros.

Os antioxidantes encontrados em cogumelos são principalmente compostos fenólicos, tendo sido quantificados em diferentes espécies encontradas em todo o mundo (VAZ *et al.*, 2011). Quanto ao acúmulo desses compostos, o conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante foram estimados e comparados em fases jovens e maduras de corpos de frutificação de AbM, não obtendo-se diferença entre elas (SOARES *et al.*, 2009). Por outro lado, a composição nutricional e os componentes antioxidantes do AbM, incluindo os fenólicos totais, podem diminuir quando submetidos a tratamentos térmicos (SUN *et al.*, 2011).

Em relação à atividade antibacteriana de compostos fenólicos, ela tem sido avaliada em estudos farmacêuticos e em alimentos. Alguns compostos fenólicos achados em plantas, tais como os de sálvia, alecrim, tomilho, lúpulo, coentro, cravo e manjerição, são conhecidos por possuírem efeitos antimicrobianos contra patógenos alimentares (AHN *et al.*, 2007).

Dessa maneira, o objetivo deste artigo foi determinar a atividade antioxidante e antibacteriana *in vitro* dos extratos de cogumelo-do-sol (AbM) cultivado na região central do Rio Grande do Sul, mediante diferentes tempos e temperaturas de extração.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de cogumelo-do-sol (AbM) foram fornecidas por um estabelecimento produtor localizado na cidade de Santa Maria, região central do Rio Grande do Sul, Brasil (coordenadas -29°41'03" +53°48'25"), sob a forma de basidiocarpos imaturos previamente desidratados. Elas foram moídas em moinho analítico refrigerado (4°C) (Quimis, modelo Q 298A21, Diadema, Brasil), classificadas em sistema de peneiras para partículas de 0,5 mm de diâmetro e acondicionadas em recipientes fechados, ao abrigo da luz e em *freezer* (-12°C) até o momento de sua utilização.

Para a determinação da composição centesimal, as amostras de AbM foram submetidas à secagem em estufa a 105°C para a análise de umidade, para cinzas a 550°C e proteínas pelo método de Kjeldahl, segundo metodologia descrita pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005). Os lipídios totais foram quantificados em conformidade com o método descrito por BLIGH; DYER (1959), e todas essas análises foram conduzidas em triplicata.

Os extratos de AbM foram preparados do pó previamente moído, pesado (6 g) em um béquer e adicionado o álcool de cereais 80% (60 mL) na proporção 1:10 (p/v). Em seguida, a mistura foi levada a dois banhos ultratermostatizados (Solab, modelo SL-152/10, Piracicaba, Brasil), um com temperatura de 50°C e outro com temperatura de 70°C, e submetida à agitação constante por intermédio de agitador mecânico (Marconi MA-039, Piracicaba, Brasil), variando o tempo de extração em 15, 30 e 60 minutos. Depois disso, os seis extratos foram

filtrados em papel-filtro e as soluções resultantes acondicionadas em frascos âmbar e armazenados em *freezer* (-12°C) até o momento das análises, ressaltando que cada extração foi realizada em triplicata.

Para a estimativa de fenólicos totais, utilizou-se o reagente de Folin-Ciocalteu, descrito por SINGLETON *et al.* (1999). Em um balão volumétrico, os extratos foram diluídos em álcool de cereais 80% na proporção 1:25 (v/v). Posteriormente, uma alíquota (0,2 mL) da solução foi misturada a 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N. Aguardaram-se 8 min no escuro e adicionou-se 0,8 mL de solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 7,5%. Após incubação à temperatura ambiente (25°C) por 2 horas, a absorvância foi medida a 765 nm em espectrofotômetro (SP-220, Biospectro, São Paulo, Brasil).

A absorvância da amostra foi comparada com a curva padrão de ácido gálico (concentrações de 0 a 70 mg de ácido gálico 100 mL<sup>-1</sup>), e aplicou-se a Equação 1:

$$y = 0,0109x + 0,0134 \quad (1)$$

Em que:

Y = absorvância,

x = concentração;

R<sup>2</sup> = 0,9986. Coeficiente de determinação da equação, uma medida de ajustamento de um modelo estatístico linear generalizado em relação aos valores observados. O R<sup>2</sup> varia entre 0 e 1, indicando em percentagem o quanto o modelo consegue explicar os valores alcançados.

O conteúdo total de fenólicos foi expresso em mg de fenólicos totais por g de extrato seco de cogumelo-do-sol (mg fenólicos totais/g cogumelo-do-sol), baseado na curva de calibração expressa em equivalentes de ácido gálico. As análises aconteceram em triplicata para os seis extratos hidroetanólicos de AbM, e os valores são apresentados como a média (± desvio padrão).

A atividade antioxidante dos compostos presentes nos extratos de cogumelo-do-sol foi determinada por meio da capacidade sequestrante do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), segundo metodologia descrita por BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995). A técnica consistiu na incubação por 30 min de 5 mL de solução etanólica (80% v/v) de DPPH 0,1 mM com 5 mL de soluções contendo concentrações crescentes de extrato hidroetanólico de AbM (0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 e 40 mg.mL<sup>-1</sup>).

A solução controle era composta de DPPH 0,1 mM em etanol 80% (v/v), e a solução branco, de solvente etanol 80% (v/v). Após incubação, foram realizadas as leituras das amostras em espectrofotômetro (SP-220, Biospectro, São Paulo, Brasil) em comprimento de onda de 517 nm. A porcentagem de atividade antioxidante (AA%) foi calculada mediante o percentual de captação do radical DPPH, conforme a Equação 2:

$$AA\% = 100 - \left\{ \left[ \frac{(\text{Absorbância}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right] \right\} \quad (2)$$

Depois disso, calculou-se a concentração necessária para capturar 50% do radical livre DPPH (IC<sub>50</sub>) por intermédio de equação da reta obtida dos valores da absorvância (AA%) das concentrações crescentes de extrato hidroetanólico de cogumelo-do-sol, substituindo o valor de Y por 50, obtendo-se o valor de X como a concentração correspondente. As análises foram realizadas em triplicata para os seis extratos hidroetanólicos de AbM.

Com base nos resultados da determinação de fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro*, elegeu-se o extrato de melhor desempenho para a determinação da atividade antibacteriana *in vitro*. Com esse extrato, o solvente foi totalmente eliminado em rotaevaporador (Fisatom® 802, Fisatom, São Paulo, Brasil) com vácuo de -760 mmHg e temperatura da água do banho a 60°C (± 1°C), e a parte sólida remanescente foi ressuspendida em água destilada esterilizada na concentração de 10 µg.µL<sup>-1</sup>.

As cepas bacterianas foram adquiridas da coleção americana *American Type Culture Collection* (ATCC). A atividade antibacteriana do extrato de cogumelo-do-sol foi avaliada no tocante às bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25.923), *Bacillus cereus* (ATCC 14.579) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19.433); e gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25.922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10.145), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* (ATCC 13.076), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* (ATCC 10.708), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* (ATCC 14.028) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13.048).

Foi realizado o teste de difusão em disco, conforme os procedimentos descritos pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003). Com culturas recentes dos micro-organismos em teste, foi preparada suspensão em solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%), a qual foi padronizada para 0,5 da escala McFarland. As suspensões foram semeadas na superfície do ágar Mueller-Hinton, em placas de Petri, com auxílio de *swab* estéril. Posteriormente, discos de papel com 6 mm de diâmetro foram impregnados com 10 µL dos extratos em teste e plaqueados no ágar previamente inoculado com o micro-organismo teste.

Para controle negativo, os discos de papel foram embebidos em água destilada esterilizada, e, para o controle positivo, usaram-se discos com 30 µg de cloranfenicol. Após 24 h de incubação a 36°C, foi medido o diâmetro dos halos de inibição de crescimento nas placas.

Obtiveram-se os resultados como médias de análises em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e regressão por meio do programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) 17.0. Quando os dados não se ajustaram aos modelos de regressão, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, utilizando nível de significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal do cogumelo-do-sol desidratado está representada na Tabela 1. O teor de proteína bruta foi de 31,31 g% ( $\pm 0,006$ ) e o de lipídios foi de 4,05 g% ( $\pm 0,007$ ), configurando elevado teor de proteínas e baixo de lipídeos, não diferindo de outros cogumelos comestíveis (AGAHAR-MURUKAR; SUBBULAKSHMI, 2005). Os cogumelos frescos chegam a apresentar umidade inicial de 85 a 95% e, quando desidratados, de 5 a 20% (SAMPAIO; QUEIROZ, 2006), valores confirmados pelo resultado encontrado neste estudo, em que o valor da umidade do cogumelo desidratado foi de 5,86 g% ( $\pm 0,001$ ).

Os cogumelos desidratados também são excelente fonte de fibras alimentares (Tabela 1), o que é representado pelo valor de 29,79 g% ( $\pm 0,006$ ), além de minerais ( $6,91 \pm 0,001$  g%), corroborando com outros resultados da literatura (CHANG, 2008). Assim, diversos estudos, assim como este, têm comprovado que o valor nutritivo de cogumelo-do-sol é de qualidade para uma dieta balanceada, indicando a sua utilização como alimento funcional, o que vem aumentando expressivamente nos últimos anos.

Por outro lado, a busca de um método de extração de compostos fenólicos prático e eficiente é um processo constante nas avaliações de compostos bioativos, em que diversos parâmetros devem ser observados, podendo ser influenciados pelo solvente, pelo tempo e pelas altas temperaturas (CARVALHO *et al.*, 2007).

Os valores de fenólicos totais do extrato hidroetanólico do AbM — expresso em mg fenólicos totais/g cogumelo-do-sol desidratado — estão representados na Figura 1A, considerando as variações de tempo e temperatura empregadas durante a extração.

De acordo com os resultados (Fig. 1A), pode-se observar que o tempo de extração de 60 min foi o que apresentou nos cogumelos o maior teor de fenólicos totais para ambas as temperaturas aplicadas (50° e 70°C), em relação aos tempos de 15 e 30 min de extração.

Portanto, levando-se em conta o tempo de extração de 60 min, os teores de compostos fenólicos totais não diferiram entre as temperaturas de 50 ( $4,41 \pm 0,533$ ) e de 70°C

**Tabela 1.** Composição centesimal do cogumelo-do-sol (*Agaricus blazei* Murril) desidratado.

Composição centesimal	g (%)
Umidade	5,86 $\pm$ 0,001
Proteína	31,31 $\pm$ 0,006
Cinzas	6,91 $\pm$ 0,001
Gordura	4,05 $\pm$ 0,007
Fibra	29,79 $\pm$ 0,006

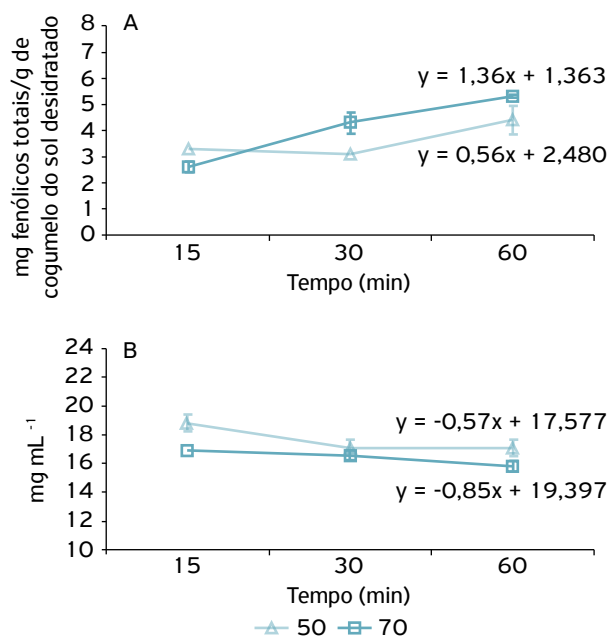
Médias  $\pm$  desvio padrão de análises em triplicata.

( $5,34 \pm 0,048$ ) aplicadas. Em concordância com os resultados obtidos, a melhor condição de tempo de extração de compostos antioxidantes do AbM foi 60 min, independentemente da temperatura utilizada (MOURÃO *et al.*, 2011).

Foi encontrado valor de 2,55 mg de fenólicos totais/g de extrato de cogumelo-do-sol utilizando solvente metanol 50% com tempo de extração de 24 horas à temperatura ambiente (SUN *et al.*, 2011), enquanto, com o solvente metanol 70% no mesmo tempo de extração (24 horas) à temperatura ambiente, foram achados valores de 0,83 a 42,21 mg de fenólicos totais/g de extrato para diferentes cogumelos comestíveis (*Pleurotus porrigens*, *Hygrocybe conica*, *Xerula furfuracea*, *Schizophyllum commune*, *Polyporus tenuiculus* e *Pleurotus florida*), representando oscilação bastante acentuada, conforme cada tipo de cogumelo avaliado (WONG; CHYE, 2009).

As variações alcançadas nos teores dos compostos fenólicos totais ocorrem por conta das diversas variações nas condições da extração, como tipo e concentração de solvente, proporção de amostra-solvente, temperatura e tempo de extração (MATA *et al.*, 2007). As diferenças de valor também podem estar relacionadas a fatores como o clima e o substrato de cultivo, além do tipo de cogumelo, entre outros (SOARES *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos na determinação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de cogumelo-do-sol demonstrados



**Figura 1.** Fenólicos totais (A) e atividade antioxidante *in vitro* representada pela concentração necessária para capturar 50% do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) – IC50 (B) de extratos hidroetanólicos de cogumelo-do-sol obtidos em temperatura de 50° e 70°C nos tempos de 15, 30 e 60 min de extração.

por meio da concentração capaz de sequestrar 50% do radical DDPH ( $IC_{50}$ ) estão representados na Figura 1B.

Quanto menor o valor de  $IC_{50}$ , maior a atividade antioxidante do extrato, já que esse valor representa a quantidade de extrato necessária para reduzir em 50% a atividade do radical livre, de forma que valores de  $IC_{50}$  acima de  $25 \text{ mg mL}^{-1}$  são considerados de baixo potencial antioxidante (CAMPOS *et al.*, 2005).

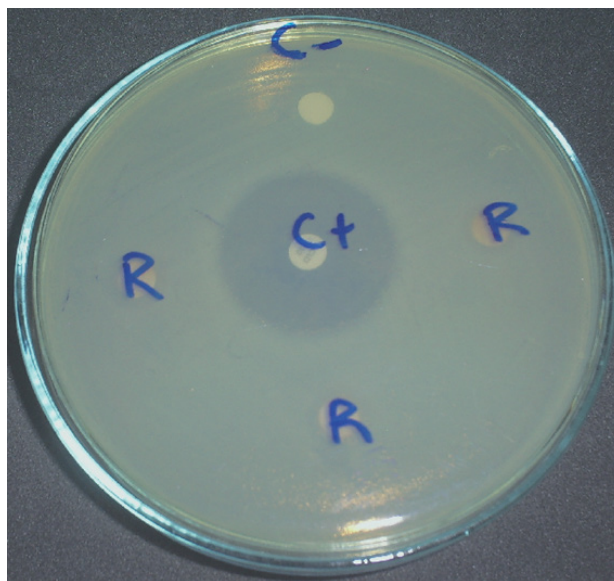
Os resultados (Fig. 1B) para as análises *in vitro* realizadas com os extratos de cogumelo-do-sol demonstraram valores de  $IC_{50}$  menores para a temperatura de  $70^\circ\text{C}$  independentemente dos tempos de extração. Dessa forma, tendo em vista essa temperatura de extração, o valor mais baixo do  $IC_{50}$  foi para o tempo de 60 min ( $15,80 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

Nessas condições a atividade antioxidante aumentou com a elevação da temperatura de extração de  $50^\circ$  para  $70^\circ\text{C}$ , diferindo de outros trabalhos, em que o tratamento térmico reduziu a quantidade de fenólicos totais, bem como alterou os tipos e a quantidade relativa desses compostos (SUN *et al.*, 2011). Entretanto, esta pesquisa corrobora com resultados de outros estudos, que determinaram a temperatura de  $70^\circ\text{C}$  como o limite máximo a ser empregado no processo extrativo para evitar a degradação, a polimerização e a oxidação de compostos fenólicos, fatores que resultariam na redução destes (PEIXOTO SOBRINHO *et al.*, 2010).

A capacidade antioxidante do cogumelo-do-sol foi avaliada anteriormente apresentando valor de  $IC_{50}$  de  $3 \text{ mg de extrato mL}^{-1}$  (SOARES *et al.*, 2009), representando capacidade antioxidante mais eficiente do que a constatada neste trabalho. Todavia, para cogumelos selvagens comestíveis, classificação que engloba o cogumelo estudado, a concentração de extrato necessária para capturar 50% do radical livre DPPH ( $IC_{50}$ ) foi em média de  $20 \text{ mg de extrato mL}^{-1}$  (WONG; CHYE, 2009), representando um valor aproximado ao encontrado, de  $17,13 \text{ mg de extrato mL}^{-1}$ , considerando condições de extração semelhantes.

Cabe salientar que diferentes autores têm apresentado valores de  $IC_{50}$  de antioxidantes naturais com grandes diferenças, dificultando a comparação dos resultados, provavelmente pelo fato de haver diferenças nas metodologias utilizadas para a elaboração de extratos.

O extrato hidroetanólico de cogumelo-do-sol avaliado nas concentrações de 1, 2 e 4% não apresentou atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* nem *Enterobacter aerogenes*, segundo o teste de difusão em disco. Na Figura 2, pode-se observar o halo de inibição do crescimento microbiano em relação ao disco impregnado com



**Figura 2.** Placa de Petri com halo de inibição do crescimento microbiano em relação ao disco impregnado com cloranfenicol  $30 \mu\text{g}$  (controle positivo, C+), discos com o extrato em três repetições ( $100 \mu\text{g}$  cada disco, R) e disco com água destilada (controle negativo, C-).

cloranfenicol  $30 \mu\text{g}$  (C+), utilizado como controle positivo no teste de difusão em disco.

Na avaliação da atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de três espécies de *Agaricus*, os autores verificaram que as bactérias gram-positivas foram mais sensíveis ao extrato de cogumelo do que as bactérias gram-negativas quando empregado  $200 \mu\text{g}$  de cogumelo (ÖZTÜRK *et al.*, 2011), o que não ficou evidente neste trabalho quando utilizado  $100 \mu\text{g}$  de cogumelo.

Os resultados obtidos no teste de difusão em disco sugerem ausência de atividade antibacteriana das substâncias presentes no extrato hidroetanólico de AbM, ou pequena concentração, não atingindo a concentração inibitória mínima para os micro-organismos em teste.

## CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo, o extrato hidroetanólico de cogumelo-do-sol (*Agaricus blazei* Murril) apresentou-se como um potencial agente antioxidante *in vitro*. O melhor resultado de extração foi obtido em temperatura de  $70^\circ\text{C}$  durante 60 min, apresentando-se numa relação diretamente proporcional entre o conteúdo de fenólicos totais e a capacidade antioxidante *in vitro*. O mesmo extrato não apontou atividade antibacteriana para os micro-organismos em teste.

## REFERÊNCIAS

- AGAHAR-MURUKAR, D.; SUBBULAKSHMI, G. Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya. *Food Chemistry*, v.89, n.4, p.599-603, 2005. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.03.042
- AHN, J.; GRÜN, I.U.; MUSTAPHA, A. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiology*, v.24, n.4, p.7-14, 2007. DOI: 10.1016/j.fm.2006.04.006
- ASOLINI, F.C.; TEDESCO, A.M.; CARPES, S.T. Atividade antioxidante e antimicrobiana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.9, n.3, p.209-215, 2006.
- ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). *Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists*. 18th.ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.
- BLIGH, E.C.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v.37, n.8, p.911-917, 1959.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology*, v.28, p.25-30, 1995.
- CAMPOS, L.M.A.S.; MICHELIN, E.M.Z.; DANIELSKI, L.; FERREIRA, S.R.S. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. *Journal of Supercritical Fluids*, v.34, n.2, p.163-170, 2005. DOI: 10.1016/j.supflu.2004.11.010
- CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 3.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007.
- CHANG, S.T. Overview of mushroom cultivation and utilization as functional foods. In: CHEUNG, P.C.K. *Mushrooms as functional foods*. Nova Jersey: Wiley-Interscience, 2008. p.1-33.
- FERREIRA, I.C.F.R.; BARROS, L.; ABREU, R.M.V. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, v.16, n.12, p.1543-1560, 2009.
- FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei Murrill*: review of literature and pharmaco-toxicological problems. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.5, n.1, p.3-15, 2008. DOI: 10.1093/ecam/nem007
- HELENO, S.A.; BARROS, L.; SOUSA, M.J.; MARTINS, A.; FERREIRA, I.C.F.R. Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry*, v.119, n.4, p.1.443-1.450, 2010. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.09.025
- KIM, Y.W.; KIM, K.H.; CHOI, H.J.; LEE, D.S. Anti-diabetic activity of beta-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. *Biotechnology Letters*, v.27, n.7, p.483-487, 2005. DOI: 10.1007/s10529-005-2225-8
- LARGETEAU, M.L.; LLARENA-HERNÁNDEZ, R.C.; REGNAULT-ROGER, C.; SAVOIE, J.M. The medicinal *Agaricus* mushroom cultivated in Brazil: biology, cultivation and non-medicinal valorization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.92, p.897-907, 2011. DOI: 10.1007/s00253-011-3630-7
- LUIZ, R.C.; JORDÃO, B.Q.; EIRA, A.F.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S. Mechanism of anticlastogenicity of *Agaricus blazei* Murill mushroom organic extracts in wild type CHO (K1) and repair deficient (xrs5) cells by chromosome aberration and sister chromatid exchange assays. *Mutation Research*, v.528, n.1-2, p.75-79, 2003. DOI: 10.1016/S0027-5107(03)00098-8
- LUND, R.G.; DEL PINO, F.A.B.; SERPA, R.; NASCIMENTO, J.S.; SILVA, V.M.; RIBEIRO, G.A.; ROSALEN, P.L. Antimicrobial activity of ethanol extracts of *Agaricus brasiliensis* against mutans streptococci. *Pharmaceutical Biology*, v.47, p.910-915, 2009. DOI: 10.1080/13880200902950801
- MATA, A.T.; PROENÇA, C.; FERREIRA, A.R.; SERRALHEIRO, M.L.M.; NOGUEIRA, J.M.F. Antioxidant and antiacetylchoalonesterases activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, v.103, n.3, p.778-786, 2007. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.017
- MENDONÇA, M.; KASUYA, M.C.; CADORIN, A.; VIEIRA, A.J. Mushroom for a living: *Agaricus blazei* cultivation for a living in Brazil. In: *Shiitake cultivation*. Part II. Mushroom for better life. Seoul: MushWorld, 2005. p.208-218. (Mushroom growers' handbook, 2).
- MOURÃO, F.; UEMO, S.H.; TAKEMURA, O.S.; LINDE, G.A.; COLAUTO, N.B. Antioxidant activity of *Agaricus brasiliensis* basidiocarps on different maturations phases. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.42, n.1, p.197-202, 2011. DOI: 10.1590/S1517-83822011000100024
- NACIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. 8.ed. Wayne: NCCLS, 2003. 58 p.
- ÖZTÜRK, M.; DURU, M.E.; KIVRAK, S.; MERCAN-DOĞAN, N.; TÜRKÖGLÜ, A.; ÖZLER, M.A. *In vitro* antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: a comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology*, v.49, n.6, p.1353-1360, 2011. DOI: 10.1016/j.fct.2011.03.019
- PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; GOMES, T.L.B.; CARDOSO, K.C.M.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Química Nova*, v.33, n.2, p.288-291, 2010. DOI: 10.1590/S0100-40422010000200011

SAMPAIO, S.M.; QUEIROZ, M.R. Influência do processo de secagem na qualidade do cogumelo Shiitake. *Engenharia Agrícola, Jaboticabal*, v.26, n.2, p.570-577, 2006. DOI: 10.1590/S0100-69162006000200027

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, v.299, p.152-178, 1999. DOI: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1

SOARES, A.A.; SOUZA, C.G.M.; DANIEL, F.M.; FERRARI, G.P.; COSTA, S.M.G.; PERALTA, R.M. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. *Food Chemistry*, v.112, n.4, p.775-781, 2009. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.05.117

SUN, L.; ZHUANG, Y.; BAI, X. Effects of boiling and microwaving treatments on nutritional characteristics and antioxidant activities of *Agaricus blazei* Murril. *International Journal of Food Science and Technology*, v.46, n.6, p.1209-1215, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2011.02602.x

TOMIZAWA, M.M.; SOUZA, E.D.; ASSIS, L.J.; GOMIDE, P.H.O.; SANTOS, J.B. Variabilidade genética de isolados do cogumelo *Agaricus blazei* por meio de marcadores RAPD. *Ciência e Agrotecnologia*, v.31, n.4, p.1.242-1.249, 2007. DOI: 10.1590/S1413-70542007000400045

TURKOGLU, A.; DURU, E.M.; MERCAN, I.K.; GEZER, K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, v.101, n.1, p.267-273, 2007. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.01.025

VAZ, J.A.; BARROS, L.; MARTINS, A.; MORAIS, J.S.; VASCONCELOS, M.H.; FERREIRA, I.C.F.R. Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. *LWT – Food Science and Technology*, v.44, n.1, p.343-346, 2011. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.06.029

WONG, J.Y.; CHYE, F.Y. Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.22, n.4, p.269-277, 2009. DOI: 10.1016/j.jfca.2008.11.021

YUMINAMUCHI, E.; KOIKE, T.; TAKEDA, K.; HORIUCHI, I.; OKUMURA, K. Interleukin-12- and interferon-gamma-mediated natural killer cell activation by *Agaricus blazei* Murril. *Immunology*, v.121, n.12, p.197-206, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2006.02558.x

YU, C.H.; KAN, S.F.; SHU, C.H.; LU, T.J.; SUN-HWANG, L.; WANG, P.S. Inhibitory mechanisms of *Agaricus blazei* Murril on the growth of prostate cancer in vitro and in vivo. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v.20, n.10, p.753-764, 2009. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2008.07.004