

Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes

Mushrooms: Bioactive Compounds and Antioxidant Properties

Ana Carolina da Silva^a; Neuza Jorge^{a*}

^aUniversidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, SP, Brasil

*E-mail: njorge@ibilce.unesp.br

Recebido: 20 de julho de 2011; Aceito: 14 de outubro de 2011.

Resumo

O presente trabalho apresenta revisão da literatura que evidencia a importância nutricional, medicinal e antioxidante dos cogumelos. Na pesquisa foram descritos os principais compostos antioxidantes dos cogumelos, tais como ácidos fenólicos, flavonoides e tocoferóis, bem como seus mecanismos de ação. Os principais métodos *in vitro* utilizados para a avaliação da atividade antioxidante desses compostos foram abordados. As influências da polaridade do solvente e do tipo de extração na obtenção dos compostos antioxidantes também foram discutidas. Foi possível concluir que os cogumelos são fontes de carboidratos, proteínas e minerais, conferindo a eles propriedades nutricionais. As propriedades funcionais e medicinais são atribuídas às glucanas, além de serem excelentes fontes de antioxidantes naturais. Com relação ao processo de extração, verificou-se que a polaridade do solvente utilizado no processo de extração é determinante na obtenção de compostos antioxidantes.

Palavras-chave: Agaricales. Compostos Fenólicos. Flavonoides. Tocoferóis

Abstract

This study presents a literature review which shows the nutritional, medicinal and antioxidant importance of mushrooms. In this research, the main antioxidant compounds of mushrooms, such as phenolic acids, flavonoids and tocopherols, as well as their mechanisms of action were described. The main in vitro methods used for evaluation of the antioxidant activity of these compounds were approached. The influences from the solvent polarity and the kind of extraction in the acquisition of the antioxidant compounds were also discussed. It was possible to conclude that mushrooms are a source of carbohydrates, proteins and minerals, thus presenting nutritional properties. The functional and medicinal properties are attributed to glucans, besides being excellent sources of natural antioxidants. Regarding the extraction process, it was noticed that the solvent polarity used in the extraction process is determinant in the obtainment of antioxidant compounds.

Keywords: Agaricales. Phenolic Compounds. Flavonoids. Tocopherols.

1 Introdução

O consumo de cogumelos é uma antiga tradição nos países asiáticos, principalmente na China, onde começaram a ser cultivados cerca de 600 anos a. C. com a espécie *Auricularia auricula*, também conhecida como orelha de pau¹.

Dentre as espécies conhecidas de fungos, 12.000 são consideradas cogumelo, sendo que destas pelo menos 2.000 são comestíveis. Aproximadamente 35 espécies são cultivadas comercialmente e 20 são cultivadas em escala industrial. O cogumelo mais cultivado no mundo é o *Agaricus bisporus* (champignon), seguido do *Lentinus edodes* (shiitake), *Pleurotus* spp (cogumelo ostra), *Auricularia auricula* (cogumelo orelha de pau) e *Volvariella volvacea* (cogumelo palha)².

Segundo *Food and Agriculture Organization* - FAO³, a produção de cogumelos na China passou de 562.194 para 1.605.000 toneladas em 2007, representando aumento de 185% em 10 anos. Esse crescimento também foi observado em países como Estados Unidos, Canadá, Israel e Índia. Uma justificativa para o aumento na produção de cogumelos

é a crescente procura pelos consumidores, que buscam os benefícios à saúde proporcionados pelo alimento.

Os cogumelos possuem vários compostos biologicamente ativos como polissacarídeos, glicoproteínas e propriedades antioxidantes e antibióticas. Por isso, além de ser apreciado por suas características sensoriais, o cogumelo também é usado como fonte medicinal⁴⁻⁶.

Cheung *et al.*⁷ e Elmastas *et al.*⁸ analisaram extratos metanólicos de várias espécies de cogumelos e encontraram correlação direta entre atividade antioxidante e o conteúdo de compostos fenólicos totais e tocoferóis.

A identificação e o isolamento dos compostos bioativos dependem da manipulação da matéria-prima e do tipo de extração. Os cogumelos são comumente consumidos desidratados e, para isso, são expostos a temperaturas elevadas e presença de oxigênio, causando maior susceptibilidade aos danos oxidativos. Por isso, a desidratação a vácuo, ao abrigo da luz e em baixa temperatura contribui para manutenção da atividade antioxidante.

Assim como a identificação dos compostos bioativos é influenciada por diversos fatores, a avaliação da ação

antioxidante destes compostos pode ser feita por diversos métodos *in vitro*, cada um com suas particularidades. Segundo Anderson e Phillips⁹, as reações de oxidação e redução são muito sensíveis ao meio no qual elas ocorrem já que os alimentos são matrizes complexas levando, muitas vezes, a resultados contraditórios na avaliação de um único antioxidante, utilizando-se diferentes sistemas *in vitro*.

De acordo com Pokorný¹⁰, quando comparados aos antioxidantes sintéticos, os naturais apresentam vantagens de serem considerados seguros, mais aceitos pelos consumidores e, além de protegerem os óleos vegetais contra a oxidação lipídica, também conferem a eles propriedades nutracêuticas. Por isso, a aplicação de antioxidantes extraídos de fontes naturais em óleos vegetais tem sido amplamente investigada¹¹⁻¹⁴. Nesses estudos, os óleos vegetais adicionados de antioxidantes naturais são submetidos a altas temperaturas e presença de oxigênio. Dessa forma, pode-se avaliar a eficiência dos antioxidantes naturais frente ao processo de oxidação.

O presente estudo apresenta breve revisão da literatura sobre os compostos antioxidantes encontrados nos cogumelos bem como os principais testes disponíveis para avaliar suas propriedades antioxidantes.

2 Desenvolvimento

2.1 Cogumelos

Os cogumelos são consumidos por povos de diversas culturas, tanto por suas características gastronômicas, quanto medicinais. Porém, seu emprego como alimento funcional é mais notado nas culturas orientais, nas quais o uso de cogumelos na manutenção da saúde teve início há milhares de anos com os chineses¹⁵.

No Brasil, não existem dados oficiais sobre a produção de cogumelos, mas a região que mais se destaca é a de Mogi das Cruzes no Estado de São Paulo. Anualmente, mais de quatro mil toneladas são comercializadas na região representando cerca de 80% da produção nacional. Portanto, estima-se que a produção brasileira se aproxime de cinco mil toneladas anuais¹⁶.

O *shiitake* é a segunda espécie de cogumelo comestível mais consumida no mundo, ficando atrás somente do Champignon, *Agaricus bisporus*¹⁵. No Brasil, o cultivo foi introduzido no início da década de 90¹⁷.

O cogumelo do sol, *Agaricus blazei*, é nativo do Brasil e vem sendo cultivado comercialmente desde o início da década de 90. O estado de São Paulo se destaca na produção, onde o cultivo é feito nas épocas de primavera e verão. É produzido em escala industrial em alguns países como China e Japão¹⁸. Neste último país, o consumo anual chega a 300 t¹⁹.

2.1.1 Propriedades nutricionais

O *shiitake in natura* contém cerca de 90% de água. É fonte de proteínas (13,4 a 17,5% da matéria seca), valores acima dos encontrados em vegetais e um pouco abaixo de carnes e leite. Os carboidratos são os constituintes principais do cogumelo, com exceção da água. O *shiitake* apresenta de 67,5 a 78% de carboidratos (sendo 44,9% de fibra alimentar)²⁰.

O *shiitake* é também fonte de vitaminas, principalmente C (2,1 mg/100g), B₁₂ (0,07 µg/100g) e D (0,1 µg/100g). É pobre em gordura (2,1% em base seca), sendo que 77,7% dos lipídios são constituídos por ácidos graxos insaturados, com predominância do ácido linolênico²⁰.

Os cogumelos contêm alto teor de minerais podendo alcançar de 3,7 a 7% de resíduo mineral. Dentre os minerais presentes no cogumelo *shiitake* destacam-se: cálcio (0,05 g/kg), potássio (26,7 g/kg), magnésio (1,55 g/kg), fósforo (8,7 g/kg), além do sódio, cobre, ferro, manganês e zinco²¹.

O cogumelo do sol é muito apreciado pelos valores proteico, vitamínico e mineral, sendo que os que mais se destacam nesta última classe são fósforo (0,87%), potássio (2,34%), cálcio (0,07%) e magnésio (0,08%). Os teores de enxofre e zinco são semelhantes aos encontrados no feijão, diferentemente do ferro e cobre que apresentam quantidades baixas quando comparadas a outros alimentos²².

Tsai *et al.*²³ analisaram a composição do cogumelo do sol e encontraram 45,52% de carboidratos, 26,74% de proteínas e 2,62% de gordura. O teor de proteínas é superior ao do *shiitake* e de outras espécies de cogumelos como *Boletus edulis* (18,54%) e *Agrocybe cylindracea* (16,47%). Nesse estudo, os autores também quantificaram, por meio de equação derivada de análise sensorial, a concentração equivalente de umami, encontrando, para o cogumelo do sol, 135,90 g/100 g de cogumelo, valor 2,9 vezes maior que o encontrado na espécie *A. cylindracea* e 13 vezes superior ao do *B. edulis*. O resultado sugere o uso do cogumelo do sol como agente saborizante em alimentos. O umami é considerado o quinto gosto básico, formado pelas substâncias ácido glutâmico, inosinato e guanilato, encontradas naturalmente em alguns alimentos.

Segundo Mizuno *et al.*²⁴, o corpo de frutificação do *A. blazei* apresenta 6-8% de fibras, 5-7% de minerais e 3-5% de gordura, todos medidos em base seca. O alimento contém, ainda, as vitaminas B₁, B₂ e niacina.

Os cogumelos são produtos muito perecíveis e tendem a perder a qualidade logo após a colheita, já que perdem água causando encolhimento e diminuição de peso. Sua vida útil é de 1 a 3 dias na temperatura ambiente, de 8 dias em atmosfera modificada (2-5% de O₂ e 3-8% de CO₂) a 3 °C e de 4 dias em atmosfera controlada (5% O₂ e 10% CO₂) a 2 °C²⁵.

2.2.2. Propriedades funcionais

Nos últimos anos, muita atenção tem sido dada aos efeitos fisiológicos provocados pelos alimentos devido à crescente preocupação dos consumidores com a saúde, que buscam substituir substâncias artificiais por fontes naturais de nutrientes como ervas e plantas, conhecidos como suplementos dietéticos, nutracêuticos e alimentos funcionais²⁶.

Para um alimento ser considerado funcional ele deve ter efeitos positivos além do valor básico nutritivo, que pode aumentar o bem estar e a saúde e reduzir o risco de doenças, promovendo benefícios à saúde além de aumentar a qualidade de vida²⁷.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza que os cogumelos consumidos nas formas dessecadas, inteiras, fragmentadas, moídas ou em conserva, são considerados alimentos (Resolução ANVISA/MS nº 272/2005), enquanto que os cogumelos comercializados em forma de pó, cápsulas e comprimidos são considerados como novo alimento (Resolução ANVISA/MS nº 19/2006). Para ambos os casos não são permitidas, em rótulos ou em qualquer outro tipo de material publicitário, alegações medicamentosas ou terapêuticas, prevenção, tratamento e cura de doenças²⁸.

De acordo com Moraes e Colla²⁷, o termo nutracêutico define ampla variedade de alimentos e componentes alimentícios com apelo médico ou de saúde, sendo que tais produtos podem abranger nutrientes isolados. Os cogumelos podem ser considerados alimentos nutracêuticos porque estudos comprovam eficácia quando consumidos como suplementos dietéticos produzidos a partir da extração de princípios ativos⁴.

Alguns compostos derivados dos cogumelos são comercializados: Lentinan® (*Lentinula edodes*), Krestin® (*Trametes versicolor*), Reishi® (*Gonoderma lucidum*), Grifon® Maitake (*Grifola frondosa*) entre outros²⁹.

Dentre os alimentos funcionais estão os prebióticos, definidos como oligossacarídeos fermentáveis que permitem alteração na composição e atividade da microbiota gastrointestinal conferindo benefícios à saúde como redução do câncer do cólon, queda da absorção de colesterol pela corrente sanguínea e queda na incidência de diabetes³⁰. Os cogumelos são fontes de prebióticos porque contêm carboidratos como quitina, hemicelulose, β e α -glucanas, mananas, galactanas e xilanas. A quitina é um polissacarídeo insolúvel em água e, por não ser hidrolisada pelas enzimas do organismo humano, confere aos carboidratos de cogumelos, a característica de prebiótico¹.

Nesse contexto, os cogumelos têm sido utilizados para estimular a imunidade, melhorar a qualidade de vida dos diabéticos, evitar riscos de doenças tais como a osteoporose e a úlcera gástrica e agir como antioxidante efetivo³¹. Porém, mais estudos sobre estas propriedades biológicas ainda são necessários.

2.2.3 Propriedades medicinais

Os cogumelos medicinais fazem parte da dieta suplementar dos chineses há mais de 2.000 anos. Seus compostos biológicos de interesse são extraídos e comercializados com o apelo de melhorar as funções biológicas do corpo humano¹. De acordo com Mahajna *et al.*³², os cogumelos possuem compostos como polissacarídeos, glicoproteínas e triterpenos. Dentre os polissacarídeos mais encontrados e estudados estão os grupos das β -glucanas. Pesquisas indicam que elas possuem propriedade de ativação do sistema imune, aumentando o teor de anticorpos e fortalecendo os mecanismos de defesa fisiológica^{19, 33}. Para corroborarem com sua atividade antitumoral, as β -glucanas devem apresentar em sua estrutura ligações β (1-3) e pontos de ramificações com ligações β (1-6). A atividade antitumoral também dependerá da solubilidade das β -glucanas em água, tamanho das moléculas e número de ramificações^{1, 34}.

Além desses benefícios, Hearst *et al.*³⁵ revelaram em seus estudos que o *shiitake* (*L. edodes*) e o cogumelo ostra (*P. ostreatus*) apresentaram propriedades antibacterianas e antifúngicas. O extrato de *shiitake* demonstrou maior atividade antimicrobiana quando comparado à ciprofloxacina, um quimioterápico sintético.

2.2.4 Propriedades antioxidantes

Os extratos de cogumelo também são estudados por apresentarem propriedades antioxidantes. Estudos feitos por Tsai *et al.*⁵ apontaram propriedade antioxidante para *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus ferulae* e *Clytocybe maxima*. Jayakuma *et al.*³⁶ pesquisaram a atividade antioxidante do cogumelo ostra e demonstraram que na concentração de 10 mg/mL, o extrato etanólico de cogumelo ostra mostrou atividade antioxidante superior ao antioxidante sintético BHT.

Elmastas *et al.*⁸ analisaram os extratos metanólicos de várias espécies de cogumelos. Por apresentarem significativa atividade antioxidante *in vitro*, os autores sugerem que os cogumelos podem ser usados como fonte natural de antioxidantes, como suplemento alimentar ou na indústria farmacêutica, sendo os compostos fenólicos os principais responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos.

A capacidade antioxidante, baseada no método de sequestro do radical livre DPPH*, foi medida nas diversas espécies de cogumelos comercializados em Taiwan: *Dictyophora indusiata*, *Grigola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Tricholoma giganteum*. Em concentração de 6,4 mg/mL, o resultado encontrado foi 92,1% para a espécie *Dictyophora indusiata* e 63,2-67,8% para as demais. Essa atividade foi atribuída ao alto conteúdo de compostos fenólicos encontrado nos extratos metanólicos, já que para a espécie *Dictyophora indusiata*, não foi detectada a presença de tocoferóis³⁷.

Yang *et al.*³⁸ realizaram estudo com cogumelo *shiitake* desidratado e moído. No extrato metanólico, os autores encontraram teores de 0,12 mg/g de tocoferol e 6,27 mg/g de compostos fenólicos totais.

Componentes antioxidantes, incluindo tocoferóis e compostos fenólicos, foram quantificados em extratos etanólicos e aquosos de diferentes espécies: *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* e *Boletus edulis*. O conteúdo de compostos fenólicos totais variou de 5,67-5,81 mg/g e não apresentou diferença significativa entre as espécies e entre os extratos. No entanto, o conteúdo de tocoferóis variou de 5,27-6,18 mg/g nos extratos etanólicos e 3,18-4,4 mg/g nos extratos aquosos³⁹. O estudo sugere que, além da quantidade de compostos antioxidantes variar de acordo com a espécie de cogumelo, o tipo de solvente utilizado na extração é um fator importante para a quantificação destes compostos, interferindo diretamente na atividade antioxidante de cada espécie.

Diversos trabalhos são dedicados à avaliação da eficácia antioxidante dos compostos químicos e extratos naturais. Por isso, é importante conhecer quais são os compostos de interesse e as melhores técnicas para isolá-los.

2.3 Antioxidantes

A formação de radicais livres está associada ao metabolismo normal do organismo. Estudos indicam correlação entre esses radicais e doenças degenerativas como o câncer. A ingestão de antioxidantes exógenos de fontes como frutas e vegetais pode minimizar a ação dos radicais livres e, conseqüentemente, reduzir os riscos dessas doenças. Por isso, nos últimos anos, o aumento do consumo de fontes naturais de antioxidantes e os estudos desses compostos têm sido observados⁴⁰.

Para uma substância ser definida como antioxidante deve prevenir ou retardar a oxidação mesmo estando em baixa concentração relativamente ao substrato a ser oxidado e, além disso, deve formar radicais estáveis após a reação⁴¹.

Dentre os antioxidantes naturais destacam-se os compostos fenólicos, tocoferóis e carotenoides, todos com propriedades redutoras, além de ações biológicas importantes como sequestro de radicais livres, quelantes de metais e inibição da oxidação do LDL⁴⁰.

Nos últimos anos, a suspeita dos efeitos tóxicos de alguns compostos sintéticos usados em alimentos fez crescer o interesse em produtos naturais. Algumas indústrias, como as produtoras de aditivos alimentares, farmacêuticas e cosméticas, têm investido em pesquisas de compostos bioativos extraídos e purificados de fontes naturais⁴².

Antioxidantes são compostos com potencial de neutralizar os radicais livres, retardando ou inibindo a ação de oxidação. Os antioxidantes estão em constante atividade nos organismos vivos, necessitando estar em quantidades suficientes para neutralizar os efeitos tóxicos dos radicais livres que são constantemente produzidos⁴³.

O antioxidante, para ser empregado em alimentos, além de ser efetivo em baixa concentração, deve atender aos seguintes requisitos: ser compatível com o substrato; não conferir odor ou sabor estranho ao produto; ser efetivo durante o período de estocagem do produto alimentício; ser estável ao processo de

aquecimento e ser facilmente incorporado ao alimento⁴⁴.

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos por meio de dois mecanismos. Nesse sentido, são classificados em primários e secundários⁴⁵. Os antioxidantes primários, representados pelos compostos fenólicos, podem atuar de duas formas: pelo mecanismo de transferência de hidrogênio ou pelo mecanismo de transferência de elétrons.

Dentre os antioxidantes primários, destacam-se o butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), galato de propila (GP), *tert* butil hidroquinona (TBHQ), e tocoferóis⁴⁶. Os radicais livres R• e ROO• sequestram com maior facilidade o átomo de hidrogênio ativo do antioxidante do que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas. Dessa forma, formam-se espécies inativas para a reação em cadeia (ROOH e RH) e um radical (A•) que não apresenta capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas⁴⁷.

Os antioxidantes secundários retardam a reação de autooxidação por meio da complexação de metais, remoção de oxigênio, decomposição dos hidroperóxidos com formação de compostos mais estáveis e regeneração dos antioxidantes primários. Os agentes quelantes, como o ácido cítrico, sequestram íons metálicos como cobre e ferro que catalisam a oxidação lipídica. Já os removedores de oxigênio, como o ácido ascórbico, são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio através de reações químicas tornando-o indisponível para propagar a autooxidação⁴⁸.

2.3.1 Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos mais usados na indústria de alimentos são: BHA, BHT, TBHQ e GP. Eles apresentam estrutura fenólica (Figura 2) e, portanto, reduzem a propagação da reação de oxidação. Não possuem cor, sabor nem odor e perdem sua atividade antioxidante em temperaturas elevadas tais como as de fritura, 180 °C⁴⁹. O BHA é um antioxidante mais efetivo na redução da oxidação de gorduras animais que de óleos vegetais e apresenta pouca estabilidade frente a elevadas temperaturas⁵⁰.

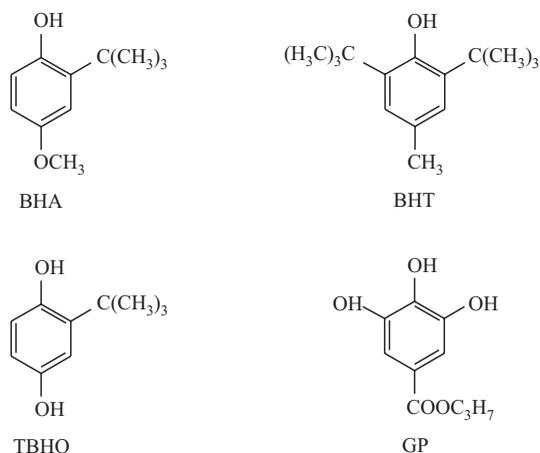


Figura 1: Estrutura dos antioxidantes sintéticos

O BHT tem qualidades similares ao BHA como solubilidade em gorduras animais e óleos vegetais e pouca resistência às elevadas temperaturas. Seu odor é um pouco desagradável⁵¹.

O TBHQ é muito efetivo na estabilização de óleos e gorduras, especialmente em óleos vegetais polinsaturados. É estável à temperatura elevada e menos volátil que o BHA e o BHT, sendo considerado o melhor antioxidante para óleos de fritura e produtos fritos. É ainda, ligeiramente solúvel em água⁴⁷.

O GP é pouco eficiente para alimentos que sofrem tratamentos térmicos porque não é resistente ao calor. Quando usado em níveis elevados pode atuar como pró-oxidante⁵².

Nos últimos anos, pesquisas têm demonstrado efeitos toxicológicos decorrentes da ingestão diária dos antioxidantes sintéticos. Estudos têm demonstrado que os antioxidantes sintéticos BHA e BHT podem causar tumores em animais. O GP pode provocar anemia, retardo no crescimento e hiperplasia no estômago. O TBHQ demonstrou potencial mutagênico em determinados ensaios⁴⁹. Por isso, o consumo desses antioxidantes é restrito. No Brasil, o uso é controlado pelo Ministério da Saúde que limita as concentrações máximas de 200 mg/kg tanto para BHA quanto para TBHQ e de 100 mg/kg para BHT e GP, sendo obrigatória a declaração do uso no rótulo⁵³. O TBHQ não é permitido no Canadá e na Comunidade Econômica Europeia. O *Codex Alimentarium* limita em 200 mg/kg o uso de BHT e TBHQ em óleos vegetais⁵⁴.

Com a finalidade de minimizar os efeitos negativos causados pelos antioxidantes sintéticos, os pesquisadores procuram encontrar produtos naturais com atividade antioxidante que poderão substituir os sintéticos ou se associarem a eles com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos. As pesquisas estão voltadas para os compostos fenólicos de origem vegetal⁴⁵.

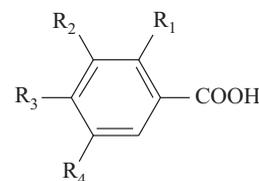
2.3.2 Antioxidantes naturais

Do ponto de vista químico, os antioxidantes naturais assemelham-se aos sintéticos por apresentarem estruturas fenólicas, moléculas que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos que interagem com radicais livres e são consumidas durante a reação¹⁹. Muitos pesquisadores têm se dedicado à busca de compostos naturais a partir de subprodutos como bagaços de uva^{55, 56}, casca de laranja⁵⁷, casca de romã⁵⁸ e carambola⁵⁹.

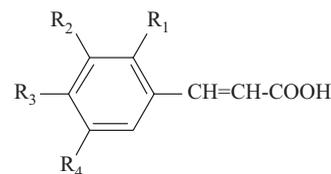
Dentre os antioxidantes naturais destacam-se os ácidos fenólicos, os flavonoides e os tocoferóis.

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupos hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes para os alimentos. Eles são divididos em dois grupos (Figura 2). O primeiro é composto pelos ácidos benzoicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza

e dentre os quais se destacam o ácido síringico, gálico e vanílico. O segundo grupo é formado pelos ácidos cinâmicos, com nove átomos de carbono (C6-C3), dentre os quais se encontram os ácidos *o*-cumárico, *p*-cumárico, ácido cafeico, ferúlico e sináptico⁴⁵.



Ácido salicílico: R₁ = OH; R₂ = R₃ = R₄ = H
 Ácido gentísico: R₁ = R₄ = OH; R₂ = R₃ = H
 Ácido *p*-hidroxibenzoico: R₁ = R₂ = R₄ = H; R₃ = OH
 Ácido protocatequímico: R₁ = R₄ = H; R₂ = R₃ = OH
 Ácido vanílico: R₁ = R₄ = H; R₂ = OCH₃; R₃ = OH
 Ácido gálico: R₁ = H; R₂ = R₃ = R₄ = OH
 Ácido síringico: R₁ = H; R₂ = R₄ = OCH₃; R₃ = OH



Ácido cinâmico: R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = H
 Ácido *o*-cumárico: R₁ = OH; R₂ = R₃ = R₄ = H
 Ácido *m*-cumárico: R₁ = R₃ = R₄ = H; R₂ = OH
 Ácido *p*-cumárico: R₁ = R₂ = R₄ = H; R₃ = OH
 Ácido cafeico: R₁ = R₄ = H; R₂ = R₃ = OH
 Ácido ferúlico: R₁ = R₄ = H; R₂ = OCH₃; R₃ = OH
 Ácido sináptico: R₁ = H; R₂ = R₄ = OCH₃; R₃ = OH

Figura 2: Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoicos (a) e hidroxicinâmicos (b)

Marinova e Yanishlieva⁶⁰ compararam quantitativamente o comportamento cinético da inibição da oxidação de alguns ácidos fenólicos. Concluíram que, no caso dos ácidos benzoicos, a hidroxila presente na molécula do ácido *p*-hidroxibenzoico não confere a este nenhuma propriedade antioxidante. Já a metoxila presente com a hidroxila no ácido vanílico confere a ele uma pequena atividade antioxidante. No caso do ácido síringico, o qual possui dois grupamentos de metoxila, a ação é ainda maior.

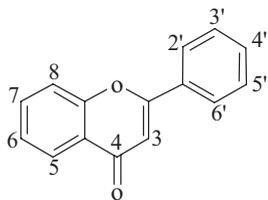
Com relação aos ácidos cinâmicos, a presença de uma metoxila adjacente à hidroxila, como ocorre no ácido ferúlico, aumenta o poder antioxidante do composto. Essa atividade é ainda maior com a presença de dois radicais metoxilas, como ocorre no ácido sináptico. Entretanto, o maior potencial antioxidante foi encontrado quando há duas hidroxilas nas porções 2 e 3, estrutura apresentada pelo ácido cafeico. Portanto, a atividade antioxidante dos compostos estudados pelos autores possui a seguinte ordem: ácido cafeico >

sináptico > síringico > ferúlico > vanílico.

Os flavonoides possuem a estrutura básica formada por C6-C3-C6, sendo os compostos mais diversificados do reino vegetal (Figura 3). Os flavonoides dividem-se em 14 classes,

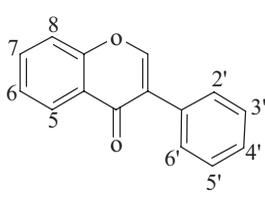
sendo que os que se incluem na dieta humana são divididos em 6 grupos: flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanóis, flavonóis e antocianidinas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula⁴¹.

Flavonas



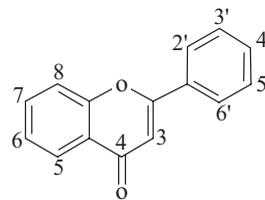
Apigenina: 5=7=4'=OH
Luteolina: 5=7=3'=4'=OH

Isoflavonas



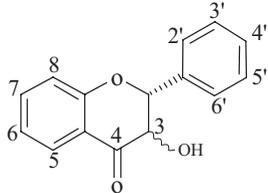
Daidizeína: 7=4'=OH
Genisteína: 5=7=4'=OH

Flavanonas



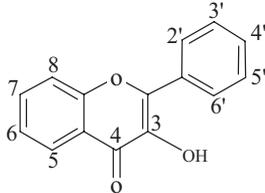
Naringenina: 5=7=4'=OH
Hesperidina: 5=7=3', 4'=OCH₃

Flavanóis



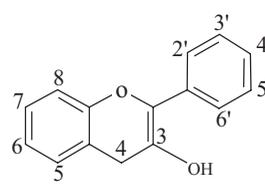
Catequina (2*R,3*S): 5=7=3'=4'=OH
Epicatequina (2*R,3*R): 5=7=3'=4'=OH

Flavonóis



Campferol: 5=7=4'=OH
Quercitina: 5=7=3'=4'=OH
Miricetina: 5=7=3'=4'=5'=OH

Antocianidinas



Pelargonidina: 5=7=4'=OH
Cianidina: 5=7=3'=4'=OH
Malvidina: 5=7=4'=OH, 3'=5'=OCH₃

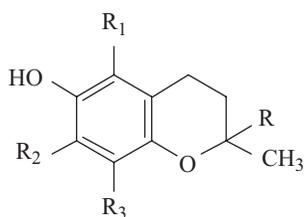
Figura 3: Principais flavonoides encontrados no reino vegetal

A posição e o número de hidroxilas presentes na molécula são responsáveis pela atividade antioxidante desses compostos. Os flavonoides atuam como antioxidantes primários, reagindo com radicais livres e, também, como quelante de metais, a exemplo dos flavonóis. A ação quelante dos flavonóis deve-se à presença da hidroxila do carbono 3 e do grupo carbonila do carbono 4 do anel pirano. A quercitina, que possui hidroxilas nas posições 5, 7, 3' e 4', apresenta maior atividade antioxidante se comparada ao campferol, que

possui hidroxilas somente nas posições 5, 7 e 4'⁴⁴.

Os flavonoides são polifenóis bioativos que contribuem para a prevenção da aterosclerose e do câncer, além de possuírem ação protetora contra a oxidação *in vitro* da LDL⁶¹.

Ao contrário dos flavonoides, os tocoferóis apresentam estrutura monofenólica. Exibem atividade antioxidante e de vitamina E. São agrupados em duas séries de compostos que possuem estrutura química semelhante e recebem o nome genérico de tocóis e tocotrienóis (Figura 4).



α-toco: R₁ = R₂ = R₃ = CH₃
β-toco: R₁ = R₃ = CH₃; R₂ = H
γ-toco: R₂ = R₃ = CH₃; R₁ = H
δ-toco: R₁ = R₂ = H; R₃ = CH₃

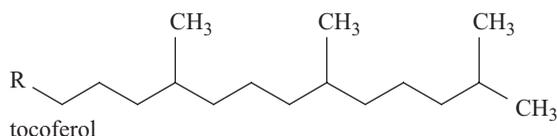
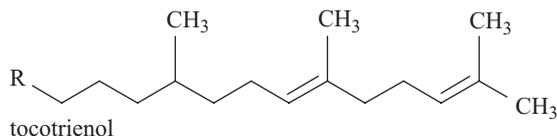


Figura 4: Estrutura química do tocoferol e tocotrienol

Os tocóis possuem cadeia saturada ligada ao anel e são denominados tocoferóis. Já os tocotrienóis possuem cadeia insaturada. Os tocoferóis atuam como antioxidantes primários e a atividade antioxidante decresce do composto δ para o α -tocoferol, sendo que o β e γ -tocoferol apresentam atividades intermediárias^{62,63}.

A atividade antioxidante dos tocoferóis depende do tipo de alimento a que foi adicionado, da concentração usada, da presença de metais e de compostos sinérgicos. Em elevadas concentrações e na presença de traços de ferro e de sais de cobre, os tocoferóis podem atuar como pró-oxidantes. Apresentam atividade antioxidante satisfatória quando usados em sinergia com ácido ascórbico, ácido cítrico, agentes quelantes ou antioxidantes sintéticos¹⁰.

2.4 Métodos *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante

Vários métodos analíticos têm sido propostos para determinar a atividade antioxidante total de extratos naturais, com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante das amostras utilizando diferentes sistemas *in vitro*.

Segundo Niki⁶⁴, para se mensurar a atividade antioxidante dois pontos devem ser observados: a) a eficiência do sequestrador de radicais livres, que é determinada não apenas pela reatividade do antioxidante com o radical livre, mas também pela sua concentração; e b) a eficácia do sequestrador do radical livre depende da localização do antioxidante no substrato. Por exemplo, a vitamina C é um potente sequestrador de radical hidrofílico, mas não de radical lipofílico. Normalmente são utilizados métodos indiretos que medem a capacidade de uma molécula em reduzir um radical livre.

O método da atividade antioxidante pela captação do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi inicialmente proposto por Blois⁶⁵, e tem sido amplamente utilizado para se determinar a atividade antioxidante de alimentos^{19, 66,5}.

O radical livre disponível comercialmente DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é solúvel em metanol e apresenta coloração violeta. Quando um antioxidante é misturado à solução metanólica de DPPH•, o radical livre é reduzido e, com isso, a coloração da solução muda de violeta para amarela. Essa mudança é medida espectrofotometricamente em 515 nm, indicando a eficiência do antioxidante adicionado em remover o radical⁶⁷. Trata-se de um método rápido, que não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação.

Portanto, o efeito dos antioxidantes sobre o sequestro do radical DPPH• é atribuído à habilidade desses compostos de doar hidrogênio.

O método β -caroteno/ácido linoleico consiste na descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico. Estima a habilidade dos compostos antioxidantes dos extratos naturais de sequestrar o radical peróxido do ácido linoleico (LOO•), que oxida o β -caroteno presente em uma emulsão. Como não ocorre a altas temperaturas, pode ser utilizado para determinar

a atividade antioxidante de compostos termolábeis. A determinação é feita espectrofotometricamente em 470nm⁴¹.

Segundo Silva *et al.*⁶⁸, a ausência de correlação entre os diferentes métodos deve-se, por um lado, aos indicadores usados na avaliação da atividade antioxidante, os quais não refletem o mesmo estado de evolução do processo oxidativo e, por outro, às condições experimentais em que se efetuam as avaliações, como temperatura, presença de catalisadores metálicos, exposição à luz e solventes envolvidos na reação.

2.5 Extração de antioxidantes naturais

Dentre os métodos mais utilizados para a extração de compostos antioxidantes está a utilização de solventes de diferentes polaridades, como água, etanol, éter de petróleo, metanol e suas misturas, que permitem a obtenção de compostos com atividade antioxidante. No entanto, outras técnicas como a extração supercrítica, têm sido sugeridas para melhorar a qualidade dos extratos e reduzir a quantidade de solventes orgânicos^{69,70}. Devido a sua baixa viscosidade e alta capacidade de difusão, os fluidos supercríticos podem se difundir através dos materiais sólidos, resultando em melhores rendimentos nas extrações. A extração supercrítica representa alternativa viável para a extração porque produz extratos livres de resíduos e pode ser conduzida em baixas temperaturas, preservando a qualidade de compostos termo-sensíveis. Porém, o grande inconveniente da extração supercrítica reside na alta pressão necessária para a operação que requer equipamentos excessivamente caros, elevando o custo final do produto⁷¹.

Kitzberger *et al.*⁷² compararam os extratos de shiitake obtidos por extração supercrítica e da extração com solventes, n-hexano, diclorometano, acetato de etila e água. Os melhores rendimentos ocorreram para as fases n-hexano e aquosa, 1,25 e 0,94%, respectivamente, valores próximos aos da extração supercrítica a 30 °C/300 bar e 40 °C/300 bar que foram de 0,96 e 1,00%, respectivamente.

O rendimento da extração de compostos antioxidantes a partir de fontes naturais é influenciado principalmente pelas condições em que o processo de extração sólido-líquido é realizado. Como cada fonte natural tem características únicas em termos de estrutura e composição, quando combinada com solventes o resultado da interação soluto-solvente tem comportamento imprevisível⁷³.

Além do solvente, outros fatores podem contribuir para a eficiência do processo de extração. Por exemplo, altas temperaturas são relatadas para melhorar a eficiência da extração, devido à maior taxa de difusão e solubilidade dos analitos em solventes, embora temperaturas elevadas também possam afetar a atividade dos extratos devido à degradação dos compostos antioxidantes. Dessa forma, as extrações de compostos antioxidantes são conduzidas, de maneira geral, entre 20 e 60 °C⁵⁶.

Segundo Spigno *et al.*⁷⁴, a cinética de extração acontece em dois estágios. O primeiro, mais rápido, envolve a

transferência direta do soluto da superfície da matéria-prima; o segundo estágio corresponde à difusão molecular do soluto do interior da matéria-prima para o solvente, que acontece de maneira mais lenta. Os fatores que interferem nesses estágios são: coeficiente de difusão, coeficiente de partição dos componentes extraídos do sólido para o solvente, o tipo de solvente, assim como seu volume, tamanho e geometria das partículas sólidas.

Para maximizar o processo de extração e conservar os compostos antioxidantes, é importante que algumas etapas preliminares sejam realizadas^{7, 39, 72,75}. Nesses estudos, os cogumelos foram desidratados e moídos antes da extração, aumentando, assim, a superfície de contato com o solvente.

Para o isolamento de compostos antioxidantes naturais obtidos de frutas, sementes e especiarias, faz-se necessária a extração com solventes de polaridades diferentes. Julkunen-Tiitto⁷⁶ alega que alimentos com predominância de compostos fenólicos apresentam maior rendimento no processo de extração com solventes polares, devido à solubilidade.

Os compostos antioxidantes possuem polaridade bem variada. Por isso, não existe sistema de extração com solvente que seja totalmente satisfatório para o isolamento de todos os antioxidantes naturais.

Substâncias com atividade biológica normalmente estão presentes em plantas e cogumelos e, portanto, o uso de técnicas de extração é importante para selecionar essas substâncias ou grupos de componentes de interesse.

Cheung *et al.*⁷ investigaram a atividade antioxidante e os compostos fenólicos de extratos de diversos cogumelos, dentre eles o *shiitake*. Para a obtenção do extrato utilizaram solventes com os seguintes resultados de rendimento: metanol (33,5%), água (16,2%), acetato de etila (3,65%) e éter de petróleo (2,4%), comprovando a eficiência dos solventes de maior polaridade.

Em estudos realizados com a variedade cogumelo do sol, Tsai *et al.*³⁹ avaliaram o rendimento da extração, a atividade antioxidante e o teor de fenóis totais no extrato. A extração foi realizada com água quente para simular a infusão de chá e com etanol. O extrato aquoso apresentou rendimento de 47% e o extrato etanólico 16%, comprovando a eficiência do solvente mais polar. Em relação à atividade antioxidante, o extrato etanólico foi mais eficiente que o aquoso. Portanto, apesar do rendimento do extrato aquoso ter sido maior, a extração etanólica conseguiu retirar do cogumelo os compostos fenólicos com maior poder antioxidante.

Com base nesses estudos, conclui-se que a solubilidade em determinado solvente é uma característica de cada composto, o que explica a inexistência de um único método universal, para a separação de todos os antioxidantes naturais. Além da solubilidade dos compostos fenólicos variar de acordo com a polaridade do solvente, o grau de polimerização dos fenólicos e suas interações com outros constituintes dos alimentos também interferem no grau de obtenção desses compostos.

3 Conclusão

Os cogumelos são fonte de proteínas, vitaminas, minerais e, sobretudo, de compostos bioativos como os compostos fenólicos. Esses compostos conferem aos cogumelos propriedades antioxidantes para agir em sistemas lipídicos, mesmo que sejam submetidos a processos de estresse oxidativo. A obtenção dos compostos antioxidantes dependerá dos métodos de extração e do solvente utilizado, sendo necessário o conhecimento das técnicas disponíveis para otimizar o processo.

Referências

1. Aida FMNA, Shuhaimi M, Yazid M, Maaruf AG. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. Trends Food Sci Tech 2009;20(11):567-75.
2. Sanchez C. Mini review: modern aspects of mushroom culture technology. Appl Microbiol Biot 2004;64(1):756-62.
3. FAO – Food and Agriculture Organization [acesso em 28 dez 2009]. Disponível em <http://www.fao.org/corp/statistics/en/>
4. Novaes MRCCG, Fortes RC. Efeitos antitumorais de cogumelos comestíveis da família agaricaceae. Nutr Bras 2005;4(4):207-17.
5. Tsai SY, Huang SJ, Lo SH, Wo TP, Lian PY, Mau JL. Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. Food Chem 2009;113(2):578-84.
6. Wong JY, Chye FY. Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. J Food Compos Anal 2009;22(4):269-77.
7. Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushrooms extracts. Food Chem 2003;81(2):249-55.
8. Elmastas M, Isildak O, Turkekel I, Temur N. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. J Food Compos Anal 2007;20(3-4):337-45.
9. Anderson D, Phillips JB. Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. Food Chem Toxicol 1999;37(9/10):1015-25.
10. Pokorný J. Natural antioxidants for food use. Trends Food Sci Technol 1991;2(9):223-7.
11. Angelo PM, Jorge N. Antioxidant evaluation of extract and ascorbyl palmitate in sunflower oil under thermoxidation. J Am Oil Chem Soc 2008;85(11):1045-9.
12. Bera D, Lahiri D, Nag A. Studies on a natural antioxidant for stabilization of edible oil and comparison with synthetic antioxidants. J Food Eng 2006;74(4):542-5.
13. Iqbal S, Bhanger MI. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. Food Chem 2007;100(1):246-54.
14. Luzia DMM, Jorge N. Ação antioxidante do extrato de semente de limão (*Citrus lemon*) adicionado ao óleo de soja sob termoxidação. Rev Inst Adolfo Lutz 2009;68(1):219-23.
15. Chang R. Functional properties of edible mushrooms. Nutr Rev 1996;54(11):91-3.
16. Sampaio SM, Queiroz MR. Influência do processo de secagem na qualidade do cogumelo shiitake. Eng Agric 2006;26(2):570-7.
17. Ferreira JE. Produção de cogumelos. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária; 1998.
18. Kaneno R, Fontanari LM, Santos SA, Di Stasi LC, Rodrigues Filho E, Eira, AF. Effects of extract from Brazilian sun-

- mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of ehrlich tumor-bearing mice. *Food Chem Toxicol* 2004;42(16):909-16.
19. Lee IP, Kang BH, Roh JK, Kim JR Lack of carcinogenicity of lyophilized *Agaricus blazei* Murill in a F344 rat two year bioassay. *Food Chem Toxicol* 2008;46(1):87-95.
 20. Furlani RPZ, Godoy HT. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2005;64(2):149-54.
 21. Mattila P, Konko K, Eurola M, Pihlava JM, Astola J, Vahtersto VH *et al.* Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J Agr Food Chem* 2001;49(5):2343-8.
 22. Oliveira ECM, Oliveira ER, Lima LCO, Villas Boas EVB. Composição centesimal do cogumelo do sol (*Agaricus blazei*). *Rev Univ Alfenas* 1999;5(1):169-72.
 23. Tsai SY, Tsai H, Mau JL. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. *Food Chem* 2008;107(3):977-83.
 24. Mizuno T, Hagiwara Y, Nakamura T, Tro H, Shimura K, Sumiya T *et al.* Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric Biol Chem* 1990;54(11):2889-96.
 25. Singh P, Langowski HC, Wani AA, Saengerlaub S. Recent advances in extending the shelf life of fresh *Agaricus* mushrooms: a review. *J Sci Food Agric* 2010;90(8):903-11.
 26. Arihara K. Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Sci* 2006;74(1):219-29.
 27. Moraes FP, Colla LM. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Rev Eletrônica Farm* 2006;3(2):109-22.
 28. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe técnico 19. Brasília, 2006. [acesso em 27 jun 2009]. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/19_300806.htm
 29. Novaes MRCG, Fortes RC. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos *Agaricales* e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. *Rev Bras Cancerol* 2006;52(4):363-71.
 30. Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastal RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 2004;17(2):259-75.
 31. Gutierrez ZR, Mantovani MS, Eira AF, Ribeiro LR, Jordão BQ. Variation of antimutagenicity of water extracts of *Agaricus blazei* Murril *in vitro*. *Toxicol in vitro* 2004;18(3):301-9.
 32. Mahajna J, Dotan N, Zaidman BZ, Petrova RD, Wasser SP. Pharmacological values of medicinal mushrooms for prostate cancer therapy: the case of *Gonoderma lucidum*. *Nutr Cancer* 2009;61(1):16-26.
 33. Liu CH, Lin Q, Gao Y, Xing Y, Xi T. Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs. *Carbohydr Polym* 2007;67(3):313-8.
 34. Ribeiro AO, Uemura GS, Souza RV, Oliveira FR. Atividade antidiabética e efeitos fisiológicos associados aos β -glucanos presentes em *Rhynchelytrum repens*. *Unopar Cient Biol Saúde* 2009;11(3):41-50.
 35. Hearst R, Nelson D, McCollum G, Millar BC, Maeda Y, Goldsmith CE *et al.* An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of shiitake (*Lentinus edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushroom. *Complementary Ther Clin Pract* 2009;15(1):5-7.
 36. Jayakumar T, Thomas PA, Geraldine P. *In vitro* antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Innov Food Sci Emerg* 2009;10(2):228-34.
 37. Mau JL, Lin HC, Song SF. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Res Int* 2002;35(6):519-26.
 38. Yang JH, Lin HC, Mau JL. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chem* 2002;77(2):229-35.
 39. Tsai SY, Tsai H, Mau JL. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. *Lebensm Wiss Technol* 2007;40(8):1392-402.
 40. Alvarez-Parrilla E, De La Rosa LA, Martínez NR, González Aguilar GA. Total phenols and antioxidant activity of commercial and wild mushrooms from Chihuahua, Mexico. *Cienc Tecnol Aliment* 2007;5(5):329-34.
 41. Borguini RG, Torres EFS. Tomatoes and tomato products as dietary sources of antioxidants. *Food Rev Int* 2006;25(4):313-25.
 42. Barros L, Ferreira MJ, Queirós B, Ferreira ICFR, Baptista P. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem* 2007;103(2):413-19.
 43. Dubost NJ, Ou B, Beelman RB. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushroom and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chem* 2007;105(2):727-35.
 44. Melo EA, Guerra NB. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Bol Soc Bras Cienc e Tecnol Aliment* 2002;36(1):1-11.
 45. Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr* 2002;15(1):71-81.
 46. Dubinsky E. Utilización de antioxidantes en aceites y grasas. *Grasas Aceites* 2000;12(1):191-9.
 47. Araújo JMA. Química de alimentos: teoria e prática. Viçosa: UFV; 2006.
 48. Gordon MH. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In: Hudson B. *Food antioxidants*. London: Elsevier Applied Science; 1990. p.1-18.
 49. Zhang CX, Wu H, Weng XC. Two novel synthetic antioxidants for deep frying oils. *Food Chem* 2004;84(2):219-22.
 50. Jorge N. Química e tecnologia de óleos vegetais. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2009.
 51. Ordóñez JAP, Rodríguez MIC, Álvarez LF, Sanz MLG, Minguillón GDGF, Peralez LH. Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artmed; 2005.
 52. Ramalho VC, Jorge N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim Nova* 2006;29(4):755-60.
 53. Brasil. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 04/88. In: Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, *Compêndio da Legislação de Alimentos*. São Paulo: ABIA; 2001.
 54. FAO – Food and Agriculture Organization [acesso em 2 maio 2010]. Disponível em <http://www.codexalimentarius.net/gsfonline/additives/details.html?id=189>.
 55. Lafka TI, Sinanoglou V, Lazos ES. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chem* 2007;104(3):1206-14.
 56. Pinelo M, Rubilar M, Jerez M, Sineiro J, Núñez MJ. Effect of solvent, temperature and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *J Agric Food Chem* 2005;53(6):2111-7.
 57. Xu GH, Chen JC, Liu DH, Zhang YH, Jiang P, Ye XQ. Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. *J Food Sci* 2008;73(1):11-8.

58. Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem* 2006;96(2):254-60.
59. Shui G, Leong LP. Residue from star as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chem* 2006;97(2):277-84.
60. Marinova EM, Yanishlieva NV. Inhibited oxidation of lipids II: Comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids. *Eur J Lipid Sci Technol* 1992;94(11):428-32.
61. Hollman PCHC, Katan MB. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* 1999;37(1):937-42.
62. Hemeda HM, Klein BP. Effects of naturally antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. *J Food Sci* 1990;55(1):184-5.
63. Six P. Current research in natural food antioxidants. *Food Technol* 1994;5(6):679-87.
64. Niki E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly? *J Nutr* 2002;18(6):524-5.
65. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958;118:1199-200.
66. Soares AA, Souza CGM, Daniel FM, Ferrari GP, Costa SMG, Peralta RM. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. *Food Chem* 2009;112(4):775-81.
67. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 1995;28(1):25-30.
68. Silva FAM, Borges MFM, Ferreira MA. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Quim Nova* 1999;22(1):94-103.
69. Leal PF, Braga ME, Sato DN, Carvalho JE, Meireles MA. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. *J Agric Food Chem* 2003;51(9):2520-5.
70. Rehman Z, Habib F, Shah WH. Utilization of potato peels extract as a natural antioxidant in soy bean oil. *Food Chem* 2004;85(2):215-20.
71. Andreo D, Jorge N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Bol Soc Bras Cienc Tecnol Aliment* 2006;24(2):319-36.
72. Kitzberger CSG, Smânia Junior A, Pedrosa RC, Ferreira SRS. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extract obtained by organic solvents and supercritical fluids. *J Food Eng* 2007;80(2):631-8.
73. Sousa A, Ferreira ICFR, Barros L, Bento A, Pereira JA. Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives "alcaparras". *Lebensm Wiss Technol* 2008;41(1):739-45.
74. Spigno G, Tramelli L, De Faveri DM. Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J Food Eng* 2007;81(1):200-8.
75. Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee J. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem* 2006;99(2):381-7.
76. Julkunen-Tiitto R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolic. *J Agric Food Chem* 1985;33(2):213-7.