



**CARACTERIZAÇÃO DE BASIDIOCARPOS
DESIDRATADOS DE *Agaricus blazei***

MARISA APARECIDA FONSECA DELÚ

2003

56919
011265

MARISA APARECIDA FONSECA DELÚ

**CARACTERIZAÇÃO DE BASIDIOCARPOS
DESIDRATADOS DE *Agaricus blazei***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRA**

2003

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Delú, Marisa Aparecida da Fonseca

**Caracterização de basidiocarpos desidratados de Agaricus blazei /
Marisa Aparecida da Fonseca Delú. -- Lavras : UFLA, 2003.
49 p. : il.**

**Orientador: Eustáquio Souza Dias.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.**

**1. Agaricus blazei. 2. Basidiocarpos. 3. Cogumelo. 4. Desidratação de
alimento. 5. Caracterização bioquímica. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.**

**CDD-576.163
-589.222**

MARISA APARECIDA DA FONSECA DELÚ

**CARACTERIZAÇÃO DE BASIDIOCARPOS
DESIDRATADOS DE *Agaricus blazei***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Mestre”.


APROVADA em 27 de junho de 2003

Prof. Dr^a Rosane Freitas Schwan

UFLA

Prof. Dr. Eduardo Valério de Barros Vilas Boas

UFLA


Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus

e

Aos anjos que Ele colocou em minha vida, iluminando, compartilhando e
caminhando ao meu lado:

Meus pais, Hélio Osório da Fonseca e Acioni Maria da Fonseca

Meu marido, Nelson Delú Filho

Meus filhos, Henrique Osório Fonseca Delú e Bruno Osório Fonseca Delú

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade concedida e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias, pela orientação e ensinamentos e ao Prof. Dr. Romildo da Silva, pela convivência e ensinamentos.

À Coordenadora e Professora do Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola da UFLA, Dr^a Rosane Freitas Schwan, pela acolhida, orientação e ensinamentos.

Às Professoras Dr^a Lea Rosa Mourgués-Schurter, Zoraia Silva e Dayse L.M. Resende, pela amizade e incentivo.

Ao Departamento de Ciências dos Alimentos, na pessoa do Prof. Dr. Eduardo V.B. Vilas Boas pelas contribuições.

Ao Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia, nas pessoas de Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira e Marco Antônio Alencar, pelo apoio na realização das análises bioquímicas.

Ao Setor de Genética e Melhoramento de Plantas do Departamento de Biologia, nas pessoas do Prof. Dr. João Bosco dos Santos e do funcionário Lamartine.

À Scheila Costa Maia e Cláudia Labory, pela amizade, auxílio e apoio espiritual.

A todos os colegas do Setor de Microbiologia Agrícola, em especial Alexandre, Evânia e Márcia, pelas contribuições na realização deste trabalho.

Às funcionárias do Setor de Microbiologia Agrícola, Magda, Cidinha e Ivani.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Atividade antitumoral e outras propriedades bioquímicas do <i>A. blazei</i>	04
2.2 Colheita, pós-colheita e armazenamento de <i>A. blazei</i>	06
2.3. Processo de escurecimento enzimático do basidiocarpo.....	08
2.4 Avaliação da cor em alimentos.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Cultivo de <i>Agaricus blazei</i>	14
3.2 Colheita e lavagem dos basidiocarpos.....	14
3.3 Preparo da amostra.....	15
3.4 Delineamento experimental e análise estatística.....	15
3.5 Secagem do Material.....	15
3.6 Avaliação da cor.....	16
3.7 Caracterização bioquímica.....	16
3.8 Análise da polifenol oxidase.....	17
3.9 Determinação da composição centesimal de basidiocarpos de <i>A. blazei</i>	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1 Biomassa fresca e seca de <i>Agaricus blazei</i> durante o processamento.....	19
4.2 Concentração de açúcares redutores e solúveis totais.....	20

4.3	Concentração de proteínas solúveis totais (PST) e aminoácidos livres.....	23
4.4	Atividade da polifenol oxidase.....	26
4.5	Proposta de padronização da cor para comercialização de <i>A. blazei</i>	28
5	CONCLUSÕES.....	38
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
	ANEXOS.....	48

RESUMO

DELÚ, Marisa Aparecida da Fonseca. **Caracterização de basidiocarpos desidratados de *Agaricus blazei***. UFLA, 2003, 49p. (Dissertação – Mestrado em Microbiologia Agrícola).

O cultivo do cogumelo *Agaricus blazei* vem sendo intensificado, em razão principalmente dos relatos de suas propriedades medicinais. Uma produção comercialmente satisfatória desse cogumelo deve ser caracterizada pelo peso, tamanho e coloração adequados. Conduziu-se este trabalho com o objetivo de avaliar o efeito do uso de ácido cítrico e ácido ascórbico sobre a coloração final de basidiocarpos desidratados e em algumas características bioquímicas. Foram realizadas análises bioquímicas da biomassa seca para açúcares redutores, açúcares solúveis totais, proteínas solúveis totais, aminoácidos livres e composição centesimal. A atividade da polifenol oxidase foi avaliada na biomassa fresca. Os basidiocarpos, depois de colhidos, foram seccionados ao meio, sendo uma parte imersa apenas em água e outra imersa na solução contendo ácido ascórbico ou cítrico. Em seguida, as metades foram desidratadas em estufa a 50°C por 24 horas, seguindo-se a extração em água para realização das análises bioquímicas. Pelos resultados, infere-se que há variação significativa no conteúdo de açúcares redutores, o que se reflete, em menor intensidade, na concentração de açúcares solúveis totais. Parece, ainda, ocorrer hidrólise protéica em alguns tratamentos, acompanhada por um incremento no conteúdo de aminoácidos livres. Em relação à coloração, utilizando-se a escala de cores de Munsell ou colorímetro, verificou-se que os tratamentos utilizados não resultaram em nenhum padrão de cor definida. A atividade da polifenol oxidase foi reduzida nos tratamentos em que se usou a imersão do cogumelo, seja em água ou em ácido ascórbico em relação ao controle (cogumelos somente lavados em água corrente). Análises bioquímicas realizadas em basidiocarpos agrupados em 6 diferentes classes de cor indicaram haver diferenças significativas nos conteúdos de proteínas solúveis totais e açúcares redutores, ao passo que para os aminoácidos livres, não houve diferenças significativas entre os tratamentos. A composição centesimal indica haver correlação positiva entre o teor de umidade e concentração de proteínas com o aumento na intensidade da coloração, enquanto para a fração glicídica, os dados sugerem haver uma correlação negativa com o aumento na intensidade da coloração.

Comitê de Orientação: Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias - UFLA (orientador),
Profª Rosane Freitas Schwan – UFLA (co-orientadora)

ABSTRACT

DELÚ, Marisa Aparecida da Fonseca. Characterization of *Agaricus blazei* basidiocarps dehydrates: UFLA, 2003, 49p. (Dissertation – Master in Agriculture Microbiology)

The cultivation of *Agaricus blazei* mushroom has been intensified mainly due to reports about its medicinal properties. The commercial production of this mushroom should be characterized by appropriate weight, size and colour. The main aim of this work was to evaluate the use of antioxidant, such as citric and ascorbic acid in the final colour of the dehydrated fruiting bodies of the mushroom, used in different concentration and times of immersion. The mushrooms were also biochemical analyzed and were characterized in relation to dry biomass, reducing sugars, total sugars, total soluble proteins, free amino acids and centesimal compositions. The polyphenol oxidase activity was analyzed in fresh biomass. The mushrooms, after harvest, were sectioned in halves, where one part was immersed only in water and the other immersed in solution containing the antioxidant, either ascorbic or citric acid. Following the two halves were dehydrated in oven at 50°C for 24 hours. The results indicated that there was a high variation in the contents of reducing carbohydrates, which was reflected in minor intensity in the concentration of the total carbohydrates. It seems that there was protein hydrolysis in some treatments, followed by the increment of free amino acid contents. In relation to the colour, it was used the Munsell scale and verified that the treatments utilized did not show any defined standard colour. The polyphenol oxidase activity was reduced in treatments, which the mushrooms were immersed both in water and ascorbic acid in relation to the control (mushroom only washed in running water). Biochemical analyses realized in fruiting bodies grouped into 6 classes of colour indicated that there was a significative difference in the content of total soluble proteins and reducing sugars, however there was no significant difference in the contents of free amino acids among the treatments analyzed. The centesimal composition indicated to have a positive correlation between the humidity and concentration of proteins, while the glicidic fraction showed that there was a negative correlation in relation to the increase of the intensity on the coloration of the fruiting bodies.

Guidance Committee: Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias - UFLA (Major Professor), Prof^a Rosane Freitas Schwan – UFLA

1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos, bastante utilizados como uma iguaria na culinária, estão sendo atualmente reconhecidos também por suas propriedades medicinais. São considerados alimentos saudáveis, por serem pobres em calorias e lipídios, ricos em proteínas, fibras, vitaminas e minerais.

Entre as espécies mais cultivadas, encontram-se o *Agaricus bisporus*, popularmente conhecido como “champignon”, o *Lentinula edodes* (shiitake) e o *Pleurotus ostreatus*, que podem ser consumidos frescos “in natura” ou processados.

Entre os cogumelos utilizados na dieta humana, além dos anteriormente mencionados, o *Agaricus blazei* vem sendo estudado nos últimos anos, estimulado pela grande procura que ele tem despertado, sobretudo depois que lhe foram atribuídas diversas atividades bioquímicas no combate ao câncer.

A comercialização do *A. blazei* é feita em função do tamanho, formato do píleo e cor do basidiocarpo desidratado. O tamanho desejado é de cerca de 7 cm de altura ou mais, com o píleo fechado e as suas bordas voltadas para baixo. Com relação à coloração, a cor amarelo-palha é a preferida. Em razão dessas características, o produto pode ser classificado como Tipo A, com tamanho superior a 5 cm, B menor que 5 cm, e C inferior a 5 cm, escuros, abertos e quebrados (que se obtêm os menores valores de comercialização).

Todavia, apesar de o produto ser amplamente aceito pelo mercado consumidor, notadamente o japonês, para onde se destina grande parte da produção nacional, não existem informações na literatura acerca da padronização de cor para sua comercialização. Assim, conduziu-se este trabalho com o objetivo de verificar a utilização do antioxidante ácido ascórbico e o acidulante ácido cítrico (que também atua como sinergista do antioxidante) sobre a coloração final em basidiocarpos desidratados e em algumas

características bioquímicas de *A. blazei*, como: teor de proteínas solúveis totais, açúcares solúveis totais, açúcares redutores, aminoácidos livres, atividade da polifenol oxidase e análise centesimal, que exprime o valor nutritivo de um alimento para cada 100 g do produto analisado (umidade, cinzas, lipídeos, proteínas, fibras e glicídios).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A utilização de fungos na dieta humana remonta a épocas bastante distantes, tendo sido relatado sua utilização desde o ano 600 d.C. na China, ao passo que, na França, Tournefort (1707) descreveu um método para o cultivo de cogumelos, o que contribuiu para o grande crescimento no cultivo de *Agaricus bisporus* (Alexopoulos et al., 1996; Mizuno, 1997).

Das 10.000 espécies de cogumelos conhecidas atualmente, acredita-se que 700 sejam comestíveis e, dessas, 220 possuem valor medicinal (Urban, 2001).

Entre os fungos comestíveis conhecidos, a maioria pertence à Divisão *Basidiomycota*, podendo ser saprófitas ou simbioses micorrízicas. De todas as espécies conhecidas, destacam-se o *A. bisporus* (champignon) e o *Lentinula edodes* (shiitake), os quais são as espécies de cogumelos mais cultivadas no mundo (Mattila et al., 2000).

O cogumelo *A. blazei* é um fungo saprófita da família *Agaricaceae* pertencente à divisão *Basidiomycota*. A espécie originária do Brasil foi descoberta acidentalmente nas florestas tropicais brasileiras. Cientistas japoneses enviaram amostras do fungo até então desconhecido, e que seria classificado na Bélgica como *A. blazei* (Mizuno, 1997).

Estudos desenvolvidos logo em seguida apresentaram surpreendentes respostas no combate ao desenvolvimento de células cancerígenas, o que repercutiu imediatamente, provocando um aumento no consumo do referido cogumelo, uma vez que o cultivo comercial estava aquém da demanda e ainda não haviam sido definidas as técnicas para o cultivo comercial de *A. blazei*.

Ao contrário do *A. bisporus*, o *A. blazei* desenvolve-se bem em temperaturas mais elevadas (24 a 28°C), podendo ser produzido em condições

ambientais durante boa parte do ano e não necessita obrigatoriamente de local protegido para o seu cultivo (Bononi, 1995).

Urban (2001) sugere que a indústria dos fungos poderá tornar-se uma das principais atividades nas áreas rurais, por apresentar altas taxas de utilização de recursos biológicos, ciclo de produção curto, rápido retorno do investimento e benefício para o desenvolvimento de outras atividades agrícolas, tais como fertilização orgânica de diversas culturas e alimentação de animais.

Segundo Bononi et al. (2001), a produção do *A. blazei* está limitada até o momento a poucos produtores isolados ou organizados em cooperativas, apesar de o produto já encontrar aceitação no mercado nacional, e ser exportado para o Japão e Estados Unidos, como complemento alimentar e auxiliar no tratamento do câncer.

Como existem poucas publicações a respeito da tecnologia de cultivo desse cogumelo no Brasil, utiliza-se como referência a metodologia utilizada pelos poucos produtores de regiões do Estado de São Paulo (principalmente Mogi das Cruzes, Sorocaba, Campinas e Piedade), Minas Gerais e Paraná. (Bononi et al., 2001).

2.1 Atividade antitumoral e outras propriedades bioquímicas do *A. blazei*

Em 1995, Ghoneum, pesquisador da Universidade da Califórnia, EUA, apresentou durante o 9º Congresso Internacional de Imunologia, em São Francisco na Califórnia, resultados obtidos com uma linhagem que ele denominou de Royal Agaricus, considerando-o como um mutante do *A. blazei*.

Os resultados apresentados por Ghoneum (1995) demonstraram a capacidade desse fungo em estimular o sistema imunológico de camundongos. Sua principal conclusão foi que o cogumelo estudado é um potente auxiliar para o tratamento de câncer.

No Brasil, estão sendo realizados diversos estudos para a comprovação dessa atividade e tentativas de conhecer melhor a biologia do fungo, (Bononi et al., 1995; Bononi et al., 2001; Barbisan et al., 2002; Colauto et al., 2002; Menoli et al., 2001; Oliveira et al., 2002).

Em trabalhos realizados no Japão, foi verificado no *A. blazei* que a fração com maior atividade antitumoral era compreendida de proteína e polissacarídeo de ligação (1→6) β , chamado β -D-Glucano (Kawagishi et al., 1989). Logo depois, confirmou-se que as duas substâncias formam um complexo proteína-glucano e que esse complexo é que apresenta atividade antitumoral (Kawagishi et al., 1990). Essa descoberta levou a uma série de outros estudos sobre o mecanismo de ação desse complexo proteína-glucano (Itoh et al., 1994; Ito et al., 1997; Matila et al., 2000), além da descoberta de outras substâncias presentes no corpo de frutificação, apresentando atividades antimutagênicas (Osaki et al., 1994).

Os cogumelos têm na sua composição proteínas, aminoácidos livres, vitaminas (niacina, ácido ascórbico, tiamina, etc), minerais (cálcio, ferro, fósforo, etc), carboidratos, fibras dietéticas e polissacarídeos, como o β -D-glucano, substância à qual se atribuem efeitos eficazes no combate ao câncer. O corpo de frutificação de *A. blazei* possui cerca de 85 a 87% de água e, quando desidratado, contém em torno de 40% de proteínas e 40% de carboidratos e vitaminas, sendo o K o mineral mais abundante, compreendendo cerca de 3% da massa seca (Mizuno, 1995).

Os três principais fatores da carcinogênese humana são o cigarro, a infecção e inflamação e as dietas carcinogênicas (Sugimura, 2000), que podem afetar praticamente todas as pessoas de qualquer idade, ao passo que o tabagismo e a infecção/inflamação são de atuação mais restrita. No tratamento dessas carcinogêneses, são gastos anualmente milhões de dólares com medicamentos químicos e radioterapia, que nem sempre apresentam resultados

satisfatórios, além de, normalmente, produzirem efeitos colaterais dos mais variados.

Uma alternativa à tecnologia de tratamento do câncer seria a utilização na dieta humana de determinados alimentos específicos que atuam como um fator de proteção diante das várias substâncias potencialmente carcinogênicas que o ser humano ingere diariamente, como nitrito, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, agentes oxidantes e aminas heterocíclicas (Sugimura, 2000).

Nesse sentido, diversos trabalhos com *A. blazei* são relatados, nos quais a utilização do referido cogumelo possibilitou uma redução no crescimento de células cancerígenas em experimentos *in vitro*. Mizuno et al., (1990a; 1990b) relataram a ação anticancerígena, especialmente em tumores de sarcoma 180, em experimentos com camundongos.

2.2 Colheita, pós-colheita e armazenamento de *A. blazei*

Diversos trabalhos na literatura relatam metodologia e tecnologias para o armazenamento de cogumelos, especialmente o *A. bisporus*, o qual é utilizado na dieta humana na sua forma hidratada, após processo de semi-esterilização (Gormley, 1975; Brennan et al., 2000).

Nesse sentido, diversos trabalhos procuram identificar possíveis substâncias que, quando utilizadas, aumentariam a vida de prateleira de cogumelos frescos (Fang et al., 1971; Kuyper et al., 1993; Brennan et al., 1999). Todavia, esses procedimentos não podem ser utilizados para o *A. blazei*, uma vez que a utilização dessa espécie é feita, normalmente, na forma desidratada, sendo empregada na produção caseira de chás ou na fabricação de cápsulas para ingestão, após o basidiocarpo ter sido triturado e moído.

Entre os trabalhos com basidiocarpos frescos, as mais diversas substâncias já foram testadas para sua conservação. Trabalhando com *A. bisporus*, Nussinovitch & Kampf (1993) testaram amostras de 20 g do basidiocarpo fresco em imersão em uma solução de alginato de sódio ou de cloreto de cálcio, nas concentrações de 1 e 2% (p/v) durante 30 segundos, seguido de armazenamento a 4 ou 20°C. Verificou-se que os tratamentos com alginato a 4°C apresentaram resultados superiores em relação aos demais com respeito à uniformidade de cor e melhor aparência. embora até o momento nenhum trabalho tenha sido localizado que procure enfocar possíveis tratamentos para uma melhor conservação e/ou padronização da cor do *A. blazei* desidratado.

Entretanto, quando *A. bisporus* foi armazenado em embalagens de filme de polietileno (atmosfera modificada), após imersão por tempo variado em soluções de diferentes concentrações de hipoclorito de cálcio, o melhor resultado foi obtido após imersão em solução a 0,4 g/L (Kuyper et al., 1993).

Estudos do efeito do metabissulfito de sódio sobre o branqueamento e manutenção da qualidade pós-colheita foram realizados em *A. bisporus* cortados ao meio (Brennan et al., 1999). Esses autores verificaram que a dosagem de 1 g/L por 10 minutos em uma solução a 4°C apresentou os melhores resultados.

O tratamento de *A. bisporus* com SO₂ ou NaCl (tratamentos químicos) e água fervente ou congelamento seguido por liofilização (tratamentos físicos) indicaram que deve ser evitado a água fervente, em razão da grande perda de sólidos solúveis observada. O tratamento que possibilitou os melhores resultados em termos de manutenção das qualidades organolépticas dos basidiocarpos tratados foi a liofilização, apesar de ser um processo relativamente caro, tornando o produto final pouco viável economicamente (Fang et al., 1971; McDonald & Sun, 2000).

Uma outra tecnologia empregada na manutenção da qualidade bioquímica de *A. bisporus* é o uso de radiação gama (Minnaar et al., 1995; Minnaar et al., 1996; Beaulieu et al., 2002). No entanto, apesar de apresentar resultados satisfatórios, sabe-se que sua aplicabilidade na prática pelo produtor torna-a praticamente inviável pelo seu alto custo, além dos perigos da utilização da radiação.

2.3 Processo de escurecimento enzimático do basidiocarpo

O escurecimento enzimático, causado pela ação indesejada da enzima polifenol oxidase (PFO), que atua tanto em tecidos vegetais como em fungos, prejudica a comercialização do produto, reduzindo seu preço ao produtor e, muitas vezes, tornando o produto inaceitável pelo consumidor. Estima-se que em certas frutas tropicais a ação da PFO pode provocar o escurecimento de até 50% do volume total dessas frutas, prejudicando também suas qualidades nutricionais (Chitarra & Chitarra, 1990).

A PFO catalisa a reação irreversível de oxidação de fenóis, formando polímeros bioquímicos que, por sua vez, são capazes de oxidar outras substâncias de menor potencial de oxidorredução (Vamos-Vigyázó, 1995). Após observar que algo presente em basidiocarpos catalisava a oxidação aeróbica de certos compostos em plantas, Schoenbien em 1856 (citado por Vamos-Vigyázó, 1995) descobriu a existência da PFO.

Verifica-se, portanto, que sua atividade está intimamente relacionada com o grau de escurecimento observado em diferentes tipos de tecidos vegetais e, como não poderia ser diferente, em basidiocarpos. Portanto, é desejado que o escurecimento enzimático, causado pela PFO, seja minimizado ou mesmo evitado por completo, apesar de que, industrialmente, isso nem sempre é

possível, levando, muitas vezes, ao aparecimento de um “flavor” desagradável, além de questões de ordem econômica.

O método mais comum empregado para o controle do escurecimento enzimático em basidiocarpos é pelo tratamento com metabissulfito de sódio. Entretanto, a segurança do uso de sulfitos em alimentos é bastante questionável (Lambrecht, 1995). Os sulfitos têm sido associados a uma série de danos à saúde humana, tais como a asma em asmáticos sulfito-sensitivos, urticária e diarreia. Tendo em vista sua toxidez, encontrar substitutos aos sulfitos no controle da atividade da PFO torna-se uma necessidade eminente, visando a proporcionar um alimento seguro e saudável.

Para que a reação da PFO ocorra, três condições devem ser satisfeitas: a presença da enzima ativa, a disponibilidade do substrato e abundância de oxigênio. Isso favorece o desenvolvimento de técnicas para se evitar o escurecimento enzimático que, em última análise, baseia-se no princípio de inibir a atividade da PFO (Araújo, 1999).

Dessa forma, podem ser utilizados diferentes tratamentos inibitórios da atividade enzimática, como o calor (Mathew & Parpia, 1971), embora esse processo possa trazer outros efeitos indesejados ao produto, como perda de sólidos solúveis totais (Biekman et al., 1996). A redução da temperatura, realizada pela imediata imersão do basidiocarpo colhido em água com temperatura entre 1 e 4°C, já foi empregada na tentativa de se evitar o escurecimento enzimático há relativamente bastante tempo (Gormley, 1975). Todavia, tratamentos dessa natureza produzem resultados satisfatórios somente quando empregados em basidiocarpos inteiros e por um período relativamente longo (5 dias a 1°C) (Gormley, 1975).

Uma terceira possibilidade de se evitar a ação da PFO é pela utilização de substâncias com menor potencial de oxidorredução em relação aos compostos fenólicos produzidos pela ação indesejada da enzima. Essa técnica tem sido

empregada, sobretudo, quando se trabalha com basidiocarpos fracionados ou segmentados. Nesse caso, o procedimento expõe o tecido interno do corpo de frutificação, anteriormente protegido, em contato direto com o oxigênio atmosférico, possibilitando a atuação rápida e eficiente da PFO (Brennan et al., 2000).

Nesse sentido, substâncias como ácido cítrico e peróxido de hidrogênio, entre outras, têm sido utilizadas (Brennan et al., 2000). Esses autores verificaram que tanto o ácido cítrico quanto o peróxido de hidrogênio produziram efeitos desejados, aumentando a meia vida dos basidiocarpos tratados para 19 dias, contra 9 dias do tratamento-controle (somente água). Os autores atribuíam esses resultados principalmente à ação antimicrobiana, notadamente contra o desenvolvimento de bactérias sobre os basidiocarpos cortados. Todavia, deve-se considerar que o uso do peróxido de hidrogênio no Brasil na conservação de alimentos não é indicada, o mesmo não ocorrendo na Europa, local de realização do trabalho anteriormente citado.

As PFO compõem uma classe de enzimas capazes de oxidar fenol e outros compostos fenólicos, podendo ser divididas em duas classes principais: lacase e tirosinase. Essas duas enzimas catalisam a transferência de um grande número de compostos fenólicos e não-fenólicos na presença de oxigênio (Duran, 1997; Durán et al., 2002).

A lacase é uma cobre-proteína (E.C. 1.10.3.2; p-benzenodiol:oxigênio oxirredutase) capaz de catalisar a oxidação de vários compostos aromáticos, particularmente os fenóis, com a concomitante redução do oxigênio em água. Em geral, a lacase apresenta quatro átomos de cobre, que desempenham um importante papel no mecanismo catalítico da enzima. Os átomos de cobre são distribuídos em diferentes sítios regulatórios da proteína (Yaropolov et al., 1994; Xu, 1996; McMillin & Eglestone, 1997).

As lacases são caracterizadas por apresentarem baixa especificidade pelo substrato e sua competência catalítica varia grandemente em função do tipo de substrato (Yaropolov et al., 1994). Por exemplo, difenois simples, como hidroquinona e catecol, são bons substratos para a maioria das lacases, mas guaiacol e 2,6 dimetoxifenol são ainda melhores (Yaropolov et al., 1994; Gianfreda & Bollag, 2003).

Além disso, a lacase é ainda capaz de catalisar a oxidação de outros polifenóis substituídos, amins aromáticas, benzenotióis e ainda uma série de outros compostos, mas é incapaz, diferentemente da tirosinase, de oxidar a tirosina (Xu et al., 2000).

A lacase é uma enzima encontrada em plantas superiores (Mayer & Harel, 1979), fungos (Xu, 1996; Karam & Nicell, 1997) e algumas bactérias (Givaudan et al., 1993; Sanchez-Amat & Solano, 1997; Alexandre & Zhuklin, 2000). Todavia, as lacases mais bem estudadas e bioquimicamente caracterizadas são as obtidas de fungos (Mayer & Harel, 1979; Bollag & Leonowicz, 1984; Arora & Gill, 2000; Mayer & Staples, 2000), e em algumas espécies fúngicas, a simples adição de indutores específicos ao meio de cultura resulta na biossíntese de novas formas extracelulares (Bollag & Leonowicz, 1984; Arora & Gill, 2000).

A tirosinase (E.C. 1.14.18.1; monofenol monooxigenase) é amplamente distribuída em toda escala filogenética, desde bactéria até mamíferos, e encontra-se presente com diferentes características em organismos não relacionados, apresentando, em alguns casos, isoformas específicas em um mesmo organismo (Burton, 1994).

As tirosinases catalisam duas diferentes reações sequenciais: a) a o-hidroxilação de monofenóis para produzir o-difenóis (atividade cresolase) e a subsequente oxidação de o-difenóis para o-quinonas (atividade catecolase) (Fontecave & Pierre, 1998).

Essas enzimas têm sido relacionadas a uma série de eventos bioquímicos e metabólicos. Em plantas, tem sido sugerida a sua participação na síntese de lignina, na tolerância a patógenos e no escurecimento de frutos. Em fungos, estão envolvidas na degradação da lignina e na morfogênese (Zhao & Kwan, 1999) e no desenvolvimento sexual (Scherer & Fischer, 1998).

2.4 Avaliação da cor em alimentos

O impacto visual causado pela cor dos alimentos, via de regra, se sobrepõe à observação dos demais atributos extrínsecos, num primeiro momento. Se o aspecto visual não é agradável, dificilmente o produto conseguirá despertar a atenção do consumidor para as demais qualidades (Oliveira, 1995). A coloração é, por conseguinte, um dos atributos mais importantes para o consumidor. Constata-se, portanto, que a cor caracteriza, de forma bastante acentuada, os objetos de maneira em geral, constituindo-se no primeiro critério aplicado para sua aceitação ou rejeição (Camargo et al., 1982; Fox, 1991). Frutos de coloração forte e brilhante são os preferidos, embora, na maioria dos casos, não contribuam para um aumento efetivo do valor nutritivo ou da qualidade do produto (Chitarra & Chitarra, 1990; Martinez, 2001).

A cor é um fator importante para valorizar a qualidade de um alimento, estando ligada ao estágio de maturação, presença de impurezas, realização adequada ou não do processamento do alimento, más condições de armazenamento e alterações causadas por microrganismos (Amorin et al., 1976; Amorin, 1978).

Todavia, a avaliação visual da cor de um alimento é sempre controversa, uma vez que sempre haverá a interferência do fator humano, gerando um conceito em que a subjetividade pode ser comprovadamente impossível de ser eliminada por completo (Pedrosa, 1995).

No caso particular da comercialização do *A. blazei*, entre os aspectos visuais observados pelo comprador, estão tamanho, formato do píleo e a coloração do basidiocarpo. Essa última deve apresentar-se de cor amarelo-palha, com leve tom dourado. Nota-se, portanto, que essa caracterização é muito subjetiva, dando grandes possibilidades a discussões sobre o tema.

Aliás, muitos produtores têm reclamado de que não conseguem comercializar seus produtos pela classificação mais alta (Tipo A), pois nunca conseguem atingir o padrão pretendido pelos compradores, sobretudo em relação à coloração dos basidiocarpos, resultando em menor preço final.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo de *Agaricus blazei*

Para o cultivo do *A. blazei*, utilizou-se um composto à base de bagaço de cana-de-açúcar, capim Coast cross e farelo de trigo, na proporção de 50:50:10 kg de cada componente, respectivamente, colonizado com micélio de *A. blazei*, pertencente à coleção do Laboratório de Fungos Filamentosos da UFLA. Esse material (composto inoculado) foi acondicionado em sacos plásticos e transferidos para uma estufa construída especificamente para o cultivo de *A. blazei*.

Após a colonização, o composto recebeu uma camada de 5 cm de cobertura com terra de barranco areno-argilosa.

Durante toda a fase de cultivo, mantiveram-se a temperatura do ar em torno de 28°C e a umidade da terra de cobertura em 70%.

3.2 Colheita e lavagem dos basidiocarpos

Os basidiocarpos foram colhidos antes que ocorresse a abertura do pileo, cerca de 20 dias após o início da incubação do composto, quando suas bordas ainda estavam voltadas para baixo, tendo sido lavados em água corrente com o auxílio de uma escova dental e esponja macia, de maneira que toda terra fosse removida. Em seguida, sua massa fresca foi determinada com auxílio de uma balança semi-analítica.

3.3 Preparo da amostra

Após a colheita e lavagem dos basidiocarpos, esses foram seccionados ao meio e imediatamente submetidos aos diferentes tratamentos.

De acordo com os tratamentos e as análises bioquímicas posteriores, os basidiocarpos foram desidratados (caracterização bioquímica – item 3.7) ou congelados para análise enzimática (item 3.8).

3.4 Delineamento Experimental e Análise Estatística

As duas metades obtidas dos basidiocarpos seccionados foram submetidas, uma, ao tratamento experimental, e outra, à utilização como controle.

Foram testados, em um primeiro experimento, os seguintes tratamentos, em esquema fatorial, com 3 repetições:

- A) Ácido ascórbico comercial – Cewin (0, 10, 20 e 30 mg/L)
- B) Tempo de Imersão: 0, 2, 5, 10, 15 e 20 minutos.

No segundo experimento, foram testadas as concentrações de 10, 20 e 30 ppm de ácido cítrico nos tempos de 10 e 15 minutos, em esquema fatorial, com 3 repetições.

Os valores médios correspondentes a cada tratamento foram submetidos á análise de variância, seguido do teste de média de Scott-Knott ao nível de 5% de significância, utilizando-se o programa SISVAR versão 4.3.

3.5 Secagem do Material

Após a imersão, as metades foram imediatamente colocadas sobre uma folha de papel, para retirada do excesso de umidade e, em seguida, transferidas para estufa à temperatura de 50°C, por 24 horas. As amostras desidratadas foram

embaladas por lotes, segundo o tratamento utilizado e acondicionadas em refrigerador a 4°C, para posterior avaliação do padrão de cores e de algumas características bioquímicas. A massa fresca e seca de cada metade do basidiocarpo foi determinada com auxílio de uma balança semi-analítica.

3.6 Avaliação da cor

As amostras dos experimentos com ácido cítrico e ácido ascórbico foram submetidas à avaliação de cor, com base nos índices de coloração segundo Munsell (1976) e em Colorímetro Minolta CR300.

Os basidiocarpos de todas as amostras foram fotografados antes de cada análise, para se obter um registro visual das cores nas diversas fases de amostragem no decorrer do experimento.

Ao final, as amostras de basidiocarpos desidratadas, independentes do tratamento, foram agrupadas em seis lotes, de maneira a formar uma escala de cores. A avaliação das cores foi feita no píleo e na estipe dos basidiocarpos pela leitura manual em Colorímetro Minolta CR300.

3.7 Caracterização bioquímica

Após a secagem, o material desidratado dos diferentes tratamentos foi moído e armazenado em recipientes plásticos mantidos à temperatura ambiente até o momento de sua utilização. Cerca de 100 mg desse material foi transferido para beakers de 20 mL contendo 10 mL de água deionizada, mantidos à temperatura de 30°C durante 20 minutos, para obtenção dos extratos aquosos. Ao final desse período, o material foi centrifugado a 10.000g por 20 minutos à temperatura ambiente, sendo o sobrenadante transferido para novos recipientes e armazenado a 4°C.

Para o material fresco e congelado, foram obtidos extratos a partir do protocolo proposto por Passos (1996), baseado na solubilidade diferencial das proteínas.

Nos extratos obtidos foram determinadas as concentrações de açúcares solúveis totais (Yemm & Coccking, 1955), aminoácidos livres (Yemm & Willis, 1954), açúcares redutores (Miller, 1959) e proteínas solúveis totais (Bradford, 1976), cujos valores foram expressos em base da biomassa seca. Para as quantificações, foram feitos os extratos de cada repetição e, dessas, cada análise foi repetida duas vezes; portanto, cada tratamento foi avaliado seis vezes para cada característica bioquímica avaliada.

Essas mesmas avaliações também foram realizadas nos basidiocarpos utilizados para a construção da escala de cores.

Os resultados foram expressos em μg de glicose/g MS para os açúcares redutores e solúveis totais; em % da MS para as proteínas solúveis totais e em mg glicina/g MS, para os aminoácidos livres.

3.8 Análise da polifenol oxidase

A atividade da polifenol oxidase foi avaliada em nove amostras de material fresco, sendo uma congelada no tempo zero (sem sofrer nenhum tratamento) e as demais congeladas após 5 min de imersão em água (tratamento-controle) e em diferentes concentrações de ácido ascórbico (10, 100, 1.000 e 10.000 ppm).

As análises foram realizadas pelo método proposto por Draetta & Lima (1976) e adaptado por Carvalho et al. (1994). O material foi macerado em 40 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,0, mantido a 4°C, triturado em polytron por 3 minutos, sendo filtrado em papel Wattman nº1 e centrifugado a 10.000g por 20 minutos.

Para o ensaio da atividade da enzima, 0,5 µL do extrato de cada amostra foi transferido para tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,0, sendo a reação iniciada pela adição de 0,5 mL de catecol. A mistura foi incubada a 30°C por 30 minutos e a reação, paralisada pela adição de ácido perclórico 2N.

O resultado da reação foi lido em espectrofotômetro a 395 nm e comparado contra o branco da reação (sem adição de catecol).

3.9 Determinação da composição centesimal de basidiocarpos de *A. blazei*

Foram determinadas as seguintes características: umidade, extrato etéreo, proteína, fibra, cinzas e fração glicídica, todas expressas em porcentagem, sendo as análises realizadas de acordo com as normas analíticas adotadas pelo Instituto Adolfo Lutz (1977).

Para determinar a umidade, foi utilizado o processo gravimétrico sem emprego de calor. O extrato etéreo ou lipídeo foi determinado pelo método de extração contínua em aparelho do tipo Soxhlet, enquanto a fração protéica foi determinada pelo método Micro-Kjeldahl, AOAC (1965) e a fração fibra foi obtida pelo método proposto por Winton & Winton (1947). A fração glicídica foi obtida pela diferença.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Biomassa fresca e seca de *Agaricus blazei* durante o processamento

Na Figura 1 são apresentados os resultados da biomassa fresca, seca, da porcentagem de massa seca e fresca em basidiocarpos de *Agaricus blazei*. Na determinação desses valores, foram utilizados basidiocarpos de tamanho considerado ideal para a comercialização, com valores acima de 5 cm de comprimento.

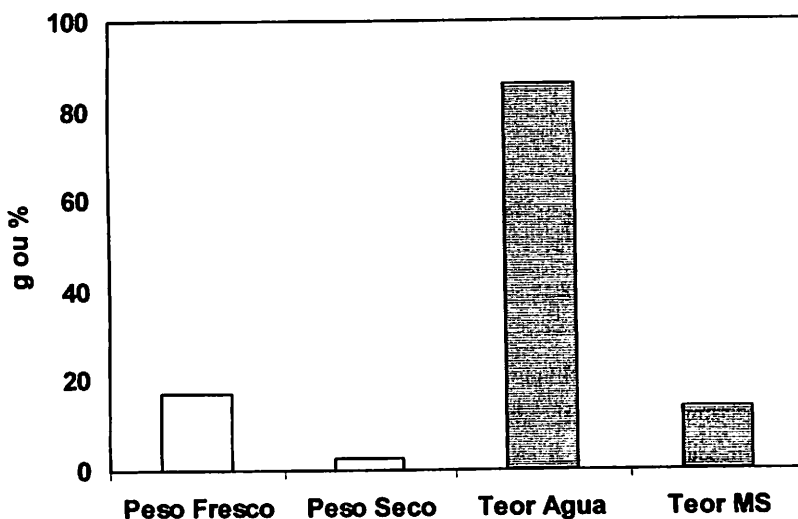


FIGURA 1 Peso fresco, peso seco, teor de água e de matéria seca em basidiocarpos de *A. blazei*.

Os valores obtidos neste trabalho para as características apresentadas na Figura 1 correspondem ao esperado e encontrado para outros cogumelos (Molena, 1986), com pequena diferença entre o valor obtido de 86% para o teor de água no *A. blazei* e de 88% para *A. bisporus* (Molena, 1986). Todavia, esses valores são bastante superiores aos encontrados para alguns vegetais, como beterraba, cenoura e batata, todos na faixa de 70%. Essa é uma importante característica do ponto de vista comercial e nutricional, pois o teor de água representa importante fator na comercialização do *A. blazei*, que normalmente é comercializado na forma desidratada.

4.2 Concentração de açúcares redutores e solúveis totais

Na Figura 2 encontram-se os resultados de concentração de açúcares redutores na biomassa seca de basidiocarpos de *A. blazei* submetidos aos diferentes tratamentos com ácido ascórbico e ácido cítrico. Observou-se que os açúcares redutores tiveram sua concentração aumentada em relação ao controle nos tratamentos de 10 ppm, nos tempos de imersão de 5, 10 e 15 minutos, e 20 ppm, nos tempos de 10 e 15 minutos.

Para todos os tratamentos, de maneira geral dentro de um mesmo tempo (barras iguais), a concentração de açúcares redutores foi reduzida com o aumento da concentração de ácido ascórbico utilizado em solução na imersão dos basidiocarpos, exceto no tempo de imersão de 2 minutos, que permaneceu baixo em todos os tratamentos. Por outro lado, o tratamento com ácido cítrico apresentou valores abaixo dos tratamentos- controle.

Nota-se ainda pequena redução, embora significativa, no conteúdo de açúcares redutores do tratamento-controle e com ácido cítrico.

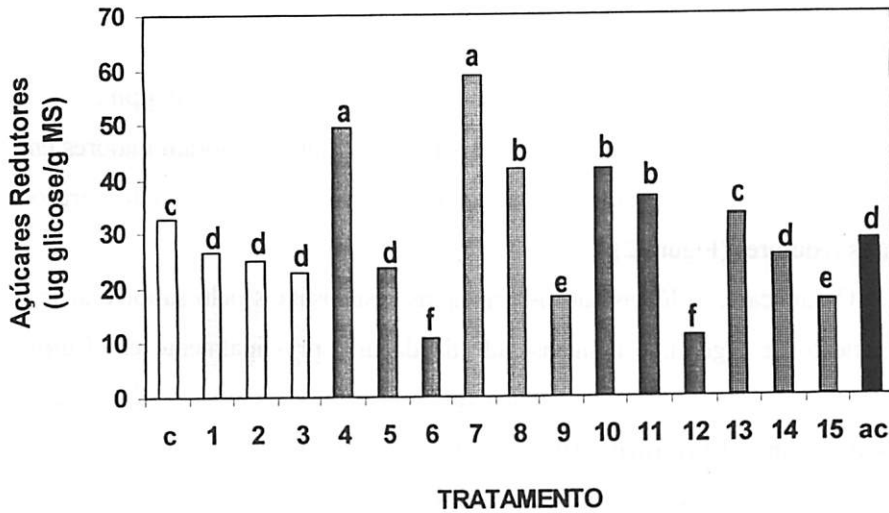


FIGURA 2 Concentração de açúcares redutores em basidiocarpos de *A. blazei*. (a letra c indica o controle, os números de 1 a 15 indicam respectivamente, a cada grupo de 3 (barras iguais) os tempos de imersão a 2, 5, 10, 15 e 20 minutos nas concentrações de 10 ppm (1, 4, 7, 10 e 13), 20 ppm (2, 5, 8, 11 e 14) e 30 ppm (3, 6, 9, 12 e 15) de ácido ascórbico, enquanto as letras ac identificam os basidiocarpos tratados com ácido cítrico).

O conteúdo de açúcares redutores reflete, basicamente, o conteúdo celular de monossacarídeos que, em última análise, corresponde aos carboidratos prontamente disponíveis na célula, para os diferentes eventos metabólicos, como na glicólise e rota das pentose fosfato, por exemplo, ou em outros eventos metabólicos celulares. Entretanto, mesmo devido à sua importância no metabolismo celular, não foram encontrados trabalhos semelhantes na literatura.

Na Figura 3 verificam-se os resultados obtidos para a concentração de açúcares solúveis totais em basidiocarpos de *A. blazei*, analisados a partir da biomassa seca. Observa-se que, à semelhança do que ocorreu com os açúcares redutores, a imersão em ácido ascórbico em concentrações maiores, promoveu

uma redução significativa na concentração de açúcares solúveis totais. Entretanto, os valores observados nesse caso foram inferiores ao controle, exceto no tratamento de 20 minutos de imersão na concentração de 10 ppm. Além disso, no tratamento com ácido cítrico, os valores encontrados foram maiores em relação ao controle. Esse padrão de acúmulo não havia sido observado para os açúcares redutores (Figura 2).

Os açúcares solúveis são os principais responsáveis pelo sabor e aroma dos alimentos em geral, e a intensidade da doçura, principalmente em frutos, está relacionada com a fração glicídica (glicose+frutose/sacarose). Ainda nesse contexto, segundo Braverman (1967), o grau de doçura dos açúcares redutores, principalmente glicose e frutose, é superior ao da sacarose.

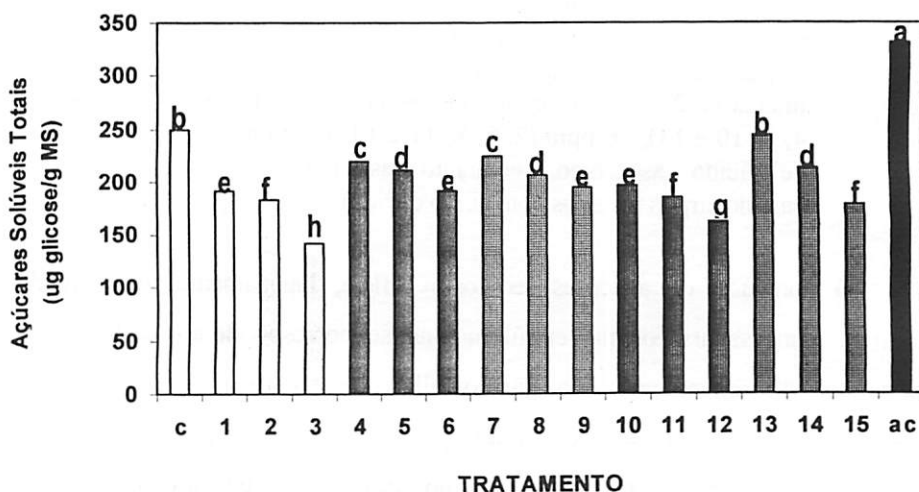


FIGURA 3 Concentração de açúcares solúveis totais em basidiocarpos de *A. blazei*. (a letra c indica o controle, os números de 1 a 15 indicam respectivamente, a cada grupo de 3 (barras iguais) os tempos de imersão a 2, 5, 10, 15 e 20 minutos nas concentrações de 10 ppm (1, 4, 7, 10 e 13), 20 ppm (2, 5, 8, 11 e 14) e 30 ppm (3, 6, 9, 12 e 15), enquanto as letras ac identificam os basidiocarpos tratados com ácido ascórbico).

O conteúdo de açúcares solúveis é fator importante no processamento do *A. blazei*, que é comercializado após desidratação, a qual é realizada, normalmente, em estufa, ou seja, em temperaturas relativamente elevadas (50-60°C), podendo levar à caramelização desses açúcares, prejudicando a qualidade final do produto, pois poderá levar ao escurecimento e alteração no sabor dos basidiocarpos, provocando sua depreciação e, conseqüentemente, resultando em um menor rendimento econômico ao produtor.

4.3 Concentração de proteínas solúveis totais (PST) e aminoácidos livres

Na Figura 4 são apresentados os resultados obtidos para a concentração de proteínas solúveis totais extraídas da biomassa seca de basidiocarpos de *A. blazei* tratados com diferentes concentrações de ácido ascórbico.

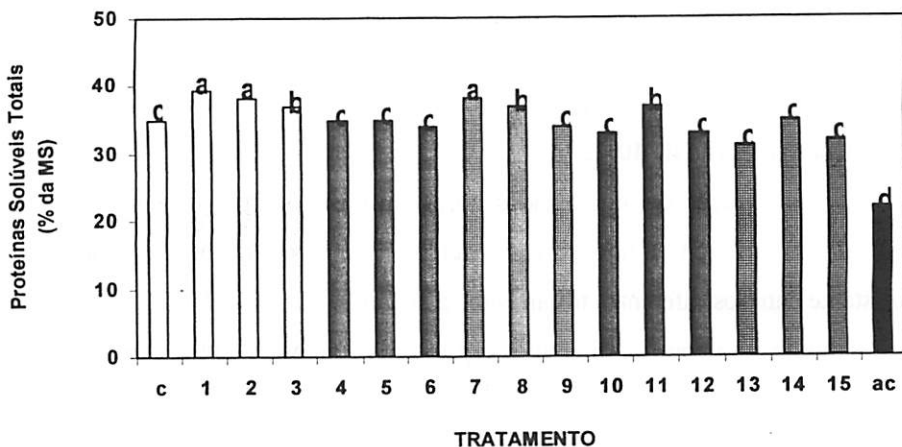


FIGURA 4 Concentração de proteínas solúveis totais em basidiocarpos de *A. blazei*. (a letra c indica o controle, os números de 1 a 15 indicam respectivamente, a cada grupo de 3 (barras iguais) os tempos de imersão a 2, 5, 10, 15 e 20 minutos nas concentrações de 10 ppm (1, 4, 7, 10 e 13), 20 ppm (2, 5, 8, 11 e 14) e 30 ppm (3, 6, 9, 12 e 15) de ácido ascórbico, enquanto as letras ac identificam os basidiocarpos tratados com ácido cítrico).

Dentro dos tratamentos com ácido ascórbico, nota-se que a concentração de PST aumentou ou se manteve estatisticamente igual em relação ao controle. Possivelmente, as PST poderiam sofrer uma hidrólise rápida, o que não foi observado na Figura 4.

Sabe-se que as proteínas podem ser classificadas em quatro diferentes categorias, de acordo com sua solubilidade em água, soluções salinas diluídas ou ainda de ácido ou base: albuminas, glutelinas, prolaminas e globulinas (Passos, 1996) e além das citadas por Passos, (Fontecave & Pierre, 1998) incluem mais três classes: protaminas, histomas e escleroproteínas (classificando-as em sete grupos).

As duas primeiras classes (albuminas e glutelinas) englobam praticamente todas as proteínas solúveis e representam, basicamente, o conteúdo de enzimas de uma célula. Nota-se, portanto, que o conteúdo dessas proteínas representam cerca de 30 a 40% do peso da biomassa seca de basidiocarpos desidratados de *A. blazei*. Esses valores estão bastante próximos daqueles apresentados por Molena (1986), e Mizuno (1995), em que são relatadas concentrações em torno de 40%.

A concentração de aminoácidos livres em basidiocarpos desidratados de *A. blazei* (Figura 5) tratados com ácido ascórbico variou de maneira inconsistente entre os diferentes tratamentos estudados.

Trabalhando com 12 diferentes espécies de fungos, Sanmee et al. (2003) determinaram a composição química com relação à concentração de proteínas, conteúdo de ácidos graxos e de carboidratos solúveis. Nesse caso, o conteúdo de proteínas variou entre 14 e 24% e o de carboidratos, entre 40 e 60% (sendo a trealose o carboidrato majoritário), enquanto o teor de ácidos graxos variou entre 2 e 9%. Resultados semelhantes foram obtidos por Bisaria & Madan (1983). Ainda nesses trabalhos, relatam os autores que todos os aminoácidos essenciais foram encontrados nos basidiocarpos analisados, reforçando seu forte valor

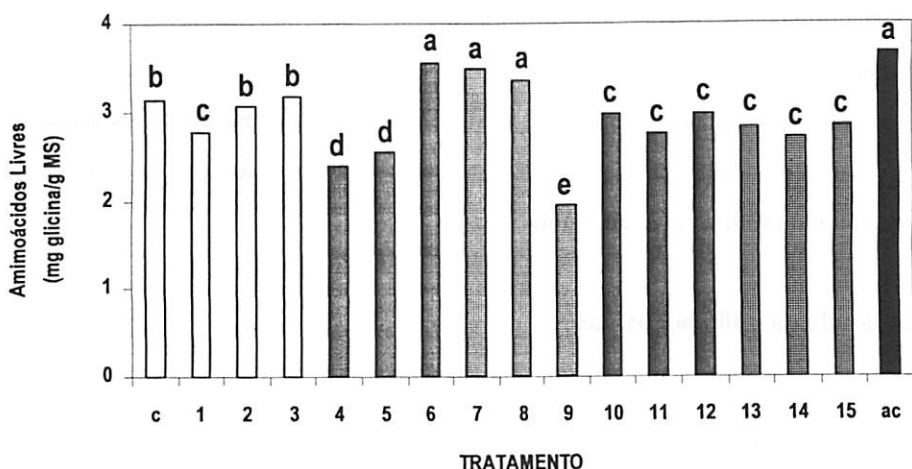


FIGURA 5 Concentração de aminoácidos livres em basidiocarpos de *A. blazei*. (A letra c indica o controle, os números de 1 a 15 indicam respectivamente, a cada grupo de 3 (barras iguais) os tempos de imersão a 2, 5, 10, 15 e 20 minutos nas concentrações de 10 ppm (1, 4, 7, 10 e 13), 20 ppm (2, 5, 8, 11 e 14) e 30 ppm (3, 6, 9, 12 e 15) em ácido ascórbico, enquanto as letras ac identificam os basidiocarpos tratados com ácido cítrico).

nutricional, embora a histidina e arginina não tenham sido detectadas em semelhante trabalho (Diez & Alvarez, 2001).

A análise do valor nutricional de um alimento envolve mais do que a simples estimativa da porcentagem de cada nutriente presente na composição total do referido alimento. Outros fatores, particularmente a capacidade do organismo para metabolizar as proteínas, carboidratos e gorduras também são importantes.

Muito do interesse em basidiocarpos tem se concentrado no seu conteúdo protéico, que é de alto valor nutritivo, de fácil digestibilidade, além de conter praticamente todos os aminoácidos essenciais (Stamets, 1983; Chang &

Miles, 1989). Portanto, pode-se considerar os basidiocarpos superiores à maioria dos vegetais nesse particular. Adicionalmente, por apresentarem grande quantidade de água na composição de sua biomassa, os basidiocarpos secos são muito ricos em proteínas (Bisaria & Madan, 1983), com valores superiores ao de muitos alimentos tradicionais do brasileiro, como feijão e leite, podendo ser considerado um ótimo suplemento alimentar.

4.4 Atividade da polifenol oxidase

Foram testadas quatro concentrações de ácido ascórbico no tratamento de basidiocarpos de *A. blazei* (Figura 6) em relação a um tratamento-controle C0 (controle no tempo zero, sem imersão em água). Nota-se que, na média, os valores da atividade da polifenol oxidase praticamente não variaram entre si, embora tenham sido inferiores aos valores observados para o tratamento-controle C0, ou seja, a imersão em água, independente da presença de ácido ascórbico, reduz a atividade da enzima. Isso era, de certa forma, esperado, uma vez que as PFO necessitam de oxigênio livre para catalisar a reação de polimerização de fenóis, e a imersão em água provavelmente deve reduzir essa disponibilidade de oxigênio, afetando de maneira indireta a atividade da enzima.

A atividade da PFO está normalmente associada a uma depreciação da qualidade do produto final, pois há um escurecimento do material biológico no qual a atividade é relativamente elevada.

As polifenol oxidases têm sido extensivamente estudadas em plantas, sobretudo em frutos, cuja aparência é um forte indicativo de sua qualidade final, refletindo em menor valor comercializado. Todavia, Goulart (2002) observou que grãos de café apresentaram elevada atividade da enzima, sugerindo o autor que isso possa ser resultado de uma possível ativação da atividade enzimática em condições de ensaio *in vitro*, uma vez que essa enzima, em plantas, encontra-

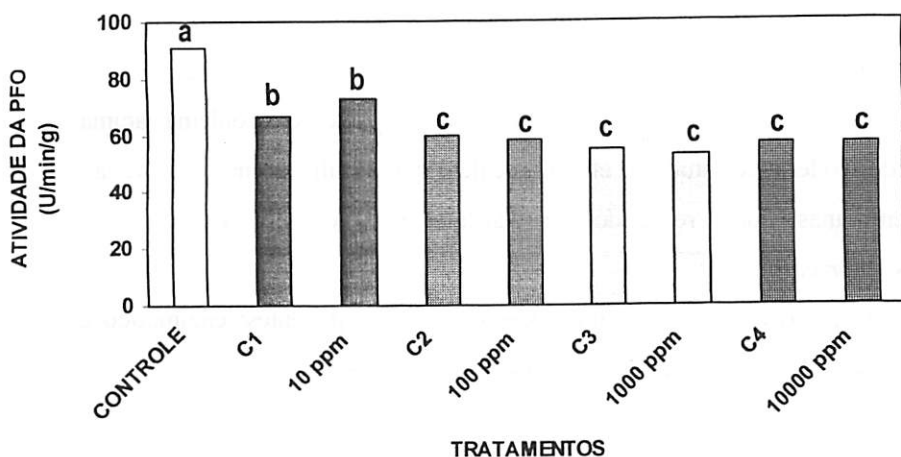


FIGURA 6 Atividade da polifenol oxidase em basidiocarpos de *A. blazei* tratados com diferentes concentrações de ácido ascórbico. (A legenda C 0 identifica o tratamento no tempo zero – controle sem imersão em água; as legendas C1, C2, C3 e C4 identificam, respectivamente, a imersão em água por 5 minutos para cada tratamento de concentração – 10, 100, 1000 e 10.000 ppm de ácido ascórbico).

se compartimentalizada em plastídios e, nessas condições *in vivo*, sua atividade seria inferior ao observado aos ensaios realizados *in vitro*.

No presente estudo verificou-se que os tratamentos com ácido ascórbico (normalmente empregado pelo produtor na tentativa de obter uma coloração considerada ideal para comercialização) praticamente não resultaram em nenhum efeito significativo sobre a atividade da PFO. Todavia, pode-se recomendar que a imersão, pelo menos em água, seja realizada, o que resultará em menor atividade enzimática e, possivelmente, em um menor comprometimento da coloração no produto final.

Há que se considerar ainda que o manejo do basidiocarpo durante as diversas etapas de seu processamento, antes de ser desidratado (colheita, limpeza, lavagem em água corrente, corte ao meio), provavelmente deverá

provocar injúrias nas suas membranas celulares, liberando a PFO que, então, encontrará condições ideais para atuar (Mayer & Harel, 1979), produzindo polifenóis que irão provocar o escurecimento dos basidiocarpos, reduzindo seu valor comercial. Para solucionar, pelo menos em parte, o problema acima mencionado, poderia-se estudar o efeito do cálcio que é utilizado na preservação de biomembranas, como realizado por Nardin (1999) em um trabalho com *Pleurotus sajor-caju*.

O processo de escurecimento pode ter dois componentes: enzimático e não-enzimático. A oxidação enzimática pode ser evitada pela inibição das PFO (lacase e tirosinase) enquanto a oxidação não-enzimática pode ser evitada pela utilização de antioxidantes (Kubo et al., 2003). A oxidação enzimática é considerada prejudicial para a qualidade final do alimento ou mesmo das bebidas (Friedman, 1986).

4.5 Proposta de padronização da cor para comercialização de *A. blazei*

No Brasil, o consumo da produção mundial de *A. blazei* gira em torno de 0,01%, ficando atrás do Canadá, com 10%, Europa, com 20% e da Ásia, o maior consumidor mundial, com 70% (Urban, 2001). Portanto, a maior preocupação no momento é o mercado externo, sobretudo o Japão, embora não se deva negligenciar o grande potencial de crescimento do mercado interno brasileiro.

Obviamente, a expansão das exportações brasileiras, bem como o aumento do consumo interno do *A. blazei*, exigirá o desenvolvimento de tecnologias que visam à melhoria da qualidade do produto final, e que deva estar atuando em todas as fases da cadeia produtiva.

Nesse aspecto, o Brasil, sendo considerado um país com grande capacidade de desperdiçar alimentos, principalmente por manuseios inadequados

ou impróprios na pós-colheita de frutas, hortaliças e grãos em geral, deverá concentrar esforços para obtenção de um produto final que atenda às exigências do mercado consumidor (nacional ou estrangeiro), com o máximo de aproveitamento, buscando uma efetiva melhoria nas atividades de pós-colheita.

Além disso, há no momento atual uma grande necessidade de se estabelecer critérios para a avaliação da qualidade dos cogumelos desidratados. A ausência de critérios objetivos impede que o produtor tenha uma avaliação justa do seu produto, tendo como conseqüência, desvalorização do mesmo no momento da comercialização, uma vez que não possui argumentos técnicos para questionar o comprador.

No caso particular dos basidiocarpos, as características extrínsecas, como cor, tamanho e forma, é que são avaliadas, estando as análises sujeitas, em grande parte, à forte subjetividade.

Tomando o café como exemplo, por se tratar de um produto agrícola brasileiro importante, sendo uma das principais fontes de divisas para o País e que tem a qualidade de seus grãos também vinculada a uma certa subjetividade, nesse caso, os aspectos físicos, na prática comercial também são considerados, como forma, tamanho, cor e uniformidade dos grãos.

O Conselho Internacional do Café nomeou um grupo de trabalho em agosto de 1966, com a finalidade de se estudar meios convenientes para a adoção de um código internacional de normas de qualidade, com bases em fundamentos científicos aplicáveis aos exportadores de café (Menchú, 1967).

Segundo Meirelles (1990), no Brasil, a criação do Selo de Pureza do Café em 1989, pela Associação Brasileira das Indústrias de Torrefação e Moagem de Café (ABIC), é um forte indicativo da preocupação com a qualidade do produto.

Todavia, para a comercialização do *A. blazei*, não existe até o momento nenhuma padronização, nem com relação aos fatores intrínsecos e tampouco

para fatores extrínsecos. Pelos motivos expostos anteriormente e também por tratar-se de uma indústria promissora (Urban, 2001), propõe-se, portanto, a adoção de padrões de comercialização, alguns dos quais serão apresentados na seqüência.

Nesse sentido, primeiramente, fez-se a qualificação da coloração dos basidiocarpos tratados com ácido ascórbico (Tabela 1) e ácido cítrico (Tabela 2) nas diferentes concentrações e tempos de imersão, de acordo com a escala de cores proposta por Munsell (1976). Notadamente, todos os basidiocarpos desidratados apresentaram um escurecimento em relação ao momento da sua colheita, alterando sua coloração de branco para tons amarelados. Nesse caso, o escurecimento observado parece fazer parte do próprio processo de desidratação do basidiocarpo (Mau et al., 1993).

Para a avaliação da cor, foram consideradas duas regiões dos basidiocarpos: as bordas e a região interna. Essa divisão se fez necessária pelo fato de que havia grande diferença na coloração entre as duas regiões, tornando-se impossível encontrar uma cor para as duas regiões. Basicamente, os tratamentos-controle (imersão somente em água) não apresentaram grandes variações, o que pode ser considerado como um resultado esperado. Por outro lado, os tratamentos com 2 e 20 minutos de imersão em ácido ascórbico apresentaram similaridade nos resultados, com variações nas cores relativas ao croma (intensidade da cor), mas o padrão de cor amarelado referente à página 2,5Y não variou significativamente nas amostras analisadas.

O tratamento com tempo de imersão de 5 minutos variou somente em duas análises na região interna do basidiocarpo com relação ao padrão da cor, onde as amostras apresentavam-se em amarelo-dourado referente a 5Y.

No tempo de imersão de 10 minutos, apenas o controle e o tratamento com 20 ppm apresentaram-se com a coloração interna levemente dourada,

TABELA 1 Efeito do tempo de imersão e das diferentes concentrações de ácido ascórbico na coloração final de basidiocarpos *Agaricus blazei*, com base no catálogo de cores segundo Munsell (1976).

TRATAMENTO	TEMPO DE IMERSÃO					
	2 minutos					
	Região Interna		Bordas		Moído	
	Página	Croma	Página	Croma	Página	Croma
CONTROLE	2,5Y	8/10	2,5Y	8/10	2,5Y	8,5/10
10 ppm	2,5Y	8,5/6	2,5Y	8/12	2,5Y	7/8
20 ppm	2,5Y	8/10	2,5Y	8/10	2,5Y	8/12
30 ppm	2,5Y	8,5/6	2,5Y	8,5/8	2,5Y	8/10
	5 minutos					
	Região Interna		Bordas		Moído	
	Página	Croma	Página	Croma	Página	Croma
CONTROLE	5 Y	8,5/6	2,5Y	8,5/6	2,5Y	8,5/6
10 ppm	2,5 Y	8,5/6	2,5Y	8/10	2,5Y	8/8
20 ppm	2,5 Y	8,5/6	2,5Y	8/10	2,5Y	8/10
30 ppm	5 Y	9/6	2,5Y	8/10	2,5Y	8/10
	10 minutos					
	Região Interna		Bordas		Moído	
	Página	Croma	Página	Croma	Página	Croma
CONTROLE	5 Y	9/2	5Y	9/2	2,5Y	9/2
10 ppm	2,5 Y	8,5/6	2,5Y	8,5/8	2,5Y	9/6
20 ppm	5 Y	8,5/8	2,5Y	8/10	2,5Y	8/10
30 ppm	2,5 Y	8,5/6	2,5Y	8/12	2,5Y	8/12
	15 minutos					
	Região Interna		Bordas		Moído	
	Página	Croma	Página	Croma	Página	Croma
CONTROLE	5 Y	9/4	5Y	9/4	2,5Y	9/4
10 ppm	2,5Y	8,5/8	2,5Y	7/12	2,5Y	9/4
20 ppm	2,5Y	8/10	2,5Y	7/10	5Y	9/6
30 ppm	2,5Y	8/10	2,5Y	8/12	2,5Y	7/10
	20 minutos					
	Região Interna		Bordas		Moído	
	Página	Croma	Página	Croma	Página	Croma
CONTROLE	2,5Y	8,5/10	2,5Y	8,5/10	2,5Y	
10 ppm	2,5Y	8,5/10	2,5Y	7/12	2,5Y	8/8
20 ppm	2,5Y	8/10	2,5Y	8/12	2,5Y	8/6
30 ppm	2,5Y	8,5/6	2,5Y	8,5/12	2,5Y	8/12

TABELA 2 Efeito do tempo de imersão e das diferentes concentrações de ácido cítrico na coloração final de basidiocarpos *Agaricus blazei*, com base na tabela de cores segundo Munsell (1976).

TRATAMENTO	TEMPO DE IMERSÃO (ácido cítrico)					
	10 minutos					
	Região Interna		Bordas		Moído	
	Página	Croma	Página	Croma	Página	Croma
CONTROLE	5 Y	9/2	5Y	9/2	2,5Y	9/2
10 ppm	2,5Y	7/10	2,5Y	7/8	2,5Y	7/12
20 ppm	5Y	9/6	2,5Y	7/8	2,5Y	7/12
30 ppm	2,5Y	8/10	2,5Y	7/8	2,5Y	7/12
	15 minutos					
	Região Interna		Bordas		Moído	
	Página	Croma	Página	Croma	Página	Croma
CONTROLE	5 Y	9/4	5Y	9/4	2,5Y	9/4
10 ppm	2,5 Y	8,5/10	2,5Y	7/10	2,5Y	8/12
20 ppm	2,5 Y	8,5/10	2,5Y	7/10	2,5Y	8/12
30 ppm	2,5 Y	8,5/10	2,5Y	7/10	2,5Y	8/12

enquanto o controle permaneceu também nas bordas com 5Y. Todos os demais tratamentos apresentaram a predominância de tons amarelados 2,5Y, variando a intensidade da cor (croma). Já no tempo de 15 minutos, somente o controle apresentou a região interna e bordas douradas referentes a 5Y. As demais amostras permaneceram na coloração 2,5Y.

Conclui-se, portanto, que os diferentes tratamentos não produziram nenhum efeito na padronização da coloração dos basidiocarpos. A utilização do catálogo de Munsell continua a contar com o fator da subjetividade, embora numa escala já muito mais reduzida, o que certamente reduz possíveis interferências tendenciosas no sentido de valorizar ou desvalorizar o produto no momento da sua comercialização. Por isso, a tabela de cores do catálogo de Munsell poderia ser uma opção para se estabelecer um padrão de cor para os basiocarpos de *A. Blazei*.

Por outro lado, para a determinação da cor como atributo de qualidade de um produto, consideram-se como objetivos os métodos que eliminem o elemento humano como fator decisivo na determinação (Lopes, 1988). Para o procedimento da avaliação objetiva da cor, podem ser utilizados os espectrofotômetros e os colorímetros (Cheftel & Cheftel, 1992). Dessa forma, procurou-se proceder a uma padronização na coloração dos basidiocarpos desidratados, que foram reunidos em seis grupos (Figura 7), visando à obtenção de uma possível escala de cores e que sirva de referência na comercialização do *A. blazei*.

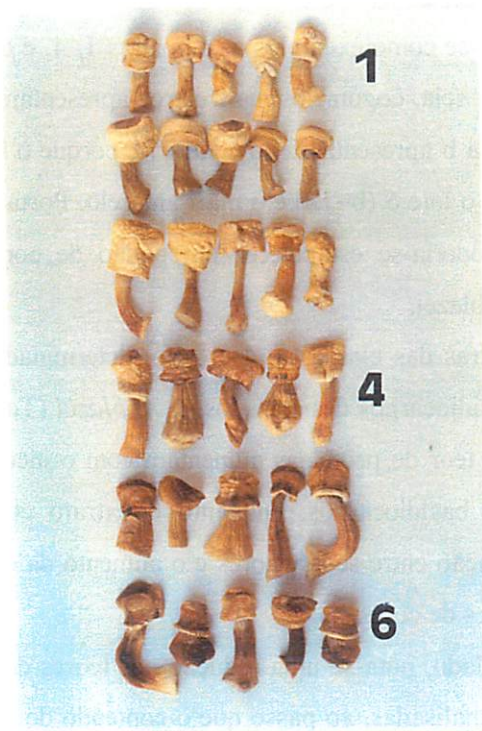


FIGURA 7 Amostras de basidiocarpos desidratados de *Agaricus blazei* organizados em 6 lotes de maneira a formar uma escala de coloração como proposta para a padronização de comercialização.

Ressalta-se que essa escala apresenta-se como a primeira tentativa de se avaliar objetivamente a cor dos basidiocarpos desidratados de *Agaricus blazei*, ainda que, futuramente, venha a sofrer modificações ou adaptações.

Para a obtenção de dados mais confiáveis, optou-se por subdividir os basidiocarpos em píleo e estipe de cada uma das amostras, sendo os resultados obtidos descritos na Tabela 3. Nessa classificação por cor, os basidiocarpos foram agrupados em seis classes diferentes, identificadas de 1 a 6, sendo a primeira a mais clara e a última a mais escura (localizada na parte inferior da Figura 7).

Os resultados da Tabela 3 indicam que as leituras de Δl e Δb discriminam melhor as diferenças entre escuro/claro e mais amarelo/menos amarelo. Tomando-se como exemplos as amostras 1, 4, e 6. Verifica-se leituras l de 69, 65, e 52, ou seja, cogumelos mais claros apresentam leituras maiores. Por outro lado, a leitura b apresenta efeito contrário, porque o lote 1 ($b=4$) é o menos amarelo, enquanto o lote 6 ($b=12$) é o mais amarelo. Portanto à partir de leituras no colorímetro, poderia-se estabelecer um padrão de core para os cogumelos desidratados de *A.blazei*.

Nas amostras das classes 1, 4 e 6, foi determinada ainda a composição centesimal dos basidiocarpos desidratados de *A. blazei* (Tabela 4). Nota-se que o teor de umidade e teor de proteínas aumentam com o incremento na intensidade da coloração dos basidiocarpos, enquanto o extrato etéreo e as cinzas não apresentam correlação entre seus valores e o aumento da coloração na seqüência proposta nas classes de cores.

Por outro lado, nota-se uma redução nos teores da fração glicídica entre as classes de cor analisadas, ao passo que o conteúdo de fibras sofre redução da classe 1 para a 4, permanecendo praticamente inalterado dessa para a classe 6.

TABELA 3 Resultados da leitura em colorímetro dos basidiocarpos desidratados de *Agaricus blazei*.

Avaliação Colorimétrica	PÍLEO						
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	MÉDIA
L	69	73	72	65	51	52	57
B	4	0,4	3	7	12	12	10
A	35	32	36	37	34	37	30
	ESTIPE						
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	MÉDIA
L	64	51	49	54	54	33	44
B	5	4	6	9	10	16	13
A	38	28	31	36	38	25	26

Obs: valores médios obtidos de 5 repetições.

Nota: as letras l, b e a referem-se a:

$\Delta l +$: mais claro que o padrão

$\Delta l -$: mais escuro que o padrão

$\Delta b +$: mais amarelo ou menos azul que o padrão

$\Delta b -$: mais azul ou menos amarelo que o padrão

$\Delta a +$: mais vermelho ou menos verde que o padrão

$\Delta a -$: mais verde ou menos vermelho que o padrão

Ao se analisar a composição centesimal, que exprime o valor nutritivo dos grupos homogêneos (aqueles que se encontram praticamente em todos os alimentos), para cada fração de 100 gramas do alimento analisado, sugerem-se que novas investigações químicas a respeito desse basidiocarpo sejam desenvolvidas.

Não se pode desconsiderar que a fração glicídica decresceu em função do escurecimento do basidiocarpo. Lembrando que o componente mais associado a sua possível atividade antitumoral é o carboidrato, seria interessante o desenvolvimento de novos estudos no sentido de conhecer o comportamento

bioquímico do basidiocarpo em diferentes condições ambientais e suas influências sobre o conteúdo e qualidade da fração glicídica.

As concentrações de proteínas solúveis totais (Figura 7) determinadas à partir dos lotes separados de acordo com a coloração, apresentaram valores aproximados, embora haja diferenças estatísticas entre os valores obtidos para a classe 6 com as demais. Com isso, sugere-se que a coloração dos basidiocarpos, nesse caso, interfere significativamente no valor nutricional referente as PST. Por outro lado, a concentração de aminoácidos livres permaneceu praticamente inalterada entre as classes analisadas, não havendo diferenças estatísticas entre elas (dados não apresentados)

Os açúcares redutores (Figura 8) sofreram um decréscimo em sua concentração em relação ao aumento na intensidade da coloração. À medida que os basidiocarpos tornaram-se mais escuros, o teor de açúcar redutor foi significativamente reduzido. Esses valores assemelham-se aos valores apresentados pela análise centesimal para a fração glicídica (Tabela 4).

TABELA 4 Composição centesimal de basidiocarpos desidratados de *A. blazei* de diferentes lotes em função da sua coloração final.

LOTE	UMIDADE	EXTRATO ETÉREO	PROTEÍNA	FIBRA	CINZAS	FRAÇÃO GLICÍDICA
1	7,5	2,0	30,9	6,2	6,3	47,1
4	8,6	1,9	35,8	5,5	7,0	41,4
6	9,8	2,1	39,2	5,6	6,8	36,3

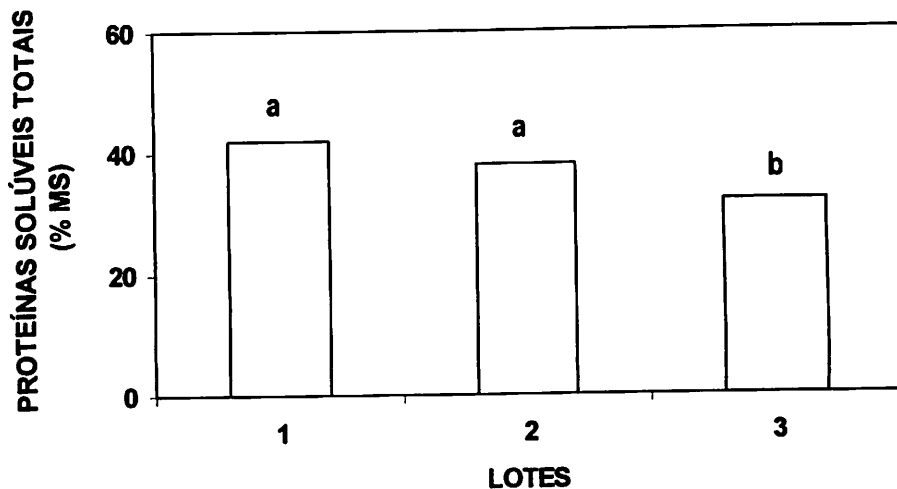


FIGURA 8 Concentração de proteínas solúveis totais em basidiocarpos desidratados de *A. blazei* em lotes com diferentes colorações (média de 3 repetições, cv 7,42%). (1 = Lote 1, 2 = Lote 4, 3 = Lote 6).

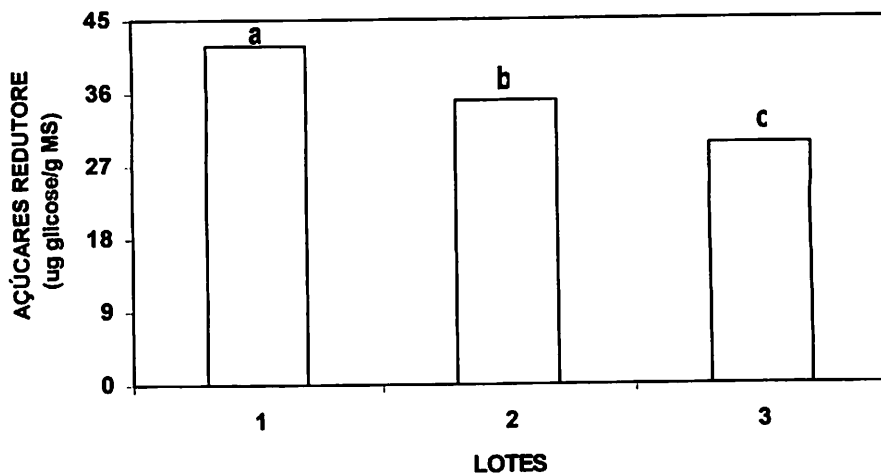


FIGURA 9 Concentração de açúcares redutores em basidiocarpos desidratados de *A. blazei* em lotes com diferentes colorações (média de 3 repetições, cv 6,62%). (1 = Lote 1, 2 = Lote 4, 3 = Lote 6).

5 CONCLUSÕES

Os basidiocarpos tratados com ácido ascórbico, independente da concentração, reduziram as concentrações intracelulares de açúcares redutores e solúveis totais;

Foi observada uma relação inversa nas concentrações de aminoácidos livres e proteínas solúveis totais.

A coloração final dos basidiocarpos não foi afetada pelos tratamentos com antioxidantes, nas diferentes concentrações e tempos testados.

A imersão dos basidiocarpos em água durante o processamento dos mesmos, antes da desidratação pode contribuir para diminuir a atividade da enzima polifenol oxidase.

Análises centesimais e bioquímicas, sugerem que o escurecimento do basidiocarpo resulta numa menor fração glicídica e de açúcares redutores.

É possível propor um padrão de cores para os cogumelos desidratados de *A. Blazei* visando a sua comercialização, utilizando o catálogo de Munsell, mais subjetivo, e o colorímetro Minolta CR300, mais objetivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRE, G.; ZHUKLIN, I. B. Laccases are widespread in bacteria. **Trends in Biotechnology**, New York, v. 18, n. 1, p. 41-42, Jan. 2000.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Wiley, 1996.
- AMORIN, H. V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionados com a deterioração de qualidade**. 1978. 85 p. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.
- AMORIN, H. V.; CRUZ, A. R. M.; BASSOL, L. C.; COSTA, J. D.; OLIVEIRA, A. J.; TEIXEIRA, A. A. Relação entre a coloração do grão e da película prateada do café e a presença de enzimas oxidativas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 4., 1976, Caxambú. **Resumos....** Rio de Janeiro: MIC/IBC/GERCA, 1976. p. 133-135.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2. ed. Viçosa: UFV, 1999. p. 319-332.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AND AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of official and Agricultural Chemistry**. 10. ed. Washington, 1965.
- ARORA, D. S.; GILL, P. K. Laccase production by some white rots fungi under different nutritional conditions. **Bioresearch Technology**, Oxford, v. 73, n. 3, p. 283-285, July 2000.
- BARBISAN, L. F.; MIYAMOTO, M.; SCOLASTICI, C.; SALVATORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; EIRA, A. F.; CAMARGO, J. L. V. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 83, n. 1/2, p. 25-35, Nov. 2002.
- BEAULIEU, M.; D'APRANO, G.; LACROIX, M. Effect of dose rate of gamma irradiation on biochemical quality and browning of mushrooms *Agaricus bisporus*. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 63, n. 3/6, p. 311-315, Mar. 2002.

BIEKMAN, E. S. A.; KROESE-HOEDEMAN, H. I.; SCHIJVENS, E. P. H. M. Loss of solutes during blanching of mushrooms (*Agaricus bisporus*) as a result of shrinkage and extraction. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 28, n. 2, p. 139-152, May 1996.

BISARIA, R.; MADAN, M. Mushrooms: potential protein source from cellulosic residues. **Enzyme Microbiology Technology**, New York, v. 5, n. 4, 251-259, 1983.

BOLLAG, J. M.; LEONOWICZ, A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 48, n. 4, p. 849-854, 1984.

BONONI, V. L. R.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R.; TRUFEM, S. F. B. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Editora Ícone, 1995. 206 p.

BONONI, V. L. R.; OKINO, L. K.; TANAKA, J. H.; CAPELARI, M. **Cultivo de *Agaricus blazei* Murril: o cogumelo do sol**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2001. 21 p.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Athenes, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BRAVERMAN, J. B. S. **Introducion a la bioquímica de los alimentos**. Barcelona: Omega, 1967. 355 p.

BRENNAN, M.; PORT, G. L.; GORMLEY, R. Post-harvest treatment with citric acid or hydrogen peroxide to extend the shelf life of fresh sliced mushrooms. **Lebensmittel-Wissenscchaft und Techonologie**, London, v. 33, n. 4, p. 285-289, 2000.

BRENNAN, M.; PORT, G. L.; PULVERENTI, A.; GORMLEY, R. The effect of sodium metabisulfite on the whiteness and keeping quality of sliced mushrooms. **Lebensmittel-Wissenscchaft und Techonologie**, London, v. 32, n. 7, p. 460-463, 1999.

BURTON, S. G. Biocatalysis with polyphenoloxidase: an overview. **Catalytic Today**, Amsterdam, v. 22, n. 23, p. 459-487, Dec. 1994.

CAMARGO, R.; FONSECA, H.; GRANER, M. **Tecnolgia dos produtos agropecuarios: alimentos**. São Paulo: Nobel, 1982. P. 73-87.

CARVALHO, V. D.; CHAGAS, S. J. de R.; CHALFOUN, S. N.; BOTREL, N.; JUSTE JUNIOR, E. S. G. Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e qualidade de bebida do café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 449-454, mar. 1994.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Edible mushrooms and their cultivation**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 189-223.

CHEFTEL, J. C.; CHEFTEL, H. **Introducción a la bioquímica e tecnología de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1992. 346 p.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL-FAEPE, 1990. 293 p.

COLAUTO, N. B.; DIAS, E. S.; GIMENES, M. A.; EIRA, A. F. Genetic characterization of isolates of the basidiomycete *Agaricus blazei* by RAPD. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 1-11, Jan./mar. 2002.

DIEZ, V. A.; ALVAREZ, A. Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. **Food Chemistry**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 417-422, Dec. 2001.

DRAETTA, I. S.; LIMA D. C. Isolamento e caracterização das polifenol oxidases do café. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 7, p. 3-28, 1976.

DURÁN, N. The impact of biotechnology in the pulp and paper industry: state of art. In: MARTINS, M. T.; ZANOLI, M. A.; TIEDJE, J.; NORTON, L.; DÖBEREINER, J.; SANCHEZ, P. (Ed.). **Progress in microbial ecology (new trends and the application on biotechnology)**. São Paulo: Brazilian Society Microbiology, 1997. p. 543-547.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccase and tyrosinase (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, n. 7, p. 907-931, Dec. 2002.

FANG, T. T.; FOOTRAKUL, P.; LUH, B. S. Effects of blanching, chemical treatments and freezing methods on quality of freeze-dried mushrooms. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 36, n. 7, p. 1044-1048, 1971.

FRIEDMAN, M. Food browning and its prevention: an overview. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 3, p. 631-653, Mar. 1996.

FONTECAVE, M.; PIERRE, J. L. Oxidation by copper metalloenzymes and some biomimetic approaches. **Coordination Chemical Review**, Lausanne, v. 170, p. 125-140, 1998.

FOX, P. F. **Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetable: food enzymology**. London: Elsevier Applied Science, 1991. v. 1, 636 p.

GHONEUM, M. *Agaricus* mushroom enhances murine natural killer cell activity in vivo. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF IMMUNOLOGY, 9., 1995, San Francisco, USA. **Abstracts book...** San Francisco, 1995. p. 488.

GIANFREDA, L.; BOLLAG, J. M. Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutant. **Enzymes Biotechnology**. 2003 (in press).

GIVAUDAN, A.; EFFOSSE, A.; FAUN, D.; POTIER, P.; BOVILLANT, M.; BALLY, R. Polyphenoloxidase from *Azospirillum lipoferum* isolated from the rizosphere: evidence for a laccase in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 205-210, Apr. 1993.

GORMLEY, R. Chill storage of mushrooms. **Journal Science Food Agriculture**, London, v. 26, n. 4, p. 401-411, Apr. 1975.

GOULART, P. de F. P. **Purificação da polyfenol oxidase e avaliação de métodos bioquímicos para aferir a qualidade da bebida do café**. 2002. 80 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 2. ed. São Paulo, 1977. v. 1.

ITO, H.; SHIMURA, K.; ITOH, H.; KAWADE, M. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) “himematsutake” and its mechanism in tumor-bearing mice. **Anticancer Research**, Athens, v. 17, n. 1A, p. 277-284, Jan./Feb. 1997.

ITO, H.; ITO, H.; AMANO, H.; NODA, H. Inhibitory action of a new (1-6)-beta-D-glucan protein complex (F III-2-b) isolated from *Agaricus blazei* MURRIL ("Himetsutake") on meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. **Japanese Journal of Pharmacology**, Kyoto, v. 66, n. 2, p. 265-271, Oct. 1994.

KARAM, J.; NICELL, J. A. Potential applications of enzymes in waste treatment. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, Sussex, v. 69, n. 2, p. 141-143, June 1997.

KAWAGISHI, H.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; MIZUNO, T.; SHIMURA, K.; ITO, H.; HAGUIWARA, T.; NAKAMURA, T. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrates Research**, Amsterdam, v. 186, n. 2, p. 267-73, Mar. 1989.

KAWAGISHI, H.; KANAO, T.; INAGAKI, R.; MIZUNO, T.; SHIMURA, K.; ITO, H.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Formolysis of a potent antitumor (1-6)-beta-D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. **Carbohydrates Polymers**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 393-403, 1990.

KUBO, I.; CHEN, Q. X.; NIHEI, K. Molecular design of antibrowning agents: antioxidative protective tyrosinase. **Food Chemistry**, Oxford, v. 81, n. 2, p. 241-247, May 2003.

KUYPER, L.; WELNERT, I. A. C.; MCGILL, A. E. J. The effect of modified atmosphere packaging and addition of calcium hypochloride on the atmosphere composition, colour and microbial quality of mushrooms. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technology**, London, v. 26, n. 1, p. 14-20, 1993.

LAMBRECHT, H. S. Sulfite substitutes for the prevention of enzymatic browning in foods. In: WHITAKER, J. R.; LEE, C. Y. **Enzymatic browning and its prevention**. Washington: American Chemical Society, 1995. p. 313-323.

LOPES, R. P. **Efeito da luz na qualidade (cor e bebida) de grãos de café (*Coffea arabica* L.) durante a armazenagem**. 1988. 131 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MARTINEZ OJEDA, R. **Utilização de ceras, fungicidas e sanitizantes na conservação de goiabas "pedro sato" sob condição ambiente**. 2001. 57 p.


Tese (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

MATHEW, A. G.; PARPIA, H. A. B. Food browning as a polyphenol reaction. **Advances in Food Research**, New York, v. 19, p. 75-145, 1971.

MATTILA, P.; SUONPÄÄ, K.; PIIRONEN, V. Functional properties of edible mushrooms. **Nutrition**, New York, v. 16, n. 7/8, p. 694-696, July/Aug. 2000.

MAU, J. L.; MIKLUS, M. B.; BEELMAN, R. B. Shelf life of *Agaricus* mushrooms. In: CHARALAMBOUS, G. **Shelf life of foods and beverages**. 1993. v. 33, p. 255-293.

MAYER, A. M.; HAREL, E. Polyphenoloxidases in plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 193-216, 1979.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccases: new functions for an old enzyme: review. **Phytochemistry**, Oxford, v. 60, n. 6, p. 551-565, July 2000.

McDONALD, K.; SUN, D. Vacuum cooling technology for the food processing industry: a review. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 55-65, Apr. 2000.

McMILLIN, D. R.; EGGLESTON, M. K. **Bioinorganic chemistry of laccase**. Singapore: World Scientific, 1997. p. 122-126.

MENCHÚ, E. F. La determinación de la calidad del café. Parte I. Características, color y aspecto. **Agricultura de las Américas**, Kassar City, v. 16, n. 5, p. 18-21, 1967.

MEIRELLES, A. M. A. **Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do Estado de Minas Gerais**. 1990. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

MENOLI, R. C. R. N.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L. R.; SPEIT, G.; JORDÃO, B. Q. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murril extracts on V79 cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 496, n. 1/2, p. 2-13, Sept. 2001.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MINNAAR, A.; TAYLOR, J. R. N.; MCGILL, A. E. J. Heat-irradiation combination processing as an effective method of producing high quality shelf-stable, low-acid food products. *Food Control*, Oxford, v. 6, n. 3, p. 165-170, June 1995.

MINNAAR, A.; TAYLOR, J. R. N.; DERSLEY, N. N.; MCGILL, A. E. J. Technological feasibility of heat-irradiation combination treatments for low-acid food products. *Radiation Physics and Chemistry*, Oxford, v. 48, n. 3, p. 371-372, 1996.

MIZUNO, T. Kawariharatake, *Agaricus blazei* Murill: medicinal and dietary effects. *Food Reviews International*, New York, v. 11, n. 1, p. 167-172, 1995.

MIZUNO, T. A solução para o câncer através da alimentação: o segredo do β -glucan, inibidor do câncer. Paulo's Comunicação e Artes Gráficas Ltda. Tradução: Lilia Yuka Sasaki, 1997.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKARA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "himematsutake" the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, v. 54, n. 11, p. 2889-2996, Nov. 1990a.

MIZUNO, T.; INAGAKI, R. T.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKARA, A. Antitumor activity and some properties of water-insoluble heteroglucans from "himematsutake" the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, v. 54, n. 11, p. 2897-2905, Nov. 1990b.

MOLENA, O. O moderno cultivo de cogumelos. São Paulo: Nobel, 1986. 170 p.

MUNSELL, A. H. *Munsell book of color*. Neighboring Hues Edition. Baltimore: Macbeth Division of Kollmorgen, 1976. (Mathefinish collection).

NARDIN, M. S. Conservação de cogumelos comestíveis (*Pleurotus sajor-caju*) por acidificação e processamento térmico e por desidratação. 1999. 96 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

NUSSINOVITCH, A.; KAMPF, N. Shelf-life and conserved texture of alginate-coated mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Lebensmittel-Wissenschaft und Technology*, London, v. 26, n. 5, p. 469-475, 1993.

OLIVEIRA, J. M.; JORDÃO, B. Q.; RIBEIRO, L. R.; EIRA, A. F. Da; MANTOVANI, M. S. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 12, p. 1775-1780, Dec. 2002.

OLIVEIRA, M. V. de. Efeito do armazenamento no branqueamento de grãos de café beneficiado: modelagem matemática do processo. CHANDRA, Prabir Kumar (orien.). 1995. 116 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OSAKI, Y.; KATO, T.; YAMAMOTO, K.; OKUBO, J.; MIYAZAKI, T. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a Basidiomycete *Agaricus blazei*, Jun-17. **Yakugaku Zasshi**, Tokyo, v. 114, n. 5, p. 342-350, May 1994.

PASSOS, L. P. Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. 223 p.

PEDROSA, I. Da cor à cor inexistente. Rio de Janeiro: Léo Christiano Editorial, 1995. 219 p.

SANCHEZ-AMAT, A.; SOLANO, F. A. A pluripotent polyphenoloxidase from the melanogenic marine *Alteromonas* sp shares catalytic capabilities of tyrosinase e laccase. **Biophysical Research Communication**, San Diego, v. 240, n. 3, p. 787-792, Nov. 1997.

SANMEE, R.; DELL, B.; LUMYONG, P.; IZUMMORI, K.; LUMYONG, S. Nutritive value of popular wild edible mushrooms from northern Thailand. **Food Chemistry**, Oxford, n. 4, Sept. 2003. (in press).

SCHERER, M.; FISCHER, R. Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus niger*. **Archives of Microbiology**, New York, v. 170, n. 2, p. 78-84, Aug. 1998.

STAMETS, P.; CHILTON, J. S. **The mushroom cultivator**. Washington: Agarikon Press, 1983. 415 p.

SUGIMURA, T. Nutrition and dietary carcinogens. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 387-395, Mar. 2000.

URBEN, A. F. **Produção de basidiocarpos por meio de tecnologia chinesa modificada**. Brasília: EMBRAPA, 2001. 151 p.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Prevention of enzymatic browning in fruits and vegetables. In: WHITAKER, J. R.; LEE, C. Y. **Enzymatic browning and its prevention**, Washington: American Chemical Society, 1995. p. 49-62.

WINTON, A. L.; WINTON, K. B. **Analysis de alimentos**. Buenos Aires: Hispanoamericana, 1947. p. 76.

XU, F. Oxidation of phenols, anilins and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potential as well as halide inhibitor. **Biochemistry**, Washington, v. 35, n. 28, p. 7608-7614, July 1996.

XU, F.; KULYS, J. J.; DUKE, K.; LI, K. C.; KRIKSTOPAITIS, K.; DEUSSEN, H. J. W. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 66, n. 5, p. 2052-2056, May 2000.

YAROLOV, A. I.; SKOROBOGAT'KO, O. V.; VARTANOV, S. S.; VARFOLOMEYER, S. D. Laccase: properties, catalytic mechanism, and applicability. **Applied Biochemical and Biotechnology**, Totowa, v. 49, n. 3, p. 257-280, Dec. 1994.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino acid with ninhydrin. **Analyst**, London, v. 80, n. 948, p. 209-213, 1955.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, n. 3, p. 508-514, 1954.

ZHAO, J.; KWAN, H. S. Characterization, molecular cloning and differential expression analysis of laccase from edible mushrooms *Lentinula edodes*. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 65, n. 11, p. 4908-4913, Nov. 1999.

ANEXOS

ANEXO A

Figura 1A Escala de cores Segundo Munsell..... 49

FIGURA 1A Escala de cores segundo Munsell

