

LAÉLIA SOARES DE ASSUNÇÃO

**ACUMULAÇÃO E ACESSIBILIDADE DE MINERAIS EM COGUMELOS DE
Pleurotus ostreatus ENRIQUECIDOS COM FERRO, ZINCO E LÍTIO**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL**

2010

LAÉLIA SOARES DE ASSUNÇÃO

**ACUMULAÇÃO E ACESSIBILIDADE DE MINERAIS EM COGUMELOS DE
Pleurotus ostreatus ENRIQUECIDOS COM FERRO, ZINCO E LÍTIO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2010.

**Prof^a. Denise Mara S. Bazzolli
(Coorientadora)**

Prof^a. Míriam Teresinha dos Santos

Prof^a. Edimar Aparecida F. Fontes

Prof^a. Neuza Maria B. Costa

**Prof^a. Maria Catarina Megumi Kasuya
(Orientadora)**

“Os conhecimentos nos dão meios para viver.

A sabedoria nos dá razões para viver.”

Rubem Alves

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me conduzido em seus braços em todos os momentos de minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Maria Catarina Megumi Kasuya, pela orientação rica em ensinamentos, incentivo, compreensão e amizade.

Às professoras Denise Mara Soares Bazzolli e Maria Cristina Dantas Vanetti, pela coorientação e sugestões feitas durante a pesquisa.

Às professoras Edimar Aparecida Filomeno Fontes, Neuza Maria Brunoro Costa e Míriam Teresinha dos Santos pela participação na banca de defesa e pelas sugestões para melhoria da dissertação.

A todos os professores do departamento, pela contribuição na minha formação acadêmica.

A todos funcionários, em especial a Sr. Toninho, Evandro, Danilo, Pablo, Laura e Nilcéa pelo apoio e carinho.

À Patrícia e à Ritinha pelo companheirismo e ajuda na execução dos experimentos.

Às meninas do Laboratório de Enzimologia, Camila, Sandra e Leonir, pelo auxílio durante o trabalho.

Aos amigos do laboratório de Associações Micorrízicas, Akihiko, Adalberto, Cidinha, Paulo, Vanessa, Bruno, Fernandinha, Sabrina, Denise,

Sirlaine, Ana Lúcia, Muriel, Marlon, Matheus, Lydice, José Maria e em especial à Marliane pela grande ajuda e sugestões e à Cíntia pela amizade e boa vontade em ajudar sempre.

Aos eternos BIC-júnior Guilherme, Priscila e Vinícius, que muito contribuíram na execução dos experimentos.

Aos amigos e companheiros de estudo, Vanessa, Natan, Danielle e Fernanda pela união e amizade.

Aos grandes amigos Guilherme e Alexandra, pelo incentivo, companheirismo e bons momentos vividos.

Às amigas de república, Elaine, Mari, Alexandra e Carol, parceiras de alegrias e descobertas.

À minha mãe, Lurdinha, pelo amor incondicional e orações, sempre pedindo a Deus o melhor para minha vida.

A todos os meus irmãos, em especial a Cléo, Tati e Deti pela cumplicidade, conselhos, respeito e o imenso carinho que nos une.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho, muito obrigada.

BIOGRAFIA

LAÉLIA SOARES DE ASSUNÇÃO, filha de Maria de Lourdes Soares de Assunção e José de Assunção, nasceu no dia 28 de julho de 1981 em Ubá, no estado de Minas Gerais.

Em 2004 ingressou na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa MG, graduando-se em janeiro de 2008, em Ciências Biológicas.

Em março do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa de dissertação em 25 de fevereiro de 2010.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Características dos cogumelos e seu enriquecimento com minerais.....	3
2.2. Importância dos microelementos na saúde humana	8
2.2.1. Ferro	8
2.2.2. Zinco	11
2.2.3. Lítio	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Micro-organismos e condições de cultivo	17
3.2. Enriquecimento de cogumelos com Fe, Zn e Li.....	18
3.3. Quantificação do teor de minerais em cogumelos.....	19
3.4. Avaliação do teor de proteínas em cogumelos.....	20
3.5. Avaliação da acessibilidade de Fe, Zn e Li por meio da solubilidade e digestibilidade <i>in vitro</i> de cogumelos de <i>P. ostreatus</i>	22
3.5.1. Grau de solubilidade por extração sequencial	22
3.5.2. Digestibilidade <i>in vitro</i>	23
3.6. Delineamento experimental e análise estatística.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. Eficiência biológica de cogumelos de <i>P. ostreatus</i> cultivados em substrato casca de café enriquecido com Fe, Zn e Li	25
4.2. Acumulação de Fe, Zn e Li nos cogumelos de <i>P. ostreatus</i>	27
4.3. Teor de minerais e de proteínas nos cogumelos.....	30
4.3.1. Teor de minerais e proteínas nos cogumelos de <i>P. ostreatus</i> enriquecidos ou não com FeSO ₄	30
4.3.2. Teor de minerais e proteínas nos cogumelos de <i>P. ostreatus</i> enriquecidos com ZnCO ₃	32
4.3.3. Teor de minerais e proteínas nos cogumelos de <i>P. ostreatus</i> enriquecidos com LiCl	34
4.4. Acessibilidade do Fe, Zn e Li nos cogumelos de <i>P. ostreatus</i>	36
4.4.1. Solubilidade por extração sequencial.....	36
4.4.2. Digestibilidade <i>in vitro</i>	40
5. CONCLUSÕES	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXOS	59

RESUMO

ASSUNÇÃO, Laélia Soares de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Acumulação e acessibilidade de minerais em cogumelos de *Pleurotus ostreatus* enriquecidos com ferro, zinco e lítio.** Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Coorientadoras: Denise Mara Soares Bazzolli e Maria Cristina Dantas Vanetti.

Cogumelos de *Pleurotus ostreatus* constituem um alimento com excelente valor nutritivo que podem ser enriquecidos, contribuindo para a mobilidade, biodisponibilidade e transferência de diversos elementos químicos do ambiente para outros organismos. Suplementos minerais e alimentos enriquecidos têm sido utilizados com o intuito de garantir a quantidade necessária de minerais essenciais que possam estar em deficiência na dieta. O ferro (Fe) e o zinco (Zn) são minerais importantes para a saúde humana e, embora o lítio (Li) não possua função nutricional reconhecida, um aporte adequado desse metal pode fornecer benefícios comportamentais. Dessa maneira, o enriquecimento de cogumelos de *P. ostreatus* com Fe, Zn ou Li pode ser útil na obtenção de uma fonte concentrada e biodisponível desses microelementos. Assim, os objetivos deste trabalho foram enriquecer cogumelos de *P. ostreatus* cultivados em substratos à base de casca de café suplementados com Fe, Zn ou Li, avaliar a capacidade de acumulação desses elementos nos cogumelos e verificar a acessibilidade desses elementos em relação a suplementos minerais comerciais. Os cogumelos foram produzidos em substrato à base de casca de café adicionado de diferentes concentrações de sulfato ferroso (FeSO_4) (0; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 ou 2,0 mg kg⁻¹); carbonato de zinco (ZnCO_3) (0; 0,53; 1,07; 2,13; 4,27 ou 8,53 mg kg⁻¹); ou cloreto de lítio

(LiCl) (0; 62,25; 125; 250; 500 ou 1000 mg kg⁻¹). Determinou-se a eficiência biológica (EB), o teor de proteínas, as concentrações de Fe, Zn, Li e também de Mn, K, P, Ca, Cu, Pb, Cd, S, Cr, Mg, Ni e Al, em três colheitas consecutivas. Para verificar a acessibilidade do Fe, Zn e Li, duas metodologias foram realizadas, a extração sequencial e a digestibilidade *in vitro*. Amostras dos cogumelos enriquecidos com FeSO₄, ZnCO₃ ou LiCl foram avaliadas em comparação a três suplementos minerais comerciais contendo FeSO₄, óxido de zinco (ZnO) ou carbonato de lítio (Li₂CO₃). A eficiência biológica (EB) foi maior na primeira colheita e reduziu consideravelmente na terceira colheita, não sendo influenciada pelas diferentes concentrações de FeSO₄, ZnCO₃ ou LiCl ($P > 0,05$). A acumulação de Fe foi afetada tanto pela dose de FeSO₄ adicionada ao substrato quanto pela ordem das colheitas ($P < 0,05$). O cogumelo de *P. ostreatus* acumulou Zn e Li, e a concentração foi influenciada pelo aumento da concentração de ZnCO₃ e LiCl adicionada ao substrato ($P < 0,05$). Não foram observadas a presença de Al, Cu, Mn, Cr, Pb, Ni e Cd nos cogumelos enriquecidos com FeSO₄, ZnCO₃ ou LiCl. Os teores de S, K e P foram afetados pelas diferentes doses de FeSO₄, ZnCO₃ ou LiCl adicionadas ao substrato ($P < 0,05$), sendo os teores de Ca e Mg afetados pelas diferentes concentrações de FeSO₄ e ZnCO₃ ($P < 0,05$). O teor de proteínas foi somente afetado pela dose de FeSO₄ adicionada ao substrato casca de café ($P < 0,05$). Os elementos Fe, Zn e Li presentes tanto nos cogumelos enriquecido quanto nos cogumelos não enriquecidos, apresentaram acessibilidade maior que esses mesmos microelementos presentes em seus respectivos suplementos. O cogumelo de *P. ostreatus* pode ser uma fonte alternativa de Fe, Zn e Li de alta acessibilidade.

ABSTRACT

ASSUNÇÃO, Laélia Soares de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2010. **Accumulation and accessibility of minerals in *Pleurotus ostreatus* mushrooms enriched with iron, zinc and lithium.** Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya. Co-advisers: Denise Mara Soares Bazzolli and Maria Cristina Dantas Vanetti.

Pleurotus ostreatus mushrooms are food with excellent nutritional value that may be enriched contributing to the mobility, bioavailability and transfer of various chemical elements from the environment for other organisms. Mineral supplements and fortified foods have been used in order to ensure the necessary amount of essential microelements that may be lacking in the diet. Iron (Fe) and zinc (Zn) are important minerals for human health and although lithium (Li) has no known nutritional function, an appropriate supply of this metal would provide behavioral benefits. Thus the enrichment of mushrooms of *P. ostreatus* with these elements may be useful for obtaining a concentrated and bioavailable source of these microelements. Thus, the objectives were to enrich mushrooms of *P. ostreatus* grown on substrates based on coffee husk supplemented with Fe, Zn or Li, to evaluate the accumulation capacity of these elements in mushrooms and evaluate the accessibility of these elements in relation to the commercial mineral supplements. The mushrooms were produced on substrate based on coffee husk supplemented with different concentrations of ferrous sulfate (FeSO_4) (0, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 or 2.0 mg kg⁻¹), zinc carbonate (ZnCO_3) (0, 0.53, 1.07, 2.13, 4.27 or 8.53 mg kg⁻¹) and lithium chloride (LiCl) (0, 62.25; 125, 250, 500 or 1000 mg kg⁻¹). The biological efficiency (BE), the proteins contents and concentration of Fe, Zn, Li, and also of Mn, K, P, Ca, Cu, Pb, Cd, S, Cr, Mg, Ni and Al, in the mushrooms in three consecutive harvests were determined. To evaluate the accessibility of Fe, Zn and Li, two procedures were performed: the sequential extraction and *in vitro*

digestibility. Samples of the mushrooms enriched with FeSO_4 , ZnCO_3 or LiCl were evaluated in comparison with three commercial mineral supplements containing FeSO_4 , zinc oxide (ZnO) or lithium carbonate (Li_2CO_3). The biological efficiency (BE) was higher in the first harvest and reduced considerably in the third harvest, not being influenced by different concentrations of FeSO_4 , ZnCO_3 or LiCl ($P > 0.05$). The accumulation of Fe was affected by both dose of FeSO_4 added to the substrate and the order of harvests ($P < 0.05$). The mushroom of *P. ostreatus* accumulated Zn and Li, and concentrations were influenced by the increasing concentration of ZnCO_3 and LiCl in the substrate ($P < 0.05$). The Al, Cu, Mn, Cr, Pb, Ni and Cd were not detected in mushrooms enriched with FeSO_4 , ZnCO_3 or LiCl . The concentrations of S, K and P were affected by different doses of FeSO_4 , ZnCO_3 or LiCl added to the substrate ($P < 0.05$), the Ca and Mg were affected by different concentrations of FeSO_4 and ZnCO_3 ($P < 0.05$). The proteins content was only affected by the dose of FeSO_4 added to the husk of coffee ($P < 0.05$). The elements Fe, Zn and Li in both, enriched and unenriched mushrooms showed greater accessibility than those same elements present in their respective supplements. The mushroom of *P. ostreatus* can be an alternative source of Fe, Zn and Li with high accessibility.

1. INTRODUÇÃO

O fungo comestível *Pleurotus ostreatus*, causador da podridão branca, possui sabor agradável, apresenta propriedades nutricionais que contribuem de forma benéfica para a saúde, além de realizar a conversão de resíduos agroindustriais em alimentos. A composição de cogumelos comestíveis, e suas funções, têm sido objeto de numerosas pesquisas, uma vez que podem ser fonte de vários elementos, em quantidade e, ou qualidade, responsáveis pelo funcionamento normal do organismo. A composição química desses cogumelos é afetada diretamente pela composição do substrato onde o fungo é cultivado, fator que permite a acumulação de determinados elementos pelos mesmos. Cerca de 40 elementos traços já foram descritos na literatura e são acumulados ou absorvidos por cogumelos em crescimento o que muitas vezes faz com que alguns minerais se tornem mais biodisponíveis.

Grande parte da população mundial ou se alimenta a base de cereais, ou vivem em regiões onde o solo apresenta um desbalanço mineral, o que pode caracterizar falta frequente de nutrientes essenciais como o ferro (Fe), zinco (Zn), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cobre (Cu), iodo (I) ou selênio (Se). Os humanos requerem mais de 22 elementos minerais, os quais podem ser fornecidos por uma dieta variada e adequada.

O lítio (Li) não é considerado um mineral essencial para funções vitais, pois nenhum sintoma de sua deficiência no ser humano tem sido relatado, mas existe uma influencia do Li sobre o comportamento sem causar alterações fisiológicas. Atualmente, o carbonato de Li é um dos medicamentos psiquiátricos mais comumente prescritos, possuindo importantes efeitos

terapêuticos no tratamento de várias doenças neurais, sendo efetivo no tratamento de pacientes que sofrem de transtorno bipolar.

A carência de minerais afeta mais da metade da população mundial, principalmente mulheres e crianças em idade pré-escolar, caracterizando um problema de grande relevância devido às doenças causadas pela má nutrição.

Estratégias para aumentar a concentração destes microelementos nos alimentos como o enriquecimento tem sido utilizadas para levar estes minerais às populações deficientes.

Neste contexto o enriquecimento de cogumelos de *P. ostreatus* com Fe, Zn e Li pode ser útil na obtenção de uma fonte concentrada e biodisponível desses microelementos. Assim, os objetivos deste trabalho foram obter cogumelos de *P. ostreatus* cultivados em substratos à base de casca de café enriquecidos com Fe, Zn ou Li, avaliar a capacidade de acumulação desses elementos nos cogumelos e verificar a acessibilidade desses elementos em relação a suplementos minerais comerciais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características dos cogumelos e seu enriquecimento com minerais

Os fungos possuem importantes funções biogeoquímicas na biosfera e estão intimamente envolvidos na ciclagem de nutrientes. Eles realizam uma variedade de processos que contribuem para a mobilidade, biodisponibilidade e transferência de diversos elementos químicos do ambiente para outros organismos vivos (GADD, 2007).

Os fungos da podridão branca pertencentes ao grupo dos Basidiomycetes, formam cogumelos e apresentam grande importância para o ecossistema devido à capacidade de degradar substratos ligninocelulósicos, principalmente (SILVEIRA, 1996). Durante o metabolismo, esses fungos secretam enzimas que levam à degradação de compostos presentes no substrato para obtenção de carbono, nitrogênio, enxofre e outros nutrientes necessários para o seu crescimento (DONINI et al., 2005). Isso é possível devido à capacidade desses fungos em produzir complexos enzimáticos, como as celulasas, celobiases, hemicelulasas, ligninases, lacases, entre outras (SCHMIDT et al., 2003). Desse modo, devido a esse aparato enzimático heterogêneo eficiente esses fungos podem ser cultivados em diferentes substratos para a produção de cogumelos (corpos de frutificação), que podem ser utilizados na alimentação humana.

São conhecidas aproximadamente duas mil espécies potencialmente comestíveis de cogumelos, porém apenas 25 delas são normalmente utilizadas na alimentação humana e um número ainda menor tem sido produzido

comercialmente (VILELA, 2007). A maioria desses fungos pertence à ordem Agaricales, cujas principais espécies mundialmente conhecidas são: *Agaricus blazei* (cogumelo do sol), *Agaricus bisporus* (champignon de Paris), *Lentinula edodes* (shiitake) e *Pleurotus* spp. (VILELA, 2007).

Pleurotus ostreatus (cogumelo ostra) pertence a filo dos Basidiomycetes, classe Agaricomycetes, ordem Agaricales, família Pleurotaceae. A produção de cogumelos do gênero *Pleurotus* tem aumentado rapidamente em poucos anos, ocupando o terceiro lugar em relação à produção de *A. bisporus* e *L. edodes* (SÁNCHEZ e ROYSE, 2001). No Brasil, são produzidas aproximadamente três mil toneladas anuais de cogumelos comestíveis, o que corresponde a 0,12 % da produção mundial. Considera-se que o valor da produção de cogumelos no Brasil chega a cerca de R\$ 10 milhões anuais, com destaque na produção de *A. bisporus* (VILELA, 2007). A crescente produção de cogumelos do gênero *Pleurotus* deve-se à sua capacidade em colonizar grande número de resíduos agroindustriais, característica que viabilizou economicamente essa produção e, ao mesmo tempo, contribuiu com a melhoria do meio ambiente (RAJARATHNAM e BANO, 1989).

O Brasil produz uma quantidade considerável de resíduos durante o processo de beneficiamento ou processamento de algumas culturas agrícolas. Por ser o maior produtor mundial de café e o segundo maior consumidor, produz anualmente 47 milhões de sacas de 60 kg, sendo que 50 % do café em coco correspondem ao grão e 50 % a casca e ao pergaminho. Assim, em 2010, foram gerados mais de 1 milhão de toneladas de casca de café como resíduo (CONAB, 2010). Estes subprodutos lignocelulósicos têm despertado interesse como uma fonte indireta de alimentos, uma vez que podem servir de substrato para a produção de cogumelos comestíveis (VILLAS-BÔAS e ESPÓSITO, 2000). O aproveitamento de resíduos lignocelulósicos oriundos da produção agrícola para produção de proteína alimentar na forma de biomassa fúngica é uma alternativa para agregar valor aos resíduos, considerando que a produção de cogumelos comestíveis é uma atividade comercial já bem estabelecida e rentável. São inúmeros os benefícios da conversão desses resíduos em cogumelos, como o fornecimento de alimentos, controle da geração de resíduos, redução de impactos ambientais, melhoria da renda familiar entre outras (SOUZA et al., 2007).

O cultivo de cogumelos de *P. ostreatus* é amplamente conhecido e dispensa tratamento químico ou biológico já que seu sistema enzimático inclui peroxidases e oxidases eficientes na decomposição dos materiais (SÁNCHEZ et al., 2002). Deve-se ressaltar ainda que o tipo de clima, quente e úmido, é favorável para a produção de cogumelos do gênero *Pleurotus*. Os fungos deste gênero são pouco exigentes em relação ao substrato e são capazes de se desenvolver bem em condições rústicas e temperaturas mais elevadas, diferentemente das exigidas pelo *A. bisporus* ou *L. edodes*, por exemplo. São fáceis de produzir e possuem baixo custo de produção, por causa de sua alta adaptabilidade e produtividade (CURVETTO et al., 2002). Atualmente, o cogumelo de *Pleurotus* vem sendo produzido em resíduos agroindustriais como palha de bananeira (REDDY et al., 2003), de milho, de feijão e de café (DIAS et al., 2003). Relata-se que a composição do substrato afeta não só a produtividade, mas também a composição química dos cogumelos (SHASHIREKHA et al., 2005); sendo, portanto, importante selecionar os substratos mais adequados.

Cogumelos comestíveis são muito apreciados, não somente pela textura ou “flavor”, mas também pelas propriedades químicas e nutricionais (MANZI et al., 1999). Possuem importantes efeitos benéficos para a saúde, pois alguns são eficazes na redução do risco de doenças (MANZI et al., 2001). As atividades terapêuticas associadas ao consumo de cogumelos estão diretamente ligadas à composição básica desses organismos, que em média apresentam 90 % de água e um conteúdo de proteína maior do que muitos vegetais (19 a 35 % de matéria seca). Possuem percentual total de gordura com ácidos graxos poliinsaturados baixo, são ricos em carboidratos (51 a 88 %), em fibras alimentares (4 a 20 %) e em vitaminas (principalmente tiamina, riboflavina, ácido ascórbico e vitamina D2) (RABINOVICH et al., 2007). São também fontes ricas de minerais como sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca), fósforo(P) e aminoácidos como leucina, valina, treonina, triptofano, e metionina e apresentam boa fonte de elementos traço como ferro (Fe), zinco (Zn), selênio (Se), cobre (Cu) e molibdênio (Mo), envolvidos em muitos processos bioquímicos essenciais para a vida (ZAIDMAN et al., 2005). Cerca de 40 elementos traço foram descritos na literatura e são acumulados ou absorvidos por cogumelos em crescimento (MICHELOT et al., 1998). Muitas espécies de

cogumelos acumulam elementos traço em quantidades superiores as das plantas (TUZEN, 2003).

A acumulação de metais por fungos pode ser afetada por fatores inerentes ao substrato como pH, quantidade de matéria orgânica e concentração do metal, mas também às características do fungo como a espécie, estágio de desenvolvimento, idade do micélio, composição bioquímica e intervalo entre as frutificações afetam a acumulação do metal (GARCIA et al., 1998; KALAC e SVOBODA, 2000). A capacidade de bioacumulação de nutrientes pelos cogumelos tem sido estudada, com o propósito de obter organismos enriquecidos com certos minerais essenciais para saúde humana (WERNER e BEELMAN, 2001; ALONSO et al., 2003; RABINOVICH et al., 2007; SILVA, 2009; SILVA et al., 2010).

Os metais podem ser incorporados por uma série de mecanismos, que incluem a produção de proteínas ligadas a metais, mineralização e sequestro pelos vacúolos (WELCH, 1993). Isso sugere que fungos possuem mecanismos eficientes para a absorção de alguns elementos traço do substrato e esses mecanismos parecem ser mais eficazes em fungos parasitas e saprófitas do que em fungos micorrízicos (LEPSOVÁ e MEJSTRIK, 1988).

Estudos realizados por Silva (2009), demonstraram que cogumelos de *P. ostreatus* acumulam selênio (Se) a uma taxa proporcional à concentração desse elemento adicionado ao substrato casca de café. Observou-se, também, que o Se incorporado aos cogumelos encontra-se altamente biodisponível (SILVA et al., 2010).

Os corpos de frutificação de fungos também podem ser enriquecidos com diversos minerais. As concentrações de minerais são, em geral, espécie-dependente e a composição do substrato é um importante fator que afeta a absorção, mas existem diferenças na acumulação dos metais individuais (MICHELOT, 1998). Cádmio (Cd), mercúrio (Hg), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) são facilmente absorvidos e acumulados em corpos de frutificação, enquanto que concentrações de chumbo (Pb) e ferro (Fe) são baixas em cogumelos em relação à sua presença no substrato (TYLER, 1982).

Rabinovich et al. (2007) demonstraram que micélio de *A. blazei* quando enriquecido com Cu e Zn, provê fonte concentrada desses minerais em formas potencialmente biodisponíveis, fornecendo uma importante porcentagem da

Ingestão Dietética Recomendada (IDR) por unidade de massa, inferindo que cogumelos destes fungos podem ser usados como suplementos alimentares.

O uso de cogumelos na alimentação humana, assim como a suplementação alimentar com microelementos tem se tornado cada vez mais comum e está crescendo em ritmo acelerado, devido a algumas vantagens de aplicação, como baixo custo e eficácia. Além disso, os suplementos estão regulamentados por uma menor quantidade de leis, que por sua vez são menos rígidas do que as leis que tratam sobre os medicamentos prescritos (SHOEIB e MESTER, 2007).

Fortificação ou enriquecimento de alimentos são termos utilizados para o processo de adição de um ou mais nutrientes essenciais contidos naturalmente ou não no alimento, com objetivo de reforçar seu valor nutritivo e, ou corrigir deficiências de nutrientes na alimentação da população (BRASIL, 1998; FDA, 2004). Alimentos enriquecidos devem fornecer entre 15 % e 30 % da IDR, por 100 g do produto pronto para consumo no caso de sólidos, sendo considerados fonte do mineral ou vitamina (BRASIL, 1998). Suplementos minerais comerciais devem conter no mínimo 25 % e no máximo 100 % da IDR na porção diária indicada pelo fabricante, não podendo substituir os alimentos, nem ser considerado como componente exclusivo da dieta, servindo apenas para completar a dieta diária de uma pessoa saudável (BRASIL, 1998).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece os nutrientes Fe, Zn e a vitamina A como as principais deficiências nutricionais em países em desenvolvimento, afetando mulheres e crianças em idade pré-escolar. A carência de minerais pode ser prevenida mediante modificações da dieta, enriquecimento de alimentos e suplementação com minerais. A forma ideal de prevenir a carência de determinado mineral seria uma dieta adequada, o que nem sempre é possível por limitações econômicas e hábitos culturais (ADA, 2005).

A suplementação medicamentosa tem sido estratégia usada no controle de doenças causadas por carência de nutrientes, mas requer acompanhamento médico e isto pode dificultar o tratamento em muitas regiões. Outros fatores para a ineficácia da suplementação, como doses inadequadas, tempo de suplementação insuficiente, efeitos colaterais como diarreia, desconforto gástrico, cólicas, pirose e náusea contribuem para o abandono do tratamento (LOPES et al., 1999; SOUZA e FILHO, 2003).

O enriquecimento de alimentos tem demonstrado ser uma forma eficiente no combate a esta inadequação nutricional a um custo compensatório (SOGLIA, 1996). Assim o enriquecimento de *P. ostreatus* torna-se uma estratégia alternativa para aumentar as quantidades de minerais nos corpos de frutificação, servindo como fonte concentrada e biodisponível de minerais.

2.2. Importância dos microelementos na saúde humana

2.2.1. Ferro

O Fe é um dos micronutrientes mais estudados e de melhor caracterização quanto à sua participação no metabolismo, sendo essencial ao adequado funcionamento do organismo humano. Desempenha importantes funções na imunologia e em processos catabólicos, participando de sistemas enzimáticos e hormonais; assim como de componentes funcionais da hemoglobina, presente nos eritrócitos, cuja função principal é o transporte de oxigênio permitindo assim, as reações de oxidação que liberam energia (COSTA e PELUZIO, 2008). Além disso, o Fe também participa de uma variedade de processos bioquímicos, incluindo o transporte de elétrons na mitocôndria, metabolismo das catecolaminas, proliferação celular e síntese de DNA (GROTTO, 2008). Esse microelemento é importante para a homeostase celular, devido principalmente a sua habilidade de aceitar e doar elétrons. Sua síntese é controlada por mecanismos enzimáticos e de degradação, tendo um controle rigoroso, uma vez que o excesso de Fe irá reagir com oxigênio formando radicais hidroxil e ânions superóxidos, que podem agir sobre proteínas, lipídeos e DNA causando graves lesões celulares e teciduais (GROTTO, 2008). A regulação da absorção do Fe é muito importante, pois a deficiência resultará em consequências para todo o organismo, sendo a anemia a manifestação mais relevante, como também a diminuição das enzimas dependentes deste mineral (GROTTO, 2008). É necessário que haja um perfeito equilíbrio no metabolismo do Fe, possibilitando a manutenção das funções celulares essenciais e ao mesmo tempo evitando possíveis danos teciduais (BEAUMONT e VAILONT, 2006).

A deficiência de Fe é um problema de saúde pública que afeta aproximadamente 24,8 % da população mundial, sendo considerada a desordem nutricional mais comum no mundo segundo a OMS (WHO, 2008). No Brasil diversos estudos mostram elevada prevalência da deficiência desse mineral e anemia ferropriva (MIRANDA et al., 2003; REZENDE et al., 2009). Em Minas Gerais, na Zona da Mata entre os anos de 1999 a 2001 foi verificado ocorrência de anemia em 63,2 % das crianças com idade entre doze e sessenta meses, já no norte do estado no ano 2000, 12,1 % das crianças de nove a quatorze anos de idade foram diagnosticadas com anemia ferropriva (MIRANDA et al., 2003).

A diversidade da alimentação e o estado nutricional dos indivíduos com relação ao Fe determinarão, em última análise, a adequação da nutrição em Fe. Esse fato tem importantes implicações para a fortificação de alimentos nos países em desenvolvimento. As melhores fontes naturais de Fe são os alimentos de origem animal (fígado e carnes) pelo fato de possuírem Fe tipo heme biodisponível, porém devido ao seu elevado custo, populações de menor poder aquisitivo apresentam dificuldades em adquirir este tipo de produto (DOUGLAS, 2002). Entre os alimentos de origem vegetal destacam-se as leguminosas, os cereais integrais ou enriquecidos, as nozes, castanhas e as hortaliças, entretanto a biodisponibilidade de Fe é diminuída nesses alimentos, devido ao seu teor de fitato, na forma de hexafosfato de mioinositol (KRAUSE e MAHAN, 1993; MONTEIRO et al., 2000). Todavia nem o total de Fe contido no alimento, nem a densidade do nutriente são guias sensíveis para a escolha da fonte de Fe alimentar, pois algumas delas são praticamente não-biodisponíveis.

No leite materno, fonte muito pobre de Fe, a biodisponibilidade do Fe (lactoferrina) é de aproximadamente 50 %. Logo, a biodisponibilidade do Fe presente na refeição depende da forma química, da presença ou da ausência de fatores que influenciam a absorção e das necessidades de Fe no indivíduo (GALANTE et al., 2007).

Considerando que a perda diária para um homem adulto seja de 1,0 mg de Fe por dia e que a média de absorção de Fe presente em uma dieta seja de 10 %, uma porção diária de 10 mg de Fe atenderá as necessidades de um homem adulto, mas varia de acordo com a idade e o grupo a qual pertence (PASSMORE et al., 1983; FAO/WHO, 1993). A recomendação de Fe para os diferentes grupos é apresentada no Quadro 1.

Quadro 1- Recomendações nutricionais de ferro nos estágios da vida

Grupo	Idade (anos)	Fe (mg dia ⁻¹)		
		EAR	RDA	UL
Lactentes	0 – 0,6	0,27*	-	40
	0,7 – 1,0	6,9	11	40
Crianças	1 – 3	3	7	40
	4 – 8	4,1	10	40
Homens	9 – 13	5,9	8	40
	14 – 18	7,7	11	45
	19 – 70	6	8	45
Mulheres	9 – 13	5,7	8	40
	14 – 18	7,9	15	45
	19 – 30	8,1	18	45
	31 – 50	8,1	18	45
	51 – 70	5	8	45
	> 70	5	8	45
Gestantes	= 18	23	27	45
	19 – 50	22	27	45
Lactantes	= 18	7	10	45
	19 – 50	6,5	9	45

* AI: ingestão adequada

EAR: necessidade média estimada

RDA: ingestão dietética recomendada

UL: limite superior tolerável de ingestão

Fonte: IOM (2001)

No Brasil a ingestão de Fe nas dietas é limítrofe em relação às recomendações, somada à biodisponibilidade, que é baixa, devido à presença de fatores inibidores. As dietas de indivíduos de baixa renda são ainda as mais prejudicadas pela pouca ingestão de carnes. Estudos realizados com dietas brasileiras apontam a ingestão de Fe variando cerca de 6,0 a 12,0 mg d⁻¹ e a biodisponibilidade ao redor de 5 % em dietas mistas (COZZOLINO, 2007). Desse modo a recomendação do enriquecimento de alimentos seria medida eficaz a médio e a longo prazo para suprir a carência de Fe em níveis adequados, garantindo o bom estado nutricional.

Diante do exposto, o enriquecimento de cogumelos se faz uma ferramenta útil para que a partir de sua ingestão possa ser suprida a necessidade de Fe no organismo.

2.2.2. Zinco

O Zn é considerado um dos mais importantes micronutrientes inorgânicos, visto que 4 e 10 % do genoma de procariotos e eucariotos, respectivamente codifica para Zn-proteínas, inferindo uma vasta função biológica (ANDREINI et al., 2006; TUBEK, 2007; MARET, 2009). É componente essencial para atividade de mais de 300 enzimas e estabilizador de estruturas moleculares de constituintes citoplasmáticos estabelecendo-se como fator de regulação de suas funções (MCCALL et al., 2000). O Zn faz parte da estrutura de ácidos nucleicos como também de seu metabolismo (VALLEE e FALCHUK, 1993). O Zn participa da síntese e da degradação de carboidratos, lipídios e proteínas e também desempenha função primordial na transcrição, consequentemente, na regulação da expressão gênica, além de possuir propriedades antioxidantes (POWELL, 2000). As enzimas contendo Zn que participam da síntese ou da degradação de ácidos nucleicos expressam o efeito dessa deficiência no crescimento e no reparo celular (MACDONALD, 2000). O corpo humano contém de 1,4 a 2,3 g de Zn, sendo a maior parte presente na pele, unhas, cabelos, ossos, dentes, músculos esqueléticos, fígado, próstata, testículos, olhos e áreas do cérebro, próximas ao hipocampo com altas concentrações de Zn (TUBEK, 2007). No sangue, cerca de 80 % do Zn estão presentes no eritrócito, e 16 % no plasma, ligados principalmente a albumina (COZZOLINO, 2007).

Devido as baixas quantidades de Zn e a importância deste metal para o funcionamento das enzimas, sua concentração no corpo humano é fortemente regulada pelos transportadores de Zn e proteínas, como as metalotioneínas (MT), que são capazes tanto de se ligarem fortemente ao Zn como liberar o metal dependendo do potencial redox (OVERBECK et al., 2008). Distúrbios da homeostase do Zn parecem estar associados com várias doenças como o diabetes, cirrose do fígado, formação de tumores, doenças intestinais e comprometimento do sistema imunológico (MCCLAIN et al., 1980; SCHOLMERICH et al., 1983; COSTELLO et al., 2004; RINK e HAASE, 2007; JANSEN et al., 2009). O Zn tem demonstrado ser necessário para o funcionamento do sistema imune principalmente no desenvolvimento de células T (RINK e KIRCHNER, 2000).

A deficiência de Zn em seres humanos é reconhecida como um problema de saúde pública de proporções globais (BHUTTA et al., 1999). Estudos em diversos países mostram uma ocorrência elevada da deficiência da ingestão dietética de Zn (GIBSON e FERGUSON, 1998). Estima-se que 82 % das gestantes em todo mundo apresentem uma ingestão deficiente desse elemento (SALGUEIRO et al., 2002). A suplementação com Zn em crianças deficientes tem sido eficaz na redução da mortalidade e na melhoria do crescimento e desenvolvimento (BHUTTA et al., 2000; JONES et al., 2003). A ingestão dietética recomendada de Zn é de 8 mg d⁻¹ para mulheres e 11 mg d⁻¹ para homens (Quadro 2).

Quadro 2. Recomendações nutricionais de zinco nos estágios da vida

Grupo	Idade (anos)	Zn (mg dia ⁻¹)		
		EAR	RDA	UL
Lactentes	0 – 0,6	-	2*	4
	0,7 – 1,0	2,2	3	5
Crianças	1 – 3	2,2	3	7
	4 – 8	4	5	12
	9 – 13	7	8	23
Homens	14 – 18	8,5	11	34
	19 – 30	9,4	11	40
	31 – 50	9,4	11	40
	51 – 70	9,4	11	40
	> 70	9,4	11	40
Mulheres	14 – 18	7,3	9	34
	19 – 30	6,8	8	40
	31 – 50	6,8	8	40
	51 – 70	6,8	8	40
	> 70	6,8	8	40
Gestantes	= 18	10,5	13	34
	19 – 30	9,5	11	40
	31 – 50	9,5	11	40
Lactantes	= 18	11,6	14	34
	19 – 30	10,4	12	40
	31 – 50	10,4	12	40

* IA: ingestão adequada

EAR: necessidade média estimada

RDA: ingestão dietética recomendada

UL: limite superior tolerável de ingestão

Fonte: IOM (2001)

As principais fontes alimentares para o Zn são ostras, peixes do mar, carnes bovina e de frango, sementes de girassol e de abóbora (moranga), farelo de trigo, alguns fungos comestíveis, fígado, gema de ovo, cebola e alho (VALLE e FALCHUK, 1993; TUBEK, 2007). Ainda que a ingestão seja adequada, poderá ocorrer deficiência, se a biodisponibilidade do Zn na dieta for muito baixa (LONNERDAL, 2000).

A biodisponibilidade do Zn pode ser comprometida devido ao alto teor de antinutrientes que limitam a utilização de seu potencial nutritivo (KHOKHAR e CHAUHAN, 1986; RAMÍREZ-CÁRDENAS et al., 2008). Os polifenóis, fitatos e alguns dos produtos da degradação do fitato são reconhecidos como antinutrientes de vários minerais essenciais da dieta, principalmente do Fe não-heme e do Zn (MARTINEZ-VALVERDE et al., 2000; SANDBERG, 2002). O conteúdo de fibras também pode interferir negativamente na absorção de minerais, embora este efeito possa ser devido ao teor de fitato e de polifenóis associados às fibras (GEIL e ANDERSON, 1994). A presença desses antinutrientes parece ser uma das razões da limitação de Zn em dietas nas quais o feijão é consumido como um alimento básico (WELCH et al., 2000).

Os aminoácidos histidina e metionina, os ácidos orgânicos e os quelantes como o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) parecem favorecer a biodisponibilidade do Zn, enquanto alguns minerais como Cu, Fe e Ca podem diminuir a biodisponibilidade em algumas circunstâncias (LONNERDAL, 2000). A biodisponibilidade do Zn em alimentos é mais crítica para alguns grupos da população, cuja ingestão é insuficiente para atingir as doses recomendadas, portanto a presença dos fatores que reduzem a sua absorção contribui para a deficiência (HOUSE et al., 2002).

Suprir a ingestão de Zn por meio de melhorias na dieta é uma tarefa complexa que exige tempo e esforços consideráveis (RUEL e BOUIS, 1998). Promover o uso de suplementos e fortificar alimentos, especialmente os mais consumidos por crianças pequenas, parece eficaz, no entanto as políticas globais para corrigir essas deficiências são poucas (GIBSON et al., 1998). O fornecimento de alimentos com alto teor de Zn absorvível é uma alternativa sustentável para solucionar este problema.

2.2.3. Lítio

O Li tem sido utilizado na medicina há mais de 50 anos, particularmente na área da psiquiatria, possui importantes efeitos terapêuticos no tratamento de várias doenças neurais, sendo efetivo no tratamento de pacientes que sofrem de transtorno bipolar (psicose maníaco depressivo) (SUBHASH et al., 1999). É importante considerar que novos campos de ação têm sido descobertos como resultado do esforço do uso do Li no tratamento de doenças da tireóide, doenças neurodegenerativas, no uso como droga tópica em dermatologia, como adjuvantes de antidepressivos (RODRIGUEZ-GIL et al., 1993; HU et al., 1997; ALVAREZ et al., 1999; KOONG et al., 1999; MANJI et al., 1999).

A quantidade de Li no corpo humano é de aproximadamente 7 mg, sendo ingerido principalmente na forma de sais solúveis e absorvido no intestino delgado através de canais de sódio e excretado primariamente pelos rins aproximadamente depois de 24 horas (SCHRAUZER, 2002). Estudos de autópsia com tecidos adultos revelaram que o cerebelo seguido pelo cérebro e rins contém mais Li do que outros órgãos. As concentrações de Li nos órgãos mostraram algumas diferenças entre os gêneros, com mulheres exibindo de 10 % a 20 % mais Li no cerebelo, cérebro, rins e coração, e 13 % a menos no pâncreas, em relação aos homens, sendo que a concentração de Li no fígado, pulmões, costela e tireóide foram aproximadamente as mesmas para os dois sexos (SCHRAUZER, 2002).

As principais fontes alimentares de Li são grãos e legumes, que podem contribuir com 66 % a 90 % do consumo total, sendo o restante derivado de alimentos de origem animal (WEINER, 1991). Em geral, dietas ricas em grãos e vegetais podem fornecer mais Li que as dietas derivadas de proteína animal (SCHRAUZER, 2002). No entanto, devido à distribuição desigual do Li na crosta da terra, uma dieta predominantemente vegetariana não é, necessariamente, rica em Li e seu consumo estimado na dieta em populações de diferentes países variam significativamente (SCHRAUZER et al., 1992). A água e bebidas podem contribuir substancialmente para o total de Li absorvido, em algumas regiões do Texas, por exemplo, os níveis de Li na água para consumo pode chegar a $170 \mu\text{g L}^{-1}$, adicionando cerca de $340 \mu\text{g}$ de Li na ingestão diária. Nestas regiões, excreções urinárias de Li dos moradores locais

variam inversamente com a pluviosidade, refletindo uma diluição da concentração de Li na água de abastecimento (DAWSON, 1991).

De acordo com Schrauzer (2002), a média de consumo de Li em um adulto de 70 kg (americano) cujas principais fontes alimentares são grãos, vegetais e carnes está entre 0,65 e 3,1 mg d⁻¹. Baseado em dados de diferentes países, uma possível recomendação seria a ingestão de 1 mg d⁻¹ para um fornecimento adequado, correspondendo a 14,3 µg de Li por kg de peso corporal (SCHRAUZER, 2002). Pessoas com dietas especiais ou populações residindo em áreas com baixa concentração de Li requerem suplementação ou outras medidas para receber a quantidade adequada do metal (ARAL e VECCHIO-SADUS, 2008).

No ser humano nenhum sintoma da deficiência de Li tem sido observado, o que existe é uma manifestação sobre o comportamento sem alterações fisiológicas (SCHRAUZER, 2002). Evidências ligando o baixo consumo de Li a alterações do comportamento e agressividade em humanos foram relatadas por Dawson, (1991), onde observou níveis significativos de associação inversa da concentração de Li na urina e na água de beber em relação as internações de doentes mentais para psicose, neurose e distúrbios de personalidade.

Pesquisas sugerem mecanismos pelos quais o Li pode agir para promover os efeitos estabilizadores do humor (JOPE, 1999; JOPE, 2003; GHASEMI et al., 2009). Segundo um desses mecanismos, íons de Li desativam a atividade da enzima glicogênio sintase quinase 3β (GSK-3β), uma enzima que tem sido implicada na patofisiologia de numerosas desordens psiquiátricas (GOULD et al., 2008). A diminuição do neurotransmissor serotonina está associada com agressão em roedores e parece favorecer a atividade da GSK-3β, assim é possível que o Li diminua a agressão por inibir a atividade da GSK-3β (JOPE, 2003). A regulação da GSK-3β pelo Li pode afetar o relógio circadiano, quando GSK-3β é ativada, a proteína Bmal1 é incapaz de redefinir o “relógio mestre” dentro do cérebro, como resultado o ciclo natural do corpo é interrompido. Quando o ciclo é interrompido, os horários de rotina de muitas funções (Metabolismo, sono, temperatura corporal), são perturbados (MCCLUNG, 2007). O Li pode, assim, restabelecer a normalidade da função cerebral em algumas pessoas.

Nesse contexto, a introdução de fontes alimentares enriquecidas com microelementos como o Fe, Zn e Li à dieta pode representar uma forma de

minimizar os danos causados pelas deficiências de nutrientes na saúde humana (BOCCIO e IYENGAR, 2002; TUBEK, 2007; ARAL e VECCHIO-SADUS, 2008). Nessa perspectiva, o enriquecimento de cogumelos de *P. ostreatus* poderá ser uma fonte promissora desses minerais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia/Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

3.1. Micro-organismos e condições de cultivo

Foi utilizado o isolado de *P. ostreatus* Plo 02, pertencente à coleção de fungos do Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia da UFV. Este isolado é mantido armazenado em tubos contendo o meio de cultura ágar batata dextrose (BDA, Merck®), a 4 °C, e é reativado semestralmente.

Para reativação da cultura, amostra do micélio de *P. ostreatus*, Plo 02, foi transferida para o centro de uma placa de Petri contendo BDA e incubado a 25 °C. Depois de sete dias de crescimento, o fungo foi utilizado para produção de inóculo em substrato à base de grãos de arroz. Os grãos de arroz foram cozidos e, posteriormente, autoclavados a 121 °C por 90 min antes de serem inoculados. As sementes foram utilizadas após a completa colonização dos grãos de arroz pelo fungo inoculado.

3.2. Enriquecimento de cogumelos com Fe, Zn e Li

O substrato utilizado foi casca de café, fervido por 2 h, centrifugado por 5 min a 1500 g. Amostras de 1,5 kg foram colocadas em sacos de polipropileno e autoclavadas por 90 min a 121 °C. Após o resfriamento, cada pacote contendo o substrato foi acrescido de 25 mL de uma solução aquosa previamente autoclavada, contendo diferentes concentrações de sulfato ferroso (FeSO₄, Hoechst®) (0; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 ou 2,0 mg kg⁻¹); carbonato de zinco (ZnCO₃, Vetec®) (0; 0,53; 1,07; 2,13; 4,27 ou 8,53 mg kg⁻¹); ou cloreto de lítio (LiCl, Sigma®) (0; 62,25; 125; 250; 500 ou 1000 mg kg⁻¹). Para a definição dessas concentrações foram feitos cultivos preliminares *in vitro* do micélio do fungo em placas contendo meio de cultura BDA, acrescidos de concentrações teste de soluções contendo FeSO₄, ZnCO₃ ou LiCl, e a partir da concentração mínima inibitória do crescimento micelial foram feitos os cálculos para as concentrações inferiores. Após a definição das concentrações e sua adição ao substrato, estes foram inoculados com 100 g da semente do isolado Plo 02, e incubados a 25 °C por 15 dias. Foram feitos três pacotes para cada concentração. Logo após o período de incubação, os pacotes foram transferidos para uma sala de frutificação com temperatura média de 20 °C e umidade do ar de 90 %.

Foram realizadas três colheitas de cogumelos em intervalos de 11 a 30 dias. Após cada colheita foi determinada a massa fresca dos cogumelos para avaliação da eficiência biológica (EB) pela seguinte fórmula:

$$EB = (\text{massa fresca dos cogumelos} / \text{massa seca do substrato}) \times 100$$

Posteriormente, os cogumelos colhidos foram desidratados em estufa a 45 °C até peso constante para determinação da massa seca e moídos em moinho de facas (General Eletric MOD.SXBG00G) e passados em peneira de 2 mm para determinação da acessibilidade, teores de proteínas e minerais.

3.3. Quantificação do teor de minerais em cogumelos

Para determinação dos teores dos minerais: Fe, Zn, Li, K, P, Ca, Pb, S, cromo (Cr), magnésio (Mg), manganês (Mn), alumínio (Al), cobre (Cu), cádmio (Cd) e níquel (Ni) contidos nos cogumelos, utilizou-se a metodologia de digestão em solução nitroperclórica (TEDESCO et al., 1995). Amostras de 100 mg do cogumelo seco e triturado foram colocadas em tubo digestor, onde foram adicionados 10 mL de solução nitroperclórica na relação 3 ácido nítrico (HNO_3 65 %, P. A., Vetec®) :1 ácido perclórico (HClO_4 72 %, P.A. Vetec®). Em seguida, o tubo foi inserido no bloco digestor, sendo aquecido gradualmente para evitar e, ou reduzir a formação de espuma na mistura contida no tubo, até que a temperatura atingisse 200 °C. A temperatura foi mantida até que se obtivesse fumos brancos de HClO_4 e que o extrato se apresentasse incolor (cerca de 2 h), obtendo-se um volume final de cerca de 2 mL. Seguindo-se ao resfriamento a aproximadamente 35 °C, o conteúdo dos tubos foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL, sendo o volume do balão completado com água (Milli-Q Millipore 18.2 MO cm^{-1}).

Foram preparadas curvas padrão, com 6 concentrações conhecidas, para cada um dos seguintes minerais: Cr, Ni, Pb, Cd, Cu, Al, Mg, Mn, Ca, K, P, S. As concentrações das soluções padrões foram 0; 1; 2,5; 5; 10 ou 20 mg L^{-1} para S e Mn; 0; 1; 2; 3; 4 ou 5 mg L^{-1} para Cr, Pb, Cu e Ni; 0; 2,5; 5; 10; 20 ou 30 mg L^{-1} para Ca; 0; 5; 10; 20; 40 ou 80 mg L^{-1} para P; 0; 10; 25; 50; 100 ou 200 mg L^{-1} para K e Al; 0; 1; 2,5; 3; ou 5 mg L^{-1} para Mg; 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 mg L^{-1} para Cd.

As leituras para todos os minerais exceto Fe, Zn e Li e a calibração da curva padrão, foram realizadas no aparelho de espectrometria de emissão em plasma (Perkin Elmer, M Optima 3300 DV, Espectrômetro de emissão óptica em plasma induzido), que fornece os valores da solução mineral em mg L^{-1} , conforme Cambraia e Oliveira (2002). O método baseia-se na medição da intensidade de emissão produzida pelos elementos químicos presentes na amostra quando eles atingem o plasma de argônio, constituído por um gás parcialmente ionizado (no caso do argônio, menos de 1 % fica ionizado no plasma) produzido por uma fonte de radiofrequência de 1 a 2,5 kW de energia a 27,14 MHz e pode alcançar temperaturas entre 9000 e 10000 °K.

Para análise dos teores de Fe, Zn e Li foram preparadas três curvas padrão nas seguintes concentrações para Fe, 0; 0,05; 0,15; 0,25; 0,4; 0,6 ou 0,8 mg L⁻¹; Zn, 0; 0,1; 0,4; 1,0; 3,0 ou 5,0 mg L⁻¹; ou Li, 0; 0,09; 0,36; 0,72; 1,44; 1,8; 2,88; 3,6 ou 9 mg L⁻¹. As leituras de Fe e Zn foram realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica Perkin-Elmer, M 1100B Atomic Absorption Spectrometer versão 6.1 (AAS) e a leitura de Li foi realizada em fotômetro de chama (Flame photometer, M. Corning). O princípio fundamental da absorção atômica envolve a medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética, proveniente de uma fonte de luz, por átomos gasosos no estado fundamental. A técnica utiliza esse fenômeno para a determinação quantitativa de elementos (metais e alguns não metais) em uma ampla variedade de amostras (águas, materiais biológicos, clínicos, ambientais, alimentos, geológicos, etc) (WELZ, 1985).

A fotometria de chama é uma técnica de medida da concentração de um determinado produto químico, alcalino e alcalino terroso, quando este é introduzido em uma chama na forma de aerossol. A chama é uma forma de excitação dos átomos os quais produzem espectros característicos através do aparecimento de bandas oriundas da excitação de óxidos.

O percentual de cada mineral nas amostras foi calculado conforme as seguintes fórmulas:

$$[M]_{\text{solução mineral}} = [M] \times \text{FC onde,}$$

$$[M] = \text{concentração do mineral em mg L}^{-1}$$

$$\text{FC} = \text{fator de diluição}$$

$$[M]_{\text{ASA}} = \frac{[M] \times 25}{\text{ASA}}$$

$$\text{ASA}$$

$$\text{ASA} = \text{peso seco da amostra}$$

3.4. Avaliação do teor de proteínas em cogumelos

O teor de proteína foi determinado pelo método semimicro-Kjeldahl (AOAC, 1996). Pesou-se aproximadamente 300 mg da amostra seca em papel livre de nitrogênio (N) (papel manteiga), recortados em pedaços de 7 x 7 cm, sendo o papel dobrado de modo que a amostra ficasse em seu interior. O papel

com a amostra foi colocado em tubo de digestão e em seguida adicionou-se 10 mL da mistura digestora [10 g de Se + 10 g de sulfato de cobre (CuSO_4)] + 1 L de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 , Vetec[®]). O tubo foi colocado no bloco digestor instalado em capela de exaustão de gases, onde se iniciou o aquecimento a 100 °C, aumentando-se a temperatura gradualmente até 350 °C. A partir de então, a temperatura foi mantida até que a mistura no tubo se tornasse amarelo transparente (cerca de 1 h). Retirado o tubo do bloco para resfriar a temperatura ambiente, foi acrescido de 1 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , Vetec[®]) 30 % (m/v). Retornou-se com o tubo para o bloco, sendo a mistura levada ao aquecimento máximo por mais 1 h, obtendo-se ao final da digestão uma mistura com coloração verde cristalina. Após o resfriamento dos tubos, adicionou-se 10 mL de água destilada e realizou-se a transferência dos mesmos para o destilador de Kjeldahl, acoplado-se à saída do condensador um frasco erlenmeyer de 250 mL, contendo 25 mL de ácido bórico (H_3BO_3) 4 % (m/v) adicionado de indicador misto de Tashiro para recolher o destilado.

Adicionou-se 25 mL de hidróxido de sódio (NaOH , Vetec[®]) 40 % (m/v) no tubo de digestão já adaptado ao destilador e em seguida iniciou-se a destilação, até que o volume do frasco erlenmeyer atingisse 150 mL (25 mL de H_3BO_3 , adicionado do indicador e 125 mL do destilado). Retirou-se o frasco erlenmeyer, sendo o destilado titulado com ácido clorídrico (HCl 37% P. A., Vetec[®]) 0,05 N padronizado.

O percentual de proteína foi calculado conforme a seguinte fórmula:

$$\% \text{ PT} = \frac{(\text{VA} \times \text{N} \times \text{f} \times 1,4)}{\text{P}} \times \text{FCN} \quad \text{onde,}$$

% PT= porcentagem de proteínas totais

VA= volume em mL de HCl gastos na titulação da amostra

N= normalidade do HCl

f= fator de correção da normalidade do HCl

P= peso (em g) da amostra

FCN= fator de correção de nitrogênio para proteína (6,25)

3.5. Avaliação da acessibilidade de Fe, Zn e Li por meio da solubilidade e digestibilidade *in vitro* de cogumelos de *P. ostreatus*

Para avaliar a acessibilidade dos minerais foi utilizada duas metodologias, a extração sequencial e a digestibilidade *in vitro*. Amostras dos cogumelos enriquecidos com FeSO_4 da segunda colheita nas concentrações de 0 e 2 mg kg^{-1} ; ZnCO_3 da segunda colheita nas concentrações de 0 e $8,53 \text{ mg kg}^{-1}$; e LiCl da primeira colheita nas concentrações de 0 e 500 mg kg^{-1} foram avaliadas em comparação a três suplementos minerais comerciais: suplemento contendo FeSO_4 (equivalente a 200 mg de Fe elementar g^{-1} do comprimido, conforme informação do fabricante); suplemento mineral à base de óxido de zinco (ZnO) (equivalente a $26,55 \text{ mg}$ de Zn g^{-1} do comprimido, conforme informação do fabricante); e suplemento mineral contendo carbonato de lítio (Li_2CO_3) (equivalente a $140,9 \text{ mg}$ de Li g^{-1} do comprimido, conforme informação do fabricante).

3.5.1. Grau de solubilidade por extração sequencial

Para o primeiro ensaio, utilizou-se o processo de extração sequencial para avaliar o grau de solubilidade, descrito por Ramos et al. (1994) e modificado por Ma e Rao (1997). Amostras de 1 g do cogumelo seco triturado ou do suplemento mineral triturado foram processadas conforme descrito a seguir:

- (a) Adição de 10 mL de água destilada por 2 h para determinação da fração solúvel em água;
- (b) Adição de 10 mL de cloreto de magnésio (MgCl_2 , Merck®) 1 mol L^{-1} , pH 7, por 2 h para determinação da fração trocável;
- (c) Adição de 10 mL acetato de sódio (NaCH_3COO , Merck®) 1 mol L^{-1} , pH 5, por 2 h para determinação da fração solúvel em ácido;
- (d) 10 mL de hidrocloreto de hidroxilamina (ClH_4NO , Vetec®) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido acético glacial (CH_3COOH , Quimex®) 25% (1:1 v/v) por 2 h para determinação da fração reduzida;
- (e) 10 mL de ácido nítrico (HNO_3 , Vetec®) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e H_2O_2 30% (1:1 v/v) a 70°C por 16 h (fração ligada organicamente);

(f) 10 mL de HNO_3 concentrado e H_2O_2 30 % por 2 h (fração residual).

Após cada extração sucessiva, foi feita a separação do sobrenadante por centrifugação a 1500 g por 10 min, e, em seguida, conduzida a análise do Fe, Zn e Li solubilizado por AAS. O sedimento obtido após cada extração foi ressuspenso e submetido a uma nova extração para coleta do sobrenadante até a obtenção das 6 frações.

Para leitura do Fe, Zn e Li foram efetuadas soluções de concentrações conhecidas para curva padrão com 9 pontos cada uma e cujas concentrações foram 0; 100; 200; 300; 500; 700; 1000; 2000 ou 3000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Fe; 0; 100; 500; 1000; 2000; 4000; 8000; 12000 ou 16000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Zn; e 0; 0,09; 0,36; 0,72; 1,44; 1,8; 2,88; 3,6 ou 9 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Li.

3.5.2. Digestibilidade *in vitro*

No segundo ensaio foi simulada, *in vitro*, a digestão gastrointestinal, com o propósito de prever a acessibilidade dos minerais no trato digestório, segundo metodologias descritas por GLAHN et al. (1998) e modificado por ELLESS e colaboradores (2000). Para isso foram utilizadas amostras em triplicata de 250 mg do cogumelo seco triturado ou do suplemento mineral triturado na seguinte sequência:

a) Digestão gástrica - 15 mL de água destilada foram adicionados a cada amostra. A mistura foi homogeneizada. O pH ajustado para 2 com HCl 5 mol L^{-1} e em seguida foi adicionado 0,75 mL de solução de pepsina (Vetec[®]) (1,0 g de pepsina dissolvida em 50 mL de HCl 0,1 mol L^{-1}). A incubação foi feita em shaker a 37 °C com agitação de 190 a 200 rpm, por 1 h.

b) Digestão intestinal - As amostras parcialmente digeridas tiveram o pH ajustado para 6 com bicarbonato de sódio (NaHCO_3 , Quimex[®]) 1 mol L^{-1} , e em seguida foram acrescidas de 3,75 mL de extrato biliar contendo a enzima pancreatina (Vetec[®]) (0,30 g do extrato biliar em 35 mL de NaHCO_3 0,1 mol L^{-1} com 0,05 g de pancreatina). O pH foi ajustado para 7 com NaOH 1 mol L^{-1} . Ao final foi efetuada a adição de 5 mL de cloreto de sódio (NaCl) 120 mmol L^{-1} e cloreto de potássio (KCl) 5 mmol L^{-1} . As amostras foram incubadas a 37 °C sob agitação de 190 a 200 rpm por 1 h. Após a digestão, as amostras foram

centrifugadas a 1500 g por 10 min e depois filtradas para obtenção dos extratos solúveis que foram analisados por AAS.

3.6. Delineamento experimental e análise estatística

Foi utilizado esquema fatorial disposto no Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com seis níveis de concentração de FeSO_4 , ZnCO_3 ou LiCl , três níveis de tempo para frutificação, três repetições para as variáveis de eficiência biológica (EB), proteína (PTN) e de acumulação do Fe, Zn, Li, K, P, Ca, Ni, Pb, S, Mn, Cd, Cu, Al, Cr e Mg. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) e de regressão ao nível de 5 % de significância, utilizando-se o programa estatístico SAS versão 9.1 licenciado para Universidade Federal de Viçosa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Eficiência biológica de cogumelos de *P. ostreatus* cultivados em substrato casca de café enriquecido com Fe, Zn e Li

A adição de FeSO_4 , ZnCO_3 e LiCl na casca de café não influenciou o crescimento micelial e a eficiência biológica (EB) de *P. ostreatus* ($P > 0,05$). A EB da produção de cogumelos de *P. ostreatus* foi somente afetada pela ordem das colheitas ($P < 0,05$), ocorrendo maior EB sempre na primeira colheita, diminuindo com o número de colheitas (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios $\pm$ desvio padrão da eficiência biológica (EB) dos cogumelos de *Pleurotus ostreatus* enriquecidos ou não com diferentes concentrações de FeSO_4 , ZnCO_3 e LiCl em três colheitas subsequentes.

Colheita	EB (%)		
	FeSO_4	ZnCO_3	LiCl
1°	20,763 $\pm$ 3,81 a	27,145 $\pm$ 4,92 a	21,539 $\pm$ 4,06 a
2°	11,482 $\pm$ 2,96 b	10,653 $\pm$ 3,84 b	13,071 $\pm$ 3,67 b
3°	6,511 $\pm$ 2,54 c	5,847 $\pm$ 3,29 c	5,57 $\pm$ 1,98 c

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

O fato da EB não ter sido reduzida pela adição das concentrações de FeSO_4 , ZnCO_3 e LiCl pode indicar, resistência ou tolerância do fungo testado a esses metais, o que está de acordo com vários trabalhos (CHANDER et al., 2001; KHAN e SCULLION, 2002); ou que a quantidade adicionada não foi

inibitória ou não causa efeito tóxico (TUZEN, 2003). Além desses fatores, o Fe e Zn são metais essenciais para o crescimento e metabolismo de fungos (GADD, 2007).

A terceira colheita que ocorreu após um período de 55 a 75, 61 a 69 e 61 a 73 dias após o enriquecimento ou não com diferentes concentrações de FeSO_4 , ZnCO_3 e LiCl respectivamente, foi muito baixa em relação as duas primeiras colheitas (Tabela 1 e 2). A redução da EB ao longo das três colheitas parece ser um comportamento normal dessa espécie de fungo, pois a mesma tendência também foi verificada por Silva (2009), ao enriquecer cogumelos de *P. ostreatus* com diferentes concentrações de selenito de sódio. Muitas vezes a terceira colheita é considerada muito pequena, sugerindo-se que o cultivo seja finalizado após a segunda colheita (SILVA, 2009).

Tabela 2. Tempo médio de incubação em dias (d) da produção de cogumelos de *Pleurotus ostreatus*, em substrato casca de café enriquecido ou não com diferentes concentrações de FeSO_4 , ZnCO_3 e LiCl em três colheitas subsequentes.

Doses (mg kg ⁻¹)	Colheitas		
	1° (d)	2° (d)	3° (d)
FeSO₄			
0	25	41	64
0,4	24	44	74
0,6	26	44	75
0,8	24	35	62
1	22	39	61
2	22	34	55
ZnCO₃			
0	25	41	64
0,53	29	45	68
1,07	29	42	67
2,13	29	42	64
4,27	31	44	61
8,53	30	48	69
LiCl			
0	25	41	64
62,25	29	41	61
125	28	45	71
250	28	45	73
500	31	43	73
1000	59	Nd	Nd

4.2. Acumulação de Fe, Zn e Li nos cogumelos de *P. ostreatus*

A acumulação de Fe foi afetada tanto pela dose de FeSO_4 adicionada ao substrato casca de café quanto pela ordem das colheitas ($P < 0,05$), sem ocorrer interação entre esses dois fatores ($P > 0,05$). Na Figura 1 aparece as variações do teor de Fe em função da adição de FeSO_4 ao substrato.

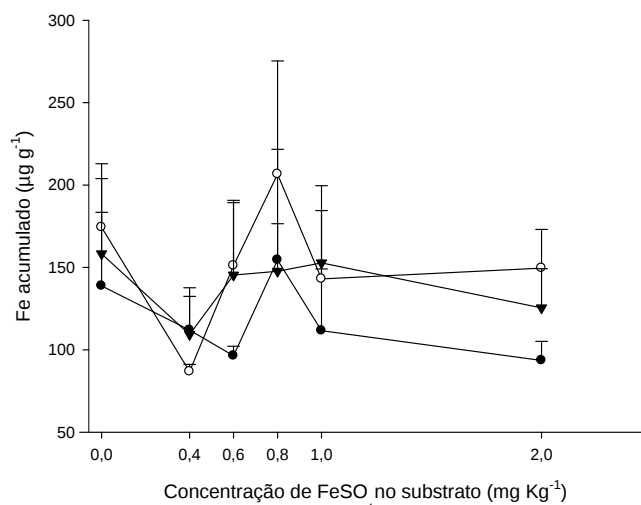


Figura 1. Variação da concentração de ferro na massa seca dos cogumelos de *Pleurotus ostreatus* em três colheitas subsequentes (—●— 1ª colheita; —○— 2ª colheita; —▼— 3ª colheita) produzidos em substrato de casca de café enriquecido ou não com sulfato ferroso (FeSO_4).

Não foi observada uma tendência na acumulação do Fe. Um dos pontos importantes a considerar, é a alta concentração de Fe que o substrato casca de café utilizado possuía (Tabela 3). A dose máxima de FeSO_4 adicionada em contrapartida, foi de 2 mg kg^{-1} correspondente a 0,007% da concentração do substrato, representando uma adição de Fe bastante baixa.

Tyler (1982) verificou que concentrações de Fe são baixas em cogumelos em relação a sua presença no substrato.

Tabela 3. Teor de minerais na massa seca do substrato casca de café.

Minerais	[] no substrato (mg g ⁻¹)
K	3,587
P	0,092
S	0,569
Mg	0,850
Mn	0,020
Ca	4,314
Fe	1,417
Zn	0,033
Li	0,094

A acumulação de Zn foi afetada tanto pela dose de ZnCO₃ adicionada ao substrato quanto pela ordem das colheitas ($P < 0,05$), sem ocorrer interação entre esses dois fatores ($P > 0,05$) (Figura 2).

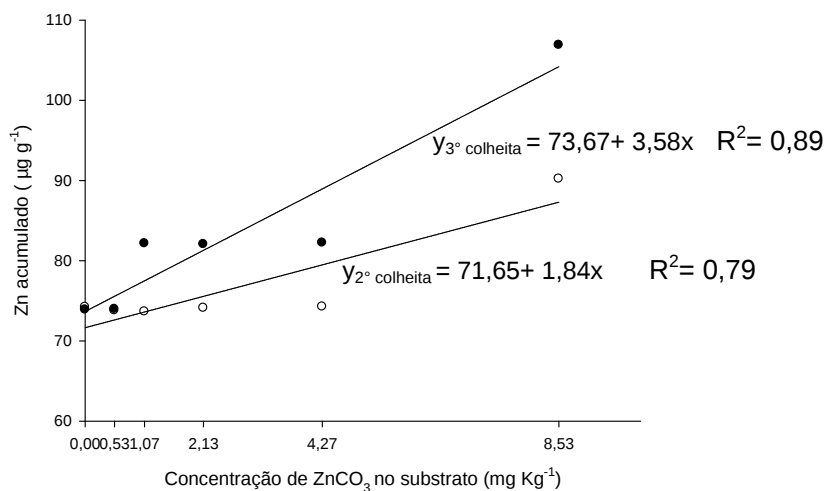


Figura 2. Variação da concentração de zinco na massa seca dos cogumelos de *Pleurotus ostreatus* em duas colheitas subsequentes (—○— 2° colheita; —●— 3° colheita), produzidos em substrato de casca de café enriquecido ou não com carbonato de zinco (ZnCO₃).

Observou-se aumento significativo na acumulação de Zn, proporcional à concentração de ZnCO₃ adicionada ao substrato casca de café nas segunda e terceira colheitas, o mesmo perfil de acumulação não foi verificado na primeira colheita, que apresentou teores médios de 74,21 (±0,40); 65,71 (±14,5); 74,50 (±0,19); 82,46 (±14,84); 57,67 (±14,43); 66,11 (±14,25) µg g⁻¹, para as concentrações no substrato de 0; 0,53; 1,07; 2,13; 4,27 e 8,53 mg kg⁻¹, respectivamente. Alta capacidade de absorção de Zn também foi observada por Rabinovich e colaboradores (2007), quando enriqueceram micélio de *A.*

blazei com diferentes concentrações de sulfato de zinco (ZnSO_4), verificando aumentos nas concentrações de Zn no micélio à medida que se aumentava a concentração de ZnSO_4 adicionado ao meio de enriquecimento.

A acumulação do Li foi afetada pela concentração de LiCl adicionado ao substrato casca de café ($P < 0,05$), mas não foi observado efeito das ordens entre as colheitas, nem interação entre esses dois fatores ($P > 0,05$) (Figura 3).

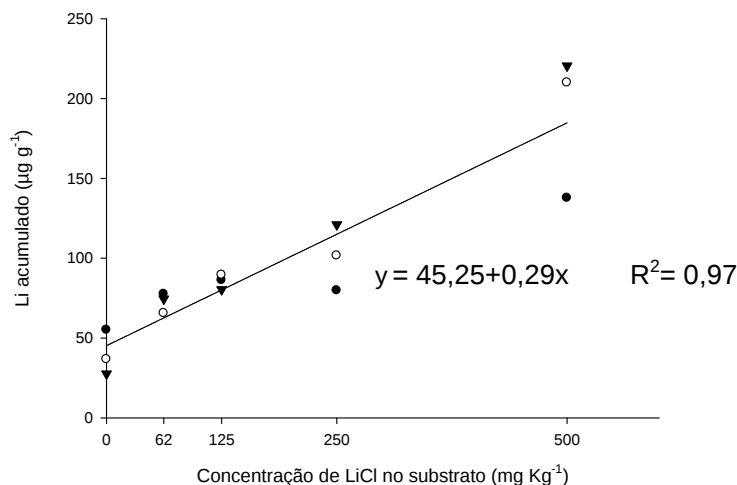


Figura 3. Variação da concentração de lítio na massa seca dos cogumelos de *Pleurotus ostreatus* em três colheitas subsequentes (● 1ª colheita; ○ 2ª colheita; ▼ 3ª colheita) produzidos em substrato de casca de café enriquecido ou não com de cloreto de lítio (LiCl).

O Li adicionado ao substrato foi eficientemente acumulado pelo cogumelo verificando-se um aumento significativo na acumulação ($P < 0,05$), proporcional à concentração de LiCl adicionada ao substrato. A adição de 62,25 e 500 mg kg⁻¹ de LiCl resultou na produção de cogumelos com conteúdo de Li na massa seca de 72,53 e 189,38 µg g⁻¹ respectivamente; um aumento de 2 e 5 vezes maior que a observada no cogumelo não enriquecido (39,77 µg g⁻¹). Não foi observada inibição da absorção em nenhum dos tratamentos.

Vetter (2005), verificou que amostras de cogumelos de diferentes grupos nutricionais coletadas de uma determinada região da Hungria (MT. Vértres), apresentaram o conteúdo de Li significativamente maior, em média 0,38 mg L⁻¹ que cogumelos originados de outras localidades (0,167 mg L⁻¹), sugerindo que as concentrações do metal no habitat influenciavam a absorção, apesar disso não se verificou o caráter acumulador desse metal nos cogumelos analisados, dentre eles *P. ostreatus*.

4.3. Teor de minerais e de proteínas nos cogumelos

Não foram observadas a presença de Al, Cu, Mn, Cr, Pb, Ni e Cd (abaixo do limite de detecção) nos cogumelos enriquecidos com FeSO_4 , ZnCO_3 e LiCl.

4.3.1. Teor de minerais e proteínas nos cogumelos de *P. ostreatus* enriquecidos ou não com FeSO_4

As concentrações de S, Ca, Mg foram afetadas pela dose de FeSO_4 adicionada ao substrato casca de café ($P < 0,05$) e não variaram entre as colheitas ($P > 0,05$). Na figura 4 aparece as variações do teor desses minerais em função da adição de diferentes concentrações de FeSO_4 .

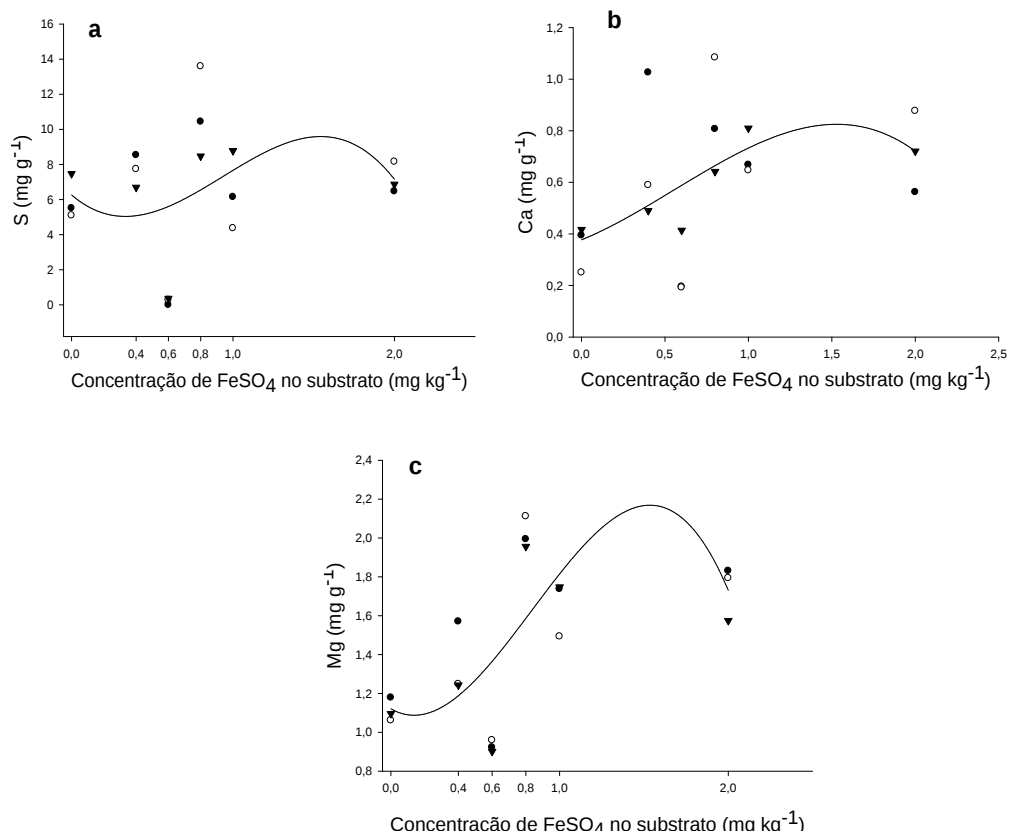


Figura 4. Variação da concentração de a) enxofre (S), b) cálcio (Ca) e c) magnésio (Mg) nos cogumelos de *Pleurotus ostreatus* enriquecidos ou não com sulfato ferroso (FeSO_4) em três colheitas subsequentes (●1ª colheita; ○2ª colheita; ▼3ª colheita).

Dos minerais avaliados apenas as concentrações de Zn e Li nos cogumelos não variaram com as doses de FeSO_4 adicionadas ao substrato

casca de café e nem entre as colheitas ($P > 0,05$), apresentando valores médios de $0,068 (\pm 0,015)$ e $35 (\pm 0,012) \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente.

As concentrações de K, P e a porcentagem de proteína foram influenciadas tanto pela dose de FeSO_4 adicionadas ao substrato, quanto pela ordem das colheitas, não sendo observado interação entre esses dois fatores ($P > 0,05$) (Figura 5).

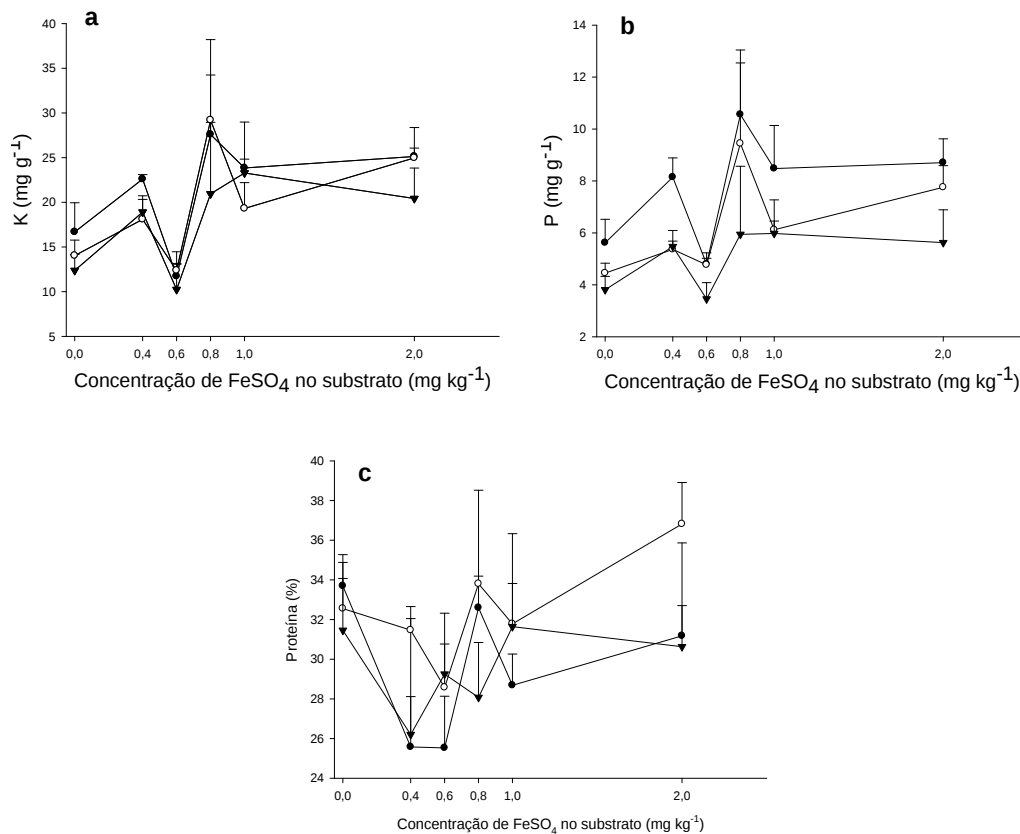


Figura 5. Variação da concentração de a) potássio (K), b) fósforo (P) e c) porcentagem de proteína (PTN) nos cogumelos de *Pleurotus ostreatus* enriquecidos ou não com sulfato ferroso (FeSO_4) em três colheitas subsequentes (—●— 1ª colheita; —○— 2ª colheita; —▼— 3ª colheita)

A diminuição do percentual de proteína de *P. ostreatus* foi verificada quando diferentes concentrações de FeSO_4 foram adicionadas na água de choque (Yildiz e Yesil, 2006).

4.3.2. Teor de minerais e proteínas nos cogumelos de *P. ostreatus* enriquecidos com ZnCO_3

A concentração de Ca foi afetada pela dose de ZnCO_3 adicionada ao substrato casca de café ($P < 0,05$), porem não variou entre as colheitas ($P > 0,05$). Na Figura 6 aparece as variações dos teores de Ca em função da adição de ZnCO_3 .

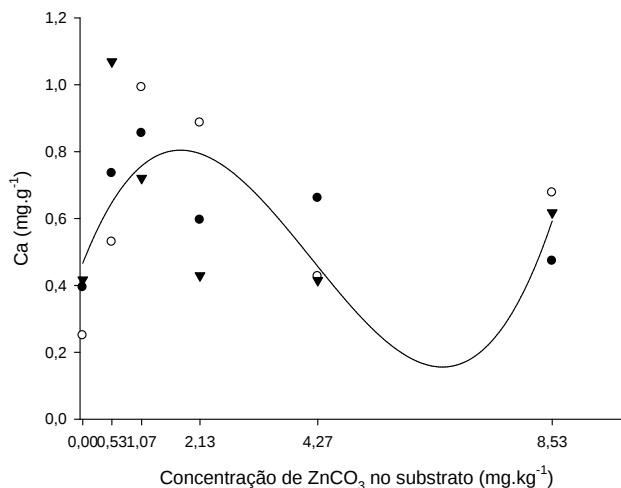


Figura 6. Variação da concentração de cálcio (Ca) nos cogumelos de *Pleurotus ostreatus* enriquecidos ou não com carbonato de zinco (ZnCO_3) em três colheitas subsequentes (● 1ª colheita; ○ 2ª colheita; ▼ 3ª colheita).

Dos minerais avaliados apenas a concentração de Li e o percentual de proteína nos cogumelos não variaram com a dose de ZnCO_3 adicionadas ao substrato casca de café e nem pela ordem das frutificações ($P > 0,05$), apresentando teores médios de 42 mg kg^{-1} ($\pm 14,5$) e $31,766 \%$ ($\pm 3,164$), respectivamente.

As concentrações de S e K foram influenciadas tanto pela dose de ZnCO_3 adicionadas ao substrato quanto pela ordem das colheitas ($P < 0,05$), não sendo observada interação entre esses dois fatores ($P > 0,05$). Já os minerais P e Mg tiveram suas concentrações afetadas pelas diferentes doses de ZnCO_3 , como também pela ordem das colheitas ($P < 0,05$), existindo interação entre esses dois fatores ($P < 0,05$). Variações nos teores de S, K, P e Mg aparecem representadas na Figura 7 em função da adição de ZnCO_3 para três colheitas.

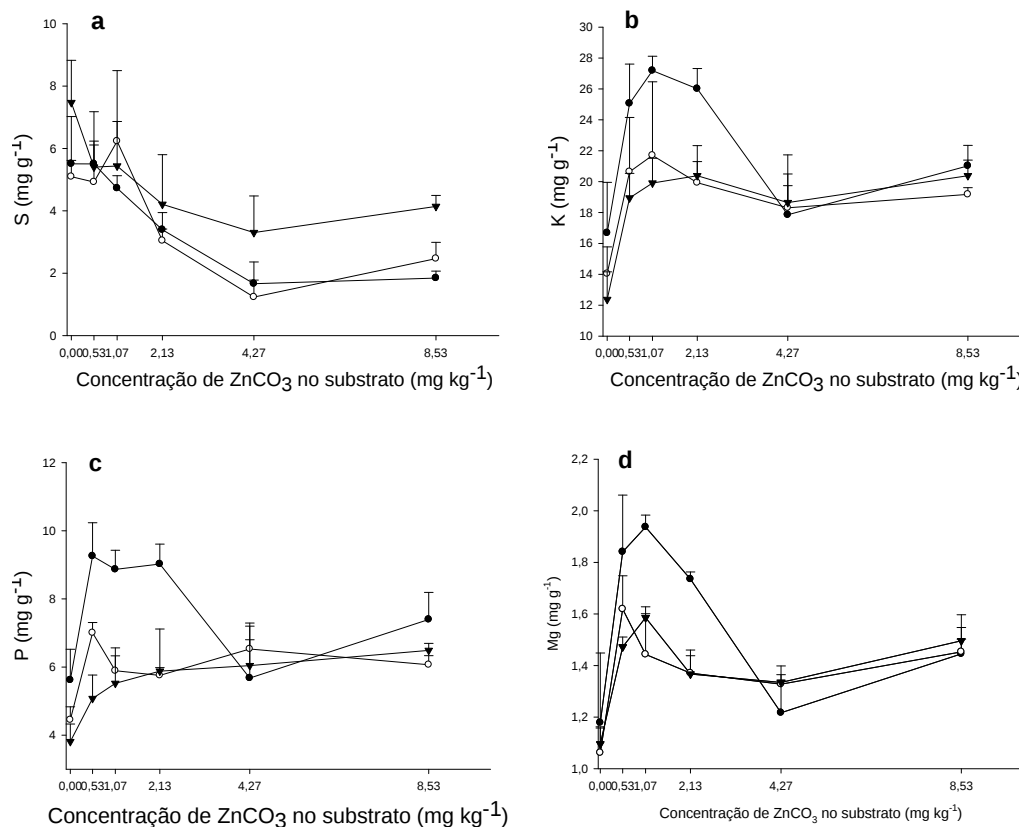


Figura 7. Variação da concentração de a) enxofre (S), b) potássio (K), c) fósforo (P) e d) magnésio (Mg) nos cogumelos de *Pleurotus ostreatus* enriquecidos ou não com carbonato de zinco (ZnCO_3) em três colheitas subsequentes (—●— 1° colheita; -○- 2° colheita; —▼— 3° colheita)

A concentração de Fe, entretanto não variou com adição de diferentes concentrações de ZnCO_3 ($P > 0,05$), sendo somente influenciada pela ordem das colheitas ($P < 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios $\pm$ desvio padrão do teor de Fe nos cogumelos de *Pleurotus ostreatus* enriquecidos ou não com diferentes concentrações de ZnCO_3 para três colheitas subsequentes.

Colheita	Fe (mg g^{-1})
1°	0,123 $\pm$ 0,044 b
2°	0,153 $\pm$ 0,031 a
3°	0,166 $\pm$ 0,033 a

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

4.3.3. Teor de minerais e proteínas nos cogumelos de *P. ostreatus* enriquecidos com LiCl

A concentração de S foi afetada pela dose de LiCl adicionada ao substrato casca de café ($P < 0,05$), sem variação entre as colheitas ($P > 0,05$) (Figura 8).

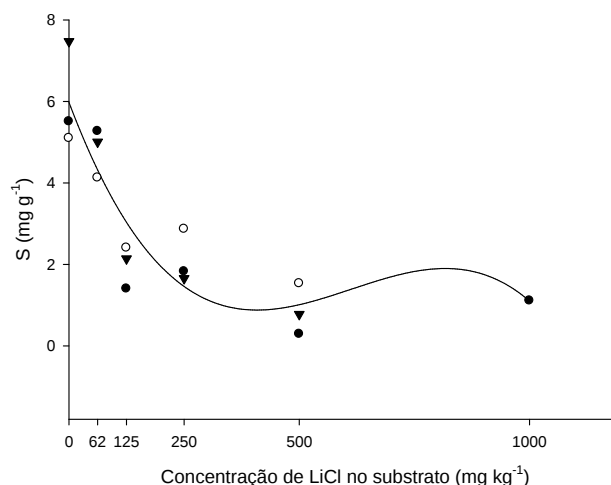


Figura 8. Variação da concentração de enxofre (S) nos cogumelos de *Pleurotus ostreatus* enriquecidos ou não com cloreto de lítio (LiCl) em três colheitas subsequentes (● 1ª colheita; ○ 2ª colheita; ▼ 3ª colheita).

As concentrações de Ca, Mg, Zn e percentual de proteína nos cogumelos não variaram com a dose de LiCl adicionadas ao substrato casca de café e nem pela ordem das colheitas ($P > 0,05$), apresentando teores médios de 0,658 ($\pm 0,81$); 1,190 ($\pm 0,32$); 0,086 ($\pm 0,02$) mg g⁻¹ e 34,039 % ($\pm 3,21$) respectivamente.

As concentrações de K e P foram influenciadas tanto pela dose de LiCl adicionadas, quanto pela ordem das colheitas ($P < 0,05$), não sendo observado interação entre esses dois fatores ($P > 0,05$). Na Figura 9 está representado as variações dos teores de K e P em função da adição de LiCl para três colheitas.

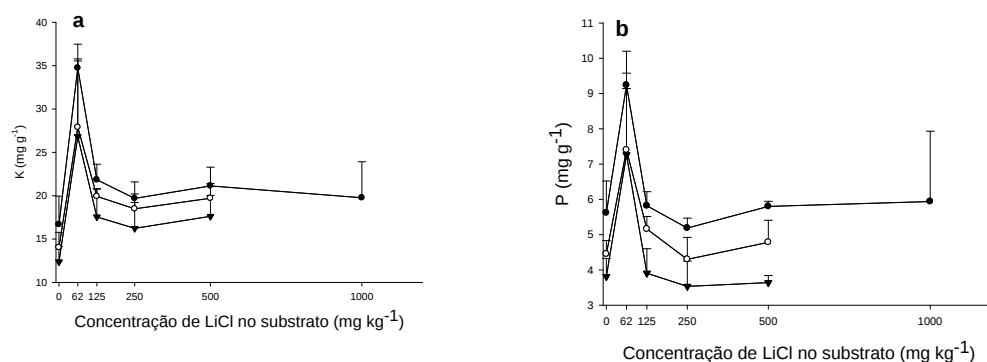


Figura 9. Variação da concentração de potássio a) (K) e b) fósforo (P) nos cogumelos de *Pleurotus ostreatus* enriquecidos ou não com cloreto de lítio (LiCl) em três colheitas subsequentes (—●— 1ª colheita; —○— 2ª colheita; —▼— 3ª colheita).

A concentração de Fe, entretanto não variou com a adição de diferentes concentrações de LiCl ($P > 0,05$), sendo somente influenciada pela ordem entre as colheitas ($P < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Valores médios $\pm$ desvio padrão do teor de Fe nos cogumelos de *Pleurotus ostreatus* enriquecidos ou não com diferentes concentrações de LiCl para três colheitas subsequentes.

Colheita	Fe (mg g ⁻¹)
1°	0,135 $\pm$ 0,021 b
2°	0,181 $\pm$ 0,026 a
3°	0,186 $\pm$ 0,029 a

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

O teor médio de proteína de 31,51 % encontrado nos cogumelos de *P. ostreatus*, são comparáveis aos encontrados por Bauer-Petrovska (2001), que verificou um teor médio de proteína de 32,6 % na matéria seca de 47 espécies de cogumelos comestíveis da Macedônia

Dos minerais avaliados, o K foi o mais abundante, seguido pelo P e S. Altos valores de K estão de acordo com Sturion e Ranzani (2000), que

encontraram concentrações variando de 27,1 a 37,8 mg g⁻¹ de K em *Pleurotus* spp. O P aparece como segundo elemento mineral, o que também está pertinente com dados encontrados em outros estudos (STURION e RANZANI, 2000; KALAC, 2009).

O S ocorreu como o terceiro elemento, contrariando vários dados da literatura onde o Mg é o terceiro elemento mineral majoritário (BANO et al., 1981; VETTER, 1994; STURION e OETTERER, 1995). Porém estudos mais recentes verificaram ocorrer um maior conteúdo de S do que Mg em cogumelos (STURION e RANZANI, 2000; KALAC, 2009). Já o teor de Ca em fungos comparado com os outros macrominerais é característico apresentar esse elemento em menores concentrações (BANO e RAJARATHNAM, 1988; CHANG e MILES, 1989).

Dos microelementos, o Fe presente nas amostras avaliadas apresentou teores semelhantes aos encontrados em outros trabalhos que variam de 0,03 a 0,485 mg g⁻¹ (TUZEN, 2003; KALAC, 2009). As concentrações de Zn e Li verificadas na literatura, variam de 0,0293 a 0,188 mg g⁻¹ (ISILOGLU, et al., 2001; TUZEN, 2003) e 0,044 a 0,208 mg L⁻¹ (VETTER, 2005), respectivamente.

4.4. Acessibilidade do Fe, Zn e Li nos cogumelos de *P. ostreatus*

4.4.1. Solubilidade por extração sequencial

O Fe presente no cogumelo de *P. ostreatus* e no suplemento de FeSO₄ foi facilmente solubilizado no processo de extração sequencial (Figura 10). Os minerais extraídos no início da sequência são considerados mais solúveis, pois a força do extrator aumenta progressivamente na sequência. Mais de 80 % do Fe no cogumelo encontram-se distribuídos nas frações solúvel em água, trocável, reduzida e ligada organicamente, enquanto 99,9 % do Fe do suplemento de FeSO₄ encontram-se associados às frações trocável, reduzida ou ligada organicamente.

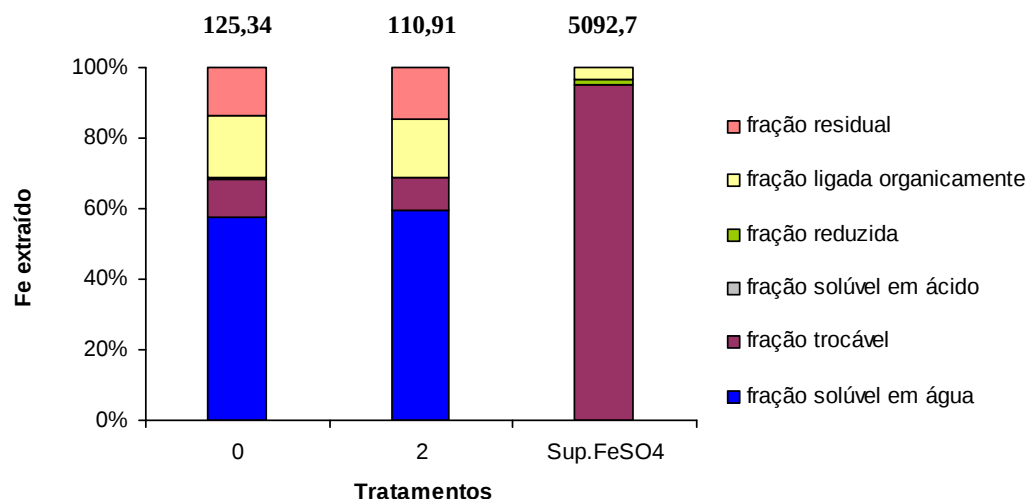


Figura 10. Porcentagem de ferro presente nas diferentes frações de cogumelos de *Pleurotus ostreatus* produzidos em casca de café, enriquecidos com 0 e 2 mg kg⁻¹ de sulfato ferroso, e no suplemento mineral à base de sulfato ferroso. A partição das barras representa os valores médios das frações depois do processo de extração sequencial, como uma porcentagem do mineral extraído. Valores acima de cada barra representam o ferro total (µg g⁻¹) extraído das amostras.

De todo o Fe obtido após a extração sequencial, foram recuperados 72, 74 e 2,5 % respectivamente dos tratamentos 0, 2 e Sup. FeSO₄. Esses valores representam uma porcentagem de Fe solubilizado no cogumelo enriquecido que é de 29 a 30 vezes maior em comparação ao suplemento de FeSO₄. Assim pode-se inferir que esse metal presente no cogumelo encontra-se mais acessível que o metal presente no suplemento de FeSO₄.

Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos, que consideram a biodisponibilidade de Fe em cogumelos consideravelmente alta, assumindo que 90 % do Fe presente nos mesmos podem ser absorvidos (KALAC e SVOBODA, 2000).

O Zn presente no cogumelo de *P. ostreatus* e no suplemento de ZnO foi facilmente solubilizado no processo de extração sequencial (Figura 11). Mais de 90 % do Zn do cogumelo e do suplemento de ZnO encontram-se distribuídos nas frações solúvel em água, trocável, solúvel em ácido, reduzida e ligada organicamente, frações consideradas acessíveis.

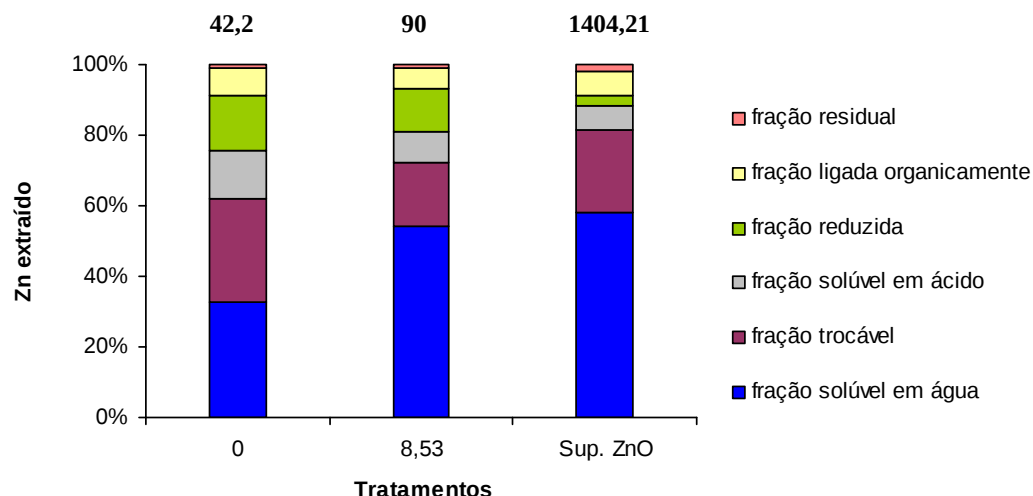


Figura 11. Porcentagem de zinco presente nas diferentes frações de cogumelos de *Pleurotus ostreatus* produzidos em casca de café, enriquecidos com 0 e 8,53 mg kg⁻¹ de carbonato de zinco e no suplemento mineral à base de óxido de zinco. A partição das barras representa os valores médios das frações depois do processo de extração sequencial, como uma porcentagem do mineral extraído. Valores acima de cada barra representam o zinco total (µg g⁻¹) extraído das amostras.

De todo o Zn obtido após a extração sequencial, 57, 99,8 e 5,3 % foram recuperados dos tratamentos 0, 8,53 e Sup. ZnO, respectivamente. Esses valores representam uma porcentagem de Zn solubilizado no cogumelo de 11 a 19 vezes maior em comparação ao suplemento. Assim, também se pode inferir que o Zn presente no cogumelo encontra-se mais acessível que o Zn presente no suplemento de ZnO.

O fato de existir Fe e Zn em porções de frações ligadas organicamente nos cogumelos sugere que os metais presentes no substrato foram transformados pelo cogumelo em formas orgânicas, incorporadas em biomoléculas dentro da célula. Formas orgânicas contribuem para a biodisponibilidade, pois possuem absorção maior ou similar que a de formas inorgânicas (MILES e HENRY, 2000).

O Li presente no cogumelo enriquecido está substancialmente associado à fração solúvel em água, seguida da fração trocável e residual; em contrapartida o Li do cogumelo não enriquecido encontra-se totalmente solúvel em água (Figura 12). Todo Li recuperado do sup. LiCO₃ está presente na fração residual, não sendo encontrado Li em frações consideradas biodisponíveis.

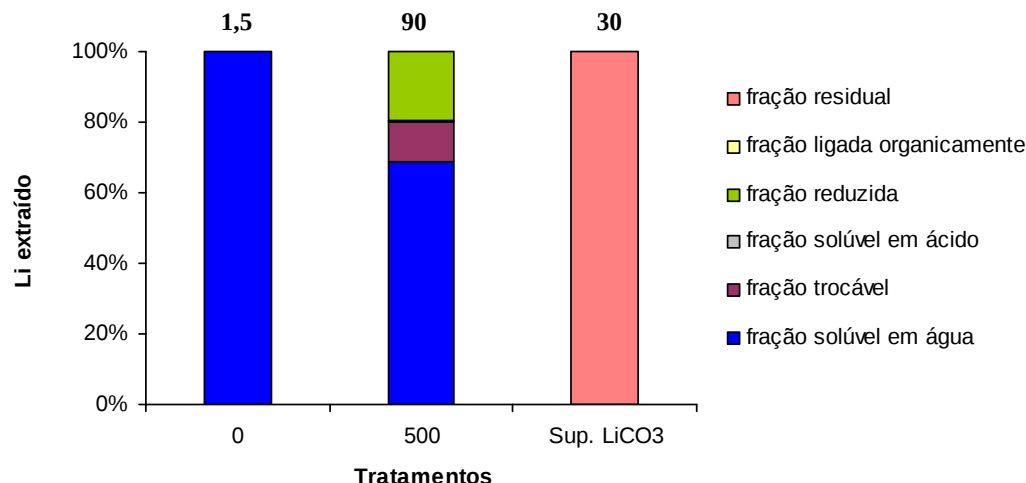


Figura 12. Porcentagem de Li presente nas diferentes frações de cogumelos de *Pleurotus ostreatus* produzidos em casca de café, enriquecidos com 0 e 500 mg kg⁻¹ de cloreto de lítio e no suplemento mineral à base de carbonato de lítio. A partição das barras representa os valores médios das frações depois do processo de extração sequencial como uma porcentagem do mineral extraído. Valores acima de cada barra representam o lítio total (µg g⁻¹) extraído das amostras.

De todo Li recuperado após os seis passos da extração, somente 4 % foi obtido do cogumelo não enriquecido, 65 % do cogumelo enriquecido com 500 mg kg⁻¹ de LiCl e apenas 0,02% extraído do suplemento de LiCO₃; uma porcentagem de Li muito inferior a dos cogumelos tanto enriquecidos como não enriquecidos.

Embora a acessibilidade não possa ser considerada como sinônimo de biodisponibilidade, este é um importante fator que afeta a biodisponibilidade. Além disso, para um elemento ser absorvido e possivelmente usado pelo organismo, tem de estar necessariamente em uma forma acessível no fluido intestinal, ou como um íon livre ou complexado com outro nutriente (ELLESS et al., 2000). Formas químicas dos minerais altamente acessíveis são consideradas potencialmente mais biodisponíveis que formas menos acessíveis. Percebe-se assim, que o mineral presente em frações não residuais (solúvel em água, trocável, solúvel em ácido, reduzida, ou ligado organicamente) são potencialmente mais biodisponíveis que combinações do mineral ligadas à fração residual (RABINOVICH et al., 2007). Na fração final o mineral só é solubilizado quimicamente com um extrator muito agressivo, sugerindo que o mineral está firmemente retido em um *status* não

biodisponível. Existem limitações no processo de extração sequencial que provê evidências semiquantitativas acerca das formas químicas, acessibilidade e, indiretamente, biodisponibilidade (MA e RAO, 1997).

Foi verificado neste trabalho que os metais Fe, Zn e Li presentes no cogumelo de *P. ostreatus* encontram-se mais acessíveis que os mesmos metais presentes nos seus correspondentes suplementos minerais. Resultados semelhantes também foram encontrados por Elless et al. (2000), quando enriqueceu *Brassica juncea* com diferentes doses independentes de Fe, Zn, Mn, Se e Cr na água de irrigação e comparou a solubilidade de todos esses minerais presentes no tecido vegetal com suplementos minerais multivitamínicos, verificando que todos os minerais testados presentes no tecido vegetal são mais acessíveis e potencialmente mais biodisponíveis em relação aos suplementos minerais multivitaminicos.

4.4.2. Digestibilidade *in vitro*

A digestão *in vitro* usando fluidos gástrico e intestinal foi realizada de forma independente para confirmar os resultados da extração sequencial.

A digestão *in vitro* é uma metodologia capaz de quantificar a acessibilidade dos nutrientes, mas não a biodisponibilidade destes propriamente dita, uma vez que nem todo material acessível é absorvido. Portanto, o método não reproduz a maioria dos fatores fisiológicos envolvidos na absorção e na utilização do nutriente. Mesmo assim, apresentam baixo custo e permitem o controle apurado de variáveis, tornando-se modelo importante no sentido de prever e sugerir estudos *in vivo* (COZZOLINO, 2007).

A porcentagem do Fe digerido no cogumelo não enriquecido foi consideravelmente maior (77,46 %) que a porcentagem no cogumelo enriquecido (42,72 %) e suplemento de FeSO_4 (6,8 %) (Figura 13).

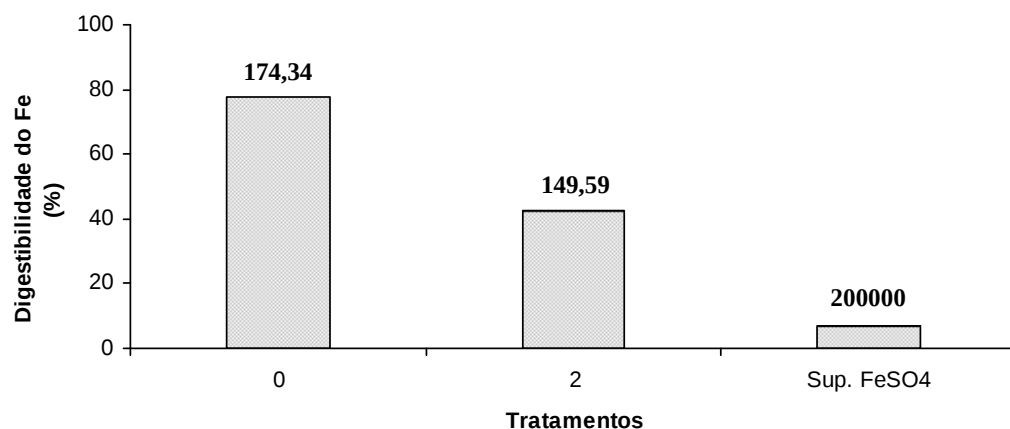


Figura 13. Porcentagem de ferro solúvel obtida após a simulação da digestão gastrointestinal de cogumelos de *Pleurotus ostreatus* enriquecidos com 0 e 2 mg kg^{-1} de sulfato ferroso e do suplemento mineral a base de sulfato ferroso. Valores acima das barras representam a concentração média de ferro ($\mu\text{g g}^{-1}$) das amostras.

O mesmo perfil foi observado para a digestão do Zn, obtendo 61,8 % de Zn digerido no cogumelo não enriquecido, 36 % para o cogumelo enriquecido com 8,53 mg kg de ZnCO_3 e 1,6 % para o suplemento de ZnO (Figura 14).

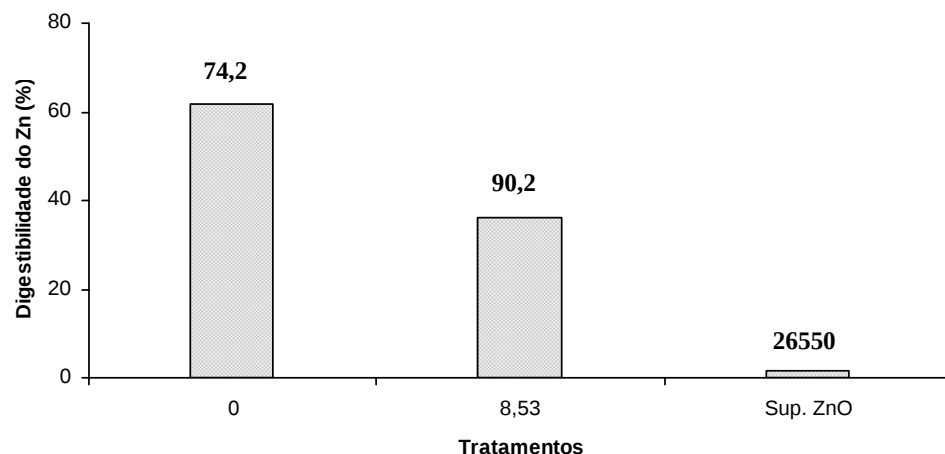


Figura 14. Porcentagem de zinco solúvel obtida após simulação da digestão gastrointestinal de cogumelos de *Pleurotus ostreatus* enriquecidos com 0 e 8,53 mg kg^{-1} de carbonato de zinco e do suplemento mineral a base de óxido de zinco. Valores acima das barras representam a concentração média de zinco ($\mu\text{g g}^{-1}$) de cada amostra.

A porcentagem do Li digerido obtida após simulação da digestão gastrointestinal a partir dos cogumelos enriquecidos com 500 mg kg^{-1} foi

consideravelmente maior (71 %) que a obtida no cogumelo não enriquecido (27 %). Já o suplemento de LiCO_3 não apresentou leitura de Li após a digestão (Figura 15).

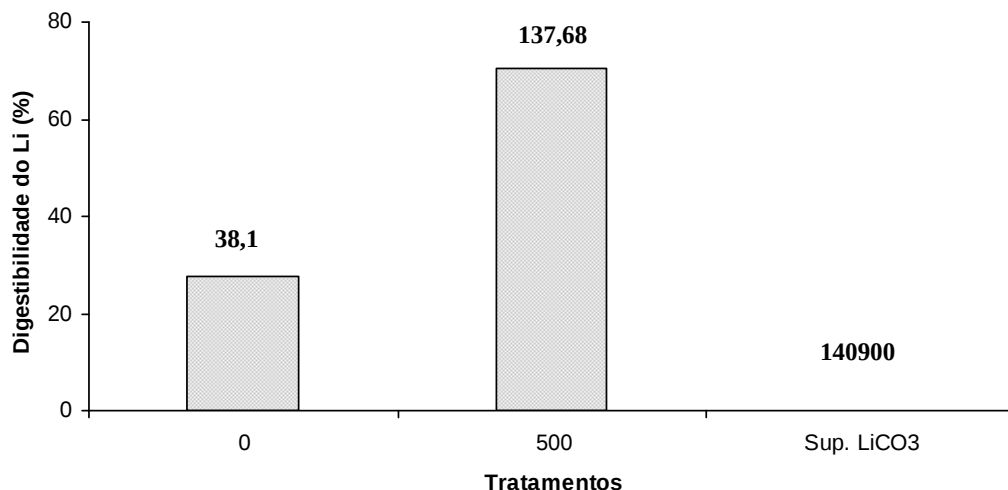


Figura 15. Porcentagem de lítio obtida após simulação da digestão gastrointestinal de cogumelos de *Pleurotus ostreatus* enriquecidos com 0 e 500 mg kg^{-1} de cloreto de lítio e do suplemento mineral a base de carbonato de lítio. Valores acima das barras representam a concentração média de lítio ($\mu\text{g g}^{-1}$) de cada amostra.

Os resultados da digestão mostram que a acessibilidade dos metais nos cogumelos continuam superiores quando comparadas com a acessibilidade nos suplementos. Para os cogumelos não enriquecidos com Fe, Zn e Li, a acessibilidade desses metais aumentou, ocorrendo o contrário com os cogumelos enriquecidos e suplementos minerais para os respectivos metais, exceto para o suplemento mineral de FeSO_4 e o cogumelo enriquecido com Li, que também apresentaram maior acessibilidade em comparação a extração sequencial após a digestão *in vitro*. De acordo com Elless (2000), o elevado pH do fluido intestinal precipita metais catiônicos, entretanto metais associados à biomassa do fungo formam quelatos com compostos orgânicos, o que impede sua precipitação. Entretanto, neste trabalho não foi observado essa precipitação de Fe.

Usando os dados da digestão obtidos no presente estudo e considerando os cogumelos que foram enriquecidos ou não com Fe, Zn e Li, pode-se inferir que 10 g do cogumelo de *P. ostreatus* seco não enriquecido

fornece 1,35 mg de Fe acessível, o que corresponde a 7,5 % da IDR para mulheres de 19 a 70 anos (Tabela 6).

Tabela 6. Porcentagem da IDR ou IA baseada na digestibilidade *in vitro* de 10 g de cogumelos de *Pleurotus ostreatus* enriquecido, não enriquecidos (controle) e dos suplementos minerais.

Tratamento	Fe		Zn		Li	
	% digerido	% IDR	% digerido	% IDR	% digerido	% IA
Controle cogumelo enriquecido	77,46	7,5	61,8	5,7	27	10,3
Suplemento	42,72	3,5	36	4,1	71	97,7
	6,8	75, 55*	1,6	53,1	nd	Nd

* 1 g do suplemento digerido

nd: não determinado

Com base na IDR de 11 mg d⁻¹ de Zn, o consumo de 10 g de cogumelo de *P. ostreatus* forneceria 0,83 mg de Zn acessível, correspondendo a 5,7 % da IDR (Tabela 6).

Assumindo que a ingestão adequada de Li seja de 1mg d⁻¹ (ARAL E VECCHIO-SADUS, 2008), e que sua acessibilidade no trato gastrointestinal seja de 71% (Figura 12) o consumo de 10 g de cogumelo seco produzido em casca de café enriquecido com 500 mg kg⁻¹ de LiCl forneceria aproximadamente 100 % dessa recomendação (Tabela 9).

Pode-se verificar que a ingestão dos metais estudados têm sua acessibilidade aumentada quando é incorporado ao cogumelo. As formas com que esses elementos se encontram no cogumelo devem ser estudadas.

5. CONCLUSÕES

A eficiência biológica foi maior na primeira colheita de *Pleurotus ostreatus* e reduziu consideravelmente na terceira colheita, não sendo influenciada pelas diferentes concentrações de FeSO_4 , ZnCO_3 e LiCl .

O cogumelo de *P. ostreatus* acumulou Zn e sua acumulação foi influenciada pelo aumento da concentração de ZnCO_3 adicionada ao substrato casca de café.

O cogumelo de *P. ostreatus* acumulou Li, e sua concentração foi influenciada pelo aumento da concentração de LiCl adicionada ao substrato casca de café.

Os elementos Fe, Zn e Li presentes nos cogumelos apresentaram acessibilidade maior que esses mesmos microelementos presentes em seus respectivos suplementos minerais testados.

O cogumelo de *P. ostreatus* enriquecidos com Fe, Zn ou Li apresentam potencial para serem utilizados como fonte alternativa e de alta acessibilidade desses microelementos.

Estudos sobre os fatores antinutricionais como fitatos, fibras, taninos e polifenóis presentes nos cogumelos de *P. ostreatus* são necessários, pois podem interferir na biodisponibilidade de alguns minerais.

Pesquisas sobre a biodisponibilidade dos minerais nos cogumelos de *P. ostreatus* fornecerão informações fundamentais sobre a efetiva absorção, efeitos fisiológicos e influencia desse alimento na promoção e manutenção da saúde humana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREINI, C.; BANCI, L.; BERTINI I. Zinc through the tree domains of life. **Journal of Proteome Research**, v. 5, p. 3173-3179, 2006.

ALONSO, J.; GARCÍA, M.; PÉREZ-LÓPEZ, M.; MELGAR, M. The concentrations and bioconcentration factors of copper and zinc in edible mushrooms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, p. 180-188, 2003.

ALVAREZ, G.; MUÑOZ-MONTAÑO, J. R.; SATRÚSTEGUI, J.; AVILA, J.; BOGÓNEZ, E.; DIAZ-NIDO, J. Lithium protects cultured neurons against β -amyloid-induced neurodegeneration. **FEBS Letters**, v. 453, p. 260, 1999.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION (ADA). Position of the American Dietetic Association: Fortification and Nutritional Supplements. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 105, n. 8, p. 1300-1309, 2005.

ARAL, H.; VECCHIO-SADUS, A. Toxicity of lithium to humans and the environment - A literature review. **Ecotoxicology and Environment Safety**, v. 70, p. 349-356, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16th ed. Washington, D.C., 1996.

BANO, Z.; NAGARAJA, K. V.; VIBHAKAR, S.; KAPUR, O. P. Mineral and heavy metal contents in the sporophores of *Pleurotus* species. **Mushrooms News I**, v. 2, p. 3-7, 1981.

BANO, Z.; RAJARATHNAM, S. *Pleurotus* mushrooms. Part II: chemical composition, nutritional value, post harvest physiology, preservation, and role as human food. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 27, p. 87-158, 1988.

BAUER-PETROVSKA, B. Protein fractions in edible Macedonian mushrooms. **European Food Research and technology**, v. 212, p. 469-472, 2001.

BEAUMONT, C., VAILONT, S. Disorders of iron homeostasis erythrocytes, erythropoiesis. Genova (Italy): **Forum Service Editore**, p. 393-406, 2006.

BHUTTA, Z. A.; BIRD, S. M.; BLACK, R. E.; BROWN, K. H.; GARDNER, J. M.; HIDAYAT, A. Therapeutic effects of oral zinc in acute and persistent diarrhea in children in developing countries: Pooled analysis of randomized controlled trials. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, p. 1516–1522, 2000.

BHUTTA, Z. A.; BLACK, R. E.; BROWN, K. H.; GARDNER, J. M.; GORE, S.; HIDAYAT, A. Prevention of diarrhea and pneumonia by zinc supplementation in children in developing countries: Pooled analysis of randomized controlled trials. **Journal of Pediatrics**, v. 135, p. 689–697, 1999.

BOCCIO, R. J.; IYENGAR, V. Iron deficiency – causes, consequences, and strategies to overcome this nutritional problem. **Biological Trace Element Research**, v. 94, p. 1-31, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Regulamento técnico referente a alimentos adicionados de nutrientes essenciais**. Portaria nº31, de 13 de janeiro de 1998.

CAMBRAIA, J.; OLIVEIRA, J. A. **Métodos analíticos em biologia**. Viçosa: UFV, p. 211, 2002.

CHANDER K.; DYCKMANS J.; HOEPER H.; JOERGENSEN R. G.; RAUBUCH M. Long-term effects on soil microbial properties of heavy metals from industrial exhaust deposition. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 164, p. 657–663, 2001.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. The nutritional attributes and medicinal value of edible mushrooms. **Edible mushrooms and cultivation**, p. 27-38, 1989.

CONAB – 2010. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira 2010**. Segunda estimativa maio/2010. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/5cafe_10.pdf> Acesso em: 06/08/2010.

COSTA, N. M. B.; PELUZIO, M. C. G. **Nutrição Básica e Metabolismo**. 1ªed. Viçosa, p. 312-328, 2008.

COSTELLO, L. C.; FENG, P.; MILON, B.; TAN, M.; FRANKLIN, R. B. Role of zinc in the pathogenesis and treatment of prostate cancer: critical issues to resolve. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 7, p. 111–117, 2004.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 2º edição, São Paulo: Manole, p. 509-866, 2007.

CURVETTO, N. R.; FIGLAS, D.; DEVALIS, R.; DELMASTRO, S. Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls supplemented with N-NH_4^+ and/or Mn(II) . **Bioresource Techonology**, v. 84, p. 171-176, 2002.

DAWSON, E. B. The relationship of tap water and physiological levels of lithium to mental hospital admission and homicide in Texas. In Schrauzer GN, KlippelKF (eds): “**Lithium in Biology and Medicine**.”Weinheim: VCH Verlag, p. 171–187, 1991.

DIAS, E. S.; KOSHIKUMO, E. M. S.; SCHWAN, R. F.; SILVA, R. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajá-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Revista Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, 2003.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E., ASCIMENTO, J. S. Desenvolvimento *in vitro* de *Pleurotus* spp. sob influencia de diferentes substratos e dextrose. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p. 331-338, 2005.

DOUGLAS, C. R. Necessidades minerais. **Tratado de fisiologia aplicado à nutrição**, 1º edição, São Paulo: Robe, p. 136-137, 2002.

ELLESS M.; BLAYLOCK M.; HUANG J.; GUSSMAN C. Plants as a natural source of concentrated mineral nutritional supplements. **Food Chemistry**, v. 71, p. 181-188, 2000.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS- World Health Organization (FAO/WHO). **Indicators and strategies for iron deficiency and anemia programmes**. Genebra, 1993.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Code of Federal Regulations**, title 21, chapter 1, v. 2, p. 100-169, revised as of april 1, 2004.

GADD, G. M. Geomycology: biochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, biowathering and bioremediation. **Mycological Research**, v. 3, p. 3-49, 2007.

GALANTE, A. P.; NOGUEIRA, C. S.; MARI, E. T. L. Biodisponibilidade de minerais. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**, 1º edição, São Paulo: Roca, p. 107-110, 2007.

GARCIA, M. A.; ALONSO, J.; FERNANDEZ, M. I.; MELGAR, M. J. Lead content in edible wild mushrooms in northwest Spain as indicator of environmental contamination. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 34, p. 330-335, 1998.

GEIL, P. B.; ANDERSON, J. W. Nutrition and health implications of dry beans: A review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 13, p. 549–558, 1994.

GHASEMI, M.; RAZA, M.; DEHPOUR, A., R. NMDA receptor antagonists augment antidepressant-like effects of lithium in the mouse forced swimming test. **Journal of Psychopharmacology**, v. 0, p. 1-10, 2009.

GIBSON, R.S.; FERGUSON, E. L. Assessment of dietary zinc in a population. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 430-434, 1998.

GIBSON, R. S.; YEUDALL, F.; DROST, N.; MTITIMUNI, B.; CULLINAN, T. Dietary interventions to prevent zinc deficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 484-487, 1998.

GLAHN, R. P.; LAI, C.; HSU, J.; THOMPSON, J. F.; GUO, M.; VAN CHAMPEN, D. R. Decreased citrate improves iron availability from infant formula: application of an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. **The Journal of Nutrition**, v. 128, p. 257-264, 1998.

GOULD, T. D.; O'DONNELL, K. C.; DOW, E. R.; DU, J.; CHEN, G.; MANJI, H. K. Involvement of AMPA receptors in the antidepressant-like effects of lithium in the mouse tail suspension test and forced swim test. **Neuropharmacology**, v. 54, p. 577–587, 2008.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 396-397, 2008.

HOUSE, W. A.; WELCH, R. M.; BEEBE, S.; CHENG, Z. Potential for increasing the amounts of bioavailable zinc in dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) through plant breeding. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 1452-1457, 2002.

HU, M.; WU, Y. S.; WU, H. W. Effects of lithium deficiency in some insulin-sensitive tissues of diabetic Chinese hamsters. **Biological Trace Element Research**, v. 58, p. 91, 1997.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. Washington, D.C., National academy Press, p.442-501, 2001.

ISILOGLU, M.; YILMAZ, F.; MERDIVAN, D. Concentrations of trace elements in wild edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 73, p. 169-175, 2001

JANSEN, J.; KARGES, W.; RINK, L. Zinc and diabets – clinical links and molecular mechanisms. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 399-417, 2009.

JONES, G.; STEKETEE, R. W.; BLACK, R. E.; BHUTTA, Z. A.; MORRIS, S. S. How many child deaths can we prevent this year? **The Lancet**, v. 362, p. 65-71, 2003.

JOPE, R., S. A bimodal model of the mechanism of action of lithium. **Molecular Psychiatry**, v. 4, p.21–25, 1999.

JOPE, R., S. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, p. 441-443, 2003.

KALAC, P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 9-16, 2009.

KALAC, P.; SVOBODA, L. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 69, p. 273-281, 2000.

KHAN, M.; SCULLION, J. Effects of metal (Cd, Cu, Ni, Pb or Zn) enrichment of sewage-sludge on soil micro-organisms and their activities. **Applied Soil Ecology**, v. 20, p. 145-155, 2002.

KHOKHAR, S.; CHAUHAN, B. M. Antinutritional factors in Moth Bean (*Vigna aconitifolia*): Varietal differences and effects of methods of domestic processing and cooking. **Journal of Food Science**, v. 51, p. 591-594, 1986.

KOONG, S. S.; REYNOLDS, J. C.; MOVIUS, E. G.; KEENANA, M.; AINK, B.; LAKSHMANANM, C.; ROBBINS, J. Lithium as a potential adjuvant to ¹³¹I therapy of metastatic, well differentiated thyroid carcinoma. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, p. 912, 1999.

KRAUSE, M. V.; MAHAN, L. K. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, p. 981, 1993.

LEPSOVÁ, A.; MEJSTRIK, V. Accumulation of trace elements in the fruiting bodies of macrofungi in the Krušné Hory mountains, Czechoslovakia. **Science of the Total Environment**, v. 76, p. 117-128, 1988.

LONNERDAL L, B. Dietary factors influencing zinc absorption. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1378S–1383S, 2000.

LOPES, M. C. S.; FERREIRA, L. O. C.; FILHO, M. B. Uso diário e semanal de sulfato ferroso no tratamento de anemias em mulheres no período reprodutivo. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, n. 4, p. 799-808, 1999.

MA, L.; RAO, G. Chemical fractionation of cadmium, copper, nickel, and zinc in contaminated soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 26, p. 259-264, 1997.

MACDONALD, R.S. The role of zinc in growth and cell proliferation. **Journal Nutrition**, v. 130, p. 1500S-1508S, 2000.

MANJI, H. K.; MOORE, G. J.; CHEN, G. Lithium at 50: have the neuroprotective effects of this unique cation been overlooked? **Biological Psychiatry**, v. 46, p. 929, 1999.

MANZI, P.; AGUZZI, A.; PIZZOFRERATO, L. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. **Food Chemistry**, v. 73, p. 321-325, 2001.

MANZI, P.; AGUZZI, A.; VIVANTI, V.; PACI, M.; PIZZOFRERATO, L. Mushrooms as a source of functional ingredients. In **Euro. Food chemistry x European Conference on: Functional Foods**, v. 1, p. 86-93, 1999.

MARET, W. Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potential and zinc signals. **Biometals**, v. 22, p. 149-157, 2009.

MARTINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 50, p. 5-18, 2000.

MCCALL, K. A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1437-1446, 2000.

MCCLAIN, C.; SOUTOR, C.; ZIEVE, L. Zinc deficiency: a complication of Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 78, p. 272-279, 1980.

MCCLUNG, C., A. Role for the Clock Gene in Bipolar Disorder. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v.72, p. 1-8, 2007.

MICHELOT, D.; SIOBUD, E.; DORE, J.; VIEL, C.; POIRIER, F. Update of metal content profiles in mushrooms-toxicological implications and tentative approach to the mechanisms of bioaccumulation. **Toxicon**, v. 36, p. 1997-2012, 1998.

MILES, R.; HENRY, P: Relative trace mineral bioavailability. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, p. 73-93, 2000.

MIRANDA, A. S.; FRANCESCHINI, S. C. C.; PRIORE, S. E.; EUCLYDES, M. P.; ARAÚJO, R. M. A.; RIBEIRO, S. M. R. Anemia ferropriva e estado nutricional de crianças com idade de 12 a 60 meses do município de Viçosa, MG. **Revista de Nutrição**, v. 16, p. 163-169, 2003.

MONTEIRO, C. A.; SZARFARC, S. C.; MONDINI, L. Tendência secular da anemia na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, nº 6, p. 62-72, 2000.

OVERBECK, S.; UCIECHOWSKI, P.; ACKLAND, M. L.; FORD, D.; RINK, L. Intracellular zinc homeostasis in leukocyte subsets is regulated by different expression of zinc exporters ZnT-1 to ZnT-9. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 368-380, 2008.

PASSMORE, R.; NICOL, B. M.; RAO, N. M. **Manual das necessidades nutricionais humanas**. São Paulo, Livraria Atheneu, p. 73, 1983.

POWELL, S. The antioxidant properties of zinc. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1447-1454, 2000.

RABINOVICH, M.; FIGLAS, D.; DELMASTRO, S.; CURVETTO, N. Copper-and zinc-enriched mycelium of *Agaricus blazei* Murril: Bioaccumulation and bioavailability. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, p. 175-183, 2007.

RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. *Pleurotus* mushrooms: Part III: biotransformations of natural lignocellulosic wastes; commercial applications and implications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 28, p. 31-113, 1989.

RAMÍREZ-CÁRDENAS, L.; LEONEL, A. J.; COSTA, N. M. B. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 200–213, 2008.

RAMOS, L.; HERNANDEZ, L. M.; GONZALEZ, M. J: Sequential extraction of copper, lead, cadmium, and zinc in soils from or near Donana National Park. **Journal of Environmental Quality**, v. 23, p. 50-57, 1994.

REDDY, G. V.; BABU, P. R.; KOMARAIHAH, P.; ROY, K. R. R. M.; KOTHARI, I. L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1457-1462, 2003.

REZENDE, E. G.; SANTOS, M. A.; LAMOUNIER, J. A.; GALVÃO, M. A. M.; LEITE R. C. Deficiência de ferro e anemia em escolares da área rural de Novo Cruzeiro (Minas Gerais) Brasil. **Revista Medica de Minas Gerais**, v. 19, p. 103-108, 2009.

RINK, L.; HAASE, H. Zinc homeostasis and immunity. **Trends in Immunology**, v. 28, p. 1-4, 2007.

RINK, L.; KIRCHNER, H. Zinc-altered immune function and cytokine production. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1407S–1411S, 2000.

RODRIGUEZ-GIL, J. E.; GUINOVART, J. J.; BOSCH, F. Lithium restores glycogen synthesis from glucose in hepatocytes from diabetic rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 301, p. 411, 1993.

RUEL, M. T.; BOUIS, H. E. Plant breeding: A long-term strategy for the control of zinc deficiency in vulnerable populations. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 488S-494S, 1998.

SALGUEIRO, M. J.; ZUBILLAGA, M. B.; LYSIONEK, A. E.; CARO, R. A., WEILL, R.; BOCCIO, J. R. The role of zinc in the growth and development of children. **Nutrition**, v. 18, p. 510-519, 2002.

SÁNCHEZ, A.; YSUNZA, F.; BELTÁN-GARCIA M. J.; ESQUEDA M. Biodegradation of Viticulture Wastes by *Pleurotus*: a source of microbial and human food and its potential use in animal feeding. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2537-2542, 2002.

SANCHÉZ, J. E.; ROYSE, D. J. **La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp.** México, Editorial Limiusa, p. 290, 2001.

SANDBERG, A. S. Bioavailability of minerals in legumes. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. S281–S285, 2002.

SCHMIDT, P.; WECHSLER, F. S.; NASCIMENTO, J. S.; JUNIOR, F. M. V. Tratamento de feno de braquiária pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1866-1871, 2003.

SCHOLMERICH, J.; LOHLE, E.; KOTTGEN, E.; GEROK, W. Zinc and vitamin A deficiency in liver cirrhosis. **Hepato-gastroenterology**, v. 30, p. 119–125, 1983.

SCHRAUZER, G. N. Lithium: occurrence, dietary intakes, nutritional essentiality. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21 (1), p. 14-21, 2002.

SCHRAUZER, G. N.; SHRESTHA, K. P.; FLORES-ARCE, M. F. Lithium in scalp hair of adults, students and violent criminals. **Biological Trace Element Research**, v. 34, p. 161–176, 1992.

SHASHIREKHA, M. N.; RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. Effects of supplementing rice straw growth substrate with cotton seeds on the analytical characteristics of the mushroom *Pleurotus florida* (Block & Tsao). **Food Chemistry**, v. 92, p. 255-259, 2005.

SHOEIB, T.; MESTER, Z. Towards the characterization of metal binding proteins in metal enriched yeast. **Microchemical Journal**, v. 85, n. 2, p. 329-340, 2007.

SILVA, M. C. S. **Enriquecimento e biodisponibilidade de selênio no cogumelo de *Pleurotus ostreatus***. 2009 71f. (Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

SILVA, M. C. S.; NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V.; VANETTI, M. C. D.; BAZZOLLI, D. M. S.; COSTA, N. M. B.; KASUYA, M. C. M. *In vivo* bioavailability of selenium in enriched *Pleurotus ostreatus* mushrooms. **Metallomics**, v. 2, p. 162-166, 2010.

SILVEIRA, V. D. **Micologia**. 5ª edição, editora Universidade Rural, 1996.

SOGLIA, S. L. O. **Enriquecimento de leite tipo C com ferro aminoácido quelato: biodisponibilidade e características físico-químicas e sensoriais**. (dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1996.

SOUZA, A. I.; FILHO, M. B. Diagnóstico e tratamento das anemias carenciais na gestação: consensos e controvérsias. **Revista de Saúde Materno Infantil**, v. 3, n. 4, p. 473-479, 2003.

SOUZA, L. F., PERES, A. P., MARTINS, B. V. **Estudo do desenvolvimento micelial através do cultivo da *Lentinula edodes* em resíduos agroindustriais e de indústrias madeireiras da região de Ponta Grossa**. Ponta Grossa: Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal Tecnológica do Paraná, 2007.

STURION, G. L.; OETTERER M. Composição química de cogumelos comestíveis (*Pleurotus* spp.) originados em diferentes substratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 15, p. 189-193, 1995.

STURION, G. L.; RANZANI, M. R. T. C. Composição em minerais de cogumelos comestíveis cultivados no Brasil – *Pleurotus* spp. e outras espécies desidratadas. **Archivos Latinos Americanos de Nutricion**, v. 50, n. 1, p. 102-108, 2000.

SUBHASH, M. N.; VINOD, K. Y.; SRINIVAS, B. N. Differential effect of lithium on 5-HT₁ receptor-linked system in regions of rat brain. **Neurochemistry International**, v. 35, p. 337, 1999.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEIS, S. J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2ª ed., Porto Alegre, Departamento de Solos, UFRGS, p. 174, 1995.

TUBEK, S. Zinc supplementation or regulation of its homeostasis: advantages and threats. **Biological Trace Element Research**, v. 119, p. 1-9, 2007.

TUZEN, M. Determination of heavy metals in soil, mushroom and plant samples by atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v.74, p. 289-297, 2003.

TYLER, G. Accumulation and exclusion of metals in *Collybia peronata* and *Amanita rubescens*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 79, p. 239-245, 1982.

VALLEE, B. L.; FALCHUK, K. H. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiological Reviews**, v. 73, p. 79-94, 1993.

VETTER, J. Data on arsenic and cadmium contents of some common mushrooms. **Toxicon**, v. 32, p. 11-15, 1994.

VETTER, J. Lithium content of some common edible wild-growing mushrooms. **Food Chemistry**, v. 90, p. 31-37, 2005.

VILELA, P. S. FAEMG - Federação da Agricultura e Pecuária de Minas Gerais **Cogumelos - mercado e comercialização**. Disponível em: www.faemg.org.br
Acesso: 01/09/2009, 2007.

VILLAS-BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço de maçã: enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, v.14, nº 1, p. 38-42, 2000.

WEINER, M. L. Overview of lithium toxicology. In Schrauzer G. N.; Klippel, K. F. (eds): "**Lithium in Biology and Medicine**". Weinheim: VCH Verlag, p. 83-99, 1991.

WELCH, R. M. Distribution and transport of zinc in plants. In: ROBSON, A. D. (ed), Zinc and soil and plants. Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers**, p.183-195, 1993.

WELCH, R. M.; HOUSE, W. A.; BEEBE, S.; CHENG, Z. Genetic selection for enhanced bioavailable levels of iron in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3576-3580, 2000.

WELZ, B. **Atomic Absorption Spectrometry**, 2° ed., VCH, Weinheim, 1985.

WERNER, A.; BEELMAN, R. Growing selenium-rich mushrooms by adding controlled amounts of selenium to the compost at spawning. **Mushroom News**, v. 49, p. 4-11, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005 : **WHO global database on anaemia**. Geneva: WHO, 2008.

YILDIZ, A.; YESIL, Ö. F. The effect of ferrum (FeSO_4) on culture mushroom: *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kumm. **Journal Biological Turkey**, v. 30, p. 227-230, 2006.

ZAIDMAN, B. Z.; YASSIN, M.; MAHAJNA, J.; WASSER, S. P. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, p. 453-468, 2005.

ANEXOS

Quadro 3. Resumo da análise de variância para as variáveis EB, PTN, S, Ca, K, P, Fe, Mg, Zn e Li de cogumelos *Pleurotus ostreatus* enriquecidos ou não com diferentes doses de sulfato ferroso para 3 frutificações.

Fonte de Variação	G.L.	EB	PTN	S	Ca	QM K	P	Fe	Mg	Zn
Frutificação	2	941,93*	52,5104*	1,2076 ^{n.s.}	0,0037 ^{n.s.}	57,3766*	32,0665*	0,0320*	0,0702 ^{n.s.}	0,0003 ^{n.s.}
Dose	5	13,6925 ^{n.s.}	46,5928*	114,2118*	0,4800*	279,9049*	24,4335*	0,0103*	1,5194*	0,0003 ^{n.s.}
Frutificação*Dose	10	20,1979*	13,2459 ^{n.s.}	8,9071 ^{n.s.}	0,1122 ^{n.s.}	14,9470 ^{n.s.}	2,08136 ^{n.s.}	0,0045 ^{n.s.}	0,0375 ^{n.s.}	0,0001 ^{n.s.}
Resíduo	36	6,5536	9,96	9,8352	0,0858	16,1892	1,8356	0,0041	0,0856	0,0002
Fonte de Variação	G.L.	Li								
Frutificação	2	0,0000 ^{n.s.}								
Dose	5	0,0000 ^{n.s.}								
Frutificação*Dose	10	0,0000 ^{n.s.}								
Resíduo	18	0,0002								

G.L. – Graus de liberdade

QM – Quadrado médio

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade

^{n.s.} Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade

Quadro 4. Resumo da análise de variância para as variáveis EB, PTN, S, Ca, K, P, Fe, Mg, Zn e Li de cogumelos de *Pleurotus ostreatus* enriquecidos ou não com diferentes doses de carbonato de zinco para 3 frutificações.

Fonte de Variação	G.L.	QM								
		EB	PTN	S	Ca	K	P	Fe	Mg	Zn
Frutificação	2	2245,5996*	4,2935 ^{n.s.}	8,5207*	0,0009 ^{n.s.}	78,9486*	23,4119*	0,0087*	0,1862*	0,0009*
Dose	5	7,20260 ^{n.s.}	4,2400 ^{n.s.}	23,3647*	0,3006*	90,3100*	7,5078*	0,0024 ^{n.s.}	0,3983*	0,0004*
Frutificação*Dose	10	39,9601*	11,08170 ^{n.s.}	1,4327 ^{n.s.}	0,11020 ^{n.s.}	9,1521 ^{n.s.}	2,9190*	0,0015 ^{n.s.}	0,0559*	0,0002 ^{n.s.}
Resíduo	36	11,4108	10,8327	1,2688	0,0665	5,1547	0,6153	0,0012	0,0141	0,0001
Fonte de Variação	G.L.	Li								
Frutificação	2	0,0001 ^{n.s.}								
Dose	5	0,0005 ^{n.s.}								
Frutificação*Dose	10	0,0002 ^{n.s.}								
Resíduo	18	0,0002								

G.L. – Graus de liberdade

QM – Quadrado médio

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade

^{n.s.} Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade

Quadro 5. Resumo da análise de variância para as variáveis EB, PTN, S, Ca, K, P, Fe, Mg, Zn e Li de cogumelos de *Pleurotus ostreatus* enriquecidos ou não com diferentes doses de carbonato de lítio para 3 frutificações.

Fonte de Variação	G.L.	EB	PTN	S	Ca	QM K	P	Fe	Mg	Zn
Frutificação	2	975,0320*	12,2054 ^{n.s.}	1,1746 ^{n.s.}	1,3163 ^{n.s.}	83,5930*	13,6974*	0,0179*	0,0591 ^{n.s.}	0,0006 ^{n.s.}
Dose	4	20,4470 ^{n.s.}	16,7462 ^{n.s.}	41,9710*	0,9417 ^{n.s.}	295,4941*	20,0510*	0,0006 ^{n.s.}	0,7798 ^{n.s.}	0,0012 ^{n.s.}
Frutificação*Dose	8	8,9125 ^{n.s.}	10,0420 ^{n.s.}	2,0031 ^{n.s.}	0,4868 ^{n.s.}	4,5319 ^{n.s.}	0,2165 ^{n.s.}	0,0007 ^{n.s.}	0,0283 ^{n.s.}	0,0008 ^{n.s.}
Resíduo	30	10,7114	9,3812	1,6411	0,6315	14,1465	0,9947	0,0006	0,0371	0,0005
Fonte de Variação	G.L.	Li								
Frutificação	2	0,0011 ^{n.s.}								
Dose	4	0,0256*								
Frutificação*Dose	8	0,0016 ^{n.s.}								
Resíduo	27	0,0019								

G.L. – Graus de liberdade

QM – Quadrado médio

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade

^{n.s.} Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade