

Determinação do ergosterol no cogumelo ostra (*Pleurotus ostreatus*) cultivado em borras de café e palha de trigo

Determination of ergosterol in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) cultivated in coffee grounds and wheat straw

Sofia Ricardo¹, Ana Sanches-Silva^{2,3}, Fernando Ramos^{1,4}, Maria Conceição Castilho¹

ana.silva@insa.min-saude.pt

(1) Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

(2) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(3) Centro de Estudos de Ciência Animal, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

(4) Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

_Resumo

Um dos cogumelos comestíveis que tem suscitado maior interesse nos últimos anos é o *Pleurotus ostreatus*, conhecido como cogumelo ostra, devido à facilidade de cultivo e ao seu grande potencial económico e qualidade nutricional. Existe, assim, a necessidade de estudar a sua composição em nutrientes e compostos bioativos para valorizar o seu cultivo. Este estudo teve por objetivo determinar o teor de ergosterol, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detetor de Ultravioleta-Visível, do cogumelo *Pleurotus ostreatus* cultivado em diferentes substratos, nomeadamente, borras de café e palha de trigo. Verificou-se que as amostras de cogumelo *P. ostreatus* cultivadas em borras de café apresentaram uma concentração de ergosterol superior ($4,06 \pm 0,32$ mg/g de matéria seca) relativamente às amostras da mesma espécie de cogumelo cultivadas em palha de trigo ($3,34 \pm 0,19$ mg/g de matéria seca). O uso das borras de café no substrato de crescimento de cogumelos ostra permitiu um aumento da concentração de ergosterol. No futuro seria de todo o interesse avaliar a influência do uso deste subproduto no substrato de crescimento de outras espécies comestíveis de cogumelos e no teor de outros compostos bioativos.

_Abstract

One of the edible mushrooms that have attracted more interest in recent years is *Pleurotus ostreatus*, known as the oyster mushroom, due to the ease of cultivation and its great economic potential and nutritional quality. Therefore there is the need to study its composition in nutrients and bioactive compounds to enhance its cultivation. This study aimed to determine the ergosterol content by high-performance liquid chromatography coupled to the ultraviolet-visible detector of *Pleurotus ostreatus* mushroom grown on different substrates, namely coffee grounds and wheat straw. Samples of *P. ostreatus* mushroom cultivated in coffee grounds showed a higher concentration of ergosterol ($4.06 / g \pm 0.32$ mg dry matter) than the samples of the same species of mushroom grown on wheat straw ($3.34 / g \pm 0.19$ mg dry matter). The use of coffee grounds on the oyster mushroom growth substrate allowed obtaining an increase in ergosterol concentration. In the future it would be of great interest to evaluate the influence of the use of this by-product on the growth substrate of other edible mushrooms species and on the content of other bioactive compounds.

_Introdução

Os cogumelos comestíveis são apreciados em todo o mundo não só pela sua textura e sabor, mas também pelas suas propriedades nutricionais e funcionais.

Estas propriedades devem-se ao facto dos cogumelos possuírem compostos bioativos, nomeadamente, ergosterol (precursor da vitamina D2), compostos fenólicos, tocoferóis, ácido ascórbico e carotenoides, responsáveis pela atividade antioxidante, pelo que podem ser associados à promoção da saúde (1,2).

Um dos cogumelos comestíveis que tem suscitado maior interesse nos últimos anos é o *Pleurotus ostreatus*, conhecido como cogumelo ostra (figura 1), devido à facilidade de cultivo e ao seu grande potencial económico e qualidade nutricional. Existe, assim, a necessidade de estudar a sua composição em nutrientes e compostos bioativos para valorizar o seu cultivo.

Figura 1:  Cogumelo ostra (*Pleurotus ostreatus*)





_Objetivo

Este estudo tem por objetivo determinar o ergosterol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detetor Ultravioleta-Visível (HPLC-UV, *High Performance Liquid Chromatography coupled with Ultraviolet-Visible detector*) do cogumelo *Pleurotus ostreatus* cultivado em diferentes substratos, nomeadamente, borras de café e palha de trigo.

_Material e métodos

Na determinação de ergosterol foram utilizadas dois tipos de amostras, cogumelos *Pleurotus ostreatus* cultivados em borras de café e cultivados em palha de trigo. As amostras de cogumelo cultivadas em borras de café e palha de trigo, ambas congeladas, foram submetidas a um processo de liofilização. As amostras liofilizadas foram posteriormente trituradas até à obtenção de um pó, o qual foi armazenado, num recipiente hermeticamente fechado, à temperatura de refrigeração. No processo de extração de ergosterol utilizaram-se solventes de grau analítico HPLC e a água utilizada no processo de extração foi obtida por um sistema da Millipore (Milli-Q Integral 10, Billerica, E.U.A.). Na análise de quantificação de ergosterol foi usado o padrão de ergosterol adquirido à Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA).

A solução padrão de ergosterol foi preparada com uma concentração de 8 mg/mL e armazenada à temperatura de refrigeração, devidamente protegida da luz, dado que o ergosterol é fotossensível. A partir da solução padrão foram realizadas diluições e obtidas soluções trabalho, num intervalo de 200-2000 µg/mL para a realização das curvas de calibração. A composição da fase móvel foi baseada nos estudo de Schwarzdorf & Muller (3) e de Abreu (4), nos quais a quantificação do ergosterol foi realizada por HPLC em fase normal. A fase móvel consiste exclusivamente em isooctano, filtrado sob vácuo através de um filtro de membrana (0,2 µm de poro), e desgaseificado por ultrassons durante 30 minutos.

A extração de ergosterol nas amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus* baseou-se na saponificação seguida da extração líquido-líquido da fração insaponificável e na concentração da solução por evaporação do solvente de extração.

As amostras foram preparadas de acordo com o método adaptado de Schwarzdorf & Muller (3). Foram pesados 0,5 g de amostra liofilizada em pó para um balão Erlenmeyer de vidro âmbar. De seguida, adicionou-se 15 mL de metanol, 10 mL de etanol e 4 g de hidróxido de potássio (KOH). A mistura foi submetida a um aquecimento a 80 °C, sob refluxo, durante 30 minutos. Após o arrefecimento procedeu-se à filtração da mistura, sob vácuo, através de um funil de Büchner, arrastando-se os resíduos existentes no balão Erlenmeyer com 5 mL de metanol. O filtrado foi transferido para uma ampola de decantação, lavando o recipiente com 5 mL de água ultrapura. A mistura saponificada foi agitada com 10 mL de *n*-hexano durante 1 minuto no vortex, deixando-se repousar para uma completa separação das duas fases. A fase superior (*n*-hexano) foi retirada, extraindo-se, novamente, a fase inferior com 5 mL de *n*-hexano. Repetiu-se a extração com mais 5 mL de *n*-hexano. As fases superiores foram filtradas através de papel de filtro Whatman nº 1 e sulfato de sódio anidro. O filtrado final foi de seguida evaporado, até à secura, num evaporador rotativo a uma temperatura de 40 °C. O resíduo final foi redissolvido em 5 mL de isooctano (fase móvel) e filtrado utilizando filtros de seringa (0,45 µm de poro).

As condições da análise de ergosterol por HPLC-UV estão resumidas na **tabela 1**. Os parâmetros de validação determinados neste estudo foram baseados nas recomendações e critérios de organizações internacionais de elevada relevância científica (5-7).

Tabela 1: ⬇️ Condições do método de HPLC-UV-Vis para a determinação do ergosterol em amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus*.

Equipamento	HPLC-UV-Vis composto por uma bomba Gilson modelo 307 (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, França)
Fase estacionária	Coluna de fase normal de Sílica Nucleosil 100-5 (25 cm x 4,6 mm; diâmetro de partícula 5 µm) da HICHROM® (Inglaterra)
Fase móvel	Isooctano
Fluxo da fase móvel	1,5 ml/min
Eluição	Modo isocrático
Volume de injeção	20 µL
Temperatura da Coluna	Temperatura ambiente
Temperatura do Injetor	Temperatura ambiente
λ	282 nm

_Resultados e discussão

O método cromatográfico desenvolvido para a determinação de ergosterol provou ser específico, seletivo e rápido, apresentando a deteção de ergosterol um tempo de retenção de aproximadamente 3,2 minutos (8). A linearidade do método foi satisfatória ($r^2 = 0,9969$) num intervalo de 200 a 2000 µg/mL. A precisão intra-dia e inter-dia para a amostra de cogumelo cultivado em borras de café, apresentou valores de desvio padrão relativo (% RSD) de 4,9% e 7,8%, respetivamente (8). No caso da amostra de cogumelo cultivado em palha de trigo, os valores de precisão intra-dia e inter-dia foram de 2% e de 5,8%, respetivamente (8). A metodologia de extração desenvolvida apresentou resultados de recuperação do ergosterol entre 78,2 e 101% para os três níveis de concentração estudados (8).

Segundo Savón *et al.* (9), o teor de ergosterol no cogumelo depende de fatores ambientais, principalmente, da luz, temperatura, humidade, concentração de acetato de sódio e do tipo de substrato utilizado.

No presente estudo verificou-se que as amostras de cogumelo *P. ostreatus* cultivado em borras de café apresentaram uma concentração de ergosterol superior ($4,06 \pm 0,32$ mg/g matéria seca) relativamente às amostras de cogumelo *P. ostreatus* cultivado em palha de trigo ($3,34 \pm 0,19$ mg/g matéria seca), sendo

que os resultados indicam que o substrato à base de borras de café poderá ter influência no aumento da concentração de ergosterol (8).

Na literatura existem vários dados sobre o teor de ergosterol de outras espécies de cogumelos comestíveis, bastante procuradas, como é o caso dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus bisporus* (cogumelo de Paris). No caso do cogumelo *Lentinula edodes* os valores do teor de ergosterol encontrados variam entre 5,51 mg/g a 6,79 mg/g em matéria seca (10-12). Enquanto no cogumelo *Agaricus bisporus* o teor variou entre 3,06 mg/g a 7,80 mg/g em matéria seca (11, 12).

De acordo com o estudo de Jasinghe *et al.* (11), os cogumelos *Lentinula edodes* (6,05 mg/g) e *Agaricus bisporus* (7,80 mg/g) apresentaram um teor de ergosterol superior relativamente ao cogumelo *P. ostreatus*, o que também se verifica no presente estudo. Gil-Ramirez *et al.* (12) verificaram também que o cogumelo *Lentinula edodes* (5,51 mg/g) apresentou um teor de ergosterol superior ao cogumelo *P. ostreatus*. Porém, o cogumelo *Agaricus bisporus* (3,06 mg/g) apresentou um teor de ergosterol bastante próximo do *P. ostreatus* quer no mesmo estudo quer no presente trabalho.

Verificou-se, também, que a espécie *P. ostreatus* possui um teor de ergosterol superior em comparação a outras espécies

artigos breves_ n. 7

de cogumelos comestíveis, obtidas comercialmente, bastante apreciadas, tais como, *Lactarius deliciosus* (1,60 mg/g), *Ganoderma lucidum* (0,69 mg/g), *Agaricus blazei* (1,73 mg/g), *Cantharellus cibarius* (2,61 mg/g) e *Flammulina velutipes* (0,53 mg/g) (11, 12).

Conclusão

O conhecimento científico de determinados compostos, como o ergosterol, em cogumelos ostra cultivados em Portugal é escasso, pelos que os resultados deste estudo são importantes para valorizar e incentivar o cultivo e o consumo deste alimento funcional, que constitui, também, uma fonte promissora de compostos bioativos para suplementos alimentares e fórmulas farmacêuticas.

Por outro lado, o reaproveitamento de subprodutos da indústria alimentar, como as borras de café, é importante para a sustentabilidade de toda a cadeia alimentar. Assim, no futuro seria de todo o interesse a avaliação da influência deste subproduto no substrato de crescimento de outras espécies comestíveis de cogumelos e no teor de outros compostos bioativos.

Referências bibliográficas:

- (1) Ferreira IC, Barros L, Abreu RM. Antioxidants in wild mushrooms. *Curr Med Chem*. 2009;16 (12):1543-60.
- (2) Barros L, Dueñas M, Ferreira IC, et al. Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food Chem Toxicol*. 2009;47(6):1076-9.
- (3) Schwadorf K, Müller HM. Determination of ergosterol in cereals, mixed feed components, and mixed feeds by liquid chromatography. *J Assoc Off Anal Chem*. 1989;72(3):457-62.
- (4) Abreu V. Comparação de dois métodos para avaliação da qualidade micológica da matéria-prima utilizada na indústria do concentrado de tomate. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 1998.
- (5) Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Reviewer guidance: validation of chromatographic methods. Rockville, MD: US FDA Federal Register, 1994. www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf
- (6) International Conference on Harmonization. Guidance for industry: Q2B validation of analytical procedures: methodology. Rockville, MD: US FDA Federal Register, 1996. www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073384.pdf
- (7) The United States pharmacopeia (29th revision). Validation of Compendial Methods [Em linha]. Rockville, Md.: United States Pharmacopeial Convention, Inc. [Consul. 20/7/ 2013]. www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1225.html

- (8) Ricardo SCN. Quantificação do teor de ergosterol por HPLC-UV e determinação da actividade antioxidante no cogumelo *Pleurotus ostreatus* comercializado e cultivado em borras de café e palha de trigo. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2013.
- (9) Savón RCB, Fernández CD, Manrique CEM, et al. Efecto de la luz en la concentración de micosteroles de *Pleurotus ostreatus* var. Florida. *Rev Cubana Aliment Nutr*. 2002;16(1):13-8. http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol16_1_02/ali02102.pdf
- (10) Mattila PH, Lampi AM, Ronkainen R, et al. Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chem*. 2002;76(3):293-98.
- (11) Jasinghe VJ. Conversion of ergosterol in edible mushrooms to vitamin D2 by irradiation. Tese de doutoramento apresentada ao Department of Chemistry of the National University of Singapore, 2005.
- (12) Gil-Ramirez A, Clavijo C, Palanisamy M, et al. Edible mushrooms as potential sources of new hypocholesterolemic compounds. *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, 2011. www.wsbmp.org/proceedings/7th%20international%20conference/2/P13.pdf