

**CAFEÍNA EM COGUMELO *Pleurotus ostreatus* CULTIVADO COM RESÍDUOS DE  
CAFÉ**

GUARAPUAVA-PR

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE

**CAFEÍNA EM COGUMELO *Pleurotus ostreatus* CULTIVADO COM RESÍDUOS DE  
CAFÉ**

Dissertação de Mestrado

Andressa Navarro Ramalho

GUARAPUAVA – PR

2015

Catálogo na Publicação

Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

Ramalho, Andressa Navarro

R165c      Cafeína em cogumelo *Pleurotus ostreatus* cultivado com resíduos de café / Andressa Navarro Ramalho. -- Guarapuava, 2015

xiii, 79 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, 2015

Orientadora: Yohanda Reyes Torres

Banca examinadora: Domingos Sávio Nunes, Maria de Lourdes Felsner

Bibliografia

1. Química. 2. Química aplicada. 3. *Pleurotus ostreatus*. 4. Café. 5. Cafeína. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

CDD 633.73

ANDRESSA NAVARRO RAMALHO

**CAFEÍNA EM COGUMELO *Pleurotus ostreatus* CULTIVADO COM RESÍDUOS DE  
CAFÉ**

Dissertação apresentada sob orientação da Profa. Dra. Yohandra Reyes Torres, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química, pelo Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, na Universidade Estadual do Centro-Oeste

Orientadora: Profa. Dra. Yohandra Reyes Torres

GUARAPUAVA – PR

2015

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me guiar para os melhores caminhos, por sempre me iluminar em todos os momentos que preciso, por ter abençoado minha graduação e pós-graduação, por ter dado as forças que eu precisava para me manter firme e por ter colocado as pessoas certas em meu caminho.

Agradeço à Prof. Dra. Yohandra por esses três anos de orientação, entre TCC e mestrado. Por me ensinar valores profissionais e pessoais. Pela sua incansável ajuda e perfeita orientação. Com certeza levarei para o resto da minha vida todo o aprendizado adquirido nesse período.

Agradeço à minha família, que mesmo longe me aconselham, brigam quando necessário, elogiam e acreditam em mim, no meu potencial. A força que eu carrego comigo com certeza vem deles.

Agradeço ao Guilherme Pimpão, meu namorado, meu amigo, meu psicólogo, meu amor. Por todos os dias de nervosismo em que estive ao meu lado, por todas as palavras aconchegantes (ou não) no momento certo. Pelo carinho quando precisava, pela ajuda quando (quase) enlouquecia. Por sempre me incentivar a continuar.

Agradeço à Thiellen, minha querida amiga, por todos os momentos no lab, momentos de desabafo, momentos de descontração, momentos de tensão, momentos de alegria, momentos de concentração, momentos de apoio, etc. Agradeço por ter construído uma amizade tão pura nesse tempo de convívio.

Não podia faltar a chefona do CRONAT Chris! Acho que ela é a pessoa mais bem humorada e disposta que eu conheço. Sempre ajudando todo mundo com alegria. Tornando o ambiente de trabalho aconchegante e feliz. Agradeço por essa amizade.

Agradeço à Prof. Herta, que sempre quando pedi sua ajuda, estava à disposição, com alegria e humildade.

Agradeço aos colegas do CRONAT. Ao Denys pela parceria durante esses dois anos (espero que perdure).

Por fim, agradeço à CAPES pela bolsa concedida.

## RESUMO

Cogumelos pertencem ao Reino Fungi e são utilizados para diversos fins, como por exemplo, na culinária, na medicina, como alucinógenos, com fins ornamentais, porém também há aqueles que são venenosos. Houve um aumento no interesse na produção e consumo de cogumelos comestíveis, particularmente no gênero *Pleurotus*. O cultivo do *Pleurotus* pode ser realizado em diversos substratos como a polpa de café, cana de açúcar e farelos de trigo, entre outros. A composição química do cogumelo é influenciada pelo substrato em que é cultivado podendo ocorrer a absorção e/ou modificação de compostos originalmente presentes no substrato. O estudo focou o *Pleurotus ostreatus*, cujo nome popular no Japão é Hiratake, e é o quarto cogumelo comestível mais consumido no mundo, chamado comumente de carne vegetariana por ser rico em proteínas. Este estudo teve como objetivo principal determinar o teor de cafeína em cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus*, inoculados com sementes desenvolvidas em substrato a base de resíduo de café e inoculadas em feno e cogumelos produzidos diretamente na semente de café, sem uso do feno. Adicionalmente, almejou-se a identificação por CG-EM de compostos presentes nos extratos metanólicos do cogumelo. A otimização foi feita utilizando planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para o processo de extração de cafeína, seguida da validação do método de determinação por CLAE-UV. Constatou-se que o cogumelo inoculado diretamente na semente de café, sem o uso do feno, absorveu a cafeína pelo seu micélio, e as concentrações encontradas no cogumelo liofilizado variaram de 589,6 a 975,0 µg/g. Já os cogumelos inoculados com sementes desenvolvidas em substrato a base de resíduo de café e inoculadas em feno, apresentaram valores de cafeína abaixo do limite de quantificação. Em relação aos flavonoides, as amostras apresentaram teores entre 45,12 e 114,31 µg/g. No entanto, o cogumelo crescido com sementes de café ainda contém quantidades significativas de compostos fenólicos e, em particular, o cogumelo cultivado diretamente na semente de café mostrou uma maior atividade antirradicalar em relação aos demais. Por fim, foram identificados por CG-EM ácidos graxos, terpenos e esteróis presentes nas amostras de cogumelo. Foi confirmada a presença de cafeína somente nos extratos dos cogumelos produzidos com sementes desenvolvidas em substrato a base de resíduo de café e inoculadas em feno e nos extratos produzidos diretamente na semente de café, sem uso do feno, demonstrando que cogumelos podem absorber cafeína a partir do substrato.

## ABSTRACT

Mushrooms are fungi which are used for various purposes, such as in cuisine, medicine, as hallucinogens, ornamental purposes, although there are also those which are poisonous. There has been an increasing interest in producing and consuming edible mushrooms, particularly those belonging to the genus *Pleurotus*, due to its easy availability. Fermentation of *Pleurotus* can be done on diverse substrates such as waste pulp of coffee, sugarcane and wheat brans, among others. The chemical composition of mushrooms is affected by the substrate because compounds originally found in substrates may be absorbed or modified by the mushrooms enzymes. The study focused on the *Pleurotus ostreatus*, whose popular name in Japan is hiratake, and it is the fourth most consumed edible mushroom in the world, commonly called vegetarian meat because its high protein content. This study aimed to determine the caffeine content in edible *Pleurotus* mushrooms that were inoculated with seeds developed on caffeic substrates and inoculated into hay and in mushrooms produced directly on the coffee seed, without using hay. Additionally, we pursued to identify organic compounds in methanolic extracts of mushrooms using GC-MS. Caffeine extraction from mushrooms was optimized by factorial design  $2^2$  followed by validation of and HPLC-UV method for caffeine determination. It was found that the fungus inoculated directly into the coffee seed, without the use of hay, absorbed caffeine through its mycelium and caffeine concentrations in lyophilized mushrooms ranged between 589.6 to 975.0  $\mu\text{g/g}$ . For mushrooms grown on coffee residues and inoculated into hay, caffeine was below the limit of quantification. Regarding the amounts of flavonoids, all samples showed relatively low levels. However, mushrooms grown in coffee seeds contained significant amounts of phenolic compounds and, in particular, the mushroom grown directly on the coffee seeds showed greater antiradical activity than the others. Finally, fatty acids, terpenes and sterols were identified by GC-MS in the mushroom samples. The presence of caffeine was confirmed only in mushrooms that had been grown in caffeic substrates, demonstrating that mushrooms can absorb caffeine from substrates.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>i</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>iv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1 Introdução</b> .....	<b>15</b>
<b>1.2 Objetivos</b> .....	<b>16</b>
1.2.1 Objetivo Geral .....	16
1.2.2 Objetivos Específicos .....	16
<b>1.3 Referências</b> .....	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO 2. CONSIDERAÇÕES GERAIS: COGUMELOS E CAFEÍNA</b> .....	<b>18</b>
<b>2. CONSIDERAÇÕES GERAIS: COGUMELOS E CAFEÍNA</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 Reino <i>Fungi</i></b> .....	<b>19</b>
2.1.1 Cogumelos.....	20
<b>2.2 Cafeína</b> .....	<b>22</b>
2.2.1 Técnicas analíticas para análise de cafeína .....	23
<b>2.3 Referências</b> .....	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO 3. AMOSTRAGEM</b> .....	<b>29</b>
<b>3. AMOSTRAGEM</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1 Amostras de <i>Pleurotus ostreatus</i></b> .....	<b>32</b>
<b>3.2 Referências</b> .....	<b>33</b>

<b>CAPÍTULO 4. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DA CAFEÍNA A PARTIR DAS AMOSTRAS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> .....</b>	<b>34</b>
<b>4. EXTRAÇÃO DA CAFEÍNA A PARTIR DAS AMOSTRAS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> .</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Materiais e Métodos.....</b>	<b>36</b>
4.1.1 Amostras.....	36
4.1.1.1 Análises cromatográficas por CLAE-UV .....	36
4.1.1.2 Otimização da metodologia de extração da cafeína em amostras de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	37
<b>4.2 Resultados e Discussão .....</b>	<b>39</b>
4.2.1 Extração de cafeína a partir das amostras de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	39
<b>4.3 Conclusões Parciais.....</b>	<b>42</b>
<b>4.4 Referências .....</b>	<b>43</b>
<b>CAPÍTULO 5. VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO DE CLAE-UV PARA DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM COGUMELO <i>Pleurotus ostreatus</i> .....</b>	<b>44</b>
<b>5. VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO DE CLAE-UV PARA DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM COGUMELO <i>Pleurotus ostreatus</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1 Materiais e Métodos.....</b>	<b>46</b>
5.1.1 Amostras.....	46
5.1.2 Determinação de cafeína em cogumelos <i>Pleurotus ostreatus</i> por CLAE-UV .....	47
5.1.2.1 Validação do método de CLAE-UV para determinação de cafeína em cogumelo <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	47
5.1.2.1.1 Seletividade .....	47
5.1.2.1.2 Linearidade.....	47
5.1.2.1.3 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD).....	48
5.1.2.1.4 Precisão intermediária e Repetitividade .....	48
5.1.2.1.5 Exatidão.....	49
5.1.2.2 Análise Estatística .....	49
<b>5.2 Resultados e Discussão .....</b>	<b>50</b>
5.2.1 Seletividade .....	50
5.2.2 Linearidade.....	51
5.2.3 Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ) .....	53
5.2.4 Precisão .....	53

5.2.5 Exatidão.....	54
<b>5.3 Aplicação do método validado para quantificação de cafeína nas amostras CF e C de cogumelo por CLAE-UV .....</b>	<b>55</b>
<b>5.4 Conclusões parciais.....</b>	<b>56</b>
<b>5.5 Referências .....</b>	<b>57</b>
<b>CAPÍTULO 6. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DAS AMOSTRAS DE COGUMELO <i>Pleurotus ostreatus</i> .....</b>	<b>58</b>
<b>6. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DAS AMOSTRAS DE COGUMELO <i>Pleurotus ostreatus</i> .....</b>	<b>59</b>
<b>6.1 Materiais e Métodos.....</b>	<b>60</b>
6.1.1 Preparação dos extratos metanólicos das amostras de cogumelo .....	60
6.1.2 Análises quantitativas dos extratos metanólicos provenientes dos cogumelos CF, C e TF .....	61
6.1.2.1 Determinação do teor de Flavonóides .....	62
6.1.2.2 Determinação do teor de Fenólicos totais .....	62
6.1.2.3 Determinação da atividade antirradicalar dos extratos dos cultivados de <i>Pleurotus ostreatus</i> baseada no método do radical DPPH· .....	63
6.1.3 Identificação de compostos presentes nos extratos metanólicos das amostras de <i>Pleurotus ostreatus</i> por CG-EM .....	64
<b>6.2 Resultados e Discussão .....</b>	<b>65</b>
6.2.1 Teores de compostos fenólicos e capacidade antirradicalar de extratos metanólicos dos cogumelos CF, C e TF .....	65
6.2.2 Identificação de compostos presentes nos extratos metanólicos das amostras de <i>Pleurotus ostreatus</i> por CG-EM .....	68
<b>6.3 Conclusões Parciais.....</b>	<b>73</b>
<b>6.4 Referências .....</b>	<b>74</b>
<b>CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>76</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Cogumelo <i>Pleurotus ostreatus</i> popularmente conhecido como cogumelo ostra.....	21
<b>Figura 2.2.</b> Estrutura molecular de uma xantina e seus derivados.....	22
<b>Figura 3.1.</b> Ciclo de vida dos cogumelos.....	31
<b>Figura 3.2.</b> Aspecto físico das amostras de cogumelo <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	32
<b>Figura 4.1.</b> Extração da cafeína das amostras de cogumelo TF seguindo a matriz do planejamento factorial 2 <sup>2</sup> .....	38
<b>Figura 4.2.</b> Curva de calibração por padrão externo de cafeína obtida por metodologia CLAE-UV.....	40
<b>Figura 4.3.</b> Gráfico de Pareto proveniente da análise dos efeitos padronizados do planejamento fatorial no nível de 95% de confiança.....	42
<b>Figura 5.1.</b> Cromatogramas monitorados a $\lambda = 274$ nm e espectros UV do pico cromatográfico de cafeína (A) da solução padrão de cafeína de 180 mg/L e (B) do extrato de cogumelo enriquecido com cafeína na concentração de 180 mg/L.....	50
<b>Figura 5.2.</b> Cromatograma do extrato de cogumelo não enriquecido com cafeína (TF).....	51
<b>Figura 5.3.</b> Retas da regressão linear a 95% de confiança para a curva de calibração do método.....	53
<b>Figura 6.1.</b> Etapas da preparação do extrato metanólico das amostras dos cogumelos produzidos com sementes desenvolvidas em grãos de trigo e inoculadas no feno (TF); cogumelos produzidos diretamente na semente de café, sem uso do feno (C) e cogumelos produzidos com sementes desenvolvidas em borra de café e inoculadas em feno (CF).....	61
<b>Figura 6.2.</b> Cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas Agilent Technologies modelo 5975 VLMSD.....	64
<b>Figura 6.3.</b> Cromatogramas obtidos por CG-EM para as amostras de cogumelo (A) produzido com sementes desenvolvidas em grãos de trigo e inoculadas no feno, (B) produzido com sementes desenvolvidas em borra de café e inoculadas em feno e (C) produzido diretamente na borra de café, sem uso do feno.....	69
<b>Figura 6.4.</b> Cromatogramas ampliados obtidos por CG-EM para as amostras de cogumelo (A) produzido com sementes desenvolvidas em grãos de trigo e	

inoculadas no feno, (B) produzido com sementes desenvolvidas em borra de café e inoculadas em feno e (C) produzido diretamente na borra de café, sem uso do feno.....	70
<b>Figura 6.5.</b> Estrutura química do lupeol.....	72
<b>Figura 6.6.</b> Estrutura química do ergosterol.....	73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1.</b> Matriz do planejamento fatorial $2^2$ representando os níveis e disposição das variáveis: volume de HCl e tempo de sonicação no procedimento de extração de cafeína em <i>Pleurotus ostretatus</i> .....	37
<b>Tabela 4.2.</b> Teores de cafeína obtidos pelo planejamento fatorial $2^2$ para as variáveis volume de HCl e tempo de sonicação, bem como os efeitos calculados.....	41
<b>Tabela 5.1.</b> Resultados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança.....	52
<b>Tabela 5.2.</b> Resultados do estudo de precisão para determinação de cafeína em cogumelos por CLAE-UV.....	54
<b>Tabela 5.3.</b> Valores de recuperação para a determinação de cafeína em cogumelos pelo método de CLAE-UV.....	54
<b>Tabela 5.4.</b> Teores de cafeína das amostras de cogumelo CF e C.....	56
<b>Tabela 6.1.</b> Teores de flavonoides, fenólicos e atividade antirradicalar ( $EC_{50}$ ) dos extratos das amostras de cogumelo.....	66
<b>Tabela 6.2.</b> Principais compostos identificados nos extratos metanólicos das amostras de cogumelo por CG-EM.....	71

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
LDL	Low Density Lipoproteins
HDL	High Density Lipoproteins
DEALI	Departamento de Engenharia de Alimentos
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção no Ultra-Violeta
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CRONAT	Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais
DPR	Desvio-Padrão Relativo
DPPH	2,2-difenil-1-picrihidrazil
EC <sub>50</sub>	Concentração mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH.
EM	Espectrometria de Massas
$F_{faj}$	$F$ para falta de ajuste
$F_{obs}$	$F$ observado
$F_{regressão}$	$F$ para regressão
IV	Infravermelho
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
$r$	Coefficiente de correlação
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
Rec	Recuperação
UV	Ultra-Violeta
UV/Vis	Ultra-Violeta/Visível

## **CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

# 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

## 1.1 Introdução

Os cogumelos são pertencentes ao reino *Fungi* e utilizados para diversas finalidades, como produto alimentício, ornamental e medicinal. Algumas espécies de cogumelos possuem efeitos alucinógenos ou até mesmo venenosos. Como se alimentam de outros seres vivos em decomposição, os cogumelos são denominados recicladores da natureza, o que destaca sua grande importância biológica (HAWKSWORTH, 1995; ZANELLA, 2004).

O cultivo dos cogumelos do gênero *Pleurotus* é de grande facilidade e baixo custo. Esses cogumelos possuem sabor agradável ao paladar e alto valor nutricional e em sua constituição são encontradas proteínas, vitaminas, carboidratos e fibras alimentares. Dependendo do substrato em que os cogumelos são cultivados, eles possuem composição e, por muitas vezes, sabores distintos (FURLANI, 2005) devido à possibilidade de absorção de substâncias químicas presentes nos substratos.

O estudo focará o *Pleurotus ostreatus*, que é o quarto cogumelo mais consumido no mundo, chamado comumente de carne vegetariana por ser rico em proteínas. Além disso, promove benefícios para a saúde, reduzindo o nível do colesterol ruim (LDL) e aumentando o nível do colesterol bom (HDL).

No Departamento de Engenharia da UNICENTRO (DEALI) são desenvolvidos processos e inovações no cultivo de cogumelos comestíveis. Dentre esses, o grupo desenvolve as chamadas “sementes de cogumelo” em substrato alternativo, no caso, o resíduo de café. O processo se inicia com o isolamento de uma parte interna do píleo do basidioma do cogumelo para isolamento da linhagem com desenvolvimento do micélio *in vitro* com repiques periódicos em tubos de ensaio contendo o meio adequado. O micélio é então transferido para grãos de cereais, geralmente de trigo, os quais são envolvidos pelo fungo. Dessa maneira, são geradas as “sementes de cogumelo” que podem ser inoculadas em diversos substratos vegetais, como por exemplo, aqueles provenientes de resíduos agroindustriais ou resíduos vegetais, como palha, azevém ou serragem.

As amostras de *P. ostreatus*, objeto de estudo no presente trabalho, foram cultivadas com sementes produzidas em resíduos de café, que é um substrato rico em cafeína. As sementes foram inoculadas em feno, devidamente preparado para o cultivo do cogumelo. É possível que os compostos presentes nas sementes possam ser adsorvidos pelo micélio do

fungo e assim, ser encontrado em seu basidioma. Como a cafeína não é produto do metabolismo do cogumelo, essa molécula não é encontrada em cogumelos cultivados em substratos vegetais comuns.

Portanto, devido à comercialização de muitos cogumelos comestíveis, os quais muitas vezes são cultivados em polpa de café, o teor de cafeína no basidioma do cogumelo deve ser determinado para se conhecer o possível aporte à dieta diária pela ingestão de cogumelos comestíveis. Ainda a presença de cafeína, molécula com propriedades termogênicas, no cogumelo possibilita novas aplicações para esse produto, como por exemplo, seu uso como suplemento alimentar para o auxílio no controle do peso.

Sabe-se que o café é rico em antioxidantes e ácidos fenólicos como os ácidos clorogênicos, portanto torna-se interessante conhecer os possíveis teores de flavonoides, fenólicos totais e atividade antirradicalar de amostras de cogumelo crescidos na semente de café. Em todo o estudo foi utilizado como controle o cogumelo crescido em semente de trigo e inoculado no feno para fins de comparação do meio de cultivo tradicional com cogumelos desenvolvidos em substratos ricos em cafeína.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

Desenvolver e validar um método de extração de cafeína de cogumelos comestíveis *Pleurotus ostreatus* e um método de determinação do teor de cafeína em extratos de cogumelos pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção por UV.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Otimizar por planejamento fatorial o processo de extração da cafeína a partir dos cogumelos *P. ostreatus*.
- Aplicar o método desenvolvido e validado para determinar o teor de cafeína em extratos de cogumelos *P. ostreatus* produzidos em resíduo de café.
- Determinar os teores de flavonoides, fenólicos totais e a atividade antirradicalar em extratos metanólicos de cogumelos *P. ostreatus*.

- Avaliar o perfil químico dos extratos de cogumelo *P. ostreatus* por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas.

### **1.3 Referências**

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. 2005. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 64, n. 2, p. 149-154.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. 1995. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, 8ª ed. Cab International, Cambridge.

ZANELLA, J. O benefício dos cogumelos. 2004. *Portal UNESP*, n. 193. Disponível em: <http://www.unesp.br/aci/jornal/193/capa.php>. Acessado em novembro de 2014.

## **CAPÍTULO 2. CONSIDERAÇÕES GERAIS: COGUMELOS E CAFEÍNA**

## 2. CONSIDERAÇÕES GERAIS: COGUMELOS E CAFEÍNA

### 2.1 Reino *Fungi*

Há cinco reinos que dividem os seres vivos existentes no Planeta Terra, são eles, *Monera*, *Protista*, *Fungi*, *Plantae* e *Animalia*. O Reino *Fungi* caracteriza-se por englobar seres eucariontes e, geralmente multicelulares, como bolores, leveduras (unicelulares), cogumelos, entre outros (TORTORA et al., 2005).

A organização celular dos fungos pode ser classificada em três tipos: unicelular, filamentosa ou carnuda. Como unicelular tem-se a levedura, já os cogumelos possuem organização celular carnuda e os bolores são fungos com estrutura filamentosa (TORTORA et al., 2005).

Os fungos, em sua maioria, vivem no solo alimentando-se de cadáveres de animais, de plantas e de outros seres vivos. Há espécies de fungos que são parasitas e também, há aquelas que vivem trocando benefícios com outros organismos. Porém, independente da grande variabilidade no modo de vida dos fungos, eles se alimentam por absorção de nutrientes do meio (CARVALHO, 2010).

Os fungos são amplamente utilizados pelo homem, tanto na área alimentícia quanto medicinal (antifúngicos). Como exemplo, as leveduras são amplamente utilizadas na fabricação de cerveja, pães, cachaça, vinho, e também, na produção de vacina contra a hepatite B. O fungo *Candida oleophila* previne a presença de outros fungos que são prejudiciais em plantações (TORTORA et al., 2005).

O Reino *Fungi* divide-se em sete filos, são eles: Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Microsporídia, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota. Os fungos comestíveis se enquadram nos dois últimos filos. Os cogumelos comestíveis, alucinógenos, tóxicos e venenosos pertencem ao filo Basidiomycota (RAVEN, 2007).

A classe dos Basidiomicetos está inserida no filo Basidiomycota. Os corpos de frutificação dos cogumelos pertencentes a esta classe são macroscópicos, denominados basidioma. No basidioma localizam-se as hifas reprodutivas, responsáveis pela produção de esporos e reprodução do fungo. Na parte inferior do cogumelo, em sua maioria sob a terra, localizam-se as hifas somáticas que nutrem o basidioma do fungo (TORTORA et al., 2005).

### 2.1.1 Cogumelos

Os conhecidos popularmente como cogumelos são os corpos frutificados dos fungos. São conhecidos desde a antiguidade onde eram utilizados tanto para fins terapêuticos quanto alimentícios ou religiosos (LARGETEAU et al., 2011). O Champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) foi a primeira espécie a ser cultivada no Brasil, além de ser a mais cultivada no mundo (FURLANI e GODOY, 2005).

O *Agaricus brasiliensis*, popularmente conhecido como cogumelo-do-sol, é amplamente utilizado na medicina para fins preventivos contra doenças e protetores. Atua também na diminuição da dor e fadiga em pessoas infectadas por vírus (ZANELLA, 2004). Ainda do mesmo gênero, o Champignon de Paris (*A. bisporus*) possui finalidade distinta do cogumelo-do-sol, focando seu amplo uso na culinária, possuindo alto valor de fibras e proteínas (FURLANI e GODOY, 2007).

Os cogumelos são conhecidos como recicladores da natureza, pois se alimentam da decomposição de matéria orgânica de outros seres vivos (HAWKSWORTH et al., 1995). Mundialmente, o uso do cogumelo como produto alimentício vem aumentando devido ao seu alto valor nutricional (DONINI et al., 2006).

A existência de polissacarídeos no basidioma do cogumelo está associada à atividade anticancerígena do mesmo, pois estimulam a formação de anticorpos que inibem o crescimento de tumores (EMBRAPA, 2009).

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* produzem a lovastatina, agente redutor do colesterol, ou seja, são eficientes na redução do colesterol presente no sangue. Além disso, o extrato de *Pleurotus* possui atividade antimicrobiana, principalmente contra *Staphylococcus aureus* (PATEL et al., 2012). O basidioma dos cogumelos *Pleurotus* possui um formato que se assemelha ao de uma ostra (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Cogumelo *Pleurotus ostreatus*, popularmente conhecido como cogumelo ostra. (Fonte: <http://ismaeljsnature.blogspot.com.br/2013/02/cogumelo-ostra-pleurotus-ostreatus-o.html>).

Na produção de cogumelos podem ser utilizados diversos tipos de substratos, que em sua maioria são resíduos agrícolas e agroindustriais. No Brasil, o eucalipto é comumente utilizado, devido a ser uma matéria-prima de fácil acesso e baixo custo (FURLANI e GODOY, 2005).

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* se destacam por apresentar facilidade, rapidez e baixo custo de produção (ELLIOT, 1997). Além disso, podem apresentar uma maior produtividade do que o gênero *Agaricus* (COLAUTO et al., 1998).

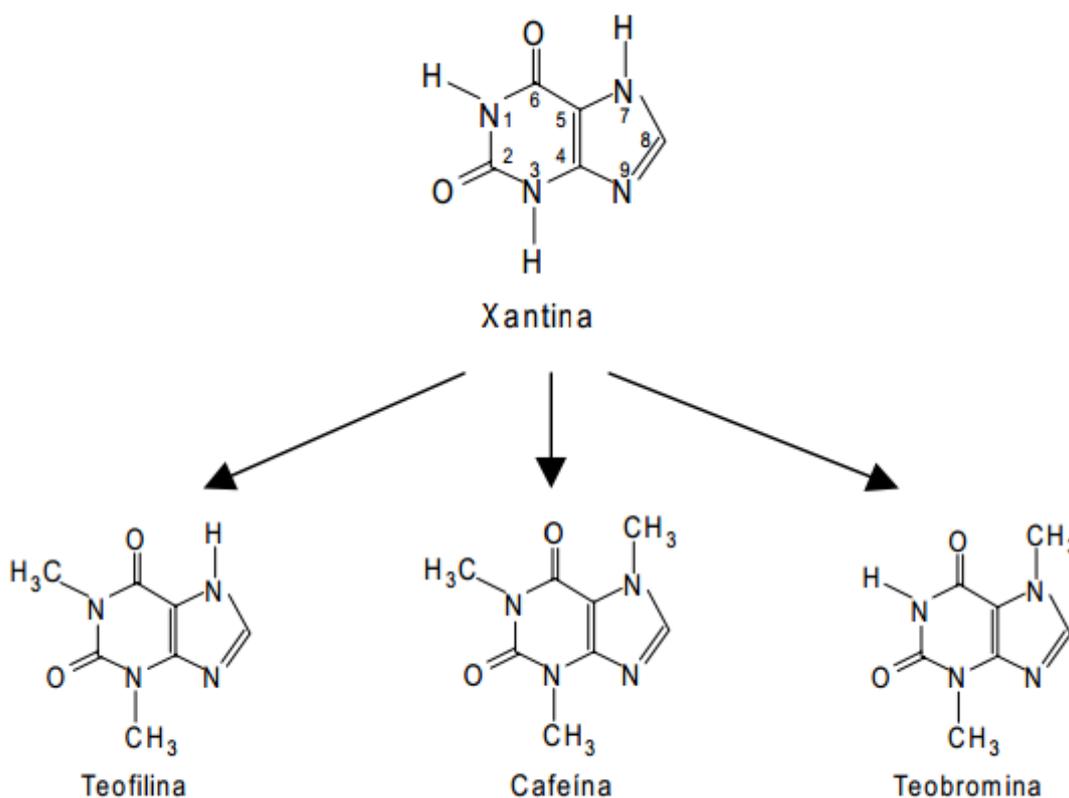
DIAS e colaboradores (2003) avaliaram diferentes resíduos agrícolas disponíveis na região sul de Minas Gerais para a produção do cogumelo *Pleurotus sajor-caju*. Dentre os substratos, os melhores resultados para o cultivo de cogumelos *P. sajor-caju* foram com a palha de feijão pura, palha de feijão enriquecida e palha de milho enriquecida. A eficiência média foi de 83%. O cogumelo crescido em palha de feijão enriquecida obteve uma produção maior do que o crescido em palha de feijão pura. Porém, notaram que a palha de feijão enriquecida dificultou a colonização do fungo, apresentando um maior tempo de crescimento micelial do que os cogumelos cultivados em palha de feijão pura. No geral, a palha de feijão foi considerada o melhor substrato para o cultivo de *P. sajor-caju* na região sul de Minas Gerais.

Este trabalho abordou o cogumelo *P. ostreatus* cultivado com sementes produzidas em resíduos de café. Como o substrato utilizado é rico em cafeína, o fungo pode absorver

compostos presentes nas sementes e assim, ser encontrado em seu basidioma. Todavia, quando o cogumelo não é cultivado na presença de cafeína, não haverá absorção.

## 2.2 Cafeína

A cafeína é uma molécula pertencente à classe das metilxantinas; essas se derivam das xantinas. Moléculas como a teofilina e a teobromina também são exemplos de metilxantinas (Figura 2.2). Essa classe de compostos tem como principal efeito a ação estimulante no sistema nervoso central (HANG e DALE, 1996).



**Figura 2.2.** Estrutura molecular de uma xantina e seus derivados (Fonte: ALTIMARI et al., 2001).

É comum encontrar a cafeína na composição química de algumas drogas vegetais. No cacau, posteriormente ao processo de torrefação, são encontrados cerca de 0,3% de cafeína. Nas sementes de guaraná o teor de cafeína está em torno de 2,5 a 5,0% e no café varia de acordo com os processos de torrefação e espécie da planta coletada (SIMÕES et al., 2003).

A cafeína é considerada uma das metilxantinas que apresenta maior atividade biológica e também, é a mais ingerida. O fato é justificado devido à sua grande ocorrência no

mundo e seu baixo custo. Além de atuar potencialmente no sistema nervoso central, a cafeína pode afetar o sistema cardiovascular e a homeostase do cálcio (De MARIA e MOREIRA, 2007).

A ingestão de cafeína, dependendo da quantidade, pode acarretar efeitos maléficos ou benéficos ao organismo. Quando se pratica exercícios de longa duração e baixa intensidade a cafeína exerce efeitos ergogênicos em dosagem controlada (BRAGA e ALVES, 2000). Porém, é considerada um fator de risco para incontinência urinária em mulheres, e sua ingestão em excesso pode causar ansiedade, tremores, inquietação, irritabilidade, perda de apetite, entre outros (HIGA et al., 2008; TFOUNI et al., 2007). Em contrapartida, SOBREIRO e colaboradores (2005) relataram em seu estudo que a ingestão de seis ou mais xícaras de café por dia aumentam a mobilidade do espermatozóide.

A partir do consumo de 1,0 g de cafeína já podem aparecer efeitos maléficos no organismo como, dores de cabeça, nervosismo, excitação, cansaço, entre outros. Além disso, a ingestão em excesso de cafeína pode acarretar distúrbios do sono, cansaço e ansiedade, síndrome conhecida como cafeinismo (SIMÕES et al., 2003).

### **2.2.1 Técnicas analíticas para análise de cafeína**

Devido à grande ação fisiológica que a cafeína acarreta no organismo, há um grande interesse dos pesquisadores em dosar níveis seguros de ingestão deste alcalóide. Para tal, se torna necessário conhecer as vantagens e desvantagens das técnicas existentes para análise de cafeína em alimentos e fluidos biológicos (De MARIA e MOREIRA, 2007).

A gravimetria, por muitos anos, foi considerada o método oficial para determinação de cafeína em sementes de café. Porém, o procedimento de aplicação dessa metodologia pecava por não apresentar tempo hábil no preparo de amostra e também, os contaminantes nem sempre eram totalmente removidos (De MARIA e MOREIRA, 2007).

SOUSA (2011) utilizou em seu trabalho a técnica de espectrofotometria no ultravioleta e visível (UV/Vis) para determinar o teor de cafeína em medicamentos fitoterápicos contendo Guaraná, fixando comprimento de onda em 274 nm. Esse método se baseia na capacidade de uma molécula absorver radiação em um determinado comprimento de onda. Todavia, a espectrofotometria não é considerada uma metodologia seletiva, devido à possibilidade de outros compostos absorverem no mesmo comprimento de onda.

A eletroforese capilar, eletroanálise e espectroscopia no infravermelho (IV) também são técnicas utilizadas na determinação de cafeína em diferentes matrizes. A eletroforese capilar apresenta alta eficiência na separação simultânea de metilxantinas, possuindo tempo de análise e consumo de reagentes relativamente menores do que quando se utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A eletroanálise apresenta baixo custo, rápida execução e não necessita de pré-tratamento de amostra, porém, é pouco utilizada na análise de cafeína em comparação à cromatografia gasosa (CG) e CLAE. Já a espectroscopia no infravermelho apresenta vantagens como, pouco manuseio da amostra, a não destruição da matriz e não produz resíduos químicos durante a análise (De MARIA e MOREIRA, 2007).

A cromatografia, em geral, é um método de separação de componentes. Com o aprimoramento da técnica, atualmente usa-se a cromatografia para identificação e quantificação de compostos presentes em uma amostra (PAULA e SENA, 2007).

De MARIA e MOREIRA (2007) em sua revisão bibliográfica citam como métodos cromatográficos para determinação de cafeína a cromatografia de absorção em camada delgada, a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Dentre elas, a CLAE se destaca por ser uma técnica eficiente, sensível, seletiva e rápida (NAIK, 2001). Entretanto, a CLAE, mais especificamente com detecção ultra-violeta (UV), necessita de um preparo de amostra antes da injeção para eliminar possíveis interferentes nas matrizes.

O número de pesquisas científicas que relatam a determinação de cafeína por CG é escasso. Uma das causas é o alto custo para a aquisição de um equipamento de CG, particularmente, quando acoplado a espectrometria de massas (EM). Outro ponto é que, geralmente, extratos cafeícos possuem compostos de baixa volatilidade. Também vale ressaltar que para analisar metilxantinas por essa técnica cromatográfica há a necessidade da etapa de derivatização. Porém, o método se destaca pela sua alta rapidez no tempo de análise, alta precisão e sensibilidade (De MARIA e MOREIRA, 2007).

A CLAE acoplada a EM foi considerada um avanço da técnica, pois permitiu analisar simultaneamente compostos não voláteis por meio de seus respectivos espectros de massas. Além do mais, tornou possível determinar metilxantinas em concentração em nível de traços, garantindo boa precisão e exatidão. Em comparação à CG, a CLAE-EM se sobressai por não necessitar da etapa de derivatização dos analitos. Destaca-se também a simplicidade para o pré-tratamento de amostra, como por exemplo, a extração em fase sólida, que em alguns casos, torna-se desnecessária (De MARIA e MOREIRA, 2007).

A quantificação de cafeína no meio ambiente vem se tornando de grande interesse científico. Essa metilxantina é considerada um marcador alotrópico, portanto, pode predizer possíveis pontos de contaminação existentes no ambiente. GARDINALI e ZHAO (2002) utilizaram a CLAE-EM para a determinação de quantidades traços de cafeína em amostras de águas superficiais próximas à Baía de Biscayne no estado da Florida, EUA. O método permitiu determinar cafeína em níveis de ng/L tanto em água salgada quanto em água doce.

ALVES et al., (2006) realizaram um estudo para desenvolver e avaliar uma metodologia analítica simples e rápida para a determinação simultânea do ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em cafés arábica e conilon torrados em diferentes graus. Para tal, fizeram o uso da técnica de CLAE-UV. Concluíram que a melhor condição de separação dos compostos foi utilizando uma coluna Spherisorb ODS (250 × 4,6 mm, 5 µm) acoplada a uma pré-coluna C<sub>18</sub>. Para a fase móvel utilizaram ácido acético/H<sub>2</sub>O (5:95 v/v) (A) e acetonitrila (B). A eluição consistiu em um gradiente de B para A: 0 min, 5%; 5 min, 5%; 10 min, 13%, com vazão de 0,7 mL/min. O detector UV também foi programado: 0 a 15 min a 272 nm, 15 a 23 min a 320 nm e de 23 min até o final, 272 nm. Os cromatogramas obtidos foram de uma resolução satisfatória, com tempo de análise de 35 minutos. O tempo de retenção médio para a cafeína foi de 30 minutos.

A técnica de CLAE-UV também foi utilizada por ALVES e BRAGAGNOLO (2002) para a determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína. A fase estacionária empregada foi uma coluna Inertsil ODS-3, a fase móvel foi constituída por ácido acético 1% e acetonitrila (95:5 v/v) em um fluxo de 1 mL/min. O comprimento de onda ajustado no detector UV foi 273 nm. O método cromatográfico foi considerado preciso, exato, econômico e simples para a determinação simultânea dessas metilxantinas.

Já SOUSA e colaboradores (2010) fizeram a determinação e quantificação de taninos e metilxantinas em pó de guaraná utilizando a CLAE-UV. Para a separação dos compostos foi utilizada uma coluna C<sub>18</sub>, com fase móvel isocrática a 1 mL/min constituída de água: acetonitrila:metanol:acetato de etila:ácido acético (89:6:1:3:1), pH 3,5 e detecção em um comprimento de onda de 280 nm.

## 2.3 Referências

- ALVES, A. B.; BRAGAGNOLO, N. 2002. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 2, p. 237-243.
- ALVES, S. T.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. T. 2006. Metodologia para análise simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em café torrado por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 29, n. 6, p. 1164-1168.
- ALTIMARI, L. R.; CYRINO, E. S.; ZUCAS, S. M.; OKANO, A. H.; BURINI, R. C. 2001. Cafeína: ergogênico nutricional no esporte. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*, v. 9, n. 3, p. 57-64.
- BRAGA, C. L.; ALVES, M. P. 2000. A cafeína como recurso ergogênico nos exercícios de endurance. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*, v. 8, n. 3, p. 33-37.
- CARVALHO, T. C. 2010. *Microbiologia básica*. Recife: EDUFRPE.
- COLAUTO, N. B.; EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. 1998. Fatores físicos que afetam a produtividade do cogumelo comestível *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. *Científica*, v. 26, p. 25-43.
- De MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. 2007. Cafeína: revisão sobre os métodos de análise. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 99-105.
- DIAS, E. S.; KOSHIKUMO, E. M. S.; SCHWAN, R. F.; SILVA, R. 2003. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 27, n. 6, p. 1363-1396.
- DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J. S. do. 2006. Desenvolvimento *in vitro* de *Agaricus brasiliensis* em meios suplementados com diferentes farelos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 6, p. 995 – 999.
- ELLIOTT, T. 1997. Mushrooms. *Quartely Magazine of the Society for General Microbiology*, v. 24, n. 1, p. 9-10.
- EMBRAPA. RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. Brasil e China vão intensificar cooperação para aumentar a produção e consumo de cogumelos. Disponível em <[www.portaldoagronegocio.com.br](http://www.portaldoagronegocio.com.br)>. Acesso em 04 de dezembro de 2014.
- FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. 2005. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 64, n. 2, p. 149-154.
- FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. 2007. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 1, p. 154-157.

- GARDINALI, P. R.; ZHAO, XU. 2002. Trace determination of caffeine in surface water samples by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC-APCI-MS). *Environment International*, v. 28, n. 6, p. 521-528.
- HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. 1995. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 8ª ed. Cab International, Cambridge.
- HIGA, R.; LOPES, M. H. B.; REIS M. J. 2008. Fatores de risco para incontinência urinária na mulher. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 42, n. 1.
- LARGETEAU M. L., LLARENA-HERNÁNDEZ, R. C.; REGNAULT-ROGER, C. SAVOIE, J. M. 2011. The medicinal *Agaricus* mushroom cultivated in Brazil: biology, cultivation and non-medicinal valorisation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 92, p. 897-907.
- NAIK, J. P. 2001. Improved high-performance liquid chromatography method to determine theobromine and caffeine in cocoa and cocoa products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 3570-3583.
- PACHECO, A. H. R. N.; BARREIROS, N. S. R.; SANTOS, I. S.; KAC, G. 2007. Consumo de cafeína entre gestantes e a prevalência do baixo peso ao nascer e da prematuridade: uma revisão sistemática. *Cadernos de Saúde Pública do Rio de Janeiro*, v. 23, n. 12, p. 2807-2819.
- PATEL, Y.; NARAIAN, R.; SINGH, V. K. 2012. Medicinal properties of *Pleurotus* Species (Oyster Mushroom): A Review. *World Journal of Fungal and Plant Biology*, v. 3, n. 1, p. 01-12.
- PAULA, N. K.; SENA, M. M. 2007. Validação de metodologia analítica para o doseamento simultâneo de mebendazol e tiabendazol por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1359-1361.
- RANG, H. P.; DALE, M. M. 1996. Farmacologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. 2007. Biologia Vegetal. 7º ed. Coord. Trad. J. E. Kraus. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRVICK, P. R. 2003. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC.
- SOBREIRO, B. P.; LUCON, A. M.; PASQUALOTTO, F. F.; HALLAK, J.; ATHAYDE, K. S.; ARAP, S. 2005. Semen analysis in fertile patients undergoing vasectomy: reference values and variations according to age, length of sexual abstinence, seasonality, smoking habits e caffeine intake. *São Paulo Medical Journal*. v. 123, n. 4, p. 161-166.
- SOUSA, S. A.; ALVES, S. F.; De PAULA, J. A. M.; FIUZA, T. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. 2010. Determinação de taninos e metilxantinas no guaraná em pó (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 6, p. 866-870.

SOUSA, S. A. Dissolution test of herbal medicines containing *Paullinia cupana*: validation of methods for quantification and of dissolution. 2011. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 47, n. 2.

TFOUNI, S. A. V.; CAMARGO, M. C. R.; VITORINO, S. H. P.; MENEGÁRIO, T. F.; TOLEDO, M. C. F. 2007. Contribuição do guaraná em pó (*Paullinia cupana*) como fonte de cafeína na dieta. *Revista de Nutrição*, v. 20, n. 1.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. 2005. Microbiologia atualizado por Roberta Marchiori Martins. – 8ª ed. – Porto Alegre: Artmed.

ZANELLA, J. 2004. O benefício dos cogumelos. *Portal UNESP*, n. 193. Disponível em: <http://www.unesp.br/aci/jornal/193/capa.php>. Acessado em novembro de 2014.

## **CAPÍTULO 3. AMOSTRAGEM**

### 3. AMOSTRAGEM

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* apresentam sabor agradável ao paladar e alto valor nutricional. O cultivo desse fungo é de grande facilidade e baixo custo, podendo ser produzidos em resíduos agroindustriais. A composição e o sabor dos cogumelos dependem do substrato em que são cultivados devido à possível incorporação e/ou transformação de moléculas oriundas dos substratos (FURLANI, 2005). A espécie de cogumelo abordada neste trabalho foi a *Pleurotus ostreatus*. Segundo ALEXOPOULOS et al., (1996), este cogumelo possui a seguinte classificação taxonômica:

Reino: Fungi

Divisão: Basidiomycota

Subdivisão: Basidiomycotina

Classe: Himenomycetes

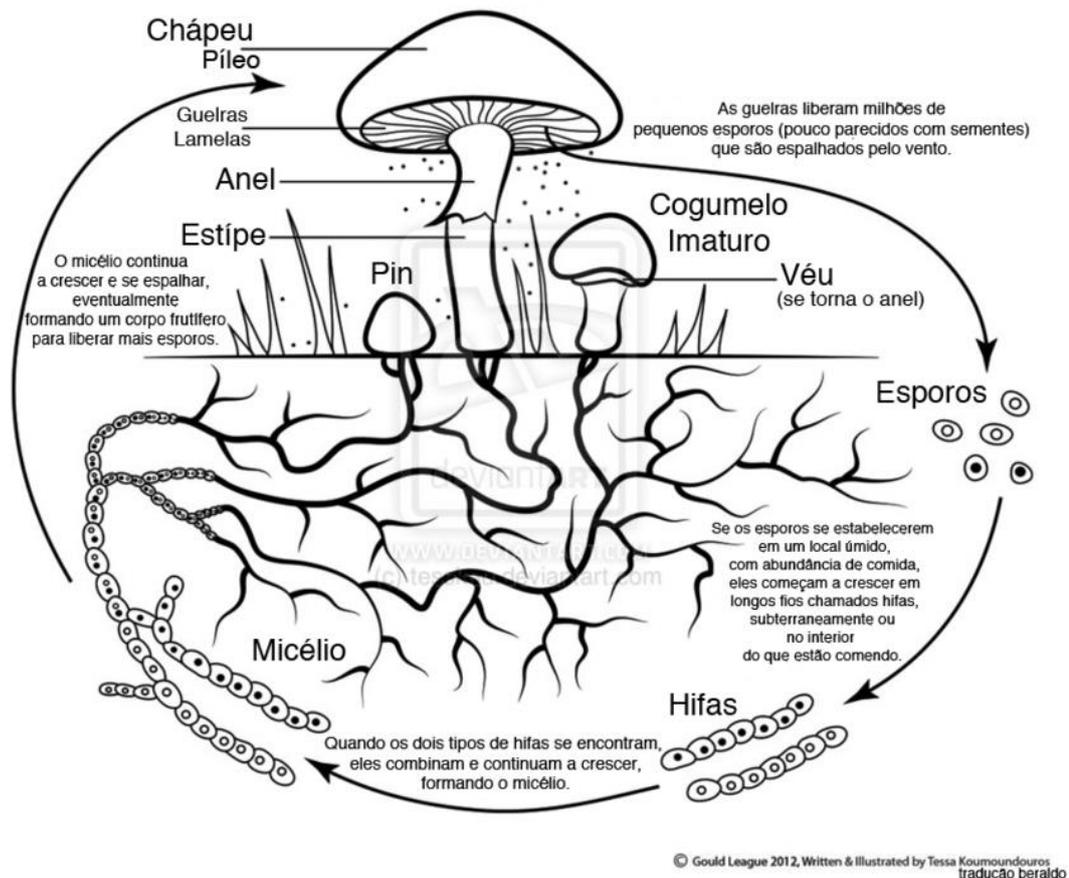
Ordem: Agaricales

Família: Tricholomataceae

Gênero: *Pleurotus*

Espécie: *ostreatus*

Os cogumelos produzem esporos, porém estes são de difícil manuseio para a produção comercial e por isso usa-se “sementes” de cogumelos. O processo todo de produção é feito com o isolamento de parte do basidioma de um cogumelo em condições estéreis em laboratório. Após a obtenção da linhagem pura esta é repicada em grãos de cereais devidamente preparados e os grãos, normalmente trigo ou sorgo, são então envolvidos pelo micélio do cogumelo e se parecem com “sementes” de cogumelos. Estes grãos miceliados são vendidos ao produtor que então os inocula em substratos adequados e previamente preparados (resíduos agroindustriais, palhas, feno, etc). Os pacotes contendo o substrato e inoculados com as “sementes” são então transferidos para uma estufa escura e seca até a completa miceliação do substrato, e esta fase é denominada de fase de incubação, fase escura ou fase seca. Assim ocorre a frutificação dos basidiomas que são então colhidos (BONONI et al., 1995). O ciclo de vida dos cogumelos e as etapas de produção podem ser visualizados na figura 3.1.



**Figura 3.1.** Ciclo de vida dos cogumelos. (Fonte: <https://cogumelosmagicos.org/comunidade/>).

Estudos foram feitos para verificar os efeitos que os compostos presentes no café acarretam na produção do *P. ostreatus*. Como o consumo de café é exorbitante, estima-se que são gerados toneladas de resíduos sólidos desse grão no mundo. Dessa maneira, torna-se necessário criar metodologias tecnológicas para o reaproveitamento do mesmo.

FAN e colaboradores (2006) avaliaram o efeito de taninos e cafeína em oito amostras de *P. ostreatus* e duas de *P. sajor-caju* cultivados em borra de café. Os pesquisadores relataram que o *Pleurotus* não degradou a cafeína, e sim, absorveu-a. Os resultados indicaram a viabilidade do uso da borra de café sem nenhum pré-tratamento para o cultivo deste cogumelo. Porém, o estudo mostrou que quanto maior a concentração de cafeína, menor é o crescimento do fungo.

Recentemente um grupo de pesquisadores verificou a viabilidade do processo de produção de sementes de cogumelos em borra de café e depositou uma patente com essa nova tecnologia na INTEG- UNICENTRO (Processo para produção de matriz micelial de fungos comestíveis e/ou medicinais em substratos alternativos) (ALMEIDA et al., 2014). Este

processo está sendo utilizado na produção de cogumelos do gênero *P. ostreatus*, com as sementes produzidas na borra de café, e inoculadas em feno devidamente preparado.

### 3.1 Amostras de *Pleurotus ostreatus*

Todas as amostras de cogumelo foram cedidas e cultivadas pelo Laboratório de Bioprocessos de Cogumelos, localizado no Departamento de Engenharia de Alimentos, Campus Cedeteg da Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Para efeito de comparação dos resultados, três tratamentos de produção de cogumelos foram analisados:

- Cogumelos produzidos com sementes desenvolvidas em borra de café e inoculadas em feno (CF);
- Cogumelos produzidos diretamente na semente de café, sem uso do feno (C) e;
- Cogumelos produzidos com sementes desenvolvidas em grãos de trigo e inoculadas no feno (TF).

O processo de obtenção das amostras consistiu na preparação do feno em saquinhos que após uma pasteurização severa foi inoculado com 3 % (v/v) da borra de café miceliada. Essa semente foi depositada em cima do feno e os saquinhos foram fechados e então incubados para miceliação e posterior produção dos cogumelos CF e C. O preparo dos cogumelos TF seguiu procedimento similar ao preparo de CF e C, porém, a borra de café miceliada foi substituída por sementes de trigo. Por fim, os cogumelos foram secos e triturados (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Aspecto físico das amostras de cogumelo *Pleurotus ostreatus*.

### 3.2 Referências

ALMEIDA, D. J.; ASSIS, J. B.; EIDAM, R.; DREWINSKI, M. P.; DALLA SANTA, H. S.; DALLA SANTA, O. R.; ALVAREZ, D. C.; CRISOSTIMO, C. Processo para produção de matriz micelial de fungos comestíveis e/ou medicinais em substratos alternativos. BR n. 10 2014 027682 3. 06 nov. 2014. 5p.

ALEXOPOULOS, C. J.; MINS, W. C.; BLACKWELL, M. Introductory Mycology - 4<sup>a</sup> ed - New York: John Wiley & Sons Inc, 1996.

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

FAN, L.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Effect of caffeine and tannins on cultivation and fructification of *Pleurotus* on coffee husks. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 420-424, 2006.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 64, n. 2, p. 149-154, 2005.

**CAPÍTULO 4. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DA CAFEÍNA A PARTIR DAS  
AMOSTRAS DE *Pleurotus ostreatus***

#### **4. EXTRAÇÃO DA CAFEÍNA A PARTIR DAS AMOSTRAS DE *Pleurotus ostreatus***

A cafeína ocorre naturalmente nas sementes de café e folhas de chá verde, mas também, pode ser encontrada no cacau, guaraná e erva-mate. Além de ser consumida como fármaco, mesmo que em pequena escala, esta metilxantina é extensivamente ingerida na forma de bebidas (De MARIA e MOREIRA, 2007).

A maior parte dos relatos na literatura é sobre extração de cafeína em alimentos e bebidas. Como exemplo, WELTER (2011) determinou o teor de cafeína em energéticos utilizando técnicas cromatográficas e espectrofotométricas. Para as análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), as amostras de energético foram submetidas à ultrasson durante 5 minutos, diluídas a 10% e posteriormente analisadas. A cafeína apresentou um tempo de retenção de 3,1 minutos. ALVES e BRAGAGNOLO (2002) utilizaram óxido de magnésio e água destilada, seguido de aquecimento, para a extração simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por CLAE com detecção UV/Vis em fase reversa.

AMARAL-MELLO e colaboradores (2007) compararam métodos de extração de cafeína em cafés descafeinados. Pelo primeiro método a amostra foi submetida a uma carbonização seletiva da matéria orgânica com ácido sulfúrico sob aquecimento para que a cafeína fosse liberada e, posteriormente, extraída com clorofórmio. Já no outro método, a amostra foi extraída, a quente, com uma solução de hidróxido de amônio e clorofórmio. Após, o clorofórmio foi evaporado e o resíduo foi ressuspensionado com água destilada. As amostras foram analisadas por espectroscopia a 274 nm. O método alcalino se mostrou mais preciso, pois apresentou desvios-padrão menores, e pela sua rapidez, seria o mais indicado para análises de rotina. Já, NASCIMENTO (2006) optou por uma extração aquosa para determinar a composição química, bem como a cafeína, em dois tipos de café.

Na literatura há relatos sobre o uso de diversos procedimentos de extração de cafeína. Este trabalho utilizou na metodologia de extração uma solução aquosa ácida e banho ultrasson. Portanto, tornou-se necessária a otimização do procedimento para avaliar a melhor condição de extração que, como consequência, apresentaria melhores resultados de porcentagem de recuperação de cafeína.

## **4.1 Materiais e Métodos**

### **4.1.1 Amostras**

Para a otimização da metodologia de extração de cafeína em amostras de cogumelo *P. ostreatus*, foi escolhida a amostra de cogumelos produzidos com sementes desenvolvidas em grãos de trigo e inoculadas no feno (TF). Como esta amostra de cogumelo foi cultivada sem a presença de borra de café, ela não contém cafeína. Então, a otimização foi realizada por meio de experimentos baseados em estimativas de recuperação de cafeína após a adição de padrão à amostra.

#### **4.1.1.1 Análises cromatográficas por CLAE-UV**

A determinação da concentração de cafeína extraída dos cogumelos foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) WATERS 600, equipado com bomba recíproca de dois pistões, sistema gradiente quaternário para mistura dos solventes da fase móvel. A detecção utilizada para as análises cromatográficas foi por UV por arranjo de diodos WATERS 2969, com lâmpada de deutério e faixa de operação de 190 a 800 nm.

As amostras foram analisadas no módulo de leitura por varredura (190 a 800 nm) e no comprimento de onda fixo de 274 nm. Como fase estacionária, em modo reverso, utilizou-se uma Coluna XTerra® Phenyl (250 x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5µm) mantida à 25°C. A fase móvel foi constituída de metanol (solvente A) e água ultra-pura (solvente B). A eluição ocorreu em modo isocrático na proporção de 40% de A e 60% de B sob fluxo de 0,5 mL/min, durante 12 minutos. O software utilizado para o processamento dos cromatogramas foi o EMPOWER2. Os solventes utilizados para as análises cromatográficas foram de grau HPLC, previamente filtrados a vácuo por membrana e desgaseificados em banho Ultra-Sônico ULTRA CLEANER/UNIQUE. Anteriormente às injeções, as soluções aquosas das amostras foram filtradas por membrana de Nylon 0,45 µm para a remoção de pequenas partículas.

#### 4.1.1.2 Otimização da metodologia de extração da cafeína em amostras de *Pleurotus ostreatus*

Para se obter maior confiabilidade da metodologia de extração de cafeína a partir das amostras de cogumelo, fez-se necessária sua otimização. Para tal, foram testadas duas variáveis, sendo elas o volume do solvente extrator HCl 0,1M (A) acrescentado ao cogumelo enriquecido com cafeína e, o tempo de sonicação no aparelho de ultrasson (B). Foi utilizado como método estatístico, um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.

Em um planejamento fatorial a influência das variáveis experimentais é investigada, como também os efeitos de suas interações nas respostas (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

Para esse trabalho, a distribuição das variáveis em seus níveis encontra-se descrita na Tabela 4.1, juntamente com a ordem dos ensaios. Todos os ensaios foram realizados aleatoriamente e em duplicata.

**Tabela 4.1.** Matriz do Planejamento Fatorial 2<sup>2</sup> representando os níveis e disposição das variáveis: volume de HCl e tempo de sonicação no procedimento de extração de cafeína em *Pleurotus ostreatus*.

Variáveis e seus níveis		
A. Vol. de HCl 0,1 M (mL)	B. Tempo sonicação (min)	Níveis
2	10	-
3	20	+

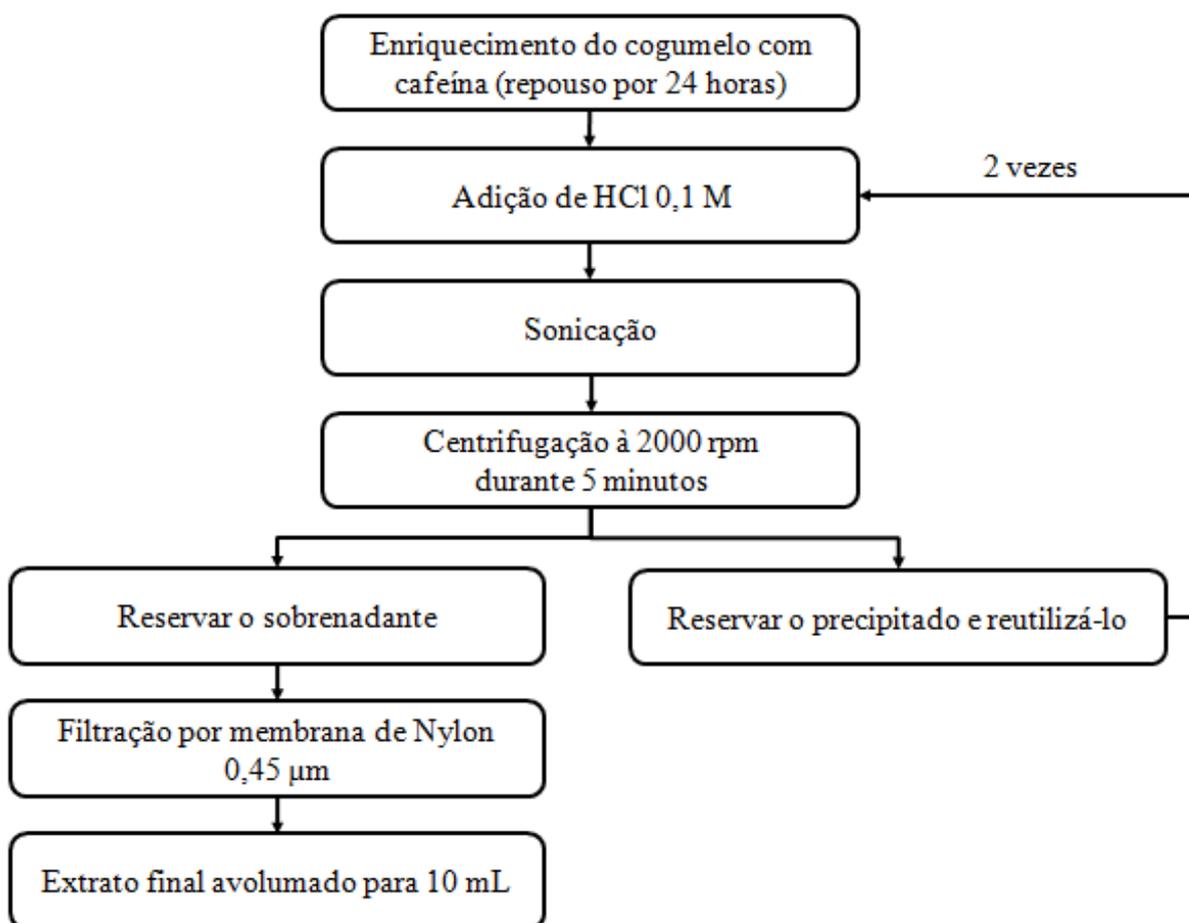
Disposição das variáveis para cada ensaio		
Ensaio	A	B
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+

Os ensaios se basearam em estudos de adição de padrão e recuperação, e como resposta para o planejamento, adotou-se a porcentagem de recuperação de cafeína (%). Também foram avaliados os efeitos de interação das variáveis estudadas.

Inicialmente, 0,1 g de cogumelo foram enriquecidos com 0,5 mg de cafeína. Para tal, uma alíquota de 0,5 mL proveniente de uma solução de trabalho contendo 1000 mg/L de

cafeína foi adicionada às amostras TF, onde permaneceu em contato durante 24 horas. O volume final dos extratos foi fixado em 10 mL, sendo assim, a concentração teórica de cafeína presente no cogumelo foi de 100 mg/L.

O HCl 0,1 M foi adicionado às amostras de cogumelo que foram levadas à sonicação, onde o volume e o tempo de sonicação respectivos foram predeterminados pelo planejamento fatorial (Tabela 4.1). Após, foram centrifugados em Centrífuga Microprocessada Quimis<sup>®</sup>, à rotação de 2000 rpm durante 5 minutos, sendo então reservado o sobrenadante. Em sequência, fez-se novamente a adição de HCl 0,1 M fresco ao precipitado, e então, repetiram-se as etapas de sonicação e centrifugação. Os sobrenadantes provenientes dos dois ciclos de extrações foram combinados e avolumados em balões volumétricos de 10 mL, usando como diluente água ultra-pura. Todo o procedimento de extração está esquematizado na Figura 4.1.



**Figura 4.1.** Extração de cafeína das amostras de cogumelo TF seguindo a matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.

As soluções dos extratos foram filtradas em membrana de Nylon 0,45  $\mu\text{m}$  e analisadas por CLAE-UV seguindo as condições descritas no item 4.1.1.1. A concentração de cafeína foi calculada a partir da área do pico nos cromatogramas referentes ao analito.

Uma curva de calibração por padrão externo foi usada para a quantificação de cafeína recuperada, cujas concentrações foram de 10, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 mg/L de cafeína.

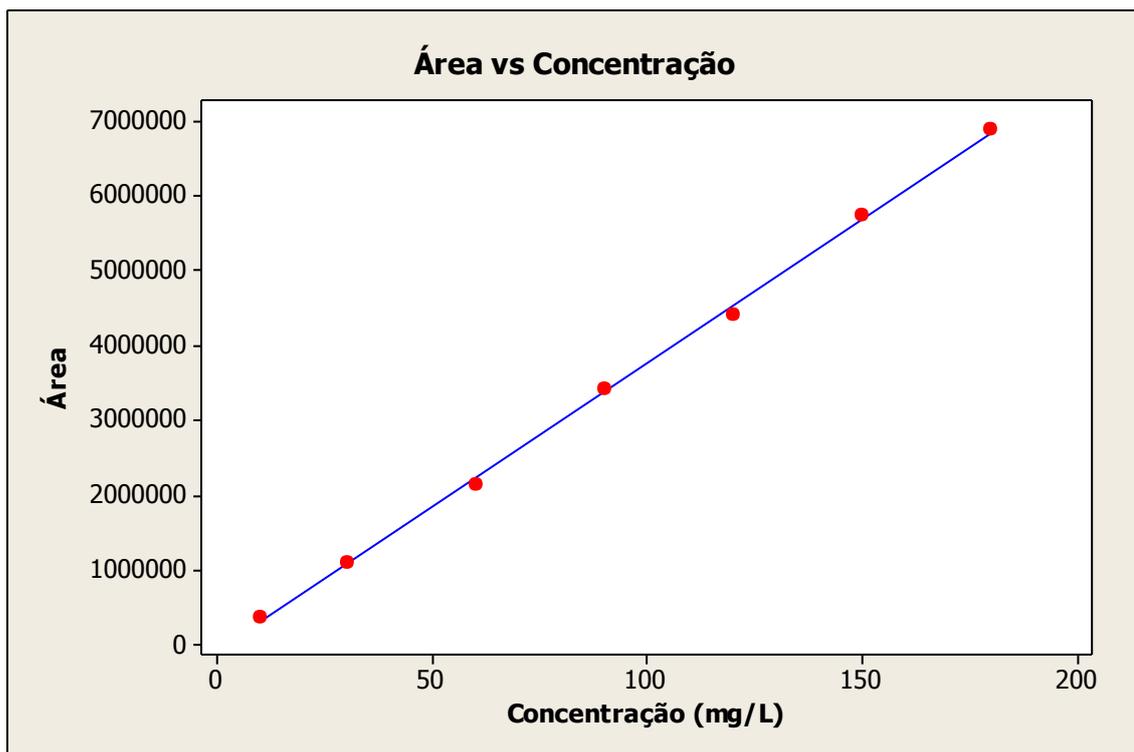
## **4.2 Resultados e Discussão**

### **4.2.1 Extração de cafeína a partir das amostras de *Pleurotus ostreatus***

Com o auxílio da ferramenta quimiométrica, planejamento fatorial  $2^2$ , realizou-se um estudo para selecionar a condição ótima para extrair a molécula de cafeína a partir do fungo estudado, verificando assim, a confiabilidade do método.

As variáveis verificadas foram o volume de HCl 0,1 M adicionado à amostra agindo como extrator, e o tempo de extração no qual a amostra foi submetida à sonicação no banho ultrasson. Como a cafeína é uma base fraca, uma solução aquosa de HCl foi escolhida para extração com o intuito de promover a protonação de nitrogênios presentes na molécula, tornando-a assim, mais solúvel em solução aquosa ácida.

Para verificar o quanto de cafeína foi recuperada nos ensaios do planejamento fatorial, construiu-se uma curva de calibração por padrão externo na faixa de 10 a 180 mg/L de cafeína. Os resultados obtidos a partir da curva de calibração por padrão externo de cafeína estão demonstrados na Figura 4.2 cujo valor do coeficiente de determinação da regressão linear foi de 99,9% no nível de 95% de confiança.



**Figura 4.2.** Curva de calibração por padrão externo de cafeína obtida por metodologia CLAE-UV.

Os resultados de recuperação provenientes do estudo do planejamento fatorial  $2^2$  foram calculados a partir da curva de calibração, todos levando em consideração a área do pico de cafeína no cromatograma monitorado a 274 nm.

Os níveis das variáveis juntamente com as respectivas porcentagens de recuperação (%) de cafeína para o planejamento fatorial  $2^2$  e seus efeitos calculados estão representados na Tabela 4.2.

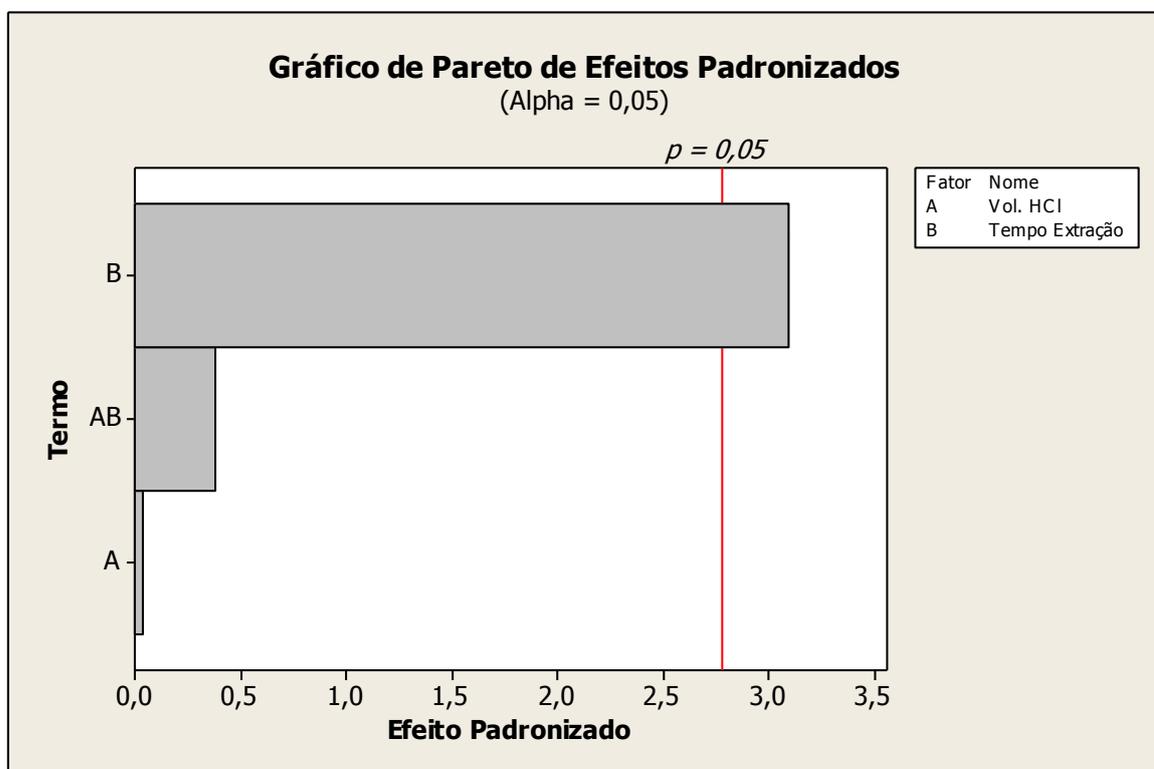
**Tabela 4.2.** Teores de cafeína obtidos pelo planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para as variáveis volume de HCl e tempo de sonicação, bem como os efeitos calculados.

Ensaio	Vol.	Tempo de	% Recuperação de cafeína	Média ± DP
	HCl 0,1 M (mL)	sonicação (min)		
1a	2	10	106,87	101,97 ± 6,92
1b	2	10	97,076	
2a	3	10	106,09	99,08 ± 9,90
2b	3	10	92,074	
3a	2	20	112,90	120,53 ± 10,79
3b	2	20	128,17	
4a	3	20	115,37	122,91 ± 10,66
4b	3	20	130,45	
<b>Efeitos</b>			<b>Estimativa ± DP</b>	<b>valor de p</b>
Vol. HCl 0,1 M (mL) (A)			-0,257 ± 3,42	0,972
Tempo de sonicação (min) (B)			21,19 ± 3,42	0,037
<i>Interação entre os dois fatores</i>				
(A) x (B)			2,635 ± 3,42	0,720

A ANVISA (2003) recomenda que a porcentagem de recuperação do analito esteja entre 80 e 120 % de sua concentração teórica. Todos os ensaios realizados encontram-se dentro do intervalo de recuperação recomendado pela ANVISA, demonstrando que a extração de cafeína está sendo realizada nas condições ótimas. Porém, os ensaios 1 e 2 apresentaram média de porcentagem de recuperação mais próxima de 100%. Diante disso, o ensaio 1 foi escolhido como condição ótima para extração de cafeína em cogumelos *P. ostreatus* pois utiliza um volume menor do solvente extrator.

Em relação aos efeitos das variáveis, a análise do valor obtido pelo teste-*t* mostrou que os efeitos da variação do volume de HCl e da interação das duas variáveis (AB) não foram significativos ( $p > 0,05$ ). Em contrapartida, o tempo em que as amostras foram submetidas à sonicação no banho ultrasson influenciou significativamente na porcentagem de recuperação de cafeína ( $p < 0,05$ ), ou seja, quanto maior o tempo de extração, maior a quantidade de

caféina recuperada. No gráfico de Pareto (Figura 4.3) as barras horizontais indicam os efeitos padronizados das variáveis estudadas.



**Figura 4.3.** Gráfico de Pareto proveniente da análise dos efeitos padronizados do planejamento fatorial no nível de 95% de confiança.

Para o tempo de extração de 20 minutos foram obtidos valores de recuperação que se encontram no limite superior do intervalo de recuperação sugerido pela ANVISA (2003). Provavelmente o maior tempo de sonicação provoca a extração de outras moléculas estruturalmente semelhantes à cafeína e que, portanto, apresentam tempos de retenção e absorção de radiação UV similares. Justifica-se assim a escolha do ensaio 1 como condição ótima para extração de cafeína a partir de cogumelos *P. ostreatus*.

### 4.3 Conclusões Parciais

O método otimizado com o auxílio do planejamento fatorial para a extração de cafeína a partir de *P. ostreatus* se mostrou simples e eficiente. As porcentagens de recuperação entre 99 e 122% se enquadraram no intervalo predeterminado pela ANVISA (2003). Outra vantagem do método de extração otimizado é que as soluções extrativas obtidas não

necessitam de etapas adicionais de tratamento como pré-concentração, evaporação de solvente, partição líquido-líquido, etc e puderam ser analisadas diretamente por CLAE-UV.

#### 4.4 Referências

ALVES, A. B.; BRAGAGNOLO, N. 2002. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 2, p. 237-243.

AMARAL-MELLO, M. R. P.; MINAZZI-RODRIGUES, R. S.; SILVA, S. A.; RAMON, V. L. S. 2007. Estudo comparativo de métodos para extração de cafeína em cafés descafeinados. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2007, Águas de Lindóia.

ANVISA. 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acessado em: agosto de 2014.

De MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R.F.A. 2007. Cafeína: revisão sobre os métodos de análise. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 99-105.

NASCIMENTO, P. M. 2006. Estudo da composição química, atividade antioxidante e potencial odorífico de um café Connillon, em diferentes graus de torrefação e análise comparativa com café arábica. 2006. 103p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. 2006. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 338-350.

WELTER, Q. S. 2011. Extração e quantificação de cafeína em energéticos através de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria. 2011. 39p. Monografia (Bacharelado em Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco.

**CAPÍTULO 5. VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO DE CLAE-UV PARA  
DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM COGUMELO *Pleurotus ostreatus***

## **5. VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO DE CLAE-UV PARA DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM COGUMELO *Pleurotus ostreatus***

A validação de uma metodologia se baseia na análise da eficiência de alguns parâmetros predeterminados. Tais parâmetros indicarão a confiabilidade do método, para que assim, seja possível a aplicabilidade do mesmo para a finalidade desejada (RIBANI et al., 2004).

Para a realização da validação, os parâmetros de desenvolvimento analítico ou figuras de mérito devem ser avaliados. Esses parâmetros são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), no qual cada um verifica aspectos distintos dentro da validação (ARAGÃO, 2009).

A seletividade de um método é a capacidade de determinação do analito sem que os interferentes da matriz prejudiquem a análise dos dados. Em se tratando de cromatografia, concluir que um método é seletivo significa não haver sobreposição de picos com o pico de interesse e ser possível a identificação inequívoca do analito na corrida cromatográfica, mesmo na presença de compostos de estrutura similar (RIBANI et al., 2004; BRITO, 2003; ARAGÃO, 2009).

A ANVISA (2003) define linearidade como sendo a capacidade do método analítico apresentar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na matriz, dentro de um intervalo especificado.

Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito que pode ser detectado, e não necessariamente quantificado. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de analito que pode ser determinada com precisão e exatidão nas condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

De acordo com a ANVISA (2003), a repetitividade mostra a proximidade dos resultados de uma mesma amostra dentro de um curto período de tempo, sem alterar as condições, o procedimento, o analista, o instrumento e o local.

A precisão intermediária mostra a variação dos resultados em um único laboratório devido à análise em dias diferentes, analistas diferentes ou equipamentos diferentes, ou também, a combinação desses fatores. Assim, com a precisão intermediária é possível verificar se a alteração dos fatores citados acima causará variação nos resultados (RIBANI et al., 2004).

A exatidão de um método analisa se os resultados obtidos experimentalmente estão de acordo com um valor de referência considerado verdadeiro. A quantidade de ensaios a serem realizados vai depender do guia de legislação ou diretriz adotada para o procedimento de validação (RIBANI et al., 2004).

No Brasil há duas agências que regulamentam os parâmetros de validação, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Essas agências dispõem de guias para o procedimento de validação de métodos (RIBANI et al., 2004).

ARAGÃO (2009) determinou os parâmetros de validação para um método de separação por CLAE de metilxantinas, dentre elas a cafeína, em amostras de chás e café. Os parâmetros avaliados foram: seletividade, linearidade, robustez, precisão, LD e LQ e exatidão, que apresentaram resultados satisfatórios de acordo com os requisitos predeterminados pelos órgãos reguladores ANVISA e INMETRO. Deste modo, o método foi considerado validado podendo ser aplicado em aulas experimentais devido ao procedimento simples e o uso de reagentes menos tóxicos ao ambiente e à humanidade.

Neste capítulo será apresentado o estudo de validação do método de CLAE-UV para determinação de cafeína em cogumelos *P. ostreatus* crescidos em resíduos de café, bem como os resultados da aplicação do método validado às amostras descritas no capítulo 3. A etapa de validação é necessária, pois não existem trabalhos na literatura sobre a extração de cafeína de cogumelos ou sobre sua determinação por CLAE-UV na presença de componentes dessa matriz alimentícia. Dessa maneira, para garantir a confiabilidade e aplicabilidade do método analítico empregado na determinação de cafeína em *P. ostreatus* foi realizado o estudo da adequabilidade do método.

## **5.1 Materiais e Métodos**

### **5.1.1 Amostras**

A amostra de cogumelos produzidos com sementes desenvolvidas em grãos de trigo e inoculadas no feno (TF) foi escolhida para o estudo de validação da metodologia analítica.

Para a aplicação do método foram utilizadas as amostras de cogumelos produzidos diretamente na semente de café (C) e cogumelos produzidos em substratos à base de borra de café e inoculadas em feno (CF).

## **5.1.2 Determinação de cafeína em cogumelos *Pleurotus ostreatus* por CLAE-UV**

### **5.1.2.1 Validação do método de CLAE-UV para determinação de cafeína em cogumelo *Pleurotus ostreatus***

O estudo de validação intralaboratorial baseou-se no guia da ANVISA (2003), já que as amostras de cogumelo além de serem produtos alimentícios, também são considerados suplementos ou produtos funcionais, comercializados em farmácias e vendidos na forma de pó seco em apresentações farmacêuticas diversas. A cafeína seria um dos princípios ativos desse alimento funcional, quando presente no cogumelo como produto da absorção por de substratos ricos nessa molécula. Os parâmetros de validação adotados foram: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão.

#### **5.1.2.1.1 Seletividade**

Anteriormente a qualquer etapa de validação, deve-se analisar se o método proposto é seletivo, caso contrário, os resultados de linearidade, precisão e exatidão poderão ser comprometidos (RIBANI et al., 2004).

No estudo de seletividade, foram injetadas no CLAE-UV uma solução padrão de cafeína (180 mg/L), um extrato proveniente da amostra de cogumelo enriquecida com o analito com concentração teórica de 180 mg/L e o extrato do cogumelo TF como amostra de cogumelo de referencia livre de cafeína. Os cromatogramas e espectros UV obtidos foram avaliados em termos de tempo de retenção, banda máxima de absorção e, também, se havia interferência de algum outro possível componente presente na matriz.

#### **5.1.2.1.2 Linearidade**

A fim de verificar a linearidade do método, uma curva de calibração pelo método de padrão externo foi construída a partir de uma solução estoque contendo 1000 mg/L de cafeína. As concentrações de cada ponto da curva foram de 1, 10, 60, 120, 180 e 210 mg/L, cada uma injetada três vezes no cromatógrafo.

Uma regressão linear e um teste de falta de ajuste no intervalo de 95% de confiança foram aplicados aos resultados, com o intuito de avaliar se o modelo linear é adequado para explicar a relação entre a área ou altura do pico cromatográfico de cafeína e sua concentração.

#### **5.1.2.1.3 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)**

O cálculo dos limites de quantificação e detecção foi realizado com base na curva de calibração obtida para a etapa de linearidade. Os valores do desvio-padrão do intercepto e da inclinação foram provenientes da equação da reta referente à curva de calibração. As equações para os cálculos seguiram os pressupostos da ANVISA (2003) e estão descritas na Equação 5.1 e 5.2:

$$LD = \frac{3 \times DPa}{IC} \text{ (Equação 5.1)}$$

$$LQ = \frac{10 \times DPa}{IC} \text{ (Equação 5.2)}$$

em que:

LD = limite de detecção.

LQ = limite de quantificação.

DPa = desvio-padrão do intercepto da curva de calibração.

IC = inclinação da curva de calibração.

#### **5.1.2.1.4 Precisão intermediária e Repetitividade**

Para avaliar a precisão do método, utilizou-se triplicatas verdadeiras de um extrato proveniente de uma amostra de *P. ostreatus* (TF) enriquecida com cafeína, com concentração teórica de 180 mg/L.

Para repetitividade, fez-se a leitura de cada triplicata do extrato três vezes em um único dia e em dois períodos diferentes, no caso, matutino e vespertino. Os resultados totalizaram 9 respostas pela manhã e 9 na parte da tarde nas mesmas condições de equipamento e analista.

A precisão intermediária foi calculada a partir das injeções em triplicata de cada amostra de TF enriquecidos com a cafeína, durante 5 dias consecutivos. Foram realizadas 9 injeções por dia.

Os resultados foram expressos em desvio-padrão relativos (DPR), de acordo com a Equação 5.3 (ANVISA, 2003):

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP} \times 100}{\text{CMD}} \text{ (Equação 5.3)}$$

em que:

DPR = desvio-padrão relativo.

DP = desvio-padrão das respostas.

CMD = concentração média determinada.

#### **5.1.2.1.5 Exatidão**

A exatidão do método foi avaliada de acordo com o guia de validação da ANVISA (2003), que propõe um estudo de adição-recuperação em três níveis de fortificação, sendo eles baixo, médio e alto de acordo com o intervalo adotado para a curva de linearidade. Então, amostras do cogumelo TF foram enriquecidas com cafeína em três níveis de concentração (50, 90 e 130 mg/L). Cada amostra foi preparada em triplicatas verdadeiras e injetada no CLAE-UV. Para cálculo das porcentagens de recuperação (%), utilizou-se a Equação 5.4:

$$\text{Rec (\%)} = \frac{C1}{C2} \times 100 \text{ (Equação 5.4)}$$

em que:

Rec (%) = porcentagem de recuperação.

C1= concentração do analito obtida experimentalmente pela aplicação do método CLAE-UV proposto.

C2 = concentração do analito teórica adicionado à amostra.

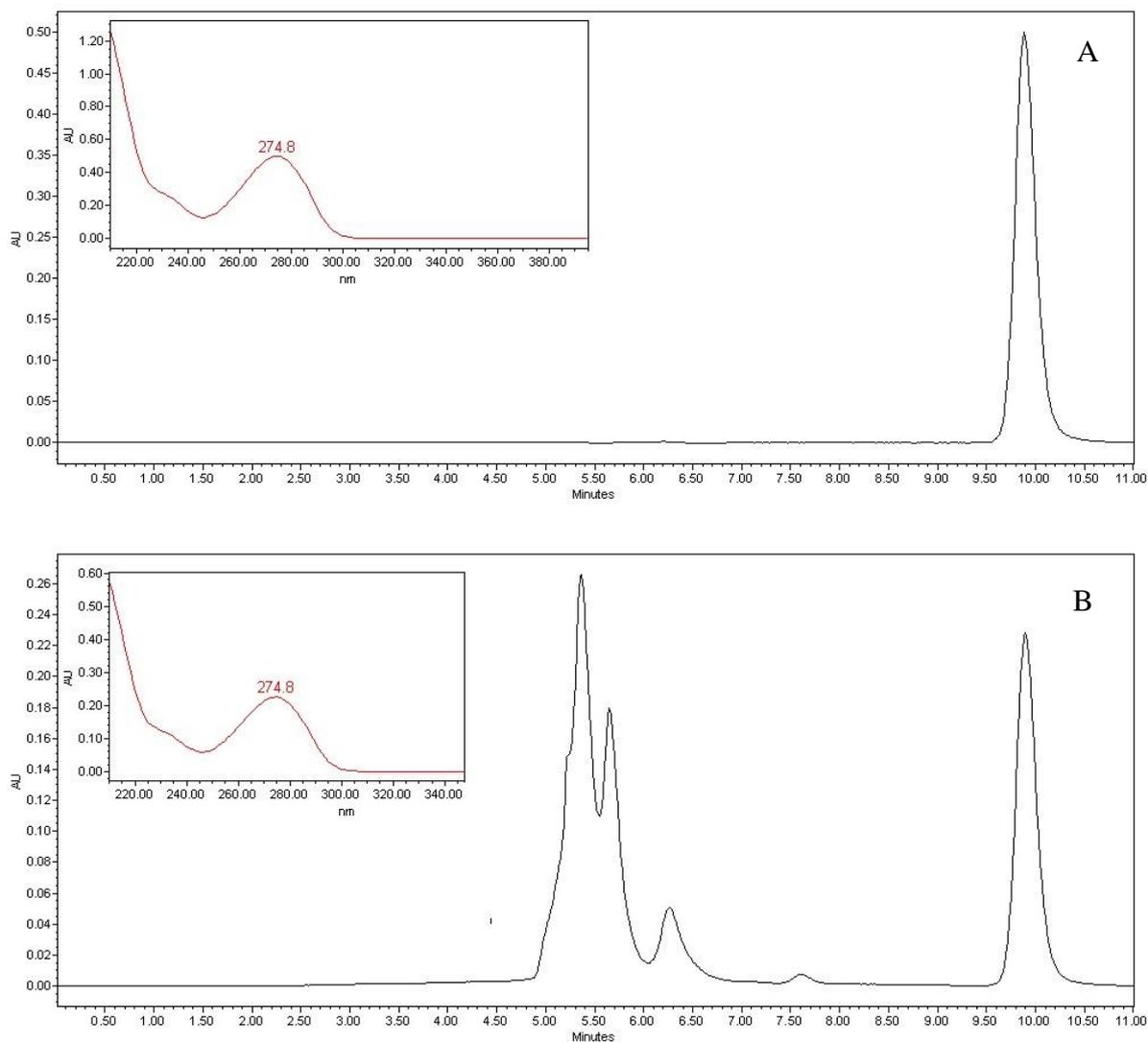
#### **5.1.2.2 Análise Estatística**

As análises estatísticas aplicadas neste trabalho foram realizadas no nível de 95% de confiança utilizando o software estatístico Minitab versão 16.2.2.

## 5.2 Resultados e Discussão

### 5.2.1 Seletividade

Para a determinação da seletividade do método foram primeiramente comparados os tempos de retenção de cafeína nos cromatogramas da solução padrão com os dos extratos provenientes das amostras monitorados em 274 nm, e também seus respectivos espectros de absorção no UV (Figura 5.1).

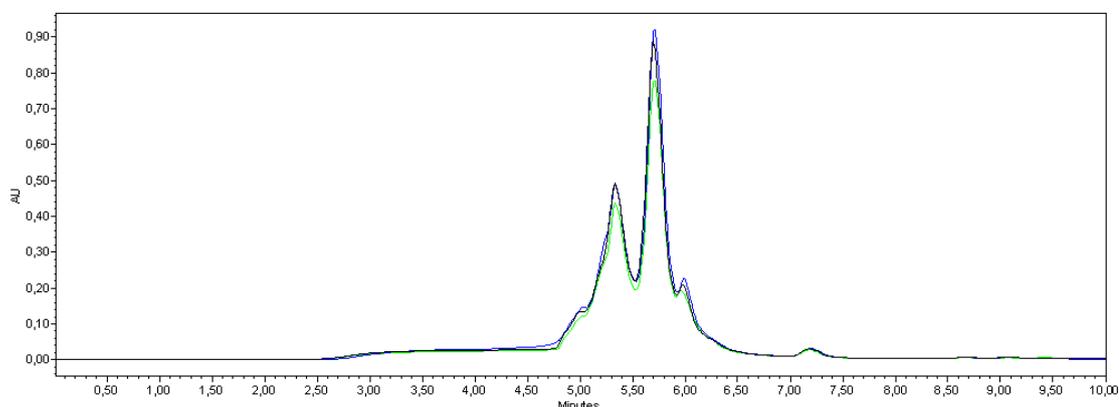


**Figura 5.1.** Cromatogramas monitorados a  $\lambda = 274$  nm e espectros UV do pico cromatográfico de cafeína (A) da solução padrão de cafeína de 180 mg/L e (B) do extrato de cogumelo enriquecido com cafeína na concentração de 180 mg/L.

Pela Figura 5.1-A nota-se que o cromatograma da solução padrão de cafeína apresentou um único pico, bem definido e simétrico, com tempo de retenção de 9,9 minutos, o que é indício de pureza elevada. Na Figura 5.1-B, foi observado que o pico de cafeína na amostra também se mostrou bem definido, com tempo de retenção de 9,9 minutos.

A seletividade do método pôde ser confirmada a partir da análise dos espectros UV do pico correspondente à cafeína na solução padrão de cafeína e nas amostras de cogumelo. Ambos os espectros apresentaram perfil semelhante de absorção de radiação UV, com máximo de absorção em 274,8 nm, como mostra a Figura 5.1. A partir desses resultados o método cromatográfico proposto para a determinação de cafeína em amostras de cogumelo apresentou seletividade adequada.

A fim de confirmar a ausência de co-eluição no pico correspondente à cafeína, uma amostra de cogumelo TF foi submetida à extração, seguindo o procedimento otimizado, e analisada por CLAE-UV (Figura 5.2). Nota-se que o cromatograma do extrato de cogumelo não enriquecido com cafeína não apresentou pico com tempo de retenção no intervalo de 9 a 10 minutos, indicando assim que as condições de extração, eluição e detecção empregadas conferem seletividade ao método analítico CLAE-UV desenvolvido.



**Figura 5.2.** Cromatograma do extrato de cogumelo não enriquecido com cafeína (TF).

### 5.2.2 Linearidade

Uma curva de calibração foi construída com soluções padrão de cafeína na faixa de 1 a 210 mg/L a fim de avaliar a linearidade do método. Esse parâmetro tem como objetivo avaliar se a resposta analítica monitorada para a cafeína (área do pico cromatográfico), na faixa de concentrações de trabalho, pode ser considerada linear e portanto, adequada para a determinação de cafeína em cogumelos. Para tal, os dados obtidos para a área do pico

cromatográfico de diversas soluções padrão de cafeína foram submetidos à regressão linear e a análise de variância (ANOVA). Todas as análises estatísticas foram realizados para o nível de confiança de 95% (Tabela 5.1).

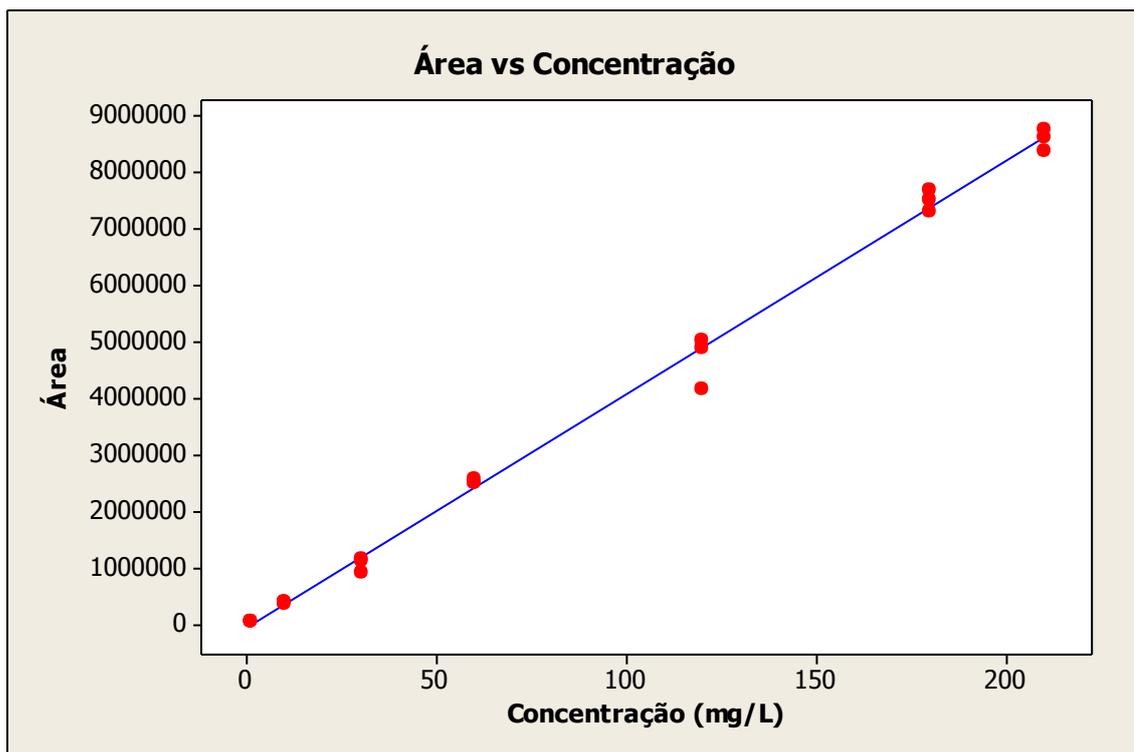
**Tabela 5.1.** Resultados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança.

<b>Regressão*</b>		<b>Falta de ajuste**</b>		<b>r</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>F<sub>regressão</sub></b>	<b>valor de p</b>	<b>F<sub>faj</sub></b>	<b>valor de p</b>		
4855,50	0,000	1,16	0,375	0,9960	99,6%
<b>Coefficientes da Reta de Regressão ± Erro Padrão</b>				<b>t<sub>observado</sub>***</b>	<b>valor de p</b>
Intercepto: - 56967 ± 69169				0,82	0,420
Inclinação: 41264 ± 592,2				69,68	0,000

\*Para regressão,  $F_{\text{crítico}} (0,05; 1, 14) = 4,60$ . \*\*Para falta de ajuste,  $F_{\text{crítico}} (0,05; 5, 14) = 2,96$ . \*\*\*Para os coeficientes da reta,  $t_{\text{crítico}} (0,025; 18) = 2,101$ .

Juntamente com a análise de regressão linear, também foi aplicado um teste de falta de ajuste ( $F_{faj}$ ) aos dados de calibração. De acordo com os valores de  $F_{faj}$  não significativos no nível de confiança de 95% ( $p > 0,05$ ), o modelo linear é adequado para expressar a relação entre a área do pico cromatográfico de cafeína e sua concentração em solução. Pode-se confirmar esse fato observando o valor do  $F_{regressão}$  altamente significativo ( $p = 0,000$ ) no mesmo nível de confiança (Tabela 5.1). Além disso, o valor do coeficiente de determinação ( $R^2 = 99,6\%$ ) demonstra que somente 0,4% da variação nos dados experimentais são referentes aos resíduos, indicando também um bom ajuste no modelo linear.

Com o intuito de analisar a significância dos coeficientes de calibração (intercepto e inclinação), foi aplicado um teste-t à cada um no nível de 95% de confiança (Tabela 5.1). A partir dessa análise pode-se observar que o intercepto não apresentou significância ( $p = 0,420$ ). Todavia, o coeficiente relacionado à inclinação da curva é significativo ( $p = 0,000$ ) o que demonstra que o método CLAE-UV é sensível às variações de concentração de cafeína em solução. Dessa maneira, conclui-se que a curva de calibração é linear na faixa de concentrações estudadas, passa pela origem e pode ser representada pela seguinte equação: área = - 56967 + 41264\*concentração de cafeína (mg/L) (Figura 5.3).



**Figura 5.3.** Reta da regressão linear a 95% de confiança para a curva de calibração do método.

### 5.2.3 Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

Para o cálculo do LD e LQ utilizou-se os dados obtidos a partir da curva analítica, como descrito no item 5.2.2., porém, na faixa de concentração de 1 a 60 mg/L. Os valores de LD e LQ obtidos para o método CLAE-UV de determinação de cafeína foram, respectivamente, 0,28 e 0,96 mg/L. Esses valores demonstram que é possível detectar e quantificar cafeína através do método analítico desenvolvido por CLAE-UV em concentrações da ordem de partes por milhão.

### 5.2.4 Precisão

A partir da análise de precisão foi possível verificar a confiabilidade do método. Para tal, foram analisados dois níveis, a repetitividade, realizada no mesmo dia em períodos diferentes, e a precisão intermediária, analisada em cinco dias consecutivos. Segundo o guia da ANVISA (2003), para a precisão, são aceitáveis valores com DPR (%) abaixo de 15%.

Portanto, os resultados de DPR foram calculados, tanto para a repetitividade quanto para a precisão intermediária (Tabela 5.2).

**Tabela 5.2.** Resultados do estudo de precisão para a determinação de cafeína em cogumelos por CLAE-UV.

Triplícatas amostrais	DPR (%)	
	Repetitividade	Precisão intermediária
Extrato do cogumelo	5,11	6,18

Os dados mostram valores de DPR abaixo de 15%, sugerindo que o método de extração de cafeína em cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* é preciso dentro dos padrões estabelecidos pela ANVISA (2003). Portanto, o método analítico desenvolvido é capaz de fornecer resultados com dispersão aceitável mesmo quando as determinações são realizadas em dias diferentes.

### 5.2.5 Exatidão

Para avaliar a exatidão do método, foram realizados testes por adição de padrão em três níveis de concentração (50, 90 e 130 mg/L) para o cogumelo TF. A equação para a determinação dos valores de recuperação foi apresentada no item 5.1.2.1.5.

A ANVISA (2003) determina que os limites de recuperação adequados para o nível de concentração de cafeína presente nas amostras investigadas estejam no intervalo de 80-120%. Na Tabela 5.3 estão demonstradas as porcentagens de recuperação (%) obtidas para esse parâmetro.

**Tabela 5.3.** Valores de recuperação para a determinação de cafeína em cogumelos pelo método de CLAE-UV.

Amostra	% Recuperação			Valor médio
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	
50 mg/L	111,8	96,6	102,9	103,8
90 mg/L	107,2	91,9	90,9	96,6
130 mg/L	105,6	98,9	109,5	104,6

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o método proposto apresenta exatidão adequada, pois as recuperações percentuais obtidas encontram-se dentro dos limites aceitáveis (80-120%). A concentração média de enriquecimento (90 mg/L) apresentou diferença numérica das outras, porém, com os dados de precisão os valores médios se tornam equivalentes não considerando significativa tal diferença.

Para verificar se houve diferenças significativas entre a recuperação desejada e a determinada experimentalmente, foi aplicado aos resultados um *teste t* a 95% de confiança. O valor de  $t_{\text{calculado}}$  foi menor que  $t_{\text{crítico}}$  para todas as concentrações estudadas, portanto não existem diferenças significativas entre o valor desejado de recuperação com o valor experimental. Sendo assim, pode-se considerar que o método apresenta exatidão no intervalo experimental estudado.

ARAGÃO (2009) validou uma metodologia de determinação de metilxantinas em chá-mate e café solúvel. Seus resultados de recuperação de cafeína no chá-mate foram de 94 e 105%, e para o café solúvel de 98 a 101%. Dessa maneira, os resultados demonstram que o método CLAE-UV apresenta exatidão adequada para a determinação de cafeína no cogumelo comestível investigado.

### **5.3 Aplicação do método validado para quantificação de cafeína nas amostras CF e C de cogumelo por CLAE-UV**

Após a otimização e validação da metodologia de extração de cafeína foi realizada a determinação do analito presente nas amostras CF e C. Primeiramente, estas foram submetidas à condição ótima de extração proveniente do planejamento fatorial, e analisados no cromatógrafo nas condições estabelecidas no item 4.1.1.1. Todas as amostras foram determinadas em triplicata e os resultados são apresentados na Tabela 5.4 como médias em mg/L e  $\mu\text{g/g}$  de cogumelo liofilizado e seus respectivos desvios-padrão.

**Tabela 5.4.** Teores de cafeína das amostras de cogumelo CF e C.

<b>Amostras</b>	<b>Valor médio ± DP (mg/L)</b>	<b>Valor médio ± DP (µg/g)</b>
CF 1	9,83 ± 2,96	294,80 ± 88,96
CF 2	4,93 ± 0,56	147,78 ± 16,85
CF 3	1,25 ± 0,59	37,50 ± 17,80
C 1	25,15 ± 6,09	754,67 ± 182,77
C 2	32,50 ± 0,30	975,04 ± 9,17
C 3	19,65 ± 7,82	589,60 ± 234,73

CF = Cogumelos produzidos com sementes desenvolvidas em borra de café e inoculadas em feno;

C = Cogumelos produzidos diretamente na semente de café, sem uso do feno;

LD = Limite de detecção.

Os resultados apontaram que o cogumelo C, produzido diretamente na borra de café, sem uso do feno, absorveu uma quantidade maior de cafeína do que os cogumelos CF, produzidos com sementes desenvolvidas em borra de café e inoculadas em feno. Esse resultado pode ser explicado devido a que o cogumelo C, produzido diretamente na semente de café, sem uso do feno, não teve outro substrato disponível na etapa de produção dos cogumelos. Ou seja, o cogumelo C esteve em contato direto com a borra de café, o que facilitou na absorção de cafeína. Como esperado, as amostras de cogumelos TF, que não tiveram contato com resíduos de café, não apresentaram cafeína.

FAN e colaboradores (2000) produziram cogumelo comestível do gênero *Pleurotus* em casca de café e fizeram a determinação de cafeína usando como solvente extrator o clorofórmio. Comparando os teores de cafeína no cogumelo seco inicial e final, 0,65 e 0,197 mg/g, respectivamente, perceberam que houve uma diminuição da quantidade de cafeína após a colonização e frutificação na ordem de 60,69%. Também constataram que a molécula não sofre degradação, e sim, se acumula em parte do corpo de frutificação do cogumelo.

#### **5.4 Conclusões parciais**

A partir dos excelentes resultados de precisão e exatidão, boa linearidade e seletividade, foi possível validar a metodologia analítica de extração e de determinação por CLAE-UV de cafeína em amostras de cogumelo *P. ostreatus*. Assim, foi possível realizar a

determinação dos teores de cafeína pelo método validado de CLAE-UV nas amostras de cogumelo investigadas podendo-se concluir que ocorre absorção de cafeína pelo micélio do cogumelo principalmente quando o mesmo é cultivado diretamente na borra de café. O cogumelo que apresentou maior teor de cafeína foi o produzido diretamente na borra de café (C) sem o uso de outro substrato.

## 5.5 Referências

ANVISA. 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acessado em: agosto de 2014.

ARAGÃO, N. M. 2009. Validação de métodos cromatográficos de análise – um exemplo de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida (CLAE) e os princípios da ‘Química Verde’ na determinação de metilxantinas em bebidas. *Química Nova*, v. 32, n. 39, p. 2476-2481.

BRITO, N. M.; AMARANTE, O. P. J.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. 2003. Validação de métodos analíticos: Estratégia e Discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 129-146,.

FAN, L.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. 2000. Produção de cogumelo comestível *Pleurotus* em casca de café e avaliação do grau de detoxificação do substrato. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. Anais. Brasília: Embrapa Café, 2000. p. 687-690.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780.

**CAPÍTULO 6. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DAS  
AMOSTRAS DE COGUMELO *Pleurotus ostreatus***

## 6. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DAS AMOSTRAS DE COGUMELO *Pleurotus ostreatus*

Os cogumelos comestíveis são fungos utilizados há milhares de anos tanto para fins alimentícios como para fins medicinais. Destacam-se por apresentar diversas atividades biológicas como antitumorais, antiinflamatórias, antivirais e antioxidantes (SMITH et al., 2002). Os agentes antioxidantes são responsáveis por inibir ou reduzir a ação dos radicais livres nas células (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

O café também possui atividade antioxidante, que é consequência de possuir em sua composição ácido cafeíco, e ácidos clorogênicos. Esses ácidos são os principais constituintes fenólicos presentes no café (NOBESNY e BUDRYN, 2003).

Os compostos fenólicos são encontrados em abundância na natureza e são considerados inibidores de radicais livres. Os fenólicos mais comumente encontrados em fontes naturais são os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis (ANGELO e JORGE, 2006).

Na literatura há uma gama de relatos sobre a determinação da atividade antioxidante e compostos fenólicos em cogumelos de diversas espécies (PAULI, 2010; MOKOCHINSKI, 2013; RICARDO, 2013). DUBOST e colaboradores (2007) verificaram que a espécie de cogumelo com maior atividade foi o *Agaricus bisporus* em relação ao *Pleurotus ostreatus*, ELMASTAS e colaboradores (2007) também chegaram à mesma conclusão em seus estudos.

O *P. ostreatus* deste trabalho foi cultivado em borra de café. O café é rico em ácidos clorogênicos, então, tornou-se interessante determinar o teor dos compostos fenólicos e a atividade antioxidante desse cogumelo a fim de verificar se o substrato em que foi produzido interfere na concentração desses compostos.

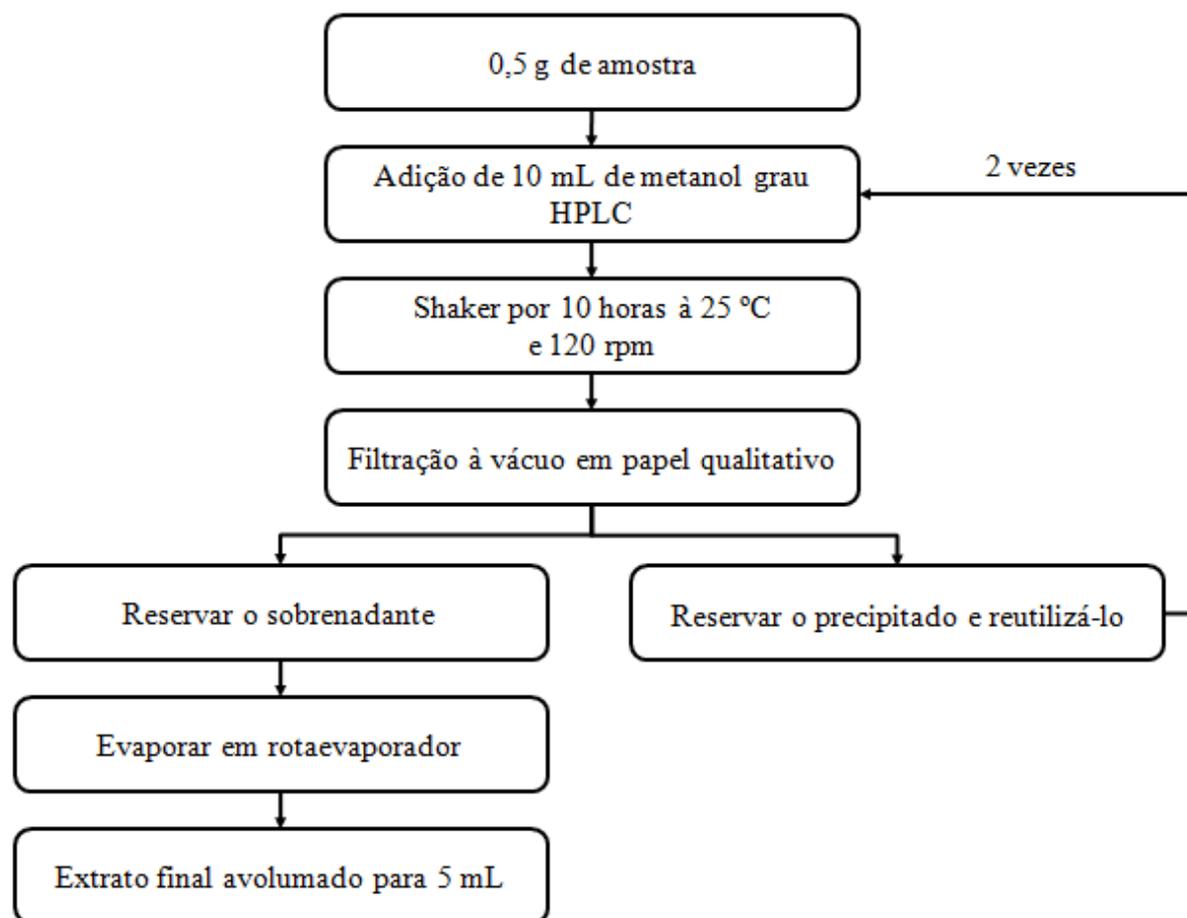
Além disso, foi feita a identificação de compostos de baixa polaridade presentes nas amostras dos cogumelos produzidos com e sem resíduos de café. O objetivo dessa etapa foi verificar se além da cafeína, o cogumelo absorve outros compostos provenientes do café que possam vir a ser encontrados em seu basidioma. E também, verificar a presença de compostos originalmente produzidos pelos próprios cogumelos, de maneira a comparar a composição qualitativa dos cogumelos crescidos em substratos tradicionais e os crescidos em substratos cafeícos.

## **6.1 Materiais e Métodos**

### **6.1.1 Preparação dos extratos metanólicos das amostras de cogumelo**

Os extratos metanólicos provenientes das amostras citadas no capítulo 3 foram preparados para posteriores análises dos teores de flavonóides, fenólicos totais e determinação de atividade antirradicalar. O procedimento de extração foi realizado de acordo com MOKOCHINSKI (2013).

0,5 g de amostra foi pesada e adicionou-se a essa massa 10 mL de metanol grau HPLC e foram levadas ao shaker Tecnal<sup>®</sup> por 10 horas à 25 °C e 125 rpm. Posteriormente, filtrou-se a vácuo em papel qualitativo e reservou o sobrenadante. Então, foi adicionado mais uma porção de solvente fresco e todas as etapas posteriores foram repetidas. Após, os extratos foram levados ao rotaevaporador (Nova Orgânica), no qual se reduziu o seu volume a 5 mL (Figura 6.1).



**Figura 6.1.** Etapas da preparação do extrato metanólico das amostras dos cogumelos produzidos com sementes desenvolvidas em grãos de trigo e inoculadas no feno (TF); cogumelos produzidos diretamente na semente de café, sem uso do feno (C) e cogumelos produzidos com sementes desenvolvidas em borra de café e inoculadas em feno (CF).

### 6.1.2 Análises quantitativas dos extratos metanólicos provenientes dos cogumelos CF, C e TF

O espectrofotômetro UV-Vis VarianCary 50 Bio foi utilizado para as análises e quantitativas. Para a determinação de flavonóides utilizou-se cloreto de alumínio dihidratado VETEC e quercetina SIGMA 98% como padrão analítico (BORS et al., 1990). O reagente Folin-Ciocalteu SIGMA-ALDRICH foi utilizado para a determinação dos teores de ácidos fenólicos e como padrão analítico, ácido gálico VETEC 99% (SINGLETON et al., 1999). Carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) CPQ e tartarato de sódio e potássio hidratado ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) CPQ foram combinados para o preparo da solução tampão. Para a determinação da atividade antirradicalar utilizou-se o radical DPPH $\cdot$  (2,2-difenil-1-

picrilhidrazil) SIGMA e metanol grau HPLC para a diluição (BRAND-WILIAMS et al., 1995). A água ultra-pura utilizada nas análises foi proveniente do equipamento da marca TKA-GENPURE.

#### **6.1.2.1 Determinação do teor de Flavonóides**

Para a determinação do teor de flavonóides utilizou-se o reagente cloreto de alumínio dihidratado a 5% m/v em metanol. Uma curva de calibração foi preparada a partir de uma solução estoque de quercetina de 50 mg/L diluída em metanol, que foi utilizada como referência. Para a curva analítica dos extratos metanólicos dos cogumelos, preparou-se soluções padrão de quercetina nas seguintes concentrações [0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 e 20,0 mg/L].

O método baseia-se na formação de quelatos a partir do alumínio e dos flavonoides e com isso, ocorrerá um deslocamento para maiores comprimentos de onda e uma intensificação de absorção, conseqüentemente, uma alteração de cor (BORS et al., 1990).

Um volume de 0,5 mL das soluções de quercetina foram misturados com 0,25 mL da solução de  $AlCl_3$  5% e avolumados em balão volumétrico de 5 mL. Aguardou-se um tempo de 30 minutos para que a reação ocorresse e posteriormente, foi realizada a medida de absorbância a 425 nm no espectrofotômetro UV-Vis. Para a quantificação de flavonóides nos extratos, efetuou-se o mesmo procedimento utilizado para as soluções padrão de quercetina.

#### **6.1.2.2 Determinação do teor de Fenólicos totais**

O método para a determinação de fenólicos totais se baseia em uma reação de óxido-redução no qual o reagente Folin Ciocalteau, solução que apresenta íons complexos formados a partir dos ácidos fosfotúngsticos-fosfomolibdicos, oxida os fenolatos em meio alcalino, reduzindo os ácidos a um complexo azul (SINGLETON e ROSSI, 1965).

As concentrações de fenólicos totais foram determinadas a partir do uso do reagente Folin-Ciocalteau. Uma solução estoque de ácido gálico em metanol na concentração de 1000 mg/L foi utilizada para o preparo das soluções padrão a fim de construir a curva de calibração para posterior quantificação. A faixa de concentração utilizada para quantificar os extratos metanólicos de *P. ostreatus* foi de [80; 120; 200; 250; 320; 350; 400 e 420 mg/L].

Em um balão volumétrico de 5 mL adicionou-se 0,1 mL de cada solução padrão de ácido gálico, 0,5 mL de solução tampão de carbonato/tartarato (20 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 1,2 g de KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>.4H<sub>2</sub>O em 100 mL de água) e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau, respeitando essa ordem e como diluente utilizou-se água ultra-pura. As soluções foram deixadas em repouso por 30 minutos. Após, realizou-se a leitura da absorbância a 760 nm. Adotou-se o procedimento de construção da curva analítica para as amostras, porém, substituiu-se a solução padrão de ácido gálico pelo extrato.

### **6.1.2.3 Determinação da atividade antirradicalar dos extratos dos cultivados de *Pleurotus ostreatus* baseada no método do radical DPPH·**

O método se baseia em uma reação no qual o DPPH· é reduzido por meio da doação de um átomo de hidrogênio proveniente das substâncias antirradicalares. Essa reação é monitorada por uma mudança de coloração (SINGLETON et al., 1999).

Foi elaborada uma curva analítica para cada amostra de cogumelo com a porcentagem de inibição (%) (Equação 6.1) em função da concentração do extrato.

$$PI (\%) = \frac{(A_f - A_i)}{A_i} \times 100 \text{ (Equação 6.1)}$$

em que:

PI (%) = porcentagem de inibição.

A<sub>i</sub> = medida de absorbância de uma solução contendo 2,5 mL da solução trabalho de DPPH· e 0,50 mL de metanol.

A<sub>f</sub> = absorbância obtida após 30 minutos de reação entre o DPPH· e o extrato de cogumelo em cada uma das concentrações testadas.

A reação foi realizada por diluição diretamente na cubeta do UV-Vis, na qual se adicionou volume fixo de DPPH· 1000 mg/L (2,5 mL) e diferentes volumes do extrato de cogumelo. O volume final de 3 mL foi completado com metanol. O tempo de espera da reação foi de 60 minutos e em seguida, foi feita a leitura da absorbância em 515 nm.

A capacidade antirradicalar dos extratos foi expressa em valores de EC<sub>50</sub>. Para tal, foi construído um gráfico a partir da porcentagem de inibição versus a concentração do extrato em g/L.

### 6.1.3 Identificação de compostos presentes nos extratos metanólicos das amostras de *Pleurotus ostreatus* por CG-EM

A identificação de componentes nos extratos metanólicos das amostras de *P. ostreatus* foram realizadas em um cromatógrafo gasoso Agilent Technologies modelo 5975C VLMSD (Figura 6.2), acoplado espectrômetro de massa de ionização por elétrons. A separação das amostras foi feita utilizando uma coluna capilar de sílica Agilent 19091S-433 (30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ ), com temperatura máxima igual a 325  $^{\circ}\text{C}$ . O programa de temperatura iniciou em 50  $^{\circ}\text{C}$  durante um minuto seguido de incrementos de 15  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até 90  $^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, a taxa de aquecimento foi aumentada para 30  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até 150  $^{\circ}\text{C}$ , e, para finalizar, 15  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até 320  $^{\circ}\text{C}$ . O tempo total de análise foi de 23 minutos. A temperatura do injetor e detector foram de 250  $^{\circ}\text{C}$  e 300  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. O modo *splitless* foi adotado e o gás de arraste foi o hélio em um fluxo constante de 1 mL/min, com volume de injeção igual a 1  $\mu\text{L}$ . Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons (IE) a 70 eV. O espectrômetro de massas foi operado no modo varredura no qual os íons  $m/z$  foram monitorados no intervalo de 50 a 600  $m/z$ . Os componentes das amostras foram identificados com base na comparação dos espectros de massa e tempos de retenção com aqueles disponíveis na biblioteca de espectros do equipamento (NIST). Todas as amostras, anteriormente à injeção, foram derivatizadas por uma reação com 50  $\mu\text{L}$  de BSTFA a 60  $^{\circ}\text{C}$  por 1 hora.



**Figura 6.2.** Cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas Agilent Technologies modelo 5975C VLMSD.

## 6.2 Resultados e Discussão

### 6.2.1 Teores de compostos fenólicos e capacidade antirradicalar de extratos metanólicos dos cogumelos CF, C e TF

Os extratos metanólicos dos cogumelos investigados foram submetidos a análises quantitativas para determinar o teor de flavonoides, fenólicos totais bem como a atividade antirradicalar pelo método de espectrofotometria UV-Vis. Aplicou-se aos resultados uma análise de variância (ANOVA) e um teste Tukey a 95% de confiança utilizando como software o Minitab versão 16.2.2.

Para a determinação dos teores de flavonoides presentes nos extratos dos cogumelos, foi utilizado como padrão analítico a quercetina. A curva analítica utilizada para a quantificação de tais teores é representada pela equação:  $A = 0,00113 + 0,00943 C$  (mg/L) com coeficiente de correlação igual a 0,998.

Para a quantificação dos teores de fenólicos totais, fez-se o uso da equação da reta proveniente da curva  $A = - 0,0201 + 0,000792 C$  (mg/L) com coeficiente de correlação igual a 0,997.

A atividade antirradicalar foi expressa em função do valor do  $EC_{50}$ , que corresponde à concentração do extrato capaz de reduzir em 50% a concentração do radical DPPH·. Esse valor foi obtido por meio da interpolação da curva analítica que relaciona a porcentagem de inibição versus a variação da concentração dos extratos. Para cada extrato foi obtida uma curva analítica na faixa de concentração de 2 a 6 g/L.

Na Tabela 6.1 são apresentados os valores médios de flavonoides, fenólicos e a atividade antirradicalar obtidos para as amostras de cogumelo TF, C e CF.

**Tabela 6.1.** Teores de flavonoides, fenólicos e atividade antirradicalar (EC<sub>50</sub>) dos extratos das amostras de cogumelo.

Amostras	Flavonoides ± DP (µg/g)	Fenólicos ± DP (µg/g)	EC <sub>50</sub> ± DP (g/L)
TF	62,28 ± 4,16 <sup>b</sup>	3841,7 ± 182,7 <sup>a</sup>	2,95 ± 0,08 <sup>b</sup>
C	45,12 ± 2,26 <sup>b</sup>	1773,9 ± 19,68 <sup>b</sup>	2,70 ± 0,11 <sup>a</sup>
CF	114,31 ± 34,56 <sup>a</sup>	1642,7 ± 166,0 <sup>b</sup>	3,47 ± 0,20 <sup>b</sup>

\* Valores expressos por grama de cogumelo seco (média ± desvio-padrão).

\* Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas no nível de 95% de confiança ( $p < 0,05$ ).

TF = cogumelos produzidos com sementes desenvolvidas em grãos de trigo e inoculadas no feno;

C = cogumelos produzidos diretamente na semente de café, sem uso do feno;

CF = cogumelos produzidos com sementes desenvolvidas em borra de café e inoculadas em feno.

Os teores médios para o teor de flavonoides nos extratos de cogumelo foram consideravelmente baixos. O cogumelo CF obteve valores de flavonoides significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) do que os cogumelos cultivados pelos outros dois tratamentos.

Os resultados para fenólicos totais demonstram que não houve correlação com os teores de flavonoides. PAULI (2010) determinou o teor de compostos fenólicos e a atividade antirradicalar dos cogumelos *Lentinus edodes* (Shiitake), *Agaricus bisporus* (Champignon de Paris), *Oudemansiella canarii* e *Pleurotus ssp.* (*Pleurotus* branco, *Pleurotus* salmon e Shimeji) fornecidas pela empresa Zucca Alimentos localizada na cidade de Salto, região de Campinas. Os resultados mostraram uma menor quantidade do teor de flavonoides nos cogumelos do gênero *Pleurotus* em relação aos demais. Para o teor de fenólicos, o P. branco, *salmon* e Shimeji, mesmo pertencendo ao mesmo gênero, apresentaram valores estatisticamente diferentes e em média, maiores que as outras espécies estudadas. Em relação à atividade antirradicalar, os cogumelos *Pleurotus*, foram menos eficientes que os demais.

O cogumelo TF apresentou maiores teores de fenólicos totais em relação aos outros. Assim, pelo que para obter cogumelos com maiores níveis de compostos fenólicos totais seria mais recomendado o cultivo do mesmo em substratos vegetais como os investigados por MOKOCHINSKI (2013). Em seu estudo MOKOCHINSKI (2013) estudou a influência de diversos substratos vegetais fermentados em estado sólido e submerso na produção do *Agaricus brasiliensis*. O extrato do substrato de abacaxi fermentado em estado sólido e submerso apresentou, respectivamente, 4,5 e 5,5 mg/g para flavonoides, 68 e 65 mg/g para fenólicos e 0,03 e 0,08 g/L para atividade antirradicalar. Este autor também observou que os substratos vegetais fermentados apresentaram melhores resultados para os ensaios citados

acima em relação a os substratos não fermentados. Por exemplo, o substrato de casca de abacaxi apresentou teores de flavonoides (2,7 mg/g), fenólicos (29 mg/g) e da atividade antirradicalar (1,10 g/L) menores do que os substratos fermentados da casca de abacaxi. Nesse trabalho foi concluído então que há um aumento da produção de compostos bioativos devido à ação das enzimas do cogumelo sobre os diferentes substratos.

No presente trabalho os resultados foram investigados através de análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey que indicaram que houve diferenças estatísticas entre os tratamentos com e sem resíduo de café ( $p < 0,05$ ). Os tratamentos distintos afetaram o metabolismo do cogumelo ou seu desenvolvimento no que diz respeito à biossíntese de compostos fenólicos e capacidade antirradicalar. Os resultados marcados com letras distintas na tabela 6.1 apresentaram diferenças significativas no nível de 95% de confiança.

Os resultados sugerem que os substratos cafeícos não são adequados para estimular a produção de compostos fenólicos pelo cogumelo. Todavia, ainda deve-se verificar se o cogumelo adsorve outras moléculas de natureza fenólica, naturalmente presentes no café, como os ácidos clorogênicos.

FAN et al., (2006) avaliaram a influência da concentração de cafeína na produção de cogumelos do gênero *Pleurotus* em casca de café. Verificaram que concentrações de 50 a 100 mg/L de cafeína acarretaram efeitos positivos no crescimento micelial, porém, em concentrações maiores que 300 mg/L houve inibição no desenvolvimento do micélio e na frutificação do fungo. Além disso, constataram que a cafeína foi parcialmente acumulada no micélio e basidioma do cogumelo.

Sabe-se que quanto menor o valor do  $EC_{50}$ , maior é o potencial antirradicalar. Os resultados demonstram que o cogumelo produzido diretamente na semente de café obteve maior capacidade antirradicalar do que os demais. Desta maneira, o extrato dessa amostra de cogumelo apresenta compostos com alto potencial antirradicalar.

RICARDO (2013) determinou a atividade antioxidante pelo método do radical DPPH· em suas amostras de *P. ostreatus* cultivados em borra de café e palha de trigo originadas da Espanha e Portugal. Os resultados expressos em  $EC_{50}$  apontaram uma maior atividade para o cogumelo produzido em borra de café em relação ao produzido em palha de trigo. Porém, apresentou resultados de  $EC_{50}$  (17 g/L) para o *P. ostreatus* produzidos em borra de café maiores em relação aos valores encontrados no nosso estudo. Sendo assim, o cogumelo que foi estudado neste trabalho se mostrou mais eficiente, pois necessitou de uma menor concentração de extrato (2,70 g/L) para reduzir em 50% a concentração do radical DPPH·.

Essa diferença pode ser explicada pelo fato do local e condições do cultivo poder influenciar a composição química do cogumelo.

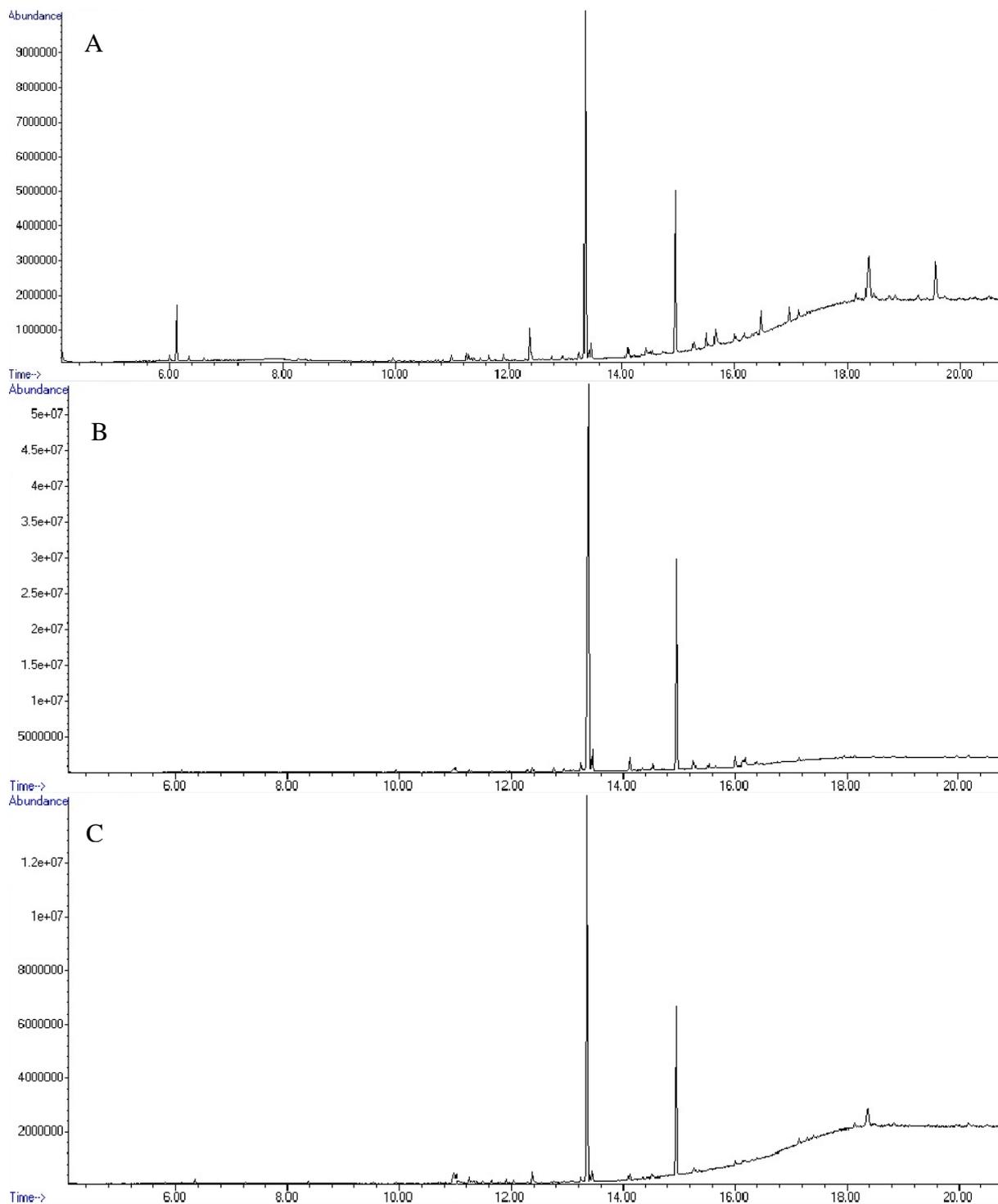
PAULI (2010) em seu estudo também verificou a capacidade antirradicalar de cogumelos comestíveis provenientes da região sul de Minas Gerais. A concentração de extrato de *P. ostreatus* encontrada para inibir em 50% o radical DPPH· foi de aproximadamente 3 g/L, demonstrando semelhança aos valores encontrados neste trabalho.

### **6.2.2 Identificação de compostos presentes nos extratos metanólicos das amostras de *Pleurotus ostreatus* por CG-EM**

Anteriormente às análises por CG-EM, as amostras passaram pela etapa de derivatização por meio da reação com o BSTFA para diminuir a polaridade dos compostos. Este derivatizante promove a substituição dos hidrogênios ativos de compostos orgânicos polares pelo grupo trimetilsilil (-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) (MOKOCHINSKI, 2013).

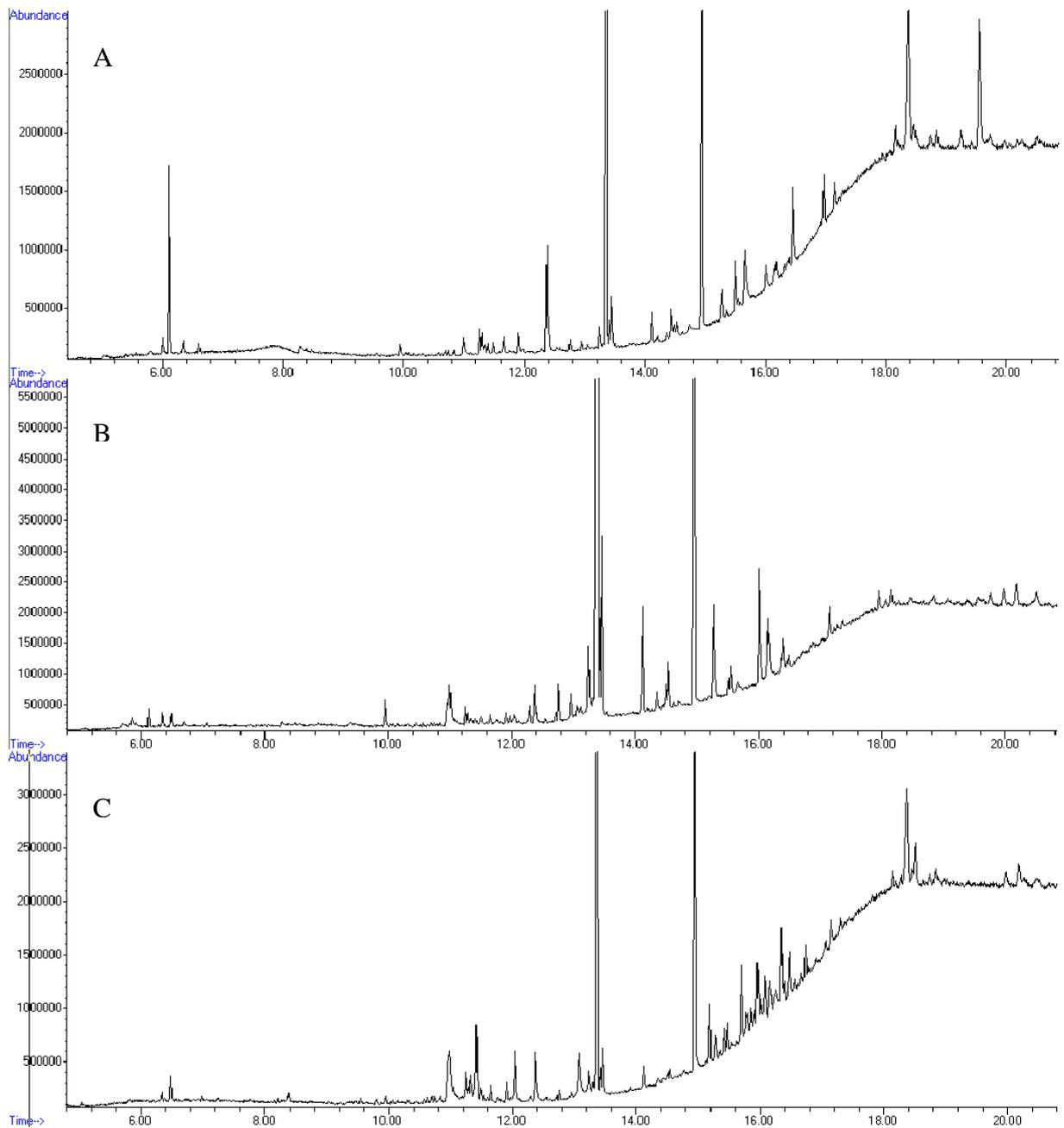
Para a identificação dos compostos, utilizou-se a biblioteca de espectros NIST para efeito de comparação dos espectros de massas obtidos experimentalmente com os dados disponíveis no equipamento.

Os cromatogramas de cada amostra (Figura 6.3) apresentaram picos mais intensos nos tempos de retenção de 13,35 e 14,94 minutos. Esses picos majoritários são referentes a compostos contaminantes presentes nas amostras de cogumelo.



**Figura 6.3.** Cromatogramas obtidos por CG-EM para as amostras de cogumelo (A) produzido com sementes desenvolvidas em grãos de trigo e inoculadas no feno, (B) produzido com sementes desenvolvidas em borra de café e inoculadas em feno e (C) produzido diretamente na semente de café, sem uso do feno.

Os cromatogramas ampliados (Figura 6.4) mostraram semelhança entre os perfis cromatográficos das três amostras de cogumelo.



**Figura 6.4.** Cromatogramas ampliados obtidos por CG-EM para as amostras de cogumelo (A) produzido com sementes desenvolvidas em grãos de trigo e inoculadas no feno, (B) produzido com sementes desenvolvidas em borra de café e inoculadas em feno e (C) produzido diretamente na semente de café, sem uso do feno.

Para maior confiabilidade nos resultados foram considerados presentes nas amostras apenas os compostos que apresentaram uma compatibilidade maior ou igual a 60% entre os

espectros obtidos experimentalmente e o fornecido pela biblioteca de espectros. Os principais compostos identificados em cada amostra estão descritos na Tabela 6.2.

**Tabela 6.2.** Principais compostos identificados nos extratos metanólicos das amostras de cogumelo por CG-EM.

<b>Amostra</b>	<b>Composto, MM (g/mol)</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>EI-MS m/z (intensidade)</b>	<b>Probabilidade (%)</b>
TF, CF e C	Tributilacetilcitrate 402,22	13,35	185 (100%), 129, 259	97%
TF, CF e C	Ftalatos, 390,27	14,95	149 (100%), 167, 57	± 35%
TF e C	Ergosterol, 396,33	18,37	69 (100%), 363, 253	80 e 66%
CF e C	Ácido hexadecanóico, 270,25	11,30	74 (100%), 143, 270	70%
CF e C	Cafeína, 194,08	10,95	194 (100%), 109,67	96%
TF	Lupeol, 426,38	19,55	68 (100%), 207, 423	66%
TF	Ácido octadecanóico, 442,32	13,41	159 (100%), 57, 98	69%
CF	1-metildodecilbenzeno, 260,25	11,24	105 (100%), 260, 147	69%
CF	9, 12- diepoxietilestearato 340,26	16,00	155 (100%), 55, 201	89%

TF = cogumelos produzidos com sementes desenvolvidas em grãos de trigo e inoculadas no feno;

C = cogumelos produzidos diretamente na semente de café, sem uso do feno;

CF = cogumelos produzidos com sementes desenvolvidas borra de café e inoculadas em feno.

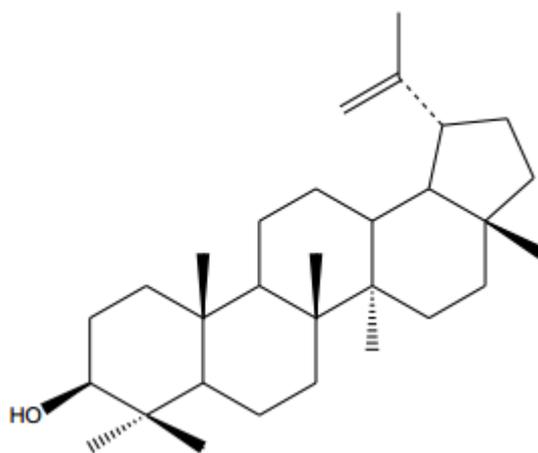
As amostras de cogumelo apresentaram alguns ácidos graxos saturados em sua composição. Porém, sabe-se que os cogumelos possuem uma baixa quantidade de lipídeos. LONGVAH e DEOSTHALE (1998) analisaram os tipos de ácidos graxos encontrados em

espécie de cogumelos *Lentinula edodes* cultivados na Índia. A partir deste estudo, relataram que os ácidos graxos insaturados estão presentes em maior quantidade do que os saturados nos fungos.

Os ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoléico representam cerca de 70 a 90% dos lipídeos presentes em cogumelos comestíveis, sendo que, a quantidade total de ácidos graxos varia entre 74 e 83% (NAPPI et al., 1999). Vale ressaltar que a quantidade de ácidos graxos pode variar de acordo com cada espécie de cogumelo.

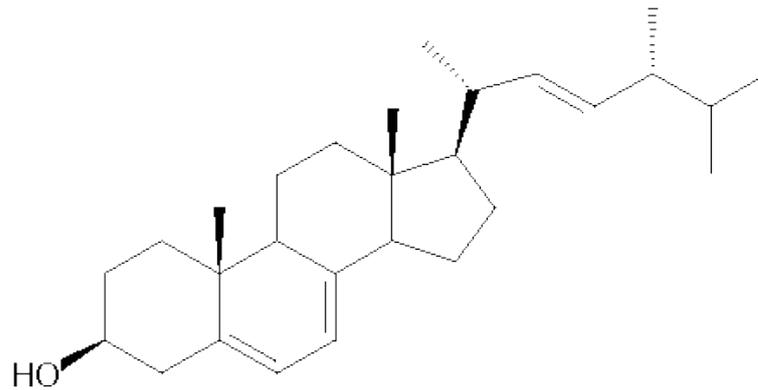
A técnica de CG-EM apresenta maior sensibilidade em relação à CLAE-UV, podendo detectar compostos em níveis de partes por bilhão. Portanto, foi confirmada a presença de cafeína somente nas amostras de cogumelo que foram cultivadas na presença de substratos cafeínicos, o que ratifica que o cogumelo absorve essa molécula dos substratos e que a mesma não é alterada pelas enzimas do mesmo.

O lupeol (Figura 6.5), identificado na amostra TF, é um triterpenóide. Compostos dessa classe apresentam diversas atividades biológicas, como antiinflamatória, antitumoral, antimicrobiana, antialérgica, além de possuir baixa toxicidade (GALLO e SARACHINE, 2009).



**Figura 6.5.** Estrutura química do lupeol.

Já o ergosterol (Figura 6.6), identificado nas amostras TF e C, é constituinte de um grupo de moléculas lipossolúveis, denominado esteróides (FAHY et al., 2005). A participação do ergosterol na composição química nas amostras é justificada pelo fato desse composto ser o principal esterol presente no micélio na maioria dos fungos (PEACOCK e GOOSEY, 1989).



**Figura 6.6.** Estrutura química do ergosterol.

Os ácidos graxos e esteróis encontrados são compostos produzidos pelos cogumelos, podendo haver alteração nas quantidades dependendo do substrato e/ou meio de cultura em que é cultivado.

Os compostos tributilacetilcitrate e ftalato, encontrados nas três amostras, são plastificantes e, comumente encontrados em produtos plásticos. Durante a produção dos cogumelos foram utilizados sacos plásticos, portanto, a identificação desses compostos na composição química das amostras pode ser proveniente de uma contaminação a partir desse produto.

### 6.3 Conclusões Parciais

Em relação aos valores de flavonoides totais, todas as amostras apresentaram teores entre 45 e 114  $\mu\text{g/g}$ . O cogumelo crescido em borra de café contém quantidades significativas de compostos fenólicos e, em particular, o cogumelo cultivado diretamente na borra de café mostrou uma maior atividade antirradicalar em relação aos demais. Isto pode indicar que a capacidade antirradicalar está vinculada à natureza das substâncias antioxidantes presentes na borra de café, mais do que relacionada com seu teor de cafeína nos extratos. Por fim, foram identificados por CG-EM ácidos graxos, terpenos e esteróis presentes na composição química dos cogumelos TF, CF e C. Em relação à cafeína, esta foi identificada somente nas amostras CF e C, confirmando que o fungo a absorve e não a degrada.

## 6.4 Referências

- ANGELO, P. M.; JORGE, N. 2007. Compostos fenólicos em alimentos: Uma breve revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 66, p.1-9.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, v. 12, n. 2.
- BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. 1990. Flavonoids as antioxidants – Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, n. 186, p. 343-355.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, v. 28, p. 25-30.
- DUBOST, N. J.; OU, B.; BEELMAN, R. B. 2007. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, v.105, p. 727–735.
- ELMASTAS, M.; ISILDAK, O.; TURKEKUL, I.; TEMUR, N. 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, p. 337–345.
- FAHY, E.; SUBRAMANIAM, S.; BROWN, H. A.; GLASS, C. K.; MERRILL, A. H.; JR., MURPHY, R. C.; RAETZ, C. R. H.; RUSSELL, D. W.; SEYAMA, Y.; SHAW, W.; SHIMIZU, T.; SPENER, F.; VAN MEER, G.; VANNIEUWENHZE, M. S.; WHITE, S. H.; WITZTUM, J. L.; DENNIS, E. A. 2005. A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, v. 46, p. 839-862.
- FAN, L.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. 2006. Effect of caffeine and tannins on cultivation and frutification of *Pleurotus* on coffee husks. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 420-424.
- GALLO, M. B. C.; SARACHINE, M. J. 2009. Biological activities of lupeol. *International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, v. 3, n. 1, p. 46-66.
- LONGVAH, T.; DEOSTHALE, Y. G. 1998. Compositional and Nutritional Studies on Edible wild Mushroom from Northeast India. *Food Chemistry*, v. 63 n. 3, p. 331-334.
- MOKOCHINSKI, J. B. 2013. Características químicas das fermentações submersas e do estado sólido produzidas pelo *Agaricus brasiliensis* em diferentes substratos. 2013. 77p. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR.
- NAPPI, B. P.; ZILIOOTTO, C. H.; RABELLO, G.; GONZAGA, L. V.; MORETTO, E.; CRUZ, R. C. B. 1999. Composição do lipídio presente na biomassa produzida pelos cogumelos comestíveis *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* e *Auricularia auricula-judae* em soro de leite. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 93-99.

- NEBESNY, E.; BUDRYN, G. 2003. Antioxidative activity of green and roasted coffee beans as influenced by convection and microwave roasting methods and content of certain compounds. *European Food Research and Technology*, v. 217, p. 157-163.
- PAULI, P. A. 2010. Avaliação da composição química, compostos bioativos e atividade antioxidante em cogumelos comestíveis. 2010. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- PEACOCK, G. A.; GOOSEY, M. W. 1989. Separation of sterols by normal phase High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 469, p. 293-304.
- RICARDO, S. C. N. 2013. 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. 2013. 89p. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar) – Universidade de Coimbra, Coimbra.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, n. 16, p. 144-158.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMMELA-RANVENSON, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, v. 299, p. 152-178.
- SMITH, J.; ROWAN, N. J.; SULLIVAN, R. 2002. Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. *Cancer Research UK*. University of Strathclyde.

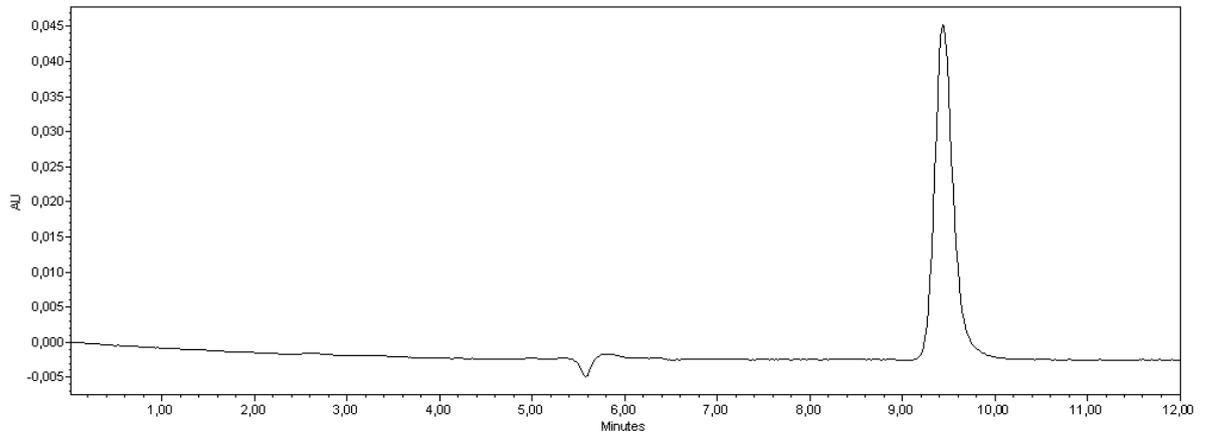
## **CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES**

## 7. CONCLUSÕES

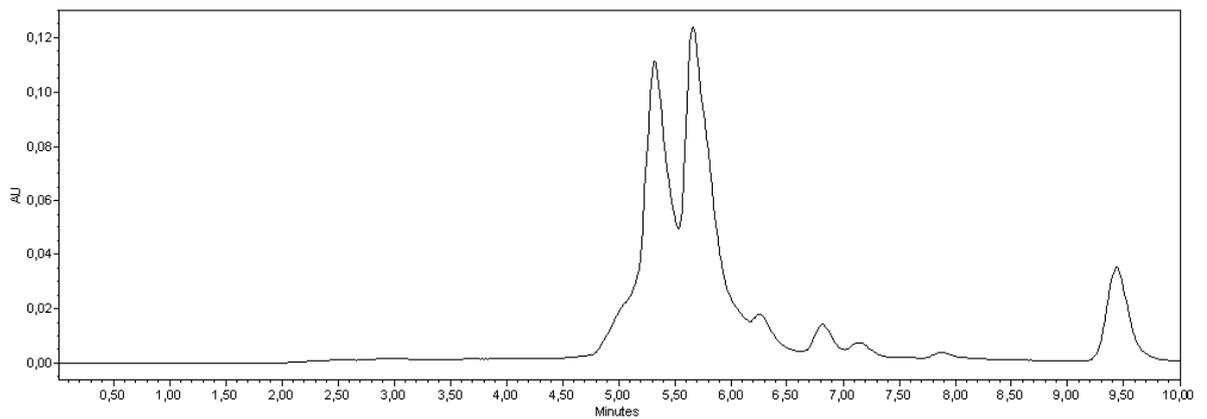
- O método otimizado com o auxílio do planejamento fatorial para a extração de cafeína a partir *P. ostreatus* se mostrou simples e eficiente permitindo recuperações em torno de 100%;
- A metodologia analítica para a quantificação de cafeína por CLAE-UV foi validada levando em consideração os parâmetros de seletividade, precisão, exatidão, linearidade e sensibilidade. Todos os parâmetros se enquadraram nas normas estabelecidas pela ANVISA (2003);
- O cogumelo crescido diretamente na borra de café, sem a presença do feno (C) apresentou maior teor de cafeína em relação ao produzido com sementes desenvolvidas em borra de café e inoculadas em feno (CF);
- A cafeína presente no substrato em que o cogumelo é cultivado pode ser absorvida pelo micélio do fungo e, desta forma, ser encontrada em sua composição química, o que poderá influenciar a atividade biológica desses cogumelos;
- O cogumelo produzido sem a presença de borra de café apresentou maior teor de fenólicos totais em relação aos outros. Portanto, os resultados sugerem que os substratos cafeícos não são adequados para estimular a produção de compostos fenólicos pelo cogumelo.
- O cogumelo crescido diretamente na borra de café mostrou maior atividade antirradicalar em relação aos demais, o que pode ser explicado devido ao café ser rico em antioxidantes. Portanto, para estudos futuros, deve-se verificar se o cogumelo adsorve outras moléculas, naturalmente presentes no café, como os ácidos clorogênicos, trigonelina, etc;
- Os extratos metanólicos das amostras de cogumelo apresentaram em sua composição química: ácidos graxos, ergosterol e lupeol. A cafeína foi identificada somente nas amostras CF e C, confirmando que o fungo pode absorvê-la e a mesma ser encontrada em seu basidioma.
- Para estudos futuros, seria interessante aprimorar a análise por CG-EM, focando na extração dos ácidos graxos e esteróis, a fim de comparar o cultivo dos cogumelos produzidos com e sem a presença de resíduos de café.

## **ANEXOS**

Cromatograma obtido por CLAE-UV, a 274 nm, referente a uma solução padrão de cafeína a 10 mg/L.



Cromatograma obtido por CLAE-UV, a 274 nm, referente ao cogumelo produzido com sementes desenvolvidas em borra de café e inoculadas em feno (CF).



Cromatograma obtido por CLAE-UV, a 274 nm, referente ao cogumelos produzidos diretamente na semente de café, sem uso do feno (C).

