

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**VALOR NUTRICIONAL DE COGUMELOS**  
**CULTIVADOS NO BRASIL**

Regina Prado Zanes Furlani  
Mestre em Ciência de Alimentos

Profa.Dra. Helena Teixeira Godoy  
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a  
obtenção do Título de Doutor em Ciência de Alimentos

CAMPINAS – SP

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

F978v Furlani, Regina Prado Zanes  
Valor nutricional de cogumelos cultivados no Brasil /  
Regina Prado Zanes Furlani. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Helena Teixeira Godoy  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Cogumelos. 2.Valor nutricional. 3.Cromatografia  
líquida de alta eficiência. 4.Vitaminas. 5.Folatos.  
I.Godoy, Helena Teixeira. II.Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.  
III.Título.

cars-fea

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy (orientadora)  
FEA - UNICAMP  
Presidente

---

Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes  
FEA - UNICAMP  
Membro

---

Profa. Dra. Magali Conceição Monteiro da Silva  
FCF – UNESP  
Membro

---

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado  
FEA - UNICAMP  
Membro

---

Dr. Paulo Roberto Nogueira Carvalho  
ITAL  
Membro

---

Prof. Dr. Augusto Ferreira da Eira  
FCA - UNESP  
Membro

---

Profa. Dra. Maria Teresa Mendes Ribeiro Borges  
CCA – UFSCAR  
Membro

Aos meus pais,  
Francisco e Neusa,  
dedico

Só sabemos com exatidão  
quando sabemos pouco; à  
medida que vamos adquirindo  
conhecimentos, instala-se a  
dúvida

Johann Wolfgang von Goethe

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Helena Teixeira Godoy, pela orientação, pelo apoio e principalmente pela amizade.

Ao meu irmão Alexandre, pelo incentivo, pelo companheirismo, pela amizade...  
Muito obrigada por tudo....

Aos meus pais Francisco e Neusa pelo incentivo.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pela infra-estrutura oferecida.

À Toyobo do Brasil Ltda., na pessoa do senhor Marcos Muller, pela doação da amostra de *Agaricus bisporus*.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões e contribuições apresentadas para a redação final da tese.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação da FEA.

Aos funcionários da secretaria de do Departamento de Ciência de Alimentos da FEA.

Aos amigos do Departamento de Ciência de Alimentos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fapesp pelo auxílio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>x</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>xi</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1 - VALOR NUTRICIONAL DE COGUMELOS COMESTÍVEIS: UMA REVISÃO</b> .....	<b>4</b>
RESUMO .....	4
SUMMARY .....	4
INTRODUÇÃO .....	4
VALOR NUTRICIONAL .....	7
Proteína .....	7
Lípídeos .....	10
Carboidratos e fibra alimentar .....	10
Vitaminas .....	11
FATORES QUE INFLUENCIAM A COMPOSIÇÃO .....	12
CONCLUSÕES .....	14
AGRADECIMENTOS .....	14
REFERÊNCIAS .....	15
<b>CAPÍTULO 2 - VALOR NUTRICIONAL DE COGUMELOS COMESTÍVEIS: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE ESPÉCIES CULTIVADAS NO BRASIL</b> .....	<b>18</b>
RESUMO .....	18
ABSTRACT .....	18
INTRODUÇÃO .....	19
MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
Amostras .....	19
Métodos .....	20
Análise estatística .....	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
CONCLUSÕES .....	26
AGRADECIMENTOS .....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27

**CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS DO COMPLEXO B EM COGUMELOS COMESTÍVEIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ..... 29**

RESUMO .....	29
ABSTRACT .....	30
INTRODUÇÃO .....	30
MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
Reagentes, solventes e materiais diversos .....	32
Equipamentos .....	32
Preparo dos padrões de vitaminas .....	33
Amostras .....	33
Cromatografia líquida de alta eficiência .....	33
Extrações das vitaminas e limpeza dos extratos .....	34
Reação de oxidação da tiamina a tiocromo .....	34
Validação da metodologia .....	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
Condições cromatográficas .....	35
Extração e limpeza .....	38
Determinação de vitaminas B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> .....	40
Validação da metodologia .....	42
CONCLUSÕES .....	44
AGRADECIMENTOS .....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44

**CAPÍTULO 4 - OTIMIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS B1 E B2 EM COGUMELO AGARICUS BISPORUS ATRAVÉS DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA ..... 47**

RESUMO .....	47
ABSTRACT .....	47
INTRODUÇÃO .....	48
MATERIAL E MÉTODOS .....	49
Amostra .....	49
Reagentes .....	49
Equipamentos .....	49
Metodologia analítica .....	50
Condições cromatográficas: .....	51
Modelo experimental .....	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
CONCLUSÕES .....	60
AGRADECIMENTOS .....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60

**CAPÍTULO 5 - DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE VITAMINAS B1 E B2 EM  
DIFERENTES ESPÉCIES DE COGUMELOS COMESTÍVEIS POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ..... 62**

RESUMO .....	62
ABSTRACT.....	62
INTRODUÇÃO.....	63
METODOLOGIA .....	64
Amostras.....	64
Reagentes.....	64
Equipamentos .....	64
Análise das vitaminas.....	65
Condições cromatográficas .....	65
Análise estatística .....	66
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
CONCLUSÕES.....	71
AGRADECIMENTOS.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

**CAPÍTULO 6 - DETERMINAÇÃO DE FOLATOS EM TRÊS DIFERENTES ESPÉCIES  
DE COGUMELOS COMESTÍVEIS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE  
CAMPINAS - SP..... 73**

RESUMO .....	73
ABSTRACT.....	73
INTRODUÇÃO.....	74
METODOLOGIA .....	75
Amostras.....	75
Reagentes.....	75
Equipamentos .....	76
Determinação dos folatos.....	76
Condições cromatográficas .....	76
Análise estatística .....	77
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
CONCLUSÃO .....	80
AGRADECIMENTOS.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

**CONCLUSÕES FINAIS .....** 82

**ANEXOS.....** 83

## RESUMO GERAL

Muito pouco se sabe a respeito da qualidade dos cogumelos comestíveis cultivados no Brasil, especialmente com respeito ao valor nutricional. Por esse fato e também pelo constante interesse do consumidor em fontes naturais de vitaminas, o presente trabalho avaliou metodologias para determinação de vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, H e PP e desenvolveu e validou metodologia analítica para determinação simultânea de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em cogumelos. Também foi realizada a determinação de vitamina C, folatos, composição centesimal e fósforo em três espécies de cogumelos (*Agaricus bisporus* - Champignon de Paris; *Lentinula edodes* – Shiitake; *Pleurotus ostreatus* - Shimeji). Os dados, certamente, contribuirão para a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos.

A análise estatística dos resultados de composição centesimal mostrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os cogumelos provenientes de diferentes lotes, sendo a água, os carboidratos e as proteínas os principais constituintes. Os champignons, shiitakes e shimejis por sua composição química, são excelentes alimentos, pois apresentam alto teor de proteínas e fibras alimentares e baixo teor de lipídeos. Há uma considerável quantidade de fósforo, mas os teores encontrados para vitamina C não foram expressivos para considerá-los fonte dessa vitamina.

Os resultados obtidos para o total de folatos evidenciaram concentrações entre de 459 a 1430 $\mu$ g/100g para os diversos lotes de cada espécie e houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre eles. Já para as médias de cada espécie, não houve diferença entre os resultados, demonstrando que os cogumelos podem ser considerados fontes de folatos e sua contribuição na dieta, para o aporte dessas vitaminas, é significativa.

Os resultados para vitamina B<sub>1</sub> variaram de 0,004 a 0,08mg/100g e para vitamina B<sub>2</sub> de 0,04 a 0,3mg/100g. e houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para os teores de ambas as vitaminas entre as espécies. Também houve diferença significativa entre a maioria dos lotes analisados de cada espécie. Esses dados mostram que os cogumelos não podem ser considerados fontes de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e sua contribuição na dieta não é expressiva.

## SUMMARY

Very little is known regarding the quality of the edible mushrooms cultivated in Brazil, especially with respect to their nutritional value. Considering this and the constant interest of the consumer in natural vitamin sources, the present work evaluated methodologies for the determination of vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, H and PP and developed and validated analytical methodology for the simultaneous determination of vitamin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in mushrooms. Also the determination of vitamin C, folates, the proximate composition and phosphorus was carried out in three species of mushroom (*Agaricus bisporus* - Champignon of Paris; *Lentinula edodes* - Shiitake; *Pleurotus ostreatus* - Shimeji). The data will certainly contribute to the Brazilian Table of Food Composition.

The statistical analysis of the results of the proximate composition showed the existence of significant differences ( $p < 0.05$ ) between different batches of mushrooms, being the water, carbohydrates and proteins their main constituents. Champignons, shiitakes and shimejis due to their chemical composition are an excellent food, because they have high level of proteins and dietary fibers, and low level of lipids. They have great amount of phosphorus, but the levels for vitamin C were not sufficient to consider as a source of this vitamin.

The results obtained for total folates were from 459 to 1430 $\mu$ g/100g for various batches of each species and there were significant differences between them. However for the averages of each species, there was no difference ( $p < 0.05$ ) between the results, demonstrating that mushrooms can be considered as sources of folates and their contribution to the diet, considering the requirements for these vitamins, is meaningful.

The results for vitamin B<sub>1</sub> varied from 0.004 to 0.08mg/100g and for vitamin B<sub>2</sub> from 0.04 to 0.3mg/100g, showing significant differences ( $p < 0.05$ ) for both vitamins between the species. Again there were differences between the majority of the batch analyzed of each species. These data show that mushrooms cannot be considered as sources of vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> and their contribution to the diet was not significant.

## INTRODUÇÃO GERAL

A relação humana com os cogumelos é muito antiga e fascinante. Ao longo da história eles foram sendo utilizados com as mais diferentes finalidades. Os egípcios, por exemplo, acreditavam que os cogumelos eram um presente do deus Osíris. Os antigos romanos também achavam que era um alimento divino por acreditarem que os cogumelos foram atirados para a Terra através de raios jogados por Júpiter durante uma tempestade (MANZI *et al.*, 1999). Já na Grécia antiga, os guerreiros acreditavam que os cogumelos proviam de força e coragem. No Egito, os faraós os utilizavam como presente especial e em Roma diziam ser o "Alimento dos Deuses" e, portanto, deviam ser servidos apenas em ocasiões especiais. Entre os chineses os cogumelos eram verdadeiros "elixir da vida" e utilizados como alimentos bons para a saúde e até mesmo entre os índios mexicanos eram utilizados como alucinógenos em rituais religiosos e feitiçarias, bem como com propósito terapêutico (CHANG & MILES, 1989).

Atualmente os cogumelos têm sido utilizados tanto por sua importância gastronômica quanto pelo seu valor medicinal, mas o seu emprego como alimento funcional é mais notado nas civilizações orientais, que há milênios mantêm uma forte tradição do seu uso tanto gastronomicamente, como medicinalmente (CHANG, 1996). Recentemente o consumo de cogumelos também está aumentando na cultura ocidental envolvendo um grande número de espécies além do popular champignon (MATTILA *et al.*, 2001).

O cultivo dos cogumelos também vem crescendo por diversos fatores. Economicamente sua cultura permite a reciclagem de diversos resíduos agrícolas e agro-industriais. Sob o ponto de vista nutricional, devido ao alto valor protéico, o cultivo dos cogumelos tem sido apontado como uma alternativa para acrescentar a oferta de proteínas aos países com alto índice de desnutrição (CHANG & MILES, 1986).

Esse crescimento pode ser atestado pelos seguintes números: em 1993, a produção anual mundial foi de 1,95 milhões de toneladas e em 2003 ela saltou para 3,19 milhões de toneladas, ou seja mais de 60% em 10 anos (FAOSTAT data, 2004). A produção no Brasil não se encontra nessa estatística mundial e segundo VILELA (2004), o Brasil não possui dados oficiais sobre a produção de cogumelos, mas é sabido que a maior região produtora está localizada no Alto Tietê, em São Paulo.

No nosso país, as principais espécies comestíveis cultivadas são *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus* spp (EIRA & MINHONI, 1997). Com o aumento crescente da

demanda no mercado mundial, dados referentes à composição dos cogumelos cultivados no Brasil tornam-se necessários.

Além do seu valor como alimento, a utilização de certas espécies, em forma de chá ou cápsulas, como preventivo de algumas doenças, também acelerou a produção de cogumelos. Existem inclusive empresas e pessoas que estão utilizando o *e-commerce* para vender cogumelos ditos “medicinais” cultivados no Brasil. Muitas vezes esses *sites* apresentam tabelas nutricionais onde são citados teores de vitaminas dos cogumelos. Esses valores são questionáveis, pois nem sempre as fontes desses dados são apresentadas, não se sabe, sequer, se os dados se referem a cogumelos cultivados no Brasil, e sob quais condições.

Informação a respeito da composição de alimentos, em especial o teor de vitaminas, tem se tornado cada vez mais importante para avaliar a sua qualidade. Para vitaminas, essas informações têm grande valor, uma vez que desempenham funções importantes no organismo humano e animal. Outros constituintes como proteínas, lipídeos e fibras também têm se tornado uma importante preocupação para profissionais das áreas da saúde e de alimentos. O consumidor também tem buscado fontes naturais de vitaminas além do interesse por produtos de boa qualidade.

Existem poucos dados, mesmo na literatura internacional, a respeito da presença de vitaminas do complexo B, folatos e também da composição centesimal dos cogumelos. Muitos autores referem-se ao cogumelo como fonte dessas vitaminas mas nem sempre a quantidade destas no produto, seja *in natura* ou desidratado, é especificada. Essa dificuldade se deve, principalmente, à falta de metodologias analíticas adequadas. Diante deste quadro, surge a necessidade de um levantamento que demonstre o real valor vitamínico dos cogumelos comestíveis. Porém, a condição básica para se iniciar um trabalho desta natureza está na disponibilidade de técnicas de análise adequadas.

Assim sendo, o presente trabalho teve por objetivos desenvolver e validar metodologia para determinação simultânea de vitaminas do complexo B em cogumelos e aplicá-la em amostras das principais espécies produzidas no Brasil, além de avaliar a composição centesimal, ácido ascórbico, fósforo e a quantidade de folatos nesses fungos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHANG, R. Functional properties of Edible Mushrooms. **Nutrition Reviews**, v. 54, n. 11, p. S91-S93, 1996.

CHANG, S.T.; MILES, P.G. **Edible mushrooms and their cultivation**. CRC Press, inc Boca Raton, Florida, 1989.

EIRA, A.F.; MINHONI, M.T.A. **Manual teórico: prático do cultivo de cogumelos comestíveis**. 2.ed. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais PAF; FCA, UNESP, 1997. 115p.

**FAOSTAT data, 2004**. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Agricultural Production - Crops Primary** - Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?version=ext&hasbulk=0&subset=agriculture>> Acesso em 10/10/2004.

MANZI, P., GAMBELLI, L., MARCONI, S., VIVANTI, V. e PIZZOFERRATO, L.. Nutrients in Edible Mushrooms: an inter-species comparative study. **Food Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 477-482, 1999.

MATTILA, P., KONKO, K., EUROLA, M., PIHLAVA, J. M., ASTOLA, J., VAHTERISTO, L., HIETANIEMI, V., KUMPULAINEN, J., VALTONEN, M. e PIIRONEN V.. Contents of Vitamins, Mineral Elements, and Phenolic Compounds in Cultivated Mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2343-2348, 2001.

VILELA P. S. **Cogumelos: Mercado e Comercialização**. Disponível em <<http://www.faemg.org.br/artigos01.asp?codart=33#7%20-%20Bibliografia%20Consultada>> Acesso em 05 Maio 2004.

# CAPÍTULO 1

## Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão

Regina Prado Zanes Furlani; Helena Teixeira Godoy

### RESUMO

Os cogumelos têm sido tratados como uma iguaria e podem ser apreciados tanto pelas suas características gastronômicas, conferindo sabor e aroma, como também pelo seu valor nutricional. Para a caracterização nutricional de um alimento um trabalho utilizando metodologias adequadas de análises deve ser realizado. A presente revisão apresenta dados de diversos autores, nacionais e internacionais, que realizaram análises quantitativas da composição de cogumelos comestíveis, avaliando o valor nutricional e as diferenças entre meios de cultivos e espécies.

**Palavras-chave:** cogumelo, fungos comestíveis, valor nutricional.

### SUMMARY

Mushrooms have been treated as a delicacy and can be appreciated for their gastronomic characteristics, conferring flavor and aroma, as also for their nutritional value. For the nutritional characterization of a food, a study using adequate analytical methodologies must be carried out. This review presents data from various authors, both national and international, who carried out quantitative analyses of the composition of edible mushrooms, evaluating the nutritional value and the differences between different ways of cultivation and species.

**Key words:** mushroom, edible fungi, nutritional value.

### INTRODUÇÃO

A relação humana com os cogumelos é muito antiga e fascinante. Eles são tratados como uma iguaria e desde a idade antiga são apreciados por se acreditar em seu potencial nutritivo e medicinal. Os egípcios acreditavam que os cogumelos eram um presente do deus Osíris. Já na Grécia antiga, os guerreiros acreditavam que os cogumelos proviam força e coragem. No Egito, os faraós os utilizavam como presente

especial e os romanos diziam ser o "Alimento dos Deuses" e, portanto, deviam ser servidos apenas em ocasiões especiais. Os antigos romanos chamavam os cogumelos de alimento divino por acreditarem que os cogumelos foram atirados para a Terra através de raios jogados por Júpiter durante uma tempestade (MANZI *et al.*,1999). Os chineses sempre trataram cogumelos como alimentos bons para a saúde, verdadeiro "elixir da vida", e os índios mexicanos os utilizavam como alucinógenos em rituais religiosos e feitiçarias, bem como com propósito terapêutico (CHANG & MILES, 1989). Embora muitas culturas venham usando os cogumelos tanto pela sua importância gastronômica quanto pelo seu valor medicinal, o seu emprego como alimento funcional é mais notado nas culturas orientais, nas quais a aplicação de cogumelos para se manter a saúde teve início há milhares de anos, como na China. O cogumelo shiitake, bem conhecido pelos japoneses e asiáticos, tornou-se o segundo cogumelo mais cultivado em todo o mundo. Junto ao costume alimentar dos asiáticos há também a forte tradição do uso dos cogumelos medicinalmente, datada há mais de 2000 anos (CHANG, 1996).

Recentemente o consumo de cogumelos também está aumentando na cultura ocidental envolvendo um grande número de espécies além do popular "champignon" (MATTILA *et al.*, 2001). Um grande crescimento pode ser atestado pelos seguintes números: em 1993, a produção anual mundial foi de 1,95 milhões de toneladas e em 2003 ela saltou para 3,19 milhões de toneladas, ou seja mais de 60% em 10 anos (FAOSTAT data, 2004). A produção do Brasil não se encontra nessa estatística mundial e segundo VILELA (2004), o país não possui estatísticas oficiais sobre a produção de cogumelos mas sabe-se que a maior região produtora está localizada no Alto Tietê, em São Paulo.

Hoje, os cogumelos são considerados por muitos pesquisadores como alimentos nutracêuticos ou funcionais fisiológicos, fato que tem estimulado também os atuais produtores brasileiros e novos produtores na busca de técnicas mais produtivas e na introdução de outras espécies. Atualmente, o cultivo dos cogumelos no Brasil vem crescendo, já que a cultura possibilita reciclar economicamente certos resíduos agrícolas e agro-industriais. Sob o ponto de vista nutricional, devido ao alto valor protéico, o cultivo dos cogumelos tem sido apontado como uma alternativa para acrescentar a oferta de proteínas aos países com alto índice de desnutrição. A utilização de certas espécies, em forma de chá ou cápsulas, como preventivo de algumas doenças, também acelerou a produção de cogumelos (CHANG & MILES, 1989).

São conhecidas cerca de 2000 espécies de cogumelos comestíveis mas apenas 25 delas são comercialmente cultivadas (COUTINHO, 2004). No Brasil, as principais

espécies comestíveis cultivadas são *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* e *Pleorotus spp* (EIRA & MINHONI, 1997) e recentemente a espécie *A. blazei* tem despertado interesse da medicina popular devido a suas possíveis propriedades medicinais e tem sido exportado do Brasil, principalmente para o Japão (PINHEIRO *et al.*, 2003).

O conhecido champignon (*A. bisporus*) foi a primeira espécie a ser cultivada no Brasil e é a espécie mais cultivada no mundo. No estado de São Paulo, principalmente na região de Mogi das Cruzes, o cultivo ainda é realizado de forma rudimentar, geralmente realizado por famílias chinesas que herdaram as técnicas por muitas gerações e sem conhecimentos científicos mais aprofundados (COUTINHO, 2004). Segundo a literatura nacional, o início do cultivo em escala comercial parece datar dos anos 50, quando imigrantes italianos se fixaram em Cabreúva e Atibaia, no estado de São Paulo e na mesma época imigrantes chineses instalaram-se em Mogi das Cruzes (BONONI, 2003). A alimentação do povo brasileiro usando proteína microbiana, na qual os cogumelos estão inseridos, é recente e restrita a algumas regiões onde prevalecem núcleos de imigrantes asiáticos. Estes povos trouxeram para o Brasil hábitos alimentares alternativos, dentre os quais o consumo de cogumelos (ANGELIS *et al.*, 2002).

A cultura do shiitake (*L. edodes*) foi iniciada na China há cerca de 800 anos. Esse cogumelo é o de segundo maior consumo no mundo (COUTINHO, 2004; SUGUI *et al.*, 2003). O Japão aperfeiçoou o cultivo e atualmente é o maior produtor mundial. São citados na literatura aspectos medicinais e terapêuticos do shiitake devido a um grande número de compostos biologicamente ativos que já foram isolados e purificados. Muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas para a melhor avaliação desse potencial (SUGUI *et al.* 2003). A medicina popular indica o shiitake para fortificar e restaurar o organismo. É indicado para todas as enfermidades que envolvam o enfraquecimento do sistema imunológico. CHANG & MILES (1989) descrevem efeitos antiviral e antitumoral em extrato aquoso desse cogumelo.

O *A. blazei* foi descoberto no Brasil e tem sido alvo de estudo no Japão desde a década de 80 (RIBEIRO, 2003). Essa espécie tem sido utilizada em forma de chás, cápsulas e também com alimento para prevenção de câncer, doenças do aparelho circulatório, digestivo e urinário, dentre outras.

Os cogumelos apresentam um alto teor de proteína e também são fontes de minerais e fibras alimentares. O teor de lipídeos é baixo, mas a relação entre ácidos graxos insaturados e saturados varia de 2 a 4,5:1 (BREENE,1990). Segundo

BREENE (1990), os cogumelos podem ser uma boa fonte de vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, niacina, biotina e vitamina C.

## VALOR NUTRICIONAL

Desconsiderando-se o alto teor de água, a composição de macronutrientes em cogumelos é relativamente alta e apresentam um baixo valor calórico. Cogumelos “in natura” apresentam teores de umidade que variam de 73,7 a 94,7 %. (CHANG & MILES, 1989; CHEUNG, 1997; MANZI *et al.*, 1999 e 2001; VETTER, 2003; LONGVAH & DEOSTHALE, 1998; YANG *et al.* 2001; STURION & OETTERER, 1995).

Várias publicações, artigos de metodologia, revisão ou livros descrevem o cogumelo como um alimento de alto valor protéico, fonte de fibra alimentar e vitaminas, além de terem um baixo teor de lipídeos.

## PROTEÍNA

Os cogumelos são considerados uma boa fonte de proteínas (BREENE, 1990). Para a maioria dos alimentos o teor de proteína é calculado utilizando-se um fator de correção a partir do conteúdo de nitrogênio orgânico presente. O fator 6,25 assume que as proteínas contêm 16% de nitrogênio e que são totalmente digeríveis. Esse fator despreza quantidades de compostos nitrogenados não protéicos presentes em alimentos e que são, na grande maioria, insignificantes. Os cogumelos, porém, possuem uma significativa quantidade de compostos nitrogenados não protéicos, na forma de quitina, em suas paredes celulares e tais compostos não são digeríveis. Para não superestimar o conteúdo protéico de cogumelos o fator 4,38 é adotado, pois esse valor assume que apenas 70% dos compostos nitrogenados existentes no cogumelo sejam digeríveis pelo organismo humano ( $0,70 \times 6,25 = 4,38$ ) (BREENE, 1990). Esse fator recomendado pode não representar o valor correto para proteína em cogumelos, já que pode haver diferenças entre espécies para o teor de quitina, amônia e outros compostos nitrogenados não protéicos (RANZANI & STURION, 1998).

Dados reunidos por CHANG & MILES (1989) apontam que o *A. bisporus* contém, em base seca, de 23,9 a 34,8% de proteína bruta. Para *Pleurotus* esse valor varia de 10,5 a 30,4% e para *L. edodes*, 13,4 a 17,5%. Esses dados foram compilados de diversos autores e o fator de conversão utilizado foi de 4,38. MATTILA *et al.* (2000) também descrevem cogumelos como fonte de proteínas contendo 19 a 35% em base seca, valores também compilados da literatura.

Vários trabalhos publicados na literatura internacional e alguns nacionais, a maioria utilizando metodologia descrita pela “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC, 1997), também conferem alto valor protéico aos cogumelos. Alguns deles avaliam a composição em termos de aminoácidos (WANG *et al.*, 2001; HADAR & COHEN-ARAZI, 1986; RANZANI & STURION, 1998; SENATORE *et al.* 1988).

RANZANI & STURION (1998) analisaram a composição de aminoácidos em espécies de *Pleurotus* spp. e em todas as espécies analisadas foram detectados todos os aminoácidos essenciais que constituíam de 42,57 a 56,38 % da proteína presente nesses cogumelos. Também em *Pleurotus*, WANG *et al.* (2001) verificaram a alta presença de aminoácidos essenciais, 126,7mg/g, em peso seco, de um total de 347,5mg/g de aminoácidos totais. Esse cogumelo apresentou, segundo os autores, todos os aminoácidos essenciais. MANZI *et al.* (1999) verificaram que amostras de *A. bisporus* continham todos os aminoácidos essenciais e os mais abundantes foram o ácido glutâmico e aspártico e arginina.

No Brasil, STURION & OETTERER (1995) avaliaram a composição química de três espécies de *Pleurotus* spp. e os conteúdos de proteína que os autores encontram variaram de 17,38 a 25,31%. Também no Brasil, RANZANI & STURION (1998) analisaram espécies de *Pleurotus* spp. cultivados em folha de bananeira e o teor de proteína bruta (N\*4,38) variou entre as espécies de 17,4 a 24,1%. Na espécie *P. ostreatus* MANZI *et al.* (1999) determinaram proteína pelo método da AOAC e em 8 amostras analisadas, da mesma espécie, obtiveram valores que variaram de 19,93 a 34,73% em base seca. Os autores utilizaram o mesmo substrato e o fator de correção utilizado foi de 4,38. Nesse mesmo trabalho também foram determinados os teores de proteína em outras espécies, como o *P. eryngii*, *P. pulmonarius* e os valores obtidos foram de 22,74 a 30,48%. A comparação entre as espécies mostrou que houve uma grande variabilidade dos teores de proteína, que, segundo os autores, pode ser explicado pela concentração de quitina presente em cada espécie. YANG *et al.* (2001), em Taiwan, verificaram que em amostra de *P. ostreatus*, proveniente de mercado local, analisada segundo o método oficial e utilizando o fator de correção de 4,38, o teor de proteína foi de 23,9%.

Dentre os muitos fatores que podem influenciar o valor protéico dos cogumelos talvez o mais importante seja o substrato.

RIOS-HURTADO *et al.* (2003) cultivaram *Pleurotus* em quatro substratos diferentes e obtiveram valores de proteína que variaram de 14,69 a 38,13% em base seca para cogumelos cultivados em palha de arroz e folha de bananeira, respectivamente. Os

autores não relataram o fator utilizado para conversão de nitrogênio em proteína. WANG *et al.* (2001) cultivaram a mesma espécie em bagaço de grãos malteados (resíduo de cervejaria) e utilizando o fator de 6,25 para conversão de nitrogênio em proteína, encontraram valores de 41,5 a 53,3% de proteína, em base seca.

EKANEM & UBENGAMA (2002) verificaram que o estágio de maturação (botão e totalmente desenvolvido) em amostras de *P. ostreatus* influencia significativamente ( $p < 0,05$ ) o teor de proteína, no cogumelo ainda botão o valor foi de 28% e para o totalmente desenvolvido foi de 40,25%.

MANZI *et al.* (2001), avaliaram as perdas de proteína após o cozimento de *P. ostreatus* e concluíram que o processamento, pelo decréscimo da quantidade de água, aumentou significativamente os teores de proteína, passando de 1,61 % para 2,53%, em base úmida. Entretanto, como os valores não foram apresentados em base seca a avaliação da perda do teor protéico pelo processamento não pode ser avaliada.

Em *A. bisporus* os teores de proteína apresentados por diversos autores variaram de 26,8% (CHEUNG, 1997) a 39,32% (VETTER, 2003), em base seca.

Os teores protéicos encontrados para os cogumelos de diferentes regiões da Espanha e em diferentes épocas não foram significativamente diferentes, ficando em uma faixa de 2,5 a 2,8%, em base úmida (LLANOS *et al.*, 1993). No entanto MANZI *et al.* (2001), encontraram teores de proteína mais baixos (1,3 a 1,6%).

Em se tratando de uma das espécies de cogumelo mais consumida, principalmente na forma de conserva, alguns trabalhos na literatura avaliaram o teor protéico dos champignons enlatados (conserva). MATIN-BELLOSO & LLANOS-BARBIOBERO (2001) encontraram teores de proteína de 2% (base úmida). VETTER (2003) encontrou valores de 35,1% e 40,6% para cogumelos em conserva fatiados e inteiros, respectivamente (base seca).

MANZI *et al.* (2001), analisando duas amostras de *A. bisporus* encontraram valores de proteína maiores para as amostras após o cozimento e congelamento.

Em 1998, LONGVAH & DEOSTHALE, utilizando fator de correção de 6,25, encontraram 22,8% de proteína em amostras de shiitake desidratados adquiridos no mercado local de Manipur, na Índia. YANG *et al.* (2001) analisaram duas amostras da espécie *L. edodes* e encontraram 19,7 e 20,5% de proteína.

## LIPÍDEOS

Os cogumelos apresentam uma baixa quantidade de lipídeos, variando entre 1,1 e 8,3% em base seca, segundo dados compilados por CHANG e MILES (1989).

No Brasil, STURION & OETTERER (1995) avaliaram teor de lipídeos em *Pleurotus* cultivado em quatro diferentes substratos e obtiveram valores variaram 1,54 e 1,86%.

LONGVAH & DEOSTHALE (1998) analisaram cogumelos comestíveis provenientes do nordeste da Índia. Encontraram 2,1% de gordura em base seca na espécie *L. edodes* e na análise dos ácidos graxos, concluíram que 77,7% dos lipídeos eram constituídos por ácidos graxos insaturados, com predominância para o linolêico. Esses valores confirmam os dados de HADAR & COHEN-ARAZI (1986) e de SENATORE *et al.* (1988).

Cogumelos comercializados em Taiwan e analisados por YANG *et al.* (2001) apresentaram teores de lipídeos que variaram de 2,16% (*P. ostreatus*) a 6,3% (*L. edodes*). Um trabalho conduzido no Japão (WANG *et al.*, 2001) apresentou resultados que variaram de 4,3 a 4,7% de lipídeos em *P. ostreatus* que foram cultivados em resíduos de cervejaria. Na Itália, MANZI *et al.* (2001) encontraram 0,33 e 0,36% de lipídeos em base úmida para *A. bisporus* e *P. ostreatus*, respectivamente. Em um trabalho recente realizado na Colômbia, RIOS-HURTADO *et al.* (2003) analisaram *Pleurotus* que foram cultivados em diferentes substratos e os valores para lipídeos foram de 0,78 a 2,72%.

## CARBOIDRATOS E FIBRA ALIMENTAR

Os carboidratos são os constituintes principais do cogumelo com exceção da água. Na revisão apresentada por BREENE (1990) os carboidratos constituem de 3 a 28% e as fibras representam 3 a 32%, em base seca. O autor cita que o *A. bisporus*, um cogumelo muito estudado, contém pentoses (xilose e ribose), hexoses (glucose, galactose, manose), sacarose, metil pentoses (ramose, fucose) e outros açúcares (manitol, inositol, ácidos galacturônico e glicorônico e glicosamina). O polímero da N acetilglicosamina, chamado de quitina, é um polissacarídeo estrutural importante encontrado na parede celular do cogumelo (PARDO *et al.*, 2001).

A maioria dos trabalhos analíticos encontrados na literatura calcula o teor de carboidratos em cogumelos por diferença (YANG *et al.* 2001; MANZI *et al.* 2001; BAUTISTA-JUSTO *et al.* 1998; MARTIN-BELLOSO & LLANOS-BARRIOBERO, 2001). Os valores variam para cada espécie, *Pleurotus* spp apresentam teores entre 6,69 e 7,59% em base úmida; *L. edodes* entre 5,37 e 5,85% e *A. bisporus* 0,80 e 5,24%. Esses valores excluem as fibras.

Fibra alimentar são os polissacarídeos e a lignina de vegetais que não são digeridos pelas enzimas digestivas do homem e são classificadas, quanto à sua solubilidade em água, como fibras solúveis (pectinas, beta-glicanas, gomas, mucilagens e algumas hemiceluloses) e insolúveis (pectinas insolúveis, celulose, hemiceluloses e lignina). Devido aos efeitos fisiológicos das fibras alimentares alguns autores se dedicaram a quantificar a fibra alimentar em cogumelos.

MANZI *et al.* (2001) encontraram 4,10% de fibra alimentar em *P. ostreatus* e 1,98% em *A. bisporus*, em base úmida. Já BAUTISTA-JUSTO *et al.* (1998) encontraram em três diferentes cepas de *P. ostreatus* valores entre de 32,14 a 36,81%, em base seca. CHEUNG (1996) analisou o chapéu e a haste de três espécies de cogumelos (*L. edodes*, *L. shimeji* e *Pleurotus*). Para o *L. edodes* o valor de fibra alimentar foi de 44,9% e 52,7%; para o *L. shimeji* foi de 44% e 39,2% e para o *Pleurotus* spp., 42,6% e 42,2% para o chapéu e haste respectivamente. Em 1997, novamente CHEUNG analisou *A. bisporus* e obteve 18,2% de fibra alimentar. Todos os valores apresentados por esse autor foram em base seca.

## VITAMINAS

Segundo BREENE (1990) os cogumelos podem ser uma boa fonte de vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, niacina, biotina e vitamina C. Poucos trabalhos analisaram essas vitaminas em cogumelos e somente nos últimos anos é que dados analíticos estão disponíveis na literatura internacional.

LLANOS *et al.* (1993) analisaram vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> e C em *A. bisporus* de três principais zonas produtoras na Espanha. As análises foram conduzidas em três períodos do ano e a média dos resultados foi 0,10; 0,29; 0,09 e 11,50mg/100g de vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> e C, respectivamente. A metodologia utilizada foi cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Três cepas de *P. ostreatus* provenientes do México foram analisadas para vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C e niacina. Os valores encontrados foram 1,92 a 1,96mg/100g para tiamina, 3,31 a 3,70mg/100g para riboflavina, 35,98 a 36,56mg/100g para niacina e 28 a 35mg/100g para ácido ascórbico, sendo todos os dados expressos em base seca (BAUTISTA-JUSTO *et al.*, 1998).

ESTEVE *et al.* (2001), utilizaram a CLAE para analisar as vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em *A. bisporus* cultivados na Espanha, e os valores encontrados foram 1,0 e 6,37µg/g respectivamente. Novamente na Espanha, MARTIN-BELLOSO & LLANOS-

BARRIOBERO (2001) também analisaram *A. bisporus* para vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>6</sub> e os resultados apresentados foram 0,41; 1,62 e 0,42mg/100g, respectivamente.

Na Finlândia, MATTILA *et al.* (2001) caracterizaram *A. bisporus* (branco e marrom), *L. edodes* e *P. ostreatus* para vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, C, D, niacina e folatos totais e verificaram que os cogumelos são boas fontes de vitaminas, principalmente de B<sub>2</sub>, niacina e folatos. A espécie *L. edodes* foi a mais apresentou teores mais elevados das vitaminas C (2,1mg/100g), B<sub>12</sub> (0,07µg/100g) e D (0,1 µg/100g). A espécie *P. ostreatus* apresentou maiores teores das vitaminas B<sub>1</sub> (0,07mg/100g) e folatos (51µg/100g) e a espécie *A. bisporus* (marrom) apresentou maior teor de niacina (4,1mg/100g) e a mesma espécie branca apresentou maior teor de vitamina B<sub>2</sub> (0,39mg/100g).

RIOS-HURTADO *et al.* (2003) analisaram *P. ostreatus* cultivados em diferentes substratos. Os valores para nicotinamida variaram de 8,89 a 26,58g/100g, para tiamina 0,61 a 9,91g/100g, para piridoxina 0,83 a 68,27g/100g, para vitamina C 1,19 a 194,14g/100g e riboflavina não foi detectada. Esses valores estão expressos emg/100g de parte comestível e não foi especificado se os resultados são em base seca ou úmida.

## **FATORES QUE INFLUENCIAM A COMPOSIÇÃO**

Os dados coletados nessa revisão mostram que existe uma grande diferença nas porcentagens de macro e micro nutrientes encontrados nos cogumelos. Esses valores, muitas vezes discrepantes, podem ter origem em diversos pontos, desde a escolha da espécie, cepas e variedades até o tipo de substrato utilizado, o grau de maturação e o tipo de armazenamento e o processo de conservação.

No Brasil, STURION e OETTERER (1995) determinaram a composição química dos corpos de frutificação de três espécies de *Pleurotus* cultivados em quatro diferentes substratos. Foi avaliado o teor de umidade, nitrogênio, extrato etéreo, fibra bruta, celulose, hemicelulose, lignina, cinza, micro e macro nutrientes. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que a composição química dos cogumelos variou, além da espécie, com o substrato utilizado sendo os componentes mais afetados a proteína, a fração fibrosa e os minerais.

Em 1996, em um trabalho conduzido por RAGUNATHAN e colaboradores foram verificados a eficiência biológica e alguns nutrientes nos corpos de frutificação de três espécies de *Pleurotus* (*P. sajor-caju*, *P. platypus* e *P. citrinopileatus*) cultivados em cinco tipos de substratos diferentes (palha de arroz, de milho, bagaço de cana, fibra de coco, e uma mistura desses resíduos). As diferentes espécies cultivadas em substratos distintos

apresentaram valores de 84,7 a 91,9% de umidade, 40,6 a 46,6% de carboidratos, 26,9 a 42,5% de proteína. A eficiência biológica (produtividade) variou entre 25,1 a 46,6% e os cogumelos apresentaram 0,8 a 2,5mg/g de cálcio, 5,1 a 15,2mg/g de ferro, 0,49 a 18,8mg/g de potássio, 9,2 a 14,1mg/g de magnésio, 0,5 a 1,32mg/g de sódio e 113 a 218mg/g de fósforo. Os autores concluíram que a palha de arroz favorece o crescimento da espécie *P. sajor-caju*, fibra de coco favorece *P. platypus* e bagaço de cana de açúcar, *P. citrinopileatus*, mas não fazem correlação entre as espécies e os substratos utilizados para os teores de nutrientes encontrados.

YILDIZ *et al.* (1998) estudaram a espécie *P. ostreatus* cultivada em diferentes substratos. Foram utilizados como fonte lignocelulósica as palhas de sorgo, de amendoim, de soja e de trigo. A relação carbono/nitrogênio dos substratos variou entre 25,13 a 81,08. Os autores analisaram os elementos orgânicos (C, H e N), proteína e minerais (K, Ca, Cu, Zn Mn e Fe) além da produção, calculada a partir do peso do substrato. Para a produção, os autores encontraram diferenças significativas entre os substratos utilizados. Palhas de soja e amendoim tiveram uma produção superior quando comparadas com trigo e a palha de sorgo foi o substrato menos produtivo. Quanto ao teor de proteína, as palhas de sorgo, amendoim e soja produziram cogumelos com quantidades superiores aos produzidos com palha de trigo. Também houve diferenças nas concentrações de minerais, dependendo de cada substrato utilizado.

MANZI *et al.* (1999) estudaram diferentes espécies e cepas, cultivadas no mesmo substrato, em relação a nutrientes. Para a espécie *P. ostreatus*, as diferentes cepas analisadas apresentaram teores de proteína que variaram entre 19,93 e 34,73%. Essa variação pode ser atribuída desde fatores comumente citados na literatura até às mudanças genéticas que a espécie vem sofrendo.

Também analisando três cepas diferentes de *P. ostreatus*, BAUTISTA-JUSTO *et al.* (1998), no México, obtiveram valores significativamente diferentes para proteína, fibra alimentar e carboidratos nas três cepas analisadas. Para lipídeos, uma cepa mostrou-se inferior às outras e, para umidade, nenhuma cepa se mostrou diferente. Os conteúdos de vitaminas (niacina, riboflavina tiamina e ácido ascórbico), nessas cepas analisadas, não se mostraram diferentes e para os minerais cálcio e fósforo os valores foram significativamente diferentes para as três cepas.

Três substratos à base de bagaço de grãos malteados (resíduo de cervejaria), suplementados com diferentes níveis de farelo de trigo, arroz, aveia, milho e resíduo de soja (*okara*), foram utilizados por WANG *et al.* (2001) para o cultivo de *P. ostreatus*. Os

autores avaliaram a eficiência biológica (razão entre o peso da produção e o peso inicial do substrato), a composição centesimal, aminoácidos e teores de vitaminas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, niacina e ácido ascórbico) e minerais. Concluíram que resíduo de cervejaria é um bom substrato para o cultivo de *P. ostreatus* e que houve variação na composição dos cogumelos, dependendo da quantidade e do tipo de farelo adicionado.

RAGUNATHAN & SWAMINATHAB (2003) cultivaram espécies de *Pleutotus* em diferentes substratos (resíduos agrícolas). Nesse trabalho, verificaram que não houve interferência do tipo de resíduo utilizado na composição dos cogumelos.

Também em 2003, RIOS HUTADO e colaboradores produziram *P. sajor-caju* em quatro substratos lignocelulósicos (serragem, palha de milho, folha de bananeira e palha de arroz) e avaliaram a variação da composição dos corpos de frutificação. As maiores diferenças foram para proteína (14,69 a 38,13%), carboidratos (9,38 a 44%), vitamina B<sub>6</sub> (0,83 a 68,27mg/100g) e vitamina C (1,19 a 194,14mg/100g). Os cogumelos cultivados em palha de arroz apresentaram o menor teor protéico (14,69%) e os menores teores de vitaminas. Já o cogumelo cultivado em folha de bananeira apresentou apenas 9,38% de carboidratos, mas apresentou o maior teor de vitaminas C e B<sub>6</sub>, 194,32mg/100g e 68,27mg/100g, respectivamente.

Recentemente, BANIK & NANDI (2004) avaliaram o efeito da suplementação da palha de arroz com o lodo residual da produção de biogás e verificaram um aumento da produtividade, de 63,1 a 108,9% e também nos níveis de proteína, que chegaram a um acréscimo de até 57% dependendo do tipo de lodo utilizado.

## **CONCLUSÕES**

Embora haja uma grande diferença na composição, dependendo das espécies e os meios de cultivo utilizados para a produção de cogumelos comestíveis, estes podem ser considerados excelentes alimentos devido às características nutricionais, pois apresentam alto teor de proteínas e carboidratos e baixos teores de gordura, resultando em um baixo valor calórico. Os cogumelos têm uma considerável quantidade de fibra alimentar e podem ser considerados fontes de aminoácidos essenciais. Embora não possam ser considerados fontes de vitaminas podem contribuir com o aporte das mesmas na dieta.

## **AGRADECIMENTOS**

As autoras agradecem à Fapesp pelo auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELIS, D. F., LUCHESI, A.C. e SIMÕES, A.C. **Sociedade dos Amigos do Instituto Biológico: *Lentinus edodes*** (Beek.) Pegler, o cogumelo Shiitake. Disponível em <<http://www.geocities.com/~esabio/cogumelo/lentinusedodes.htm>> Acesso em 25 Outubro 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL AOAC. **Official methods of analysis**. 16<sup>ed.</sup>, 3<sup>o</sup> rev., Gaitherburg, M.D., 1997.

BANIK, S.; NANDI, R. Effect of supplementation of rice straw with biogas residual slurry manure on the yield, protein and mineral contents of oyster mushroom. **Industrial crops and products**. *In press, Corrected Proof*, 2004.

BAUTISTA-JUSTO,-M; ALANIS-GUZMAN,-M-G; GONZALEZ-DE-MEJIA,-E; GARCIA-DIAZ,-C-L. Composicion quimica de tres cepas mexicanas de *setas* (*Pleurotus ostreatus*). **Archivos Latinoamericano de Nutricion**, v. 48, n. 4, p. 359-63, 1998.

BONONI, V. L. R. O cultivo de *Agaricus bisporus* no Brasil. **Anais do 1<sup>o</sup>. Simpósio Internacional sobre cogumelos, alimentação, saúde, tecnologia e meio ambiente no Brasil**. Brasília: Ed. Urben, A. F.;Santos, J. K. P.;Oliveira, H. C. B.: Embrapa, agosto 2003. p. 24-31.

BREENE, W. M. Nutritional and Medicinal Value of Specialty Mushrooms. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 10, p. 883-894, 1990.

CHANG, R. Functional properties of Edible Mushrooms. **Nutrition Reviews**, v. 54, n. 11, p. S91-S93, 1996.

CHANG, S.T.; MILES, P.G. **Edible mushrooms and their cultivation**. CRC Press, inc Boca Raton, Florida, 1989.

CHEUNG, P. C. K. Dietary Fiber Content and Composition of Some Edible Mushroom fruiting bodies and mycelia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, n. 2, p. 468-471, 1996.

CHEUNG, P. C. K. Dietary Fiber Content and Composition of Some Edible Fungi Determined by Two methods of analysis. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, v.73, n. 2, p. 255-260, 1997.

COUTINHO, L.N. **Cultivo de espécies de cogumelo comestíveis**. Disponível em <<http://www.geocities.com/esabio.geo/cogumelo/agaricus.htm>>. Acesso em: 13 maio 2004.

EIRA, A.F.; MINHONI, M.T.A. **Manual teórico: prático do cultivo de cogumelos comestíveis**. 2.ed. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais PAF; FCA, UNESP, 1997. 115p.

EKANEM, E. O.; UBENGAMA, V. S. Chemical composition, anti-nutritional factors and shelf life of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). **Journal of Food Science Technology**, v. 39, n. 6, p. 635-338, 2002.

ESTEVE, M. J.; FARRÉ, R.; FRÍGOLA, A.; GARCIA-CANTABELLA, J. M. Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in mushrooms by liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1450-1454, 2001.

**FAOSTAT data, 2004.** FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Agricultural Production - Crops Primary** - Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?version=ext&hasbulk=0&subset=agriculture>> Acesso em 10/10/2004.

HADAR, Yitzhak; COHEN-ARAZI, Ephraim. Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. **Applied and environmental microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1352-1354, 1986.

LLANOS, E.; BARCOS, R.; AUTOR, M. J.; MUNILLA, C.; ANTOLIN, R.; MARTIN, O. Composición química del champiñón, **Alimentación - equipos y tecnología**, v. 12, n. 4, p. 53-59, 1993.

LONGVAH, T.; DEOSTHALE, Y. G. Compositional and Nutritional Studies on Edible wild Mushroom from Northeast India. **Food chemistry**, v. 63, n 3, p. 331-334, 1998.

MANZI, P., GAMBELLI, L., MARCONI, S., VIVANTI, V. e PIZZOFERRATO, L.. Nutrients in Edible Mushrooms: an inter-species comparative study. **Food Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 477-482, 1999.

MANZI, P.; AGUZZI, A.; PIZZOFERRATO, L. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy, **Food chemistry**. v. 73, n. 3. p. 321-325, 2001.

MARTÍN-BELLOSO, O.; LLANOS-BARRIOBERO, E. Proximate composition, minerals and vitamins in selected canned vegetable. **European Food Research Technology**, v. 212, n. 2, p. 182-187, 2001.

MATTILA, P., KONKO, K., EUROLA, M., PIHLAVA, J. M., ASTOLA, J., VAHTERISTO, L., HIETANIEMI, V., KUMPULAINEN, J., VALTONEN, M. e PIIRONEN V. Contents of Vitamins, Mineral Elements, and Phenolic Compounds in Cultivated Mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2343-2348, 2001.

MATTILA, P.; SUONPAA, K.; PIIRONEN, V. Functional properties of edible mushrooms. **Nutrition**. V. 16, n. 7/8, p. 694-696, 2000.

PARDO, A.; JUAN, J. A.; PARDO, J. E. Chemical composition and nutritional value of cultivated **mushroom**, *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. **Alimentacion Equipos y Tecnologia**, v. 20 n. 157, p. 115-117, 2001.

PINHEIRO, F.; FARIA, R.R.; CAMARGO, J.L.V.; SPINARDI-BARBISAN, A.L.T; EIRA, A.F.; BARBISAN, L.F. Chemoprevention of preneoplastic liver foci development by dietary mushroom *Agaricus blazei* Murrill in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v.41, n. 11, p. 1543–1550, 2003.

RAGUNATHAN, R.; GURUSAMY, R.; PALANISWAMY M.; SWAMINATHAN, K. Cultivation of *Pleurotus* spp. on various agro-residues. **Food Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 139-144, 1996.

RAGUNATHAN, R.; SWAMINATHAN, K. Nutritional status of *Pleurotus* spp. grown on various agro-wastes. **Food Chemistry**, v. 80, n. 3, p. 371-375, 2003.

RANZANI, M. R. T. C.; STURION, G. L. Avaliação da composição em aminoácidos de *Pleurotus* spp. cultivados em folha de bananeira. **Archivos Latinoamericanos de nutrición**, v. 48, n. 4, p. 339-348, 1998.

RIBEIRO, V. L. Produção de *Agaricus blazei* Murril no Brasil. **Anais do 1º. Simpósio Internacional sobre cogumelos, alimentação, saúde, tecnologia e meio ambiente no Brasil**. Brasília: Ed. Urben, A. F.; Santos, J. K. P.; Oliveira, H. C. B.: Embrapa, agosto 2003. p. 71-76.

RIOS-HURTADO, A.; TORRES-TORRES, G.; MEDINA-RIVAS, M. A. Caracterización bromatológica de la seta (*Pleurotus sajor-caju*) producida em cuatro sustratos orgánicos. **Alimentaria**, v. 349, p. 85-89, 2003.

SENATORE, F.; DINI, A.; MARINO, A.; SCHETTINO, O. Chemical constituents of some basidiomycetes. **Journal of science of food and agriculture**, v. 45, n. 4, p. 337-345, 1988.

STURION, G. L. e OETTERER, M. Composição química de cogumelos comestíveis (*Pleurotus* spp.) originados de cultivos em diferentes substratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 15, n. 2, p. 189-193, 1995.

SUGUI, M. M.; ALVES de LIMA, P. L.; DELMANTO, R. D.; EIRA, A. F.; SALVADORI, D. M. F.; Ribeiro, L. R. Antimutagenic effect of *Lentinula edodes* (BERK.) Pegler mushroom and possible variation among lineages, **Food and Chemical Toxicology**; v. 41, n. 4, p. 447-602, 2003.

VETTER, J. Chemical composition of fresh and conserved *Agaricus bisporus* mushroom. **European Food Research and Technology A**, v. 217, n. 1, p. 10-12, 2003.

VILELA P. S. **Cogumelos: Mercado e Comercialização**. Disponível em <<http://www.faemg.org.br/artigos01.asp?codart=33#7%20-%20Bibliografia%20Consultada>> Acesso em 05 Maio 2004.

WANG, D.; SAKODA, A.; SUZUKI, M. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. **Bioresource Tecnology**, v. 78, n. 3, p. 293-300, 2001.

YANG J. H.; LIN H. C.; MAU J. L.- Non-volatile taste components of several commercial mushrooms, **Food Chemistry**, v. 72, n. 4, p. 465-471, 2001.

YILDIZ, A.; KARAKAPLAN; M.; AYDIN, F. Studies on *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kum. var. *salignus* (Pers. ex Fr.) Konr. et Maubl.: cultivation, proximate composition, organic and mineral composition of carpophores, **Food Chemistry**, v. 61, n. 1-2, p. 127-130, 1998.

## CAPÍTULO 2

### Valor nutricional de cogumelos comestíveis: estudo comparativo entre espécies cultivadas no Brasil

Regina Prado Zanes Furlani; Tatiana Rodrigues Lima; Helena Teixeira Godoy

#### RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar e comparar a composição centesimal, teor de ácido ascórbico, fibra alimentar e fósforo dos cogumelos mais cultivados no Brasil (*Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, e *Pleurotus* spp). Cinco diferentes lotes de cada cogumelo foram analisados segundo os métodos descritos pela “Association of Official Analytical Chemists International” (AOAC, 1997). Para sólidos totais, proteína, lipídeo, cinza, carboidratos, fibra alimentar e fósforo os valores médios, em base seca, foram respectivamente: 9,37; 23,22; 4,71; 8,89; 63,17 e 34,0g/100g. Para fósforo e ácido ascórbico os valores médios em base úmida foram de 104,13 e 6,67mg/100g. Pela composição, os cogumelos estudados neste trabalho mostraram ser um alimento com características nutricionais excelentes, pois apresentaram alto teor de proteínas e fibras alimentares, além do baixo teor de lipídeos e fonte considerável de fósforo, entretanto mostraram-se fontes pobres de ácido ascórbico.

**Palavras-chave.** Cogumelo, valor nutricional, fungos comestíveis, composição centesimal.

#### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate and to compare the proximate composition, vitamin C (ascorbic acid), dietary fiber and phosphorus contents of the more cultivated mushrooms in Brazil (*Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, and *Pleurotus* spp). Five different batches of each mushroom were analyzed according to methods described in the Association of Official Analytical Chemists International (AOAC, 1997). For total solids, protein, fat, ash, carbohydrates and dietary fiber the average values, on a dry weight basis, were respectively: 9.37, 23.22, 4.71, 8.89, 63.17 and 34.0g/100g. For phosphorus and vitamin C, the average values on a wet weight basis were: 104.13 and 6.67mg/100g. From their

compositions, the mushrooms studied here were shown to be excellent nutritional foods, presenting high protein and dietary fiber contents, low fat contents and reasonable source of phosphorus, although poor vitamin C sources.

**Key words.** Mushroom, nutritional value, edible fungi, proximate composition.

## INTRODUÇÃO

Os cogumelos são alimentos muito apreciados desde a idade antiga por se acreditar em seu elevado valor nutritivo e em seu potencial medicinal, além de ser classificado como uma especiaria nobre em pratos culinários. São conhecidas aproximadamente 2000 espécies comestíveis e cerca de 25 delas são comercialmente cultivadas (COUTINHO, 2004). Dentre essas, existem 3 espécies mais comumente cultivadas no Brasil e apreciadas gastronômicamente: *A. bisporus*, conhecido como champignon de Paris; *L. edodes* ou Shiitake e *Pleurotus*, conhecido como shimeji ou hiratake (URBEN, 2001). No Brasil, vem se notando um crescimento no consumo e conseqüentemente na produção e comercialização de tal produto. Esse fato se dá por haver, atualmente, uma maior divulgação de seu valor nutritivo e medicinal e por seu preço ter se tornado um pouco mais acessível à população. Informação a respeito da composição de alimentos tem se tornado cada vez mais importante para avaliar a sua qualidade. Constituintes como vitaminas, proteínas, lipídeos e fibras têm se tornado uma importante preocupação para profissionais da área da saúde e de alimentos. O consumidor também tem se interessado por produtos com melhor qualidade e que contenham informações adequadas. Mas muito pouco se sabe a respeito da qualidade dos cogumelos comestíveis cultivados no Brasil, especialmente a respeito de diferenças entre espécies. A composição centesimal, bem como teor de vitaminas e minerais têm grande valor, uma vez que esses constituintes desempenham funções importantes no organismo humano e animal.

Com base nestas considerações, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a composição centesimal, ácido ascórbico, fibra alimentar e fósforo em três espécies de cogumelos produzidos no Brasil (*A. bisporus*, *L. edodes* e *P. ostreatus*).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostras

Foram adquiridos 5 lotes de 400g de cada espécie (*A. bisporus* - champignon de Paris; *L. edodes* - shiitake e *Pleurotus* spp - shimeji) de cogumelos *in natura* no comércio

da cidade de Campinas e São Paulo. Cada lote foi dividido em 2 partes, uma destinada à análise da composição centesimal, fósforo e ácido ascórbico e outra, seca em estufa a 105°C, destinada à análise de fibra alimentar. Para determinação de fibra alimentar, apenas três lotes, foram utilizados.

## **Métodos**

Para a determinação de sólidos totais, cinza, proteína e fibra alimentar (método enzimático) foram utilizados os métodos descritos na AOAC (1997). O fator de conversão utilizado para proteína foi 4,38 (BREENE,1990). Para a determinação de lipídeos foi utilizado o método descrito por BLIGH & DYER (1959). O conteúdo de carboidratos nos cogumelos foi calculado por diferença. Todas as determinações foram realizadas em triplicata, com exceção da fibra alimentar que foi em quadruplicatas.

O teor de fósforo foi determinado utilizando fosfomolibdovanadato de acordo com o método espectrofotométrico descrito na AOAC (1997).

Para a determinação de Ácido ascórbico, foi empregado o método titulométrico que se baseia na reação de oxi-redução do ácido ascórbico em meio ácido pela ação do 2,6-diclorofenolindofenol de sódio. As amostras foram extraídas com ácido oxálico (BENASSI & ANTUNES, 1988). A extração foi realizada em duplicata e a titulação em triplicata.

## **Análise estatística**

Foi realizada análise de variância e teste de Tukey, utilizando-se o programa STATISTICA, StatSoft (2000). Foram avaliadas as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para os teores de cada composto analisado para cada espécie e as diferenças entre as espécies.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As Tabelas de 1 a 5 mostram os resultados obtidos nas determinações realizadas para a composição centesimal em três diferentes espécies de cogumelos. Os resultados estão apresentados em base seca, com exceção de sólidos totais que estão apresentados em base úmida.

Os conteúdos de sólidos totais nos cogumelos, apresentados na Tabela 1, ficaram na faixa de 8,00 a 9,23%, confirmando o alto teor de umidade desses produtos (BREENE, 1990; CHANG, 1996). Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os lotes, possivelmente afetada por alguns fatores, tais como condições de cultivo, armazenamento pós-colheita,

entre outros. Entretanto, a média dos teores de sólidos totais extraída das análises dos cinco diferentes lotes de cada amostra para as três espécies não apresentou diferença significativa.

Tabela 1 - Sólidos Totais em cogumelos (%) <sup>a</sup>.

Lote	Champignon	Shiitake	Shimeji
1	7,42 ± 0,05 (d)	8,87 ± 0,12 (c)	7,20 ± 0,02 (e)
2	7,78 ± 0,17 (c)	9,78 ± 0,15 (a)	11,97 ± 0,03 (a)
3	6,66 ± 0,01 (e)	9,44 ± 0,05 (b)	11,08 ± 0,06 (b)
4	9,77 ± 0,05 (a)	5,41 ± 0,01 (e)	8,96 ± 0,05 (c)
5	8,28 ± 0,08 (b)	8,44 ± 0,07 (d)	8,04 ± 0,02 (d)
Média <sup>b</sup>	8,00 ± 1,07 (a)	8,39 ± 1,62(a)	9,23 ± 1,71 (a)

<sup>a</sup> Médias e estimativa de desvio padrão (n=3). Valores expressos em base úmida. <sup>b</sup> Médias e estimativa de desvio padrão (n=15) das análises de cinco diferentes lotes. Valores assinalados com a mesma letra na mesma coluna entre as médias parciais, e na última linha para resultados finais, não diferem significativamente (p<0,05), segundo teste de Tukey.

Observando os resultados apresentados na Tabela 2, nota-se que na composição de todas as espécies analisadas, os carboidratos são os maiores constituintes nutricionais apresentando um teor médio de 63,17%, em base seca. Quando foi realizada a comparação entre as três espécies, o champignon e o shimeji foram estatisticamente iguais, ambos diferindo do shiitake que foi superior.

Quando os dados de cada lote foram analisados separadamente, notou-se que para o champignon, houve diferença (p<0,05) entre todos os lotes analisados. Para o shimeji, apenas dois lotes não diferiram significativamente dos demais e para o shiitake apenas um lote diferiu significativamente (p<0,05) dos demais. Os valores médios para carboidratos encontrados para cada tipo de cogumelo estão próximos aos citados na literatura internacional (CHEUNG,1997; CHANG e MILLES, 1989; MANZI *et al.*, 2001; YANG *et al.* 2001).

Tabela 2 - Carboidratos em cogumelos (%) <sup>a</sup>.

Lote	Champignon	Shiitake	Shimeji
1	50,42 ± 0,55 (d)	70,68 ± 2,60 (a)	75,74 ± 0,29 (a)
2	54,00 ± 1,82 (c)	70,86 ± 1,34 (a)	52,39 ± 1,02 (d)
3	65,05 ± 0,52 (a)	70,69 ± 0,71 (a)	65,40 ± 0,31 (c)
4	57,48 ± 0,56 (b)	69,10 ± 0,14 (ab)	67,64 ± 1,03 (b)
5	43,67 ± 0,98 (e)	66,57 ± 0,52 (b)	67,92 ± 0,79 (b)
Média <sup>b</sup>	54,12 ± 7,42 (b)	69,58 ± 2,05 (a)	65,82 ± 7,86 (b)

<sup>a</sup> Valores calculados e estimativa de desvio padrão (n=3). Valores expressos em base seca. <sup>b</sup> Médias dos valores calculados e estimativa de desvio padrão (n=15) referentes a cinco diferentes lotes. Valores assinalados com a mesma letra na mesma coluna entre as médias parciais, e na última linha para resultados finais, não diferem significativamente (p<0,05), segundo teste de Tukey.

Outro constituinte que se destaca na composição dos cogumelos é a proteína e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3. O valor médio para todas as espécies foi de aproximadamente 23% e o champignon foi estatisticamente superior aos demais. Seu teor médio de proteína foi de 28,45% em base seca, e está de acordo com o intervalo apresentado por CHANG & MILLES (1989) entre 23,9 e 34,8% de proteína.

Os diferentes lotes, para cada espécie apresentaram diferenças significativas para os teores de proteína. Para o shiitake, a quantidade de proteína foi de 18,98%, em base seca, ligeiramente superior aos dados apresentados por CHANG & MILES (1989) (13,4 a 17,5%) e MANZI *et al.* (1999) (15,19%). Já para o shimeji a média encontrada nesse trabalho foi de 22,22%, em base seca, valor que se enquadra nos intervalos apresentados por CHANG & MILES (1989) que foi de 10,5 a 30,4% e por MANZI *et al.* (1999) que foi de 19,93 a 34,73%.

Tabela 3 - Proteína em cogumelos (%) <sup>a</sup>.

Lote	Champignon	Shiitake	Shimeji
1	31,57 ± 0,33 (b)	17,97 ± 1,53 (b)	16,19 ± 0,38 (e)
2	30,31 ± 0,50 (c)	19,63 ± 0,33 (ab)	33,73 ± 0,70 (a)
3	16,46 ± 0,16 (e)	18,58 ± 0,46 (ab)	22,91 ± 0,27 (b)
4	26,34 ± 0,11 (d)	18,24 ± 0,21 (b)	19,71 ± 0,13 (c)
5	37,59 ± 0,32 (a)	20,48 ± 0,24 (a)	18,59 ± 0,29 (d)
Média <sup>b</sup>	28,45 ± 7,25 (a)	18,98 ± 1,16 (b)	22,22 ± 6,37 (b)

<sup>a</sup> Médias e estimativa de desvio padrão (n=3). Valores expressos em base seca. <sup>b</sup> Médias e estimativa de desvio padrão (n=15) das análises de cinco diferentes lotes. Valores assinalados com a mesma letra na mesma coluna entre as médias parciais, e na última linha para resultados finais, não diferem significativamente (p<0,05), segundo teste de Tukey.

Outro fator importante na constituição dos cogumelos foi o baixo teor de lipídeos, em que a média para as três espécies ficou em 4,7% (Tabela 4). O champignon apresentou baixo teor de lipídeos, 5,4% base seca, valor divergente daquele apresentado por CHEUNG (1997) que foi de 1,9% mas dentro do intervalo de 1,7 a 8,0% conforme apresentado por CHANG & MILLES (1989). O shiitake apresentou 4,39% de lipídeos em base seca sendo que o valor apresentado por CHANG & MILES (1989) foi um pouco superior, 4,9 a 8,0%. O teor de lipídeos do shimeji, como nos demais cogumelos, mostrou-se baixo (4,30%) e também acima do valor apresentado por CHANG & MILLES (1989).

Tabela 4 - Lipídeos em cogumelos (%) <sup>a</sup>.

Lote	Champignon	Shiitake	Shimeji
1	5,79 ± 0,06 (b)	2,44 ± 0,03 (d)	2,46 ± 0,02 (c)
2	4,83 ± 0,18 (d)	4,06 ± 0,05 (c)	5,12 ± 0,06 (a)
3	3,62 ± 0,17 (e)	4,27 ± 0,09 (c)	4,52 ± 0,04 (b)
4	5,24 ± 0,09 (c)	4,91 ± 0,08 (b)	4,35 ± 0,11 (b)
5	7,64 ± 0,13 (a)	6,29 ± 0,20 (a)	5,08 ± 0,10 (a)
Média <sup>b</sup>	5,42 ± 1,37 (a)	4,39 ± 1,30 (ab)	4,30 ± 1,01 (b)

<sup>a</sup> Médias e estimativa de desvio padrão (n=3). Valores expressos em base seca. <sup>b</sup> Médias e estimativa de desvio padrão (n=15) das análises de cinco diferentes lotes. Valores assinalados com a mesma letra na mesma coluna entre as médias parciais, e na última linha para resultados finais, não diferem significativamente (p<0,05), segundo teste de Tukey.

Para cinzas, o teor médio para as espécies foi de 8,9% (Tabela 5). O champignon mostrou-se com considerável quantidade de cinzas, média de 11,98% em base seca, superior aos demais ( $p < 0,05$ ), e esse valor é similar ao apresentado por CHEUNG (1997) que foi 10,3% e dentro do intervalo mencionado por CHANG & MILLES (1989) entre 7,7 e 12,0%. Já o shiitake e o shimeji apresentaram valores coincidentes com os intervalos apresentados por CHANG & MILLES (1989).

Tabela 5 - Cinzas em cogumelos (%) <sup>a</sup>.

Lote	Champignon	Shiitake	Shimeji
1	12,23 ± 0,05 (b)	8,92 ± 0,16 (a)	5,61 ± 0,05 (d)
2	10,86 ± 0,04 (c)	5,44 ± 0,03 (d)	8,77 ± 0,08 (ab)
3	14,79 ± 0,39 (a)	6,46 ± 0,14 (c)	7,17 ± 0,05 (c)
4	10,94 ± 0,04 (c)	7,75 ± 0,17 (b)	8,30 ± 0,23 (b)
5	11,10 ± 0,09 (c)	6,65 ± 0,16 (c)	8,42 ± 0,21 (b)
Média <sup>b</sup>	11,98 ± 1,54 (a)	7,04 ± 1,24 (b)	7,65 ± 1,20 (b)

<sup>a</sup> Médias e estimativa de desvio padrão (n=3). Valores expressos em base seca. <sup>b</sup> Médias e estimativa de desvio padrão (n=15) das análises de cinco diferentes lotes. Valores assinalados com a mesma letra na mesma coluna entre as médias parciais, e na última linha para resultados finais, não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ), segundo Teste de Tukey.

Nas Tabelas 6, 7 e 8 estão apresentados os resultados obtidos para fibras, ácido ascórbico e fósforo respectivamente. Os valores para fibra alimentar estão em base seca e para os demais constituintes, em base úmida. Passar para base seca

Pode-se notar que os valores de fibra alimentar para os cogumelos são altos, apresentando um teor médio de 34% para as três espécies. Para o champignon as fibras alimentares foram de 20,44% em base seca, valor superior ao encontrado por CHANG & MILLES (1989) entre 8,0 a 10,4%, porém similar aos dados de CHEUNG (1997) com teor de 18,2%. Essa espécie foi a que apresentou, o menor valor para fibra alimentar dentre as analisadas. Quanto ao shiitake, o valor encontrado foi de 41,92% em base seca, valor próximo à média mostrada por CHEUNG (1996), porém muito superior ao citado por CHANG & MILLES (1989) entre 7,3 e 8,9%, para o mesmo cogumelo. O shimeji assim como o shiitake, também se destacaram pela quantidade de fibras alimentares, 39,62% em base seca, valor ligeiramente superior ao mostrado por CHEUNG (1996), porém muito maior em relação ao apresentado por CHANG & MILES (1989).

Tabela 6 - Fibra alimentar em cogumelos (%) <sup>a</sup>.

Lote	Champignon	Shiitake	Shimeji
1	17,67 ± 0,50 (c)	47,60 ± 1,78 (a)	51,25 ± 2,17 (a)
2	22,87 ± 0,21 (a)	37,26 ± 0,12 (c)	22,30 ± 1,59 (c)
3	20,78 ± 1,27 (b)	40,91 ± 0,47 (b)	45,31 ± 0,64 (b)
Média <sup>b</sup>	20,44 ± 2,34 (b)	41,92 ± 4,57 (a)	39,62 ± 13,12 (a)

<sup>a</sup> Médias e estimativa de desvio padrão (n=4). Valores expressos em base seca. <sup>b</sup> Médias e estimativa de desvio padrão (n=12) das análises de cinco diferentes lotes. Valores assinalados com a mesma letra na mesma coluna entre as médias parciais, e na última linha para resultados finais, não diferem significativamente (p<0,05), segundo teste de Tukey.

Os resultados para as análises de ácido ascórbico estão apresentados na Tabela 7. Os valores encontrados nesse trabalho superam os descritos por MATTILA *et al.* (2001), que encontraram 1,3; 2,1 e 1,6mg/100g para o champignon, shiitake e shimeji, respectivamente.

Tabela 7 - Ácido ascórbico em cogumelos (mg/100g) <sup>a</sup>.

Lote	Champignon	Shiitake	Shimeji
1	4,09 ± 0,17 (d)	7,54 ± 0,29 (b)	6,53 ± 0,30 (bc)
2	7,79 ± 0,66 (a)	7,39 ± 0,08 (b)	7,46 ± 0,28 (a)
3	7,09 ± 0,19 (b)	9,74 ± 0,19 (a)	5,35 ± 0,12 (d)
4	5,77 ± 0,14 (c)	5,80 ± 0,05 (c)	6,36 ± 0,05 (c)
5	6,77 ± 0,15 (b)	5,50 ± 0,04 (d)	6,79 ± 0,04 (b)
Média <sup>b</sup>	6,30 ± 1,34 (b)	7,19 ± 1,55 (a)	6,50 ± 0,72 (ab)

<sup>a</sup> Médias e estimativa de desvio padrão (n=6). Valores expressos em base úmida. <sup>b</sup> Médias e estimativa de desvio padrão (n=30) das análises de cinco diferentes lotes. Valores assinalados com a mesma letra na mesma coluna entre as médias parciais, e na última linha para resultados finais, não diferem significativamente (p<0,05), segundo Teste de Tukey.

Os cogumelos analisados apresentaram um alto teor de fósforo sendo que a média para as espécies foi de 104mg/100g, em base úmida. O champignon e o shiitake apresentaram os valores de 113,3 e 89,4mg/100g, respectivamente, que foram ligeiramente superiores aos encontrados por MATTILA *et al.* (2001) que foram entre de 98 e 73mg/100g, respectivamente. Para o shimeji, o valor encontrado foi de 109,7mg/100g e está muito próximo ao apresentado por MATTILA *et al.* (2001) que foi de 111mg/100g.

Tabela 8 - Fósforo em cogumelos (mg/100g) <sup>a</sup>.

Lote	Champignon	Shiitake	Shimeji
1	118,0 ± 0,7 (b)	103,6 ± 4,4(a)	45,4 ± 3,4 (d)
2	117,4 ± 2,3 (b)	111,1 ± 1,4 (a)	204,9 ± 6,7 (a)
3	74,5 ± 4,3 (c)	105,0 ± 3,2 (a)	111,1 ± 8,9 (b)
4	132,0 ± 0,09 (a)	60,4 ± 2,7 (b)	103,6 ± 3,2 (b)
5	124,4 ± 2,9 (b)	67,1 ± 3,2 (b)	83,4 ± 3,0 (c)
Média <sup>b</sup>	113,3 ± 22,5 (a)	89,4 ± 23,7 (a)	109,7 ± 59,0 (a)

<sup>a</sup> Médias e estimativa de desvio padrão (n=3). Valores expressos em base úmida. <sup>b</sup> Médias e estimativa de desvio padrão (n=15) das análises de cinco diferentes lotes. Valores assinalados com a mesma letra na mesma coluna entre as médias parciais, e na última linha para resultados finais, não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ), segundo teste de Tukey.

Através do teste de Tukey, pode-se notar que ocorreu, em todos os casos, diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre médias das análises dos diferentes lotes da mesma espécie. Essas diferenças podem ter sido causadas por diversos fatores, já que um cogumelo pode ter composição diversa quando cultivado em regiões ou países diferentes (RANZANI & STURION, 1998; EKANEM & UBENGAMA, 2002; RIOS-HURTADO *et al.*, 2003; BANIK & NANDI, 2004). Além desses fatores apresentados, STURION & OETTERER (1995), afirmam que o tipo de substrato utilizado no cultivo influencia a composição química dos cogumelos, principalmente quanto ao teor de proteínas, fibras e minerais.

## CONCLUSÕES

Os cogumelos champignon, shiitake e shimeji por sua composição química, constituem-se um alimento com excelente valor nutritivo, pois apresentam alto teor de proteínas e fibras alimentares, além de conterem baixo teor de lipídeos. Há uma considerável quantidade de fósforo, mas os valores encontrados para ácido ascórbico não são expressivos para considerá-los fonte dessa vitamina.

A análise estatística dos resultados obtidos mostrou a existência de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na composição nutricional dos cogumelos provenientes de diferentes lotes. Existe, no entanto, inúmeros fatores que podem influenciar esta composição, entre eles a espécie, a variedade, as condições edafoclimáticas (época e região), estágio de desenvolvimento do basidiocarpo, condições de cultivo, manuseio e colheita, armazenamento pós-colheita e transporte, capazes de afetar sensivelmente os resultados.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fapesp pelo auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16<sup>ed.</sup>, 3<sup>o</sup> rev., Gaitherburg, M.D., 1997.

BANIK, S.; NANDI, R. Effect of supplementation of rice straw with biogas residual slurry manure on the yield, protein and mineral contents of oyster mushroom. **Industrial Crops and Products**, In press, 2004.

BENASSI, M. T.; ANTUNES, A. J. A Comparison of meta-phosphoric and oxalic acids as extractant solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 31, n. 4: p. 507-513, 1988.

BLIGH, E. C.; DYER, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BREENE, W. M. Nutritional and Medicinal Value of Specialty Mushrooms. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 10, p. 883-894, 1990.

CHANG, R. Functional properties of Edible Mushrooms. **Nutrition Reviews**, v. 54, n. 11, p. S91-S93, 1996.

CHANG, S.T.; MILLES, P.G. **Edible Mushrooms and their CULTIVATION**. CRC Press, inc Boca Raton, Florida, 1989.

CHEUNG, P. C. K. Dietary Fiber Content and Composition of Some Cultivated Edible Mushroom Fruiting Bodies and Mycelia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 468-471, 1996.

CHEUNG, P. C. K. Dietary Fiber Content and Composition of Some Edible Fungi Determined by Two methods of analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.73, p. 255-260, 1997.

COUTINHO, L.N. **Cultivo de Espécies de Cogumelo Comestíveis**. Disponível em <<http://www.geocities.com/esabio.geo/cogumelo/agaricus.htm>>. Acesso em: 13 maio 2004.

EKANEM, E. O.; UBENGAMA, V. S. Chemical composition, anti-nutritional factors and shelf-life of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). **Journal of Food Science Technology**, v. 39, n. 6, p. 635-338, 2002.

MANZI, P., GAMBELLI, L., MARCONI, S., VIVANTI, V. e PIZZOFERRATO, L.. Nutrients in Edible Mushrooms: an inter-species comparative study. **Food Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 477-482, 1999.

MANZI, P., PIZZOFERRATO, L. AGUZZI, A. Nutritional Value of Mushrooms widely consumed in Italy. **Food Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 321-325, 2001.

MATTILA, P., KONKO, K., EUROLA, M., PIHLAVA, J. M., ASTOLA, J., VAHTERISTO, L., HIETANIEMI, V., KUMPULAINEN, J., VALTONEN, M. e PIIRONEN V.. Contents of Vitamins, Mineral Elements, and Phenolic Compounds in Cultivated Mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2343-2348, 2001.

RANZANI, M. R. T. C.; STURION, G. L. Avaliação da composição em aminoácidos de *Pleurotus* spp. cultivados em folha de bananeira. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 48, n. 4, p. 339-348, 1998.

RIOS-HURTADO, A.; TORRES-TORRES, G.; MEDINA-RIVAS, M. A. Caracterización bromatológica de la seta (*Pleurotus sajor-caju*) producida em cuatro sustratos orgánicos. **Alimentaria**, v. 349, p. 85-89, 2003.

STATSOFT, INC. (2000). STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, email: info@statsoft.com, Web: http://www.statsoft.com.

STURION, G. L.; OETTERER, M. Composição Química de Cogumelos Comestíveis (*Pleurotus* spp.) Originados de Cultivos em Diferentes Substratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 15, n. 2, p. 189-193, 1995.

URBEN, A. F., OLIVIERA, H. C. B., VIEIRA, W., CORREIA, M. J., URIARTT, A. H. **Produção de Cogumelos por meio de Tecnologia Chinesa Modificada**. Brasília : Embrapa, 2001. 151 p.

YANG, J. L., LIN H. C., MAU J. L. Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. **Food Chemistry**, v. 72, n. 4, p. 465-471, 2001.

## CAPÍTULO 3

### **Avaliação de metodologia para determinação de vitaminas do complexo B em cogumelos comestíveis por cromatografia líquida de alta eficiência**

Regina Prado Zanes Furlani; Helena Teixeira Godoy

#### **RESUMO**

A maior dificuldade na determinação de vitaminas em alimentos está relacionada aos procedimentos de extração e limpeza da amostra. Devido à baixa concentração destes nutrientes em matrizes alimentícias, onde a presença de interferentes é grande, estas etapas podem interferir nos valores encontrados e levar a erros de quantificação. Este trabalho avaliou diferentes condições para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), assim como técnicas de extração e limpeza de extratos para determinação de vitaminas do complexo B em cogumelos. Etapas de extração e limpeza utilizando hidrólise ácida e precipitação com metanol (MeOH), bem como a combinação de hidrólise ácida seguida de hidrólise enzimática foram estudadas. Para a separação das vitaminas foram avaliadas duas colunas analíticas de octadecilsilil ( $C_{18}$ ) com partículas de  $4\mu\text{m}$  e  $5\mu\text{m}$  e dimensões de  $3,9 \times 150\text{mm}$  e  $4,6 \times 250\text{mm}$ , respectivamente. Foram testadas diversas fases móveis com sistema de eluição isocrático e gradiente para a separação das vitaminas e os compostos eluídos foram monitorados simultaneamente por detectores de ultravioleta e de fluorescência, acoplados em série. A quantificação foi realizada por padronização externa. Os melhores resultados para a separação das vitaminas  $B_1$  e  $B_2$  em cogumelos foram obtidos com a utilização da coluna analítica  $C_{18}$  de dimensões  $3,9 \times 150\text{mm}$  e partículas de  $4\mu\text{m}$ , bem como a extração mais adequada foi a que utilizou hidrólise ácida seguida de hidrólise enzimática com derivação pré-coluna da tiamina a tiocromo. Os níveis de recuperação de padrões adicionados às amostras apresentaram-se dentro de limites aceitáveis (86 a 97%), bem como a repetibilidade que apresentou coeficientes de variação de 7,1 e 5,5% e limites de detecção de 0,026ng e 0,029ng para as vitaminas  $B_1$  e  $B_2$ , respectivamente.

**Palavras-chave:** cogumelo, vitaminas do complexo B, cromatografia

## ABSTRACT

The greatest difficulties confronted in the determination of vitamin in foods are related to the procedures for the extraction and clean-up of the sample. Due to the low concentration of these nutrients in food matrices, where the presence of interferents is great, these stages can interfere with the values found and them lead to errors of quantification. This work evaluated different conditions for high-performance liquid chromatography (HPLC) as well techniques for the extraction and extract clean-up for determination oh the B group vitamin in mushrooms. Extraction and clean-up stages using acid hydrolysis and precipitation with methanol, as well as a combination of acid hydrolysis followed by enzymatic hydrolysis were studied. For the vitamin separation two analytical octadecylsillil ( $C_{18}$ ) columns with particle sizes of  $4\mu\text{m}$  e  $5\mu\text{m}$  and dimensions of  $3.9 \times 150\text{mm}$  and  $4.6 \times 250\text{mm}$  respectively were evaluated. Various mobile phases with isocratic and gradient systems were tested for the separation of the vitamins and the compounds monitored by ultraviolet and fluorescence detectors, connected in series. Quantification was always carried out by external standardization. The best results for the separation of vitamins  $B_1$  and  $B_2$  in mushrooms were obtained with the techniques using a  $C_{18}$  analytical column with dimensions of  $3.9 \times 150\text{mm}$  and a particle size of  $4\mu\text{m}$  and extraction using acid hydrolysis followed by enzymatic hydrolysis with pre-column derivation of thiamine to thiochrome. The recovery levels of standards added to the samples were within acceptable limits (86 to 97%), as were the repeatability (CV% 7.1 and 5.5) and the limits of detection, which were of 0.026ng and 0.029ng for the vitamins  $B_1$  and  $B_2$ , respectively.

**Key words:** mushroom, vitamins of the B complex, chromatography

## INTRODUÇÃO

Os cogumelos são conhecidos pela humanidade há muitos séculos. São utilizados tanto na culinária, por suas características organolépticas, quanto na medicina popular, principalmente em países asiáticos que os consomem também por se acreditar em seu potencial nutritivo e medicinal. Hoje no entanto, são considerados por muitos pesquisadores como alimentos nutracêuticos, o que tem estimulado os produtores brasileiros na busca de técnicas mais produtivas e na introdução de diferentes espécies.

Mas muito pouco se sabe a respeito da qualidade dos cogumelos comestíveis cultivados no Brasil, especialmente com respeito ao valor nutricional. Mesmo na literatura internacional, dados a respeito da presença de vitaminas do complexo B nos cogumelos

são escassos e mesmo assim algumas dessas fontes não se referem aos métodos de análise empregados. Por outro lado, a utilização de uma metodologia adequada e validada é crucial para a credibilidade dos valores encontrados (VALENTE-SOARES, 2001).

A falta desses dados tem como aliado a falta de metodologias analíticas adequadas para essa matriz. Diante do exposto, surge a necessidade de um levantamento que demonstre o real valor vitamínico dos cogumelos comestíveis cultivados no Brasil. Porém, a condição básica para a realização de um trabalho desta natureza está na disponibilidade de técnicas de análises adequadas.

Não há na literatura trabalhos para a determinação simultânea com mais de três vitaminas, a não ser poucos para produtos enriquecidos ou formulações farmacêuticas. Por esse fato e também pelo constante interesse do consumidor em fontes naturais de vitaminas, o presente trabalho avaliou metodologias para determinação de vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, H e PP e validou metodologia analítica para a determinação simultânea de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em cogumelos.

As vitaminas podem estar naturalmente presentes nos alimentos sob a forma livre ou fosforiladas (NDAW *et al.*, 2000) e geralmente são determinadas pelos métodos oficiais descritos na AOAC (Association of Official Analytical Chemists), que podem não medir todas as formas presentes (SHARPLESS *et al.*, 2000).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido amplamente utilizada para a análise de vitaminas. É um método que pode ser robusto, rápido, reprodutível e sensível (FINGLAS & FAUKS, 1987), mas deve-se ficar atento para a identificação e quantificação sejam confiáveis (VALENTE-SOARES, 2001).

Para a análise de vitaminas a etapa de extração tem uma grande importância, já que extrações incompletas, limpeza inadequada dos extratos podendo levar à presença de interferentes e, ainda, a degradação das vitaminas pode acarretar erros na quantificação. Extração utilizando hidrólise ácida, que garante a liberação das vitaminas das proteínas da matriz, seguida de hidrólise enzimática, que transforma as formas fosforiladas em formas livres, tem sido utilizada por diversos autores para determinação dessas vitaminas em matrizes alimentícias (HÄGG, 1994; NDAW *et al.*, 2000; ARELLA *et al.*, 1996; SIMS & SHOEMAKER, 1993; ESTEVE *et al.*, 2001; VAN DER BERG, H. *et al.*, 1996).

As enzimas mais utilizadas para a hidrólise têm sido a takadiastase, milase e claradiastase (BIANCHINI-PONTUSCHKA & PENTEADO, 2003a, 2003b), mas também há relatos do uso de clarase, papaína e fosfatase ácida (VAN DEN BERG *et al.*, 1996).

A fase estacionária mais utilizada para a separação de vitaminas do complexo B, por CLAE, tem sido a fase reversa (AGOSTINI & GODOY, 1997; NDAW *et al.*, 2000; ARELLA *et al.*, 1996; HÄGG, M., 1994; SHARPLESS *et al.* 2000; OLLILAINEN *et al.*, 2001). A detecção para essas vitaminas pode ser realizada por ultravioleta, mas em matrizes onde as quantidades de vitaminas são baixas, o limite de detecção fica prejudicado, além da possível influência de interferentes. A riboflavina (B<sub>2</sub>) e a piridoxina (B<sub>6</sub>) são naturalmente fluorescentes e a tiamina (B<sub>1</sub>) pode ser facilmente convertida a tiocromo com reação de oxidação pré ou pós-coluna. A vantagem de se utilizar detecção por fluorescência é a alta sensibilidade e especificidade desse detector, o que eleva o limite de quantificação do método.

A quantificação das vitaminas do complexo B é geralmente realizada por padronização externa mas pode-se utilizar padrões internos, para quantificar B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, como ácido hidroxibenzóico, cloroetilamina e acetilneurina por possuírem propriedades similares a essas vitaminas (LYNCH & YOUNG, 2000).

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver e validar metodologia para determinação simultânea de vitaminas do complexo B.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Reagentes, solventes e materiais diversos**

Os padrões de tiamina (B<sub>1</sub>), riboflavina (B<sub>2</sub>), piridoxina (B<sub>6</sub>), cianocobalamina (B<sub>12</sub>), niacina (NA), niacinamida (ND) e d-biotina (H) foram adquiridos da Sigma<sup>®</sup> Chemical Co, USA e os filtros para amostras da Millipore<sup>®</sup>, com poros de 0,45µm, 13mm de diâmetro. Os reagentes de uso comum em laboratório foram de grau analítico e os solventes para cromatografia, grau cromatográfico e a enzima takadiastase foi da marca Fluka<sup>®</sup>, Suíça.

### **Equipamentos**

Foram utilizados os seguintes equipamentos: espectrofotômetro ultravioleta/visível, modelo Lambda 6 da marca Perkin Elmer; cromatógrafo a líquido de alta eficiência, marca HP (HEWELETT-PACKARD) modelo 1100, com desgaseificador, bomba quaternária, sistema de injeção automática (0 a 100µL), detectores de UV-Visível com arranjo de

diodos e de fluorescência, acoplados em série e compartimento controlador de temperatura para coluna analítica; “software HP-Chemstation” utilizado para administração do sistema de aquisição e tratamento de dados; colunas de guarda Varian®, com fase estacionária de octadecilsilil e colunas analíticas de fase estacionária de octadecilsilil Nova-pak® C<sub>18</sub> (Waters), com partículas de 4µm e dimensão 3,9 x 150mm e Vydac® 201TPC C<sub>18</sub> com partículas de 5µm e dimensão 4,6 x 250mm; mixer de uso doméstico, marca Britania; ultrapurificador de água, marca “MilliQ”; banho maria marca Fisatom, modelo 557; liofilizador marca Edwards, modelo Super Modullyo; banho ultrassom, modelo SX-20, marca Micossonic.

### **Preparo dos padrões de vitaminas**

As soluções estoque dos padrões das vitaminas foram preparadas com as seguintes concentrações: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e H = 0,1mgmL<sup>-1</sup> e NA e ND = 0,2mgmL<sup>-1</sup>. Todos os padrões foram dissolvidos em HCl 0,1N com exceção da biotina que foi em água. A partir destas soluções foi preparada uma solução de trabalho contendo todas as vitaminas. O comprimento de onda máximo de absorção foi determinado espectrofotometricamente.

### **Amostras**

Foram utilizadas para os testes de avaliação da metodologia, amostras de cogumelo “in natura” e ou liofilizados. Os cogumelos foram liofilizados por 28 horas a -55°C com pressão 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-2</sup>mbar.

### **Cromatografia líquida de alta eficiência**

Para a separação simultânea dos padrões das vitaminas foram avaliadas diversas condições cromatográficas, inicialmente baseando-se em trabalhos da literatura (ESTEVE *et al.*, 2001; ARELLA *et al.* 1996; MORENO & SALVADÓ, 2000). Foram testadas diversas fases móveis com sistema isocrático e gradiente e a aplicação dessas fases na separação de uma mistura de padrões das vitaminas e também para extratos de amostras de cogumelos. Inicialmente os padrões foram injetados separadamente para a avaliação do tempo de retenção de cada vitamina.

Para o sistema isocrático (Tabela 1), foram utilizadas as seguintes fases móveis: metanol e água (50:50), acetato de sódio 0,05M e metanol (70:30 e 80:20). Para os sistemas de gradiente foram utilizados acetato de sódio 0,07M, acetato de amônio 0,05M,

acetonitrila, metanol e água. Os gradientes utilizados estão apresentados na Tabela 2. Utilizou-se também ácido hexanosulfônico 5mM e trietilamina 0,15% com pH ajustado para 2,2 como formador de par iônico juntamente com metanol e acetonitrila. E por fim, testou-se um gradiente de fase aquosa adicionada de 0,3% de trietilamina e fase orgânica de metanol, o gradiente está apresentado na Tabela 3. Foram testadas duas colunas analíticas com fase estacionária de octadecilsilil: Nova-pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (Waters), com partículas de 4µm e dimensões 3,9x150mm e Vydac<sup>®</sup> 201TPC C<sub>18</sub> com partículas de 5µm e dimensões 4,6x250mm. Foram testadas vazões de 0,5 e 1,0mLmin<sup>-1</sup>. Em todos os testes realizados a coluna analítica foi mantida a 25°C. Os compostos eluídos foram monitorados simultaneamente em diferentes comprimentos de onda no ultravioleta com arranjo de diodos e no detector de fluorescência. Os compostos eluídos foram monitorados pelos detectores, simultaneamente, nos comprimentos de onda: 212nm, 254nm, 268nm, 325nm, 361nm (ultravioleta com arranjo de diodos) e 250nm para excitação e 410nm e 521nm para emissão (fluorescência).

### **Extrações das vitaminas e limpeza dos extratos**

Foram testadas extrações por hidrólise ácida (HCl 0,1N e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N) e precipitação dos interferentes com metanol (AGOSTINI & GODOY, 1997); extração com hidrólise ácida (HCl 0,1N) e enzimática (takadiastase) (ESTEVE *et al.*, 2001). Os extratos obtidos pela hidrólise ácida e enzimática foram oxidados através de reação para transformação da tiamina a tiocromo para aumentar a sensibilidade de detecção da vitamina B<sub>1</sub>. A reação consistiu na oxidação da tiamina a tiocromo com ferricianeto de potássio em meio básico, com posterior neutralização para injeção no cromatógrafo. Todos os testes foram conduzidos em duplicata e em uma das replicatas foi adicionada uma mistura de padrões de vitaminas para se verificar a recuperação.

### **Reação de oxidação da tiamina a tiocromo**

Para a reação de oxidação da tiamina a tiocromo utilizaram-se 300µL de K<sub>2</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 1%, em NaOH 15%, que foram adicionados a 5mL de padrões de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> ou aos extratos obtidos na extração dos cogumelos. As concentrações dos padrões de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> utilizadas para esse teste foram de 5,7 e 5,8µgmL<sup>-1</sup>, respectivamente. A reação foi conduzida por 10 minutos e em local abrigado da luz. Após a reação, foram adicionados 200µL de ácido ortofosfórico 15% para neutralização. O extrato foi então filtrado e injetado.

## Validação da metodologia

Para a validação da metodologia de determinação das vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> utilizou-se como parâmetros de avaliação a linearidade, o limite de detecção e quantificação, a repetibilidade e a exatidão.

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração ou intervalo de massas dos analitos. Segundo a IUPAC (“International Union of Pure and Applied Chemistry”), em documento técnico publicado por THOMPSON *et al.* (2002), a curva de calibração deve conter seis ou mais pontos de concentração e estes devem ser analisados em duplicata, preferencialmente em triplicata. Neste trabalho a curva de calibração foi construída com 14 pontos (médias de triplicatas) para as vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em um intervalo de massas de 1,14 a 210ng e 2,32 a 202ng, respectivamente, onde a vitamina B<sub>1</sub> sofreu reação de oxidação para transformá-la em tiocromo e a detecção foi realizada por fluorescência.

O limite de detecção é a menor quantidade ou concentração do analito, que pode ser detectado com confiança. O limite de detecção das vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, foi determinado a partir da relação sinal/ruído igual a três (ACS, 1980), onde a menor quantidade detectada dos padrões produziu um sinal com uma amplitude três vezes maior que a do ruído.

Os limites de quantificação adotados para as vitaminas foram de cinco vezes o limite de detecção.

A repetibilidade do método foi fornecida por análises (10 repetições) de amostra de cogumelo *A. bisporus* liofilizada. Os coeficientes de variação foram determinados e comparados pela fórmula descrita por HORWITZ *et al.* (1980) ( $CV\% = 2^{(1-0,5\log C)}$ , onde CV é o coeficiente de variação e C é a concentração expressa como potência de 10).

A exatidão foi determinada pelas análises (10 repetições) da amostra de *A. bisporus* liofilizada que foi fortificada com as vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> nos níveis de 0,1 e 1mg/100g, respectivamente. Esses níveis de fortificação equivalem a aproximadamente 0,01 a 0,1mg/100g de cogumelo *in natura*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Condições cromatográficas

Mesmo com o conhecimento de que seria muito difícil a separação simultânea das vitaminas através da eluição isocrática, em virtude das características da coluna analítica

Nova-Pak<sup>®</sup> com partículas de 4µm, ainda assim testaram-se algumas possibilidades. Foi utilizado como fase móvel metanol e água (50:50) (ESTEVE *et al.*, 2001), acetato de sódio 0,05M + metanol (70:30) (ARELLA *et al.* 1996) e também na proporção 80:20. Os tempos de retenção das vitaminas eluídas em todos os sistemas isocráticos testados não foram satisfatórios como se pode verificar na Tabela 1.

Tabela 1 - Fases móveis testadas para a eluição de padrões de vitaminas do complexo B e respectivos tempos de retenção <sup>a</sup>.

Fase móvel (sistema isocrático)	Vitamina						
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>6</sub>	B <sub>12</sub>	NA	ND	H
	Tempo de retenção (minutos)						
MeOH + H <sub>2</sub> O(50:50)	co-eluição (< 5 min)						
Acetato de sódio 0,05M + MeOH(70:30)	1,8	4,8	1,8	2,5	1,6	1,9	nd
Acetato de sódio 0,05M + MeOH(80:20)	nd	19,3	2,8	13,0	2,2	3,3	3,0

<sup>a</sup> Coluna analítica Nova-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (Waters) e vazão de 0,5mLmin<sup>-1</sup>; nd – não detectado.

Como o sistema isocrático de eluição não proporcionou bons resultados, passou-se a testar sistemas em gradiente de várias proporções da fase móvel contendo acetato de sódio 0,05M ou acetato de amônio 0,05M e metanol e ou acetonitrila. No início da corrida cromatográfica utilizou-se 100% de acetato de sódio 0,05M ou 0,07M (ARELLA *et al.* 1996) e acetato de amônia 0,05M (MORENO & SALVADÓ, 2000) para melhorar a força iônica da fase móvel, aumentando dessa forma o tempo de retenção das vitaminas. Em seguida houve a introdução de modificadores orgânicos, como metanol ou acetonitrila, para o ajuste da polaridade da fase móvel. Após o término da corrida cromatográfica o sistema foi então equilibrado com 100% do acetato. Os sistemas de gradientes testados para a separação estão apresentados na Tabela 2, bem como os tempos de retenção de cada vitamina.

Embora algumas fases móveis, apresentadas na Tabela 2, permitiu a separação das vitaminas, a resolução dos picos para as vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub> e H não foi satisfatória. Os cromatogramas apresentaram picos largos e não definidos. Nas fases móveis B e E, da Tabela 2 os picos das vitaminas B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> se apresentaram divididos. No monitoramento dos compostos em 212nm com fase móvel utilizando gradiente, houve uma queda acentuada da linha de base, dificultando a detecção da biotina. A mudança para acetato de amônio 0,05M em substituição ao acetato de sódio 0,007M melhorou

ligeiramente a resolução, mas a queda da linha de base em 212nm ocorreu em todos os sistemas testados.

Falsas injeções possibilitaram a verificação da eluição incompleta da vitamina B<sub>2</sub>, mesmo com a introdução de 30% de metanol à fase móvel (MORENO & SALVADÓ, 2000).

Tabela 2 - Fases móveis com eluição por gradiente testadas para determinação das vitaminas do complexo B<sup>a</sup>.

Fase Móvel	Gradiente da Fase móvel				Vitamina							
	Tempo	Acetato de sódio 0,07M	Metanol	Acetonitrila	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>6</sub>	B <sub>12</sub>	NA	ND	H	
A	0	100	0	0								
	15	70	30	0	10,8	16,6	8,4	18,7	4,2	9,8	10,4	
	20	100	0	0								
B	0	100	0	0								
	7	100	0	0	17,8	34,3	11,5	31,9	15,1	15,7	-	
	20	70	30	0								
C	28	100	0	0								
	0	100	0	0								
	15	70	30	0	-	21,3	-	18,8	4,1	9,8	10,5	
D	20	70	30	0								
	25	100	0	0								
	0	10	0	0								
E	3	100	0	0								
	12	70	30	0	12,7	20,7	10,5	17,3	4,4	11,7	-	
	18	70	30	0								
F	25	100	0	0								
	0	100	0	0								
	3	100	0	0								
	12	70	20	10								
	18	70	20	10	11,9	16,8	9,9	15,5	4,0	10,8	11,2	
G	25	50	30	20								
	30	50	30	20								
	40	100	0	0								
	0	100	0	0								
	5	100	0	0								
H	5,1	90	10	0								
	15	70	30	0	12,4	22,3	10,5	19,1	4,3	11,7	9,6	
	17	70	30	0								
	22	0	30	70								
I	25	100	0	0								
	0	100	0	0								

<sup>a</sup> Coluna analítica Nova-Pak® C<sub>18</sub> (Waters) e vazão a 0,5mLmin<sup>-1</sup>.

Com os mesmos gradientes apresentados na Tabela 2 foi testada a eluição de padrões em uma coluna analítica Vydac<sup>®</sup> C<sub>18</sub> com dimensões 4,6x250mm e partículas de 5µm e com vazão de 1mLmin<sup>-1</sup> e observou-se que não houve melhora na resolução dos compostos eluídos, bem como os tempos de retenção apresentaram-se semelhantes.

Para as duas colunas analíticas testadas (Nova-Pak<sup>®</sup> e Vydac<sup>®</sup>) e utilizando a fase móvel F (Tabela 2), a resolução dos compostos ficou ligeiramente superior às demais e por esse motivo essas condições foram aplicadas na análise de cogumelos.

### **Extração e limpeza**

As amostras de cogumelo que foram utilizadas para testes de extração e limpeza dos possíveis interferentes foram trituradas juntamente com o solvente de extração testado. Cogumelos liofilizados foram utilizados a fim de se obter amostras homogêneas, além de minimizar as perdas das vitaminas, e possibilitar a realização de vários testes de extração e limpeza.

Na extração por hidrólise com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N (AGOSTINI & GODOY, 1997), seguida ou não de precipitação com metanol, houve a presença de muitos interferentes no extrato que eluíram juntamente com as vitaminas, tanto na coluna Vydac<sup>®</sup> quanto na Nova-Pak<sup>®</sup>, dificultando a identificação e a quantificação das mesmas. A utilização de HCl 0,1N (ARELLA *et al.*,1996; ESTEVE *et al.*, 2001; NDAW *et al.*,2000; OLLILAINEN *et al.*,2001), em substituição ao ácido sulfúrico, embora largamente citada na literatura, também apresentou os mesmos problemas.

Extrações utilizando a combinação de hidrólise ácida e enzimática têm sido relatadas para a análise de vitaminas do complexo B (HÄGG, 1994; NDAW *et al.*, 2000; ARELLA *et al.*, 1996; SIMS & SHOEMAKER, 1993; ESTEVE *et al.*, 2001; VAN DER BERG, H. *et al.*,1996). Neste trabalho utilizou-se a metodologia de extração e limpeza descrita por ESTEVE *et al.* (2001) que utiliza hidrólise ácida seguida de hidrólise enzimática realizada com takadiastase e limpeza por precipitação dos interferentes com ácido tricloroacético. Embora os cromatogramas obtidos, utilizando as duas colunas, tenham se mostrado mais limpos, os valores para recuperação dos padrões adicionados variaram de 36% (biotina) a 168% (riboflavina), indicando ter havido desde uma extração incompleta da biotina até uma má separação cromatográfica entre a riboflavina e compostos interferentes.

Devido a vários relatos na literatura da utilização de fase móvel com par iônico para separação simultânea das vitaminas do complexo B (BLANCO *et al.*, 1994; CHASE *et al.*,

1993; ALBALA-HURTADO *et al.*, 2001; AGOSTINI & GODOY, 1997), optou-se por testar também esta fase. A formação de íons orgânicos afeta a resolução dos compostos devido à formação de um complexo equilíbrio com as substâncias polares da amostra e a fase reversa apolar e, portanto melhorando a resolução dos picos cromatográficos (WILLS *et al.*, 1977). Como Foi utilizado ácido hexanossulfônico (AHS) como formador do par iônico e a fase móvel aquosa foi preparada como descrito em AGOSTINI e GODOY (1997). A concentração do AHS foi de 5mM contendo 0,15% trietanolamina (TEA), o pH foi ajustado para 2,8 com adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e o gradiente utilizado está apresentado na Tabela 3, bem como os tempos de retenção das vitaminas para as colunas Vydac<sup>®</sup> e Nova-pak<sup>®</sup>.

Tabela 3 - Fase móvel com gradiente testada para a eluição das vitaminas do complexo B.

Tempo	Gradiente da Fase móvel			Coluna	Vitamina						
	AHS+TEA	Metanol	Acetonitrila		B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>6</sub>	B <sub>12</sub>	NA	ND	H
0	100	0	0		Tempo de retenção (minutos)						
5	100	0	0	A	14,5	17,5	12,0	16,5	4,0	5,6	16,5
5,1	99	0	1								
25	45	50	5	B	18,9	21,6	15,7	20,2	4,6	6,7	nd
25,1	100	0	0								

A - Vydac<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, vazão de 1mLmin<sup>-1</sup>; B - Nova-pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, vazão de 0,5mLmin<sup>-1</sup>

Mesmo com a utilização da fase móvel composta por par iônico e modificador orgânico metanol e acetonitrila não houve melhora na resolução da separação das vitaminas com a coluna analítica Vydac<sup>®</sup> e nem mesmo para a coluna Nova-pak<sup>®</sup>. Os picos das vitaminas NA e ND apresentaram-se muito largos e a biotina apresentou pico muito assimétrico e resolução muito ruim. Pequenas modificações no gradiente dessa fase móvel também não possibilitaram a resolução adequada das vitaminas NA, ND e H em ambas as colunas testadas.

Mesmo assim, com a intenção de se avaliar a limpeza dos extratos e tentando-se analisar as outras vitaminas que apresentaram resolução suficiente (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>) foi realizada a injeção das amostras de cogumelos extraídas com a combinação de hidrólise ácida e enzimática. Foram utilizadas amostras com e sem adição de padrões. Os resultados obtidos para amostras com adição de padrões mostraram-se com muitos interferentes nos tempos de retenção das vitaminas NA, ND e biotina, já para as vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>, o cromatograma mostrou-se adequado. Para a amostra não adicionada

de padrões, ficou comprovado a presença da vitamina B<sub>2</sub>, que é fluorescente e sua detecção é mais sensível, enquanto que as vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> não ficaram evidenciadas no cromatograma, podendo estar em concentrações abaixo do limite de detecção do método.

Embora a vitamina B<sub>1</sub> não tenha sido observada pelo detector de ultravioleta e alguns artigos na literatura (BAUTISTA JUSTO *et al.*, 1998; LLANOS *et al.*, 1993; ESTEVE *et al.*, 2001; MARTIN-BELLOSO & LLANOS-BARRIOBERO, 2001; MATTILA *et al.* 2001) mencionem a presença desta vitamina em cogumelos, testou-se a reação de oxidação da tiamina a tiocromo para aumentar a sensibilidade desse composto e a possível detecção nas amostras pelo detector de fluorescência. Após a reação de oxidação, com ferricianeto de potássio, de um extrato obtido a partir da extração combinada de hidrólises ácida e enzimática ficou evidenciada a presença de tiamina.

### **Determinação de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>**

A partir da verificação da presença de tiamina e riboflavina nas amostras de cogumelos e dado a dificuldade da separação das outras vitaminas, decidiu-se estabelecer uma fase móvel mais simples, que consistiu de fase aquosa 0,3% de trietilamina e pH 7.4 ajustado com ácido sulfúrico e fase orgânica metanol, que permitisse a determinação dessas duas vitaminas em amostras de cogumelos.

O gradiente utilizado foi composto inicialmente por 80% da fase aquosa e 20% da fase orgânica até 1,5 minutos, em 1,51 minutos passou-se para 84% da fase aquosa e 16% de metanol, sendo empregado um gradiente linear até 15 minutos chegando a 30% da solução aquosa e 70% de metanol. As condições iniciais foram retomadas e a coluna não necessitou de re-equilíbrio para a próxima injeção. A vazão foi de 1 mLmin<sup>-1</sup> e a coluna analítica utilizada foi a Nova-pak® e mantida a 25°C pelo compartimento controlador de temperatura. Para aumentar a sensibilidade da detecção da vitamina B<sub>1</sub>, utilizou-se reação de oxidação da tiamina transformando-a em tiocromo.

A detecção foi realizada por fluorescência, iniciando-se com o comprimento de onda de excitação a 365nm e emissão a 436nm, para a vitamina B<sub>1</sub>, e em 7,5 minutos alterado para 422nm (excitação) e 515nm (emissão) para a detecção de B<sub>2</sub>.

A Figura 1 apresenta o perfil cromatográfico obtido na separação de padrões das vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>.

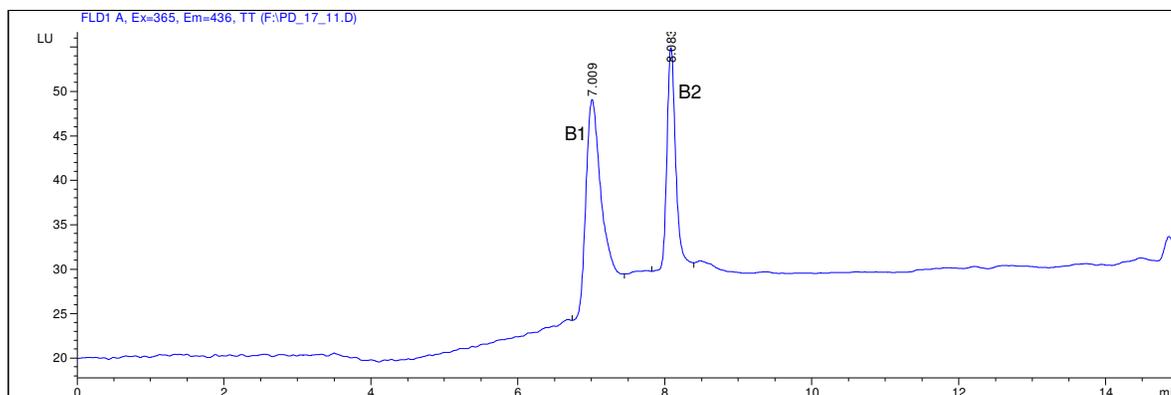


Figura 1 - Perfil cromatográfico dos padrões de B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>.

Condições cromatográficas:

Coluna analítica Nova-pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 4µm, 3,9 x 150mm

Detector de fluorescência λ<sub>exc</sub> 365nm, λ<sub>em</sub> 436nm (B<sub>1</sub>)

λ<sub>exc</sub> 422nm, λ<sub>em</sub> 515nm (B<sub>2</sub>)

Fase móvel com gradiente de fase aquosa acidificada com modificador orgânico trietilamina (0,3%) e fase orgânica metanol.

Vazão: 1,0mLmin<sup>-1</sup>

O fluxograma para a extração das vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> nos cogumelos, que se baseou na metodologia descrita por ESTEVE *et al.* (2001), está apresentado na Figura 2.

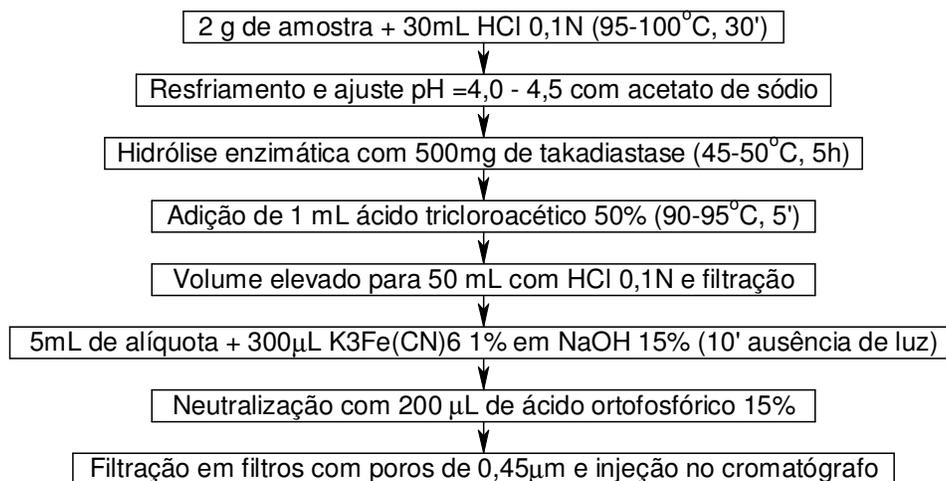


Figura 2 - Procedimento empregado para a determinação de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em amostras de cogumelos

O perfil cromatográfico de uma amostra de shimeji utilizando a fase móvel em gradiente de fase aquosa acidificada com modificador orgânico trietilamina e fase orgânica metanol e extração segundo o fluxograma apresentado na Figura 2 está

apresentado na Figura 3. A separação das vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> nas amostras de cogumelos mostrou-se adequada e sem a presença de interferentes.

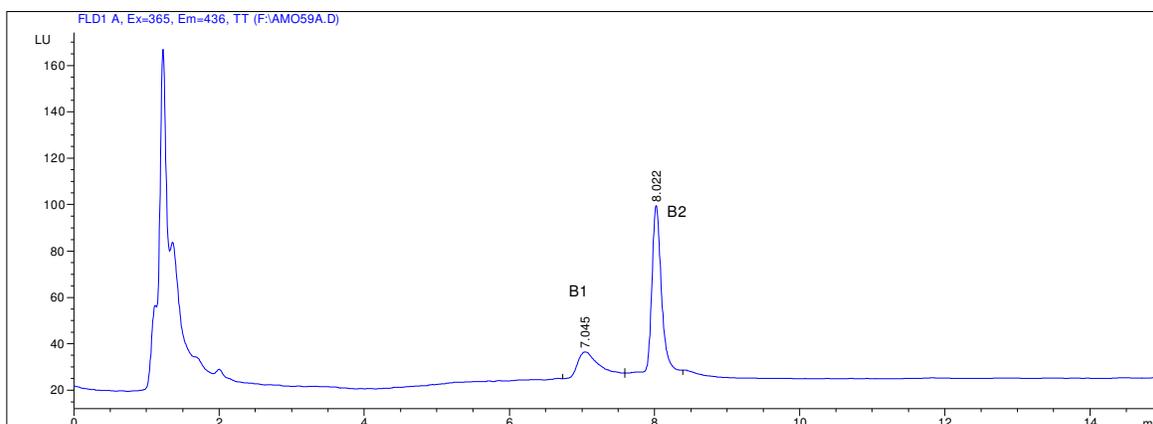


Figura 3 - Perfil cromatográfico de uma amostra de shimeji. Extração combinada de hidrólise ácida (HCl) e hidrólise enzimática (takadiastase) e reação para oxidação da tiamina a tiocromo, conforme descrita na Figura 1.

Condições cromatográficas:

Coluna analítica Nova-pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 4μm, 3,9 x 150mm

Detector de fluorescência λ<sub>exc</sub> 365nm, λ<sub>em</sub> 436nm (B<sub>1</sub>)

λ<sub>exc</sub> 422nm, λ<sub>em</sub> 515nm (B<sub>2</sub>)

Fase móvel com gradiente de fase aquosa acidificada com modificador orgânico trietilamina (0,3%) e fase orgânica metanol.

Vazão: 1,0mLmin<sup>-1</sup>

### Validação da metodologia

A linearidade da curva padrão para a análise das vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> foi determinada com a construção de uma curva de calibração contendo as vitaminas nas faixas de massas de 1,14 a 210ng e 2,32 a 202ng, respectivamente para B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Foram realizadas três injeções para cada um dos níveis, resultando em coeficientes de variação médios das injeções de 4,2% e 1,2% para B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, respectivamente. O coeficiente de correlação r foi 0,9954 e 0,9962 e as equações que representam as correlações lineares entre os pontos foram:  $y=4,0214x-13,612$  e  $y=0,7788x+2,9781$  para as vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, respectivamente.

Os limites de detecção para os padrões de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, determinado a partir da relação sinal/ruído igual a três (ACS,1980), foram de 0,026ng e 0,029ng para B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, respectivamente, conferindo assim uma boa sensibilidade ao método. Os limites de

quantificação adotados para as vitaminas nos cogumelos foram de cinco vezes o limite de detecção.

A repetibilidade do método foi fornecida por análises (n=10) de amostra liofilizada, realizadas em dias diferentes, num intervalo de cinco dias. O desvio padrão relativo foi de 0,0128 e 0,1112 para vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, respectivamente. Os resultados obtidos estão na apresentados na Tabela 4. Os coeficientes de variação obtidos pela fórmula preconizada por HORWITZ (1980) foram maiores do que os obtidos nas análises, demonstrando que a variação é aceitável.

Tabela 4- Valores dos teores de vitamina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (mg/100g) obtidos para o teste de repetibilidade.

	Vitamina B <sub>1</sub>	Vitamina B <sub>2</sub>
	mg/100g	
	0,2192	2,0916
	0,2094	2,0012
	0,2494	2,2529
	0,2337	2,2234
	0,2383	2,0918
	0,2404	2,3461
	0,2342	2,2990
	0,2149	2,2428
	0,2184	2,2550
	0,2313	2,3000
Média <sup>a</sup>	0,2289	2,2104
DP <sup>b</sup>	0,0128	0,1112
CV % <sup>c</sup>	11,2	5,6
CV% (HORWITZ, 1980)	16	11

<sup>a</sup> n=10; <sup>b</sup> DP = estimativa do desvio padrão; <sup>c</sup> CV= coeficiente de variação

A exatidão foi determinada pelas análises (n=10) de amostras que foram fortificadas com padrões das vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> nos níveis de 0,1 e 1mg/100g para ambas as vitaminas. As amostras utilizadas para estes testes foram de *A. bisporus* liofilizados e os valores de recuperação dos padrões de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> adicionados na amostra ficaram

entre 86 e 97%. As médias das recuperações, seus respectivos desvios padrão e coeficientes de variação estão apresentados na Tabela 5.

Os valores encontrados para a recuperação na amostra de cogumelo estão próximos aos encontrados por ESTEVE *et al.* (2001) que obtiveram 91,6 e 96,7% para vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, respectivamente.

Tabela 5- Valores de recuperação das vitaminas adicionadas à amostra de *A. bisporus* liofilizada em dois diferentes níveis.

Vitamina adicionada	Nível I (mg/100g)	Recuperação <sup>a</sup> (%)	DP	CV%	Nível II (mg/100g)	Recuperação <sup>a</sup> (%)	DP	CV%
B <sub>1</sub>	0,104	91	4,34	4,8	1,04	94,2	3,42	3,6
B <sub>2</sub>	0,104	93	3,91	4,2	1,04	93,5	3,0	3,2

<sup>a</sup> n=10; <sup>b</sup> DP = estimativa do desvio padrão; <sup>c</sup> CV= coeficiente de variação

## CONCLUSÕES

Com as técnicas de extração e limpeza aqui estudadas e detecção por ultravioleta, concluiu-se que a presença de interferentes aliada à baixa concentração das vitaminas nos cogumelo impossibilitaram a determinação simultânea das vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, H, NA e ND.

O método aqui validado para a separação das vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em cogumelo mostrou-se satisfatório, através dos dados obtidos de linearidade, recuperação, repetibilidade e limites de detecção e quantificação.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fapesp pelo auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACS COMMITTEE ON ENVIRONMENTAL IMPROVEMENT. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. **Analytical Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 2242-2249, 1980.

AGOSTINI, T. S., GODOY, H. T. Simultaneous determination of nicotinamide, nicotinic acid, riboflavin, thiamin, and pyridoxine in enriched Brazilian foods by HPLC. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 20, n. 4, p. 245-248, 1997.

ALBALA-HURTADO, S.; VECIANA-NOGUES, M. T.; VIDAL CAROU, M. C.; MARINE FONT, A. Concentration of selected vitamins in infant milks available in Spain. **Journal-of-Food-Science**, v. 66, n. 8, p. 1191-1194, 2001.

ARELLA, F.; LAHÉLY, S.;BOURGUIGNON, J.B. & HASSELMANN, C. Liquid chromatography determination of vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in foods. A collaborative study. **Food Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 81-86, 1996.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL AOAC. **Official methods of analysis**, 16<sup>ed.</sup>, 3<sup>o</sup> rev., Gaithersburg, M.D., 1997.

BAUTISTA-JUSTO,-M; ALANIS-GUZMAN,-M-G; GONZALEZ-DE-MEJIA,-E; GARCIA-DIAZ,-C-L. Composicion quimica de tres cepas mexicanas de *setas* (Pleurotus ostreatus). **Archivos Latinoamericano de Nutricion**, v. 48, n. 4, p. 359-63, 1998.

BIANCHINE-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M. V. C. Vitamina B<sub>1</sub>. In: PENTEADO, M. V. C. **Vitaminas - Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**, 1<sup>a</sup>. Ed. Barueri, SP: Manole, 2003a, p. 227-276.

BIANCHINE-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M. V. C. Vitamina B<sub>2</sub>. In: PENTEADO, M. V. C. **Vitaminas - Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**, 1<sup>a</sup>. Ed. Barueri, SP: Manole, 2003b, p. 277-328.

BLANCO, D.; SÁNCHEZ, L. A.; GUTIÉRREZ, M. D. Determination of water soluble vitamins by liquid chromatography with ordinary and narrow-bore columns. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 17, n. 7, p. 1525-1539, 1994.

CHASE, G. W.; LANDEN, W. O. & SOLIMAN, A. G. Method modification for liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and pyridoxine in medical foods. **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 3, p. 561-565, 1993.

ESTEVE, M. J.; FARRÉ, R.; FRÍGOLA, A.; GARCIA-CANTABELLA, J. M.. Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in mushrooms by liquid chromatography, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1450-1454, 2001.

FINGLAS, P. M.; FAULKS, R. M. Critical review of HPLC methods for determination of thiamin, riboflavin and niacin in food. **Journal of Micronutrient Analysis**, v. 3, v. 4, p. 251-283, 1987.

HÄGG, M. Effects of various commercially available enzymes in the liquid chromatography determination with external standardization of thiamine and riboflavin in foods. **Journal of the AOAC International**, v. 77, n. 3, p. 681-686, 1994.

HORWITZ, W.; KAMPS, L. R.; BOYER, K. W.; Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **Journal of the AOAC**, v.63, n.6, p. 1344-1354, 1980.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R.; Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Applied Chemistry**, v. 74, n.5, p. 835-855, 2002.

LLANOS, E.; BARCOS, R; AUTOR, M. J.; MUNILLA, C.; ANTOLIN, R; MARTIN, O. Composición química del champiñón, **Alimentación - equipos y tecnología**, v. 12, n. 4, p. 53-59, 1993.

LYNCH, P. L. M., YOUNG, I. S. Determination of thiamine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1-2, p. 267-284, 2000.

MARTÍN BELLOSO, O.; LLANOS-BARRIOBERO, E. Proximate composition, minerals and vitamins in selected canned vegetable. **European Food Research Technology**, v. 212, n. 2, p. 182-187, 2001.

MATTILA, P., KONKO, K., EUROLA, M., PIHLAVA, J. M., ASTOLA, J., VAHTERISTO, L., HIETANIEMI, V., KUMPULAINEN, J., VALTONEN, M. e PIIRONEN V. Contents of Vitamins, Mineral Elements, and Phenolic Compounds in Cultivated Mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2343-2348, 2001.

MORENO, P. & SALVADÓ, V. Determination of eight water-soluble and fat-soluble vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography A**, v. 87, n. 1-2, p. 207-215, 2000.

NDAW, S.; BERGAENTZLÉ, M.; AOUDÉ-WERNER, D.; HASSELMANN, C. Extraction procedures for the liquid chromatography determination of thiamin, riboflavin and vitamin B<sub>6</sub> in foodstuffs. **Food Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 129-138, 2000.

OLLILAINEN, V.; FINGLAS, P.M.; VAN DEN BERG, H.; FROIDMONT-GORTZ, I. Certification of B-group vitamins (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub>) in four food reference materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 315-321, 2001.

SHARPLESS, K. E.; MARGOLIS, S.; THOMAS, J. B. Determination of vitamins in food-matrix Standard Reference Materials. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1-2, p.171-181, 2000.

SIMS, A.; SHOEMAKER, D. Simultaneous Liquid Chromatographic Determination of Thiamine and Riboflavin in Selected Foods. **Journal of AOAC International**, v. 76, n. 5: p. 1156-1160, 1993.

VALENTE-SOARES, L. M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 60, n. 1, p 79-84, 2001.

VAN DEN BERG, H.; VAN SCHAİK, F.; FINGLAS, P. M.; FROIDMONT-GÖRTZ, I. Third EU MAT Intercomparison on methods for the determinations of vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub> in food. **Food Chemistry**, v 57, n. 1, p. 101-108, 1996.

WILLS, R. B. H.; SHAW, C. G.; DAY, W. R. Analysis of water soluble vitamins by high pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography Science**, v.15, v. 7, p. 262-266, 1977.

## CAPÍTULO 4

### Otimização da determinação de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em cogumelo *Agaricus bisporus* através da metodologia de superfície de resposta

Regina Prado Zanes Furlani; Helena Teixeira Godoy

#### RESUMO

Metodologia de análise de superfície de resposta foi aplicada para otimizar a determinação de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em cogumelos, por cromatografia líquida de alta eficiência. Quantidade da amostra e da enzima, tempo de reação enzimática e a concentração do oxidante foram assumidos como os fatores mais importantes e que poderiam afetar a determinação das vitaminas. As variáveis significativas para efeito de primeira ordem, para as duas vitaminas, foram o peso da amostra (linear e quadrático) e o tempo de reação enzimática (linear e quadrático). A quantidade de amostra ideal está na faixa 80 a 220mg de amostra liofilizada, equivalente a aproximadamente 0,8 a 2,20 g de amostra in natura. O tempo ideal para a hidrólise enzimática, nas condições estudadas foi em torno de 7 horas.

**Palavras-chave:** cogumelo, superfície de resposta, vitaminas, cromatografia.

#### ABSTRACT

Response surface methodology was applied to optimize the determination of vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in mushrooms by high-performance liquid chromatography. The amount of sample and enzyme, time of enzymatic reaction and the concentration of the oxidant were assumed to be the most important factors, which could affect the determination of the vitamins. The significant variable, for both the vitamins, were the amount of sample (linear and quadratic) and the time of enzymatic hydrolysis (linear and quadratic). The ideal amount of sample was between 80 the 220mg of freeze-dried sample, equivalent to approximately 0.8 the 2.20g of fresh sample. The ideal time for the enzymatic hydrolysis, under the conditions studied was around 7 hours.

**Key words:** mushrooms, surface response, vitamins, chromatography.

## INTRODUÇÃO

Há muito tempo os cogumelos são tratados como uma iguaria e desde a idade antiga são apreciados por se acreditar em seu potencial nutritivo e medicinal. Hoje, no entanto, são considerados por muitos pesquisadores como alimentos nutracêuticos, o que tem estimulado, também os produtores brasileiros e novos produtores na busca de técnicas mais produtivas e na introdução de outras espécies. Existem empresas e pessoas que estão utilizando o *e-commerce* para vender cogumelos cultivados no Brasil e muitas vezes esses *sites* apresentam tabelas nutricionais onde são citados teores de vitaminas dos cogumelos. Esses valores são questionáveis, pois nem sempre as fontes desses dados são apresentadas, não esclarecendo, sequer, se os dados se referem a cogumelos cultivados no Brasil, e sob quais condições, assim como o método de análise empregado.

As vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> podem estar naturalmente presentes nos alimentos sob a forma livre ou fosforiladas (NDAW *et al.*, 2000) e geralmente são determinadas pelos métodos oficiais descritos na AOAC (Association of Official Analytical Chemists), que podem não medir todas as formas presentes (SHARPLESS *et al.*, 2000).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido largamente utilizada para a determinação dessas vitaminas, quer seja em matrizes simples, como formulações farmacêuticas, ou em matrizes alimentícias, que são mais complexas. É um método que pode ser robusto, rápido, reprodutível e sensível (FINGLAS & FAUKS, 1987), mas deve-se ficar atento para que a identificação e quantificação dos compostos sejam confiáveis (VALENTE-SOARES, 2001).

Para a determinação dessas vitaminas a etapa de extração é de suma importância, já que extrações incompletas, presença de interferentes e ainda a degradação das vitaminas podem levar a erros na quantificação. A extração utilizando uma combinação de hidrólise ácida, que garante a liberação das vitaminas das proteínas da matriz, seguida de hidrólise enzimática, que converte as formas fosforiladas em formas livres, tem sido utilizada por diversos pesquisadores para determinação dessas vitaminas em matrizes alimentícias (HÄGG, 1994; NDAW *et al.*, 2000; ARELLA *et al.*, 1996; SIMS & SHOEMAKER, 1993; ESTEVE *et al.*, 2001; VAN DER BERG, H. *et al.*, 1996).

As enzimas mais utilizadas para a hidrólise têm sido a takadiastase, milase e claradiastase (BIANCHINI-PONTUSCHKA & PENTEADO, 2003a, 2003b), mas também

há relatos da utilização de clarase, papaína e fosfatase ácida (VAN DEN BERG *et al.*, 1996).

Alguns autores avaliaram a eficácia da extração e estudaram as condições da hidrólise enzimática, para análise de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em alimentos diversos (VAN DER BERG *et al.*, 1996; ARELLA, *et al.*, 1996; NDAW *et al.*, 2000; HÄGG, 1994; DEFIBAUGH, 1987). RAMOS (2002) determinando vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em vegetais folhosos não convencionais, avaliou o procedimento de extração por metodologia multivariada de superfície de resposta. As variáveis independentes estudadas foram o tempo de centrifugação, velocidade da centrífuga, peso da amostra e tempo de maceração. O autor verificou que dentro das variáveis independentes, o peso da amostra e o tempo de maceração foram determinantes. Os melhores valores para essas variáveis foram 5g de amostra e 3 minutos de maceração.

O objetivo desse estudo foi encontrar as melhores condições de análise para determinação de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em cogumelos utilizando metodologia de superfície de resposta.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostra**

Foram utilizados cerca de 2Kg de cogumelo da espécie *Agaricus bisporus*, recém colhidos na produção da empresa Toyobo do Brasil Ltda., que foram liofilizados.

### **Reagentes**

Os padrões de tiamina (B<sub>1</sub>) e riboflavina (B<sub>2</sub>) foram adquiridos da Sigma Chemical Co, USA. As soluções padrão das vitaminas foram preparadas em HCl 0,1N. A enzima takadiastase foi adquirida da empresa Fluka<sup>®</sup>, Suíça.

Os solventes orgânicos utilizados como fase móvel na cromatografia a líquido foram de grau cromatográfico. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. Para o preparo das fases móveis foi utilizada água purificada pelo sistema Milli-Q (MILLIPORE). Toda fase móvel utilizada foi filtrada através de membranas com poro de 0,45µm.

### **Equipamentos**

Foi utilizado um liofilizador marca Edwards, modelo Super Modullyo.

O equipamento utilizado para a determinação das vitaminas foi um cromatógrafo a líquido de alta eficiência, marca HP, modelo 1100, com desgaseificador, bomba quaternária, sistema de injeção automática (0 a 100 $\mu$ L), detectores de Ultravioleta-Visível com arranjo de diodos e de fluorescência, acoplados em série e compartimento controlador de temperatura para coluna analítica. O sistema de detecção permite a detecção simultânea em vários comprimentos de onda. O sistema foi controlado pelo “software HP-Chemstation”, que também administrou o sistema de aquisição e tratamento de dados.

### **Metodologia analítica**

Os cogumelos frescos e inteiros foram liofilizados por 28 horas a -55 C com pressão 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-2</sup> mbar. Após a liofilização, os cogumelos foram triturados em moinho de facas utilizando-se peneira com granulometria de 20mesh, acondicionados em frascos de polietileno e armazenados a -10°C até a utilização para as análises.

A metodologia de extração utilizada baseou-se no método descrito por ESTEVE *et al.* (2001). Para a extração/hidrólise ácida utilizou-se 200mg de amostra liofilizada, o equivalente a 2g de amostra fresca, às quais se adicionaram 30mL de HCl 0,1N. Esta solução foi aquecida por 30 minutos, em banho-maria, à temperatura de 95-100°C. O extrato foi então resfriado e o pH foi levado a 4,0-4,5 com solução de acetato de sódio 5M. A este extrato foram adicionados 500mg de enzima takadiastase e a solução foi colocada em banho-maria por 5 horas à temperatura de 45-50°C. Após a hidrólise enzimática, foi adicionado 1mL de ácido tricloroacético 50% ao extrato, que foi aquecido por 5 minutos, em banho-maria, à temperatura de 95-100°C. Após resfriamento o volume foi levado a 50mL com HCl 0,1N e filtrado.

A uma alíquota de 5mL do filtrado, foram adicionados 300 $\mu$ L de ferricianeto de potássio (1% em solução de NaOH 15%) e deixado reagir por 10 minutos ao abrigo da luz. Após a reação, o extrato foi neutralizado com 200 $\mu$ L de ácido ortofosfórico 15% e filtrado em filtro com poros de 0,45 $\mu$ m e imediatamente injetado no cromatógrafo a líquido. Para a construção da curva de calibração também foram utilizados 5mL da solução de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e a reação de oxidação foi realizada da mesma maneira descrita acima. Volumes diversos desta solução de padrões foram injetados de modo a obter uma curva de calibração com 1,14 a 210ng de B<sub>1</sub> e 2,32 a 202ng de B<sub>2</sub>.

### **Condições cromatográficas:**

A fase móvel consistiu em gradiente de fase aquosa, composta de 3% de trietilamina (TEA) com pH 7,4 ajustado com ácido sulfúrico, e de fase orgânica de metanol. O gradiente foi composto inicialmente por 80% da fase aquosa e 20 % da fase orgânica até 1,5 minutos, em 1,51 minutos passou-se para 84% da fase aquosa e 16% de metanol, sendo empregado um gradiente linear até 15 minutos chegando a 30% da solução aquosa e 70% de metanol. As condições iniciais da foram retomadas e a coluna não necessitou de re-equilíbrio para a próxima injeção. A vazão foi de 1,0mLmin<sup>-1</sup>. A coluna analítica utilizada foi a Nova-pak® C<sub>18</sub> (Waters) , com partículas de 4µm e dimensão 3,9 x 150mm, protegida por uma coluna de guarda com fase estacionária de octadecilsilil (Varian), com partículas de 5µm e dimensão 3,9 x 15mm e com temperatura controlada de 25°C. O volume de injeção para as amostras foi de 100µL.

### **Modelo experimental**

No presente estudo considerou-se como variáveis para a determinação das vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> , a quantidade de amostra (mg) e de enzima (mg), o tempo de reação enzimática (h) e a concentração do oxidante (%).

O delineamento estatístico utilizado foi o fatorial completo 2<sup>4</sup>, com 4 variáveis independentes e está apresentado na Tabela 1. Para avaliação da estimativa do erro experimental realizaram-se 9 repetições dos pontos centrais. Utilizaram-se 8 pontos axiais adicionados ao planejamento no centro do experimento completo para medir a possibilidade da não-linearidade nos valores de concentração de vitamina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> relacionados às quatro variáveis (BOX *et al*, 1978). Os dados obtidos foram analisados no programa STATISTICA, StatSoft (2000).

O modelo experimental com valores reais e codificados encontra-se na Tabela 2. Os valores Y, das variáveis dependentes, correspondem aos valores encontrados nos ensaios das concentrações das vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> na amostra de cogumelo. Os ensaios 1 a 8 e 12 a 19 determinam o modelo linear e são referentes ao experimento completo. Os ensaios 23 a 30 do planejamento correspondem aos pontos axiais. As 9 replicatas que correspondem aos pontos centrais do experimento estão apresentadas nas linhas restantes.

Tabela 1 - Variáveis independentes pré-estabelecidas (nível superior (+), nível inferior (-), intermediário (0) e pontos axiais ( $\alpha$ )).

Variáveis	$\alpha$ (-)	(-)	(0)	(+)	$\alpha$ (+)
(PA) Peso da amostra (mg)	100	150	200	250	300
(PE) Peso da enzima (mg)	300	400	500	600	700
(TR) Tempo de reação (h)	3	4	5	6	7
(CO) Concentração do oxidante (%)	0,5	0,75	1,0	1,25	1,5

Tabela 2 - Modelo experimental com valores reais e codificados para otimização da análise de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em cogumelos *A. bisporus*.

Ensaio <sup>a</sup>	VALORES EXPERIMENTAIS								Y <sup>c</sup>	
	Real <sup>b</sup>				Codificado				B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>
	PA (mg)	PE (mg)	TR (h)	CO (%)	X1	X2	X3	X4	mg/100g	
1 (L)	150	400	4	1,25	-1	-1	-1	1	0,202	2,468
2 (L)	150	400	6	0,75	-1	-1	1	-1	0,226	2,513
3 (L)	150	600	4	0,75	-1	1	-1	-1	0,122	2,216
4 (L)	150	600	6	1,25	-1	1	1	1	0,254	2,739
5 (L)	250	400	4	0,75	1	-1	-1	-1	0,188	2,320
6 (L)	250	400	6	1,25	1	-1	1	1	0,200	2,463
7 (L)	250	600	4	1,25	1	1	-1	1	0,171	2,260
8 (L)	250	600	6	0,75	1	1	1	-1	0,174	2,448
9 (C)	200	500	5	1,00	0	0	0	0	0,219	2,092
10 (C)	200	500	5	1,00	0	0	0	0	0,209	2,001
11 (C)	200	500	5	1,00	0	0	0	0	0,249	2,253
12 (L)	150	400	4	0,75	-1	-1	-1	-1	0,176	2,456
13 (L)	150	400	6	1,25	-1	-1	1	1	0,260	2,706
14 (L)	150	600	4	1,25	-1	1	-1	1	0,199	2,247
15 (L)	150	600	6	0,75	-1	1	1	-1	0,219	2,700
16 (L)	250	400	4	1,25	1	-1	-1	1	0,126	2,211
17 (L)	250	400	6	0,75	1	-1	1	-1	0,161	2,390
18 (L)	250	600	4	0,75	1	1	-1	-1	0,187	2,246
19 (L)	250	600	6	1,25	1	1	1	1	0,169	2,469
20 (C)	200	500	5	1,00	0	0	0	0	0,234	2,223
21 (C)	200	500	5	1,00	0	0	0	0	0,238	2,092
22 (C)	200	500	5	1,00	0	0	0	0	0,240	2,346
23 (A)	100	500	5	1,00	-2	0	0	0	0,197	2,620
24 (A)	300	500	5	1,00	2	0	0	0	0,179	2,245
25 (A)	200	300	5	1,00	0	-2	0	0	0,186	2,288
26 (A)	200	700	5	1,00	0	2	0	0	0,166	2,104
27 (A)	200	500	3	1,00	0	0	-2	0	0,259	2,347
28 (A)	200	500	7	1,00	0	0	2	0	0,317	2,363
29 (A)	200	500	5	0,50	0	0	0	-2	0,253	2,454
30 (A)	200	500	5	1,50	0	0	0	2	0,213	2,218
31 (C)	200	500	5	1,00	0	0	0	0	0,234	2,299
32 (C)	200	500	5	1,00	0	0	0	0	0,215	2,243
33 (C)	200	500	5	1,00	0	0	0	0	0,218	2,255

<sup>a</sup> Os ensaios foram conduzidos em ordem randômica; PA, peso da amostra (mg); PE, peso da enzima (mg); TR, tempo de reação (h); CO, concentração do oxidante (%); <sup>c</sup>Concentração (mg/100g) das vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> encontrados nos ensaios; (A), pontos axiais; (L), pontos do modelo linear; (C), pontos centrais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos das variáveis independentes sobre a quantidade das vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> foram analisados utilizando-se o programa STATISTICA, StatSoft (2000) e tendo sido avaliados em relação ao seu grau de significância ao teste t (Student) para um  $\alpha < 0,05$  e estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Estimativa dos efeitos, erro puro e significância dos efeitos (p) e t de Student para otimização da extração das vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em cogumelo *A. bisporus*.

Variáveis Interações	ª Estimativa dos efeitos							
	Estimativa dos efeitos		Erro puro		t (8)		p	
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>
Média	0,228444*	2,200444*	0,004513*	0,037686*	50,62289*	58,38910*	0,000000*	0,000000*
PA <sup>b</sup> (L)	-0,026500*	-0,165667*	0,005527*	0,046156*	-4,79476*	-3,58931*	0,001365*	0,007092*
PA(Q)	-0,030764*	0,148819*	0,004918*	0,041067*	-6,25591*	3,62380*	0,000244*	0,006745*
PE <sup>c</sup> (L)	-0,007000	-0,047500	0,005527	0,046156	-1,26654	-1,02913	0,240950	0,333527
PE (Q)	-0,036764*	0,030569	0,004918*	0,041067	-7,47603*	0,74438	0,000071*	0,477942
TR <sup>d</sup> (L)	0,034000*	0,169667*	0,005527*	0,046156*	6,15176*	3,67597*	0,000273*	0,006255*
TR (Q)	0,019236*	0,110069*	0,004918*	0,041067*	3,91171*	2,68023*	0,004470*	0,027916*
CO <sup>e</sup> (L)	0,004000	-0,016500	0,005527	0,046156	0,72374	-0,35749	0,489846	0,729975
CO (Q)	-0,008264	0,100569*	0,004918	0,041067*	-1,68048	2,44890*	0,131373	0,040005*
PA x PE(L)	0,012000	0,035000	0,006769	0,056529	1,77279	0,61915	0,114200	0,553034
PA x TR(L)	-0,028500*	-0,067250	0,006769*	0,056529	-4,21037*	-1,18966	0,002954*	0,268287
PA x CO(L)	-0,027000*	-0,034500	0,006769*	0,056529	-3,98877*	-0,61031	0,004012*	0,558592
PE x TR(L)	-0,002250	0,096250	0,006769	0,056529	-0,33240	1,70267	0,748131	0,127038
PE x CO(L)	0,006750	-0,008000	0,006769	0,056529	0,99719	-0,14152	0,347873	0,890957
TR x CO(L)	0,009750	0,047250	0,006769	0,056529	1,44039	0,83586	0,187722	0,427493

ª Confiança de 95%, t de Student; p-significância; <sup>b</sup> PA, peso da amostra; <sup>c</sup> PE, Peso da enzima; <sup>d</sup> TR, tempo de reação ; <sup>e</sup> CO, Concentração do oxidante; B<sub>1</sub>, Tiamina; B<sub>2</sub>, Riboflavina. \*significativos a 95%.

O coeficiente de correlação (r) representa a relação entre as respostas observadas e os valores previstos pelo modelo matemático. Quanto mais próximo esse valor for de 1 ou 100% mais preditivo é o modelo (BARROS NETO, et. al, 1995). Na análise de variância (ANOVA) apresentada nas Tabela 4 e Tabela 5, respectivamente para as

vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, verifica-se que o modelo obtido apresenta coeficientes de correlação para a vitamina B<sub>1</sub> de r=0,75188 e indica que o modelo explica 75,18 % da variação dos dados observados, e para a vitamina B<sub>2</sub> o coeficiente de correlação foi de 0,70795 e indica que o modelo explica 70,79% da variação dos dados observados. Os F calculados, para ambas as vitaminas, foram superiores ao F tabelado para 95% de confiança. Os baixos valores para o erro puro indicaram uma boa reprodutibilidade das análises do modelo experimental. Os valores dos resíduos foram baixos para ambas as vitaminas quando em comparação com os valores obtidos pela regressão.

Tabela 4 - Análise de variância para desenvolvimento experimental (ANOVA) para determinação de vitaminas B<sub>1</sub> (tiamina) em cogumelo *A. bisporus*.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F calculado	F tabelado	Razão dos Fs	r
<b>Regressão</b>	0,037524379	7	0,005360626	8,86	2,4	3,69	0.75188
<b>Resíduo</b>	0,015131136	25	0,000605245				
<b>Falta de ajuste</b>	0,013664914	17	0,000803818				
<b>Erro puro</b>	0,001466222	8	0,000183278				
<b>Total</b>	0,052655515	32					

Limite de confiança de 95%.

Tabela 5 - Análise de variância para desenvolvimento experimental (ANOVA) para determinação de vitaminas B<sub>2</sub> (riboflavina) em cogumelo *A. bisporus*.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F. calculado	F tabelado	Razão dos Fs	r
<b>Regressão</b>	0,637483616	5	0,127496723	8,63	2,57	3,36	0,70795
<b>Resíduo</b>	0,39892893	27	0,014775146				
<b>Falta de ajuste</b>	0,296672708	19	0,015614353				
<b>Erro puro</b>	0,102256222	8	0,012782028				
<b>Total</b>	1,036412545	32					

Limite de confiança de 95%.

Observando-se as Figuras 1 e 2, verificamos que as variáveis significativas para efeito de primeira ordem, para as duas vitaminas, foram o peso da amostra (L e Q) e o

tempo de reação (L e Q). Para a variável peso da amostra (L) a influência é negativa para ambas as vitaminas, ou seja se aumentarmos o peso da amostra, individualmente, os valores encontrados para a concentração das vitaminas é diminuído. A explicação provável seria de que pelo aumento do peso da amostra a extração poderia ser incompleta. Já para a variável tempo da reação enzimática (L e Q), a influência é positiva, ou seja, o aumento dessa variável, individualmente, poderia levar a um aumento na resposta das vitaminas. O peso da enzima (L) não teve influência significativa para ambas as vitaminas, mas o valor quadrático desta variável foi significativo para a resposta de B<sub>1</sub>, onde um aumento em termos quadráticos do peso da enzima acarretaria uma diminuição da resposta desta vitamina. Já a concentração do oxidante só tem efeito significativo e positivo no valor quadrático e apenas para a resposta vitamina B<sub>2</sub>.

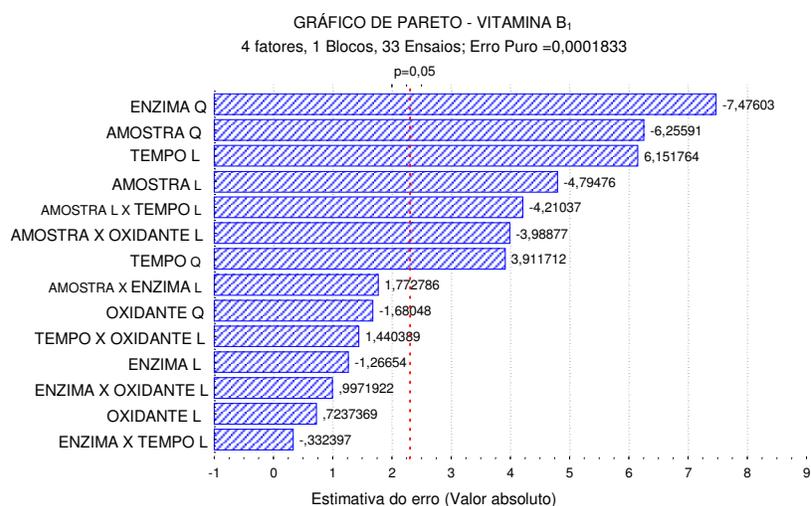


Figura 1 - Representação gráfica da significância do modelo para determinação de Vitamina B<sub>1</sub> em cogumelo *A. bisporus* liofilizado.

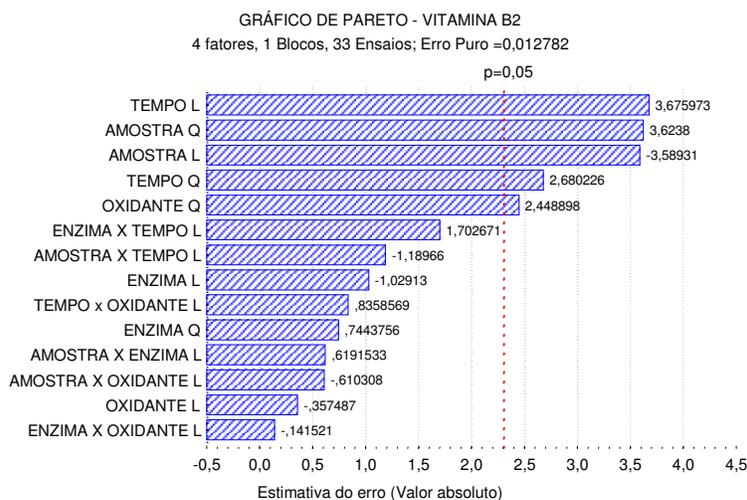
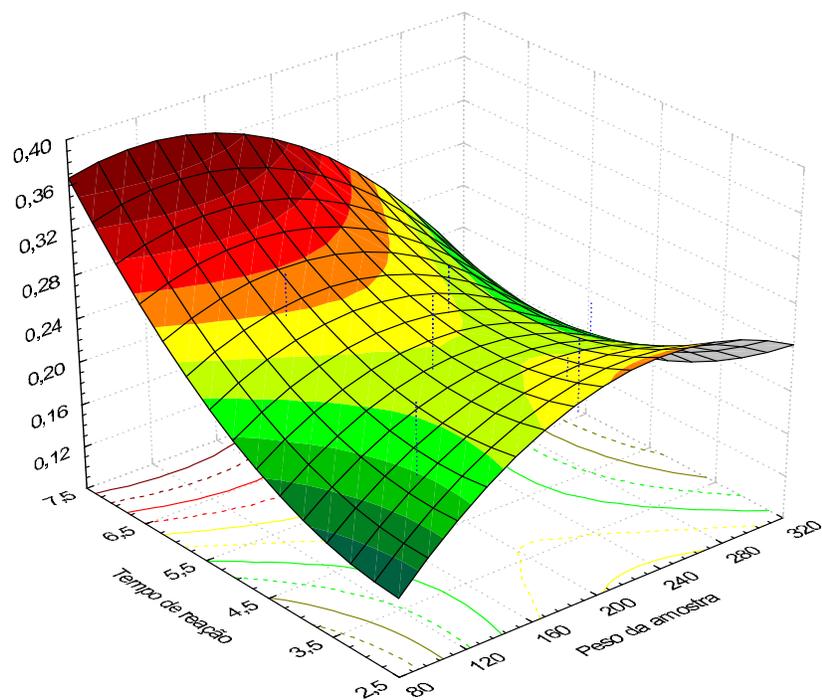


Figura 2 - Representação gráfica da significância do modelo para determinação de Vitamina B<sub>2</sub> em cogumelo *A. bisporus* liofilizado.

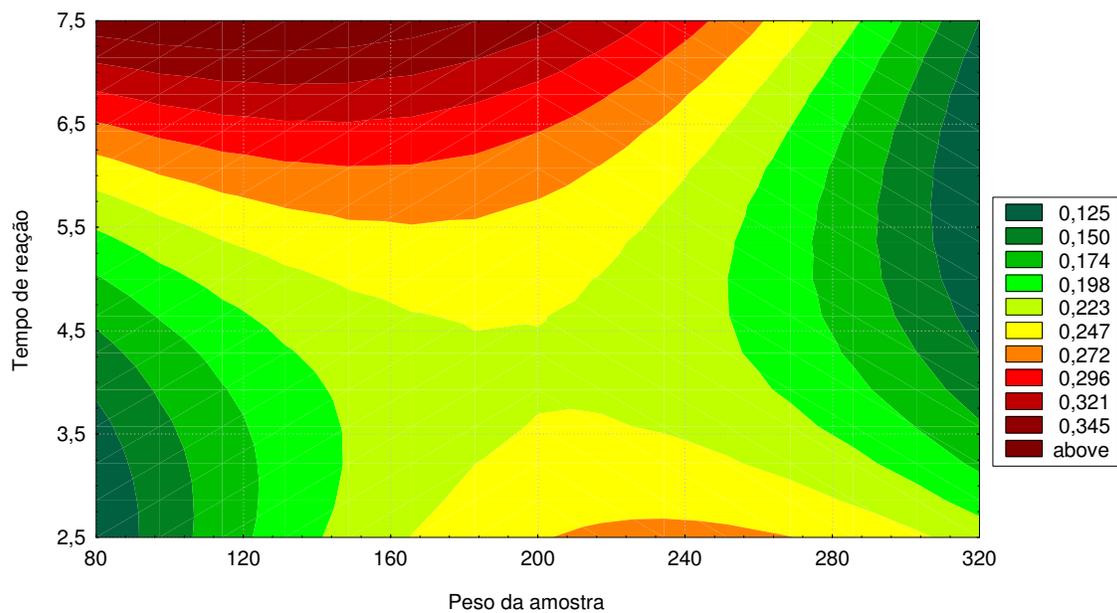
Para as variáveis de segunda ordem podemos observar (Figuras 1 e 2) que apenas para a resposta da vitamina B<sub>1</sub> é que houve significância e para as interações “peso da amostraXtempo de reação” e “peso da amostraXconcentração do oxidante”, com efeito negativo para essa vitamina. O tempo de reação pode ser insuficiente para a quantificação da vitamina B<sub>1</sub> dependendo da quantidade de amostra, mas deve-se tomar cuidado para que um tempo prolongado de reação não promova a perdas da vitamina por degradação. Já a quantidade de oxidante pode ser insuficiente para a oxidação total da tiamina presente na quantidade de amostra e levar-nos a uma subestimação de resultados.

Nos gráficos de superfície de resposta, apresentados nas Figura 3 e 4, podemos observar as faixas ideais para as interações “peso da amostraXtempo de reação” e “peso da amostraXconcentração do oxidante”. A faixa ideal para o peso da amostra está entre 80 e 200mg e o tempo de reação ao redor de 7 horas. No entanto a interação “peso da amostraXconcentração do oxidante”, mesmo sendo significativa ( $p < 0,05$ ), indica que o ponto central escolhido para o experimento, para essa interação, é o ideal para a resposta de vitamina B<sub>1</sub>.



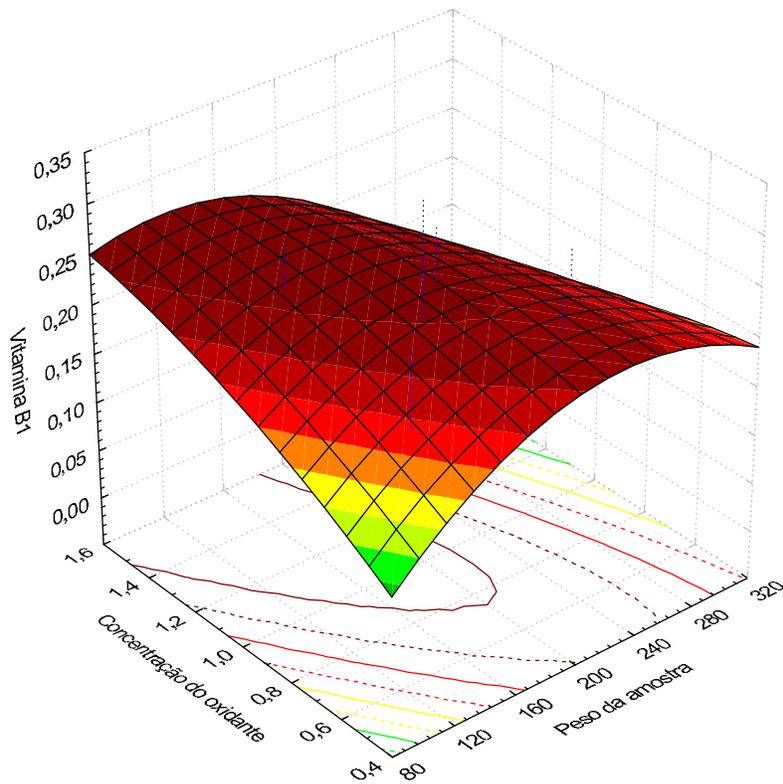
Vitamina B<sub>1</sub>

a



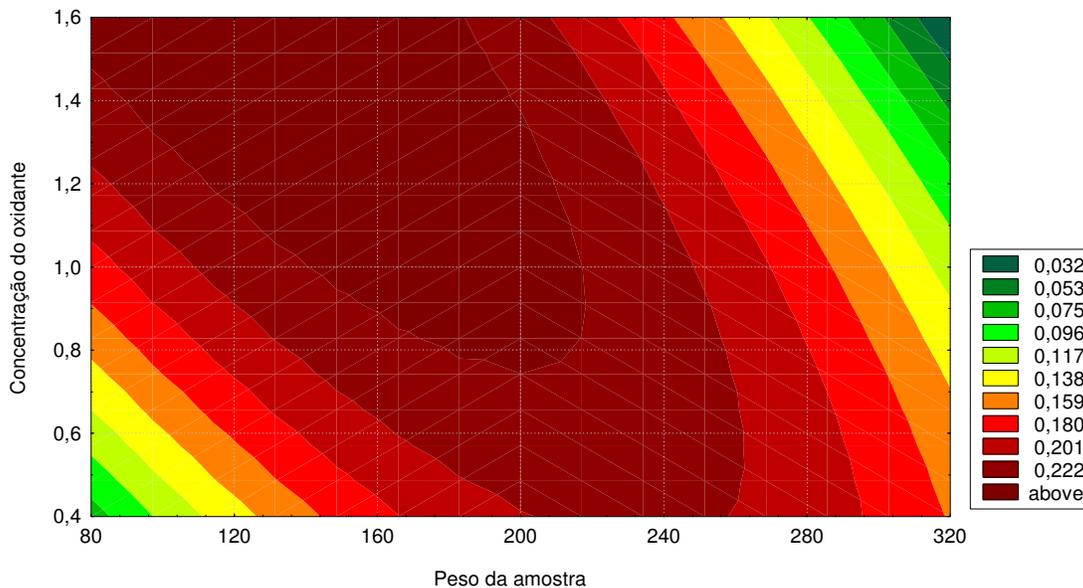
b

Figura 3: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) demonstrando a concentração esperada de vitamina B<sub>1</sub> em função do peso da amostra e do tempo de reação enzimática.



Vitamina B1

a



b

Figura 4: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) demonstrando a concentração esperada de vitamina B<sub>1</sub> em função do peso da amostra e da concentração do oxidante.

## CONCLUSÕES

A análise da superfície de resposta demonstrou que dentro das faixas estabelecidas no experimento e através dos dados obtidos, o ponto central escolhido para as análises não foi o ideal. Apesar do modelo não ser o ideal e por se tratar de análise simultânea de vitaminas, esse modelo apresentou índices de explicação acima de 70%.

Através das análises de superfície de resposta das faixas ótimas de trabalho, verificou-se que o nível ideal do peso da amostra está entre 80 a 220mg de amostra liofilizada, o equivalente a aproximadamente 0,8 a 2,20 g de amostra *in natura*, e o tempo de reação enzimática ao redor de 7 horas.

Para a interação “peso da amostraXconcentração do oxidante” o ponto central escolhido está dentro da faixa ótima de resposta para a vitamina B<sub>1</sub>.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pelo auxílio financeiro e à Toyobo do Brasil Ltda., na pessoa do senhor Marcos Muller, pela doação da amostra de *A. bisporus* para a elaboração desse trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. INTERNATIONAL. **Official methods of analysis**. 16<sup>ed.</sup>, 3<sup>o</sup> rev., Gaithersburg, M.D., 1997.

ARELLA, F.; LAHÉLY, S.; BOURGUIGNON, J. B.; HASSELMANN, C. Liquid chromatographic determination of vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in foods. a collaborative study. **Food Chemistry**, v. 56, n. 1, p 81-86,1996.

BARROS NETO, B.; SACARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2<sup>a</sup>. Ed. Campinas: Unicamp, 1995. 299p.

BIANCHINE-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M. V. C. Vitamina B<sub>1</sub>. In: PENTEADO, M. V. C. **Vitaminas - Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. 1<sup>a</sup>. Ed. Barueri, SP: Manole, 2003a, p. 227-276.

BIANCHINE-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M. V. C. Vitamina B<sub>2</sub>. In: PENTEADO, M. V. C. **Vitaminas - Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. 1<sup>a</sup>. Ed. Barueri, SP: Manole, 2003b, p. 277-328.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistic for experimenters an introduction to design, data analysis and model building**. Wiley series in probability and mathematical statistics, NewYork, 1978. 653p.

DEFIBAUGH, P. W. Evaluation of selected enzymes for thiamine determination. **Journal of AOAC**, v. 70, n. 3, p. 514-517, 1987.

ESTEVE, M. J.; FARRÉ, R.; FRÍGOLA, A.; GARCIA-CANTABELLA, J. M.. Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in mushrooms by liquid chromatography, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1450-1454, 2001.

FINGLAS, P. M. e FAULKES, R. M. Critical review of HPLC methods for determination of thiamin, riboflavin and niacin in food. **Journal of Micronutrient Analysis**, v. 3, n. 4, p. 251-283, 1987.

HÄGG, M. Effects of various commercially available enzymes in the liquid chromatography determination with external standardization of thiamine and riboflavin in foods. **Journal of the AOAC International**, v. 77, n. 3, p. 681-686, 1994.

NDAW, S.; BERGAENTZLÉ, M.; AOUDÉ-WERNER, D.; HASSELMANN, C. Extraction procedures for the liquid chromatography determination of thiamin, riboflavin and vitamin B<sub>6</sub> in foodstuffs. **Food Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 129-138, 2000.

RAMOS, K. L. **Desenvolvimento, validação e determinação simultânea das vitaminas tiamina (B<sub>1</sub>) e riboflavina (B<sub>2</sub>) em vegetais folhosos não convencionais, por CLAE.** 2002. 118f.. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SHARPLESS, K. E.; MARGOLIS, S.; THOMAS, J. B. Determination of vitamins in food-matrix Standard Reference Materials. **Journal-of-Chromatography-A**, v. 881, n. 1-2, p.171-181, 2000.

SIMS, A.; SHOEMAKER, D. Simultaneous Liquid Chromatographic Determination of Thiamine and Riboflavin in Selected Foods. **Journal of AOAC International**, v. 76, n. 5: p. 1156-1160, 1993.

STATSOFT, INC. (2000). STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, email: info@statsoft.com, Web: <http://www.statsoft.com>.

VALENTE-SOARES, L. M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 1, p 79-84, 2001.

VAN DEN BERG, H.; VAN SCHAİK, F.; FINGLAS, P. M.; FROIDMONT-GÖRTZ, I. Third EU MAT Intercomparison on methods for the determinations of vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub> in food. **Food Chemistry**, v 57, n. 1, p. 101-108, 1996.

## CAPÍTULO 5

### Determinação simultânea de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em diferentes espécies de cogumelos comestíveis por cromatografia líquida de alta eficiência

Regina Prado Zanes Furlani; Helena Teixeira Godoy

#### RESUMO

Há muito tempo os cogumelos são tratados como uma iguaria. Hoje, no entanto, são considerados por muitos pesquisadores como alimentos nutracêuticos, o que tem estimulado os produtores brasileiros e novos produtores na busca de técnicas mais produtivas e na introdução de outras espécies. O presente trabalho teve como objetivo a determinação dos teores de vitamina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em cogumelos. As principais espécies de cogumelos cultivados no Brasil, e analisadas neste trabalho foram: *Agaricus bisporus* (champignon de Paris e dinamarquês), *Lentinula edodes* (shiitake) e *Pleurotus* spp (shimeji). A metodologia empregada utilizou hidrólise ácida, seguida de hidrólise enzimática, e a separação das vitaminas por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando fase reversa de C<sub>18</sub> e detecção por fluorescência. Os resultados obtidos para vitamina B<sub>1</sub> foram 0,004 a 0,08mg/100g e para vitamina B<sub>2</sub> de 0,04 a 0,3mg/100g. Os dados mostraram que os cogumelos não podem ser considerados fontes de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, assim a contribuição na dieta para o aporte dessas vitaminas não é significativa.

**Palavras-chave:** cogumelo, fungos comestíveis, vitaminas

#### ABSTRACT

Mushrooms have long been treated as a delicacy. However, these days many researchers consider them as a nutraceutical food, which has stimulated Brazilian producers and new producers to search for more productive techniques and the introduction of other species. The objective of present work was the determination of vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in cultivated mushrooms. The main species of mushroom cultivated in Brazil and analyzed in this work were: *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* and *Pleurotus* spp. The methodology employed used acid hydrolysis followed by enzymatic hydrolysis, and separation of the vitamins by high-performance liquid chromatography, using reverse phase C<sub>18</sub> and fluorescence

detection. The results obtained for thiamin were from 0.004 to 0.08mg/100g and for riboflavin from 0.04 to 0.3mg/100g. The data showed that mushrooms could not be considered as sources of vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> since their contribution of these vitamins to the diet is not significant.

**Key words:** mushroom, edible fungi, vitamins.

## INTRODUÇÃO

Os cogumelos são utilizados como alimento há muitos séculos. Embora muitas culturas usem os cogumelos, tanto pela sua importância gastronômica quanto pelo seu valor medicinal, o seu emprego como alimento funcional é mais notado nas culturas orientais, nas quais a aplicação de cogumelos para se manter a saúde teve início há milhares de anos atrás, como na China. O cogumelo shiitake, bem conhecido pelos japoneses e asiáticos, tornou-se o segundo cogumelo mais cultivado em todo o mundo. Junto ao costume alimentar dos asiáticos há também a forte tradição do uso dos cogumelos medicinalmente, datada há mais de 2000 anos atrás (CHANG,1996).

Os cogumelos têm feito parte da dieta na cultura oriental por centenas de anos. Recentemente o consumo de cogumelos também está aumentando na cultura ocidental envolvendo um grande número de espécies além do popular champignon (MATTILA *et al.*, 2001). São conhecidas cerca de 2000 espécies de cogumelos comestíveis, mas apenas 25 delas são comercialmente cultivadas. No Brasil, as principais espécies comestíveis cultivadas são *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus spp.*

O conhecido champignon (*A. bisporus*) foi a primeira espécie a ser cultivada no Brasil e é a espécie mais cultivada no mundo. No estado de São Paulo, principalmente na região de Mogi das Cruzes, o cultivo ainda é feito de forma rudimentar, geralmente realizado por famílias chinesas que herdaram as técnicas por muitas gerações e sem conhecimentos científicos mais aprofundados (COUTINHO, 2000). No Brasil, vem sendo notado um crescimento no consumo e conseqüentemente, na produção e comercialização de tal produto. Esse fato se dá por haver, atualmente, uma maior divulgação de seu valor nutritivo e medicinal e por seu preço ter se tornado um pouco mais acessível à população. As informações nutricionais dos alimentos vêm se tornando cada vez mais importantes, tanto para profissionais da área de alimentos e saúde, quanto para os próprios consumidores, que estão cada vez mais preocupados com a qualidade nutricional dos alimentos, que compõe ou podem ser introduzidos na sua dieta. Mas muito pouco se sabe a respeito da qualidade nutricional dos cogumelos comestíveis cultivados no Brasil. O teor

de vitaminas tem grande valor, uma vez que as mesmas desempenham funções importantes no organismo humano e animal, e segundo BREENE (1990), os cogumelos podem ser uma boa fonte de vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, niacina, biotina e vitamina C. Por esses motivos, o presente trabalho teve por objetivo quantificar vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> nos cogumelos cultivados no Brasil.

## **METODOLOGIA**

### **Amostras**

As amostras analisadas foram adquiridas na cidade de Campinas, totalizando 11 amostras de diferentes marcas, sendo: 01 *Pleurotus* branco, 01 *Pleurotus* salmão, 04 champignon de Paris (01 identificado como champignon gigante), 01 dinamarquês, 01 champignon de Paris em conserva, 01 shiitake e 02 shimeji. Para cada amostra foram adquiridos 05 lotes de diferentes datas de colheita ou fabricação.

### **Reagentes**

Os padrões tiamina (B<sub>1</sub>) e riboflavina (B<sub>2</sub>), foram adquiridos da Sigma Chemical Co, USA. As soluções padrão das vitaminas foram preparadas em HCl 0,1N. A enzima takadiastase foi adquirida da Fluka<sup>®</sup>, Suíça.

Os solventes orgânicos utilizados como fase móvel na cromatografia líquida foram de grau cromatográfico e os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. Para o preparo das fases móveis foi utilizada água purificada pelo sistema Milli-Q (MILLIPORE). Toda fase móvel utilizada foi filtrada através de membranas com poro de 0,45µm.

### **Equipamentos**

O equipamento utilizado para a determinação das vitaminas foi um cromatográfico a líquido de alta eficiência, marca HP, modelo 1100, com desgaseificador, bomba quaternária, sistema de injeção automática (0 a 100µL), detectores de UV-Visível com arranjo de diodos e de fluorescência, acoplados em série e compartimento controlador de temperatura para coluna analítica. O sistema de detecção permitiu a detecção simultânea em vários comprimentos de onda. O sistema foi controlado pelo “software HP-Chemstation”, que também administrou o sistema de aquisição e tratamento de dados.

## **Análise das vitaminas**

A metodologia de extração utilizada baseou-se no método descrito por ESTEVE *et al.* (2001) e todas as determinações foram realizadas em duplicata. Os cogumelos foram triturados até completa liquefação e homogeneizados utilizando-se um mixer doméstico e imediatamente analisados. Para a extração por hidrólise ácida utilizaram-se 2,0g de amostra previamente desintegrada às quais se adicionaram 30mL de HCl 0,1N. Esta solução foi aquecida por 30 minutos, em banho-maria, à temperatura de 95-100°C. O extrato foi então resfriado e o pH foi ajustado para 4,0-4,5 com solução de acetato de sódio 5M. Foram adicionados 500mg de enzima takadiastase e a solução foi levada a banho-maria por 5 horas à temperatura de 45-50°C. Após a hidrólise enzimática foi adicionado 1mL de ácido tricloroacético 50% ao extrato e aquecido por 5 minutos, em banho-maria, à temperatura de 95-100°C. Após resfriamento o volume foi levado a 50mL com HCl 0,1N e filtrado.

A uma alíquota de 5mL do filtrado foram adicionados 300µL de ferricianeto de potássio (1% em solução de NaOH 15%) e deixado reagir por 10 minutos ao abrigo da luz. Após a reação, o extrato foi neutralizado com 200µL de ácido ortofosfórico 15% e filtrado em filtro com poros de 0,45µm e 100µL foram injetados no cromatógrafo. Para a construção da curva de calibração também foram utilizados 5mL da solução de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Diversos volumes da solução oxidada dos padrões foram injetados de modo a obter uma curva de calibração com 1,14 a 210ng e 2,32 a 202ng de tiamina e riboflavina, respectivamente.

## **Condições cromatográficas**

A fase móvel consistiu em gradiente de fase aquosa de 3% de trietilamina (TEA) a pH 7,4 ajustado com ácido sulfúrico e da fase orgânica de metanol. O gradiente foi formado, inicialmente por 80% da fase aquosa e 20 % da fase orgânica até 1,5 minutos, em 1,51 minutos passou-se para 84% da fase aquosa e 16% de metanol, sendo empregado um gradiente linear até 15 minutos chegando a 30% da solução aquosa e 70% de metanol. As condições iniciais foram retomadas e a coluna não necessitou de re-equilíbrio para a próxima injeção. A vazão foi de 1mLmin<sup>-1</sup> e a coluna analítica utilizada foi a Nova-pak® C<sub>18</sub> (Waters) , com partículas de 4µm e dimensão 3,9 x 150mm, protegida por coluna de guarda com fase estacionária de octadecilsilil com partículas de 5µm e dimensão 3,9x15mm. A temperatura da coluna foi mantida a 25°C pelo

compartimento controlador de temperatura. O volume de injeção para as amostras foi de 100 $\mu$ L.

As vitaminas eluídas foram monitoradas utilizando um detector de fluorescência com programação. A detecção iniciou com  $\lambda_{exc} = 365\text{nm}$  e  $\lambda_{em} = 436\text{nm}$  para a vitamina B<sub>1</sub> e em 7,5 minutos foi alterada para  $\lambda_{exc} = 422\text{nm}$  e  $\lambda_{em} = 515\text{nm}$  para a detecção de B<sub>2</sub>. A quantificação foi realizada por padronização externa, utilizando-se padrões de vitamina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. A identificação foi realizada por comparação dos espectros de fluorescência e pelos tempos de retenção. Também se utilizou adição de padrões ao extrato para confirmação.

### **Análise estatística**

Foi realizada análise de variância e teste de Tukey, utilizando-se o programa STATISTICA (2000). Foram avaliadas as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para os teores de vitamina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cada amostra analisada ( $n=10$ ) independente do lote ou data de colheita e também para cada amostra individualmente, comparando os valores encontrados entre os lotes.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos para as amostras aqui analisadas estão apresentados na Tabela 1.

Pelos resultados apresentados na Tabela 1, pode-se notar que a espécie shimeji da marca G apresentou o mais alto teor de vitamina B<sub>1</sub> (0,08mg/100g). A mesma espécie, de uma diferente marca (F) apresentou resultado com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e imediatamente inferior (0,05mg/100g). Essa amostra apresentou resultados que não diferiram das espécies *Pleurotus* salmon, champignon gigante, champignon da marca C e dinamarquês. A espécie que apresentou o menor teor de vitamina B<sub>1</sub> foi o champignon em conserva (0,004mg/100g), que diferiu significativamente das demais amostras. Como a vitamina B<sub>1</sub> é muito instável, um resultado inferior na amostra em conserva era esperado, pois o processamento utiliza ação de calor, além de contato com agentes químicos tais como cloreto de sódio e agentes branqueadores como sais de sulfito ou dióxido de enxofre, podendo contribuir para perdas.

Tabela 1 - Teores de vitamina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em cogumelos comercializados na cidade de Campinas – SP.

Espécie	Marca	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>
		mg/100g *	
Pleurotus branco	A	0,01±0,01 (d, e)	0,07±0,05 (d)
Dinamarquês	B	0,04±0,01 (b, c)	0,28±0,09 (a)
Champignon Gigante	B	0,03±0,01 (b, c, d)	0,25±0,05 (a)
Champignon	C	0,027±0,009 (b, c, d, e)	0,30±0,05 (a)
Champignon Conserva	D	0,004±0,002 (e)	0,04±0,01 (d)
Champignon	B	0,02±0,01 (c, d, e)	0,16±0,03 (b, c)
Champignon	A	0,02±0,01 (c, d, e)	0,24±0,05 (a, b)
Pleurotus Salmom	A	0,03±0,03 (b, c, d, e)	0,11±0,05 (c, d)
Shiitake	E	0,010±0,003 (d, e)	0,06±0,01 (d)
Shimeji	F	0,05±0,01 (b)	0,09±0,08 (c, d)
Shimeji	G	0,08±0,04 (a)	0,06±0,03 (d)
DMS		0,0253	0,0769

\* Média e estimativa de desvio padrão (n=10); letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ao nível de 5% de significância, segundo teste de Tukey. DMS - Diferença mínima significativa

Os teores de vitamina B<sub>2</sub>, independente da espécie, foram sempre maiores em relação à B<sub>1</sub>. Para vitamina B<sub>2</sub>, as espécies champignon da marcas A e C, o champignon gigante e o cogumelo dinamarquês foram significativamente superiores (p<0,05), embora o champignon da marca A não tenha diferido da marca B. As espécies *Pleurotus* branco e salmon, o shiitake, o shimeji e o champignon em conserva foram os que apresentaram os menores teores (p<0,05) em vitamina B<sub>2</sub>.

Comparando-se os valores obtidos para vitamina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> com os poucos trabalhos envolvendo análise de vitaminas em cogumelos, pode-se observar que existe uma grande variação entre os dados obtidos nesse trabalho e os apresentados por diversos autores. LLANOS *et al.*, (1993) encontraram 0,10 e 0,29mg/100g de vitamina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, respectivamente em amostras de *A. bisporus*. ESTEVE *et al.* (2001) analisaram *A. bisporus* e os valores encontrados foram: 1,0 e 6,37 µg/g vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, respectivamente. Os valores encontrados por BAUTISTA JUSTO *et al.*, (1998) foram 1,92

a 1,96mg/100g para B<sub>1</sub> e 3,31 a 3,70mg/100g para B<sub>2</sub>. MARTIN-BELLOSO e LLANOS-BARRIOBERO (2001) também analisaram *A. bisporus* para vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e os resultados apresentados foram 0,41 e 1,62mg/100g, respectivamente. MATTILA *et al.* (2001) caracterizaram *A. bisporus* (branco e marrom), *L. edodes* e *P. ostreatus* para vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e verificaram que os cogumelos são boas fontes de vitaminas, principalmente de B<sub>2</sub>. A espécie *P. ostreatus* apresentou maiores teores das vitaminas B<sub>1</sub> (0,07mg/100g) e *A. bisporus* branca maior teor de vitamina B<sub>2</sub> (0,39mg/100g).

Como as amostras analisadas eram provenientes de marcas diferentes, de diferentes espécies, as condições edafoclimáticas, bem como as cepas e ou linhagens, podem ter contribuído para essa diferença. Cabe ressaltar que em alguns casos as empresas apenas comercializam os cogumelos, comprando-os de vários produtores e apenas embalando e distribuindo-os. Os diferentes substratos utilizados para o cultivo também podem alterar a composição dos cogumelos (STURION E OETTERER,1995; RIOS-HURTADO *et al*, 2003).

Nas Tabelas 2 e 3 estão apresentados os resultados individuais de cada amostra analisada em duplicata para vitamina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, respectivamente.

A análise de variância e o teste de Tukey mostraram que apenas para o shiitake da marca E e para o shimeji da marca F não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) para os teores de vitamina B<sub>1</sub>, entre os lotes analisados. Para vitamina B<sub>2</sub>, apenas o champignon gigante não apresentou diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os lotes analisados.

Tabela 2 – Comparação dos teores de vitamina B<sub>1</sub>(mg/100g) entre diferentes lotes de cogumelos comercializados na cidade de Campinas – SP\*.

Espécie	Marca	Lote				
		1	2	3	4	5
Champignon	A	0,040±0,003 a	0,0177±0,000 2 c	0,0269±0,0003 b	0,004 ±0,00 d	0,029 ±0,00 b
	B	0,010±0,001 c	0,010±0,002 c	0,021±0,001 b	0,027±0,002 a	0,012±0,001 c
	C	0,026±0,002 bc	0,031±0,001 b	0,015±0,001 d	0,0415±0,0001 a	0,024±0,003 c
Champignon Gigante	B	0,015±0,001 c	0,042±0,009 a	0,044±0,001 a	0,0189±0,0002 bc	0,0346±0,0004 ab
Champignon Conserva	D	0,0036±0,0001 b	0,0034 ±0,0 b	0,0035±0,0002 b	0,0071±0,0001 a	0,004±0,001 b
Pleurotus Branco	A	0,030±0,002 a	0,008±0,001 c	0,0068±0,0002 c	0,0037±0,0001 c	0,014±0,001 b
Pleurotus Salmon	A	0,07± 0,02 a	0,010±0,001 b	0,0072±0,0002 b	0,009±0,001 b	0,030±0,001 b
Dinamarquês	B	0,033±0,002 b	0,037±0,002 b	0,0474±0,0006 a	0,037±0,002 b	0,0434±0,0006 a
Shiitake	E	0,007±0,001 a	0,009±0,002 a	0,007±0,003 a	0,014±0,001 a	0,010±0,002 a
Shimeji	F	0,06±0,01 a	0,057±0,006 a	0,051±0,001 a	0,046±0,02 a	0,034±0,002 a
Shimeji	G	0,11±0,01 a	0,109±0,004 a	0,082±0,001 b	0,092±0,002 ab	0,005±0,001 c

\* médias e estimativa de desvio padrão (n=2); letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ao nível de 5% de significância, segundo teste de Tukey.

Tabela 3 - Comparação dos teores de vitamina B<sub>2</sub> (mg/100g) entre diferentes lotes de cogumelos comercializados na cidade de Campinas – SP\*.

Espécie	Marca	Lotes				
		1	2	3	4	5
Champignon	A	0,328±0,004 a	0,191±0,003 d	0,199±0,004 cd	0,25±0,08 b	0,216±0,001 c
	B	0,123±0,003 c	0,153±0,001 b	0,17±0,01 b	0,16±0,01 b	0,22±0,01 a
	C	0,32±0,01 ab	0,29±0,01 b	0,3182±0,0003 ab	0,35±0,01 a	0,21±0,05 c
Champignon Gigante	B	0,219±0,001 a	0,26±0,08 a	0,322±0,007 a	0,263±0,003 a	0,21±0,01 a
Champignon Conserva	D	0,035±0,003 ab	0,043±0,005 a	0,047±0,006 a	0,0386±0,0004 a	0,02±0,00 b
Pleurotus Branco	A	0,167±0,004 a	0,0478±0,0002 bc	0,045±0,002 c	0,060±0,004 b	0,055±0,006 bc
Pleurotus Salmon	A	0,19±0,04 a	0,1049±0,0004 b	0,057±0,005 b	0,071±0,001 b	0,114±0,004 b
Dinamarquês	B	0,437±0,003 a	0,2766±0,0004 b	0,2161±0,0005 c	0,274±0,004 b	0,191±0,003 d
Shiitake	E	0,060±0,005 b	0,039±0,003 c	0,051±0,001 bc	0,060±0,002 b	0,077±0,005 a
Shimeji	F	0,24±0,02 a	0,07±0,01 b	0,052±0,004 b	0,05±0,02 b	0,040±0,002 b
Shimeji	G	0,11±0,04 a	0,042±0,002 ab	0,046±0,01 ab	0,067±0,003 ab	0,03±0,01 b

\* médias e estimativa de desvio padrão (n=2); letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ao nível de 5% de significância, segundo teste de Tukey.

## CONCLUSÕES

Os valores de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> encontrados nas amostras variaram de 0,004 a 0,08mg/100g e 0,04 a 0,3mg/100g, respectivamente, e indicam que os cogumelos não podem ser considerados fontes dessas vitaminas, mas podem contribuir com o aporte das mesmas na dieta. As diferenças entre os lotes das mesmas amostras e entre produtores indicam que há influência de vários fatores sobre os teores vitamínicos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fapesp pelo auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUTISTA-JUSTO,-M; ALANIS-GUZMAN,-M-G; GONZALEZ-DE-MEJIA,-E; GARCIA-DIAZ,-C-L. Composición química de tres cepas mexicanas de *setas* (*Pleurotus ostreatus*). **Archivos Latinoamericano de Nutricion**, v. 48, n. 4, p. 359-63, 1998.

BREENE, W. M. Nutritional and Medicinal Value of Specialty Mushrooms. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 10, p. 883-894, 1990.

CHANG, R. Functional properties of Edible Mushrooms. **Nutrition Reviews**, v. 54, n. 11, p. S91-S93, 1996.

COUTINHO, L.N. **Cultivo de espécies de cogumelo comestíveis**. Disponível em <<http://www.geocities.com/esabio.geo/cogumelo/agaricus.htm>>. Acesso em: 13 maio 2004.

ESTEVE, M. J.; FARRÉ, R.; FRÍGOLA, A.; GARCIA-CANTABELLA, J. M. Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in mushrooms by liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1450-1454, 2001.

LLANOS, E. et. al. Composición química del champiñón, **Alimentación - equipos y tecnología**, v. 12, n. 4, p. 53-59, 1993.

MARTÍN BELLOSO, O.; LLANOS-BARRIOBERO, E. Proximate composition, minerals and vitamins in selected canned vegetable. **European Food Research Technology**, v. 212, n. 2, p. 182-187, 2001.

MATTILA, P., KONKO, K., EUROLA, M., PIHLAVA, J. M., ASTOLA, J., VAHTERISTO, L., HIETANIEMI, V., KUMPULAINEN, J., VALTONEN, M. e PIIRONEN V. Contents of Vitamins, Mineral Elements, and Phenolic Compounds in Cultivated Mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2343-2348, 2001.

RIOS-HURTADO, A.; TORRES-TORRES, G.; MEDINA-RIVAS, M. A. Chemical characterization of oyster mushrooms (*Pleurotus sajor caju*) grown on four organic substrates. **Alimentaria**, v. 349, p. 85-89, 2003.

STURION, G. L. e OETTERER, M. Composição Química de Cogumelos Comestíveis (*Pleurotus* spp.) Originados de Cultivos em Diferentes Substratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 15, n. 2, p. 189-193, 1995.

STATSOFT, INC. (2000). STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc.

## CAPÍTULO 6

### Determinação de Folatos em Três Diferentes Espécies de Cogumelos Comestíveis Comercializados na Cidade de Campinas - SP

Regina Prado Zanes Furlani; Helena Teixeira Godoy

#### RESUMO

O teor de folatos nas principais espécies de cogumelos cultivados no Brasil foi avaliado neste trabalho. As espécies analisadas foram *Agaricus bisporus* (champignon de Paris), *Lentinula edodes* (shiitake) e *Pleurotus ostreatus* (shimeji). Foram determinadas as 5 principais formas de folatos presentes em alimentos: tetrahydro ácido fólico (THAF), 10-metil ácido fólico (10MAF), 5-metil tetrahydro ácido fólico (5MTHAF), 10-formil ácido fólico (10FAF) e 5-formil tetrahydro ácido fólico (5FTHAF). A metodologia empregada utilizou extração com tampão fosfato, limpeza com ácido tricloroacético e separação das vitaminas por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção simultânea por fluorescência e ultravioleta. Os resultados obtidos para o total de folatos foram 551 a 1404 $\mu\text{g}/100\text{g}$  para o champignon de Paris, 606 a 727 $\mu\text{g}/100\text{g}$  para o shiitake e 460 a 1325 $\mu\text{g} /100\text{g}$  para o shimeji. Os dados mostram que os cogumelos podem ser considerados fontes de folatos e sua contribuição na dieta, para o aporte dessa vitamina, é significativa.

**Palavras-chave:** Cogumelo, folatos, fungos comestíveis, vitaminas

#### ABSTRACT

In this study, folates were evaluated in the main species of mushrooms cultivated in Brazil. The species analyzed were *Agaricus bisporus* (champignon of Paris), *Lentinula edodes* (shiitake) and *Pleurotus ostreatus* (shimeji). The five main forms of folate found in food were determined: tetra hydro folic acid (THF), 10-methyl folic acid (10MF), 5-methyl tetra hydro folic acid (5MTHF), 10-formyl folic acid (10FF) and 5-formy tetra hydro folic acid (5FTHF). The methodology employed used extraction with buffer phosphate, clean-up with trichloroacetic acid and separation of the vitamins by high-performance liquid chromatography, with simultaneous detection by ultraviolet and fluorescence. The results

obtained for total folate were 551 to 1404 $\mu$ g/100g for the champignon of Paris, 606 to 727 $\mu$ g/100g for shiitake and 460 to 1404 the 1325 $\mu$ g /100g for the shimeji. The data show that mushrooms can be considered as sources of folate and their contribution of these vitamins to the diet is meaningful.

**Key words:** mushroom, folates, edible fungi, vitamins.

## INTRODUÇÃO

Os cogumelos são utilizados como alimento há muitos séculos. São conhecidas cerca de 2000 espécies de cogumelos comestíveis, mas apenas 25 delas são comercialmente cultivadas. No Brasil, as principais espécies comestíveis cultivadas são *A. bisporus*, *L. edodes*, *P. ostreatus* e a espécie medicinal *A. blazei* (“cogumelo do sol”).

Esses fungos comestíveis têm feito parte da dieta na cultura oriental por mais de centenas de anos. Recentemente o consumo de cogumelos também está aumentando na cultura ocidental envolvendo um grande número de espécies além do popular champignon (MATTILA *et al.*, 2001). O conhecido champignon (*A. bisporus*) foi a primeira espécie a ser cultivada no Brasil e é a espécie mais cultivada no mundo. No estado de São Paulo, principalmente na região de Mogi das Cruzes, o cultivo ainda é de realizado forma rudimentar, geralmente por famílias chinesas que herdaram as técnicas por muitas gerações e sem conhecimentos científicos mais aprofundados (COUTINHO, 2004).

Os cogumelos têm sido apreciados desde a idade antiga por se acreditar em seu elevado valor nutritivo e em seu potencial medicinal, além de ser classificado como uma especiaria nobre em pratos culinários. No Brasil, vem se notando um crescimento no consumo e conseqüentemente, na produção e comercialização de tal produto. Esse fato deve-se, atualmente, à maior divulgação de seu valor nutritivo e medicinal e pelo preço ter se tornado um pouco mais acessível à população. As informações nutricionais dos alimentos vêm se tornando cada vez mais importante, tanto para profissionais da área de alimentos e saúde, quanto para os próprios consumidores, que estão cada vez mais preocupados com a qualidade nutricional dos alimentos que compõem ou podem ser introduzidos na sua dieta. Mas muito pouco se sabe a respeito da qualidade nutricional e não existe nenhum dado na literatura indexada sobre o teor de folatos dos cogumelos comestíveis cultivados no Brasil. O teor de vitaminas tem grande valor, uma vez que estas desempenham funções importantes no organismo humano e animal.

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel que também é chamada de ácido pteroilglutâmico, vitamina B<sub>9</sub>, vitamina B<sub>12</sub> e vitamina M e recentemente tem chamado a atenção dos pesquisadores em decorrência da confirmação de sua ação benéfica ao organismo humano. Essa vitamina está presente naturalmente nos alimentos, geralmente, na forma reduzida, como derivados de poliglutamatos (DEVLIN, 1998). Folato é o termo geral que se refere a compostos não só estruturalmente, mas também com atividade semelhante à do ácido fólico (BRODY, 1994; DALY *et al.*, 1997). Acredita-se que um dos possíveis efeitos diretamente ligado à carência dos folatos e, que tem surtido maior repercussão mundial, são as malformações congênitas. Inúmeros trabalhos publicados mostram que a deficiência de folatos pode causar doenças cardiovasculares, câncer e desordens mentais, como o mal de Alzheimer (KATZUNG, 1994).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi determinar as cinco formas de folatos em amostras de cogumelos comestíveis cultivados no Brasil.

## **METODOLOGIA**

### **Amostras**

As espécies de cogumelo analisadas neste trabalho foram: *A. bisporus* (champignon de Paris), *L. edodes* (shiitake) e *Pleurotus* spp. (shimeji). As amostras foram adquiridas em supermercados da cidade de Campinas, SP. Foram analisadas quatro (04) amostras de cada espécie de cogumelo, provenientes de diferentes marcas, sendo cada amostra formada por aproximadamente 200g do produto.

### **Reagentes**

Os padrões de tetrahydro ácido fólico (THAF), 10-metil ácido fólico (10MAF), 5-metil tetrahydro ácido fólico (5MTHAF), 10-formil ácido fólico (10FAF) e 5-formil tetrahydro ácido fólico (5FTHAF) foram adquiridos de Schircks Laboratories, Suíça. As soluções estoque dos padrões dos folatos foram preparadas individualmente com a concentração de 0,03mgmL<sup>-1</sup>. Os padrões foram dissolvidos em tampão fosfato (0,25mol/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,37mol/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) juntamente com 1% de ácido ascórbico. A partir destas soluções foi preparada uma solução de trabalho contendo todas as formas de folatos.

Os reagentes utilizados para o preparo da fase móvel foram de grau cromatográfico. Toda fase móvel utilizada foi filtrada através de membranas com poro de 0,45µm. Para o

preparo das fases móveis e tampão fosfato foi utilizada água purificada pelo sistema Milli-Q<sup>®</sup> (MILLIPORE). Todos os outros reagentes foram grau de pureza para análise.

### **Equipamentos**

O equipamento utilizado para a determinação das vitaminas foi um cromatógrafo a líquido de alta eficiência, marca HP modelo 1100, com desgaseificador, bomba quaternária, sistema de injeção automática (0 a 100 $\mu$ L), detectores de UV-Visível com arranjo de diodos e de fluorescência, acoplados em série e compartimento controlador de temperatura para coluna analítica. O sistema foi controlado pelo “software HP-Chemstation”, que também administrou o sistema de aquisição e tratamento de dados.

### **Determinação dos folatos**

O procedimento empregado utilizou a metodologia desenvolvida por CATHARINO (2004) que validou a metodologia com material de referência de mistura de vegetais (BCR487), adquirido do Instituto de Materiais de Referência e Padrões da Bélgica. Foram avaliados os limites de detecção, % de recuperação e repetibilidade para cada forma de folato.

Os cogumelos foram triturados até completa liquefação e homogeneizados em um mixer doméstico e imediatamente analisados. Para a extração pesou-se 3g da amostra previamente desintegrada com 30mL de tampão fosfato (0,25mol/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 0,37mol/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). O extrato foi levado em banho de ultra-som por 15 minutos e após a extração dos folatos foi adicionado 1mL de ácido tricloroacético e 10mL de acetonitrila para limpeza e precipitação de interferentes. O volume foi completado para 50mL com tampão fosfato em balão volumétrico. O extrato foi então filtrado em papel de filtro comum e depois em filtros com poros de 0,22 $\mu$ m. As análises foram conduzidas em duplicata.

### **Condições cromatográficas**

A separação dos folatos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa de octadecilsilil (Nova-pak<sup>®</sup>, Waters), com temperatura controlada de 25°C, com partículas de 3 $\mu$ m e dimensão 3,9x150mm e coluna de guarda com fase estacionária de octadecilsilil de 5 $\mu$ m e dimensão 3,9x15mm.

A fase móvel foi composta de fase aquosa acética (2% de ácido acético; pH ajustado para 2,8 com KOH) e acetonitrila, com eluição por gradiente. Foi utilizado gradiente composto inicialmente por 100% da fase aquosa acética, sendo empregado um

gradiente linear até 25 minutos chegando a 24% da fase aquosa acética e 76% de acetonitrila. Em 26 minutos foram restabelecidas as condições iniciais e o término da corrida se deu em 40 minutos, o suficiente para o re-equilíbrio do sistema. Todas as formas de folatos foram eluídas em um tempo de 15 minutos de corrida. A vazão da fase móvel foi de 0,5mLmin<sup>-1</sup>. O volume de injeção para as amostras foi de 100µL.

A detecção foi realizada simultaneamente por fluorescência e ultravioleta. Os compostos foram monitorados em  $\lambda=290\text{nm}$  para ultravioleta e  $\lambda_{\text{exc.}}=290\text{nm}$  e  $\lambda_{\text{em.}}=360\text{nm}$  e 445nm para fluorescência. A quantificação foi realizada por padronização externa, utilizando-se os padrões das diferentes formas de folatos. A identificação foi feita por comparação dos espectros de absorvância, tanto no ultravioleta quanto na fluorescência e também pelos tempos de retenção. Também se utilizou adição de padrões ao extrato para confirmação.

### Análise estatística

Foi realizada análise de variância e teste de Tukey, utilizando-se o programa STATISTICA (2000) para identificar as possíveis diferenças significativas ( $p<0,05$ ) para cada forma de folato e folatos totais entre os lotes de cada espécie. Também foi realizada análise de variância e teste de Tukey para a avaliação de possíveis diferenças do teor de folatos totais entre cada espécies.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os limites de detecção para a metodologia estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1– Limites de detecção para as diversas formas de folatos (CATHARINO, 2004).

10 MAF	5 MTHAF	5 FTHAF	10 FAF	THAF
ngmL <sup>-1</sup>				
5	0,005	0,03	0,03	0,007

THAF: tetrahydro ácido fólico; 10MAF: 10-metil ácido fólico; 5MTHAF: 5-metil tetrahydro ácido fólico; 10FAF, 10-formil ácido fólico e 5FTHAF: 5-formil tetrahydro ácido fólico.

A repetibilidade mostrou-se adequada, pois as variações das medidas sempre foram menores que os valores de repetibilidade calculados a partir da fórmula  $r = t\sqrt{2.sr}$ , onde r é a repetibilidade, t é o t de Student e sr é a estimativa do desvio padrão.

As porcentagens de recuperações ficaram entre 98 e 103% para os padrões adicionados ao material de referência certificado.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados obtidos para as amostras analisadas fólido.

Tabela 2 – Teores de folatos em cogumelos comercializados na cidade de Campinas – SP.

Espécie	Marca	10 MAF	5 MTHAF	5 FTHAF	10 FAF	THAF	Total
		µg/100g *					
Paris	H	86±2 <b>b</b>	7, 7±0,1 <b>a</b>	ND	ND	570±49 <b>b</b>	664±47 <b>b</b>
	A-1	508±19 <b>a</b>	ND	ND	ND	42±13 <b>c</b>	551±5 <b>b</b>
	A-2	599±120 <b>a</b>	2±1 <b>b</b>	98±10	17±12 <b>a</b>	692±61 <b>b</b>	1409±202 <b>a</b>
	B	238±41 <b>b</b>	2,7±0,7 <b>b</b>	ND	24±5 <b>a</b>	1166±137 <b>a</b>	1431±184 <b>a</b>
Média <sup>a</sup>							1014±449 <b>a</b>
Shiitake	B	596±100 <b>a</b>	5±1 <b>a</b>	126±5 <b>b</b>	ND	ND	727±93 <b>a</b>
	A	602±2 <b>a</b>	4,0±0,3 <b>a</b>	ND	ND	ND	606±2 <b>a</b>
	E -1	404±9 <b>a</b>	29±15 <b>a</b>	181±2 <b>a</b>	ND	ND	614±22 <b>a</b>
	E -2	579±12 <b>a</b>	15,5±0,5 <b>a</b>	89,9±0,7 <b>c</b>	ND	ND	684±11 <b>a</b>
Média <sup>a</sup>							658±65 <b>a</b>
Shimeji	H	ND	6,0±0,1 <b>d</b>	70±2	ND	591±35 <b>a</b>	666±37 <b>b</b>
	B	ND	964±1 <b>a</b>	ND	ND	361,3±0,3 <b>b</b>	1325±2 <b>a</b>
	A	ND	459±2 <b>b</b>	ND	ND	266±27 <b>bc</b>	725±25 <b>b</b>
	F	58,57±21,1	251±16 <b>c</b>	ND	ND	150±47 <b>c</b>	459±43 <b>c</b>
Media <sup>a</sup>							794±345 <b>a</b>

ND – Não detectado; \* Média e estimativa de desvio padrão (n=2); Valores assinalados com a mesma letra na mesma coluna entre as médias de cada espécie e para as médias finais não diferem significativamente (p<0,05) segundo teste de Tukey. <sup>a</sup> Média e estimativa de desvio padrão (n=8) das respectivas espécies. THAF: tetrahydro ácido fólico; 10MAF: 10-metil ácido fólico; 5MTHAF: 5-metil tetrahydro ácido fólico; 10FAF, 10-formil ácido fólico e 5FTHAF: 5-formil tetrahydro ácido fólico.

As formas majoritárias para as amostras de champignon de Paris foram o tetrahydro ácido fólico e o 10-metil ácido fólico. Para o shiitake foram o 10-metil ácido fólico e o

5-formil tetrahydro ácido fólico. Já para o shimeji as formas majoritárias foram o tetrahydro ácido fólico e o 5–metil tetrahydro ácido

A Figura 1 apresenta um cromatograma característico do extrato de cogumelo, evidenciando as formas de folatos detectadas.

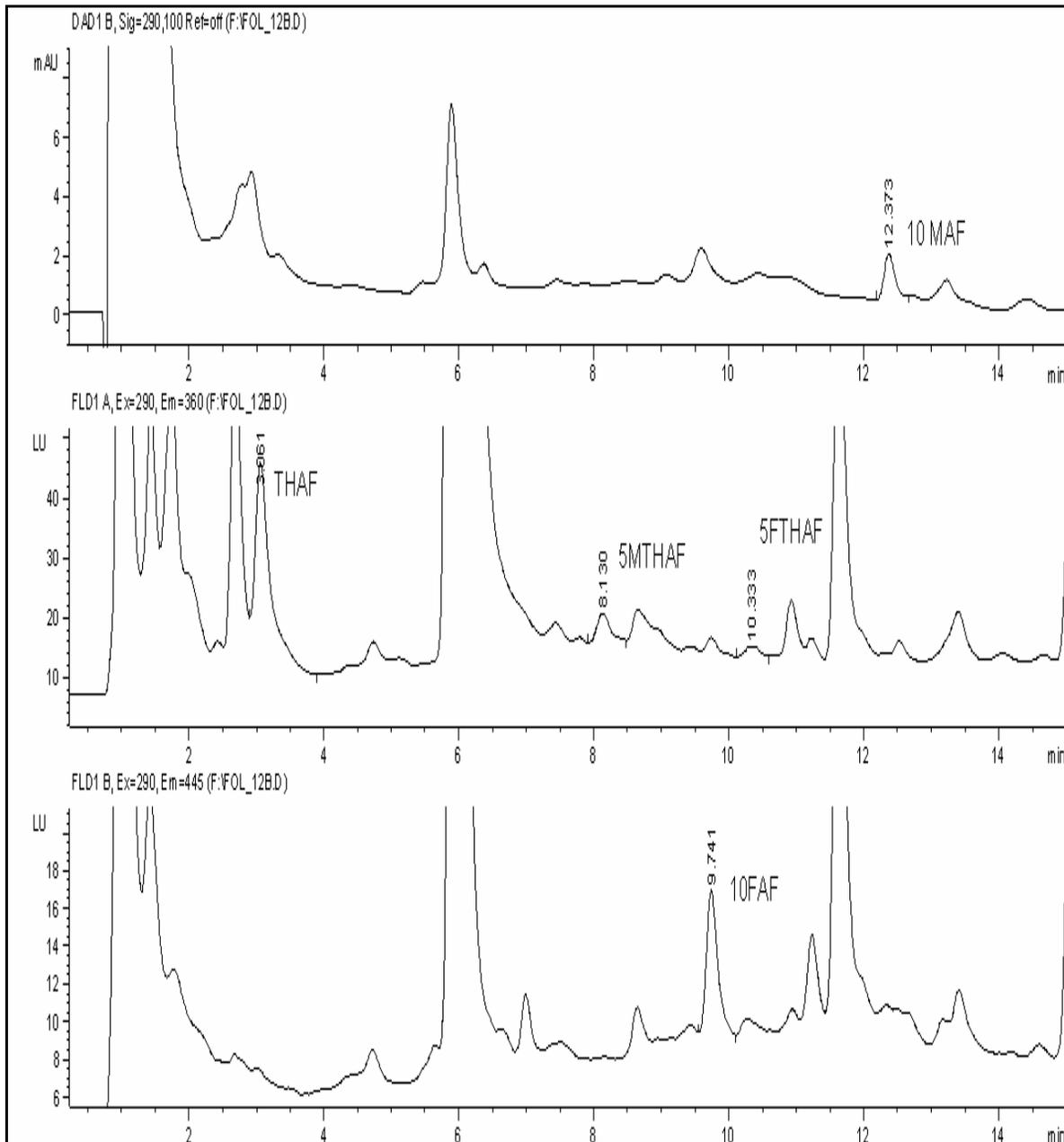


Figura 1- Cromatograma de uma amostra de *A. bisporus* para a análise de folatos. Condições cromatográficas descritas no texto.

Ao se analisar separadamente as espécies estudadas nota-se que existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as formas de folatos para as diferentes marcas. Para o champignon de Paris, das quatro amostras analisadas, sendo duas de uma mesma marca, vê-se que existem diferenças para as cinco formas de folatos. As duas amostras da mesma marca não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) apenas para 10MAF. Para o shiitake, apenas para o 5FTHAF é que os resultados foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Nessa espécie não foram detectados 10FAF e THAF. Para o shimeji não foram detectados 10MAF e 5FTHAF em três das quatro amostras analisadas e em nenhuma das amostras de shimeji foi encontrado 10FAF.

Essas diferenças podem ter sido causadas pelas diferentes condições edafoclimáticas (época e região de cultivo) além do grau de maturação e armazenamento pós-colheita. Também pode-se atribuir essas diferenças ao substrato utilizado, pois segundo STURION e OETTERER (1995) e RIOS-HURTADO *et al* (2003), diferentes substratos levam a diferentes composições químicas e nesse trabalho para folatos, foram analisadas amostras de diferentes marcas que provavelmente utilizaram substratos distintos.

Pode-se notar que o teor total das formas de folatos variou entre 459,1 e 1431,4 $\mu$ g/100g para todas as espécies analisadas. Para o champignon de Paris, a média para todas as marcas analisadas foi de 1014 $\mu$ g/100g de folatos totais e não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as marcas A-2 e B e as marcas H e A-1. As marcas A-2 e B foram superiores às outras duas marcas. Para o shiitake a média para todos os lotes analisados foi de 658 $\mu$ g/100g e não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as marcas. Já para o shimeji, os lotes analisados foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) para as marcas B e F e as marcas H e A não apresentaram diferenças entre si ( $p > 0,05$ ), mas diferiram das demais. Quando analisou-se estatisticamente os teores de folatos totais para todas as espécies, não ocorreram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre elas.

## **CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos mostram que os cogumelos podem ser considerados fontes de folatos e sua contribuição na dieta, para o aporte dessa vitamina, é significativa.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Fapesp pelo auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CATHARINO, R. R.; **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de folatos em alimento**. 2004. 97f. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

COUTINHO, L.N. **Cultivo de espécies de cogumelo comestíveis**. Disponível em <<http://www.geocities.com/esabio.geo/cogumelo/agaricus.htm>>. Acesso em: 13 maio 2004.

DALY, S., MILLS, J.L., MOLLOY, A.M., CONLEY, M., LEE, Y.J., KIRKE P.N., WEIR, D.G., SCOTT, J.M. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. **Lancet**, v.350, n. 9092, p. 1666- 1669, 1997.

DEVLIN, T.M. Manual de Bioquímica com correlações clínicas. Tradução de Yara M. Michelacci. 4ª ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 1998. 1007p.

KATZUNG B.G. Farmacologia básica e clínica. Tradução de Ana Beatriz Assumpção Souza *et al.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1994. 992 p.

MATTILA, P., KONKO, K., EUROLA, M., PIHLAVA, J. M., ASTOLA, J., VAHTERISTO, L., HIETANIEMI, V., KUMPULAINEN, J., VALTONEN, M. e PIIRONEN V.. Contents of vitamins, mineral elements, and phenolic compounds in cultivated mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, 2343-2348, 2001.

RIOS-HURTADO, A.; TORRES-TORRES, G.; MEDINA-RIVAS, M. A. Chemical characterization of oyster mushrooms (*Pleurotus sajor caju*) grown on four organic substrates. **Alimentaria**, V. 349, p. 85-89, 2003.

STATSOFT, INC. (2000). STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc.

STURION, G. L. e OETTERER, M. Composição química de cogumelos comestíveis (*Pleurotus* spp.) originados de cultivos em diferentes substratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 15, n. 2, p. 189-193, 1995.

## CONCLUSÕES FINAIS

1 - Os cogumelos *A. bisporus*, *L. edodes* e *Pleurotus* spp., cultivados no Brasil, mostraram-se em sua composição química serem um excelente alimento nutricional, pois apresentam alto teor de proteínas (23g/100g, base seca), fibra alimentar (34g/100g, base seca) e fósforo (104mg/100g, base úmida), e baixo teor de lipídeos (4,7g/100g, base seca). Há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na composição centesimal dos cogumelos da mesma espécie e provenientes de lotes diferentes.

2 – Com as técnicas de extração e limpeza aqui estudadas e detecção por ultravioleta, concluiu-se que a presença de interferentes aliada à baixa concentração das vitaminas nos cogumelo impossibilitaram a determinação simultânea das vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, H, NA e ND.. O método aqui validado para a separação das vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em cogumelo mostrou-se satisfatório, através dos dados obtidos de linearidade, recuperação, repetibilidade e limites de detecção e quantificação.

3- A análise da superfície de resposta demonstrou que dentro das faixas estabelecidas no experimento e através dos dados obtidos o ponto central escolhido para as análises não foi o ideal. Apesar do modelo não ser o ideal e por se tratar de análise simultânea de vitaminas, esse modelo apresentou índices de explicação acima de 70%. Através das análises de superfície de resposta das faixas ótimas de trabalho, verificou-se que o nível ideal do peso da amostra está entre 80 a 220mg de amostra liofilizada, o equivalente a aproximadamente 0,8 a 2,20 g de amostra *in natura*, e o tempo de reação enzimática ao redor de 7 horas.

4 - Os teores das vitaminas B1 e B2 encontrados nas amostras analisadas variaram de 0,004 a 0,08mg/100g e 0,04 a 0,3mg/100g, respectivamente e indicam que os cogumelos não podem ser considerados fontes dessas vitaminas, mas podem contribuir com o aporte das mesmas na dieta.

5 – A metodologia empregada para determinação de folatos nos cogumelos mostrou-se adequada. O sistema de extração e separação para as principais formas de folatos mostrou-se apropriado para as amostras de cogumelos. Os teores totais de folatos, entre as diferentes espécies de cogumelos, variaram de 458 a 1431µg/100g e os resultados obtidos nas amostras analisadas mostram que os cogumelos podem ser considerados fontes de folato.

## ANEXOS



Figura 1: Foto de uma amostra de *Pleurotus* spp.



Figura 2: Foto de uma amostra de *L. edodes* (shitake).



Figura 3: Foto de uma amostra de *Pleurotus ostreatus* (shimeji).



Figura 4: Foto de uma amostra de *A. bisporus* (Champignon de Paris).

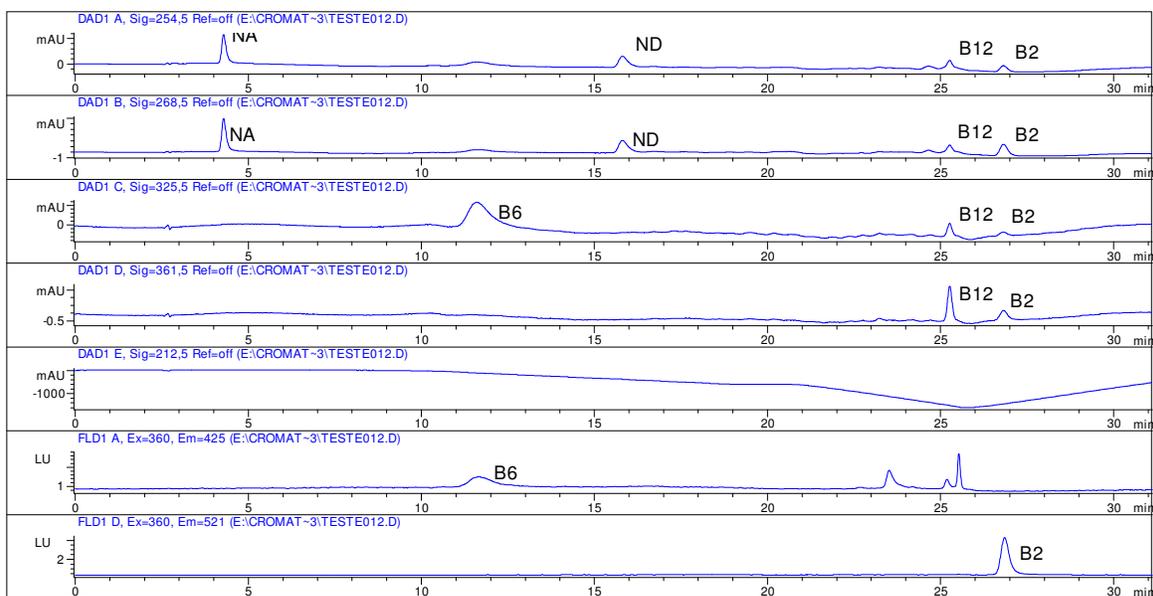


Figura 5 - Perfil cromatográfico dos padrões de B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, NA, ND e H  
 Condições cromatográficas:  
 Coluna analítica Vydac® C<sub>18</sub>, 5µm, 4,6 x 250mm  
 Fase móvel F da Tabela 2 (capítulo 3)  
 Vazão: 1mLmin<sup>-1</sup>

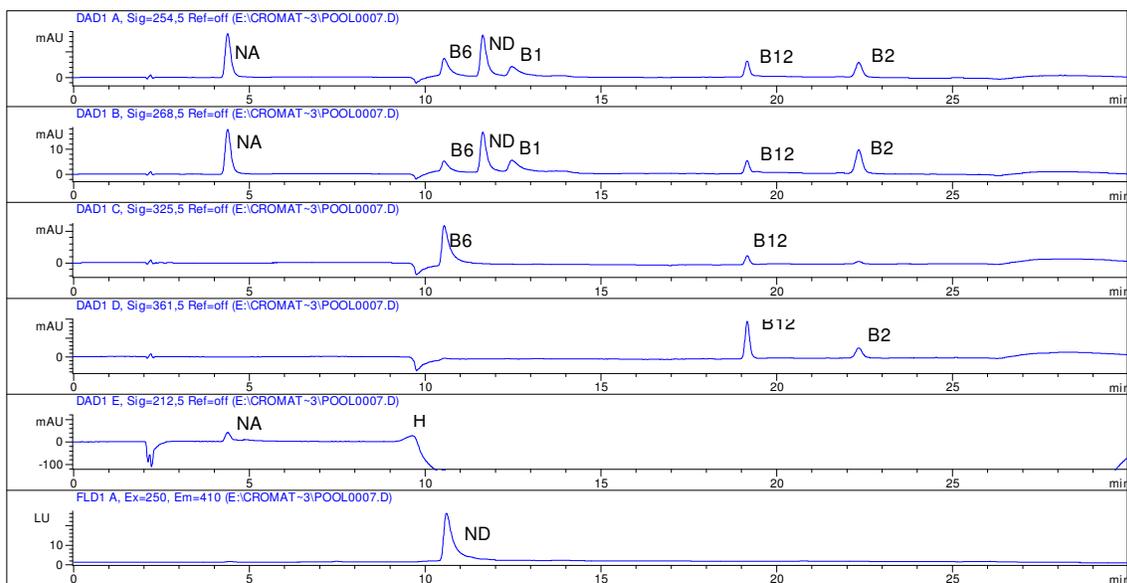


Figura 6 - Perfil cromatográfico dos padrões de B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, NA, ND e H  
 Condições cromatográficas:  
 Coluna analítica Nova-pak® C<sub>18</sub>, 4µm, 3,9 x 150mm  
 Fase móvel F da Tabela 2 (capítulo 3)  
 Vazão: 0,5mLmin<sup>-1</sup>

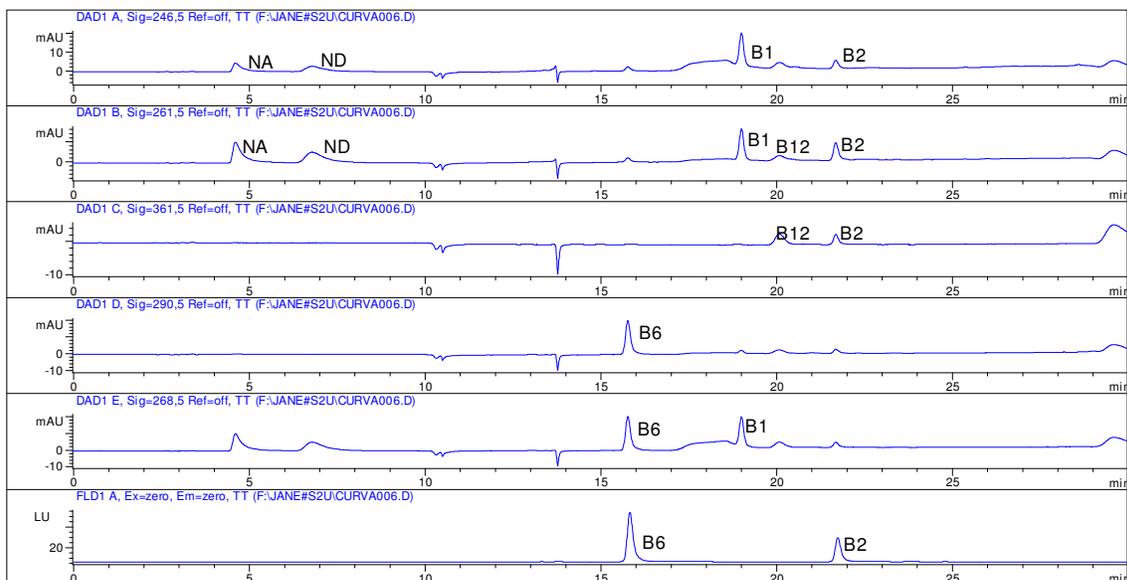


Figura 7 - Perfil cromatográfico dos padrões de B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, NA, ND  
 Condições cromatográficas:  
 Coluna analítica Nova-pak® C<sub>18</sub>, 4µm, 3,9 x 150mm  
 Fase móvel apresentada na Tabela 3 (capítulo 3)  
 Vazão: 0,5mLmin<sup>-1</sup>

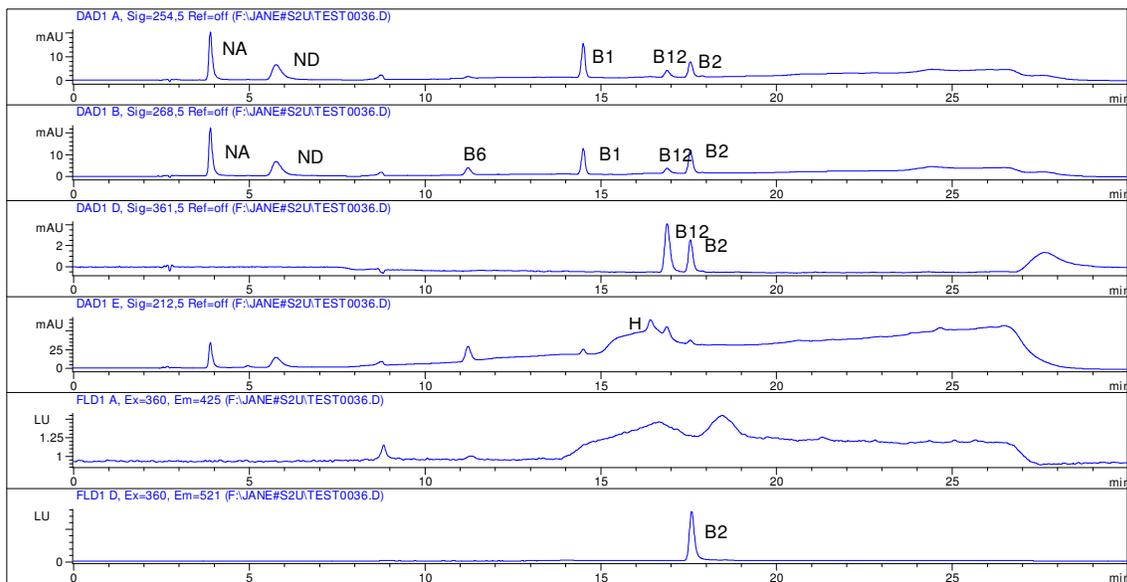


Figura 8 - Perfil cromatográfico dos padrões de B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, NA, ND e H  
 Condições cromatográficas:  
 Coluna analítica Vydac® C<sub>18</sub> 5µm, 4,6 x 250mm  
 Fase móvel apresentada na Tabela 3 (capítulo 3)  
 Vazão: 1mLmin<sup>-1</sup>

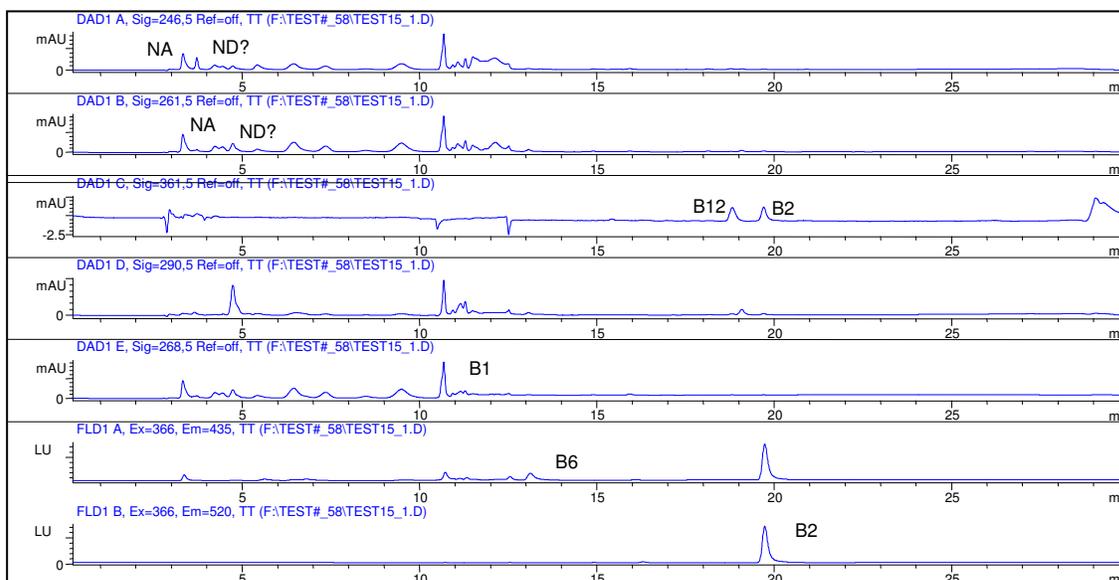


Figura 9 - Perfil cromatográfico de extrato de cogumelo adicionado de padrões das vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, . B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, NA, ND.  
 Condições cromatográficas:  
 Coluna analítica Nova-pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 4µm, 3,9 x 150mm  
 apresentada na Tabela 3 (capítulo 3)  
 Vazão: 0,5mLmin<sup>-1</sup>

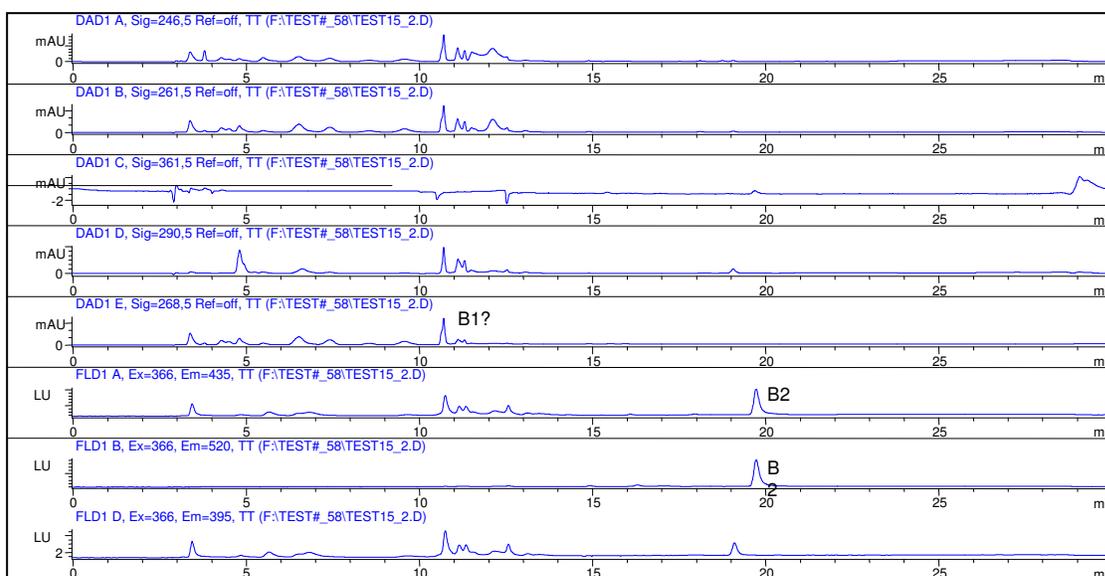


Figura 10 - Perfil cromatográfico de extrato de cogumelo  
 Condições cromatográficas:  
 Coluna analítica Nova-pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 4µm, 3,9 x 150mm  
 apresentada na Tabela 3 (capítulo 3)  
 Vazão: 0,5mLmin<sup>-1</sup>

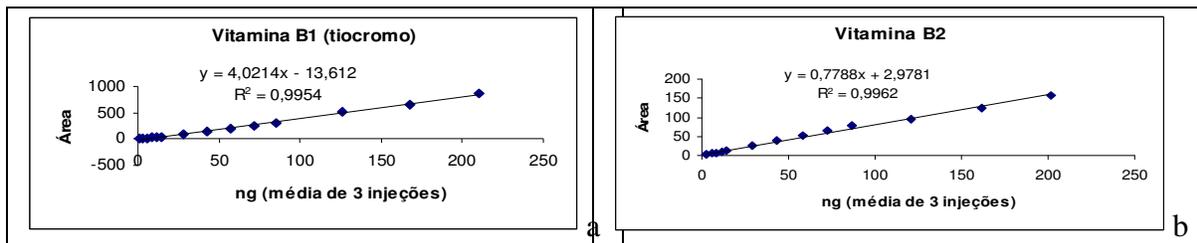


Figura 11: Curvas de calibração da vitamina B<sub>1</sub> (a) (tiocromo) e B<sub>2</sub> (b)

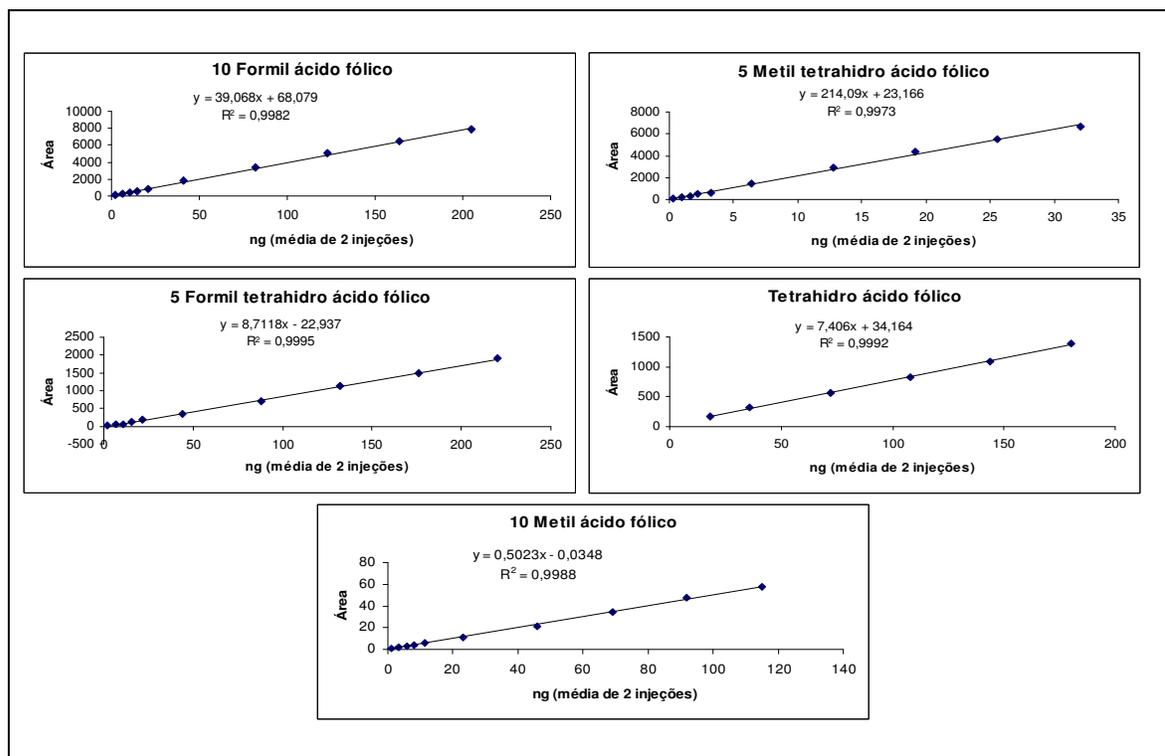


Figura 12: Curvas de calibração das diversas formas de folatos.