



# **Concentração de compostos fenólicos totais em Cogumelos da espécie *Pleurotus ostreatus* cultivados em substrato enriquecido com cascas de OVOS**

## **CONCENTRATION OF TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS IN PLEUROTUS OSTREATUS MUSHROOMS CULTIVATED ON SUBSTRATES ENRICHED WITH EGGSHELL**

**Priscila Caroline Galvan \***, **Francisco Menino Destéfánis Vítola †**,  
**Maria Eduarda Gnoatto Lemes‡**, **William Júnior Ribeiro dos Santos §**

### **RESUMO**

O desenvolvimento de novas aplicações para resíduos gerados pela produção avícola, como cascas de ovos, tem o potencial de gerar impacto econômico e ambiental na região do sudoeste do Paraná. O clima local é favorável para produção de cogumelos. Cogumelos acumulam metabolitos secundários, incluindo compostos fenólicos, colaborando para a sua atividade antioxidante, e necessitam de substratos adequados para o crescimento e desenvolvimento do corpo frutífero. Neste aspecto, o presente estudo visa analisar o efeito da substituição do calcário por cascas de ovos, em um substrato convencional para cultivo de *Pleurotus ostreatus*, sobre o conteúdo de compostos fenólicos totais dos cogumelos. Utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu adaptado para quantificação dos fenólicos totais em extratos dos cogumelos. O experimento não demonstrou alteração estatisticamente significativa na concentração de compostos fenólicos totais. Entretanto, levando-se em consideração os fenólicos como marcadores de estresse, os resultados sugerem que casca de ovo no substrato não apresenta toxicidade ou desbalanço nutricional para os mesmos. Este foi o primeiro trabalho desta linha de pesquisa, tendo a função de implementar uma metodologia que servirá para investigar a influência de diversos fatores sobre a concentração de fenólicos totais em cogumelos.

**Palavras-chave:** cogumelos, ovos, calcário, substrato, fenólicos

### **ABSTRACT**

The development of new applications for residues generated by poultry production, such as eggshells, has the potential to generate economic and environmental impact in the region of southwest of Paraná. The local climate is favorable for mushroom production. Mushrooms accumulate secondary metabolites, including phenolic compounds, contributing to their antioxidant activity, and demand substrates suitable for the growth and development of the fruiting body. The present study aims to analyze the effect of replacing limestone with eggshells, in a conventional substrate for cultivation of *Pleurotus ostreatus*, over the content of total phenolic compounds in mushrooms. Folin-Ciocalteu method was adapted for the quantification of total phenolics from mushroom extracts. The experiment did not show statistically significant variations in the concentration of total phenolic compounds. However, taking into account phenolics as stress markers, the results obtained show that eggshell in the substrate does not present toxicity or nutritional imbalance for mushrooms. The extracts showed stability, as there was no significant degradation during storage. This was the first experiment of this line of research, having the function of

\* Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, PR, Brasil  
[priscilagalvan84@gmail.com](mailto:priscilagalvan84@gmail.com)

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos; [franciscovitola@utfpr.edu.br](mailto:franciscovitola@utfpr.edu.br)

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; [marialemes@alunos.utfpr.edu.br](mailto:marialemes@alunos.utfpr.edu.br)

§ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; [william.2017@alunos.utfpr.edu.br](mailto:william.2017@alunos.utfpr.edu.br)

implementing a methodology that will serve to investigate the influence of several factors over the concentration of total phenolics in mushrooms.

**Keywords:** mushrooms, eggs, limestone, substrate, phenolics

## 1 INTRODUÇÃO

O sudoeste do Paraná é uma região com reconhecida produção avícola, com produtores espalhados em 399 municípios do estado, de pequenas e grandes granjas. Gerando grande quantidade de resíduos desta linha, novas aplicações para as cascas de ovos tem o potencial de gerar impacto econômico e ambiental na região. O clima local também é favorável para produção de cogumelos. Os substratos mais utilizados para o cultivo de cogumelos incluem subprodutos orgânicos; além de suplementos como calcário calcítico e gesso agrícola. Substratos enriquecidos corretamente podem auxiliar no crescimento e desenvolvimento do corpo frutífero do fungo (CHANG et al., 2018). Dentre os cogumelos, temos a espécie *Pleurotus ostreatus*, encontrada em diversas regiões do planeta, com faixa de temperatura média de cultivo entre 15 e 25 °C, que vem se mostrando de grande importância para a indústria, devido à sua facilidade de cultivo e escalabilidade (EGER et al., 1976).

Compostos fenólicos são substâncias químicas (moléculas) que possuem em sua estrutura um grupo hidroxila ligado a um anel benzênico que possibilitam a doação de elétrons (SOLOMONS et al., 2018). Possuem forte capacidade antioxidante, e são capazes de inibir a oxidação de lipídios e algumas outras moléculas, devido às suas propriedades óxido-redução (DEGÁSPARI et al., 2004).

Os cogumelos são uma fonte de nutrientes, minerais, aminoácidos essenciais, vitaminas e fibras, considerado um alimento de baixo nível energético. Acumulam uma grande quantidade de metabólitos secundários, incluindo compostos fenólicos, que colaboram para a sua atividade antioxidante (STEFANELLO et al., 2016). Devido a essa característica, os cogumelos podem ser usados como uma fonte natural de antioxidantes para suplementos alimentares e a indústria farmacêutica (SILVA et al., 2011). Os cogumelos são capazes de produzir enzimas que desencadeiam rotas metabólicas para suprir o fornecimento de novas fontes de nutrição, manutenção e defesa ao estresse do meio (os compostos fenólicos também podem ser vistos como marcadores de estresse em plantas, visto que são produzidos e acumulados em maior quantidade na presença de algumas substâncias tóxicas), resultando na formação de metabólitos complexos, podendo ser induzidos por moléculas simples e agressivas disponíveis no meio de cultivo (ZHONG et al., 2009; CHANG et al., 2018).

Neste aspecto, qual o efeito de se substituir o calcário, de um substrato convencional, por cascas de ovos, sobre a concentração de compostos fenólicos totais nos cogumelos. Em outras palavras, qual avaliação do poder indutor das cascas de ovos sobre a concentração de compostos fenólicos dos cogumelos? O objetivo final, além do aproveitamento do subproduto em questão, seria a obtenção de cogumelos mais ricos em antioxidantes, seja como um produto final, como fontes destas substâncias para purificação, ou mesmo como uma forma de reduzir a perecibilidade dos cogumelos. De forma indireta, também foi avaliada a toxicidade das cascas de ovos sobre o cultivo, considerando que as substâncias fenólicas podem ser consideradas marcadores de estresse.

## 2 PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS DA PESQUISA

As matérias-primas utilizadas no preparo do substrato foram: cascas de ovos de galinha, calcário calcítico (CaCO<sub>3</sub>), serragem de eucalipto e farelo de trigo. A espécie de cogumelo utilizada para o cultivo foi *Pleurotus*

*ostreatus* linhagem *Shimeji* cinza (PoP<sub>2</sub>), a cultura micelial pura foi adquirida da empresa Funghi e Flora, situada em Vinhedo/SP, e mantida em placas de Petri contendo meio BDA (ágar batata dextrosado); sendo conservada por refrigeração e transferências periódicas para meio de cultivo fresco.

Os substratos foram preparados à base de serragem de eucalipto, suplementada com farelo de trigo, sendo divididos em dois grupos: um com calcário e outro com casca de ovo seca e triturada em pó, conforme descrito no Quadro 1. A serragem foi deixada submersa em água corrente (24 h) e o excesso de umidade foi escorrido com uma peneira agrícola. Logo após, a serragem úmida foi pesada e foram misturadas as suplementações de ovo e de calcário em cada grupo (2%), mais 10% de farelo de trigo em ambos — percentagens estas em relação à massa original de serragem úmida. Após homogeneização, o material foi ensacado (sacos de polipropileno 17 × 25 cm com 6 micras de espessura e filtro adaptado) e autoclavado (40 min, 120 °C, 1 atm.). Os micélios foram transferidos para os sacos com substratos na câmara de fluxo laminar. O tempo de incubação foi de 30 dias para miceliação (25 °C) no escuro. Após este período, os sacos com substrato miceliado foram transferidos para outro ambiente, para indução da frutificação: sob fotoperíodo e iluminação indireta, os sacos foram perfurados e água corrente foi borrifada nos mesmos duas vezes ao dia. Os cogumelos frutificados foram colhidos e, em seguida, congelados.

**Quadro 1 – Composição do substrato**

Substrato	Serragem de eucalipto (g)	Farelo de trigo (g)	Suplemento (6 g)
1	300	30	CaCO <sub>3</sub>
2	300	30	casca de ovo

Fonte: Autoria própria (2021).

Para o preparo dos extratos as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, secas em estufa de secagem (50 °C) e trituradas até pó com o auxílio de um liquidificador. Inicialmente foi adicionado em cinco frascos Erlenmeyer (125mL): água destilada (20 ml em cada), mais amostra triturada do cogumelo (1 g em cada), os vidros foram identificados e levados para uma incubadora com agitação orbital (40 min) em velocidade de 100 rpm (23,3 °C), suspendendo as partículas sólidas, colocando assim o material em contato com o solvente. As amostras foram transferidas para tubos Falcon (50 ml), enumeradas e encaminhadas para centrifuga, sendo processadas em velocidade de 4 000 rpm (10 min) para separação da parte sólida da líquida. O sobrenadante aquoso foi recuperado e transferido para tubos Falcon (15 ml). Todos os tubos assim como os cinco frascos Erlenmeyer utilizados foram envoltos com papel alumínio, durante todo o processo para que a extração fosse realizada na ausência de luz. Todas as medições foram realizadas em balança analítica e provetas e todos os recipientes foram identificados. A metodologia utilizada para quantificação dos fenólicos totais foi adaptada de Ribeiro et al. (2013). As soluções de reação de Folin-Ciocalteu (FC) foram preparadas com os extratos de cogumelos (250 µL) misturados com (250 µL) o reagente de FC diluído (água destilada, 1: 1 v/v), em tubos Falcon (15 mL), mais uma solução saturada de carbonato de sódio (500 µL) e água destilada (4 mL). Após 25 min de repouso, a mistura foi centrifugada por 10 min a 3000 rpm (1638 g). Para leitura da absorbância em espectrofotômetro (725 nm), foi necessária uma diluição prévia das amostras (água destilada, 1: 3 v/v). Realizou-se duas leituras de absorbância, após a primeira leitura as amostras foram mantidas refrigeradas, a segunda após o intervalo de duas semanas. Para comparação dos resultados entre calcário e ovo, antes e depois do armazenamento, foi realizado o “teste-t”, com um nível de significância de 95% (P<0,05).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Absorbâncias

O Quadro 2 mostra as leituras de absorbância dos produtos da reação de FC, no momento da extração (absorbância 1) e após intervalo de duas semanas (absorbância 2) com os extratos armazenados sob refrigeração (10 °C). O valor de absorbância tem uma relação de proporcionalidade direta com o teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos. Porém, não foi possível realizar a curva, padrão, para determinação da concentração absoluta de compostos fenólicos. Entretanto, isto não impediu uma estimativa do efeito da variação no substrato sobre o conteúdo de compostos fenólicos dos cogumelos, de forma quantitativa (apenas para efeito de comparação interna). Logo, os resultados não podem ser comparados com dados externos, mas mantêm a validade da comparação entre si.

**Quadro 2 – Análise espectrofotométrica**

<b>Amostras</b>	<b>Absorbância 1</b>	<b>Absorbância 2</b>	<b>Suplemento</b>
1	0,459	0,369	CaCO <sub>3</sub>
2	0,380	0,298	CaCO <sub>3</sub>
3	0,496	0,389	CaCO <sub>3</sub>
4	0,433	0,333	Ovo
5	0,378	0,368	Ovo

Fonte: Autoria própria (2021).

#### 3.2 Resultado teste-t

Comparando os suplementos utilizados conforme Quadro 3, entre os resultados do teste t não pareado a média do grupo CaCO<sub>3</sub> menos o grupo de casca de ovo é igual a 16,25 com intervalo de confiança de 95%, o valor P bicaudal é de 0,9288, e pelos critérios convencionais, essa diferença não é considerada estatisticamente significativa. Em relação aos resultados do teste t pareado a média de um grupo menos o outro é de -143,67 com intervalo de confiança de 95%, o valor P bicaudal é de 0,6389 essa diferença também não é considerada estatisticamente significativa.

### 4 CONCLUSÃO

O presente estudo mostra que a alteração no substrato não resultou em alterações estatisticamente significativas na concentração de compostos fenólicos totais para um nível de significância de 95%, nos extratos de cogumelos, pelos critérios do teste-t. Ao se analisar a concentração de compostos fenólicos totais presentes nos extratos, pode-se concluir que não ocorreu degradação significativa ( $p > 0.05$ ), mantendo-se estáveis no armazenamento. Novas variações no substrato podem ser testadas, buscando o aumento na concentração de compostos fenólicos, incluindo materiais de origem vegetal, dado que são as principais fontes de fenóis presentes na alimentação humana e na indústria, em geral (ANGELO, 2006). Porém, levando-se em consideração os fenólicos como marcadores de estresse, os resultados sugerem que a casca de ovo no substrato não apresentou toxicidade ou desbalanço nutricional para os cogumelos. Este foi o primeiro trabalho desta

linha de pesquisa, tendo a função de implementar uma metodologia que servirá para investigar a influência de diversos fatores sobre a concentração de fenólicos totais em cogumelos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, a DIREC de Dois Vizinhos, essenciais para a realização do projeto. Ao orientador Prof. Francisco M. D. Vítola, primordial para desenvolvimento do mesmo, aos meus colegas de projeto, e as Prof<sup>as</sup>. Dr<sup>as</sup>. Paula F. Montagner e Magali F. da Silveira pelos reagentes cedidos.

## REFERÊNCIAS

- CHANG, S. T. WASSER, S. P. **Current and Future Research Trends in Agricultural and Biomedical Applications of Medicinal Mushrooms and Mushroom Products** (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms* V. 20, Ed. 12, Pg. 1121-1133, 2018.
- EGER, G., EDEN, G. & WISSIG, E. ***Pleurotus ostreatus* – breeding potential of a new cultivated mushroom**. *Theoretical and Applied Genetics* 47: 155–163, 1976.
- SOLOMONS, T.W. Graham *et al.* **Química Orgânica**. 12. Ed. 656 p. Rio de Janeiro: Ltc, 2018.
- DEGÁSPARI, Cláudia Helena *et al.* **Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos**. *Visão Acadêmica*, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-8, 30 jun. 2004. Universidade Federal do Paraná.
- STEFANELLO, Flávia Santi *et al.* **Efeito da extração de compostos fenólicos sobre a atividade antioxidante e antibacteriana in vitro de cogumelo-do-sol**. *Arquivos do Instituto Biológico*, [S.L.], v. 83, p. 1-7, ago. 2016. DOI: 10.1590/1808-1657000522014.
- SILVA, Ana Carolina da *et al.* **Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes**. 2011. 10 f. Universidade Estadual Paulista J.M.F., São Paulo, 2011.
- ZHONG, J. J. *et al.* **Secondary Metabolites from Higher Fungi: Discovery, Bioactivity, and Bioproduction**. *Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology*, V. 113, Pg. 79-150, 2009.
- RIBEIRO, Alessandra B. *et al.* **Antioxidant Capacity, Total Phenolic Content, Fatty Acids and Correlation by Principal Component Analysis of Exotic and Native Fruits from Brazil**. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, [S.L.], v. 24, n. 5, p. 1-8, 2013. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).
- ANGELO, Priscila Milene. **Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão**. 2006. 9 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas Unesp, São José do Rio Preto, 2006.