DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE ERGOSTEROL DE BIOMASSA FÚNGICA

Tayna Cris Silva (Fundação Araucária), Maria Fabiana Sirino de Campos, Nelci Catarina Chiquetto, Mareci Mendes de Almeida (Orientador), e-mail: marecimal@yahoo.com.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Engenharia de Alimentos.

Ciência e Tecnologia de Alimentos e Ciência de Alimentos.

Palavras-chave: Espectrofotometria, Fermentação no estado sólido, *A. oryzae*.

Resumo

A concentração do ergosterol em fungo é dependente do estágio de seu desenvolvimento. Esse é um componente celular que pode ser utilizado para a determinação indireta de biomassa fúngica. O objetivo deste trabalho foi a validação da metodologia para extração de ergosterol de biomassa fúngica obtida por fermentação no estado sólido. A validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos. O método adaptado para extração obteve êxito e foi validado, sendo este apropriado para a finalidade pretendida.

Introdução

O ergosterol é um constituinte natural das membranas miceliais, a sua concentração no micélio é dependente do estágio de desenvolvimento do fungo. A quantificação do ergosterol pode ser utilizada para a determinação indireta de biomassa fúngica (RAHYMI-VERKI et. al., 2016).

A fermentação no estado sólido (FES) pode ser definida como uma técnica de crescimento de micro-organismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas (SCHRODER, 2015). O objetivo deste trabalho é a validação da metodologia para extração de ergosterol de biomassa fúngica obtida por fermentação no estado sólido.

A validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos (ANVISA, 2017).

Materiais e Métodos

Fermentação em estado sólido, preparo da biomassa e extração do ergosterol

Para a fermentação no estado sólido foi utilizado o método descrito por Schroder (2015), Foi utilizado como substrato o resíduo do processamento dos frutos da palmeira juçara, sendo inoculada uma suspensão de 10^8 conídios mL^{-1} do fungo *Aspergillus oryzae* ATCC 11488. Como fermentadores foram utilizados erlenmeyers que foram incubados a 28°C, por 120 horas. Após o tempo de crescimento foi adicionados 60 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7. Após 1 hora foi filtrado em tecido cirúrgico separando a biomassa e o filtrado.

A biomassa passou por uma etapa de secagem em estufa a 45ºC. Após a secagem as amostras foram trituradas e peneiradas (20 mesh). Para a extração do ergosterol foi utilizada a metodologia modificada descrita por Mokochiski et al. (2015), obtendo-se o analito.

Seletividade

A análise da solução padrão e analito foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis na faixa entre 250 a 300 nm para identificar o comprimento de onda de máxima absorção.

Curva padrão e linearidade/faixa linear de trabalho/sensibilidade

Para a curva padrão de ergosterol foi utilizado o método descrito por Gutarowska e Zakowska (2002). A linearidade foi avaliada na faixa de concentração de 5 a 50µg mL^{-1} utilizada para construção de cinco curvas padrão, obtidas em seis níveis de concentração. O coeficiente de correlação foi obtido através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, os resultados foram analisados estatisticamente para definir o coeficiente de determinação (valor mínimo R^2 = 0,992).

Exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A exatidão do método foi avaliada pela adição e recuperação de padrão em triplicata adicionado à matriz isenta de padrão. Foram feitas análises para verificar a recuperação de ergosterol do método modificado descrita por Mokochiski et al. (2015). A exatidão foi expressa, conforme a Equação 1.

$$Exatidão = \left[\frac{Concentração\ média\ experimental}{Concentração\ teórica} \right] x\ 100 \qquad (1)$$

O cálculo para determinar os valores correspondentes ao LD e LQ, foi baseado no desvio padrão da resposta do branco e sua relação com a inclinação da reta (coeficiente angular) na curva analítica, seguindo as equações 2 e 3:

LD = (s/b) * 3,3 (2)

LQ = (s/b) * 10 (3)

Onde: s: desvio padrão da resposta do branco;
b: valor da inclinação da curva analítica.

Precisão e robustez

Para a precisão foram analisados três níveis de concentrações: 10, 30 e 40 µg mL^{-1} de ergosterol, em triplicata. A repetibilidade foi realizada no mesmo dia e nas mesmas condições de análise, enquanto a precisão intermediária foi realizada em intervalos de 48 horas e com analistas distintos.

A robustez do método foi verificada pela variação de equipamento (BEL photonics UV-2000 Spectrophotometer e UVmini-1240 UV-VIS spectrophotometers SHIMADZU) e pelos valores de absorbância encontrados no espectrofotômetro UV-Vis na faixa entre 250 a 300 nm.

Resultados e Discussão

A seletividade do método foi comprovada através da detecção do pico de ergosterol com absorção em 282nm (Figura 1). Segundo Carvalho (2004) esse comprimento de onda é considerado o maior pico de absorbância para o composto. O mesmo espectro de absorção foi utilizado por Gutarowska e Zakowska (2002).

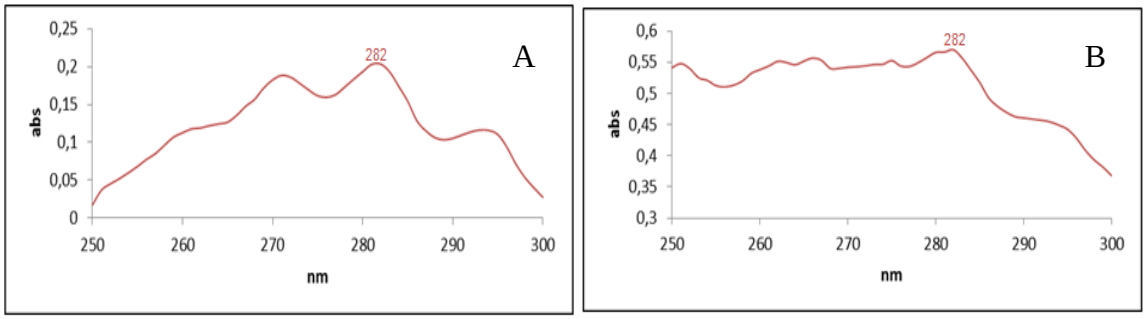


Figura 1 - Espectros do pico de absorbância a 282 nm do padrão (A) e do analito (B).

Os dados obtidos de absorbância para soluções padronizadas de ergosterol possibilitaram a obtenção da curva de calibração y=0,0174x+0,0177 e coeficiente de correlação linear de R^2 = 0,992 foi verificada a linearidade do mesmo, obedecendo ao parâmetro de aceitação da linearidade. A análise de variância (ANOVA) avaliou a qualidade do ajuste do modelo linear. A análise dos dados da linearidade demonstrou ser a regressão altamente significativa, uma vez que, os valores de F calculados foram menores do que os valores de F críticos ao nível de 95% de confiança.

Para a exatidão a recuperação de ergosterol fornecida pelo método foi estimada em 66%, sendo uma boa exatidão comparada com a metodologia de extração de Carvalho que (2004) obteve valor de 10% de recuperação de ergosterol.

Os valores obtidos para os LD e LQ foram 0,50 e 1,54 µg/mL, respectivamente. Com esses resultados foi verificado que o método possui alta sensibilidade para detectar e quantificar a amostra.

A Tabela 1 apresenta os resultados para os testes de repetibilidade e precisão intermediária, demonstrando a precisão do método tendo CV% abaixo de 5%. Os dados obtidos nos diferentes dias e analistas para cada concentração investigada foram submetidos ao teste t de Student e não foi observada diferença estatística entre os diferentes conjuntos de medidas realizadas ($p < 0,05$).

Tabela 1 – Resultados obtidos para as análises de repetibilidade e precisão intermediária.

	Repetibilidade		Precisão intermediária		
Concentração ($\mu g.mL^{-1}$)	Média ± DP ($\mu g.mL^{-1}$)	CV (%)	Média ± DP ($\mu g.mL^{-1}$)	CV (%)	Teste t de Student (p)
10	13,93 ± 1,84	4,38	12,16 ± 0,29	2,42	0,349
30	26,70 ± 1,02	3,83	25,94 ± 1,09	4,22	0,426
40	41,99 ± 0,55	3,94	42,80 ± 0,14	0,34	0,529

CV = coeficiente de variação; DP= desvio padrão.

Por fim, para a robustez foi observado que a especificidade do método não foi modificada, sendo encontrados valores próximos de absorbância do ergosterol no comprimento de onda de 282nm. Ao ser realizada a varredura no Espectrômetro UV-VIS foi obtido altos valores de absorbância em pequenas variações do valor do pico do comprimento de onda.

Conclusões

O método adaptado para extração por espectrofotometria obteve êxito e foi validado, sendo este apropriado para a finalidade pretendida de quantificar o ergosterol em biomassa fúngica obtida por fermentação no estado sólido.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, a Dra. Mareci Mendes de Almeida, aos meus pais. A Fundação Araucária pelo auxílio financeiro concedido e as minhas amigas e colegas da graduação.

Referências

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Critérios para a validação de métodos analíticos. RDC - Resolução da Diretoria Colegiada, de 11 de julho de 2017.

CARVALHO, J.C. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de pigmentos a partir de *Monascus* por fermentação em substrato sólido**. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

GUTAROWSKA, B.; ZAKOWSKA, Z. Elaboration and application of mathematical model for estimation ofmould contamination of some building materials based on ergosterol content determination. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v.49 p.299 – 305, 2002.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Analíticos, DOQ-CGCRE-008, agosto de 2016.

MOKOCHINSKI, J. B.; SOVRANI, V.; SANTA, H. S. D et. al. Biomass and sterol production from vegetal substrate fermatation using agaricus brasiliensis. **Journal of Food Quality**. p.221 – 229, 2015.

RAHIMI-VERKI, N.; SHAPOORZADEHB, A.; RAZZAGHI-ABYANEHA, M. et al. Cold atmospheric plasma inhibits the growth of *Candida albicans* by affecting ergosterol biosynthesis and suppresses the fungal virulence factors in vitro. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v.13 p.66–72, 2016.

SCHRODER, M. A. **Produção de lipase a partir dos resíduos de processamento dos frutos de palmeira juçara por fermentação no estão sólido**. 2015. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

SEITZ, L.M., SAUER, D.B., BURROUGHS, R. et al. Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**. v.69, p.1202–1203, 1979.