

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CENTRO TECNOLÓGICO

**Obtenção de Extrato de Cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*)
com CO₂ a Alta Pressão**

Cíntia Sorane Good Kitzberger

Prof^a Dr^a Sandra Regina Salvador Ferreira
Orientadora

Florianópolis, SC
Fevereiro de 2005.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CENTRO TECNOLÓGICO**

**Obtenção de Extrato de Cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*)
com CO₂ a Alta Pressão**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos.

Cíntia Sorane Good Kitzberger

Prof^a Dr^a Sandra Regina Salvador Ferreira

Orientadora

Florianópolis, SC

Fevereiro de 2005

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Autor da Vida, meu Senhor e Salvador, que me abriu esta porta.

À Prof^a. Sandra Regina Salvador Ferreira, pela orientação, estímulo e amizade que foram de grande importância para a realização deste trabalho.

Ao Prof^o. Haiko Hense, por sua colaboração.

Ao Departamento de Eng. Química e Eng. de Alimentos, pelo apoio.

A CAPES pelo suporte financeiro.

Ao Prof^o. Arthur Esmânia Junior, pelas análises antimicrobianas realizadas.

À Prof^a. Rozângela Curi Pedrosa, pelas análises antioxidantes realizadas.

Aos amigos do LATESC, Eliane, Luanda, Aziza, Gabriela Jahn, Fernanda, Cláudia, Alexandre, Danielle, Gabriela Neves, Priscilla, Giandra, Fábio, Douglas, Rose e em especial ao Rodrigo pela parceria neste trabalho.

Aos meus pais Valdemar e Nadir e ao meu irmão Alan, pelo apoio, carinho e amor.

Aos meus amigos que não me deixaram olhar para trás Rui Petry e Luciane Blum.

A todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho, em especial a Wesley G. O. Leal pelas valiosas dicas, minha gratidão.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do comportamento de um fluido puro em um diagrama de fase P-T. (CANSELL et al., 2004).....	6
Figura 2 - Corpo de frutificação do cogumelo Shiitake.....	18
Figura 3 - Foto da unidade de extração 1.....	31
Figura 4 - Esquema da unidade de extração 1.....	32
Figura 5 - Foto da unidade de extração 2.....	34
Figura 6 - Esquema da unidade de extração 2.....	34
Figura 7 – Matéria-prima utilizada para as extrações.....	35
Figura 8 - Fluxograma da extração convencional.....	40
Figura 9 – Esquema da análise de DPPH.....	44
Figura 10 – Esquema ilustrando as etapas do método de difusão em agar.....	46
Figura 11– Micrografia de partículas de shiitake com um aumento de 100 x.....	49
Figura 12– Micrografia de partículas de shiitake com um aumento de 200 x.....	49
Figura 13 - Efeito da pressão no rendimento da ESC a temperatura constante: rendimento das isotermas a 30°C, 40°C e 50°C.....	52
Figura 14 – Efeito da vazão do solvente – Condição de operação: P= 250 bar, T= 40°C.....	54
Figura 15 – Efeito da pressão em 30°C, vazão de 3,33 g/min.....	54
Figura 16 – Efeito da pressão em 40°C, vazão de 3,33 g/min.....	56
Figura 17 – Efeito da pressão em 50°C, vazão de 3,33 g/min.....	57
Figura 18 – Efeito da Temperatura em 150 bar	58

Figura 19 – Efeito da Temperatura em 200 bar.....	58
Figura 20 - Efeito da Temperatura em 250 bar.....	58
Figura 21 - Efeito da Temperatura em 300 bar.....	59
Figura 22 - Dados experimentais e curvas resultadas dos modelos: 40°C, 300 bar e 3,33 g/min, modelada com o $x_0=0,0114$ e o $x_0=0,0116$ da curva.....	62
Figura 23 - Dados experimentais e curvas resultadas dos modelos: 50°C, 300 bar e 3,33 g/min, modelada com o $x_0=0,0118$ e o $x_0=0,0142$ da curva	63
Figura 24 - Curva de rendimento de extração utilizando três concentrações de co-solvente etanol.....	67
Figura 25 – Cromatograma obtido a 250 bar, 40°C, vazão de 3,33 g/min.....	67
Figura 26 – Cromatograma obtido a 50°C, 250 bar, vazão de 3,33 g/min.....	69
Figura 27 – Efeito da composição do óleo de cogumelo shiitake (40°C e 250 bar, 3,33 g/min).....	70
Figura 28 – Cromatograma obtido a 40°C e 150 bar, vazão de 3,33 g/min.....	72
Figura 29 – Cromatograma obtido a 40°C e 350 bar, vazão de 3,33 g/min.....	72
Figura 30 – Cromatograma obtido a 30°C e 300 bar, vazão de 3,33 g/min.....	72
Figura 31 – Cromatograma obtido a 50°C e 200 bar, vazão de 3,33 g/min.....	73
Figura 32 – Cromatograma do extrato de shiitake obtido com solvente diclorometano.....	73
Figura 33 – Cromatograma do extrato de shiitake obtido com solvente acetato de etila.....	76
Figura 34 - Atividade antioxidante dos extratos da ESC+co-solvente e ELL.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Solubilidade de compostos em CO ₂ líquido e supercrítico.....	10
Tabela 2 – Composição de ácidos graxos presentes em <i>Lentinula edodes</i>	20
Tabela 3 - Propriedades de alguns componentes do cogumelo shiitake.....	22
Tabela 4 - Caracterização do leite de partículas.....	50
Tabela 5 - Rendimentos e condições de operação da ESC a vazões de 3,33 g/min.....	51
Tabela 6 - Solubilidades experimentais para cogumelo shiitake.....	53
Tabela 7 - Parâmetros para a aplicação dos modelos de Sovová e Martinez.....	62
Tabela 8 - Erro médio quadrático.....	64
Tabela 9 - Rendimentos para diferentes técnicas de extração e solventes.....	65
Tabela 10 - Rendimentos das extrações usando etOH, DCM e AE como co-solventes a 40°C e 200 bar.....	67
Tabela 11 – Compostos identificados no óleo de shiitake nos extratos obtidos pela ESC e empregando a condição cromatográfica 1.....	71
Tabela 12 - Componentes identificados no óleo de shiitake para as amostras submetidas à condição cromatográfica 2.....	74
Tabela 13 – Compostos identificados no óleo de shiitake nos extratos obtidos por extração com solvente.....	77
Tabela 14 – Porcentagem de atividade antioxidante dos extratos e seus respectivos valores de EC ₅₀	78
Tabela 15 – Conteúdo de fenólicos totais em equivalentes de ácido tânico (EAT) expressos em g de EAT/100 g de extrato.....	81
Tabela 16 - Atividade antimicrobiana dos extratos de cogumelo shiitake.....	82
Tabela 17 – Valores de MIC dos extratos para os microrganismos testados.....	84

NOMENCLATURA

CER – índice referente à etapa de taxa constante de extração;

FER – índice referente à etapa de taxa decrescente de extração;

M_{CER} – taxa de extração na etapa CER, kg/s;

d_a – densidade aparente, g/cm³;

d_r – densidade real, g/cm³;

m_{extr} – massa de extrato obtida pelo modelo relativa a N, Kg_{extrato}/Kg_{sólido};

P – massa de soluto de fácil acesso, kg;

h – coordenada axial do extrator, m;

N – massa de sólido inerte, Kg;

J (X,Y) – taxa de transferência de massa, kg/m³ s;

k – parâmetro do modelo de Lack;

K – massa de soluto de difícil acesso, kg;

k_{Ya} – coeficiente de transferência de massa da fase fluida, s⁻¹;

k_{Xa} – coeficiente de transferência de massa na fase sólida, s⁻¹;

O – massa de soluto extraível, kg;

P – pressão, bar;

r_o – concentração adimensional da fase sólida considerando o teor inicial de soluto;

t – tempo, s;

t_{CER} – duração da etapa CER, s;

t_{FER} – período de taxa decrescente de extração, s;

Q_{CO_2} – vazão de solvente, kg/s;

U – velocidade superficial, m/s;

V – volume, ml;

X – razão mássica de soluto na fase sólida, g/g;

X_k – razão mássica de soluto de difícil acesso, g/g;

X_p – razão mássica de soluto de fácil acesso, g/g;

X_0 – Rendimento global de extrato, g/g

X_0 – razão mássica de soluto extraível, g_{soluto extraível}/g_{sólido inerte}.

y – razão mássica de soluto na fase solvente;

Y – concentração normalizada na fase solvente;

Y^* - concentração de equilíbrio, $\text{kg}_{\text{extrato}}/\text{kg}_{\text{CO}_2}$;

Y_{CER} – concentração de soluto na fase solvente na etapa CER, $\text{kg}_{\text{extrato}}/\text{kg}_{\text{CO}_2}$;

Z – parâmetro do período de extração rápida;

Z_w – coordenada adimensional da posição entre extração rápida e lenta.

EC_{50} – é a quantidade de extrato capaz fornecer 50% de inibição contra o reagente DPPH.

MIC – Mínima concentração inibitória.

FSC – Fluido supercrítico.

m_{siv} – massa de solvente.

$M_{\text{sól}}$ - massa de soluto.

RESUMO

A extração supercrítica (ESC) é uma tecnologia que vem se destacando dentre as demais extrações por sua seletividade e por empregar baixas temperaturas, produzir um extrato livre de resíduos de solventes, garantindo assim extratos de alta qualidade em compostos de interesse, além da técnica ser considerada segura para o meio ambiente. No processo de ESC a variação das condições de temperatura e pressão de operação permitem relacionar eficiência e condições ótimas de processo.

Levando-se em consideração as vantagens que a ESC oferece, o objetivo deste trabalho foi seu emprego na obtenção de extratos do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*) em diferentes temperaturas e pressões de operação e avaliar rendimento, composição, atividade antioxidante e antimicrobiana, além de comparar os resultados obtidos com a ESC CO₂ utilizando co-solventes e com a extração líquido-líquido (ELL). *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler é o segundo cogumelo mais largamente cultivado no mundo. É considerado boa fonte de nutrientes como proteínas, carboidratos, lipídeos, minerais e vitaminas. Dentre suas propriedades terapêuticas destacam-se a ação antitumoral, a ação hipocololesterolêmica, as atividades antifúngica e antimicrobiana, a redução do colesterol e a ação antioxidante. As condições de operação na ESC foram temperaturas de 30 a 50°C e pressões de 150 a 350 bar que forneceram rendimentos de 0,53 a 1,01%. Foram usados os co-solventes diclorometano, acetato de etila e etanol. A ELL empregou os seguintes solventes n-hexano, diclorometano, acetato de etila e água. Para a quantificação e identificação dos extratos da ESC e ELL foram realizadas, análises cromatográficas através da cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, sendo os principais componentes do shiitake os ácidos graxos como palmítico, linoléico e o ergosterol (pró-vitamina D). Os extratos da ELL e ESC com co-solvente apresentaram atividade antioxidante, com valores de EC₅₀ na faixa de 132,11 a 190,30 mg/mL. Para as análises antimicrobianas os extratos foram mais efetivos contra as bactérias *M. luteus* e *B. cereus*. Os valores de MIC ficaram em torno de 0,5 mg/mL para os extratos obtidos a 50°C e 150 bar e 30°C e 200 bar

contra *M. luteus* e de 0,25 mg/mL para o extrato 30°C e 300 bar contra *B. cereus*. Os modelos de SOVOVÁ (1994) e de Martinez (2003), que foram utilizados para descrever a curva de extração representaram adequadamente os dados experimentais para a ESC de cogumelo shiitake.

ABSTRACT

The supercritical fluid extraction (SFE) is a technology that detaches among other extraction techniques, due to its selectivity, the use of low temperatures, to produce an extract free of solvent residues, to guarantee high quality extracts related to compounds of interest and is considered environmentally safe. In the SFE the control of temperature and pressure relates efficiency with process optimization. Considering the SFE advantages, the objective of this work was to use the high pressure process to obtain extracts of the mushroom shiitake (*Lentinula edodes*) at different conditions of temperatures and pressures and compares the process yield, the extract composition, the antioxidant activity and the antimicrobial activity with other techniques such as SFE with co-solvent and with organic solvent extraction (LLE). *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler is the second widely cultivated mushroom in the world. It is considered good source of nutrients as protein, carbohydrates, lipids, mineral and vitamins. Among its therapeutic properties, the antitumoral action, the hipocololesterolemic action and the antifungic and antimicrobial activities are relevant, together with the reduction of cholesterol and the antioxidant action. The operating conditions in the SFE were 30 to 50°C and 150 to 350 bar, producing extraction yield of 0.53 to 1.01%. Dichloromethane, ethyl acetate and ethanol were used as co-solvent in the SFE. For the organic solvent extraction the following solvents were used: n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and water. The analyses of gas chromatography-mass spectrometry were used for the quantification and identification of the extracts from shiitake and the main components identified were: fat acids as palmitic, linoleic and the ergosterol (pró -vitamin D). The extracts of the LLE and SFE with co-solvent presented antioxidant activity, with values of EC50 in the range of 132.11 to 190.30 mg/mL. For the antimicrobial analyses the extracts were more effective against the *M. luteus* and *B. cereus*. The values of MIC stayed around 0,5 mg/mL for the extracts at 50°C and 150 bar and 30°C and 200 bar against *M. luteus* and of 0,25 mg/mL for the extract 30°C and 300 bar against *B. cereus*. The SOVOVÁ (1994) and the MARTINEZ et al. (2003) models, utilized for describe the curve of extraction represented adequately the experimental data for the SFE of mushroom shiitake.

Combati o bom combate, completei a carreira, guardei a fé.
II Timóteo 4:7

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS	iii
NOMENCLATURA	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. Introdução.....	2
2. Objetivo.....	5
2.1. Objetivos específicos.....	5
3. Revisão Bibliográfica.....	6
3.1.Extração Supercrítica.....	6
3.1.1. Fluidos Supercríticos.....	6
3.1.2. Inversão das isotermas.....	8
3.1.3. Seletividade e solubilidade.....	9
3.1.4. Emprego de co-solventes.....	11
3.1.5. Vantagens e aplicações da ESC.....	11
3.1.6. Curvas de extração.....	13
3.1.7. Modelagem matemática.....	15
3.2. Extrações convencionais.....	17
3.3. Shiitake (<i>Lentinula edodis</i>).....	18
3.3.1. Classificação taxonômica.....	18
3.3.2. Propriedades nutricionais.....	20
3.3.3. Propriedades medicinais.....	21
3.4. Atividade Antioxidante.....	24
3.4.1. Oxidação.....	24
3.4.2. Antioxidantes.....	25
3.4.3. Cogumelos.....	26
3.5. Atividade Antimicrobiana.....	27
4. Material e Métodos.....	30
4.1. Procedimento Experimental – ESC	31
4.1.2. Unidade de Extração.....	31
4.1.2.1. Equipamento de Extração 1.....	31
4.1.2.2. Equipamento de Extração 2.....	33

4.2.	Preparo da matéria-prima.....	35
4.3.	Caracterização do leito de partículas.....	36
4.3.1.	Microscopia Eletrônica de varredura (MEV).....	36
4.3.2.	Densidade Real do shiitake/Densidade Aparente.....	37
4.3.3.	Porosidade do leito de partículas.....	37
4.4.	Determinação da densidade do solvente.....	38
4.5.	Curvas de extração.....	38
4.6.	Determinação do rendimento total de óleo (X_0).....	39
4.7.	Determinação da solubilidade experimental.....	40
4.8.	Extração com solventes orgânicos (ELL).....	40
4.9.	Determinação da composição dos extratos.....	42
4.9.1.	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS).....	42
4.9.2.	Cromatografia gasosa (CG).....	43
4.10.	Determinação da atividade antioxidante dos extratos.....	43
4.10.1.	Método ensaio fotométrico DPPH.....	43
4.10.2.	Determinação do teor de fenólicos totais.....	45
4.11.	Determinação da atividade antimicrobiana e antifúngica dos extratos.....	46
4.11.1.	Método de difusão em agar.....	46
4.11.2.	Determinação da mínima concentração inibitória (MIC).....	47
5.	Resultados e discussão.....	49
5.1.	Testes preliminares.....	49
5.2.	Caracterização da matéria-prima.....	49
5.3.	ESC.....	51
5.3.1.	Cinética da extração.....	54
5.3.1.1.	Efeito da vazão do solvente.....	54
5.3.1.2.	Efeito da pressão.....	55
5.3.1.3.	Efeito da temperatura.....	57
5.3.2.	Modelagem matemática.....	60
5.3.2.1.	Determinação das variáveis do modelo.....	60
5.4.	Extração com solventes orgânicos (ELL).....	65
5.4.1.	Rendimento das extrações.....	65
5.5.	ESC e co-solvente.....	66
5.6.	Determinação da composição dos extratos.....	69

5.6.1. Composição dos extratos da ESC empregando a condição cromatográfica 1.....	69
5.6.2. Composição dos extratos da ESC empregando a condição cromatográfica 2.....	73
5.6.3. Determinação da composição dos extratos da ELL.....	77
5.7. Determinação da atividade antioxidante dos extratos.....	80
5.7.1. Método ensaio fotométrico DPPH.....	80
5.7.2. Determinação do teor de fenólicos totais.....	82
5.8. Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos.....	83
5.8.1. Método de difusão em ágar.....	83
5.8.2. Determinação da mínima concentração de inibição (MIC).....	86
6. Conclusão.....	89
7. Sugestões para trabalhos futuros.....	92
8. Referências Bibliográficas.....	93
9. Anexos.....	104
ANEXO I – PROPRIEDADES DOS CO ₂	104
ANEXO II – EQUAÇÕES PARA A APLICAÇÃO DO MODELO DESCRITO POR SOVOVÁ (1994).....	105
ANEXO III – EQUAÇÕES PARA A APLICAÇÃO DO MODELO DESCRITO POR MARTINÉZ et.al. (2003)	110
ANEXO IV – CURVA DE EXTRAÇÃO NAS CONDIÇÕES 30°C 150 BAR E 30°C E 200 BAR.....	112
ANEXO V – DADOS EXPERIMENTAIS DAS CURVAS DE EXTRAÇÃO	115
ANEXO VI – RESULTADOS DAS CURVAS AJUSTADAS PELO SAS.....	117
ANEXO VII – CURVA DE RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO COM DICLOROMETANO COMO CO-SOLVENTE.....	123
ANEXO VIII – CROMATOGRAMAS EXTRATOS DE SHIITAKE OBTIDOS NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO.....	124
ANEXO IX – ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO DE SHIITAKE.....	126
ANEXO X – CURVA PADRÃO DE ÁCIDO TÂNICO EMPREGADA NA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS.....	128

1. Introdução

Cerca de 25% dos fármacos empregados atualmente advêm direta ou indiretamente de produtos naturais, especialmente de plantas. Entretanto, nas últimas décadas, os fármacos de origem natural que apareceram no mercado são, em maior proporção, provenientes de pesquisas científicas realizadas na China, na Coreia e no Japão, sendo que a contribuição dos países ocidentais neste período foi bem menor (YUNES & CECHINEL-FILHO, 2001).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado de 350.000 a 550.000 espécies. A diversidade biológica brasileira não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos (NODARI & GUERRA, 2000).

Atualmente, existem inúmeras pesquisas em busca de moléculas ativas presentes em plantas, organismos marinhos, insetos e microrganismos. No ano de 1992, das 42 novas moléculas descobertas com importante atividade biológica, 18 eram oriundas de produtos naturais ou derivados (YUNES & CECHINEL-FILHO, 2001). Dentre os inúmeros produtos naturais citamos o lentinan, um polissacarídeo com atividade antitumoral obtido do cogumelo *Lentinula edodes*, triterpenóides com ação imunomoduladora isolados de *Ganoderma lucidum* (ROWAN et al., 2002; CHIHARA et al., 1970).

O cogumelo shiitake se enquadra taxonomicamente na classe dos Basidiomicetos que constituem aproximadamente 20.300 espécies, identificadas em 1.037 gêneros e 112 famílias. Esta classe vem sendo reconhecida por suas propriedades terapêuticas por milênios na China, Coreia e Japão (SMÂNIA, 2003).

Cogumelos têm recentemente se tornado atrativo como alimento funcional e como fonte de agentes terapêuticos. Por seus altos níveis de proteínas seu consumo tem sido indicado para casos de altas deficiências nutricionais.

Ademais, cogumelos têm sido incorporados na dieta como tônicos, chás, sopas e pratos saudáveis, bem como em fórmulas. Shiitake (*Lentinula edodes*) é o segundo cogumelo comestível mais popular no mercado global. Vários componentes bioativos importantes tais como proteínas, lipídeos (principalmente ácido linoléico), carboidratos, fibras, minerais, vitaminas (B1, B2 e C) e ergosterol têm sido isolados deste fungo (SUGUI et al., 2003).

Dentre as propriedades terapêuticas do cogumelo shiitake destacam-se a ação antitumoral (ROWAN et al., 2002; HATVANI, 2001; CHIHARA et al., 1970; SUGUI et al., 2003; LIU et al., 1997), a ação hipocololesterolêmica (SUGUIYAMA et al., 1995; MANZI & PIZZOFERATTO, 2000), as atividades antifúngica e antimicrobiana (HATVANI, 2001; ISHIKAWA, et al., 2001), a redução do colesterol (SHIMADA, et al., 2003) e a ação antioxidante (CHEUNG et al., 2003; MATILLA et al., 2001).

Esses compostos de interesse encontram-se normalmente nos extratos dos produtos naturais e várias técnicas de extração vêm sendo desenvolvidas e testadas a fim de isolar substâncias a partir de produtos naturais, dentre elas tem-se destaque a extração supercrítica que fornece extratos livres de resíduos de solventes e por empregar baixas temperaturas de extração, preservando componentes termossensíveis, o que consiste em uma vantagem sobre a técnica de extração com solventes orgânicos (ZANCAN et al., 2002; VÁGLI et al., 2005; ESMELINDRO et al., 2004).

Dentre os fluidos supercríticos empregados o CO₂ (dióxido de carbono) vem sendo o mais comumente usado por apresentar características especiais em comparação com outros fluidos supercríticos como etano, óxido nitroso e água. Dentre suas principais características destaca-se a atoxicidade, não-inflamabilidade, facilidade de recuperação do soluto, entre outras (LANÇAS, 2000; MAUL, 1999; CARRILHO et al., 2001; MUKHOPADHYAY, 2000).

Assim o presente trabalho tem como objetivo principal estudar o emprego do processo de extração supercrítica na obtenção dos extratos de cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*). Este estudo visa avaliar a composição dos extratos obtidos nas condições de operação empregadas e compará-los com os obtidos

por métodos convencionais de extração, e mediante a técnica a alta pressão com o emprego de co-solventes. Para os extratos obtidos também foram realizadas análises de atividade antioxidante e antimicrobiana a fim de validar e comparar as técnicas de extração utilizadas.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho é a obtenção de dados da extração supercrítica de extrato de Shiitake (*Lentinula edodes*) e avaliação das propriedades dos extratos.

2.1. Objetivos específicos

- Definição de temperatura e pressão de operação para maior rendimento em compostos de interesse.
- Avaliação do efeito de temperatura e pressão no rendimento e composição dos extratos.
- Comparar a ESC com extração convencional em termos de:
 - Rendimento das diferentes frações obtidas com diferentes solventes orgânicos.
 - Perfil de composição dos extratos.
- Estudo da composição dos extratos e suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas.
- Seleção do solvente com os melhores resultados de composição e propriedades antioxidantes e antimicrobianas para emprego como co-solventes.
- Otimização do processo pelo estudo dos parâmetros de processo
 - Aplicação dos modelos de transferência de massa SOVOVÁ (1994) e MARTÍNEZ et al.(2003).

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Extração Supercrítica

A extração supercrítica (ESC) é uma tecnologia de interesse para a indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica, pois se destaca como uma tecnologia alternativa aos processos convencionais, tais como extração com solventes orgânicos e a destilação a vapor, que utilizam altas temperaturas de extração causando a degradação de compostos termolábeis e um extrato com presença de resíduos de solvente (ZANCAN et al., 2002; VÁGI et al., 2005; ESMELINDRO et al., 2004). Estas técnicas oferecem poucos parâmetros de processo que permitem o controle da seletividade da extração. A ESC, em contrapartida destaca-se por empregar baixas temperaturas, produzir um extrato livre de resíduos de solventes e possibilitar fácil controle da seletividade pelo ajuste de temperatura e pressão de operação. Estas características vêm fazendo com que a ESC ganhe espaço principalmente devido a fatores ambientais e de qualidade envolvidos (LANG & WAI, 2001; PEREIRA et al., 2004; MAUL, 1999).

A crescente demanda por produtos naturais vem contribuindo para o desenvolvimento de pesquisas que exploram as atividades terapêuticas das espécies medicinais, dentre elas o gengibre utilizado pelos asiáticos contra doenças cardiovasculares e motoras e como antiinflamatório (ZANCAN et al., 2002); o mate com propriedades antiinflamatórias, anti-reumáticas, estimulante e diurética (ESMELINDRO et al., 2004); o óleo essencial de orégano com comprovada atividade antioxidante e antimicrobiana contra bactérias e fungos (VÁGI et al., 2005), a cavalinha, com ação diurética e no tratamento de diarreias (MICHIELIN et al., 2004) e a calêndula utilizada para tratamento de doenças da pele e como antiinflamatório (CAMPOS et al., 2005).

3.1.1. Fluidos supercríticos

Quando uma substância é elevada acima de sua temperatura (T_c) e pressão (P_c) crítica esta passa para uma condição chamada de "o estado fluido supercrítico". A temperatura crítica é a temperatura mais alta, na qual o gás pode

ser convertido em líquido pelo aumento da pressão. A pressão crítica é definida como a pressão mais elevada na qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura do líquido. É um estado no qual as características do fluido supercrítico são intermediárias entre o líquido e o gasoso em que o fluido se encontra. A Figura 1 mostra o comportamento de um fluido no diagrama de fases onde as regiões de gás, sólido, líquido e fluido supercrítico são apresentadas para o dióxido de carbono.

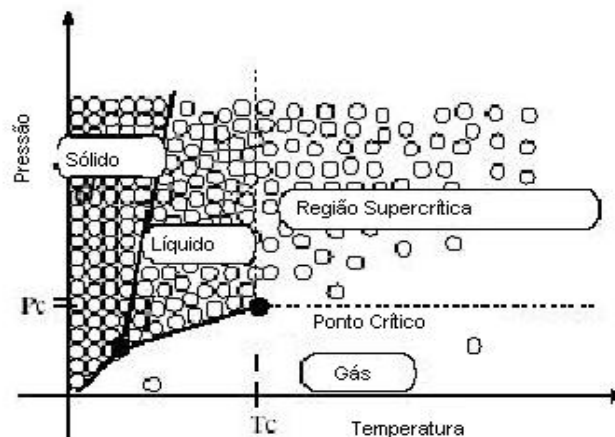


Figura 1 - Representação esquemática do comportamento de um fluido puro em um diagrama de fase P-T. (CANSELL et al., 2004).

Nessas condições, o fluido é relativamente denso comparado com um gás convencional e as forças de solubilização são mais intensas. Ao se elevar a pressão e a temperatura de um gás ou líquido altera-se o estado de agregação e, como consequência, modifica-se as propriedades da substância de interesse. Esta alteração do estado de agregação em função da mudança na pressão e temperatura de um gás ou líquido conduz a uma mudança na densidade e no poder de solvatação, o que modifica o comportamento químico da substância (LANÇAS, 2000; MAUL, 1999; CARRILHO et al., 2001).

Fluidos supercríticos possuem propriedades de gases e de líquidos:

- A alta compressibilidade é semelhante a um gás;

- O poder de dissolução de solutos é alto como de um líquido (quando suficientemente comprimidos);
- A viscosidade é baixa como a de um gás (produzindo baixas quedas de pressão em colunas de mercúrio);
- A difusão é intermediária entre gases e líquidos, variando com a sua densidade (MAUL, 1999; MUKHOPADHYAY, 2000).

Propriedades como densidade, viscosidade e difusividade podem ser observadas na tabela A1 na seção Anexos I, que compara valores para líquidos, gases e fluidos supercríticos. Pode-se notar que a densidade é comparável com a de líquidos, a viscosidade comparável à de gases e a difusividade possui valor uma ordem de magnitude maior que a de líquidos. Essas propriedades valorizam o poder de solvatação dos fluidos supercríticos em relação ao estado gasoso e aumentam a taxa de transferência de massa em relação aos solventes líquidos.

O solvente mais utilizado para a ESC de produtos naturais para alimentos e fármacos é o dióxido de carbono (CO_2). O CO_2 tem a vantagem de ser inerte, relativamente barato, facilmente disponível em alta pureza, sem odor, ambientalmente seguro, e GRAS (Geralmente recomendado como seguro). Na ESC com CO_2 não há resíduos no extrato por ser um gás em condições ambiente (LANÇAS, 2000; MAUL, 1999; CARRILHO et al., 2001; MUKHOPADHYAY, 2000).

3.1.2. Inversão das isotermas

De acordo com CARVALHO JUNIOR et al. (2003) sistemas formados por um soluto e um FSC (Fluido Supercrítico) apresentam um comportamento de inversão das isotermas de solubilidade. Este fenômeno, também chamado de retrogradação, representa a influência da pressão de vapor do soluto e do poder de solvatação do solvente no valor de solubilidade dos compostos no fluido supercrítico.

Em estudos com alecrim nas temperaturas de 30 e 40°C, CARVALHO JUNIOR et al. (2003) observaram a inversão das isotermas ao se elevar a

pressão de 100 para 177 bar sendo acompanhada por um aumento na densidade do solvente e, conseqüentemente, por um aumento na solubilidade do extrato de alecrim. Isto pode ser explicado pela diminuição na distancia média entre as moléculas, aumentando a interação específica entre soluto e solvente. Para pressões maiores que 200 bar, o aumento na pressão causa um aumento moderado na densidade e, conseqüentemente, um aumento moderado na solubilidade. Para a temperatura entretanto, considera-se dois efeitos na solubilidade: i) pressão de vapor do soluto, ii) densidade do solvente. Para pressões abaixo de 177 bar, a densidade do CO₂ diminui fortemente com o aumento da temperatura e como conseqüência, a solubilidade do extrato de alecrim diminui. Para pressões de 177 bar, os dois efeitos de temperatura na solubilidade tem aproximadamente a mesma importância. Para pressões maiores do que 177 bar, o aumento na pressão de vapor do soluto com a temperatura é mais importante do que a diminuição da densidade do solvente.

MICHIELIN et al. (2004), estudando a ESC de cavalinha observaram que a região da inversão das isotermas se encontra entre 120 e 150 bar, onde a 120 bar houve a predominância do efeito da densidade na solubilização da oleoresina e de 150 a 250 bar o principal efeito foi o da pressão de vapor, ou seja, a 120 bar o aumento da temperatura de 30°C para 40°C indicou a redução do rendimento, enquanto que acima de 150 bar observou-se um aumento de rendimento com a mesma variação de temperatura.

3.1.3. Seletividade e solubilidade

Solubilidade, seletividade e taxa de transferência de massa, são propriedades importantes para projetar e ampliar a escala de processos a alta pressão. O parâmetro de solubilidade auxilia na determinação das condições de operação e a seletividade fornece informações sobre a qualidade e composição dos extratos (FERREIRA et al., 1999).

Em um processo de extração em leito fixo, durante a etapa de taxa constante de extração (CER), pode-se determinar a solubilidade, que é um dado de equilíbrio. A solubilidade de um soluto em um fluido supercrítico pode ser obtida pelo método dinâmico através da inclinação da curva de extração. A vazão

de solvente dever ser relativamente baixa e o extrator relativamente longo para que, durante o tempo de contato entre soluto e solvente, o equilíbrio entre as fases seja alcançado (BRUNNER, 1994; FERREIRA et al., 1999; del VALLE et al., 2005).

A seletividade do solvente por determinados componentes na mistura (soluto) pode ser controlada mediante o ajuste das condições de temperatura e pressão do processo, que controlam a densidade do solvente, dentro da região supercrítica. A definição das condições de extração (temperatura e pressão) indica o poder de solvatação do solvente. Assim, quanto maior o poder de solvatação, maior não somente a solubilidade de um determinado composto, como também o número de compostos solubilizáveis de uma mistura. Assim, alta solubilidade significa baixa seletividade e vice-versa (MUKHOPADHYAY, 2000).

Em geral, a extratibilidade dos compostos com CO₂ supercrítico depende da ocorrência de grupos funcionais individuais nesses compostos, seu peso molecular, polaridade e interações (MUKHOPADHYAY, 2000).

Hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos de relativamente baixa polaridade, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, e epóxidos são extraíveis em CO₂ SC a uma baixa pressão na faixa de 75 a 100 bar, enquanto que substâncias moderadamente polares, tais como derivados de benzeno com um grupo carboxila e duas hidroxilas, são moderadamente solúveis. Os componentes altamente polares, tais como aqueles com um grupo carboxila e três ou mais grupos hidroxilas, são dificilmente solubilizáveis. Para a extração de certas classes de composto, um co-solvente é freqüentemente usado com o CO₂ para aumentar sua polaridade e logo seu poder solvente (MUKHOPADHYAY, 2000).

A Tabela 1 apresenta uma classificação de substâncias naturais como muito solúvel, pouco solúvel, e quase insolúvel em CO₂ supercrítico.

Tabela 1 – Solubilidade de compostos em CO₂ líquido e supercrítico.

Muito solúvel	Pouco solúvel	Quase insolúvel
Substâncias orgânicas apolares e ligeiramente polar, baixo PM (<250), Mono e sesquiterpenos (tiois, pirazinas, tiazols), Ácido acético, benzaldeído, hexanol, glicerol, acetatos.	Substâncias orgânicas de alto PM (em torno de 400), terpenos substituídos e sesquiterpenos, água, ácido oléico, glicerol, decanol, lipídeos saturados acima de C ₁₂ .	Substâncias orgânicas com PM acima de 400, açúcares, proteínas, taninos, ceras, sais inorgânicos, clorofila, carotenóides, ácidos cítrico e málico, amino ácidos, nitratos, pesticidas, inseticidas, glicinas, etc.

Fonte: MUKHOPADHYAY, 2000.

3.1.4. Emprego de co-solventes

O dióxido de carbono é um excelente solvente para compostos apolares, sua limitação mais freqüente como um solvente de extração analítica é que sua polaridade é muito baixa para obter extrações eficientes (ZOUAGH et al., 2004).

Um co-solvente é uma substância orgânica que tem volatilidade intermediária entre o solvente supercrítico e o soluto a ser extraído e é adicionada para alterar as características da mistura co-solvente/solvente, tais como polaridade e interações específicas, sem mudar significativamente a densidade e compressibilidade do solvente supercrítico original. Um co-solvente pode melhorar a seletividade da separação por preferencialmente interagir com um ou mais componentes da mistura de solutos (MUKHOPADHYAY, 2000).

3.1.5. Vantagens e aplicações da ESC

A maioria dos danos causados pelos métodos convencionais descritos na seção 3.2 podem ser evitados pelo uso de CO₂ supercrítico como solvente de extração. Algumas vantagens desta técnica estão descritas abaixo (MAUL, 1999; MUKHOPADHYAY, 2000):

- Os solventes supercríticos, geralmente, são gasosos à pressão normal e temperatura ambiente, sendo facilmente eliminados dos produtos extraídos;
- A maioria dos gases supercríticos utilizados são fisiologicamente seguros e inertes;
- A separação de materiais é feita a baixas temperaturas, o que é extremamente importante quando são extraídas substâncias naturais que são termicamente degradadas;
- As propriedades solventes dos gases comprimidos podem ser grandemente variadas, tanto pelo ajuste da temperatura e da pressão quanto pela introdução de co-solventes que mudem a polaridade dos gases.
- A adição de co-solventes permite a extração diferencial de solutos não polares até solutos de polaridade alta;
- Não permanece solvente residual nos extratos obtidos por fluido supercrítico;
- Outra vantagem é que o gás carbônico é um material inerte, não inflamável e, como solvente, depois da água, é o de menor custo;
- Os solventes podem ser recirculados, o que significa um baixo custo operacional.

A ESC tem aplicações em uma larga faixa de campos de atividade. Abaixo estão listadas algumas das aplicações da ESC na indústria de produtos naturais e alimentos (MUKHOPADHYAY, 2000):

- Descafeinação de café e chá,
- Extração de condimentos (óleos e oleoresinas),
- Desodorização de óleos e gorduras,
- Extração de óleos vegetais de sementes e grãos,
- Extração de “flavors”, fragrâncias, aromas e perfumes,

- Extração de lúpulo,
- Extração de plantas medicinais,
- Estabilização de sucos de frutas,
- Extração de lanolina de lã,
- Descolesterização de ovos e tecidos animais,
- Extração de antioxidantes de plantas,
- Extração de pigmentos de plantas,
- Extração de pesticidas naturais,
- Desnicotização de tabaco.

3.1.6. Curvas de extração

O processo de extração de soluto presente em matrizes sólidas consiste de duas etapas; a solubilização do soluto e a separação da mistura soluto/solvente. Na extração, o solvente supercrítico escoar através de um leito fixo de partículas sólidas e solubiliza os compostos existentes na matriz sólida. O solvente é alimentado no extrator e distribuído uniformemente no interior do leito fixo. A mistura extrato/solvente é removida do extrator até o precipitador, onde finalmente são separados (BRUNNER, 1994).

Através do método dinâmico pode-se determinar as curvas de extração que são obtidas através da relação entre a quantidade de massa de óleo extraída versus a massa de solvente consumido ou do tempo de extração (BRUNNER, 1994).

Os modelos matemáticos para a descrição dos sistemas com fluido supercrítico devem ter soluções simples e permitir a determinação das condições ótimas de operação, através da predição das curvas de extração (SOVOVÁ, 1994).

De acordo com BRUNNER (1994), FERREIRA et al. (1999) e RODRIGUES et al. (2003), FERREIRA & MEIRELES (2002) a curva típica de extração é caracterizada por três fases distintas:

- Etapa de taxa constante de extração (CER), onde o predomínio da transferência de massa ocorre devido a convecção na fase fluida (extração do soluto exposto na superfície da partícula);
- Etapa de taxa decrescente de extração (FER), onde tanto os efeitos convectivos na fase fluida quanto os difusionais na fase sólida determinam a velocidade de extração.
- Etapa de taxa de extração nula, onde ocorre o predomínio do fenômeno difusivo no sólido (remoção do soluto que está na parte interna da partícula).

As curvas de extração são obtidas através da relação apresentada na equação 3.1 (BRUNNER, 1994):

$$m_{extr} = Q_{CO_2} \int_0^{t_{total}} y(t) dt \quad (3.1)$$

onde: m_{extr} é a massa de extrato obtida em kg; Q_{CO_2} é a vazão de solvente em kg/s; t é o tempo em s e $y(t)$ é a concentração de soluto na fase solvente em kg.

A equação 3.1 representa uma curva de extração onde a concentração de soluto na fase solvente varia com o tempo de extração. A maioria dos modelos matemáticos que descrevem o mecanismo de transferência de massa emprega parâmetros como vazão do solvente, o teor de óleo extraível e características das partículas sólidas como diâmetro e porosidade do leito. Os modelos matemáticos de SOVOVÁ (1994) e MARTÍNEZ et al. (2003) são apresentados na seção 3.1.7.

3.1.7. Modelagem Matemática

A modelagem matemática e a análise das curvas de extração permitem a determinação de parâmetros do processo de extração supercrítica, como as dimensões requeridas para a coluna de extração, a vazão de solvente necessária para a obtenção da taxa de extração desejada, o tamanho das partículas de sólidos e possivelmente a predição da viabilidade do processo de ESC em escala industrial, através de uma simulação das curvas de extração (MARTÍNEZ, 2002, MARTÍNEZ et al., 2003). A utilização de modelos matemáticos que representam a curva de extração é um meio que permite estimar a influência de parâmetros de processo sobre a eficiência da extração. Existem diversos modelos de transferência de massa disponíveis na literatura que são utilizados para descrever as curvas de extração experimentais. Dentre eles citamos o modelo de SOVOVÁ (1994), o modelo de MARTÍNEZ et al. (2003) e o modelo de TAN & LIOU (1989) como métodos baseados na definição do teor total de óleo presente na matriz sólida.

O processo de extração depende das seguintes condições de operação: temperatura, pressão, vazão de solvente, morfologia do material, tratamento prévio da matriz sólida porosa e das propriedades físicas do leito fixo como a porosidade, distribuição de tamanho de partícula, conteúdo inicial de soluto na matriz sólida e altura do leito fixo (CORRÊA et al., 2001 apud. MICHIELIN, 2002).

Os extratos de materiais vegetais normalmente se encontram aprisionados nas células que são protegidas pela parede celular que trabalha como uma barreira ao contato entre o solvente e os compostos desejáveis presentes no sólido (vegetal). A trituração do sólido facilita o contato entre o soluto e solvente. Após a moagem, uma fração do soluto torna-se livre para a interação com o solvente, mas algumas células podem se manter intactas, com o soluto dentro das mesmas. Baseado nesta consideração, SOVOVÁ (1994) propôs um modelo no qual o soluto possível de ser extraído (X_0) é representado por duas frações: o soluto facilmente acessível (X_p) e o de difícil acesso (X_k). O soluto de fácil acesso é primeiramente extraído e a resistência a transferência de massa ocorre apenas na fase solvente. Entretanto, quando a concentração na fase sólida diminui até o

valor de X_k a transferência de massa ocorre também por difusão na fase sólida, diminuindo a taxa de transferência (JOCHMANN, 2000).

SOVOVÁ (1994), considera a ESC dividida em três etapas: na primeira etapa há o óleo de fácil acesso (óleo exposto ou livre), onde a resistência à transferência de massa se encontra na fase solvente; na segunda etapa, o óleo de fácil acesso é esgotado no início do extrator e início do processo difusivo (extração do óleo de difícil acesso, do interior das partículas sólidas) e na terceira etapa há o processo difusivo (esgotamento do óleo livre em toda a extensão do leito).

Para o balanço de massa dentro do leito de extração, em cada etapa do processo, SOVOVÁ (1994) obteve analiticamente as equações para a curva de extração completa, a qual pode ser determinada através do ajuste dos coeficientes de transferência de massa para as fases sólida e fluida. As equações que descrevem o modelo estão no Anexo II.

O modelo proposto por SOVOVÁ (1994) foi aplicado por FRANÇA et al. (1999) e FRANÇA et al. (2000) no processo de extração de buriti com relação a carotenóides e lipídios. O óleo presente na fase sólida é transportado para fase fluída e o óleo da superfície do material é rapidamente dissolvido. Os resultados experimentais das curvas de extração demonstram existir as três regiões distintas de extração. O modelo apresentou um bom ajuste aos dados experimentais.

POVH et al. (2001), estudaram a aplicação do modelo de SOVOVÁ (1994) para o ajuste das curvas do sistema óleo essencial e oleoresina de camomila (*Chamomilla recutita* [L] *Rauschert* + CO₂ supercrítico, o ajuste dos dados experimentais ao modelo matemático foram satisfatórios.

O modelo de SOVOVÁ (1994) foi empregado também por FERREIRA (1996) para a modelagem das curvas de extração do óleo essencial de pimenta do reino, WEINHOLD (2003) no processo de extração do óleo de avenca-da-praia (*Polygala cyparissias*), e por MICHIELIN (2002) na avaliação do processo de extração da oleoresina de cavalinha (*Equisetum arvense*). Em todos estes

estudos o modelo de SOVOVÁ (1994) apresentou um bom ajuste aos dados experimentais.

MARTÍNEZ et al. (2003) correlata às curvas de extração de extratos de gengibre usando o modelo logístico (LM), que é baseado no modelo de Sovová e considera a solubilidade do soluto representado pelos componentes presentes no extrato. Em seu estudo os autores aplicaram o LM considerando o soluto como uma mistura com um simples componente e como uma mistura complexa. A melhor correlação foi obtida usando o modelo LM com soluto como um simples componente. Este modelo tem dois parâmetros ajustáveis para cada grupo de componentes: t_m , que é o instante no qual a taxa de extração atinge seu valor máximo, e b , mas seu significado físico não é bem definido (SOUSA et al., 2004). As equações do modelo Logístico de Martínez estão apresentadas no anexo III.

CAMPOS et al. (2005) empregou o modelo de MARTÍNEZ et al. (2003) para o processo de extração de oleoresina de calêndula e obteve um bom ajuste aos dados experimentais.

3.2. Extrações convencionais

As técnicas para a extração de componentes ativos de substratos naturais evoluíram consideravelmente nos últimos anos. Os primeiros processos de extração foram com flores e condimentos em óleos e gorduras e de ervas e partes de plantas em água e vinho.

Mais tarde, no caso de produtos voláteis, predominou a destilação direta e a destilação por arraste a vapor de água. Nos últimos anos o processo de extração de matérias-primas por diversos solventes, como por exemplo, o hexano, o benzeno, os álcoois metílico, etílico e propílico, a acetona, o pentano e diversos solventes clorados, passaram a ser muito usado. Após a extração, o solvente é removido por evaporação, ou destilação à pressão reduzida, deixando um extrato denso e resinoso.

Cada um desses processos pode produzir ingredientes de aromas e odores de muita qualidade, entretanto, a temperatura elevada (da destilação) e o uso de solventes orgânicos, podem fazê-los divergir da qualidade original.

Há dois problemas associados com as elevadas temperaturas: primeiro, os danos causados aos componentes, altamente sensíveis, de aromas, fragrâncias e princípios ativos farmacêuticos; segundo, a perda de componentes altamente voláteis, de baixo peso molecular, que não podem mais ser recuperados e reincorporados aos extratos.

O problema com os solventes é o fato de ser praticamente impossível remover todo o solvente residual sem um grande dispêndio de energia e custos; além disso, o solvente pode provocar alterações químicas nas moléculas e causar efeitos tóxicos nos consumidores. Portanto, na maioria das situações, tanto para fins sensoriais quanto para fins farmacológicos, o solvente residual pode ser indesejável num produto farmacêutico, no aromático e nas fragrâncias, devido à sua toxicidade, à sua capacidade reagente ou mesmo pela interferência no sabor e no aroma do extrato obtido (MAUL, 1999; SCALIA et al., 1999; FALKENBERG et al., 2003).

3.3. Shiitake (*Lentinula edodes*)

3.3.1. Classificação taxonômica

A classificação taxonômica atualmente empregada para o cogumelo *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (1983) é:

Reino: Fungi

Divisão: Mycota

Classe: Basidiomycetes

Subclasse: Holobasidiomycetidae

Ordem: Agaricales

Família: Tricholomataceae

Gênero: *Lentinula*

Espécie: *Lentinula edodes* (NAPPI & MORETTO, 1998).

Lentinula edodes, é um fungo decompositor primário, isto é, decompõe resíduos vegetais intactos que ainda não sofreram prévia decomposição por outros microrganismos. É conhecido popularmente como “shiitake” (NAPPI & MORETTO, 1998).

Lentinula edodes (Berk.) Pegler é o segundo mais largamente cultivado cogumelo no mundo, com uma produção mundial em 1995 de 1,7 milhões de toneladas. Seu cultivo originou-se na China, sendo introduzido no Japão por intermédio de cultivadores chineses. Posteriormente, o cultivo foi introduzido nos Estados Unidos da América e Europa. No Brasil a produção anual está em torno de 200t (dados de 1998). O Estado de São Paulo destaca-se como o maior produtor nacional, onde muitos descendentes de imigrantes orientais produzem o cogumelo em sistema familiar de pequenas propriedades, trabalhando em mutirão. O cogumelo mais consumido é o champignon, seguido pelo shiitake (*Lentinula edodes*) e pelo *Pleurotus spp* (ZHAO & KWAN, 1998; PAULA et al., 2001; ALMEIDA et al., 1999).

O cogumelo Shiitake ocorre naturalmente em florestas da zona temperada e subtropical da Ásia. Como Japão, China, Bórneo, Coréia, Tailândia, Burma, Nova Guiné, região do Himalaia e Filipinas.

Por apresentar características sensoriais excelentes o shiitake foi denominado “alimento dos deuses” pelos romanos e pelas suas propriedades terapêuticas e nutricionais ficou conhecido como “elixir da vida” pelos chineses (NAPPI & MORETTO, 1998). A figura 2 apresenta uma foto ilustrando o corpo de frutificação (parte comestível) do cogumelo shiitake.



Figura 2 - Corpo de frutificação do cogumelo Shiitake.

Fonte: www.mda.state.mn.us/mgo/crops/Mushrooms.htm

3.3.2. Propriedades nutricionais

Os cogumelos comestíveis em geral são considerados boa fonte de proteínas digeríveis, com valores acima de vegetais e um pouco abaixo de carnes e leite, este conteúdo pode variar dependendo da espécie de 10 a 40% em base seca, contendo todos os aminoácidos essenciais, mas podem ser limitantes no conteúdo de aminoácidos sulfurados, cisteína e metionina. O Shiitake apresenta um conteúdo médio de proteínas em base seca de 13,4 a 17,5% (ROWAN et al., 2002; NAPPI & MORETTO, 1998).

Em termos de quantidade de carboidratos o shiitake contém em média de 67,5 a 78% constituindo-se de pentoses, hexoses e dissacarídeos e entre 7,3% a 7,8% de fibras, estas são de fácil digestão e faz com que o shiitake tenha um baixo valor calórico (NAPPI & MORETTO, 1998; YANG et al., 2002).

Cogumelos contêm alto teor de minerais podendo alcançar de 3,7 a 7% de resíduo mineral fixo. Os minerais presentes no cogumelo shiitake são: cálcio, potássio, magnésio, fósforo, sódio, cobre, ferro, manganês e zinco representando de 56 a 70% do total de cinzas. Do conteúdo de minerais mais significativos estão o cálcio com 0,05 g/kg, o potássio, 26,7g/kg, o magnésio, 1,55 g/kg e o fósforo com 8,7 g/kg (MATTILA et al., 2001).

Cogumelos parecem ser uma excelente fonte de vitaminas especialmente tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina, biotina e ácido ascórbico (Vit. C). Várias espécies de cogumelos comestíveis, inclusive o cogumelo shiitake contém quantias detectáveis de β -carotina e de ergosterol que é transformado em vitamina D ativa quando exposta à irradiação ultravioleta. As vitaminas que se destacam no shiitake são: vitamina C, 20 mg/100g, B1, 0,9 mg/100g, a niacina 65 mg/100g e a D com 0,3 μ g/100g (ROWAN et al., 2002; MATTILA et al., 2001; LONGVAH & DEOSTHALE, 1998).

Quanto ao conteúdo de lipídeos os cogumelos contêm todas as principais classes de componentes lipídicos incluindo ácidos graxos livres, mono-, di- e triglicerídeos, esteróis, ésteres de esterol e fosfolipídeos. Os níveis são geralmente em torno de 1 até 20% em base seca. Para o shiitake o teor de ácidos

graxos varia de 1,1 a 8%. A Tabela 2 mostra a composição dos ácidos graxos estudados por CHANG & MILES (1989) apud. NAPPI & MORETTO (1998).

Tabela 2 – Composição de ácidos graxos presentes em *Lentinula edodes*.

Ácido Graxo	%
Ácido mirístico	0,71
Ácido esteárico	1,66
Ácido palmitoléico	1,93
Ácido Oléico	6,23
Ácido palmítico	21,94
Ácido linoléico	67,53

Fonte: NAPPI & MORETTO, 1998.

3.3.3. Propriedades medicinais

Cogumelos têm sido reconhecidos como alimento funcional, isto é, um alimento que além de seu valor nutricional possui propriedades que auxiliam na saúde humana. Recentes civilizações têm acumulado conhecimentos práticos dos cogumelos adequados para consumo e aqueles que são venenosos ou psicotrópicos. Em muitas partes do mundo, especialmente na Europa, cogumelos selvagens são regularmente coletados e usados diretamente como alimento principal ou adicionado a sopas, guisados e chás (SUGUI et al., 2003; BRAUER et al., 2002; MINATO et al., 1999; ROWAN et al., 2002).

No Oriente, há vários anos, havia o conhecimento que muitos cogumelos comestíveis e certos não comestíveis podiam ter benefícios à saúde. Dentre os comestíveis, se destacam por suas propriedades medicinais as espécies: *Lentinula*, *Auricularia*, *Hericcium*, *Grifola*, *Flammulina*, *Pleurotus* e *Tremella*. Já as espécies *Ganoderma* e *Trametes* são consideradas apenas medicinais uma vez que o seu sabor amargo e textura dura não permitem seu consumo como alimento (ROWAN et al., 2002).

Quando usados com intenção terapêutica os cogumelos medicinais são normalmente consumidos como concentrados em pó ou extratos obtidos por

processo empregando água quente, e extratos concentrados produzidos por freeze-dried ou spray-dried, usados como bebida ou em forma de pó granular que permite fácil manuseio, transporte e consumo (MIZUNO et al., 1995 apud. ROWAN et al., 2002). A entrada regular destes concentrados na alimentação é possivelmente devido à melhora da resposta imune do corpo humano, aumentando assim a resistência para doenças e em alguns casos causando regressão do estado da doença.

Segundo MIZUNO et al. (1995) apud. (ROWAN et al., 2002), extratos obtidos com água quente de vários tipos de cogumelos usados na medicina chinesa e outras medicinas populares têm sido considerados eficazes para o tratamento de diversas doenças incluindo inúmeras formas de câncer. O uso de extratos de cogumelos medicinais na luta contra o câncer é bem conhecido e documentado na China, Japão, Coreia, Rússia e agora em ascensão nos EUA.

Uma das mais notáveis características dos extratos derivados de cogumelos medicinais é sua habilidade de funcionar como imunoestimulador, ou seja, a constituição fisiológica do mecanismo de defesa do hospedeiro é melhorada pela entrada desses componentes dos cogumelos que restauram a homeostase e melhoram a resistência para doenças. Entretanto, é somente nas últimas três décadas que a tecnologia química tem sido hábil para isolar componentes relevantes e usá-los em experimentos controlados para aplicação anticancer (ROWAN et al., 2002; HATVANI, 2001; CHIHARA et al., 1970; SUGUI et al., 2003; LIU et al., 1997).

Certas espécies de cogumelos têm conhecido efeito na diminuição do colesterol quando adicionado na dieta de animais em experimentos. A eritadenina isolada de *Lentinula edodes* mostrou que a sua ação pode ser hipocolesterolêmica devido à depressão da secreção do colesterol do fígado para a corrente sanguínea, entretanto, um mecanismo mais detalhado não foi definido (SUGUIYAMA et al., 1995; MANZI & PIZZOFERATTO, 2000).

A Tabela 3 apresenta uma série de compostos e suas propriedades relatadas em estudos utilizando o shiitake, com as respectivas referências bibliográficas.

Tabela 3 - Propriedades de alguns componentes do cogumelo shiitake.

Composto	Descrição/propriedade	Referência
1,2,4,5- tetratiana, 1,2,4-tritriolano	Aroma, antibacteriano, antifúngico.	Hatvani, 2001
Bis[(metilsulfonil)metil]disulfido	Derivado da lentionina, antifúngico, antibacteriano (S. aureus, B. subtilis, E. coli)	Hatvani, 2001
Fração LEM (extrato aquoso do micélio de Lentinula edodes)	Polissacarídeo imunoativo: indução de interferon in vitro e in vivo	Hatvani, 2001
KS-2	Polissacarídeo antitumor	Chihara et al., 1970, Sugui et al., 2003
Lectina	Glicoproteína	Guillot et al., 1997
Lentina	Proteína antifúngica	Patrick et al., 2003
Ergost-7-em-3 β -ol, ergosta-7,22-dienol, ergosta-7,5-dienol, fungisterol	Esteróis	Yokokawa & MTISUHASHI, 1981
Etanolamina	Reduz colesterol	Shimada et al., 2003
Lentinan	Polissacarídeo antitumoral, melhora sistema imne (contra infecções virais, bacterianas), antioxidante	Chihara et al., 1970, Sugui et al., 2003, Liu et al., 1997
Lentionina	Composto sulfurado confere aroma, antibacteriana, antifúngico	Hatvani et al., 2001, Chen et al., 1986
Ergosterol	Pró-vitamina permite que células sintetizem vit. D	Yokokawa et al., 1981, Matilla et al., 2002
Eritadenina	Hipocolesterolêmica	Shimada et al., 2003
Ácidos fenólicos: ác. Tr-cianamico, ác.hidroxil benzóico, ác. Protocateico, ác.caféico	Antioxidante	Cheung, 2003; Matilla et al., 2001
Fenólicos totais	Antioxidante	Yang et al., 2002
1-octen-2-ol	Responsável pelo odor	Zawirska-Wojtasiak, 2004

3.4. Atividade Antioxidante

O oxigênio mesmo sendo indispensável para a vida pode resultar em danos reversíveis e mesmo irreversíveis quando os seres vivos são expostos a ele em concentrações superiores às encontradas na atmosfera. Este oxigênio pode ser combatido por mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

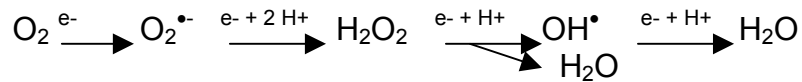
Embora quase todos os organismos possuam defesa antioxidante e sistemas de reparo que evoluíram para atuar na proteção contra danos oxidativos, estes sistemas são insuficientes na proteção completa dos organismos aos danos provocados pela oxidação. Entretanto, suplementos antioxidantes, ou alimentos contendo antioxidantes, podem ser usados para ajudar o corpo humano a reduzir os danos oxidativos (YANG et al., 2002; RENZ et al., 2003).

3.4.1. Oxidação

As espécies reativas do oxigênio estão envolvidas em uma série de processos degenerativos, por serem ou gerarem radicais livres. Estes radicais são qualquer espécie química capaz de existir independente de apresentar um ou mais elétrons desemparelhados, sendo assim, são altamente reativos e capazes de atacar qualquer biomolécula.

A formação das espécies reativas de oxigênio (ROS) é determinada pela perda ou ganho de um elétron, ficando assim com um elétron desemparelhado. O mecanismo de formação de ROS pode ocorrer durante os processos oxidativos biológicos, sendo assim formados fisiologicamente nos sistemas biológicos a partir de compostos endógenos, ou da mesma forma, podem ser oriundos do metabolismo de alguns compostos exógenos ao organismo, gerando assim diferentes radicais livres (RENZ et al., 2003).

Pela sua configuração eletrônica, o oxigênio tende a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos, destacando-se o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}).



Conforme esquema acima, o ânion radical superóxido é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio até água, sendo formados a partir dele, os demais ROS. A partir das moléculas reativas $\text{O}_2^{\bullet -}$ e H_2O_2 podem surgir outras ROS como o radical HO^{\bullet} .

O radical hidroxila é um dos mais potentes oxidantes, tendo a capacidade de atravessar membranas e reagir com moléculas como lipídios insaturados e DNA (RENZ et al., 2003).

Espécies reativas de oxigênio pela luz solar, ultravioleta, radiação ionizante, reações químicas e processos metabólicos tem uma larga variedade de efeitos patológicos, tais como danos ao DNA, carcinogênese e degeneração celular relatada pela idade.

Radicais superóxido e hidroxil são os dois mais representativos radicais livres. Em reações de oxidações celulares, radicais superóxido são normalmente os primeiros a serem formados, e seus efeitos podem ser magnificados porque produzem outros tipos de radicais livres danosos a células e agentes oxidantes. Entretanto, a ação danosa dos radicais hidroxil é a mais forte entre os radicais livres (LIU et al., 1997).

Há muitas evidências de influencia dos ROS em doenças degenerativas, como ocorre na catarata, efisema, artrite, doença de Parkinson, diabetes, câncer e envelhecimento (RENZ et al., 2003).

3.4.2. Antioxidantes

Para evitar os danos causados pelos ROS, o organismo desenvolveu vários mecanismos de defesa, isto é, potenciais de neutralização das ações dos radicais livres, chamados de antioxidantes. Os antioxidantes estão em constante atividade no organismo, pois a produção de energia é uma das principais causas da formação de radicais livres. Quando o mecanismo de proteção antioxidante torna-se desequilibrado por fatores tais como idade e deterioração das funções

fisiológicas, ocorrem doenças e a aceleração do envelhecimento provocando o estresse oxidativo. Entretanto uma dieta com alimentos ou suplementos antioxidativos constituídos de compostos fenólicos como flavonóides, ácidos fenólicos, ou compostos de nitrogênio tais como alcalóides, derivados clorofil, aminoácidos e aminas, são úteis na ajuda ao corpo a reduzir a ação oxidante (MAU et al., 2001; KAUR & KAPOOR, 2001; SOARES, 2002).

Antioxidantes neutralizam radicais livres por doar um de seus próprios elétrons, finalizando a reação de “roubo de elétrons”. Os antioxidantes não se tornam radicais livres, pois são estáveis em qualquer forma, atuando assim como limpadores de radicais livres (KAUR & KAPOOR, 2001).

Antioxidantes também têm sido definidos como preservativos, pelo FDA (Food and Drug Administration), ou substâncias usadas para preservar alimentos pelo retardo da deterioração, rancificação ou descoloração causada pela oxidação. Peroxidação lipídica (deterioração oxidativa dos lipídios poliinsaturados) é uma importante reação deteriorativa de alimentos durante processamento e estocagem formando substâncias tóxicas. Antioxidantes, entretanto, de acordo com seu modo de ação, têm também sido classificados como os compostos que terminam a cadeia de radicais livres na peroxidação lipídica por doar elétrons ou hidrogênio para gorduras contendo um radical livre e para a formação de um complexo entre a cadeia do lipídio e um radical livre. O mecanismo de ação dos antioxidantes é bem variado, desde a remoção do oxigênio do meio, varredura dos ROS, seqüestro dos metais catalisadores da formação de radicais livres, aumento da geração de antioxidantes endógenos ou mesmo a interação de mais de um mecanismo (RENZ et al., 2003; ROBBINS, 2003).

3.4.3. Cogumelos

Em recentes anos, o uso de alguns antioxidantes sintéticos tem sido restrito devido aos seus possíveis efeitos tóxicos e carcinogênicos. Isto tem resultando em inúmeras pesquisas por produtos naturais com propriedades antioxidantes (KAUR & KAPOOR, 2001; SOARES, 2002).

Experimentos realizados por CHENG et al. (2003), com cogumelo shiitake desidratado e submetido a extração com solventes (éter de petróleo, acetato de etila, metanol e água) foram analisados através do ensaio fotométrico de varredura em radicais DPPH (1,1- difenil-2-picrilhidarzil). Os autores usaram as frações metanólica e aquosa em concentrações de 1 a 9 mg/mL. Para a fração metanólica a maior porcentagem de atividade antioxidante foi de 29,4% à concentração de 9 mg/mL. E a fração aquosa apresentou 40,4% de atividade antioxidante para a mesma concentração de extrato. CHENG et al. (2003); determinaram ainda o conteúdo de fenólicos totais referentes às frações metanol e aquosa de 0,05 e 0,08 μ moles de GAEs/mg de extrato (equivalente de ácido gálico), respectivamente. E os conteúdos de fenólicos para fração metanol e aquosa foram de 4,49 e 1,33 mg de GAEs/g de cogumelo seco, respectivamente.

Em outro experimento YANG et al. (2002) realizaram a extração de cogumelo shiitake desidratado e moído. Essa extração consistiu na agitação de 10 g de cogumelo em 100 mL de metanol à 25°C, 150 rpm por 24 horas. Depois de filtrado este resíduo foi então extraído com metanol. Para este extrato o autor determinou o conteúdo de 0,12 mg/g de tocoferol e γ -tocoferol (em pequenas quantidades 0,12-0,45 mg/g) e 6,27 mg/g de fenólicos totais, entretanto ácido ascórbico e β -caroteno não foram detectados neste extrato.

MATTILA et al. (2001) determinou o conteúdo de ácidos fenólicos em shiitake, encontrando as seguintes quantidades: 160, 760, 139 e <50 μ g/100g em peso seco de tr-cinâmico, p-hidroxibenzóico, protocatequínico e caféico, respectivamente.

3.5. Atividade antimicrobiana

As substâncias antibióticas ou antimicrobianas representam talvez o maior avanço da farmacoterapia nas últimas cinco décadas ou mais, com progressos sem limites dentro da terapia com medicamentos (LIMA, 2001).

Com a descoberta da Penicilina por Alexander Fleming, em 1929, deu-se início ao crescimento de pesquisas a fim de descobrir novas substâncias com atividade antimicrobiana, contra diversas bactérias, fungos e parasitas.

Posteriormente, foi verificado que tanto os microrganismos como os vegetais seriam capazes de elaborar e produzir substâncias com potencial atividade antimicrobiana (VALGAS, 2002; LIMA, 2001).

No Brasil, as pesquisas sobre antimicrobianos de origem vegetal tiveram início em 1948 com os pesquisadores CARDOSO & SANTOS, 1948 (apud. LIMA, 2001), que avaliaram os extratos de 100 plantas, utilizadas como antiinflamatórias e cicatrizantes. Destas, somente cinco extratos apresentaram atividade inibitória contra *S. aureus*, *E. coli* e *Proteus X-19*, evidenciando que os resultados com a atividade biológica de produtos naturais foram escassos, porém, em razão de crescentes problemas associados à terapêutica de diversas infecções, e considerando-se o limitado espectro de ação, assim como os efeitos colaterais dos antibióticos, entre outros fatores, os estudos de substâncias de origem vegetal adquiriram novas perspectivas (LIMA, 2001; VALGAS, 2002).

A palavra “antibiótico” deriva do termo *antibiosis*, que literalmente significa “contra a vida” (*anti* = contra; *bios* = vida). Os conceitos formais mais aceitos por cientistas especializados define o antibiótico como uma substância química que é produzida por um microrganismo e que, em baixa concentração, tem a capacidade de inibir ou matar, seletivamente, outros microrganismos. O componente mais crítico dessa definição é a “seletividade” ou a “toxicidade seletiva”, significando que o composto deve inibir ou matar o microrganismo sem inibir ou matar o organismo hospedeiro (por exemplo, o ser humano). Agentes antimicrobianos podem ser classificados segundo a sua origem (naturais, sintéticos ou semi-sintéticos), o efeito antimicrobiano (bacteriostáticos ou bactericidas), o espectro de atividade (amplo, intermediário e reduzido) e o mecanismo de ação (inibição da síntese da parede celular, alteração da permeabilidade celular, inibição da síntese protéica ou inibição da síntese de DNA ou RNA). Além disso, é comum a classificação dos antimicrobianos pela estrutura química (LIMA, 2001; VALGAS, 2002; JOHANN, 2003).

Alguns estudos consideram os cogumelos uma fonte de antibióticos naturais. Metabólitos secundários liberados pelos micélios combatem bactérias e

vírus e exsudados de micélio de cogumelos são ativos contra protozoários que causam malária e outros microrganismos (SMÂNIA, 2003).

As atividades antibacteriana, antiviral, e antiparasitária de substâncias extraídas de Basidiomycetes também têm sido investigadas (SMÂNIA et al., 1995; Di PIERO, 2003). Testes da atividade antibiótica foram realizados contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* utilizando cortinelina, um composto isolado de *L. edodes* e outro composto antibacteriano formado por um álcool β -fenetil e lentinamicina isolado a partir de cultura líquida de micélio (Di PIERO, 2003).

HIRASAWA et al. (1999) realizou extrações com shiitake desidratado em água a 4°C e fracionou com os solventes clorofórmio, acetato de etila e água. Extratos clorofórmicos de shiitake apresentam atividade bactericida contra células vegetativas e células de resistência de *Streptococcus mutans*, o principal agente causal de cáries dentárias e contra *Prevotella intermédia*, provocador de doença periodontal em adultos. Por sua vez, substâncias solúveis em água ou em acetato de etila mostraram-se bacteriostáticas. Os principais componentes dos extratos clorofórmico e aquoso podem ser lentionina e lentinan, respectivamente (HIRASAWA et al., 1999). A lentionina é um composto sulfatado, detectado tanto no basidiocarpo como na biomassa micelial produzida em cultura submersa e apresenta forte atividade antibacteriana e antifúngica (Di PIERO, 2003; HATVANI, 2001; ISHIKAWA et al., 2001).

Em virtude dos estudos de atividade antioxidante e antimicrobiana para extratos obtidos a partir do cogumelo shiitake empregando extrações com solventes orgânicos, optou-se por realizar esses experimentos em extratos obtidos por ESC e também extração com solventes orgânicos. Maiores detalhes sobre as técnicas empregadas nestas análises serão discutidos nas seções 4.11 e 4.12 do item Material e Métodos.

4. Material e Métodos

Nesta seção são apresentados e descritos os materiais e métodos utilizados para a determinação dos parâmetros de processo para a operação de extração supercrítica do óleo de shiitake (*Lentinula edodes*) bem como as análises realizadas a fim de validar as condições de extração estudadas.

Foram realizados testes preliminares a fim de estabelecer as condições de operação para a determinação do rendimento global de óleo (X_0), como determinação do tamanho de partícula da matéria-prima.

Para efeito de comparação foram realizadas análises com extrações com solventes orgânicos do cogumelo shiitake a fim de verificar a influência do método de extração no rendimento, composição e atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos.

Para caracterizar os extratos foram realizadas análises dos compostos presentes nos diferentes extratos obtidos tanto na ESC quanto na extração com solventes orgânicos, através de técnicas de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) com a finalidade de identificar e quantificar os compostos presentes nas diferentes frações de óleo de shiitake.

Para a avaliação das propriedades dos extratos foram realizadas análises de atividade antioxidante e antimicrobiana tanto nos extratos obtidos por extração com solventes orgânicos como com os extratos supercríticos.

Para o estudo da cinética do processo de extração foram realizadas curvas de extração de óleo de cogumelo shiitake, que juntamente com os resultados de X_0 , e dados de solubilidade do sistema CO_2 + shiitake, fornece os parâmetros de processo necessários para a aplicação de modelos matemáticos de transferência de massa como os modelos descritos por SOVOVÁ (1994) e MARTÍNEZ et al, (2003).

Os experimentos de extração supercrítica e extração com solventes orgânicos foram realizados no LATEC – Laboratório de Termodinâmica e

Extração Supercrítica, localizado nas dependências do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.2. Procedimento Experimental - ESC

4.2.1. Unidade de Extração

Para obtenção do óleo de shiitake foram utilizadas duas unidades de extração supercrítica. Os resultados preliminares e os dados de solubilidade e emprego de co-solvente foram obtidos na unidade de extração supercrítica que opera com pressão máxima de 250 bar e vazões na ordem de 0,5 g/min a 5 g/min (Equipamento 1). Os valores de rendimento global de óleo de shiitake (X_0) e as curvas de extração foram obtidos no equipamento que opera com pressões de até 500 bar e altas vazões de solvente entre 1,6 g/min e 41,6 g/min (Equipamento 2).

4.2.1.1. Equipamento de Extração 1

O equipamento constitui-se de um cilindro de CO₂ com vara pescadora que alimenta um tanque pulmão (S) de 200 cm³ (Suprilab, São Paulo), onde é conectada uma válvula de três vias (VTV) com dispositivo de segurança. Este tanque é provido de uma camisa de PVC para o resfriamento através de um banho termostático (Microquímica, modelo MQBTZ99-20, Florianópolis) cuja temperatura programada para 1°C, garante o estado líquido do solvente antes do bombeamento. O tanque pulmão ainda possui um manômetro (PI2) para o controle da pressão com precisão de 0,5% (IOPE, 01221-40-2). Através de uma válvula globo (VG) é possível a passagem do solvente para bomba (Constametric, modelo 3200 P/F, EUA), que opera no modo de pressão constante fornecendo uma vazão de solvente adequada, normalmente entre 1 e 6 mL/min. A tubulação que liga a bomba ao extrator é mantida submersa em um banho termostático (Microquímica, modelo MQBTZ99-20, Florianópolis) programado para manter constante a temperatura de operação. Este banho também é responsável por manter constante a temperatura do extrator. O extrator constitui-se de um cilindro de aço inoxidável encamisado de 40 cm de comprimento, 2,1 cm de diâmetro interno, volume de 138,5 mL e extremidades rosqueadas, onde é formado o leito

fixo de partículas. Na saída do extrator é conectada uma válvula micrométrica (VM) (Autoclave Engineer, modelo 30VRMM4812-316SS, EUA), onde ocorre a despressurização da mistura soluto/solvente e sua conseqüente separação. Para garantir que os compostos extraídos da matriz vegetal não se acumulem na linha de extração, coloca-se uma fita de aquecimento (H) ao redor da VM a fim de evitar o congelamento da mesma, devido à drástica redução da pressão (mudança de estado físico do solvente de fluido supercrítico para vapor). Após a válvula micrométrica o extrato obtido é coletado em frascos de vidro âmbar. Na saída destes frascos está conectado um bolhomêtro onde são realizadas as medidas de vazão do solvente, mediante o deslocamento de coluna de líquido, conforme descrito por JOCHMANN (2000). O co-solvente é bombeado para o extrator por uma bomba (Constametric, modelo 3200, EUA) que opera a vazões de 0,01- 9,99 mL/min. As figuras 3 e 4 mostram a foto e o esquema de funcionamento do equipamento, respectivamente.



Figura 3 - Foto da unidade de extração 1.

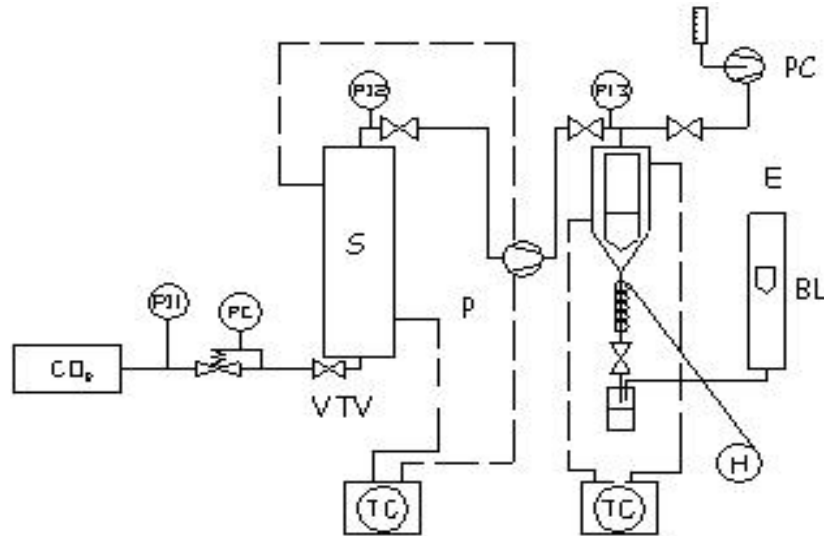


Figura 4 - Esquema da unidade de extração 1.

Onde:

CO₂ - reservatório de solvente

S – tanque pulmão

P – bomba

PC – bomba co-solvente

E – Extrator

TC – banho termostático

VM – válvula micrométrica

C – coletor de amostra

BL – medidor de vazão

H – fita aquecedora

PI1, PI2 e PI3 - manômetros.

4.2.1.2. Equipamento de Extração 2

A unidade de ESC 2 constitui-se de um cilindro de CO₂ com tubo pescador (White Martins Ltda, Joinville, SC, Brasil), que alimenta a linha de extração, que passa imersa em um banho termostático de resfriamento (Thermo Haake C10 - K10) programado para manter a temperatura inferior a 0°C, garantindo assim que o solvente siga no estado líquido à bomba (Maximator M111 CO₂), que trabalha

suprida por uma linha de ar comprimido e filtrado. A pressão de operação desejada é regulada através da válvula V1 (Tescom Cat N° 26-1761-24-161). A bomba é alimentada com o solvente, que é então pressurizado a uma pressão pré-estabelecida em V1, e encaminhado à linha de extração, passando ao extrator, que se constitui de um cilindro encamisado de aço inox com extremidades rosqueadas de 33,5 cm de comprimento, 2,042 cm de diâmetro interno e volume interno de 100 mL. A temperatura de operação do extrator é mantida constante através de um banho termostático de aquecimento (Thermo Haake DC30 – B30). Toda a tubulação onde se encontram conectadas as válvulas V1 a V6 é mantida submersa em um banho termostático de aquecimento (Microquímica, modelo MQBTZ99-20) a uma temperatura de 40 °C. A tubulação da saída do extrator é conectada à V3 (Sitec Microvalve 710.3012) e em seguida à V4 (Sitec Shutoff Valve 710.3010) por onde o fluxo de CO₂ é regulado. Após passar pela V4, o extrato é coletado em tubos âmbar, onde também é conectado um rotâmetro (ABB Automation Products 10 A 61) para medição do fluxo de CO₂, regulado na V3 e V4.

Essa unidade de ESC foi desenvolvida e construída no Laboratório 'Thermische Verfahrenstechnik' na Technische Universität Hamburg-Harburg (TUHH), Alemanha. As figuras 5 e 6 mostram a foto e o esquema de funcionamento do equipamento, respectivamente.



Figura 5 - Foto da unidade de extração 2.

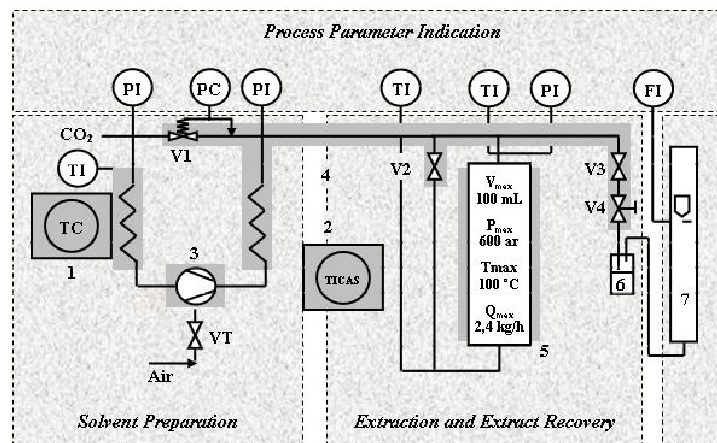


Figura 6 - Esquema da unidade de extração 2.

Onde:

VT - Válvula de controle de frequência da bomba.

V1 - Válvula reguladora de pressão.

V2 - Válvula de entrada do extrator (Autoclave valve 10V2071 Maximator Cat N° 3710.0104).

V3 - Válvula da saída do extrator (Sitec Shutoff 710.3010).

V4 - Microválvula (controla a velocidade de escoamento) (Sitec Microvalve 710.3012).

PI1 - Manômetro do cilindro (WIKA do Brasil, PI: Cat 233.50.10).

PI2 – Manômetro da bomba (WIKA do Brasil, PI: Cat 233.50.10).

PI3 – Manômetro do extrator (WIKA do Brasil, PI: Cat 233.50.10).

4.3. Preparo da matéria-prima

A matéria-prima shiitake (*Lentinula edodes*) utilizada para as extrações foi adquirida da Guinishi – Comércio, Importação e Exportação de Produtos Alimentícios Ltda (Suzano-SP, Brasil) em embalagens de 4 Kg. A parte utilizada do cogumelo shiitake desidratado foi o píleo (parte esporífera do cogumelo conhecida como “chapéu”) já que os caules não estavam presentes na amostra. O shiitake foi submetido à trituração em liquidificador doméstico por aproximadamente dois minutos. Após esta etapa as amostras moídas foram separadas em diferentes tamanhos de partícula empregando-se peneiras de série

Tyler -80/+100 mesh a fim de classificar a amostra. A Figura 7 apresenta a matéria-prima (shiitake) utilizada neste trabalho.



Figura 7 – Matéria-prima utilizada para as extrações.

4.4. Caracterização do Leito de Partícula

A caracterização do leito de partículas, representada pela determinação das características físicas das partículas e do leito, é necessária para obtenção de propriedades de transporte, como a porosidade do leito e densidade de sólido. Estes parâmetros são utilizados na modelagem matemática das curvas de extração, realizada a fim de avaliar a influência destes parâmetros de processo na eficiência da extração. Para a caracterização do leito são empregadas a microscopia eletrônica de varredura – MEV (item 4.4.1) e a determinação da densidade do sólido (item 4.4.2).

4.4.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Uma amostra de shiitake moído, nas mesmas condições da matéria-prima utilizada para as extrações a alta pressão, foi submetida à análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), para determinação do diâmetro médio de partículas. A análise foi realizada no Laboratório de Materiais do Departamento de

Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), através de um microscópio eletrônico de varredura (PHILIPS, modelo XL 30).

O procedimento descrito por JOCHMANN (2000) consiste em depositar a amostra em um suporte para posteriormente ser recoberta com ouro em uma célula de vácuo. Após esse procedimento a amostra é então colocada no microscópio onde sofre a incidência de um feixe de elétrons de intensidade variada fazendo com que a amostra tenha sua superfície micrografada.

O diâmetro médio das partículas da amostra analisada na MEV foi determinado durante a análise no microscópio. Através dos dados de diâmetro máximo e diâmetro mínimo das partículas, é determinado o diâmetro de uma esfera equivalente, para cada amostra, apresentando os valores médios, com os desvios correspondentes.

4.4.2. Densidade Real do Shiitake/ Densidade Aparente

A densidade real do shiitake moído (d_r) foi determinada usando picnometria com gás Hélio, através do equipamento Ultrapycnometer 1000 da Quantachrome. Esta foi realizada pelo Laboratório de Materiais Particulados da Universidade de São Carlos – UFScar (São Carlos, São Paulo)

A densidade aparente (d_a) foi calculada através da massa de shiitake utilizada nas extrações pelo volume da célula extratora em g/cm^3 .

$$d_a = \frac{\text{massa de shiitake}}{\text{volume do leito}} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

4.4.3. Porosidade do Leito e Partículas

Para formar o leito fixo de partículas foi utilizado o cogumelo shiitake moído (mesh -80/+100) que forneceu a maior massa moída e fácil manuseio empregando-se uma massa igual a 45 g para o equipamento 1 e 32 g para o equipamento 2. A porosidade total do leito (ϵ) e das partículas foi calculada usando a densidade real das partículas e a densidade aparente do leito, conforme a equação 4.2 abaixo.

$$\varepsilon = 1 - \frac{da}{dr} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

4.5. Determinação da Densidade do Solvente

A densidade do solvente supercrítico (CO₂) nas condições operacionais e ambientais foi determinada através da tabela termodinâmica de ANGUS et al. (1976), baseada em dados experimentais. Estes dados são necessários para a aplicação do modelo de transferência de massa descrito por SOVOVÁ, e para avaliar a influência da densidade do solvente na solubilização do soluto.

4.6. Curvas de Extração

As curvas de extração do óleo de shiitake com o CO₂ supercrítico foram obtidas com o emprego do método dinâmico de extração. Estas curvas são obtidas com a massa de soluto por massa de sólido e massa de solvente por massa de sólido e representam as diferentes etapas do processo, desde a etapa de taxa constante de extração (CER), a etapa de taxa decrescente de extração (FER) e a etapa difusional.

Para a interpretação das curvas de extração e aplicação de modelos de transferência de massa, como o descrito por SOVOVÁ (1994) é necessário o conhecimento dos parâmetros de processo como (YODA, 2001):

M_{CER} : taxa de extração no período CER;

Y_{CER} : razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna (etapa CER), obtido pela equação 4.3.

t_{CER} : duração da etapa de taxa constante de extração (segundos);

R_{CER} : rendimento em extrato na etapa de taxa constante de extração (%massa);

R_{total} : rendimento total em extrato (% massa);

Q_{CO_2} : vazão média do solvente para o período CER.

Tais parâmetros podem ser obtidos pelo ajuste simultâneo de duas retas a curva de extração através do pelo método *spline* com o auxílio do pacote estatístico SAS System for Windows – versão 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). A reta 1 descreve o período CER e pela interseção das retas 1 e 2 obtêm-se o parâmetro t_{cer} . O parâmetro M_{cer} é o valor da tangente da reta 1 e a partir do mesmo, obtêm-se o valor de Y_{cer} através da Equação 4.3. O rendimento total de extrato foi calculado através da massa total de óleo de shiitake obtido nas extrações dividida pela massa de shiitake que forma o leito fixo de partículas. A vazão média do solvente (Q_{CO_2}) foi determinada experimentalmente através de medidores de vazão, um bolhômetro para o equipamento 1 e um rotâmetro para o equipamento 2.

$$Y_{cer} = \frac{M_{cer}}{Q_{CO_2}} \quad (\text{Eq. 4.3})$$

Para obtenção das curvas de extração do óleo de shiitake utilizadas na aplicação do modelo de transferência de massa descrito por SOVOVÁ (1994) e MARTINEZ et al. (2003) foram realizados doze experimentos, em diferentes condições de temperatura, pressão e vazão de solvente.

4.7. Determinação do rendimento total de óleo (X_0)

O rendimento global de óleo (X_0) é a quantidade de óleo extraível presente na matriz sólida (shiitake). Para que os valores de X_0 sejam válidos e reprodutíveis é preciso especificar uma metodologia para sua determinação. Desta forma, foram realizados testes preliminares para determinação das condições de operação (temperatura, pressão, tempo de extração, massa de shiitake utilizada para formar o leito e diâmetro de partícula), necessárias para determinação dos valores de X_0 .

Para determinação do rendimento global de óleo de shiitake, fez-se a extração do óleo através da técnica de extração supercrítica. As temperaturas de operação foram de 30, 40 e 50 °C e pressões variando de 150 a 350 bar. A vazão de solvente variou de 0,82 a 1,18 g/min para o equipamento 1 e de 3,33 g/min

para o equipamento 2 e o tempo total das extrações foi de 3 horas para ambos utilizando-se a metade do extrator (massa de amostra de 22 g no equipamento 1 e 16 g no equipamento 2) e completando o leito com contas de vidro. Optou-se por utilizar a metade do extrator por apresentar economia de matéria-prima, solvente e reduzindo também o tempo de extração.

4.8. Determinação da Solubilidade Experimental

A solubilidade do óleo de shiitake no solvente supercrítico foi determinada experimentalmente através do ajuste simultâneo de duas retas, as curvas de extração utilizando o pacote estatístico SAS for Windows – versão 6.11 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Foi determinada a inclinação da reta ajustada no período de taxa constante de extração (CER), onde se obtém a completa saturação do soluto. Esta inclinação corresponde ao valor de Y_{cer} que é equivalente ao valor de Y^* para condições de temperatura e pressão específica quando o equilíbrio de fases é alcançado. A vazão utilizada para determinação da solubilidade experimental foi baseada no estudo feito por DANIELSKI (2002), que definiu a faixa de 0,9 g/min à 1,2 g/min para a solubilidade de oleoresinas em CO_2 supercrítico, salientando assim o tempo de contato entre as fases, necessário para alcançar o equilíbrio. Os dados obtidos com este procedimento são valores aproximados, uma vez que existe variação da composição do extrato com o tempo de extração. Estes dados aproximados foram considerados apenas para a aplicação do modelo de SOVOVÁ (1994).

4.9. Extração com Solventes Orgânicos (ELL)

A extração convencional com os solventes orgânicos (extração líquido-líquido) hexano, diclorometano, acetato de etila, que apresentam polaridade crescente, 0,0<3,4<4,3, foi realizada a fim de comparar o rendimento de extração e a composição dos extratos obtidos neste processo e na extração supercrítica. A Figura 8 mostra o esquema da extração com solventes orgânicos por maceração a frio.

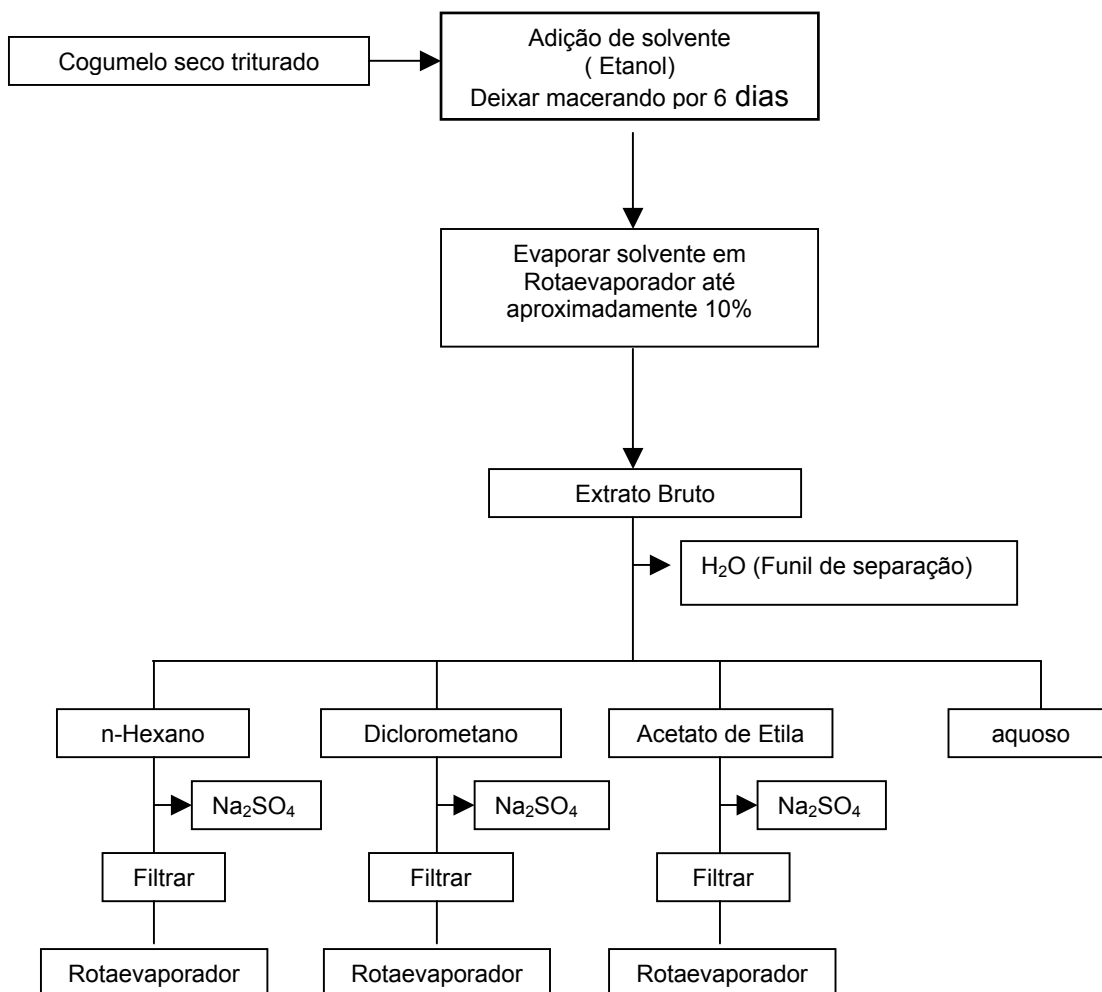


Figura 8 - Fluxograma da extração convencional.

A extração convencional foi realizada no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica e consiste inicialmente de maceração a frio da matriz seca (100g) em 400g de etanol durante 6 dias (extração sólido-líquido), após esta etapa, o extrato alcoólico foi filtrado e concentrado em rotaevaporador até 10% de seu volume inicial. Acrescentou-se ao extrato alcoólico concentrado 10% do volume em água e então novamente concentrou-se em rotaevaporador (Fisatom, modelo 550) para retirada do etanol do extrato hidroalcoólico. A extração líquido-líquido consiste em fracionar o extrato hidroalcoólico em solventes de polaridade crescente. O extrato resultante da extração sólido-líquido é então misturado à 60 mL de hexano, homogeneizado e deixado até a separação das fases hexano e aquosa, realizada em funil de separação. À fração n-hexano foi adicionado ao extrato sulfato de sódio anidro para retirada de vestígios de água e então foi concentrada para a retirada do solvente. Para os demais solventes, diclorometano

e acetato de etila, realizou-se o mesmo procedimento, com volumes de 60 mL para cada solvente. No fim da extração com solventes orgânicos foram obtidos quatro extratos: fração n-hexano, fração diclorometano, fração acetato de etila e fração aquosa (FALKENBEG et al., 2003; SILVA, 2004).

4.10. Determinação da Composição dos Extratos

4.10.1. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG – MS)

Os principais constituintes do óleo de shiitake obtidos mediante extração supercrítica e extração convencional, foram quantificados e identificados através de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Foram empregados dois diferentes programas de temperatura na análise. A primeira análise (definida como condição cromatográfica 1) foi executada em um cromatógrafo gasoso (Agilent model 6890) com detector de massa (Agilent, Model 5973) equipado com uma coluna HP-5MS (30 m X 0.25 mm X 0.25 μ m). O programa de temperatura da condição 1 foi: temperatura mantida a 50°C por 2 min, sendo então elevada para 250°C a taxa de 5°C por minuto. A temperatura do injetor foi fixa para 290°C em modo split less (1/20 split ratio). O gás carreador foi hélio 99,99% em um fluxo constante. O detector de massa opera em um modo de impacto de ionização de elétron, a temperatura da linha de transferência de 295°C e a energia eletrônica de 70 eV. A faixa de massa scaniada foi de 40 a 300 m/z. Os extratos foram diluídos em diclorometano e injetados no volume de 1 μ L tanto na condição cromatográfica 1 e 2.

Os componentes foram tentativamente identificados por comparação do espectro das massas gerados no sistema, com aqueles da biblioteca de espectros de massa Standard Reference Data Series of the National Institute of Standard and Technology (NIST). Em virtude de não existirem outros trabalhos referentes à extração supercrítica de shiitake, não foi possível comparar os compostos encontrados com dados da literatura.

A segunda análise (condição cromatográfica 2) empregou um programa de temperatura inicial da coluna de 70°C, por 2 min, até 290°C, com uma velocidade de aquecimento de 5°C por minuto. Esta segunda condição foi empregada numa tentativa de identificar outros compostos.

As análises de CG-EM foram realizadas no Laboratório de Química Analítica e Ambiental no Instituto de Química – UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.10.2. Cromatografia Gasosa (CG)

A análise foi executada em um cromatógrafo gasoso (Shimadzu CG-17A). A separação foi executada com uma coluna HP-5MS (30 m X 0.25 mm X 0.25 µm). O programa de temperatura foi: temperatura mantida a 50 °C por 2 min, sendo então elevada para 250°C a taxa de 5°C por minuto. A temperatura do injetor foi fixa para 290°C em modo split less (1/20 split ratio). O gás carreador foi hélio 99,99% em um fluxo constante. O detector de massa opera em um modo de impacto de ionização de elétron, a temperatura da linha de transferência de 295°C e a energia eletrônica de 70 eV. A faixa de massa scaniada foi de 40 a 300 m/z.

Metil éster (99%) foi injetado como padrão interno na concentração de 49,5 µg, possibilitando a quantificação dos compostos por comparação da área deste padrão.

As análises de CG foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química, UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina.

4.11. Determinação da atividade antioxidante dos extratos

4.11.1. Método ensaio fotométrico DPPH

Avaliação da atividade antioxidante pelo método ensaio fotométrico em radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) foi realizadas nos extratos obtidos da ESC e extração com solventes orgânicos. Estes extratos foram solubilizados em etanol até uma concentração final de 1,0 mg/mL. A solução resultante foi diluída com etanol para concentrações finais de 250, 125, 50, 25, 10 and 5 µg/mL. Um

mL da solução etanólica de 0,3 mM de reagente DPPH foi adicionada em tubos de ensaio para volume final de 2.5 mL, juntamente com a solução do extrato de cogumelo shiitake nas concentrações acima descritas. Posteriormente deixou-se reagindo em temperatura ambiente. Após 30 min os valores de absorbância dos extratos com o reagente DPPH e seus respectivos brancos foram medidos a 517 nm em espectrofotômetro (Spectronic Unicam, modelo Genesys 10 Vis) e convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA) usando a seguinte fórmula:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{[Abs_{amostra} - Abs_{branco}] \times 100}{Abs_{controle}} \right\} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

Etanol (1.0 mL) mais a solução do extrato de cogumelo foi usado como branco. Solução de DPPH (1.0 mL:0.3mM) e etanol (2.5 mL) foi usada como controle negativo. Os valores de EC₅₀ foram calculados pela regressão linear dos valores plotados onde na abcissa representam a concentração dos extratos de cogumelos testados e na ordenada a porcentagem média de atividade antioxidante dos testes em triplicata (MENSOR et al., 2001). Os valores de EC₅₀ indicam a concentração do extrato que representa 50% da atividade antioxidante.

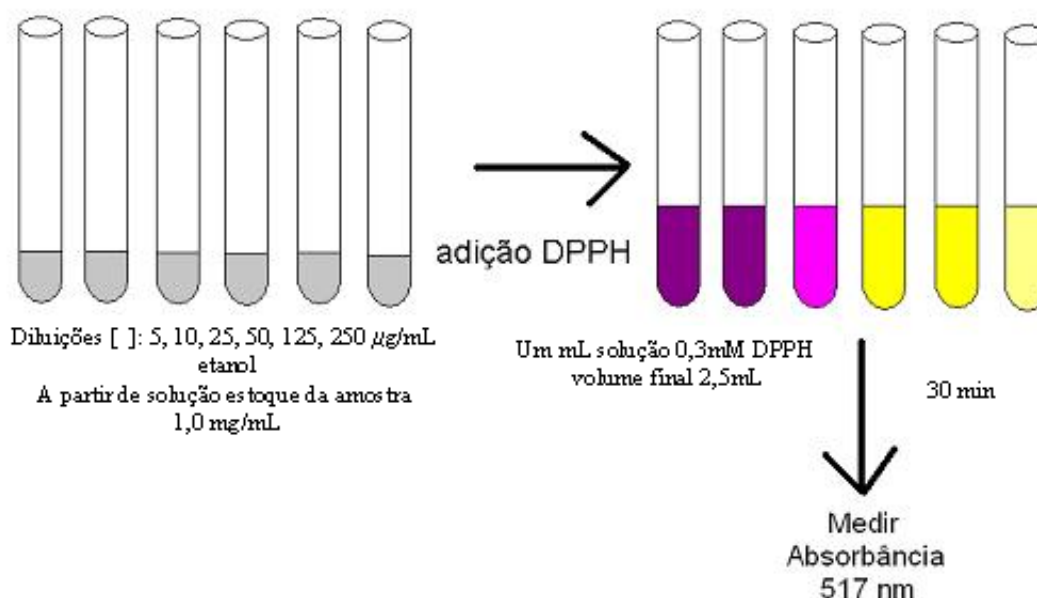


Figura 9 – Esquema da análise de DPPH.

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Experimental do Departamento de Química e no LATESC do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.11.2. Determinação do teor de fenólicos totais

Os extratos da ESC, ESC e co-solvente e ELL que apresentaram atividade antioxidante no ensaio com radical DPPH foram submetidos a análise para a determinação do teor de fenólicos totais empregando-se o reagente Folin-Denis pelo procedimento descrito pela AOAC método 9110. Este método baseia-se na redução em meio alcalino do reagente Folin-Denis (ácido fosfomolibdico + tungstato de sódio) pelos fenóis a molibdênio promovendo coloração azul que tem sua absorbância medida a 760 nm.

Inicialmente foi preparada uma curva padrão com ácido tânico. Este padrão foi pesado nas seguintes quantidades: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg, e foram diluído em água destilada em balão volumétrico de 100 mL. Foram adicionados 5 mL de reagente de Folin-Denis e posteriormente 10 mL de solução saturada de carbonato de sódio. Completou-se então o volume de 100 mL do balão com água destilada e homogenizou-se, sendo deixado em repouso por 30 minutos. Filtrou-se as soluções em papel de filtro e efetuou-se a leitura em espectrofotômetro a 760 nm (Spectronic Unicam, modelo Genesys 10 Vis). Plotou-se então a curva padrão de ácido tânico em concentração de ácido tânico (mg) versus absorbância.

Cada extrato foi pesado na quantidade aproximada de 0,005 gramas dissolvendo-se em 1 mL de metanol. Em seguida este volume foi transferido para balão volumétrico de 100 mL, foi então adicionado os demais reagentes conforme os procedimento para a elaboração da curva padrão. Em paralelo faz-se o branco utilizando somente os reagentes sem o extrato. Para o cálculo da quantidade de fenólicos (em equivalentes de ácido tânico -EAT), emprega-se a seguinte equação:

$$\text{Fenólicos(gEAT/100g extrato)} = \left[\frac{\text{leitura(mg/mL)} \times 10}{\text{peso amostra(g)}} \right] \quad \text{Eq. (4.5)}$$

Onde: Leitura (mg/mL) é o valor da concentração de ácido tânico obtido na curva padrão para a leitura de absorbância referente ao extrato de cogumelo (AOAC, 1980).

4.12. Determinação da atividade antimicrobiana e antifúngica dos extratos

4.12.1. Método de difusão em ágar

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada empregando-se o método de difusão em ágar descrito por SMÂNIA et al. (1995).

O presente estudo com os extratos obtidos por ESC, ESC+co-solvente e extração com solventes orgânicos de cogumelo shiitake foi executado com os seguintes microrganismos: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* provenientes do Departamento de Saúde Pública e a levedura *Cândida albicans* ATCC proveniente do Laboratório Santa Luzia. As culturas foram incubadas a 36°C por 18 horas. As culturas foram então diluídas em caldo de cultivo para conter 10⁶ CFU/mL. Ágar Mueller-Hinton e caldo de cultivo foram usados para o crescimento bacteriano. Todas as culturas bacterianas foram incubadas em condições aeróbicas.

O método de difusão em ágar foi realizado com “swabs” de algodão que foram mudados para cada suspensão de bactérias (10⁶ CFU/mL) e inoculadas em placas onde as bactérias foram espalhadas regularmente sobre a superfície do meio ágar. Furos de sete mm de diâmetro foram assepticamente cortados e preenchidos com os diferentes extratos de cogumelo (supercríticos, convencionais e supercríticos com co-solvente) na concentração de 10 mg/mL de DMSO (dimetilsulfóxido), por este não oferecer nenhuma inibição aos microrganismos testados. As placas foram incubadas a 36°C por 18 horas e examinadas para verificar a inibição das linhagens indicadoras. Um resultado positivo foi definido como uma zona de inibição de 9 mm ou mais em diâmetro de crescimento inibido das linhagens de microrganismos e foi interpretado como presença confirmada de uma substância antibacteriana. O esquema da Figura 10 mostra os passos do método de difusão em ágar.

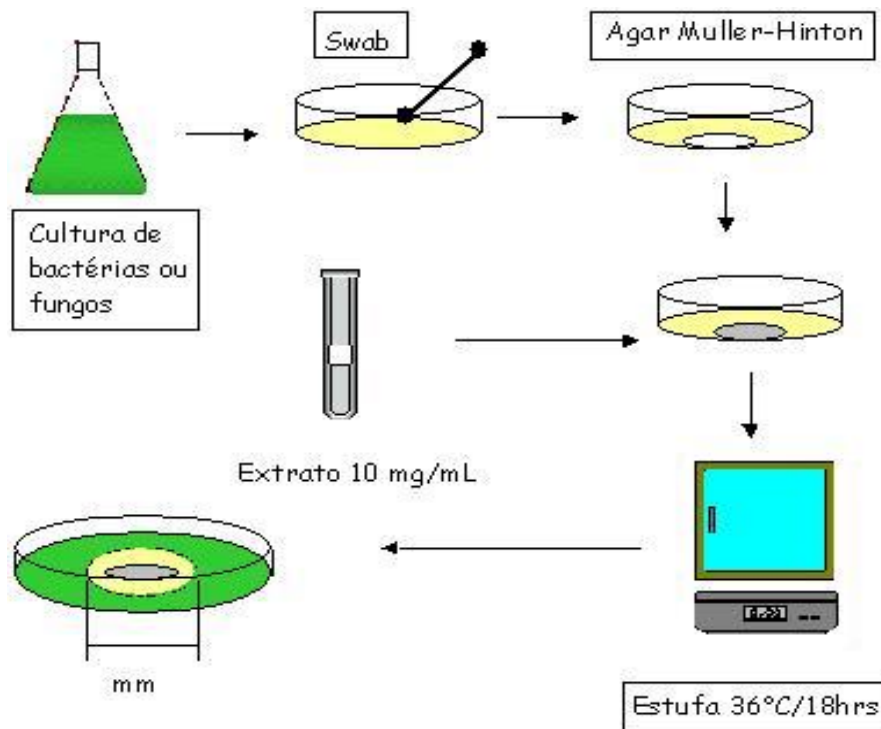


Figura 10 – Esquema ilustrando as etapas do método de difusão em agar.

4.12.2. Determinação da Mínima Concentração Inibitória (MIC)

A atividade antimicrobiana foi avaliada através da determinação da MIC pelo método de microdiluição em caldo de cultivo. Os extratos de cogumelo shiitake que apresentaram halo de inibição ao serem submetidos ao método de difusão em agar foram dissolvidos em 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO), previamente esterilizado por autoclavação, e as soluções foram adicionadas de 1.800 μL de caldo Muller-Hinton para bactérias e caldo nutritivo para o fungo. Posteriormente foram preparadas diluições seriadas com concentrações variando de 2,0 a 0,0156 mg/mL, e distribuídas em volume de 200 μL nas placas de microdiluição (contendo 96 orifícios). Como controle de crescimento foram usadas apenas a mistura de meio de cultura e para o controle de esterilidade foi usado apenas o DMSO, sem a adição de agentes antimicrobianos. Em cada orifício teste e de controle de crescimento foram adicionados 5 μL de inóculo bacteriano ou fúngico. Os experimentos foram desenvolvidos em duplicata e as placas foram incubadas por 24 horas a 36°C para as bactérias (*M. luteus* e *B. cereus*) e 72 horas a 30-35°C para o fungo (*C. albicans*). A leitura dos experimentos foi realizada com o uso de um revelador de crescimento microbiano, o p-iodo

nitrotetrazolium - INT (Sigma). A MIC foi considerada a menor concentração da substância que inibiu o crescimento bacteriano ou fúngico, após a incubação. Os resultados foram expressos em mg/mL (SMÂNIA, 2003; ZACCHINO et al., 2001).

As análises foram realizadas no Laboratório de Antibióticos – Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

5. Resultados e discussão

5.1. Testes preliminares

Testes preliminares foram realizados a fim de definir as condições de operação adequadas para a extração de óleo de shiitake com fluido supercrítico (FSC). Inicialmente determinou-se o tamanho das partículas com base no rendimento da moagem da amostra, sendo o tamanho de partícula retirado da peneira mesh -80/+100 a granulometria que permitiu a reprodutibilidade do empacotamento do leito.

Pela análise das curvas de extração dos experimentos preliminares, inicialmente empregou-se 6 horas de extração, mas observou-se que com um tempo de extração de 3 horas e empregando a metade do extrator com uma massa de sólido de 22 g (equipamento 1) e 16 g (equipamento 2) foi possível atingir a proximidade da etapa de taxa nula de extração (100% do total de soluto no sólido), isto representa economia de matéria-prima, solvente e redução do tempo de extração, se comparado com o emprego do leito de extração completo.

Através dos testes preliminares definiram-se as seguintes condições: tempo total de extração de 3 horas, massa de sólido de 22 g para o equipamento 1 e 16 g para o equipamento 2, sendo o restante do leito completo com contas de vidro. A vazão foi fixa em de $3,33 \pm 0,025$ g/min no equipamento 2, e vazões de 0,82 a 1,18 g/min no equipamento 1 para a determinação dos valores de solubilidade. As temperaturas empregadas foram de 30, 40 e 50°C e as pressões variando num intervalo de 150 a 350 bar. Estas condições de operação permitiram o estudo do sistema CO₂+ shiitake, a fim de determinar os parâmetros de processo como determinação dos valores de X_0 , obtenção dos dados preliminares de solubilidade do soluto no solvente, avaliação da cinética de extração e também o emprego de co-solvente para as extrações a alta pressão.

5.2. Caracterização da matéria-prima

Cogumelo shiitake moído e separado nas peneiras de mesh -80/+100, foi analisado por microscopia eletrônica de varredura para determinação do diâmetro

médio de partícula, estes dados são empregados na aplicação de modelos matemáticos de transferência de massa. O diâmetro da partícula foi calculado através de uma função do próprio microscópio eletrônico de varredura.

As Figuras 11 e 12 apresentam a micrografia da amostra de shiitake moído com um aumento de 100 e 200 x, respectivamente.

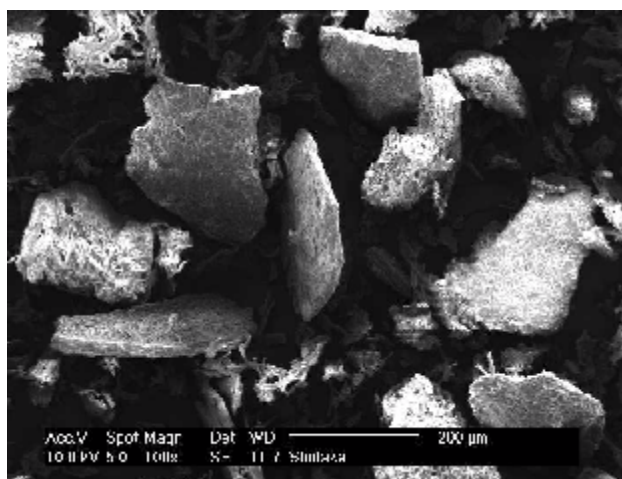


Figura 11– Micrografia de partículas de shiitake com um aumento de 100 x.

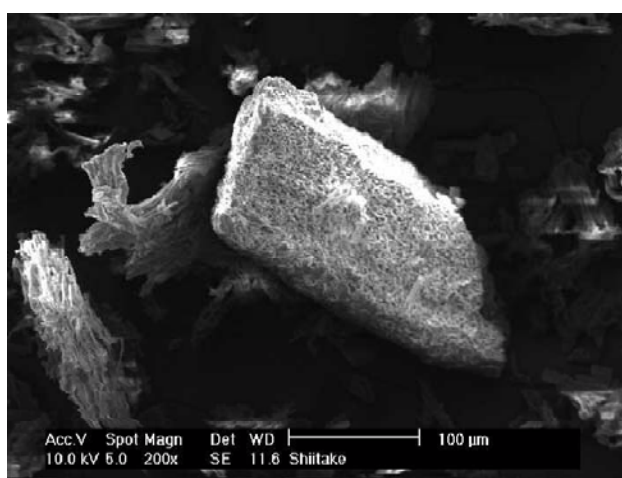


Figura 12– Micrografia de partículas de shiitake com um aumento de 200 x.

O diâmetro médio de partícula, para a amostra de shiitake foi determinado com o auxílio de um recurso do microscópio eletrônico a de varredura, a densidade real do sólido determinada por picnometria a gás hélio a densidade aparente e a porosidade do leito, calculado conforme item 4.4.2, estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Caracterização do leito de partículas.

Diâmetro médio (mm)	Densidade real (g/cm ³)	Densidade aparente (g/cm ³)	Porosidade (ε)
0,214	1,45	0,32	0,78

Estas características da matéria-prima são de importância para a aplicação do modelo de transferência de massa descrito por SOVOVÁ (1994).

5.3. ESC

Para a determinação do rendimento global de extração foram realizados experimentos a pressões de até 350 bar mantendo-se a vazão fixa em 3,33 g/min. Os experimentos foram executados em 3 horas de extração, utilizando-se meio leito sendo o restante completo com contas de vidro. A Tabela 5 mostra os resultados dos experimentos realizados com cogumelo shiitake e as condições de operação empregadas na ESC.

Tabela 5 - Rendimentos e condições de operação da ESC a vazões de 3,33 g/min.

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	ρ_{CO_2} (g/cm ³)*	X ₀ (%)
30	150	0,835	0,57
30	200	0,891	0,58
30	250	0,914	0,74
30	300	0,948	0,96
40	150	0,781	0,55
40	200	0,841	0,65
40	250	0,880	0,81
40	300	0,911	1,00
40	350	0,935	1,01
50	150	0,701	0,53
50	200	0,785	0,71
50	250	0,834	0,83
50	300	0,871	1,01

*ANGUS et al., 1976.

Os valores de rendimento da ESC apresentados na Tabela 5, e o comportamento das isotermas no rendimento total (X_0) do cogumelo shiitake com as pressões, é observado na Figura 13. Os resultados indicam um aumento no rendimento de processo com a pressão para as temperaturas estudadas de 30°C, 40°C e 50°C. Este comportamento pode ser explicado pelo aumento da densidade do solvente com a elevação da pressão.

Como descrito na seção 3.1.2, o efeito da temperatura na taxa de extração, a uma pressão constante, é devido a dois mecanismos: um aumento na temperatura do processo aumenta a solubilidade devido ao aumento da pressão de vapor do soluto e reduz a solubilidade devido à diminuição da densidade do solvente (CARVALHO JUNIOR et al., 2003).

Na Figura 13, o rendimento do óleo de shiitake diminuiu com o aumento da temperatura a 150 bar, porém aumentou para as pressões de 200, 250 e 300 bar. As isotermas mostram uma inversão entre 150 bar e 200 bar, possivelmente representando a região de retrogradação. Portanto, de acordo com os resultados da Tabela 5 e Figura 13, o efeito da densidade do solvente na solubilização do óleo de shiitake é dominante a 150 bar, enquanto que a pressão de vapor é o principal efeito no processo de solubilização na faixa de pressão de 200 a 300 bar, para as faixas de temperaturas e pressões deste estudo.

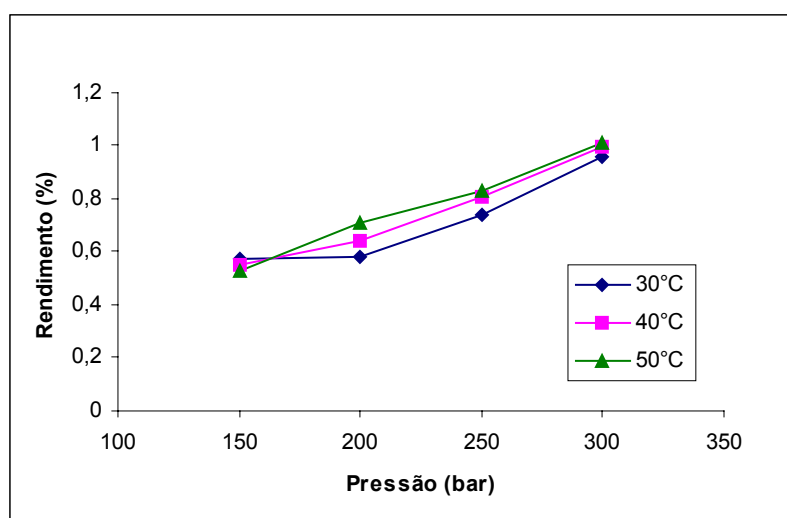


Figura 13 - Efeito da pressão no rendimento da ESC a temperatura constante: rendimento das isotermas a 30°C, 40°C e 50°C.

Estes efeitos também podem ser evidenciados através da Tabela 6 que apresenta os valores preliminares de solubilidade obtidos em diferentes condições de operação a partir das curvas de extração do óleo de shiitake. Os valores prévios de solubilidade do óleo de shiitake no dióxido de carbono a alta pressão podem ser obtidos através da etapa de taxa constante de extração conforme descrito no item 4.8.

Podemos observar a diminuição da solubilidade ao se aumentar a temperatura para a pressão de 150 bar indicando o efeito da densidade do solvente. Em contrapartida, o comportamento da solubilidade a 200 bar aumenta com o aumento da temperatura, indicando o efeito da pressão de vapor do soluto.

Os resultados da Tabela 6, obtidos com baixa vazão de solvente comprovam o comportamento da inversão das isotermas apresentado na Tabela 5 e Figura 13.

Tabela 6 – Solubilidades preliminares para cogumelo shiitake.

Exp.	T (°C)	P (bar)	Densidade (g/cm ³)	Vazão (g/min)	Solubilidade (g _{óleo} /g _{solvente}) x 10 ⁴
1	30	150	0,835	0,8	25,0
2	30	200	0,891	0,82	16,6
3	40	150	0,781	1,18	14,5
4	40	200	0,840	0,98	22,8
5	50	150	0,701	0,88	13,9
6	50	200	0,785	1,01	23,5

DANIELSKI (2002), determinou uma vazão de solvente ótima para a obtenção dos valores de solubilidade, apesar destes valores terem sido um pouco abaixo daqueles sugeridos pelo autor, considerou-se adequada para a determinação da solubilidade de óleo de shiitake.

Segundo WEINSTEIN et al. (2004) a solubilidade de sólidos em CO₂ geralmente aumenta com o aumento da pressão. Entretanto, o grau de aumento e

a magnitude do poder de dissolução do dióxido de carbono variam significativamente de componente para componente. Além disso, o efeito da temperatura (à pressão fixa) não é sempre a mesma para cada componente, e a solubilidade aumenta com o aumento da temperatura (200 bar) para alguns componentes e diminui com o aumento da temperatura (150 bar) para outros. Pode-se verificar que o maior valor de solubilidade foi obtido na condição de 30°C e 150 bar ($25,0 \times 10^{-4}$ g/g), e este valor foi empregado no modelo de transferência de massa descrito por SOVOVÁ (1994) para a modelagem de todas as curvas de extração.

5.3.1. Cinética da Extração

Para o estudo da cinética da ESC, foram realizadas curvas de extração em nas temperaturas de 30, 40 e 50°C e pressões de 150, 200, 250 e 300 bar, usando-se a vazão de solvente de 3,33 g/min e 6,67 g/min na condição de 40°C e 250 bar.

As curvas experimentais de extração foram construídas com a massa de soluto por massa de sólido versus a massa de solvente por massa de sólido ou tempo de extração. Estas curvas apresentam uma etapa de taxa constante de extração, uma de taxa decrescente e, finalmente, tendem a apresentar uma etapa de taxa nula de extração. O comportamento das curvas de extração de óleo de shiitake é apresentado na seqüência.

5.3.1.1. Efeito da vazão do solvente

O efeito da vazão de solvente nas curvas de extração pode ser observado na Figura 14 para a condição de operação de 40°C e 250 bar e vazões de solvente 3,33 e 6,67 g/min.

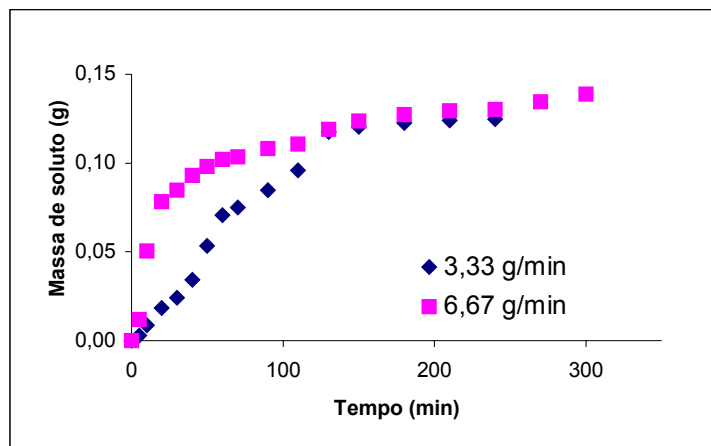


Figura 14 – Efeito da vazão do solvente – Condição de operação: P= 250 bar, T= 40°C.

O efeito da vazão do solvente é observado na Figura 14 mostra um aumento na taxa de extração com o aumento da vazão do solvente na primeira etapa da extração. A 3,33 g/min o rendimento da extração obtido a 110 min foi de 0,59 % (p/p), enquanto que a 6,67 g/min no mesmo tempo de extração o rendimento foi de 0,65%. MICHIELIN et al. (2005) observou efeito similar para a extração de oleoresina de cavalinha em CO₂ supercrítico. Pode-se observar que na maior vazão de solvente a taxa de extração foi maior na etapa CER, sendo semelhante à menor vazão quando se observa a etapa FER. Isto pode ser devido a porosidade do sólido que favoreceu a formação de canais na matriz fazendo com que o soluto seja extraído por difusão mais rapidamente nesta etapa. O óleo pode também estar em maior concentração na superfície do sólido sendo rapidamente retirado na etapa CER, aumentando assim a taxa de extração nesta etapa. Outra possível explicação pode ser devido ao efeito de arraste, que solubiliza os compostos e estes ficam presos no extrator.

5.3.1.2. Efeito da pressão

As figuras 15, 16 e 17 mostram experimentos nas temperaturas estudadas 30, 40 e 50°C, respectivamente e para as diferentes pressões de 150 a 300 bar, onde foi utilizada a vazão de 3,33 g/min na obtenção das curvas de extração de óleo de shiitake. Os gráficos foram plotados em massa de solvente por massa de sólido ($m_{slv}/m_{sól}$) e massa de soluto por massa de sólido ($m_{slt}/m_{sól}$).

Pode-se observar que quando se aumenta a pressão a temperatura constante ocorre um aumento da taxa de extração em todas as etapas do processo, conforme esperado, devido ao aumento da densidade (e poder de solvatação) do CO₂ supercrítico (YAMINI et al., 2002). Desta forma para as maiores pressões temos os maiores rendimentos. A única exceção a este comportamento foi na temperatura de 30°C e pressões de 150 e 200 bar. A curva a 150 bar apresentou um maior rendimento do que a 200 bar, este comportamento foi confirmado em outras extrações conforme apresentado em Anexo IV. Uma possível explicação para este comportamento é a proximidade do ponto crítico na temperatura de 30°C onde pequenas alterações nas condições de operação provocam grandes variações na densidade do solvente, conseqüentemente nos valores de solubilidade e rendimento.

Observando as figuras 16 e 17 podemos notar que ocorreu um aumento de rendimento com o aumento da pressão nas temperaturas de 40 e 50°C, mostrando o efeito da pressão de vapor na solubilização dos compostos do óleo de cogumelo shiitake.

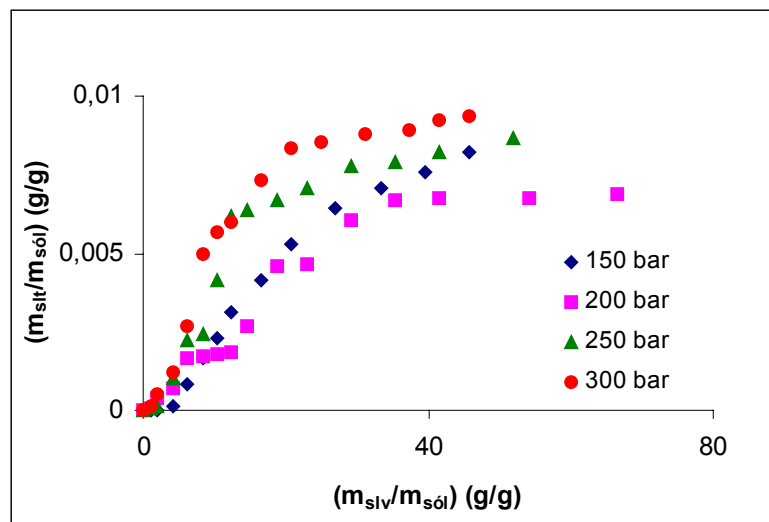


Figura 15 – Efeito da pressão em 30°C, vazão de 3,33 g/min.

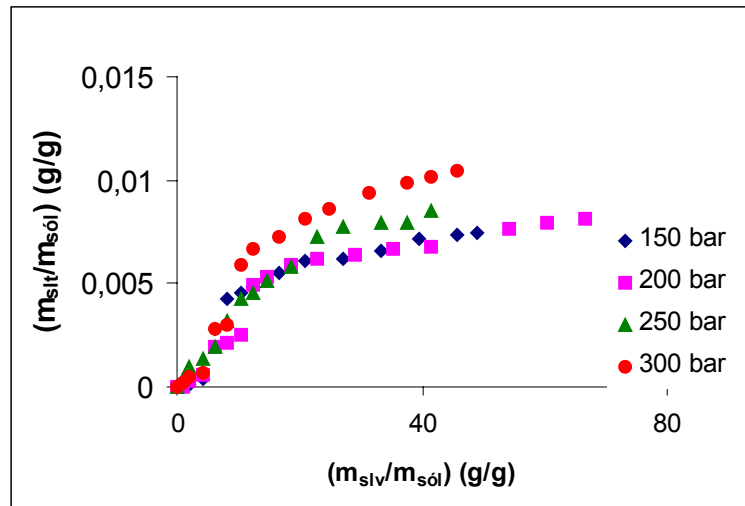


Figura 16 – Efeito da pressão em 40°C, vazão de 3,33 g/min.

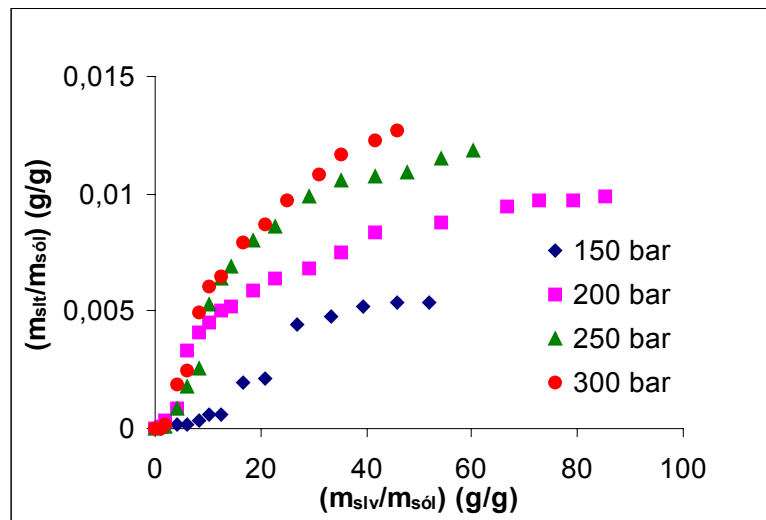


Figura 17 – Efeito da pressão em 50°C, vazão de 3,33 g/min.

5.3.2.3. Efeito da temperatura

A influência da temperatura de operação na extração de óleo de shiitake foi investigada em condições de 30, 40 e 50°C. O objetivo foi verificar a influência da temperatura quanto ao poder de solvatação do solvente que, sofre influência da temperatura mediante dois mecanismos. O primeiro devido a redução da densidade do solvente com o aumento da temperatura e o segundo com relação ao aumento da pressão de vapor do soluto (ou volatilidade) com o aumento da temperatura. Estes dois efeitos são contrários e a influência da temperatura na

curva de extração é ditada pelo efeito sobre o poder de solvatação do solvente (JOCHMANN, 2000).

As figuras 18, 19, 20 e 21 apresentam as curvas de extração para as condições de 150, 200, 250 e 300 bar, respectivamente e vazão de 3,33 g/min para as três temperaturas estudadas.

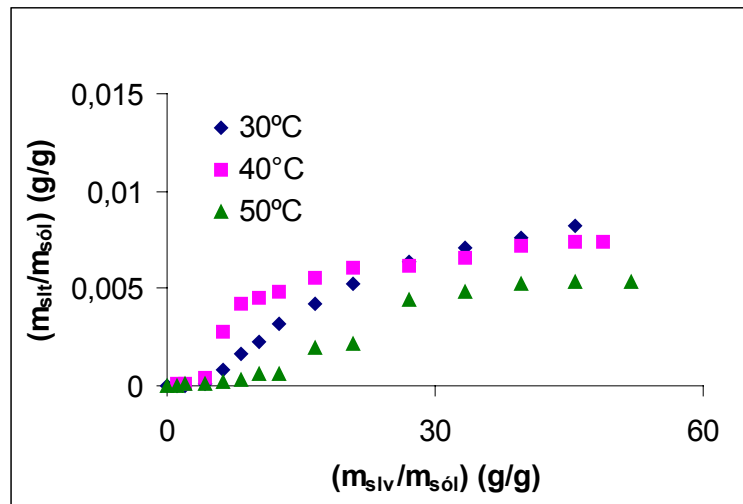


Figura 18 – Efeito da Temperatura em 150 bar.

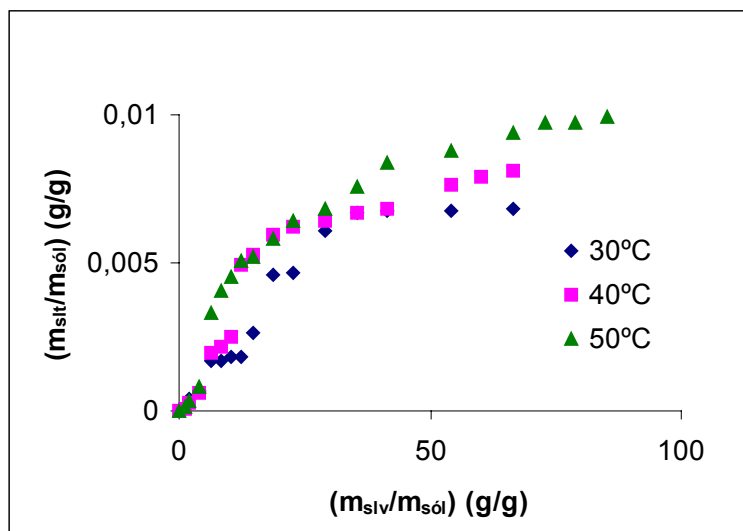


Figura 19 – Efeito da Temperatura em 200 bar.

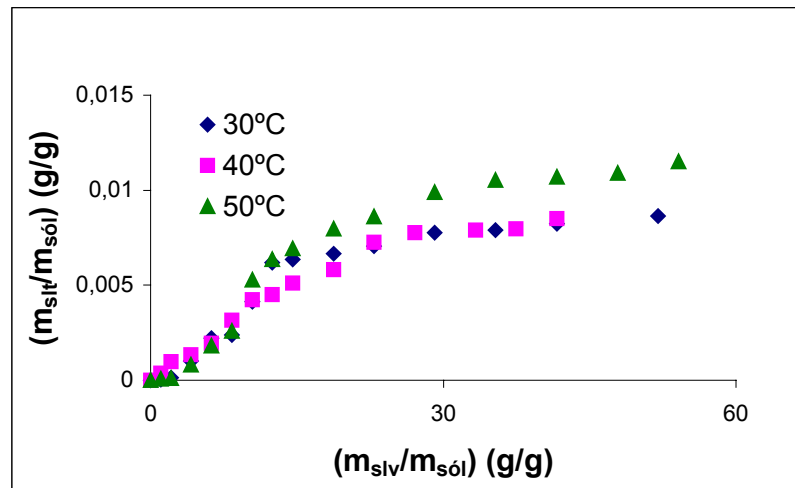


Figura 20 - Efeito da Temperatura em 250 bar.

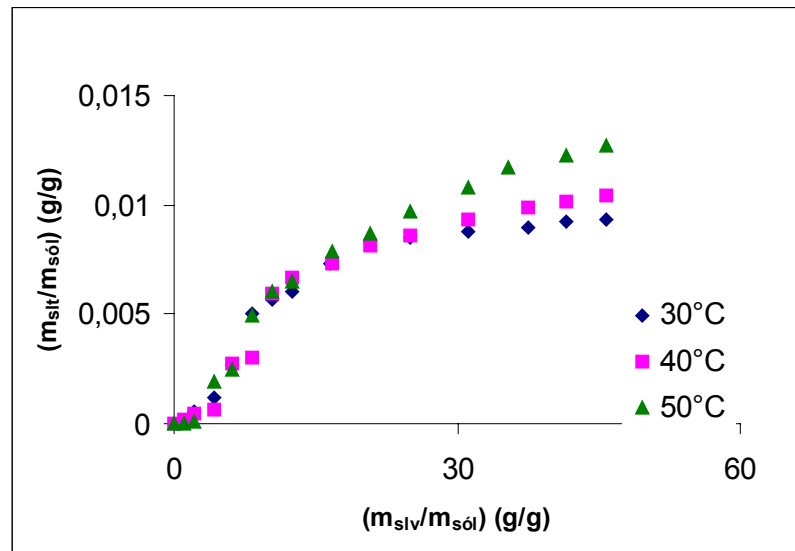


Figura 21 - Efeito da Temperatura em 300 bar.

Segundo YAMINI et al., (2002) uma variação da temperatura durante a ESC afeta a densidade do fluido, a propriedade volátil do soluto, e a desorção dos componentes da matriz.

A uma alta temperatura, o soluto torna-se mais volátil, mas a densidade do CO_2 diminui, e um aumento na eficiência da extração ao se aumentar a temperatura pode ser dependente do peso molecular, o que é relatado para a pressão de vapor da molécula.

Os dados experimentais referentes às curvas de extração estão apresentados no Anexo V.

5.3.2. Modelagem Matemática

5.3.2.1. Determinação das variáveis do modelo

Para a aplicação dos modelos de transferência de massa descritos por SOVOVÁ (1994) e MARTÍNEZ et al., (2003), é necessário o conhecimento do teor inicial do óleo presente na matriz sólida (x_0). Para a obtenção dos valores de x_0 para a aplicação dos modelos de transferência de massa foram consideradas duas metodologias, segundo SILVA (2004): dados experimentais de x_0 obtidos conforme resultados da Tabela 5 e valores de x_0 obtidos diretamente da curva de extração a ser modelada. Este valor é determinado com base no rendimento das curvas de extração e rendimento de processo (Tabela 5) considerando que a massa extraída equivale a 90% do total de soluto presente na matriz sólida (MICHIELIN, 2002; FERREIRA, 1996).

Para avaliar a eficiência dos modelos foram consideradas as curvas de extração obtidas nas condições de 40°C e 300 bar e 50°C e 300 bar com vazão de solvente de 3,33 gCO₂/min.

Assim, para calcular o conteúdo de óleo extraível (x_0) obtido da Tabela 5 que apresenta os valores de rendimento global de extração (X_0), que corresponde a 90% do total de soluto presente na matriz sólida no início do processo, considerando que a taxa nula foi alcançada. O rendimento de extração obtido foi de 0,1703 g de óleo para 40°C e 300 bar e 0,1732 g para 50°C e 300 bar obtemos os seguintes valores: para o teor inicial de óleo no sólido $O = 0,1892$ e $O = 0,1924$, respectivamente, para a massa de inerte $N = 16,8228$ e $16,3619$, respectivamente. Para tanto, os valores de x_0 para a curva 40°C e 300 bar é $0,0114 \text{ g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{sólido}}$ e 50°C e 300 bar é de $0,0118 \text{ g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{sólido}}$.

Para x_0 obtido da curva, com rendimento de extração de 0,1675 g de óleo para 40°C e 300 bar e 0,2031 g para 50°C e 300 bar obtemos os seguintes valores: para o teor inicial de óleo no sólido de $O = 0,1842$ e $0,2256$, respectivamente, para a massa de inerte $N = 16,0097$ e $16,0028$,

respectivamente. Os valores de x_0 são obtidos pela relação de O (teor inicial de óleo) e N (massa de inerte, empregada no empacotamento do leite). O x_0 para a curva 40°C e 300 bar é 0,0116 g_{óleo}/g_{sólido} e para a curva de 50°C e 300 bar é de 0,0142 g_{óleo}/g_{sólido}.

Para a aplicação do modelo foram empregados os seguintes parâmetros de processo descritos na seção 4.6: M_{CER} , Y_{CER} , t_{cer} , Q_{CO_2} .

Os valores de t_{CER} são obtidos através do ajuste das curvas de extração através do Programa SAS, e representa o tempo de duração da etapa de taxa constante de extração obtido pela interseção destas retas, introduzindo t_{CER} e a equação (VIII) na equação (X) obtêm-se o valor de X_p (óleo de fácil acesso) e com este o valor de X_k (óleo de difícil acesso) pela equação (XI). As equações para a aplicação do modelo de SOVOVÁ estão no Anexo II.

O parâmetro M_{CER} (taxa de extração na etapa CER) é o valor da tangente da reta ajustada na etapa CER da curva de extração e a partir do mesmo obtêm-se o valor de Y_{CER} (concentração de soluto na fase solvente na etapa CER) através da equação (IX). Os resultados das análises estatísticas para a determinação dos parâmetros t_{CER} , M_{CER} e Y_{CER} , os gráficos de ajuste de cada experimento e os dados experimentais das extrações realizadas estão disponíveis em Anexo VI.

O modelo de Martínez considera o soluto como um simples componente sendo os dados experimentais das curvas de extração representados pela equação (IX), onde dois parâmetros são ajustados pelo modelo (b e t_m). As equações estão no Anexo III.

As equações dos modelos utilizados foram solucionadas através do programa MATLAB R12 (CAMPOS et al., 2005).

Os parâmetros de processo (parâmetros cinéticos) para o modelo de Sovová e Martínez foram calculados através do Software Estatístico SAS 8.2 e os valores para M_{CER} , Y_{CER} , t_{CER} , X_k , K_{Ya} e K_{Xa} são apresentados na Tabela 7. As curvas ajustadas pelo SAS estão no Anexo VI.

Tabela 7 - Parâmetros para a aplicação dos modelos de Sovová e Martínez.

Exp.	t_{CER} (min)	$M_{CER} \times 10^8$ (Kg/s)	$Y_{CER} \times 10^3$ (Kg/Kg)	$X_k \times 10^2$ (min^{-1})	$K_{Ya} \times 10^2$ (min^{-1})	$K_{Xa} \times 10^3$ (min^{-1})	$bx \times 10^3$ (min^{-1})	t_m (min)
40/300	68,92	3,083	5,549	0,0071	0,0086	0,0020	0,0320	39,2603
40/300*	68,92	3,083	5,549	0,0012	0,0086	0,0014	0,0320	39,2603
50/300	67,38	3,267	5,886	0,0074	0,0089	0,0020	0,0186	8,3811
50/300*	67,68	3,267	5,886	0,0098	0,0089	0,0017	0,0186	8,3811

* Dados para a curva modelada com x_0 da curva.

As Figuras 22 e 23 mostram a modelagem da curva de extração utilizando o modelo de Sovová e modelo Logístico (Martinez) e com o valor de x_0 da Tabela 5 e com um x_0 da curva. As curvas são graficadas em função da massa acumulada de óleo versus tempo de extração.

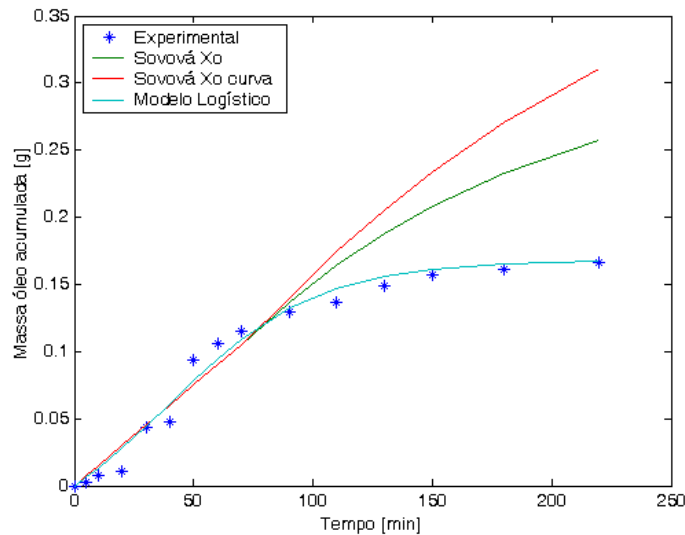


Figura 22 - Dados experimentais e curvas resultadas dos modelos: 40°C, 300 bar e 3,33 g/min, modelada com o $x_0 = 0,0114$ e o $x_0 = 0,0116$ da curva.

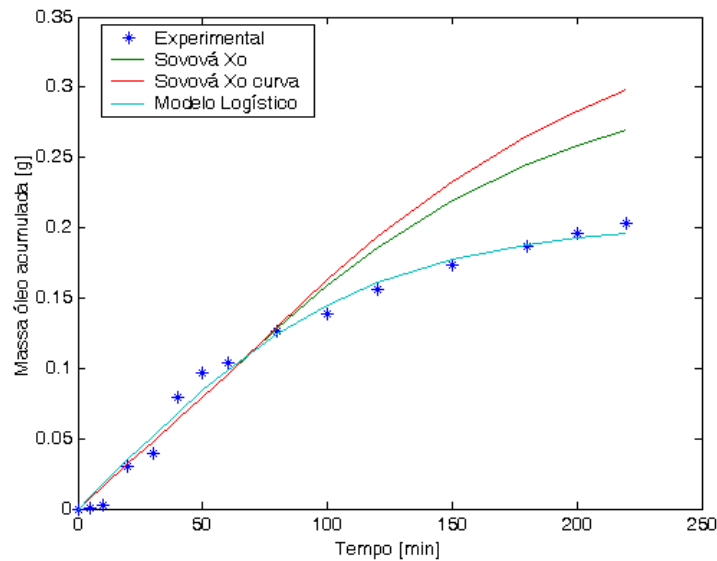


Figura 23 - Dados experimentais e curvas resultadas dos modelos: 50°C, 300 bar e 3,33 g/min, modelada com o $x_0 = 0,0118$ e o $x_0 = 0,0142$ da curva .

Analisando as Figuras 22 e 23 onde se empregou um valor de $x_0 = 0,0114$ e de $x_0 = 0,0118$, respectivamente referente ao valor de x_0 apresentados na Tabela 5 conforme descrito na seção 5.3. Pode-se notar que o modelo de SOVOVÁ representou bem os dados experimentais referentes à etapa CER, evidenciando que os valores de solubilidade preliminares (item 5.3) foram adequados para a representação das curvas de extração.

Os resultados dos valores de x_0 calculados a partir da Tabela 5 e da curva, demonstraram que após a etapa CER (a partir de 90 min) a curva apresentou grande desvio entre os pontos experimentais, e as curvas modeladas indicando que as considerações para a determinação de x_0 e conseqüentemente X_p e X_k , podem não ser válidas para todas as faixas de condições experimentais. O modelo subestima a resistência interna à transferência de massa. WEINHOLD (2003), observou o mesmo comportamento ao usar o modelo de Sovová para modelar as curvas de extração de avenca-da-praia. Este comportamento é devido também a complexidade dos mecanismos de transferência de massa que atuam nesta etapa de extração. Na etapa FER há o início do processo difusivo que possui definição baseada nas funções de x_0 , X_p e X_k . Destaca-se também o fato do cogumelo shiitake apresentar um baixo conteúdo de extrato.

Assim foi empregado o valor de x_0 de 0,0142 e 0,0116 para as condições 40°C e 300 bar e 50°C e 300 bar, que representam o x_0 da curva de extração. Através da análise da figura 22 e 23 utilizando os novos valores de x_0 pode-se verificar um comportamento semelhante ao x_0 experimental, evidenciando que na curva de extração foi possível atingir o x_0 , ou seja, houve reprodutibilidade dos resultados.

O modelo de Sovová (1994), apresenta bons resultados quando as curvas experimentais têm um período de taxa constante de extração bem definido no seu início, e sua principal vantagem é a descrição do fenômeno que ocorre no processo de ESC que dá um claro significado físico aos parâmetros ajustáveis. Por outro lado, este modelo é limitado aos sistemas onde a solubilidade do soluto no solvente é conhecida à temperatura e pressão do processo (SOUSA et al., 2004).

O modelo de MARTÍNEZ et al. (2003) forneceu o melhor ajuste para os dados experimentais. Segundo SOUSA et al. (2004) os modelos com dois parâmetros ajustáveis foram hábeis para obter os melhores ajustes dos dados experimentais, mas a razão para estes resultados não deve ser limitada somente ao número de parâmetros, mas também a uma boa identificação das etapas de extração.

O modelo de Martinez é útil para descrever as curvas de extração onde a taxa de extração tem um lento aumento no seu início, antes de atingir o valor constante.

Os parâmetros ajustados pelo modelo de Sovová podem ser analisados, observando a Tabela 9. Pode-se verificar que os valores de K_{Ya} (coeficiente de transferência da massa na fase fluida) foram maiores que os valores de K_{Xa} (coeficiente de transferência de massa na fase sólida), evidenciando que a transferência de massa é predominante na fase fluida, ou seja, o efeito dominante é o efeito convectivo.

A Tabela 8 apresenta o erro médio quadrático para cada modelo utilizado para descrever as curvas de extração do cogumelo shiitake.

Tabela 8 - Erros médios quadráticos entre os resultados experimentais e modelados das curvas de extração do óleo de shiitake.

Exp.	Sovová	Martínéz
40/300	0,0013	$7,8205 \times 10^{-5}$
40/300*	0,0030	$7,8205 \times 10^{-5}$
50/300	0,0011	$6,2761 \times 10^{-5}$
50/300*	0,0019	$6,2761 \times 10^{-5}$

De acordo com a Tabela 8 o menor erro médio quadrático para todos os experimentos foi obtido com a utilização do modelo Logístico de Martinez, provavelmente porque este modelo possui dois parâmetros ajustáveis, b e tm, ao contrário do modelo de Sovová que não apresenta nenhum parâmetro ajustável. O modelo de Sovová apresentou os maiores erros por apresentar um grande desvio entre os dados experimentais e as curvas modeladas na etapa FER.

5.4. Extração com solventes orgânicos (ELL)

As frações de diferentes polaridades obtidas na etapa da extração líquido-líquido (ELL) foi comparada a extração supercrítica em relação a rendimento e composição dos extratos.

5.4.1. Rendimento das extrações

A extração convencional com solventes orgânicos é realizada através da maceração a frio da amostra por seis dias, evitando assim a degradação de compostos termolábeis, consistindo na extração sólido-líquido. O extrato bruto após filtração é concentrado até 10% do seu volume e então fracionado com solventes em escala ascendente de polaridade, é obtido através da extração líquido-líquido. Os solventes comumente empregados são: n-hexano, diclorometano, acetato de etila, e água. Para avaliar a influência do solvente na extração, o processo de ESC foi comparado com o processo de extração líquido-líquido (ELL).

A Tabela 9 mostra os valores dos rendimentos da extração líquido-líquido da extração de cogumelo shiitake.

Tabela 9 - Rendimentos para diferentes frações dos solventes empregados.

Extração Líquido-líquido	
Solventes	Rend. (%)
n-Hexano	1,25
Diclorometano	0,23
Acetato de Etila	0,07
Fração Aquosa	0,94

Os maiores rendimentos da extração líquido-líquido foram obtidos nas fases n-hexano e aquosa, 1,25% e 0,94%, respectivamente, que podem ser comparadas em termos de magnitude à extração supercrítica nas condições 30°C e 300 bar (0,96%), 40°C em 300 bar e 350 bar (1,00 e 1,01%, respectivamente) e 50°C e 300 bar (1,01%). As frações diclorometano e acetato de etila apresentaram rendimentos muito inferiores aos da extração supercrítica possivelmente porque a matéria-prima contém baixa quantidade de compostos polares. Isto pode indicar a presença de mais compostos apolares que foram extraídos na fração n-hexano e nos extratos obtidos por ESC.

5.5. ESC e co-solvente

A seleção dos solventes etanol, diclorometano e acetato de etila para serem empregados como co-solvente de extração para o óleo de shiitake, foi baseado nos resultados da extração com solventes orgânicos e nos resultados de atividade antioxidante obtidos na fração diclorometano e acetato de etila (descritos na seção 4.9).

Para aumentar a polaridade do fluido supercrítico o solvente etanol (etOH) de polaridade 5,2 foi usado como co-solvente nas concentrações de 5, 10 e 15% (p/p), acetato de etila (AE) de polaridade de 4,3 foi testado apenas a 15% e diclorometano (DCM) com polaridade de 3,4 foi testado nas concentrações de 10,

15 e 20% na ESC. A condição de 40°C, 200 bar e vazão de 1,35 g/min de CO₂ foi empregada nas extrações com os solventes DCM e AE, utilizando o equipamento 1. Para o emprego do etanol como co-solvente foi empregado o equipamento 2 devido a problemas encontrados na unidade 1. Então as condições de operação para o equipamento 2 empregando o etanol como co-solvente foram 40°C, 200 bar e vazão de solvente de 3,33 g/min. A Tabela 10 apresenta os rendimentos obtidos nas extrações com os co-solventes empregados.

Tabela 10 - Rendimentos das extrações usando etOH, DCM e AE como co-solventes a 40°C e 200 bar (ESC1 – equipamento 1 e ESC2 – equipamento 2).

Concentração de co-solvente (%)	Vazão de CO ₂ (g/min)	Rendimento (% p/p)
ESC1 com CO ₂	0,72	0,48
ESC2 com CO ₂	3,33	0,65
ESC2 com EtOH (5%)	3,33	1,08
ESC2 com EtOH (10%)	3,33	2,67
ESC2 com EtOH (15%)	3,33	3,81
ESC1 com DCM (10%)	1,20	0,57
ESC1 com DCM (15%)	1,15	0,85
ESC1 com DCM (20%)	1,35	0,61
ESC1 com AE (15%)	1,35	0,91

A figura 24 mostra o comportamento da curva de rendimento versus a concentração de co-solvente etanol utilizada.

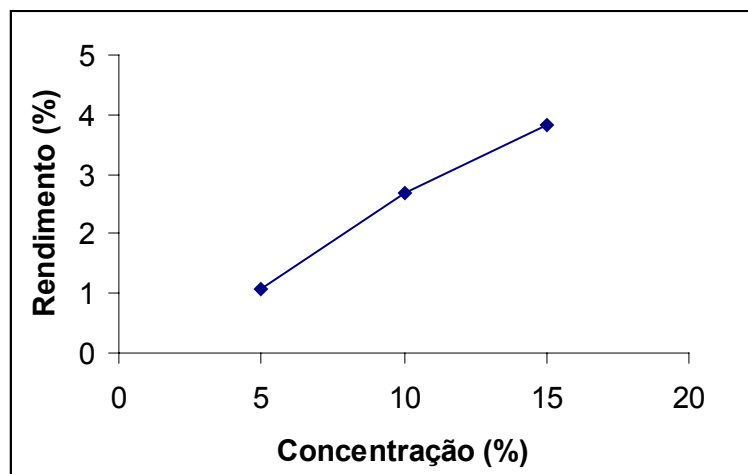


Figura 24 - Curva de rendimento de extração utilizando três concentrações de co-solvente etanol.

Como visto na Tabela 10 o rendimento da extração, aumentou com o aumento da concentração de etanol. LIM et al. (2002) atribuíram o efeito no rendimento da extração pela adição do co-solvente a um aumento da solubilidade do CO_2 e ao fato de que o co-solvente causa um inchamento da matriz sólida, aumentando assim a superfície de contato entre o solvente supercrítico e a matriz. EYCHENNE et al. (2001), discutem o fato do etanol ser um doador de ligações com hidrogênio, sendo que uma melhor extração pode ser explicada por uma afinidade maior dos grupos hidroxilas do etanol e a carbonila, e os grupos hidroxilas dos ésteres e compostos hidroxilados da lanolina, composto estudado em sua pesquisa.

O rendimento do ESC+ DCM apresentou um rendimento de 0,85% e com o AE o rendimento foi de 0,91% a 15% de co-solvente. Ambos os resultados foram superiores ao encontrado utilizando somente o CO_2 (0,48%). A curva de rendimento de extração utilizando três concentrações de diclorometano está apresentada no Anexo VII. Pode-se observar que o rendimento diminui ao se aumentar a concentração de diclorometano a 20%. Isto pode ser devido a outros tipos de interações que ocorrem entre este solvente e o soluto da matriz sólida. Interações dipolo-dipolo ocorrem em substâncias polares como diclorometano e acetona (CHEMICAL FORCES, 2005).

YAMINI et al. (2002), utilizaram metanol como co-solvente para a extração de duas drogas esteróides, a medroxyprogesterona acetato (MED) e a cyproterona acetato (CYP). Os resultados indicaram que ao se aumentar o volume de metanol de 50 (5%) para 100 μ L (10%) resultou numa diminuição drástica na extração de MED (P de 300 bar e 348 K). Em suas conclusões atribuíram este fato a novas interações de soluto com o modificador o qual enfraqueceu as interações soluto/CO₂ supercrítico. Para a droga CYP a melhor concentração de co-solvente foi de 10% de metanol (P de 100 bar e 308K), evidenciando assim que há uma T, P e % de co-solvente ótimos para cada tipo de compostos que se deseja extrair.

WONG & WANG (2001), estudando a extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) na gasolina relataram que LANGEENFELD et al. (1994) examinado a eficiência de solventes orgânicos como modificadores em ESC, concluíram que as propriedades químicas dos co-solventes tem um maior impacto no aumento da eficiência da extração de PAHs do que a concentração do modificador.

Então possivelmente a diminuição do rendimento com relação ao DCM pode ser devido ao fato que a concentração de 20% empregada provocou a formação de novas interações do soluto com o co-solvente enfraquecendo as interações com o CO₂ resultando numa diminuição no rendimento da extração. Esta diminuição pode ter ocorrido somente em alguns compostos que apresentaram interação com o co-solvente. Já no emprego do etanol a concentração de 15% foi a concentração que possivelmente ainda permitiu as interações do soluto com o fluido supercrítico. Necessitando assim do emprego de uma concentração maior de co-solvente para confirmar esta suposição.

5.6. Determinação da composição dos extratos

5.6.1. Composição dos extratos da ESC empregando a condição cromatográfica 1

Para avaliar o efeito das seguintes variáveis: temperatura, pressão e tempo de extração, na composição do óleo de shiitake foram empregadas a análise por

cromatografia gasosa e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

As amostras de óleo foram obtidas em diferentes condições de temperatura e pressão, bem como em diferentes etapas da curva de extração. Os cromatogramas apresentados a seguir mostram a influência da temperatura, pressão no perfil de composição dos extratos supercríticos. O Anexo VIII apresenta o resultado das análises cromatográficas referentes ao tempo de extração.

Os resultados da análise dos extratos obtidos na ESC em pressão de 250 bar, vazão de 3,33 g/min e 3 horas de extração são apresentadas nas Figuras 25 e 26, nas temperaturas de 40 e 50°C, respectivamente.

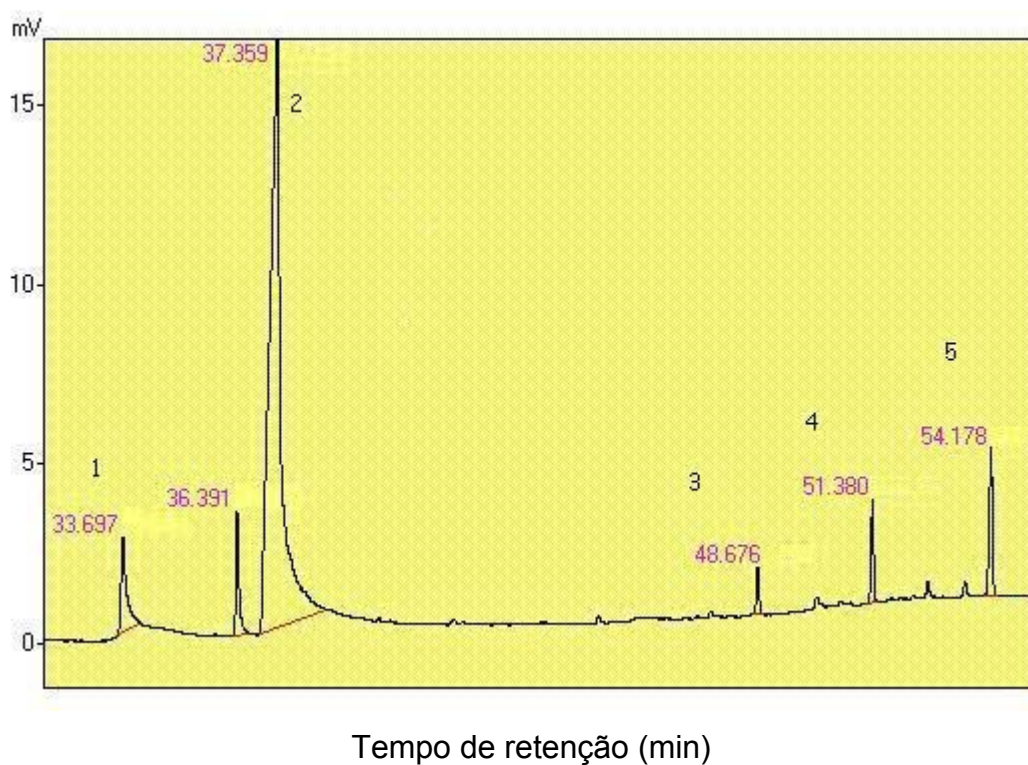


Figura 25 – Cromatograma obtido a 250 bar, 40°C, vazão de 3,33 g/min.

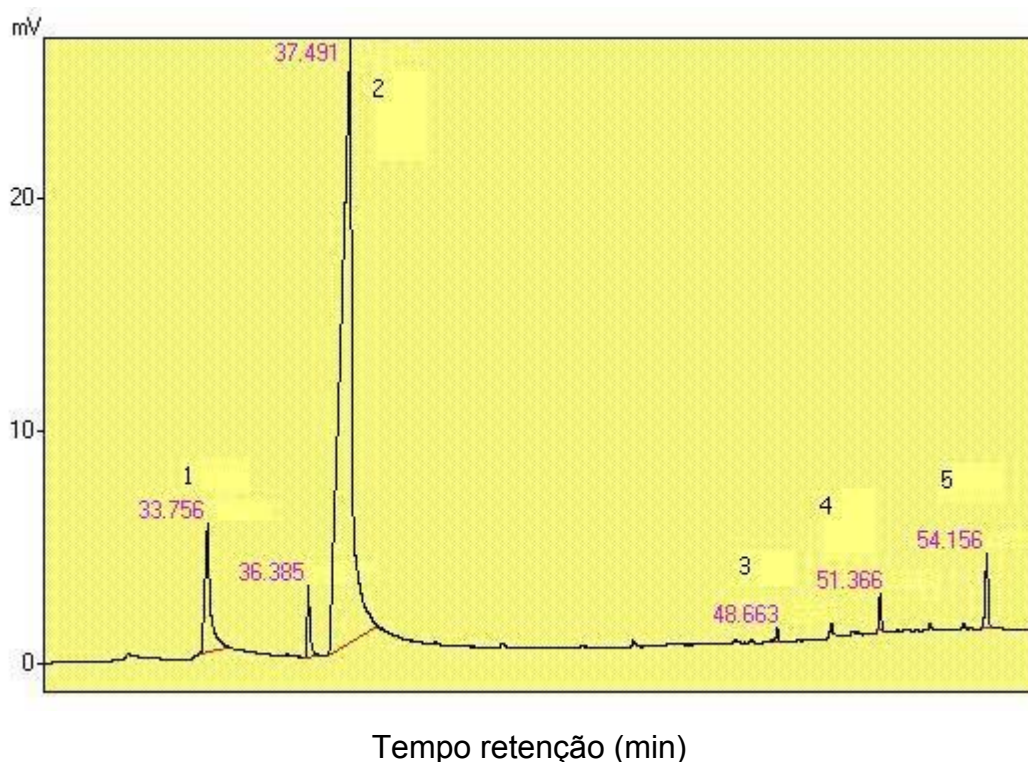


Figura 26 – Cromatograma obtido a 250 bar, 50°C, vazão de 3,33 g/min.

Observando as figuras acima se nota a similaridade entre os cromatogramas, destacando-se a reprodutibilidade dos compostos detectados na análise. Assim, visualmente observamos que a temperatura praticamente não influenciou na composição dos extratos obtidos a 250 bar.

Comparando a Tabela 11 com a Figura 26 na temperatura de 50°C e 250 bar, com vazão de 3,33 g/min e 3 horas de extração, observamos que a pressão de 250 bar parece extrair um maior número de compostos referentes a pressão de 300 bar, pelo menos em relação aos componentes detectáveis pela análise cromatográfica realizada.

Os picos referentes aos tempos de retenção de 36,391 e 36,385 (figuras 25 e 26, respectivamente) são referentes ao padrão interno metil éster (49,5 µg) injetado com a amostra, (conforme citado na seção 4.10.2) permitindo assim a adequada quantificação dos componentes dos extratos. Os compostos foram identificados por comparação dos espectros com o banco de dados NIST. A Tabela 11 mostra os compostos identificados e as quantidades de cada composto

em comparação com o padrão interno injetado para os cromatogramas apresentados acima.

Tabela 11 – Compostos identificados no óleo de shiitake nos extratos obtidos pela ESC e empregando a condição cromatográfica 1.

Picos	Componentes	Quantidade (μg)		
		T ($^{\circ}\text{C}$)/P (bar)		
		40/250	50/250	50/300
1	Ácido Palmítico (n-hexadecanoico)	69,47	183,1	481,1
2	Ácido α - linoleico (ácido 9,12-octadecadienóico)	886,48	1721,45	4393,05
3	Ergosterol	15,85	7,43	-
4	5-Metil-octadecano	34,07	21,05	-
5	n.i.	6,02	53,65	-

n.i. não identificado

Analisando a quantidade (expressa em microgramas) de cada composto em relação ao padrão injetado pode-se observar que com o aumento da temperatura ocorreu um aumento da quantidade dos compostos 1, 2 e 5 extraídos. Dentre os compostos identificados destaca-se a presença de ácidos graxos (palmítico e linoléico) com função de reduzir a pressão sanguínea, agregação plaquetária e estimular o sistema imunológico (GREGÓRIO et al., 2002) e do ergosterol (pró-vitamina D), que tem aumenta a capacidade de absorção de cálcio e fósforo auxiliando na formação dos ossos. Observando a influência da pressão empregada na extração podemos verificar que ao se aumentar a pressão de 250 bar para 300 bar na temperatura de 50°C foi possível identificar menos compostos, observando-se apenas os ácidos graxos palmítico e linoléico, presentes em quantidades bem superiores às obtidas a 250 bar.

Com relação à influência do tempo de extração podemos verificar que o ácido palmítico e um composto não identificado denominado de n.i. são extraídos em maior quantidade nos primeiros 120 minutos da extração sendo esgotado ao longo da extração, o composto n.i. é extraído somente na primeira fração de 1-

120 minutos. O ácido linoléico tem um aumento na quantidade extraída até a segunda fração referente a 240 minutos de extração e tem uma diminuição ao longo do tempo. A Figura 27 mostra o comportamento da quantidade extraída dos compostos ácido palmítico, ácido linoléico, ergosterol, e 5-metil-octadecano e um compostos não identificado (n.i.). Os cromatogramas estão apresentados no Anexo VIII.

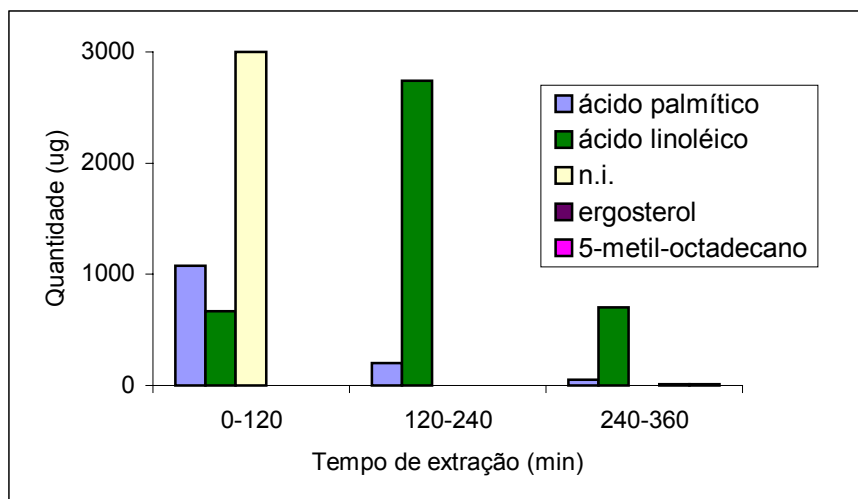


Figura 27 – Efeito da composição do óleo de cogumelo shiitake (40°C e 250 bar, 3,33 g/min).

Os compostos ergosterol e 5 – metil – octadecano são extraídos somente na última fração referente ao tempo de 240-360 minutos.

5.6.2. Composição dos extratos da ESC empregando a condição cromatográfica 2

Em virtude do número reduzido de compostos obtidos na condição cromatográfica 1, foi empregado um novo programa de temperatura como descrito na seção 4.10.1, que foi denominado de condição cromatográfica 2.

As Figuras 28, 29, 30 e 31 mostram os cromatogramas dos extratos submetidos a condição cromatográfica 2. As amostras foram coletadas com tempo de 3 horas de extração.

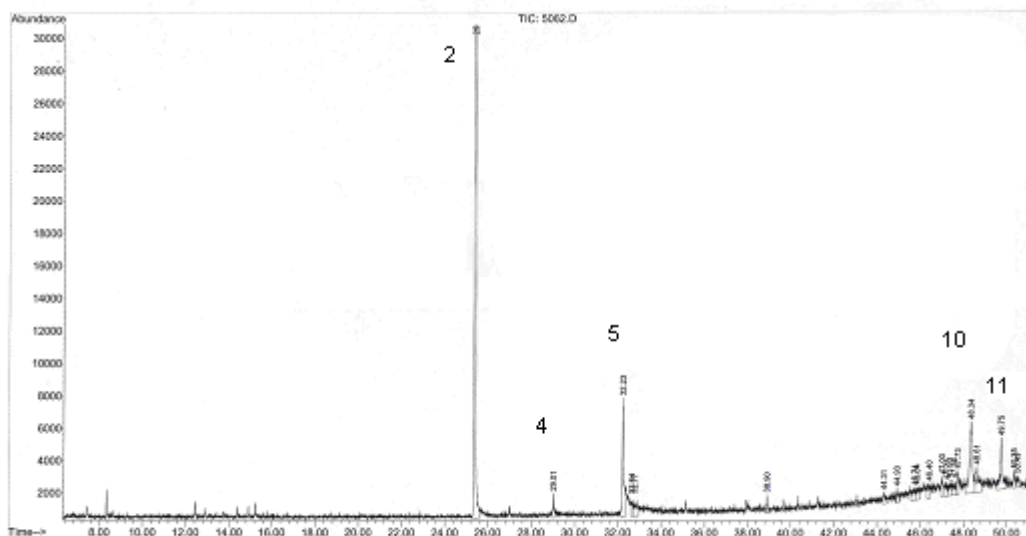


Figura 28 – Cromatograma obtido a 40°C e 150 bar, vazão de 3,33 g/min.

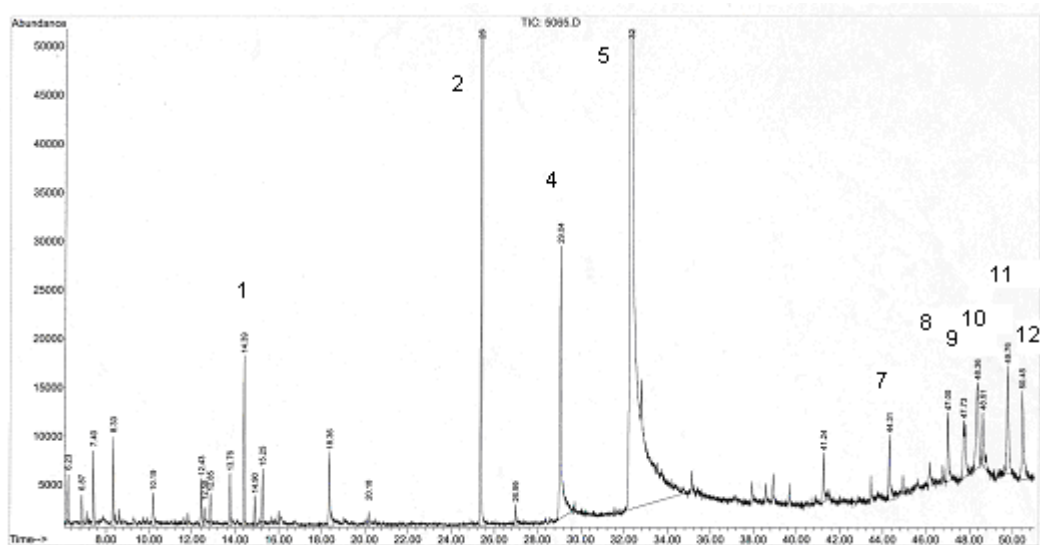


Figura 29 – Cromatograma obtido a 40°C e 350 bar, vazão de 3,33 g/min.

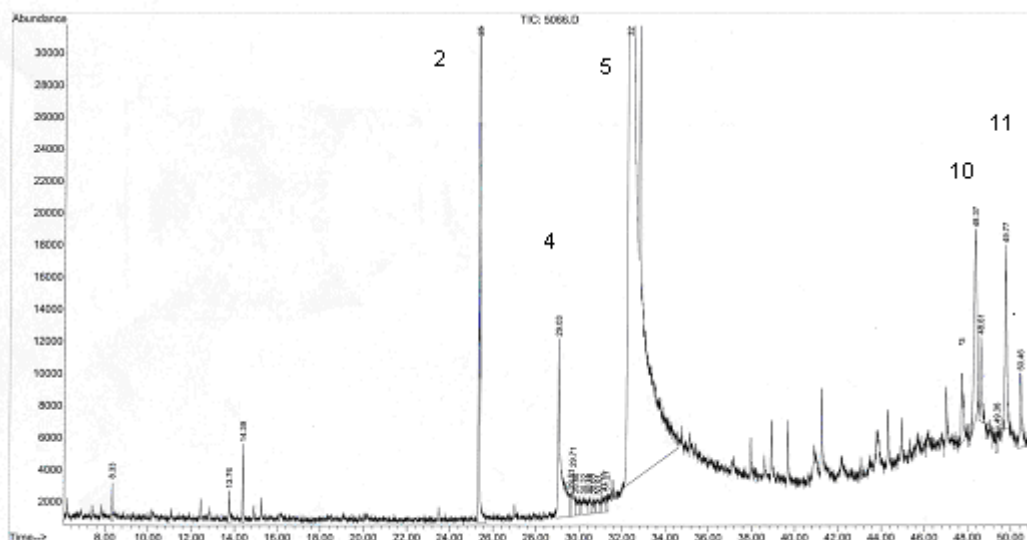


Figura 30 – Cromatograma obtido a 30°C e 300 bar, vazão de 3,33 g/min.

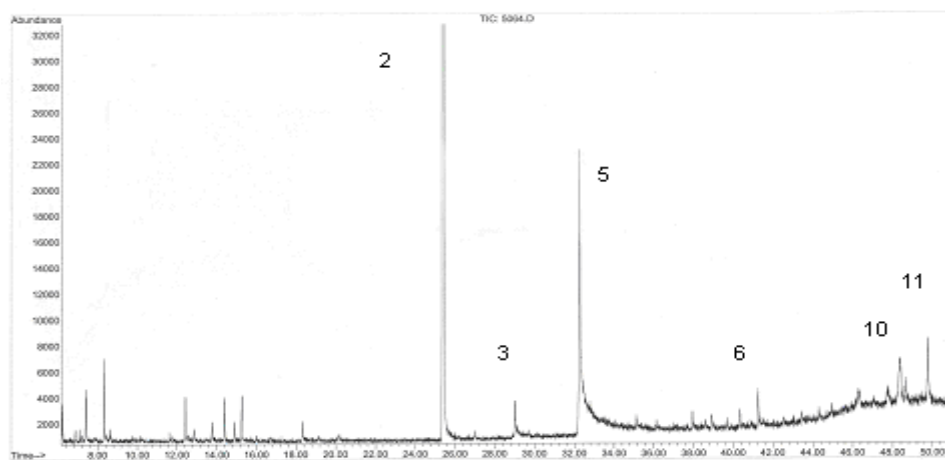


Figura 31 – Cromatograma obtido a 50°C e 200 bar, vazão de 3,33 g/min.

A Tabela 12 mostra o perfil de composição dos extratos submetidos a condição cromatográfica 2. A composição para estes extratos é aproximada, para a identificação e quantificação completa é necessário a injeção de padrões internos sendo os resultados expressos apenas em relação aos compostos identificados e/ou detectados nesta análise.

Tabela 12 - Componentes identificados no óleo de shiitake para as amostras submetidas à condição cromatográfica 2.

Picos	TR (min)*	Componentes	Área de pico (%)			
			T (°C)/ P (bar)			
			40/150	40/350	30/300	50/200
1	14,388	2,4-decadienal	-	2,67	-	-
2	25,375	N-butil benzenosulfonamida	91,17	20,38	14,65	86,56
3	29,006	4-hexadecanol	-	-	-	0,87
4	29,033	Ácido Tridecanóico	0,40	7,01	1,73	-
5	32,221	Ácido α - linoleico (ácido 9,12-octadecadienóico)	3,13	53,56	75,15	9,41
6	41,228	24,25-dihydroxycholecalciferol	-	-	-	1,53
7	44,306	8-metil-heptadecano	-	1,69	-	-
8	46,593	Ácido esteárico (ácido octadecanóico)	-	2,83	-	-
9	47,728	Cholesta-5,17(20),24-trien-3-ol, (3 β)	-	4,34	-	-
10	48,363	Ergosterol	3,64	1,28	5,02	0,40
11	49,759	4-Cholesten-3 β -ol	1,64	3,42	3,43	1,20
12	50,452	5-Metil-octadecano	-	2,77	-	-
n.i.	-	Componentes não identificados	-	9,09	4,59	4,84

*Tempo de Retenção

Aplicando-se um novo programa de temperatura foi possível a identificação de um maior número de compostos. O extrato que apresentou o maior número de compostos detectados na presente análise foi na temperatura de 40°C e pressão de 350 bar.

Pode-se verificar que aumentando a pressão de 150 bar para 350 bar houve um aumento do número de compostos, e comparando-se com as análises obtidas na condição 1, verificou-se que esta condição permitiu a separação de um maior número de compostos, isso pode ser devido ao maior tempo de análise promovido pela condição 2.

Os compostos 2, 5,10 e 11 foram encontrados em todos os extratos e dentre os compostos identificados, podemos destacar a presença de ácidos graxos linoléico e esteárico. O ácido linoléico apresentou uma porcentagem de área superior nas maiores pressões empregadas. Ao aumentar a pressão de 150 bar para 350 bar a porcentagem de área do ácido linoléico aumentou de 3,13 para 53,56%, respectivamente. O ácido graxo esteárico, 2,4-decadienal, 8-metil-heptadecano, cholesta-5,17(20),24-trien-3-ol, (3 β) e 5-metil-octadecano foram somente identificados na maior pressão empregada para a temperatura de 40°C. Os compostos 4-hexadecanol e 24,25-dihydroxycholecalciferol foram identificados apenas a 50°C e 200 bar. O composto 2 apresenta uma natureza plastificante, possivelmente devido a alguma contaminação durante a extração ou análise cromatográfica.

Em virtude da inexistência de dados em literatura referentes a extração supercrítica de cogumelo shiitake não foi possível comparar os compostos detectados neste trabalho com resultados de outros trabalhos.

As estruturas químicas, pesos moleculares, e fórmula molecular estão apresentadas no Anexo IX.

5.6.3. Determinação da composição dos extratos da ELL

Para avaliar o efeito da polaridade dos solventes e da interação soluto/solvente na composição dos extratos, as frações diclorometano e acetato de etila obtidas na extração com solventes orgânicos (ELL) foram submetidas à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas empregando-se a condição cromatográfica 1, isto porque ao se empregar a segunda condição a amostra apresentou problemas na sua dissolução sendo impossível aplicar esta outra condição.

As Figuras 32 e 33 apresentam, respectivamente os cromatogramas das frações diclorometano e acetato de etila, obtidos por extração com solventes orgânicos, conforme procedimento de análise descrito no item 4.10.

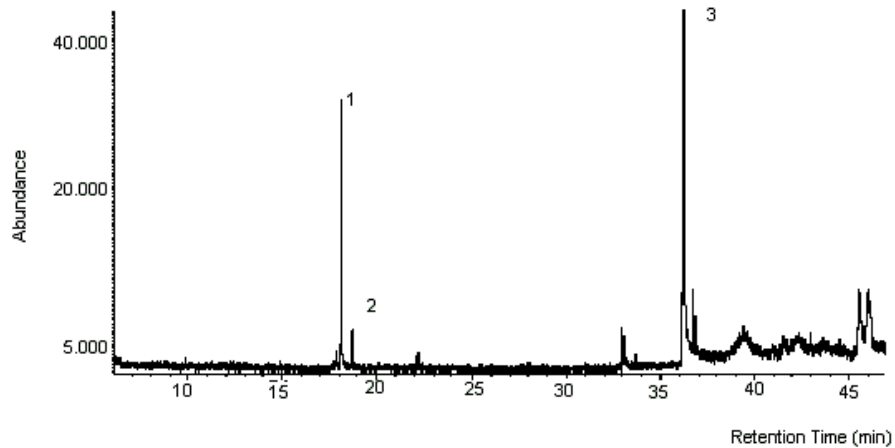


Figura 32 – Cromatograma do extrato de shiitake obtido com diclorometano.

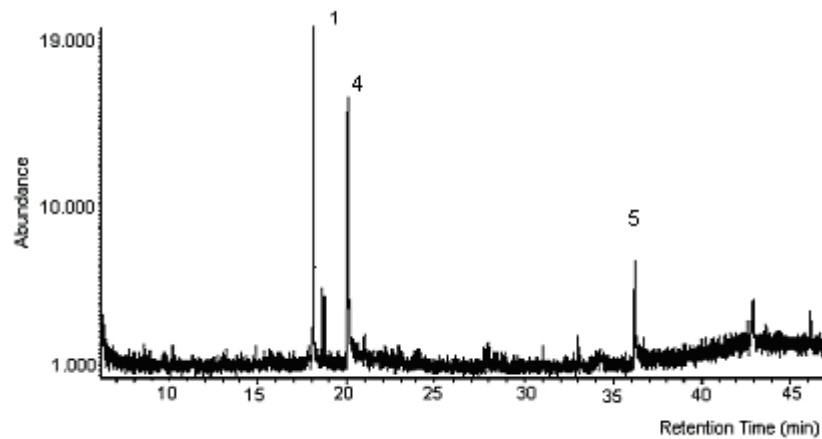


Figura 33 – Cromatograma do extrato de shiitake obtido com acetato de etila.

Como pode ser observado nas Figuras 32 e 33 os extratos apresentam um perfil de concentração com somente um composto em comum aos dois extratos (p-Menthane-1,8-diol). A diferença no perfil de composição é provavelmente devido à diferença de polaridade dos solventes empregados e conseqüentemente da seletividade destes em relação aos componentes do óleo. Foi observada a

presença da vitamina niacinamida (B3), que tem destaque por ajudar o organismo a reduzir o colesterol, uma das propriedades medicinais atribuídas ao cogumelo shiitake (PFUHL et al., 2004).

Na Tabela 13 são apresentados os componentes identificados do óleo de shiitake com as respectivas porcentagens de área dos picos para as frações diclorometano e acetato de etila. As fórmulas estruturais, moleculares e pesos moleculares estão apresentados no Anexo IX.

Tabela 13 – Compostos identificados no óleo de shiitake nos extratos obtidos por extração com solvente.

Picos	Componentes	Área de pico (%)	
		Fração DCM	Fração AE
1	Terpin hidratado (p-Menthane-1,8-diol)	20,91	30,50
2	1,8-Terpin	2,94	-
3	Etil lineloato	41,71	-
4	Niacinamida	-	49,78
5	Ácido Carboxílico (n.i.)	-	12,98
n.i.	Componentes não identificados	34,86	6,74

O composto 1 apresentou uma área superior na fração AE em comparação com a fração DCM. Os compostos 2 e 3 apareceram somente na fração DCM e os compostos 4 e 5 somente na fração AE. Pode ser observado uma porcentagem maior de compostos não identificados na fração DCM.

Ao comparar a composição dos extratos submetidos à análise cromatográfica podemos notar que a extração supercrítica possibilitou a obtenção de extratos com maior número de compostos detectados nas análises cromatográficas empregadas em comparação com os extratos da ELL. Podemos notar também um perfil de composição diferente entre os extratos obtidos através das duas técnicas de extração. A ESC possibilita uma maior seletividade em compostos de interesse, pois permite o ajuste de temperatura e pressão conforme a composição que se deseja obter, ou seja, a ESC possibilita a identificação de

um maior número de compostos e com um perfil de composição diferente quando comparado a extração com solventes orgânicos.

5.7. Determinação da atividade antioxidante dos extratos

5.7.1. Método ensaio fotométrico DPPH

DPPH é um radical livre, estável em temperatura ambiente, que produz uma solução violeta em etanol. Ele é reduzido na presença de uma molécula antioxidante, ocasionando a descoloração da solução etanólica. O uso do DPPH fornece um fácil e rápido modo de avaliar a atividade antioxidante (MENSOR et al., 2001).

A Tabela 14 apresenta os resultados da análise de DPPH para os extratos avaliados (extração com solventes orgânicos e ESC com co-solvente) em relação à porcentagem de atividade antioxidante nas diferentes concentrações destes extratos em ($\mu\text{g/mL}$), e os valores de EC_{50} (que representa a concentração de extrato capaz de fornecer 50% de atividade antioxidante).

Tabela 14 – Porcentagem de atividade antioxidante dos extratos e seus respectivos valores de EC_{50} .

Extrato	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)						
	5	10	25	50	125	250	EC_{50}
Diclorometano	3,36	3,64	8,03	19,67	49,89	92,93	132,11
Acetato de etila	1,77	2,40	6,47	13,50	41,28	64,83	183,15
40°C/200 bar/5% etOH	2,25	5,76	10,75	24,59	39,27	60,50	190,30
40°C/200 bar/10% etOH	6,07	11,90	31,94	32,62	50,60	63,96	158,33
40°C/200 bar/15 % etOH	11,11	25,95	32,10	36,93	49,22	72,97	133,57

Os extratos obtidos pela extração com solventes orgânicos que apresentaram atividade antioxidante foram as frações diclorometano e acetato de etila. Os valores de atividade antioxidante foram de 92,93 e 64,83%,

respectivamente para a maior concentração do extrato testada (250 µg/mL). Os solventes empregados para a obtenção destes extratos são de polaridade 3,4 para o DCM e 4,3 para o AE, evidenciando a presença de compostos polares responsáveis pela atividade antioxidante. Todos os extratos supercríticos foram testados, mas nenhum apresentou atividade antioxidante somente o extrato obtido na condição de 40°C e 300 bar, que apresentou atividade antioxidante consideravelmente baixa (11,33% em 250 µg/mL) em comparação com os extratos obtidos com solventes orgânicos.

Os valores de EC_{50} para os extratos analisados apresentaram valores na faixa de 132,11 a 190,30 mg/mL, ou seja, estes valores representam a concentração de extrato que apresenta 50% de atividade antioxidante, sendo que quanto menor os valores de EC_{50} melhor pois mostra que uma pequena quantidade de extrato é capaz de fornecer uma inibição de 50% considerada eficaz na remoção de radicais livres.

Em virtude dos resultados acima apresentados foram empregados três diferentes co-solventes para a ESC, visando a extração de compostos antioxidantes do shiitake. Os co-solventes testados com suas respectivas polaridades foram: diclorometano (3,4), acetato de etila (4,3) e etanol (5,2).

A ESC com co-solvente foi executada na condição de operação de 40°C e 200 bar. Os extratos obtidos com os co-solventes diclorometano e acetato de etila não apresentaram atividade antioxidante mesmo na concentração de 15%.

Ao se empregar o etanol como co-solvente foi possível obter atividade antioxidante nas três concentrações de co-solvente empregadas 5, 10 e 15%. Este resultado indica que o etanol possui características que possibilitam a sua interação com os compostos antioxidantes do cogumelo shiitake permitindo a extração destes compostos na ESC.

A Figura 34 mostra o gráfico comparando as porcentagens de atividade antioxidante dos extratos de cogumelo shiitake obtidos com ESC e co-solvente e os extratos obtidos nas frações DCM e AE na ELL. Pode-se notar que a atividade antioxidante aumentou ao se aumentar à concentração de etanol que foi

empregado como co-solvente na ESC. O DCM como solvente na ELL promoveu a maior atividade antioxidante. O AE teve uma porcentagem antioxidante comparável com a ESC com 10% de etanol.

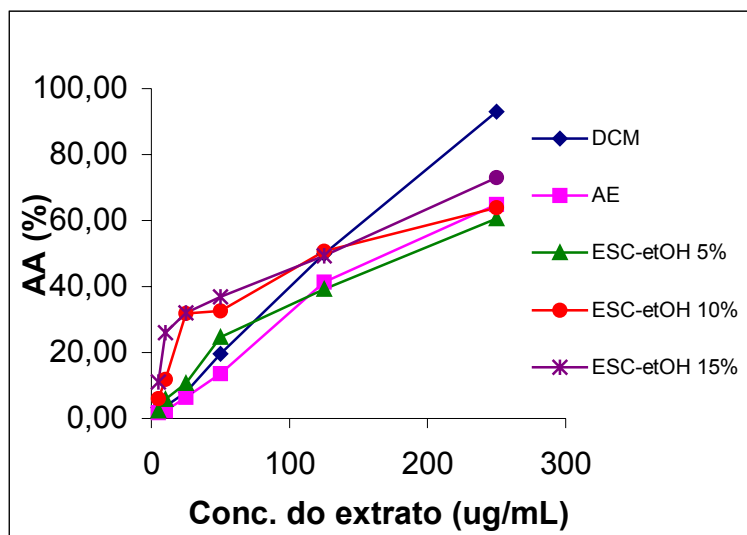


Figura 34 - Atividade antioxidante dos extratos da ESC+co-solvente e ELL.

5.7.2. Determinação do teor de fenólicos totais

Tem sido relatado que a atividade antioxidante de extratos de plantas são correlacionadas com o conteúdo de seus componentes fenólicos (VELIOGLU et al., 1998). Assim, é importante considerar o efeito do conteúdo total de fenólicos na atividade antioxidante dos extratos de cogumelo shiitake.

As concentrações de compostos fenólicos nos extratos de cogumelo shiitake foram expressas como gramas de equivalentes de ácido tânico (EAT) por 100 g de extrato.

A curva padrão de ácido tânico nas diferentes concentrações testadas e as suas respectivas absorbâncias estão apresentadas no Anexo X.

A Tabela 15 apresenta o conteúdo de fenólicos totais para os extratos de cogumelo shiitake obtidos pela ESC empregando co-solventes e obtidos com as frações da ELL e que apresentaram valores de atividade antioxidante (Tabela 14).

Tabela 15 – Conteúdo de fenólicos totais em equivalentes de ácido tânico (EAT) expressos em g de EAT/100 g de extrato.

Extrato	g(EAT)/100g de extrato
DCM	1,05
AE	2,15
ESC-etOH 5%	0,45
ESC-etOH 10%	1,01
ESC-etOH 15%	1,02

Pela análise da Tabela 15 podemos ver que os maiores conteúdos de fenólicos totais foram obtidos nas frações AE e DCM e no extrato supercrítico empregando-se 15% de etanol como co-solvente. Relacionando estes resultados com os dados de atividade antioxidante da Tabela 14, os extratos que apresentaram as maiores atividades antioxidantes apresentaram também os maiores valores de conteúdo de fenólicos, exceto para o extrato AE que apresentou o maior conteúdo de fenólicos totais, isto pode ser devido a sua capacidade de solubilizar compostos flavonóides (FALKENBERG et al., 2003). Estes compostos não foram identificados pela cromatografia gasosa, pois esta técnica apresenta restrições para a análise destas substâncias, sendo necessária a realização de tratamentos químicos no extrato a fim de aumentar a volatilidade dos flavonóides, o que limita o uso desta técnica na detecção de flavonóides (ZUANAZZI & MONTANHA, 2003).

5.8. Determinação da Atividade antimicrobiana dos extratos

5.8.1. Método de difusão em ágar

A triagem da atividade antimicrobiana dos extratos foi realizada utilizando-se o método de difusão em ágar. Uma das vantagens desta técnica é sua elevada sensibilidade, pois a presença de uma “zona clara” indica crescimento microbiano inibido. Entretanto, deve-se ressaltar que o resultado desta técnica tem apenas caráter qualitativo e que não é recomendada qualquer comparação quantitativa, como caracterizar uma substância como mais ativa em virtude do tamanho do halo de inibição formado (JOHANN, 2003).

Foram testados todos os extratos da ESC, ELL e alguns extratos da ESC com co-solvente, contra as bactérias *S. aureus*, *B.cereus* e *Micrococcus luteus* (Gram positiva) e *E.coli* (Gram negativa) e uma levedura a *Candida albicans*.

A Tabela 16 mostra os resultados obtidos pelos testes de difusão em ágar e relaciona os extratos testados com o halo de inibição (mm) para as bactérias e a levedura.

Tabela 16 - Atividade antimicrobiana dos extratos de cogumelo shiitake.

Extrato (°C/bar)	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>M.luteus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>C.albicans</i>
30/150	0	*	0	0	12
30/200	0	*	14	10	0
30/300	0	9	12	10	0
40/150	0	*	14	0	12
40/200	0	*	N.T.	N.T.	N.T.
40/300	*	0	19	12	0
50/150	*	*	16	14	0
50/200	0	*	12	10	0
40/150/AE 15%	N.T.	N.T.	0	12	0

N.T. – não testado.

Para a realização do método de difusão foram pesados aproximadamente 15 mg de extrato diluído em DMSO (conforme descrito na seção 4.12.1).

Os extratos obtidos por solventes orgânicos, ou seja, as frações n-hexano, DCM, AE e aquosa não apresentaram atividade antimicrobiana para nenhuma das bactérias. Porém ao se empregar o extrato supercrítico com co-solvente acetato de etila (40/150/AE 15%) houve inibição contra *B. cereus* apresentando um halo de inibição de 12 mm, possivelmente por compostos extraídos pela ESC, já que esta técnica possibilitou os melhores resultados de atividade antimicrobiana.

Ao se analisar os resultados de atividade antimicrobiana apresentados na Tabela 16 para os extratos obtidos pela ESC, podemos verificar que houve inibição contra as bactérias testadas.

Podemos observar que a bactéria *S. aureus* se mostrou resistente a todos os extratos testados, somente os extratos obtidos a 40°C e 300 bar e o de 50°C e 150 bar apresentaram halo de inibição, porém houve crescimento de bactérias dentro do halo, indicando uma fraca inibição do crescimento das bactérias testadas (indicados com o símbolo *).

Para a bactéria *E.coli* todos os extratos apresentaram halo de inibição com crescimento da bactéria no interior da zona clara, exceto o extrato obtido a 40°C e 300 bar que não apresentou nenhuma inibição ao crescimento da *E.coli* e o extrato 30°C e 300 bar que apresentou um halo de 9 mm, porém foi considerado insuficiente para a realização da MIC (mínima concentração de inibição).

Para a bactéria *Micrococcus luteus* somente dois extratos não apresentaram atividade antimicrobiana, foram os extratos da ESC referentes as seguintes condições: 30°C e 150 bar e 40°C e 150 bar com acetato de etila como co-solvente. Pode-se destacar a condição de 40°C e 300 bar que apresentou um halo de inibição de 19 mm um dos maiores para os extratos de cogumelo shiitake testados contra a bactéria *M. luteus*.

Para a bactéria *Bacillus cereus* os extratos que não apresentaram atividade foram àqueles obtidos nas condições de 30°C e 150 bar e 40°C e 150 bar, tendo destaque a condição de 50°C e 150 bar que apresentou o maior halo de inibição (14 mm) dentre os extratos testados para esta bactéria.

A levedura *Candida albicans* apresentou atividade para somente dois extratos a condição de 30°C e 150 bar e 40°C e 150 bar (12 mm de diâmetro em ambos).

Podemos verificar então que os extratos foram mais efetivos contra o crescimento microbiano das bactérias *M.luteus* e *B.cereus* que são bactérias gram positivas. Para o fungo testado somente os extratos obtidos na pressão

mais baixa testada neste trabalho apresentou atividade antifúngica contra *C. albicans*.

Podemos destacar que a ESC possui a capacidade de extrair compostos capazes de influenciar o crescimento de bactérias e fungos responsáveis por danos a saúde. Porém com as técnicas cromatográficas empregadas neste trabalho não foi possível detectar a presença de tais compostos. A Tabela 3 do item 3.3.3 indica alguns compostos com comprovada atividade antimicrobiana relatadas em literatura. Dentre os prováveis compostos obtidos pela ESC pode haver a presença dos compostos relatados na Tabela 3.

5.8.2. Determinação da mínima concentração de inibição (MIC)

Como definido na seção 4.12.1, MIC é a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento do microrganismo testado. Os extratos que obtiveram resultados satisfatórios para o teste de difusão foram submetidos ao teste de diluição.

Os resultados da concentração dos extratos referentes à determinação da mínima concentração inibitória dos extratos estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17 – Valores de MIC dos extratos para os microrganismos testados.

Extratos (°C/bar)	MIC		
	Microrganismos		
	<i>M. luteus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>
30/150	N.T.	N.T.	2
30/200	0,5	N.T.	N.T.
30/300	1	0,25	N.T.
40/150	1	N.T.	2
40/300	1	0,5	N.T.
50/150	0,5	0,5	N.T.
50/200	1	N.T.	N.T.
40/150/AE 15%	>2	0,5	N.T.

Expresso em mg/mL de extrato. N.T. Não testado.

Para os testes foram usados: um controle de crescimento microbiano e outro de esterilidade do meio de cultura.

Analisando os resultados obtidos para a bactéria gram positiva *M. luteus* pode-se verificar que os extratos que apresentaram as concentrações mais baixas foram os extratos 50°C e 150 bar e 30°C e 200 bar (0,5 mg/mL em ambos).

Pode-se observar que o maior valor do halo de inibição (19 mm) obtido para o extrato 40°C e 300 bar (testado para *M. luteus*) não resultou na menor concentração de inibição (1 mg/mL), isto porque embora o tamanho da zona de inibição no teste de difusão possa depender da sensibilidade do organismo ao antimicrobiano, isso não pode ser usado para comparar a potência das amostras (JOHANN, 2003).

Para a bactéria *B. cereus* o extrato obtido a 30°C e 300 bar apresentou um MIC de 0,25 mg/mL, mesmo o halo de inibição sendo de 10 mm um dos mais baixos apresentado na Tabela 16, isto evidencia que a concentração de 0,25 mg/mL deste extrato promove a inibição da bactéria *B. cereus*. Os extratos 40/300, 40/150/AE e 50/150 apresentaram um valor de MIC de 0,5 mg/mL.

Para o fungo testado ocorreu inibição do crescimento somente na maior concentração testada do extrato (2 mg/mL). Isto indica que possivelmente a *C. albicans* seja resistente a ação antifúngica destes extratos.

Podemos então concluir que os extratos de cogumelo shiitake obtidos por ESC apresentam ação antimicrobiana e extração com solventes orgânicos apresentaram atividade antioxidante. A extração com solventes orgânicos permitiu a seleção de co-solventes para o emprego na ESC tornando possível a extração de compostos com atividade antioxidante.

Submetendo-se os extratos tanto da ESC quanto da extração com solventes orgânicos à análises cromatográficas, não foi possível identificar os compostos com atividade antioxidante e antimicrobianas descritos na literatura (conforme seção 3.3.3) mediante as técnicas cromatográficas empregadas neste trabalho, porém estas propriedades foram detectadas através dos métodos

empregados para a investigação da atividade antioxidante (DPPH e fenólicos totais) e antimicrobiana (difusão em agar e MIC).

Em virtude destes resultados, sugere-se que seja empregada técnica mais específica para a identificação desses compostos como análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e o uso de CG-EM com o emprego de coluna quiral que possibilita a identificação e separação de compostos isômeros.

6. CONCLUSÃO

Com os resultados das operações de extração de óleo de cogumelo shiitake com CO₂ supercrítico em diferentes condições de operação, foi possível concluir que:

- Verificou-se um aumento no rendimento do extrato com o aumento da temperatura e pressão do sistema. A região de retrogradação para o óleo de shiitake foi observada entre 150 bar e 200 bar. Observou-se que a 150 bar o efeito dominante foi o da densidade, já nas pressões de 200, 250 e 300 bar o efeito dominante foi o do aumento da pressão de vapor dos componentes do óleo.
- O modelo de SOVOVÁ (1994) com um x_0 a partir do rendimento global de extração e o x_0 obtido da curva e o modelo de MARTÍNEZ (2003), utilizados para descrever a curva de extração representaram adequadamente os dados experimentais. O modelo de SOVOVÁ (1994) modelou somente a etapa CER.
- Os maiores rendimentos da extração convencional foram das frações n-hexano e aquosa, que pode ser comparada em termos de magnitude à extração supercrítica nas condições 30°C e 300 bar (0,96%), 40°C em 300 bar e 350 bar (1,00 e 1,01%, respectivamente) e 50°C e 300 bar (1,01%).
- A utilização do co-solvente aumentou o rendimento da extração de 0,48 para 0,85% na concentração de 15% de diclorometano, de 0,48% para 0,91% para de acetato de etila, e de 0,65% para 3,81% usando o etanol com a mesma concentração.
- Com relação à análise cromatográfica, empregando a condição 1 (programa de temperatura), os resultados indicaram que a temperatura não influenciou na composição do extrato. E a uma maior pressão de 300 bar houve uma redução do número de compostos.
- A condição cromatográfica 1 permitiu a identificação principalmente de ácidos graxos e do ergosterol (pró-vitamina D) relatados em literatura. Quando se empregou um segundo programa de temperatura (Condição cromatográfica 2),

foi possível a separação de mais compostos, demonstrando a presença de ácidos graxos e ergosterol.

- Os extratos obtidos por solventes orgânicos mostraram a presença de p-Menthane-1,8-diol presente tanto na fração diclorometano quanto acetato de etila, e a niacinamida presente na fração acetato de etila.
- Os extratos obtidos pela ELL possuem atividade antioxidante para as frações diclorometano e acetato de etila que apresentaram atividade de 92,93 e 64,83%, respectivamente na concentração de 250 µg/mL de extrato.
- Os extratos da ESC não apresentaram atividade antioxidante, porém ao se empregar o etanol como co-solvente foi possível a obtenção de atividades antioxidante de até 72,97% (à 250 µg/mL de extrato), quando se empregou 15% deste solvente. Observou-se também que ao se aumentar a concentração de etanol na ESC, aumentou-se os valores de atividade antioxidante.
- Os valores de EC₅₀ para os extratos analisados apresentaram valores na faixa de 132,11 a 190,30 mg/mL.
- Os maiores conteúdos de fenólicos totais foram obtidos na fração AE, DCM e nos extratos supercríticos empregando 15% de etanol como co-solvente. Observamos que os extratos que apresentaram os maiores teores de fenólicos totais foram também os que apresentaram as maiores atividades antioxidantes, exceto para o extrato AE que apresentou o maior conteúdo de fenólicos totais.
- Os extratos da ESC apresentaram atividade antimicrobiana, estes foram mais efetivos contra as bactérias *M. luteus* e *B. cereus*. Somente dois extratos supercríticos (40 e 30°C a 150 bar) apresentaram resultados para a levedura *C. albicans*, porém seu MIC não apresentou bons resultados para a máxima concentração testada (2 mg/mL), indicando que sua resistência á ação do extrato.

- Os extratos que apresentaram as concentrações mais baixas para a *M. luteus* foram os extratos 50°C e 150 bar e 30°C e 200 bar (0,5 mg/mL em ambos).
- Para a bactéria *B. cereus* o extrato 30°C e 300 bar apresentou um MIC de 0,25 mg/mL, mesmo o halo de inibição sendo de 10 mm um dos mais baixos apresentados.
- Os extratos obtidos por solventes orgânicos não apresentaram atividade antimicrobiana, porém ao se empregar o extrato supercrítico com co-solvente acetato de etila houve inibição contra *B. cereus*.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilização de matérias-primas cultivadas em outras regiões, a fim de avaliar a influência de clima, substrato na composição dos extratos.
- Estudar a aplicação de outros co-solventes para a extração de compostos de interesse.
- Aplicações de outros modelos de transferência de massa para a descrição das curvas de extração.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L.P.; UZZO, R.P.; MALUF, W.R. Como cultivar o cogumelo shiitake, Boletim Técnico de Hortaliças, nº008, 1999.

AOAC - ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. Official methods of analysis of AOAC, 14 ed., Washington, 1980.

ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; REUCK, K.M. International thermodynamic tables of the fluid state. V.3. Carbon Dioxide. Pergamon Press, 1976.

BRUNNER, G. Gás Extration – An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes. 1 ed. Nova Iorque: Steinkopff Darmstadt Springer, 1994.

BRAUER, D.; KIMMONS, T.; PHILLIPS, M. Effects of management on the yield and high-molecular-weight polysaccharide content of shiitake (*Lentinula edodes*) mushroom. Journal Agricultural and Food Chemistry, 50, p. 5333-5337, 2002.

CAMPOS, L.M.A.S; MICHIELIN, E.M.Z; DANIELSKI, L. FERREIRA, S.R.S. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula of. cinalis*) oleoresin. J. of Supercritical Fluids, 2005. Article in press.

CANSELL, F.; AYMONIER, C.; LOPPINET-SERANI, A. Review on Materials Science and Supercritical Fluids, Current Opinion in Solid State & Materials Science, França, 2004.

CARRILHO, E.; TAVARES, M.C.H.; LANÇAS, F.M. Fluidos supercríticos em química analítica. I - cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos, Química Nova, vol.24, nº4, e509-515, 2001.

CARVALHO JUNIOR, R.N.; MOURA, S.L.; QUISOE-CONDORI, S.; ROSA, P.T.V.; MING, L.C.; MEIRELES, M.A.A. Determination of the global yield isotherms for the system rosemary (*Rosmarinus officinalis*) + CO₂. Proceedings

of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids, p. 129-134, Versailles - França, 2003.

CHEMICAL FORCES. Disponível em :<
<http://science.marshall.edu/castella/chm448/chap8.pdf>> Acesso em: 08 fev. 2005.

CHEN, C-C; HO, C-T. High-performance liquid chromatographic determination of cyclic sulfur compounds of Shiitake mushroom (*Lentinus edodes* Sing.). *Journal of Chromatography*, 356, p. 455-459, 1986.

CHEUNG, L.M.; CHEUNG, P.C.K.; OOI, V.E.C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 81, 249–255, 2003.

CHIHARA, G.; HAMURO, J.; MAEDA, Y.Y.; ARAI, Y.; FUKUOKA, F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodis* (Berk.) sing. (an Edible Mushroom), *Cancer Research, Japan*, 30, 2776-2781, 1970.

DANIELSKI, L. Solubilidade das oleoresinas de calêndula (*calendula officianilis* L) e cavalinha (*Equisetum arvense*) em CO₂ supercrítico. Florianópolis, 2002. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

del VALLE, J.M.; la FUENTE, J.C.; CARDARELLI, D.A. Contributions to supercritical extraction of vegetable substrates in Latin América, *Journal of Food Engineering*, 67, p. 35-57, 2005.

DI PIERO, R.M. Pontencial dos cogumelos *Lentinula edodis* (shiitake) e *Agaricus blazei* (cogumelo-do-sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos. Piracicaba, 2003. Dissertação (Doutorado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2003.

EYCHENNE, V.; SAÍZ, S.; TRABELSI, F.; RECASENS, F. F. Near-critical solvent extraction of wool with modified carbon dioxide — experimental results. *Journal of Supercritical Fluids*, 21, p. 23–31, 2001.

ESMELINDRO, M.C.; TONIAZZO, G., LOPES, D.; OLIVEIRA, B.; DARIVA, C. Effects of processing conditions on the chemical distribution of mate tea leaves extracts obtained from CO₂ extraction at high pressures, *Journal of Food Engineering*, 2004, article in press.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. In: *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. Introdução à Análise Fitoquímica*, Porto Alegre /Florianópolis, p. 229-245, 2003.

FERREIRA, S. R. S. & MEIRELES, M. A. A. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. *J. of Food Engineering*, 54 263-269, 2002.

FERREIRA, S.R.S. Cinética de transferência de massa na extração supercrítica de óleo essencial de pimenta-do-reino. Campinas, 1996. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1996.

FERREIRA, S.R.S.; NIKOLOV, Z.L.; DORAISWAMY, L.K.; MEIRELES, M.A.A.; PETENATE, A.J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 14, n.3, p.235-245, 1999.

FRANÇA, L.F.; REBER, G.; MEIRELES, M.A.A; MACHADO, N.T.; BRUNNER, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. *Journal of Supercritical Fluids*, v.14, p.247-256, 1999.

FRANÇA, L.F.; MEIRELES, M.A.A; Modeling the extraction of carotene and lipids from pressed palm oil (*Elaeis guineensis*) fibers using supercritical CO₂, *Journal of Supercritical Fluids*, 18, p. 35–47, 2000.

GREGORIO, S.M.P., LEMOS, C.C.S., CALDAS, M.L. Effect of dietary linoleic acid on the progression of chronic renal failure in rats. *Braz J Med Biol Res*, vol.35, no.5, p.573-579, 2002.

GUILLOT, J.; KONSKA, G. Lectins in Higher Fungi. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25, No. 3, p. 203-230, 1997.

HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17, p. 71-74, 2001.

HIRASAWA, M.; SHOUJI, N.; NETA, T.; FUKUSHIMA, K.; TAKADA, K., Three kinds of bacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom), *International Journal of Antimicrobial Agents*, n°11, p.151-157, 1999.

ISHIKAWA, N.K.; KASUYA, M.C.M.; VANETTI, M.C.D. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid médium, *Brazilian Journal of Microbiology*, n°32, p.206-210, 2001.

JOCHMANN, A. Extração supercrítica de oleoresina de calêndula (*Calendula officinalis*). Florianópolis, 2000. Tese de Mestrado em Engenharia Química – Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

JOHANN, S. Atividade antimicrobiana de flavonóides polimetoxilados isolados de frutos cítricos. Florianópolis, 2003, 97 p. Tese (Mestre em Biotecnologia) – Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Antioxidants in fruits and vegetables- The millennium's health international. *Journal of Food Science and Technology*, 36, pp.703-725, India, 2001.

LANÇAS, F.M. Fluidos supercríticos: Desenvolvimento de instrumentação para fluidos supercríticos - Uma experiência brasileira bem sucedida.

Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Ano 3, nº16, Set/Out, 2000. Arquivo disponível em: <http://biotecnologia.uol.com.br/revista/bio16/fluidos.asp> . Acessado em: 18/03/2004.

LANG, Q.; WAI, C.M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies – A practical review. *Talanta*, 53, 771-782, 2001.

LIMA, E.O. In: Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: Uma breve análise histórica. Chapecó, p. 481-502, 2001.

LIM, G-B; LEE, S-Y; LEE, E-K; HAAM, S-J; KIM, W-S Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. *Biochemical Engineering Journal*, 11, 181–187, 2002.

LIU, F.; OOI, V.E.C.; CHANG, S.T.; Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Science*, vol. 60, nº 10, pp. 763-771, 1997.

LONGVAH, T.; DEOSTHALE, Y.G. Composition and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast Índia. *Food Chemistry*, vol.63,nº3, p.331-334, 1998.

MARTÍNEZ, J.; MONTEIRO, A. R.; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Multicomponent Model to describe Extraction of Ginger Oleoresin with supercritical carbon dioxide. *Ind. Eng. Chem* nº 42, p.1057-1063, 2003.

MARTÍNEZ, J. Estudo de modelos de transferência de massa na interface sólido-fluido durante processos de extração supercrítica. Campinas, 2002. Tese de mestrado em Engenharia de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2002.

MANZI, P.; PIZZOFRATTO, L. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry* nº68, p. 315-318, 2000.

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

MATTILA, P.; LAMPI, A-M.; RONKAINEN, R.; TOIVO, J.; PIIRONEN, V. Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry* , 76, p. 293–298, 2002.

MAUL, A.A. Fluidos supercríticos -situação atual e futuro da extração supercrítica. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Ano 2, nº11,1999. Arquivo disponível em: <http://www.biotecnologia.uol.com.br/revista/bio11/11> Acessado em: 17/03/2004

MAU, J.L; CHAO, G-R.; WU, K-T. Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. *Journal of Agriculture an Food Chemistry*, 49, pp. 5461-5467, China, 2001.

MENSOR, L.L; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; dos SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15,127-130, Rio de Janeiro, 2001.

MICHIELIN, E.M.Z. Avaliação do processo de extração com fluido supercrítico da oleoresina cavalinha (*Equisetum arvense*). Florianópolis, 2002. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

MICHIELIN, E.M.Z; BRESCIANI, L.F.V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R.A.; FERREIRA, S.R.S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 2005. Article in press.

MINATO, K-I.; MIZUNO, M.; TERAJ, H.; TSUCHIDA, H. Autolysis of lentinan, na antitumor polysaccharide, during storage of *Lentinus edodis*, shiitake mushroom, Journal of Agricultural Food Chemistry, Japan, 47, p.1530-1532,1999.

MUKHOPADHYAY, M. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. Washington, D.D, 2000.

NAPPI, B. P.; MORETTO, E Valor nutricional de corpos de frutificação e biomassas dos cogumelos comestíveis *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* e *Auricularia auricula-fuclae*. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, 1998.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. In: Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. Aspectos genéticos e moleculares da produção vegetal, Porto Alegre /Florianópolis, p. 29-43, 2003.

PATRICK, H.K.; NGAI, T.B.Lentin, a novel and potent antifungal protein from shiitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. Life Science, 73, p. 3363-3374, 2003.

PAULA, D.P.; TARTASITANO, M.A.A.; GRACIOLLI, L.A. Viabilidade econômica do cultivo de shiitake em diferentes escalas de produção. Scientia Agrícola, vol.58, nº2, 2001.

PEREIRA, C.G.; MARQUES, M.O.M., BARRETO, A.S.; SIANI, A.C.; FERNANDES, E.C.; MEIRELES, M.A. Extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO₂+ethanol: an evaluation of the process variables and the raw material origin. Journal of Supercritical Fluids, 30, 51-61, 2004.

PFUHL, P.; KÄRCHER, U.; HÄRING, N.; BAUMEISTER, A.; TAWAB, M.A.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M. Simultaneous determination of niacin, niacinamide and nicotinuric acid in human plasma. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004, article in press.

POVH, N.P.; MARQUES, M. O.M.; MEIRELES, M. A.A. Supercritical CO₂ extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert. Journal of Supercritical Fluid, v.21, p.245-256, 2001.

RENZ, S.V.; GONZÁLEZ, F.H.D. Oxidação e antioxidantes. Seminário da disciplina Bioquímica do Tecido Animal, UFRGS, 2003.

ROBBINS, R. J. Phenilic acids in foods: an overview of analytical Methodology. Journal of Agriculture an Food Chemistry, 51, 2866-2887, 2003.

RODRIGUES, V.M.; ROSA, P.T.V.; MARQUES, M.O.M.; PETENATE, A.J.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical Extraction of Essential Oil from Aniseed (*Pimpinella anisum* L) Using CO₂: Solubility, Kinetics, and Composition Data. J.Agric. Food Chem., 51, p.1518-1523, 2003

ROWAN, N.J.; SMITH, J.E.; SULIVAN, R. Medicinal mushroom: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments cancer. Research UK, University of Strathclyde, May, 2002. Arquivo disponível em: <http://www.shiitake.net/UK.htm> Acessado em: 21/07/2003.

SCALIA, S.; GIUFFREDA, P.; PALLADO, P. Analytical and preparative supercritical fluid extraction of chamomile flowers and its comparison with conventional methods. J. Pharmaceut. Biomed. Anal., 21, 549–558, 1999.

SILVA, D.C.M.N. Determinação experimental de parâmetros de processo na extração supercrítica de óleo essencial de carqueja (*Bacharis trimera* Less). Florianópolis, 2004. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

SHIMADA, y.; MORITA, T.; SUGIYAMA, K. Dietary eritadenine and ethanolamine depress fatty acid desaturase activities by increasing liver microsomal phosphatidylethanolamine in rats. Journal of Nutrition, 3, 758-765, 2003.

SMÂNIA, A.Jr; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA E.F.A.; GIL, M.L.; BENCHETRIT, L.C.; CRUZ, F.S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr., n.45, p. 177-181, 1995.

SMÂNIA, E.F.A. Esteróis e triterpenos isolados de espécies de *ganoderma* karsten e sua atividade antimicrobiana. Florianópolis, 2003. Tese de Doutorado em Química Orgânica – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. Revista de Nutrição, 15, pp. 71-81, Campinas, 2002.

SOUSA, E.M.R.D.; MARTÍNEZ, J.; CHIAVONE-FILHO, O.; ROSA, P.T.V.; DOMINGOS, T. MEIRELES, M.A.A. Extraction of volatile oil from *Croton zehntneri* Pax et Hoff with pressurized CO₂: solubility, composition and kinetics Journal of Food Engineering, 2004, article in press.

SOVOVÁ, H., Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – I. Modelling of extraction curves. Chem. Eng. Science 49, 409, 1994.

SUGUI, M.M.; ALVES de LIMA, P.L.; DELMANTO, R.D.; da EIRA, A.F.; SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R. Antimutagenic effect of *Lentinula edodis* (BERK.) Pegler mushroom and possible variation among lineages. Food and Chemical Toxicology, n°1, p.555-560, Brazil, 2003.

SUGUIYAMA, K.; AKACHI, T.; YAMAKAWA, A. Eritadenine-induced alteration of hepatic phospholipid metabolism in relation to its hypocholesterolemic action in rats, Nutricional Biochemistry, n°6, p.80-87, 1995.

TAN, C.; LIOU, D. Modeling of desorption at supercritical conditions. AiChe Journal, 35, n°6, p.1029-1031, 1989.

VÁGI, E.; SIMÁNDI, B.; SUHAJDA, Á.; HÉTHELYI, É. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. Food Research International, 38, p. 51–57, 2005.

VALGAS, C. Avaliação de métodos de triagem para a determinação de atividade antimicrobiana de produtos naturais. Florianópolis, 2002. Tese (Mestrado em Farmácia) – Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J. Agric. Food Chem.*, 46, p. 4113-4117, 1998.

YAMINI, Y.; ASGHARI-KHIAVI, M.; BAHRAMIFAR, N. Effects of different parameters on supercritical fluid extraction of steroid drugs, from spiked matrices and tablets, *Talanta*, n°58, p.1003-1010, 2002.

YANG, J-H; LIN, H-C; MAU, J-L Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*, 77, pp. 229-235, China, 2002.

YOKOKAWA, H.; MITSUHASHI, T. The mushrooms. *Phytochemistry*, Japan, 20, n°6, p.1349-1351, 1981.

YODA, S.K. Estudo da cinética de extração dos glicosídeos da *Stevia rebaudiana* Bertoni com mistura CO₂+ Água. Campinas, 2001. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

YOSHII, H.; FURUTA, T.; SHIGA, H.; KUWAHARA, H.; OHKAWARA, M.; LINKO, P. Encapsulation of shiitake (*Lentinus edodes*) flavors by spray drying Japão. Disponível em: http://ift.confex.com/ift/2004/techprogram/paper_24249.htm Arquivo acessado em: 07/06/2004.

YUNES, R.A.; CECHINEL-FILHO, V. In: Plantas Mediciniais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental., Chapecó, 2001, p. 18-44.

WEINHOLD, T.S. Efeito das condições de processo na composição da oleoresina de avenca-da-praia (*Polygala cyparissias*). Florianópolis, 2003. Tese

(Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

WEINSTEIN, R.D.; MUSKE, K.R.; MORIARTU, J.; SCHMIDT E.K. The solubility of Benzocaine, Lidocaine, and Procaine in liquid and supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Eng. Data*, 49, 547-552, 2004.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos, p. 436-479. In: *Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna*, ed. Argos, 2001.

ZANCAN, K.C.; MARQUES, M.O.M.; PETENATE, A.J. MEIRELES, M.A.A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. *Journal of Supercritical Fluids*, n°24, p. 57–76, 2002.

ZHAO, J.; KWAN, H.S. Characterization, molecular cloning, and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes* Applied and Environmental Microbiology, p. 4908-4913, Vol. 65, No. 11, China, 1998.

ZOUGAGH, M.; VALCÁRCEL, M.; RÍOS, A. Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. *Trends in Analytical Chemistry*, v.23, n°5, 2004.

ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R. Optical purity of (R)-()-1-octen-3-ol in the aroma of various species of edible mushrooms. *Food Chemistry*, 86, p. 113–118, 2004.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. In: *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. Flavonóides*, Porto Alegre /Florianópolis, p. 29-43, 2003.

9. ANEXOS

ANEXO I – PROPRIEDADES DO CO₂

$$PM = 46$$

$$T_c = 31,1^\circ\text{C}$$

$$P_c = 73,8 \text{ bar}$$

Tabela A1 - Comparação entre propriedades físicas de líquido, gás e fluido supercrítico (MUKHOPADHYAY, 2000):

Estado físico	Densidade (g/cm ³)	Viscosidade (g/cm.s)	Difusividade (cm ² /s)
Líquido	0,6 -1,6	$0,2 - 0,3 \times 10^{-2}$	$0,2 - 2,0 \times 10^{-5}$
Gases	$0,6 - 2,0 \times 10^{-3}$	$1 - 3 \times 10^{-4}$	0,1 - 0,4
Fluido supercrítico			
P _c , T _c	0,2 - 0,5	$1 - 3 \times 10^{-4}$	$0,7 \times 10^{-3}$
4 P _c , T _c	0,4 - 0,9	$3 - 9 \times 10^{-4}$	$0,2 \times 10^{-3}$

ANEXO II – EQUAÇÕES PARA A APLICAÇÃO DO MODELO DESCRITO POR SOVOVÁ (1994)

O mecanismo de transferência de massa de produtos natural em FSC é complexo devido ao grande número de componentes presentes na mistura. Também é difícil estabelecer as interações entre os componentes do extrato, solvente e a fase sólida presentes no sistema. Desta forma uma alternativa para avaliação da transferência de massa de sistemas complexos envolvendo matrizes vegetais e FSC é o modelo proposto por de SOVOVÁ (1994).

SOVOVÁ (1994) descreve um modelo baseado em balanços de massa considerando que o solvente escoia axialmente com velocidade superficial U através de um leito fixo de seção transversal cilíndrica. Considera-se que na entrada do extrator o solvente está livre de soluto e a temperatura e pressões de operação são constantes. O tamanho das partículas e a distribuição do soluto no interior do sólido são considerados homogêneas e o soluto encontra-se nas células do sólido, protegido pela parede celular. Devido a moagem, algumas células apresentam sua parede celular rompida tornando parte do soluto exposto ao solvente.

Para aplicação do modelo as condições de balanço de massa para a fase sólida e fluída são respectivamente:

$$\text{Fase sólida: } -\rho_s(1-\varepsilon)\frac{\partial X}{\partial t} = J(X, Y) \quad \text{Eq. V.1}$$

$$\text{Fase fluída: } \rho_f.U\frac{\partial Y}{\partial h} = J(X, Y) \quad \text{Eq. V. 2}$$

Onde: X e Y são as razões mássicas de soluto nas fases sólida e fluída respectivamente; ρ_s e ρ_f são as densidades da fase sólida e fluída respectivamente ($\text{kg}_{\text{solvente}}/\text{m}^3$); ε é a porosidade do leito; t é o tempo (s); h é a coordenada axial (m), U é a velocidade superficial do solvente (m/s) e $J(X, Y)$ é a taxa de transferência de massa ($\text{kg}/\text{m}^3.\text{s}$).

As condições de contorno iniciais e de contorno para a resolução das equações de balanço de massa são:

$$x(h, t=0) = x_0$$

$$Y(h=0, t) = 0$$

$$Y(h, t=0) = 0$$

Onde: x é a concentração na fase sólida; y é a concentração na fase solvente; h é a posição do leito de sólidos (m); t é o tempo de extração (s) e x_0 é a razão mássica inicial de soluto na fase sólida.

A força motriz para transferência de massa varia de acordo com os domínios dos diferentes mecanismos de transferência (convecção natural, forçada e difusão), presentes no processo de extração. Estes domínios são definidos através da determinação dos teores de óleo de fácil acesso e de difícil acesso na matriz sólida (X_p e X_k respectivamente). Isto possibilita a obtenção de curvas de extração que descrevem a diferentes etapas do processo.

Com base nas equações intermediárias para a aplicação do modelo, este permite a descrição das curvas de extração para as três etapas do processo, apresentadas a seguir:

Período de taxa constante de extração (CER) - $t < t_{CER}$

$$m_{extr} = Y^* [1 - \exp(-Z)] Q_{CO_2} \cdot t \quad \text{Eq. V. 3}$$

Período de taxa decrescente de extração (FER) - $t_{CER} \leq t < t_{FER}$

$$m_{extr} = Y^* [t - t_{CER} \cdot \exp(z_W - Z)] Q_{CO_2} \quad \text{Eq. V. 4}$$

Período controlado pela difusão - $t \geq t_{FER}$

$$m_{extr} = N \left\langle X_O - \frac{Y^*}{W} \ln \left\{ 1 + \left[\exp \left(\frac{W X_O}{Y^*} \right) - 1 \right] \exp \left[\left(\frac{W \cdot Q_{CO_2}}{N} \right) (t_{CER} - t) \right] \frac{X_k}{X_O} \right\} \right\rangle \quad \text{Eq. V. 5}$$

Onde: m_{extr} é a massa de extrato (kg), t_{CER} é a duração da etapa constante de extração (s), N é a massa de matéria-prima livre de soluto (kg), Y^* é a solubilidade (kg/kg), Q_{CO_2} é a vazão média do solvente (Kg/s), t_{FER} é o período de taxa decrescente de extração (s), x_0 é a razão mássica inicial de soluto na fase sólida, X_k é a razão mássica de soluto no interior de células intactas.

Com base nas equações I e II descritas acima referente às equações de balanço de massa na fase sólida e fluida e as considerações das condições

iniciais e de contorno a aplicação do modelo de transferência de massa descrito, implica no conhecimento prévio do teor de soluto extraível pelo solvente.

Assim, o teor de óleo disponível é definido como o teor inicial de óleo no sólido (O) igual a soma do óleo de fácil acesso (P), que se encontra na superfície do sólido e o óleo de difícil acesso (K), no interior da partícula, conforme equação V.6.

$$O = P + K \quad \text{Eq. VI}$$

A concentração de soluto na fase sólida é descrita através do teor de sólidos totais livre de soluto, ou sólido inerte (N), através das relações:

$$X_o = \frac{O}{N}; \quad X_K = \frac{K}{N}; \quad X_P = \frac{P}{N} \quad \text{Eq. VII}$$

SOVOVÁ (1994), resolveu as equações I e II utilizando as condições de contorno e as VI e VII descrevendo as equações III a V com as seguintes restrições:

Nas três equações do modelo a quantidade Z é diretamente proporcional ao coeficiente de transferência de massa da fase fluida, indicando um parâmetro pra a etapa CER:

$$Z = \frac{N \cdot k_{Ya} \cdot \rho_{CO_2}}{Q_{CO_2} \cdot (1 - \varepsilon) \rho_s} \quad \text{Eq. VIII}$$

Para a solução do modelo, é necessário o conhecimento dos seguintes parâmetros (YODA, 2001):

M_{CER} = taxa de extração na etapa CER (kg/s);

Y_{CER} = razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna na etapa CER (kgextrato/kg CO₂);

t_{CER} = duração da etapa CER (s).

Descrito pelo ajuste de duas retas sob a curva de extração (massa de oleoresina acumulada versus tempo de extração) com o auxílio do pacote estatístico SAS. O parâmetro M_{CER} é o valor da tangente ao período CER e, a

partir do mesmo obtêm-se o valor de Y_{CER} (concentração de soluto na fase solvente na etapa CER) através da equação:

$$Y_{CER} = \frac{M_{CER}}{Q_{CO_2}} \quad \text{Eq. IX}$$

Onde: Q_{CO_2} é a vazão do solvente (kg/s).

As demais restrições e definições são descritas:

$$t_{CER} = \frac{X_0 - X_k}{Y^* \cdot Z} \cdot \frac{N}{Q_{CO_2}} \quad \text{Eq. X}$$

$$X_p = X_0 - X_k \quad \text{Eq. XI}$$

$$X_k = X_0 - X_p \quad \text{Eq. XII}$$

$$\frac{z_w}{Z} = \frac{Y^*}{WX_0} \ln \left\{ \frac{X_0 \cdot \exp\left[\left(\frac{W \cdot Q_{CO_2}}{N}\right)(t - t_{CER})\right] - X_k}{X_0 - X_k} \right\} \quad \text{Eq. XII}$$

Eq. XIV

$$W = \frac{N \cdot k_{Xa}}{Q_{CO_2} \cdot (1 - \varepsilon)} = k \frac{ZY^*}{X_k}$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{N}{Q_{CO_2} \cdot W} \ln \left[\frac{X_k + (X_0 - X_k) \cdot \exp\left(\frac{WX_0}{Y^*}\right)}{X_0} \right] \quad \text{Eq. XV}$$

onde: m_{extr} é a massa de extrato (kg), t_{CER} é a duração da etapa constante de extração (s), N é a massa de matéria-prima livre de soluto (kg), Y^* é a solubilidade (kg/kg), Q_{CO_2} é a vazão média do solvente (kg/s), t_{FER} é o período de taxa

decrecente de extração (s), X_0 é a razão mássica inicial de soluto na fase sólida, X_k é a razão mássica de soluto no interior de células intactas.

Os parâmetros K_{Xa} e K_{Ya} são respectivamente os coeficientes de transferência de massa da fase fluida e fase sólida (s^{-1}), sendo definidos pelas equações:

$$k_{Ya} = \frac{M_{CER}}{\rho_{CO_2} \cdot S \cdot H \cdot \Delta Y} \quad \text{Eq. XVI}$$

$$k_{Xa} = \frac{k_{Ya} \cdot \rho_{CO_2} \cdot \Delta Y}{\rho_S \cdot \Delta X} \quad \text{Eq. XVII}$$

Onde: M_{CER} é a taxa de extração no período CER (kg/s), ρ_{CO_2} é a densidade do solvente (kg/m^3), S é a área de seção transversal do leito (m^2), H é o comprimento do leito (m), ΔY e ΔX são respectivamente as médias logarítmicas para as razões mássicas de soluto na fase fluida e fase sólida e ΔY é a diferença na razão mássica do leito durante o período de taxa constante de extração (kg óleo/kg CO_2).

$$\Delta \bar{Y} = \frac{Y_{CER}}{\ln \left[\frac{Y^*}{Y^* - Y_{CER}} \right]} \quad \text{Eq. XVIII}$$

$$\Delta Y = \frac{M_{CER}}{\rho_{CO_2} \cdot S \cdot H \cdot k_{Ya}} \quad \text{Eq. XIX}$$

$$\Delta X = \frac{(X_p + X_k)}{2} \quad \text{Eq. XX}$$

ANEXO III – EQUAÇÕES PARA A APLICAÇÃO DO MODELO DESCRITO POR MARTINÉZ et al. (2003)

O modelo Logístico, ou de MARTINÉZ é baseado no balanço de massas do leito de extração e despreza o acúmulo e dispersão na fase fluida, pois esses fenômenos não têm influencia significativa no processo quando comparado ao efeito de convecção. O modelo de Martinez pode ser aplicado para a transferência de soluto para a fase fluida e, quando o soluto é representado como um grupo de simples componentes. Então o balanço de massa na fase fluida pode ser simplificado da seguinte forma:

$$u \frac{\partial Y}{\partial h} = \frac{J(X,Y)}{\epsilon} \quad \text{Eq. I}$$

Com as seguintes condições de contorno:

$$Y(h=0,t)=0 \quad \text{Eq. II}$$

O termo de transferência de massa interfacial, representado como $J(X,Y)$, pode ser interpretado por diferentes caminhos e para o desenvolvimento deste modelo Martinez (2003) definiu $J(X,Y)$ como uma função S que depende da composição do extrato ao longo do processo, baseado nos experimentos realizados com oleoresina de gengibre, que foi dividida em quatro grupos de compostos quimicamente similares. Esta definição foi incorporada no termo de transferência de massa interfacial, como mostrado na equação (Eq.III):

$$J(X,Y) = S = \sum_{i=1}^n S_i \quad \text{Eq. III}$$

Onde:

$$S = \frac{A_i b_i \exp[b_i(t_m - t)]}{\{1 - \exp[b_i(t_m - t)]\}^2} \quad \text{Eq. IV}$$

Após a integração da equação Eq. I em h com as condições de contorno da equação Eq. II, a equação para a razão de massa de extrato na fase fluida foi obtida:

$$Y(h = H, t) = \frac{H}{u} \sum_{i=1}^n S_i \quad \text{Eq. V}$$

Na eq. (V), H é o comprimento total do leito de extração. Finalmente, a equação para as curvas de extração foi obtida pela integração da equação Eq.V em tempo com a condição de contorno da Eq. VI:

$$m(h = H, t = 0) = 0 \quad \text{Eq. VI}$$

$$m(h = H, t) = \int_0^t Y Q_{CO_2} dt = \frac{Q_{CO_2} H}{u} \sum_{i=1}^n \int_0^t S_i dt \quad \text{Eq.VII}$$

Para um grupo de compostos simples, a curva de extração pode ser representada pela Eq. VIII que mostra o resultado da integração da função S .

$$m(h = H, t) = \frac{Q_{CO_2} H A_i}{u} \left\{ \frac{1}{1 + \exp[b_i(t_m - t)]} - \frac{1}{1 + \exp[b_i t_m]} \right\} \quad \text{Eq.VIII}$$

Em ambas Eqs. VII e VIII Q_{CO_2} representa o fluxo de massa de solvente dentro no leito de extração.

Em análise da Eq. VIII pode ser observado que o tempo tende ao infinito, a massa de componente extraído i tende a um valor fixo, assintoticamente. Este valor pode ser considerado como a massa total extraível deste composto, nas condições de processo. Pelo rearranjo da Eq. VIII a curva de extração (massa de extrato, m_{ext}) pode ser representada pela seguinte equação com somente dois parâmetros ajustáveis (b e t_m):

$$m_{ext}(h = H, t) = \frac{m_{ti}}{\exp(b_i t_m)} \left\{ \frac{1 + \exp(b_i t_m)}{1 + \exp[b_i(t_m - t)]} - 1 \right\} \quad \text{Eq. IX}$$

onde: m_{ext} é a massa de oleoresina extraída (kg), m_t é a massa inicial total de sólido no leito de extração (kg), b é o parâmetro a ser ajustado no modelo (s^{-1}), t_m é o parâmetro a ser ajustado no modelo (s), t é o tempo de extração.

**ANEXO IV – CURVA DE EXTRAÇÃO NAS CONDIÇÕES 30°C 150 BAR E
30°C E 200 BAR**

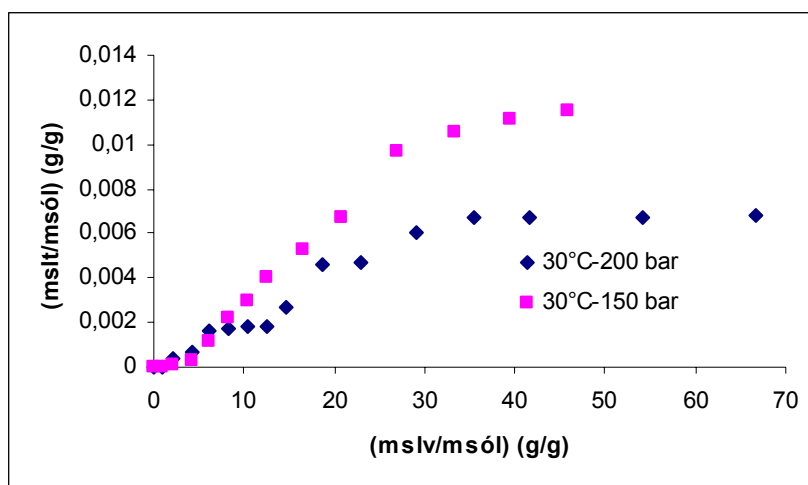


Figura IV. 1 – Curva de extração repetição.

30°C e 150 bar		30°C e 200 bar	
mslt/msól	mslv/msól	mslt/msól	mslv/msól
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1,79E-05	1,040462	0,0001	1,0404
0,00011	2,080925	0,0004	2,0807
0,000329	4,16185	0,0007	4,1614
0,001184	6,242775	0,0017	6,2421
0,002191	8,323699	0,0017	8,3228
0,002995	10,40462	0,0018	10,4035
0,004046	12,48555	0,0018	12,4842
0,005306	16,6474	0,0026	14,5649
0,006676	20,80925	0,0046	18,7263
0,009697	27,05202	0,0047	22,8877
0,010505	33,2948	0,0061	29,1299
0,011141	39,53757	0,0067	35,3720
0,011482	45,78035	0,0067	41,6141
		0,0067	54,5825
		0,0068	66,5825

ANEXO V – DADOS EXPERIMENTAIS DAS CURVAS DE EXTRAÇÃO

Tabela I – Dados experimentais das curvas de extração realizadas a 150 bar e vazão de 3,33 g/min.

Temperatura (°C) T (min)	30	40	50
	Massa de óleo acumulada (g)		
0	0,0000	0,0000	0,0000
5	0,0005	0,0017	0,0003
10	0,0026	0,0021	0,0014
20	0,0070	0,0039	0,0061
30	0,0371	0,0513	0,0101
40	0,0427	0,0780	0,0138
50	0,0554	0,0836	0,0188
60	0,0626	0,0841	0,0192
80	0,0723	0,1019	0,0496
100	0,0781	0,1126	0,0590
130	0,0821	0,1142	0,1086
160	0,0898	0,1219	0,1160
190	0,1050	0,1328	0,1193
220	0,1097	0,1362	0,1220
235		0,1374	0,1223

Tabela II – Dados experimentais das curvas de extração realizadas a 200 bar e vazão de 3,33 g/min.

Temperatura (°C) T (min)	30	40	50
	Massa de óleo acumulada (g)		
0	0,0000	0,0000	0,0000
5	0,0006	0,0025	0,0020
10	0,0062	0,0052	0,0049
20	0,0112	0,0076	0,0133
30	0,0268	0,0218	0,0534
40	0,0276	0,0438	0,0649
50	0,0288	0,0754	0,0723
60	0,0291	0,0878	0,0808
70	0,0423	0,1244	0,0829
90	0,0733	0,1300	0,0935
110	0,0749	0,1449	0,1029
140	0,0970	0,1494	0,1089
170	0,1075	0,1548	0,1207
200	0,1078	0,1594	0,1341
260	0,1080		0,1402
320	0,1096		0,1508
350			0,1553
380			0,1554
410			0,1586

Tabela III – Dados experimentais das curvas de extração realizadas a 250 bar e vazão de 3,33 g/min.

Temperatura (°C) T (min)	30	40	50
	Massa de óleo acumulada (g)		
0	0,0000	0,0000	0,0000
5	0,0008	0,0100	0,0006
10	0,0021	0,0223	0,0010
20	0,0160	0,0525	0,0087
30	0,0354	0,0816	0,0193
40	0,0384	0,1026	0,0276
50	0,0660	0,1191	0,0561
60	0,0990	0,1308	0,0676
70	0,1017	0,1398	0,0736
90	0,1066	0,1464	0,0848
110	0,1130	0,1656	0,0916
130	0,1245	0,1795	0,1052
150	0,1266	0,1891	0,1121
180	0,1318	0,2027	0,1139
210	0,1385	0,2075	0,1161
240		0,2175	0,1224
270		0,2208	0,1259
300		0,2250	
330		0,2292	

Tabela IV – Dados experimentais das curvas de extração realizadas a 300 bar e vazão de 3,33 g/min.

Temperatura (°C) T (min)	30	40	50
	Massa de óleo acumulada (g)		
0	0,0000	0,0000	0,0000
5	0,0020	0,0024	0,0002
10	0,0084	0,0079	0,0021
20	0,0193	0,0103	0,0304
30	0,0431	0,0440	0,0389
40	0,0800	0,0477	0,0790
50	0,0908	0,0941	0,0965
60	0,0959	0,1058	0,1035
80	0,1171	0,1154	0,1263
100	0,1340	0,1293	0,1391
120	0,1363	0,1364	0,1557
150	0,1410	0,1485	0,1734
180	0,1432	0,1571	0,1872
200	0,1482	0,1612	0,1962
220	0,1494	0,1658	0,2031

ANEXO VI – RESULTADOS DAS CURVAS AJUSTADAS PELO SAS

VI.1 – Experimento realizado a 40°C, 300 bar e 3,33 g/min.

The NLIN Procedure
 Dependent Variable mext
 Method: Gauss-Newton

Iterative Phase					Sum of Squares
Iter	b0	b1	b2	knot1	
0	-0.0271	0.000810	-0.00034	90.0000	0.0562
1	-0.00731	0.00167	-0.00137	44.7743	0.0164
2	-0.00427	0.00131	-0.00091	78.6265	0.00440
3	-0.0107	0.00185	-0.00150	62.5705	0.00151
4	-0.0107	0.00185	-0.00150	68.9212	0.000873

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	4
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.101497
Object	0.421675
Objective	0.000873
Observations Read	15
Observations Used	15
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	0.1724	0.0431	231.77	<.0001
Residual	11	0.000873	0.000079		
Uncorrected Total	15	0.1733			
Corrected Total	14	0.0561			

Ensaio Shiitake: 40oC, 300 bar,3.33 g/min

The NLIN Procedure

Parameter	Approx Estimate	Approximate 95% Std Error	Confidence Limits	
b0	-0.0107	0.00520	-0.0221	0.000788
b1	0.00185	0.000154	0.00151	0.00219
b2	-0.00150	0.000169	-0.00187	-0.00113
knot1	68.9212	6.4741	54.6718	83.1706

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.7957507	0.7259282	0.3335883
b1	-0.7957507	1.0000000	-0.9122558	-0.6656612
b2	0.7259282	-0.9122558	1.0000000	0.3711611
knot1	0.3335883	-0.6656612	0.3711611	1.0000000

Ensaio Shiitake: 40oC, 300 bar,3.33 g/min

Obs	tmin	mext	AL1	MEXTHAT	MRES
1	0	0.0000	0	-0.01066	0.010661
2	5	0.0024	0	-0.00142	0.003817
3	10	0.0079	0	0.00783	0.000073
4	20	0.0103	0	0.02631	-0.016015
5	30	0.0440	0	0.04480	-0.000802
6	40	0.0477	0	0.06329	-0.015590
7	50	0.0941	0	0.08178	0.012322
8	60	0.1058	0	0.10027	0.005534
9	80	0.1154	0	0.12059	-0.005193
10	100	0.1293	10	0.12751	0.001787
11	120	0.1364	30	0.13443	0.001966
12	150	0.1485	60	0.14481	0.003686
13	180	0.1571	90	0.15520	0.001905
14	200	0.1612	110	0.16212	-0.000915
15	220	0.1658	130	0.16904	-0.003236

Ensaio Shiitake: 40oC, 300 bar,3.33 g/min

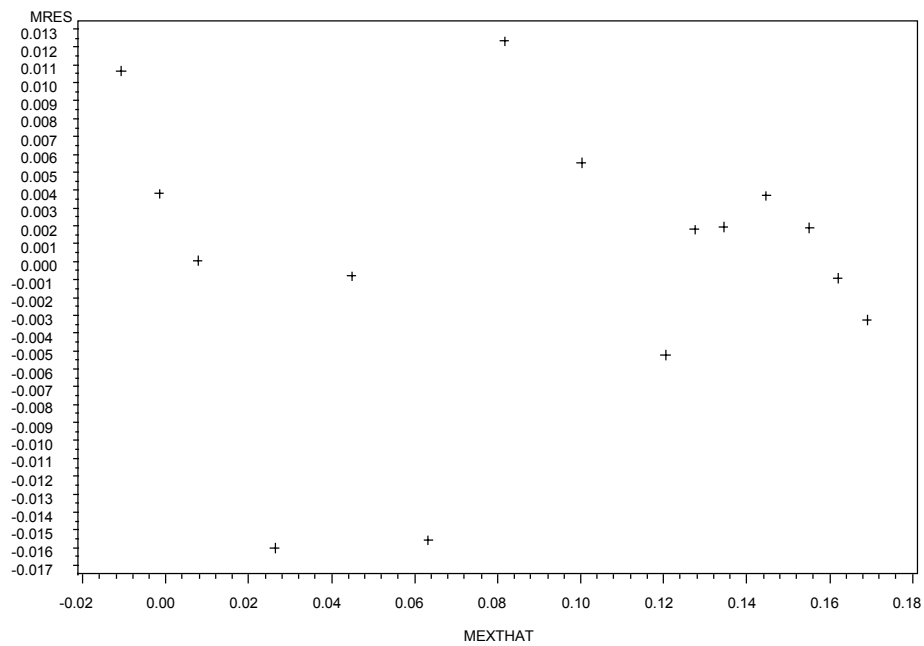
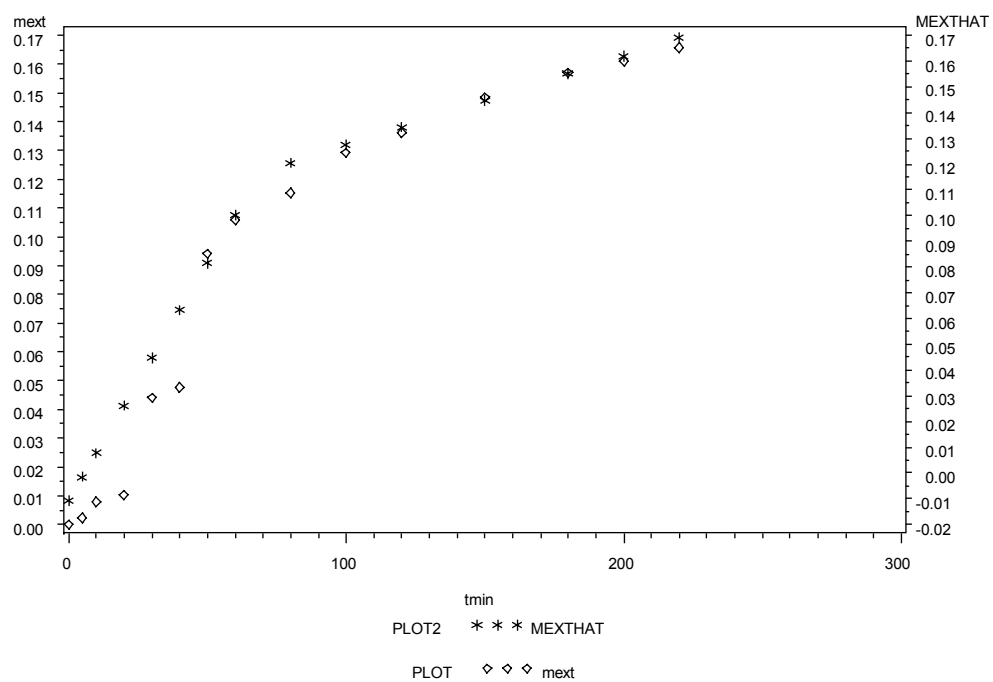


Figura VI.3 – Gráfico da dispersão.
Ensaio Shiitake: 40oC, 300 bar,3.33 g/min



VI.2 – Experimento realizado a 50°C, 300 bar e 3,33 g/min.

Ensaio Shiitake: 50oC, 300 bar,3.33 g/min

The NLIN Procedure
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	Iterative Phase			Sum of	
	b0	b1	b2	knot1	Squares
0	-0.0271	0.000810	-0.00034	90.0000	0.0889
1	-0.00559	0.00179	-0.00126	42.0889	0.0145
2	-0.00911	0.00195	-0.00132	62.3269	0.000679
3	-0.00893	0.00196	-0.00140	67.7194	0.000570
4	-0.00893	0.00196	-0.00140	67.3796	0.000568

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	4
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.005019
Object	0.002794
Objective	0.000568
Observations Read	15
Observations Used	15
Observations Missing	0

Source	Sum of DF	Squares	Mean Square	Approx F Value	Pr > F
Regression	4	0.2325	0.0581	491.65	<.0001
Residual	11	0.000568	0.000052		
Uncorrected Total	15	0.2331			
Corrected Total	14	0.0767			

Ensaio Shiitake: 50oC, 300 bar,3.33 g/min

The NLIN Procedure

Parameter	Approx Estimate	Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.00893	0.00419	-0.0182	0.000304
b1	0.00196	0.000124	0.00169	0.00224
b2	-0.00140	0.000137	-0.00170	-0.00110
knot1	67.3796	5.5308	55.2063	79.5528

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.7957507	0.7239888	0.3174077
b1	-0.7957507	1.0000000	-0.9098187	-0.6478703
b2	0.7239888	-0.9098187	1.0000000	0.3436055
knot1	0.3174077	-0.6478703	0.3436055	1.0000000

Ensaio Shiitake: 50oC, 300 bar,3.33 g/min

Obs	tmin	mext	AL1	MEXTHAT	MRES
1	0	0.0000	0	-0.00893	0.008928
2	5	0.0002	0	0.00089	-0.000686
3	10	0.0021	0	0.01070	-0.008601
4	20	0.0304	0	0.03033	0.000070
5	30	0.0389	0	0.04996	-0.011059
6	40	0.0790	0	0.06959	0.009412
7	50	0.0965	0	0.08922	0.007283
8	60	0.1035	0	0.10885	-0.005346
9	80	0.1263	0	0.13039	-0.004086
10	100	0.1391	10	0.14157	-0.002465
11	120	0.1557	30	0.15274	0.002956
12	150	0.1734	60	0.16951	0.003887
13	170	0.1872	80	0.18069	0.006508
14	200	0.1962	110	0.19746	-0.001260
15	220	0.2031	130	0.20864	-0.005539

Ensaio Shiitake: 50oC, 300 bar,3.33 g/min

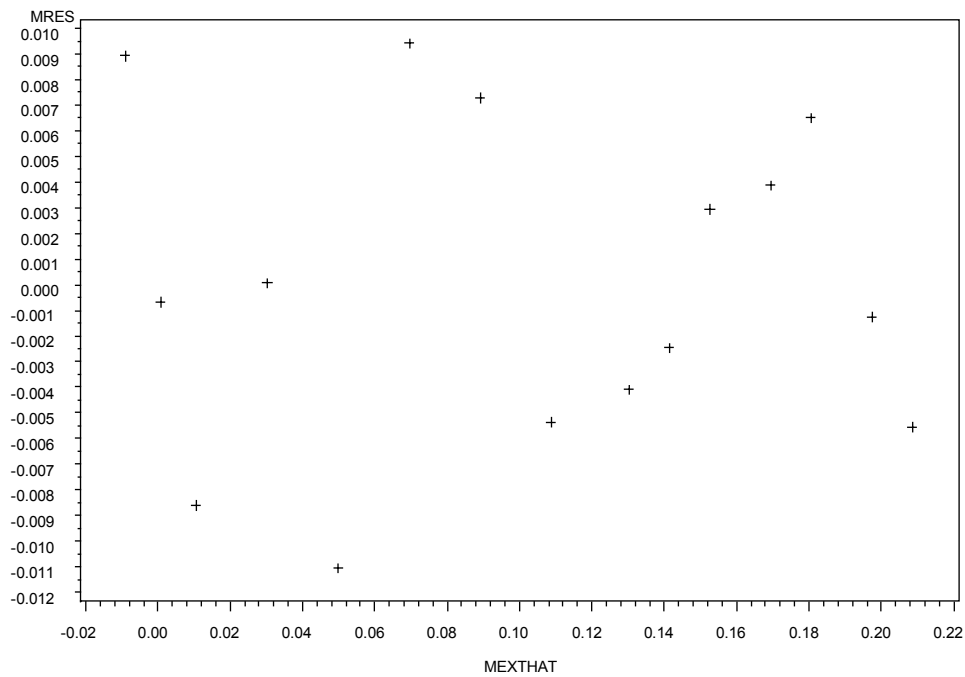


Figura VI.4 – Gráfico de dispersão.
Ensaio Shiitake: 50oC, 300 bar,3.33 g/min

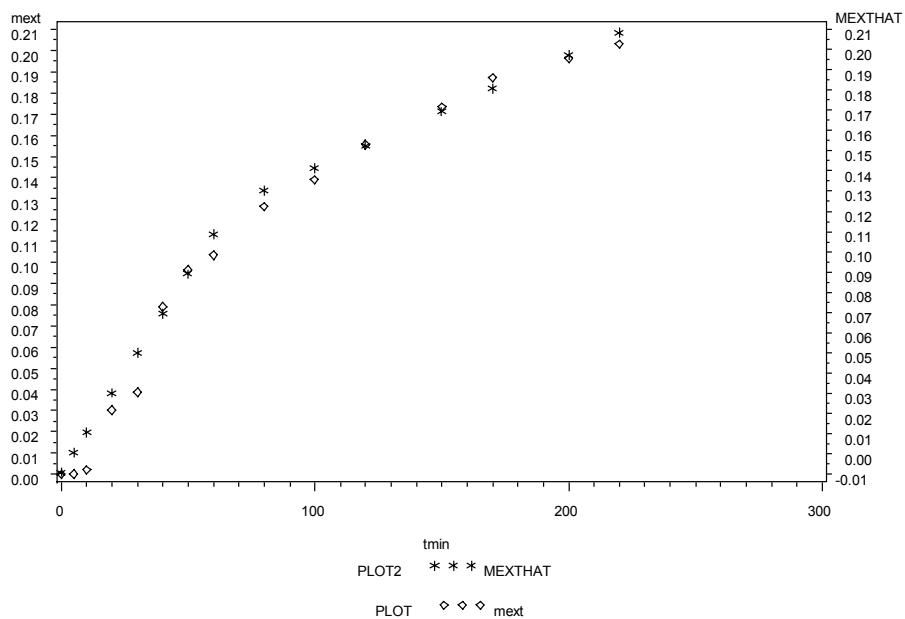


Figura VI.5 – Gráfico de ajuste : 50°C, 300 bar e 3,33 g/min.

**ANEXO VII – CURVA DE RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO COM
DICLOROMETANO COMO CO-SOLVENTE**

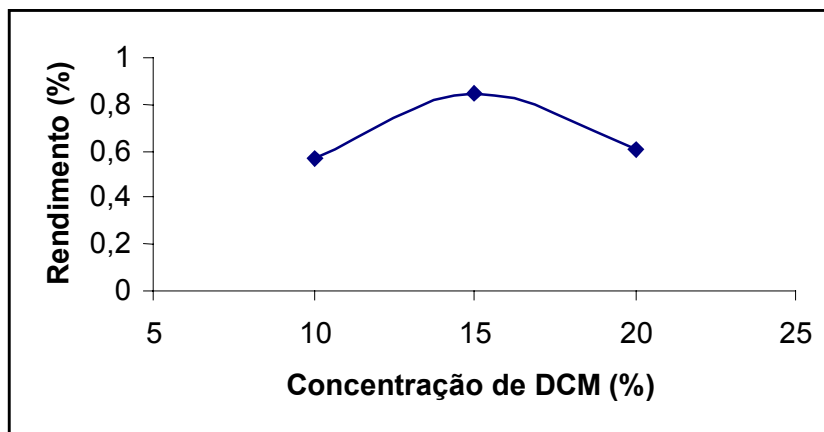


Figura VII.1 - Curva de rendimento de extração utilizando três concentrações de co-solvente diclorometano.

ANEXO VIII – CROMATOGRAMAS EXTRATOS DE SHIITAKE OBTIDOS NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO

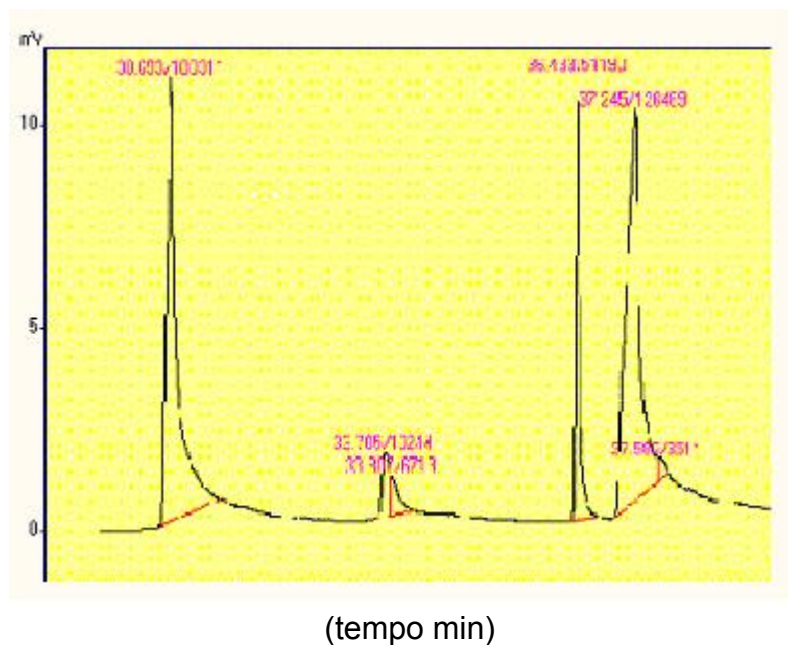


Figura I – Cromatograma 30°C e 150 bar, 3,33g/min.

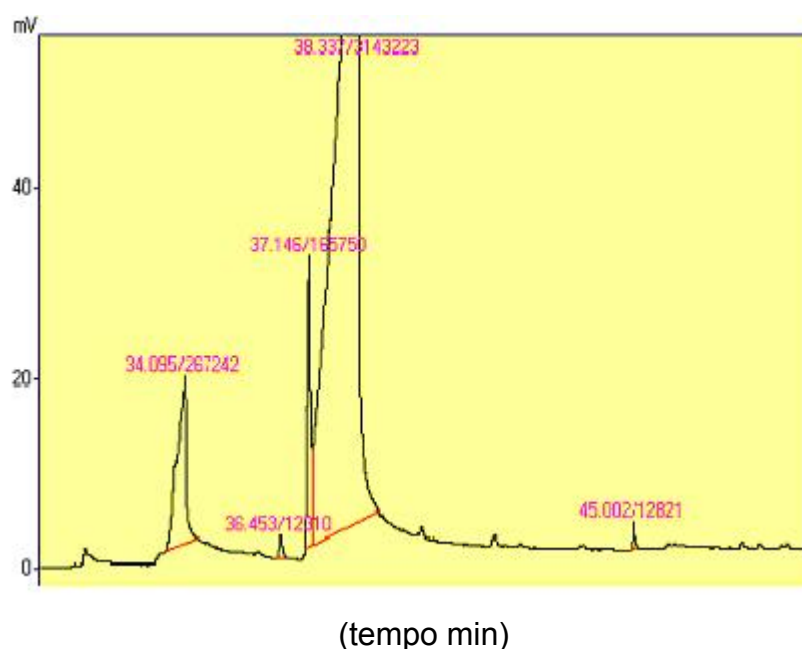


Figura II – Cromatograma 40°C e 250 bar, 3,33g/min (0-120 minutos).

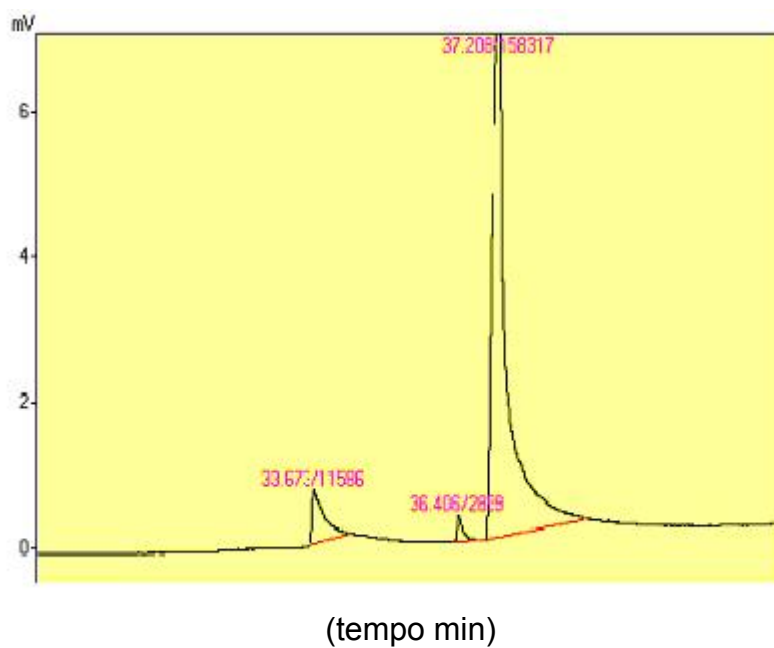


Figura III – Cromatograma 40°C e 250 bar, 3,33g/min (120-240 minutos).

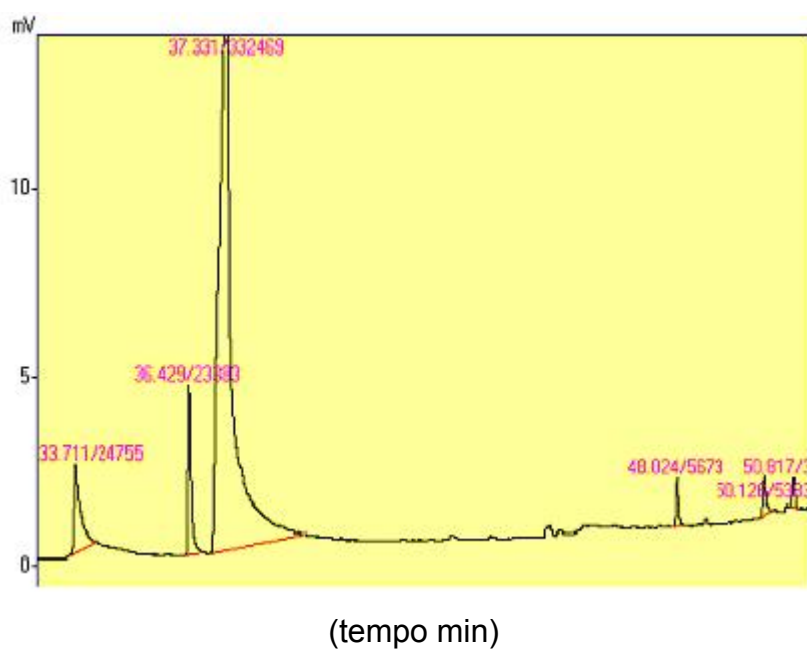
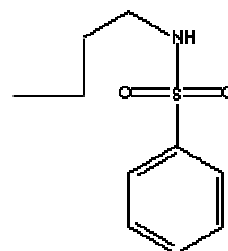


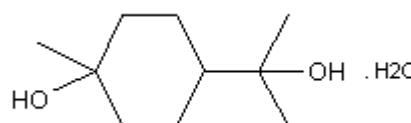
Figura IV – Cromatograma 40°C e 250 bar, 3,33g/min (240-360 minutos).

**ANEXO IX – ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS
IDENTIFICADOS NO ÓLEO DE SHIITAKE**

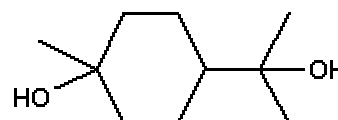
N-butylbenzenesulfonamida
($C_6H_5SO_2NH(CH_2)_3CH_3$)
MOL= 213,30 g/gmol



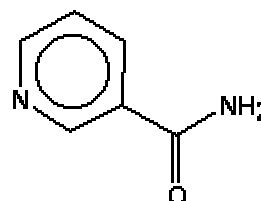
Terpin Hidratado (p-Menthane-
1,8-diol)
($C_{10}H_{20}O_2 \cdot H_2O$)
MOL= 190,28 g/gmol



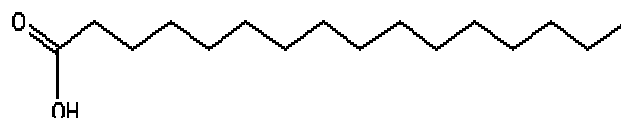
1,8-Terpin
($C_{10}H_{20}O_2$)
MOL= 172,26 g/gmol



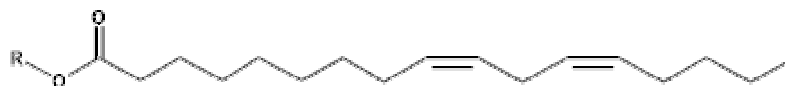
Niacinamida
($C_6H_6N_2O$)
MOL= 122,13 g/gmol



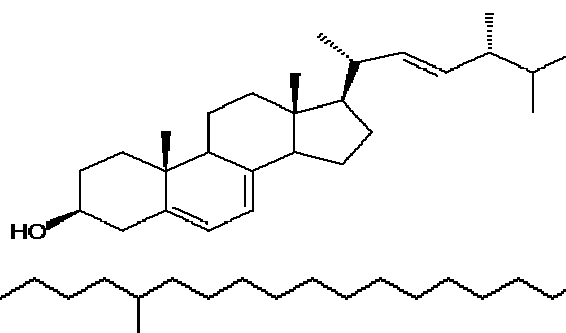
Ácido Palmítico (n-
hexadecanóico)
 $C_{16}H_{32}O_2$
MOL= 256,42 g/gmol



Ácido α - linoleico (ácido 9,12-
octadecadienóico)
($C_{18}H_{32}O_2$)
MOL= 280,5 g/gmol



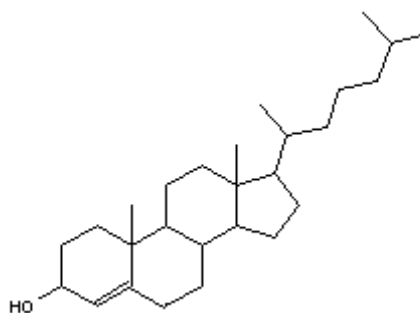
Ergosterol ((22E)-Ergosta-
5,7,22-trien-3 β -ol)
($C_{28}H_{44}O$)
MOL= 396,65 g/gmol



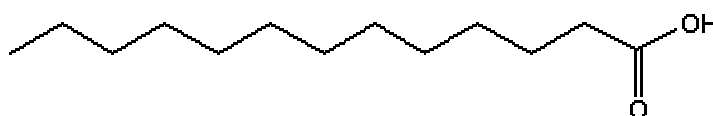
5-Metil-octadecano
($C_{19}H_{40}$)
MOL= 268,52 g/gmol



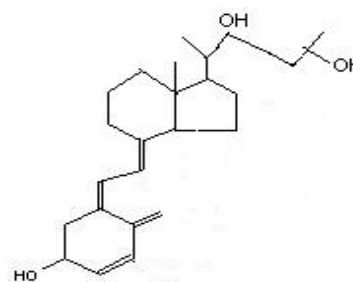
4-Cholesten-3 β -ol
(C₂₇H₄₆O)
MOL= 386 g/gmol



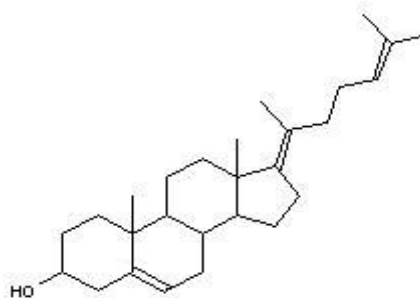
2,4-decadienal ((Z,Z)-2,4-decadienal)
(C₁₀H₁₆O)
MOL= 152,1 g/gmol
Ácido Tridecanóico
(C₁₃H₂₆O₂)
MOL= 214,34 g/gmol



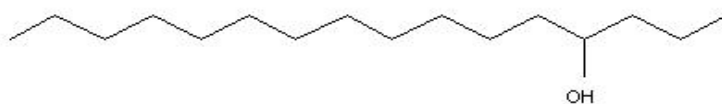
24,25-dihydroxycholecalciferol
(C₂₇H₄₄O₃)
MOL= 416 g/gmol



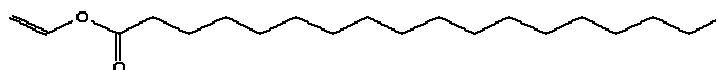
Cholesta-5,17(20),24-trien-3-ol,
(3 β)
(C₂₇H₄₂O)
MOL= 382 g/gmol



4-hexadecanol
(C₁₆H₃₄O)
MOL= 242,44 g/gmol



Ácido esteárico (ácido octadecanóico)
(C₂₀H₃₈O₂)
MOL= 310,51 g/gmol
8-metil-heptadecano
(C₁₈H₃₈)
MOL= 254 g/gmol



ANEXO X – CURVA PADRÃO DE ÁCIDO TÂNICO EMPREGADA NA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

Tabela X.1 – Leitura da absorbância das concentrações de ácido tânico para a curva padrão.

Absorbância (760 nm)	Concentração de ácido tânico (mg)
0,087	0,1
0,138	0,2
0,269	0,4
0,333	0,6
0,472	0,8
0,594	1,0

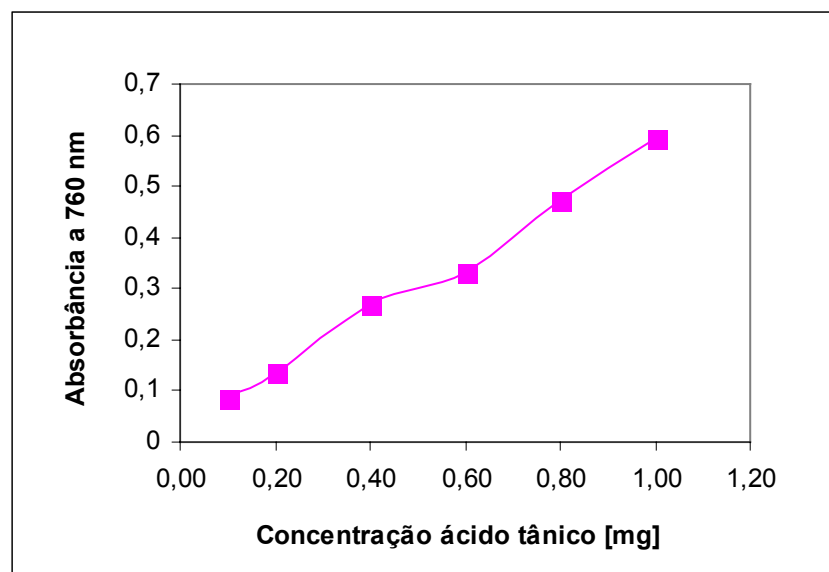


Figura X.1 – Curva padrão de ácido tânico.