

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

Aline Krümmel

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE COGUMELO OSTRAL
(*Pleurotus sajor-caju*)**

Florianópolis - SC
2018

Aline Krümmel

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE COGUMELO OSTRA
(*Pleurotus sajor-caju*)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Regina
Salvador Ferreira

Coorientador: Dr. Luiz Gustavo
Gonçalves Rodrigues

Florianópolis - SC
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Krümmel, Aline

Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Antioxidante de Extratos de Cogumelo Ostra (*Pleurotus sajor-caju*) / Aline Krümmel ; orientadora, Sandra Regina Salvador Ferreira ; coorientador, Luiz Gustavo Gonçalves Rodrigues , Florianópolis, 2018.

135 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. *Pleurotus sajor-caju*. 3. extração supercrítica. 4. líquido pressurizado. 5. Atividade biológica. I. Ferreira, Sandra Regina Salvador. II. Rodrigues, Luiz Gustavo Gonçalves. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Aline Krümmel

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE COGUMELO OSTRA
(*Pleurotus sajor-caju*)**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof.^a Dr.^a Sandra Regina Salvador Ferreira
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Luiz Gustavo Gonçalves Rodrigues
Coorientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Lanza
Universidade Federal de Santa
Catarina

Dr.^a Patrícia Benelli
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul

Florianópolis, 15 de março de 2018

Este trabalho é dedicado a Deus pela graça dessa oportunidade. Aos meus queridos pais, Airton e Salete, e ao meu irmão, Alisson, pelo amor incondicional e confiança em mim depositada. Ao meu noivo, Glauco, por acreditar em mim, até mais do que eu mesma, e sempre me incentivar a persistir rumo à concretização deste objetivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proteger, guiar e abençoar durante todo caminho.

A minha família, meu porto seguro em todos os momentos da vida, pelo incentivo e encorajamento a mim prestados.

Ao meu amor, Glauco, pela parceria na vida, por ser meu refúgio de todas as horas, meu confidente, por me amar, por me compreender e aguentar meus “dias ruins”, por nunca desistir de nós, apesar da distância, e sempre me motivar a buscar a realização dos meus sonhos.

À professora Sandra Regina Salvador Ferreira, agradeço pela valiosa orientação, pela confiança e por todos os ensinamentos.

Ao Gustavo, meu coorientador, agradeço pelo conhecimento e tempo compartilhados, bem como pela disponibilidade e toda ajuda a mim prestada no decorrer de todo o mestrado.

Ao professor Márcio Rossi pelo auxílio nas análises microbiológicas, sempre tão prestativo e dedicado.

Aos membros da banca por aceitarem avaliar este trabalho e pelas considerações realizadas.

Aos IC's Marcos Castiani e Carolina Guimarães pelo esforço e todo auxílio com os experimentos.

Ao PPGEAL/UFSC por oferecer toda a estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Aos amigos do LATESC por fazerem do laboratório um lugar agradável de se estar, pela convivência, amizade, bons cafés da tarde e por todo conhecimento compartilhado.

Um agradecimento especial a minha querida amiga Rafaela Hall, por ter sido meu braço direito nessa etapa. Obrigada por toda amizade e apoio a mim prestados no decorrer de toda esta trajetória, que foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

À Aline Elias, agradeço por todos os conselhos, pelo incentivo e por todo o auxílio durante essa caminhada. Obrigada pela amiga e vizinha companheira que foste, tornando meus dias mais alegres.

Às colegas e amigas que a UFSC me deu, Nely Almeida, Aline Gomide, Daniele Severo, Milena Nascimento, Mariane Proner e Carolina Boeira pela parceria e momentos de descontração.

Às minhas amadas amigas de infância, Maitê, Dandriaila e Olívia, por preservarem nossa amizade, mesmo distantes, por compreenderem minha ausência e as dificuldades deste período e ainda assim sempre me apoiarem a persistir.

A todos que de alguma forma contribuíram para a concretização desse objetivo, torcendo por mim e pelo sucesso deste trabalho.

*Tudo é possível para quem tem fé
em Deus e sabe onde quer chegar.*

Marcos 9:23

RESUMO

Cogumelos são fungos comestíveis de alto valor nutricional e reconhecidas propriedades funcionais. O cogumelo *Pleurotus sajor-caju*, conhecido como cogumelo ostra, é um fungo comestível de origem asiática, rico em vitaminas e aminoácidos, que apresenta propriedades terapêuticas e diversas aplicações biotecnológicas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antioxidante, antimicrobiano e a composição química de extratos de *Pleurotus sajor-caju* obtidos através do uso de diferentes tecnologias de extração. Para extração a baixa pressão utilizou-se o método de Soxhlet empregando os solventes etanol e hexano. As extrações a alta pressão foram realizadas por extração supercrítica (ESC), extração com líquido pressurizado (ELP) e extração sequencial (ES; ESC seguida de ELP). Os ensaios através de ESC com CO₂ e com a mistura de CO₂ e etanol em diferentes concentrações, empregaram pressões de 200 e 300 bar, a uma temperatura e vazão fixas de 40°C e 12 g.min⁻¹. As condições experimentais avaliadas para a ELP foram temperaturas de 40 e 80 °C, pressão de 100 bar e modos de extração estático (30 mL de solvente) e dinâmico (vazão de 2 mL.min⁻¹), utilizando etanol como solvente. A ES teve sua primeira etapa realizada por ESC com CO₂ puro a 300 bar e 40 °C, seguida de ELP a 100 bar e 80 °C em modo estático. A qualidade dos extratos foi avaliada em termos de teor de compostos fenólicos totais (TFT) pelo método de Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS. Os resultados mostraram que os extratos obtidos por Soxhlet utilizando etanol como solvente e por ELP em modo dinâmico a 80 °C apresentaram os maiores rendimentos (15,61 e 15,35 %, respectivamente), enquanto o melhor rendimento da ESC com CO₂ foi na condição de 300 bar e 40 °C (1,05 %). O emprego de 10 % de etanol como cossolvente na ESC aumentou em 2,4 vezes o rendimento de extração. Os melhores resultados de TFT e de potencial antioxidante foram obtidos no extrato proveniente da extração em Soxhlet com etanol, seguido da ES. A adição de cossolvente na ESC aumentou o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante dos extratos de cogumelo *P. sajor-caju*. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela concentração mínima inibitória (CMI) frente a *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. Os extratos obtidos por ESC com e sem cossolvente, Soxhlet com hexano e ELP a 40 °C apresentaram atividade antibacteriana, especialmente contra *S. aureus*. Para *C. albicans*, apenas os extratos obtidos por ESC e Soxhlet com hexano apresentaram atividade antifúngica, com destaque para o extrato ESC com CO₂, um forte

inibidor para todos os micro-organismos testados. O método ES apresentou bons resultados de rendimento e de potencial antioxidante do extrato, comparado com os ensaios utilizando a matéria-prima bruta, sugerindo a combinação de processos como estratégia para melhor recuperação de compostos com atividades biológicas. A composição dos extratos, avaliada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), mostrou a presença de ácido linoleico (ômega-6; composto majoritário identificado na maior parte dos extratos), ácido pentadecanoico e 2-etilacridina, ambos com potencial antimicrobiano citado pela literatura. Estes resultados indicam que os extratos de cogumelo *P. sajor-caju* são fontes potenciais de compostos antioxidantes e antimicrobianos e, dessa forma, a busca por condições operacionais, como a utilização de processos verdes a alta pressão e processos sequenciais, que favoreçam a extração de compostos ou a qualidade dos extratos são alternativas promissoras para este cenário.

Palavras-chave: *Pleurotus sajor-caju*, extração supercrítica, líquido pressurizado, antimicrobianos, antioxidantes.

ABSTRACT

Mushrooms are edible fungi of high nutritional value and recognized. The *Pleurotus sajor-caju*, known as oyster mushroom, is an edible mushroom of Asian origin, rich in vitamins and amino acids, which presents therapeutic properties and various biotechnological applications. In this way, the objective of the present work was evaluates the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of *Pleurotus sajor-caju* extracts obtained through different extraction technologies. For extraction at low pressure the Soxhlet method was used using the solvents ethanol and hexane. The high pressure extractions were performed by supercritical extraction (SFE), pressurized liquid extraction (PLE) and sequential extraction (SE; SFE followed PLE). Tests using ESC with CO₂ and with the mixture of CO₂ and ethanol at different concentrations employed pressures of 200 and 300 bar at a fixed temperature and flow rate of 40 °C and 12 g.min⁻¹. The experimental conditions evaluated for the ELP were temperatures of 40 and 80 °C, pressure of 100 bar and modes of static (30 mL solvent) and dynamic extraction (flow of 2 mL.min⁻¹), using ethanol as solvent. ES had its first stage performed by ESC with pure CO₂ at 300 bar and 40 °C followed ELP at 100 bar and 80 °C in static mode. The quality of extracts was evaluated in terms of total phenolic compounds (TFT) by the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant activity by the DPPH and ABTS methods. The results showed that the extracts obtained by Soxhlet using ethanol as solvent and the PLE in dynamic mode at 80 °C presented the highest yields (15.61 and 15.35 %, respectively), while the best yield for extracts of SFE using pure CO₂ was in the condition of 300 bar and 40 °C (1.05 %). The use of 10 % ethanol as co-solvent in the SFE increased by 2.4 times the extraction yield. The best results for the TFT and the antioxidant potential were obtained in the extract from the Soxhlet extraction with ethanol, followed by the SE, for both tests. The addition of cosolvents to the SFE process promoted an increase in the total phenolic compounds content and antioxidant activity of the *P. sajor-caju* mushroom extracts. The antimicrobial activity was evaluated by the minimum inhibitory concentration (MIC) against *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans*. The extracts obtained by SFE with and without addition of cosolvent, as well as by the Soxhlet method with hexane and PLE at 40 °C in the two modes studied showed antibacterial activity, being higher for *S. aureus*. For *C. albicans*, only the extracts obtained by SFE and Soxhlet with hexane presented antifungal activity, which highlights the SFE extract

with pure CO₂ as a strong inhibitor for all the microorganisms tested. The SE method presented good results related from the extraction yield to the significant increase in the antioxidant potential of the extract compared to those obtained from extraction techniques that used the raw material, indicating that this could be a strategy to obtain products with better biological activities. The quantification and identification of extracts composition were evaluated by quantification and identification of extracts by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The presence of linoleic acid (omega-6, major compound identified in most of the extracts), pentadecanoic acid, and 2-ethylacridine, the latter with antimicrobial potential cited in the literature. These results indicate that *P. sajor-caju* mushroom extracts are potential sources of antioxidant and antimicrobial compounds and, therefore, the search for operational conditions, such as the use of green processes at high pressure and sequential processes, which positively favor extraction yield or extract quality are promising alternatives for this scenario.

Keywords: *Pleurotus sajor-caju*, supercritical extraction, liquid pressurized, antimicrobials, antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Corpos de frutificação do cogumelo <i>Pleurotus sajor-caju</i> ..	32
Figura 2 – Extrator Soxhlet	41
Figura 3 – Diagrama pressão-temperatura para um componente puro..	42
Figura 4 – Fluxograma simplificado do processo de ESC	45
Figura 5 – Curva de ESC com representação das três etapas da extração	46
Figura 6 – Cogumelo <i>P. sajor-caju</i> desidratado (a) e amostra após a moagem (b)	54
Figura 7 – Equipamento para extração em Soxhlet (a) extrator (b) sistema em funcionamento.	56
Figura 8 – Extrator supercrítico	57
Figura 9 – Diagrama da unidade de extração. (1) Cilindro de CO ₂ ; (2) Reservatório de cossolvente; (3) Coluna de extração; (4) Frasco coletor; (5) Bomba de CO ₂ ; (6) Bomba de cossolvente; (7) Rotâmetro; (8) Compressor de ar; (9) Banho de resfriamento do CO ₂ ; (10) Banho termostático; (11)- Banho de aquecimento da coluna de extração.	59
Figura 10 – Equipamento de extração com líquidos pressurizados. (a) Imagem do equipamento desenvolvido no LATESC. (b) Fluxograma de ELP.....	62
Figura 11 – Cinética de extração supercrítica de cogumelo <i>P. sajor-caju</i> a 200 bar, 40 °C e 12 ± 2 g.min ⁻¹ de CO ₂	73
Figura 12 – Cinéticas de extração com etanol pressurizado para <i>P. sajor-caju</i> a 40 e 80 °C, 100 bar e com vazão de 2 mL.min ⁻¹	75
Figura 13 – Curva padrão de ácido gálico utilizada no cálculo de TFT dos extratos de <i>P. sajor-caju</i>	133
Figura 14 – Curva de calibração de Trolox, utilizada na determinação de	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção brasileira anual de cogumelos	30
Tabela 2 – Composição centesimal do cogumelo <i>P. sajor-caju</i> em base seca.....	32
Tabela 3 – Atividades biológicas do <i>P. sajor-caju</i>	34
Tabela 4 – Caracterização do cogumelo <i>Pleurotus sajor-caju</i>	71
Tabela 5 – Parâmetros da cinética de extração supercrítica do cogumelo <i>P. sajor-caju</i> a 200 bar, 40 °C e 12 ± 2 g.min ⁻¹ de CO ₂	74
Tabela 6 – Rendimento global de extração (X ₀) para o cogumelo <i>P. sajor-caju</i> obtido por diferentes técnicas de extração.....	76
Tabela 7 – Teor de compostos fenólicos total (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico para os extratos de cogumelo <i>P. sajor-caju</i>	79
Tabela 8 – Rendimento x Teor de compostos fenólicos total (TFT).....	82
Tabela 9 – Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de cogumelo <i>P. sajor-caju</i> através do método DPPH, expressos através do percentual de atividade antioxidante (% AA) e concentração efetiva a 50 % (EC ₅₀).....	83
Tabela 10 – Capacidade antioxidante determinada pelo método ABTS para os extratos de <i>P. sajor-caju</i>	87
Tabela 11 – Valores da concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de <i>P. sajor-caju</i> para <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i> , expressos em µg mL ⁻¹	90
Tabela 12 – Compostos identificados nos extratos de <i>P. sajor-caju</i> avaliados por CG-EM.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 13 – Tempo de extração, massa de extrato, massa de extrato acumulada e rendimento (X ₀) do experimento cinético a 200 bar, 40 °C e 12 ± 2 g CO ₂ .min ⁻¹	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA – atividade antioxidante
ABTS – Radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA – Análise de variância
BHT – Butil-hidroxi-tolueno
CER – período de taxa constante de extração
CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CMI – concentração mínima inibitória
CO₂ – dióxido de carbono
DCP – Etapa difusional (*Diffusion Controlled Period*)
D_p – diâmetro médio de partícula
DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EAG – equivalente em ácido gálico
EC₅₀ – *Effective concentration*
ELP – Extração com Líquido Pressurizado
ESC – Extração Supercrítica
ES – Extração sequencial
FER – período de taxa decrescente de extração
GRAS – Geralmente reconhecido como seguro (*Generally Recognized as Safe*)
LATESC – Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica
M_{CER} – taxa de transferência de massa
P – Pressão (bar)
Q_{CO₂} – vazão de dióxido de carbono
R_{CER} – rendimento do período CER
ROS – espécies reativas do oxigênio
T – Temperatura (°C)
t_{CER} – duração do período CER
TEAC – Atividade antioxidante equivalente ao trolox (*Trolox equivalente antioxidante capacity*)
t_{FER} – duração do período FER
TFT – teor de compostos fenólicos totais
X₀ – rendimento global
x_i – massa das frações retidas
Y_{CER} – razão mássica de soluto na saída do leito

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	OBJETIVOS	27
1.1.1	Objetivo geral	27
1.1.2	Objetivos específicos	27
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1	COGUMELOS COMESTÍVEIS NA ALIMENTAÇÃO.....	29
2.2	COGUMELO OSTRAL - <i>Pleurotus sajor-caju</i>	30
2.3	PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE <i>P. sajor-caju</i>	33
2.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	34
2.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	38
2.6	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	39
2.6.1	Soxhlet	40
2.6.2	Extração supercrítica (ESC)	41
2.6.2.1	Curvas globais de extração.....	45
2.6.3	Extração com líquido pressurizado (ELP)	47
2.7	ESTADO DA ARTE.....	50
3	MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1	MATÉRIA-PRIMA	53
3.2	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	54
3.3	EXTRAÇÃO A BAIXA PRESSÃO	55
3.2.1	Soxhlet	55
3.2.2	Eliminação do solvente	56
3.4	EXTRAÇÃO SUPERCRTICA.....	57
3.4.1	Procedimento experimental	58
3.4.2	Determinação da cinética de extração	60
3.5	EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO.....	61
3.5.1	Procedimento experimental de ELP	63
3.6	EXTRAÇÃO SEQUENCIAL	63

3.7	DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO GLOBAL (X_0) ...	64
3.8	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS	64
3.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	65
3.9.1	Método DPPH.....	65
3.9.2	Método ABTS.....	66
3.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	67
3.11	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS.....	69
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	71
4.2	CINÉTICA DE EXTRAÇÃO.....	72
4.2.1	Cinética de extração supercrítica	72
4.2.2	Cinética de extração com líquido pressurizado.....	74
4.3	RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES.....	75
4.4	TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (TFT)	78
4.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	82
4.5.1	Potencial antioxidante pelo método do radical DPPH.....	82
4.5.2	Potencial antioxidante pelo método do radical ABTS	85
4.6	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	89
4.7	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS	94
5	CONCLUSÃO.....	101
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	103
	REFERÊNCIAS.....	105
	APÊNDICE A – Dados experimentais da curva de extração.....	131
	APÊNDICE B – Curva padrão de ácido gálico.....	133
	APÊNDICE C– Curva padrão de trolox.....	135

1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos são fungos macroscópicos que fazem parte da história de inúmeras civilizações. Já na Antiguidade eram utilizados como alimento de alto valor nutritivo e terapêutico. Desde então, esses fungos atraem o interesse de pesquisadores por suas propriedades nutricionais, uma vez que são ricos em proteínas, fibras, vitaminas e minerais, e apresentam baixo teor de lipídeos (DIAS; ABE; SCHWAN, 2004), e também por suas propriedades medicinais, devido aos seus efeitos antitumorais e imunostimulantes (NOVAES; FORTES, 2005).

Existem aproximadamente 140 mil espécies de cogumelos, sendo que apenas 10 % são conhecidas, e somente 2 mil são comestíveis, dentre as quais apenas 25 são comercialmente cultivadas (WASSER, 2002). Conforme a Associação Nacional dos Produtores de Cogumelo (ANPC), as principais espécies comestíveis, cultivadas no Brasil, são *Agaricus bisporus* (Champignon de Paris), *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Pleurotus sp* (Shimeji, cogumelo ostra) (ANPC, 2017).

O cogumelo *Pleurotus sajor-caju*, também conhecido como cogumelo ostra e no Japão como Houbitake, é um fungo macroscópico, aeróbio, que representa aproximadamente 17 % da produção brasileira anual, a qual gira em torno de 12 mil toneladas/ano (ANPC, 2017). Taxonomicamente, este cogumelo pertence ao reino *Fungi*, estando incluído no gênero *Pleurotus* da família *Pleurotaceae*, ordem *Agaricales* e filo *Basidiomycota* (PRAMANIK et al., 2005; SATITMANWIWAT et al., 2012; EOL, 2018; FINIMUNDY et al., 2018).

Dentre as propriedades atribuídas a esse fungo, encontram-se compostos que apresentam atividade biológica. Destacam-se as vitaminas do complexo B, como a riboflavina, que funciona como um antioxidante, e a niacina, uma antiolesterolêmica natural (FINIMUNDY et al., 2013). As beta-glucanas, polissacarídeos complexos compostos por moléculas de glicose e fibra solúvel, apresentam importantes propriedades antienvhecimento e anti-inflamatório, como também são consideradas eficientes no tratamento de várias enfermidades, incluindo doenças alérgicas, diabetes e câncer (CARBONERO et al., 2012).

Além disso, esta espécie de cogumelo apresenta alto teor de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), ácidos graxos essenciais que devem ser ingeridos na dieta. Estudos mostram que populações com maior ingestão de PUFA possuem redução significativa na incidência e mortalidade por câncer (MIZUNO; ZHUANG, 1995). Dentre os lipídios

destacam-se principalmente o ergosterol, precursor da vitamina D por ação de raios ultravioleta, o qual age como anticarcinogênico e o ácido linoleico (ômega-6) que atua como bactericida. Estudos indicam, também, a presença de ribonuclease e sua ação antimicrobiana (NGAI; NG, 2004).

Uma maneira de valorização dessas importantes propriedades é através do estudo de técnicas de extração para a obtenção de compostos bioativos de alta qualidade, grande rendimento e baixo custo. Os métodos convencionais de extração com solventes orgânicos são muito utilizados para a obtenção de extratos de diferentes matrizes vegetais. Entretanto, essas técnicas geralmente utilizam grandes quantidades de solventes, longos tempos de extração e altas temperaturas são necessárias, o que pode promover a degradação destes compostos durante o processo extrativo (JU; HOWARD, 2003; NOBRE et al., 2006).

Assim, a utilização de técnicas de extração alternativas aos métodos convencionais, como por exemplo, emprego de fluidos pressurizados [extração supercrítica (ESC) ou extração com líquidos pressurizados (ELP)] se faz necessário para uma melhor seletividade e eficiência dos processos de extração. Essas técnicas inovadoras representam uma alternativa ambientalmente correta e economicamente viável que não utilizam altas temperaturas e podem ser realizadas em tempo reduzido. Neste contexto, pode-se destacar o grupo de pesquisa na área de fluidos sub/supercríticos do Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina que, desde 1999, desenvolve estudos consolidados com o principal foco na extração de compostos bioativos a partir de matrizes biológicas.

Dessa forma, surge o interesse pela obtenção de extratos bioativos a partir do cogumelo *P. sajor-caju*, utilizando tecnologias a alta pressão, considerando o fato desta matéria-prima apresentar um potencial biológico muito conhecido e citado pela literatura científica (MIZUNO; ZHUANG, 1995; CARBONERO et al., 2003; NGAI, NG, 2004; PRAMANIK et al., 2005; KANAGASABAPATHY et al., 2012; CONTESSA et al., 2016; FINIMUNDY et al., 2018). Esse estudo também apresenta grande importância, devido ao fato de até o momento não ter sido encontrado nenhum trabalho empregando processos a alta pressão referentes à extração de compostos bioativos do cogumelo *Pleurotus sajor-caju*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é a utilização de processos verdes a alta pressão, empregando CO₂ supercrítico e etanol pressurizado para obtenção de extratos de cogumelos *Pleurotus sajor-caju* e sucessiva avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana desses extratos.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Obter extratos do cogumelo *P. sajor-caju* e comparar o rendimento entre os métodos a baixa pressão (Soxhlet) com técnicas de extração em alta pressão (ESC, ELP e ES);
- b) Definir os parâmetros de extração e avaliar as condições operacionais para a ESC, ELP e ES do cogumelo *P. sajor-caju*, como temperatura, pressão, tempo, vazão de solvente e modo de extração;
- c) Obter os extratos supercríticos e por líquido pressurizado do *P. sajor-caju* em diferentes condições de processo;
- d) Obter extrato de *P. sajor-caju* por ES na melhor condição estudada de ESC e ELP;
- e) Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos do cogumelo pelo método de determinação da concentração mínima inibitória frente aos seguintes micro-organismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*;
- f) Avaliar a atividade antioxidante dos diferentes extratos do *P. sajor-caju* obtidos por diferentes técnicas de extração através dos métodos DPPH e ABTS, bem como pelo teor de compostos fenólicos totais através do método de Folin-Ciocalteu;
- g) Determinar a composição dos extratos do *P. sajor-caju* através de cromatografia gasosa com espectrometria de massas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COGUMELOS COMESTÍVEIS NA ALIMENTAÇÃO

Cogumelos comestíveis veem sendo adicionados regularmente na dieta da população, por apresentarem várias características nutricionais como, por exemplo, a excelência em fontes de aminoácidos essenciais, proteínas, vitaminas, minerais, carboidratos, fibras, sendo pobres em gorduras saturadas, trans e colesterol além de possuir sabor agradável (ANPC, 2017).

A produção mundial de cogumelos comestíveis vem aumentando com a popularização do cultivo e industrialização dos mesmos, além da descoberta de benefícios que o consumo destes pode trazer à saúde do homem (ALVES et al, 2013). No Brasil também se observa esta tendência, mesmo não fazendo parte do hábito alimentar da grande maioria da população. Mas já foi percebido um aumento de consumo neste país, devido, principalmente, ao reconhecimento do seu alto valor nutritivo, potencial medicinal e ao aumento da oferta, tornando o produto mais popular e acessível (FINIMUNDY et al., 2013). Segundo a ANPC (2018), o consumo de cogumelos per capita anual no Brasil dobrou nos últimos dez anos.

De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical* (FAOSTAT) a China lidera a produção mundial de cogumelos, seguida pela Itália, Estados Unidos e Holanda. O consumo per capita no país asiático também é o maior do mundo, com 8 kg anuais, por habitante. No Brasil, a média anual, apesar de ter aumentado, ainda é de apenas 160 g, bem abaixo de países europeus, como a Alemanha, que consome 4 kg, França (2 kg) e Itália (1,3 kg). Quanto mais os brasileiros conhecem as propriedades nutricionais e medicinais do alimento, mais se tornam boas as perspectivas do produto no mercado interno (ANPC, 2018).

A ANPC (2017) destaca que, ao longo dos últimos anos, a cadeia produtiva do cogumelo no Brasil tem se estruturado e, atualmente, o cultivo de cogumelos está disseminado em várias regiões do país, o que antes era concentrado na região do Alto Tietê em São Paulo. A produção brasileira anual gira em torno de 12 mil ton/ano, sendo que os principais produtores encontram-se nos estados de São Paulo e Paraná. A Tabela 1 apresenta os valores referentes à produção, divididos por espécie de cogumelos cultivados.

Tabela 1 – Produção brasileira anual de cogumelos

Espécies de cogumelos cultivadas no Brasil	Produção estimada (ton/ano)
<i>Agaricus bisporus</i> (Champignon de Paris)	8.000
<i>Pleurotus</i> sp (Shimeji, Cogumelo ostra)	2.000
<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake)	1.500
<i>Agaricus blazei</i> (Cogumelo-do-sol)	500
Outros	50

Fonte: Adaptado de ANPC (2017).

As maiores barreiras encontradas na comercialização de cogumelos no Brasil estão ligadas à crença popular quanto à sua natureza tóxica, preço, hábito alimentar e ao cultivo com baixa produtividade (DEMIATE; SHIBATA, 2003). No Brasil, o valor do kg do cogumelo desidratado encontra-se em torno de R\$ 135,00 a 250,00, variando conforme o tipo de cogumelo, segundo dados de sites de vendas online (FUJIYAMA, 2017; MASTROIANI, 2017)

Além do valor nutricional, os cogumelos apresentam cores, sabores, aromas e textura únicos, os quais atraem a atenção dos consumidores (CHANG, 2008), bem como destacam-se, também, pela sua capacidade terapêutica (BERNARDI et al., 2010), antioxidante (OYETAYO, 2009) e antimicrobiana (KITZBERGER, 2005).

Akpaja, Isikhuemhen e Okhuoya (2003) realizaram uma pesquisa para avaliar o uso de cogumelos comestíveis e medicinais em um povoado da Nigéria. Eles verificaram que 95 % dos entrevistados consumiam os cogumelos por causa do sabor, enquanto 86 % consumiam como substitutos cárneos. Ainda, 50 % utilizavam os cogumelos como espessantes para as sopas e 36,36 % e 27,27 % consumiam baseados nos seus valores medicinais e nutricionais, respectivamente.

2.2 COGUMELO OSTRAL - *Pleurotus sajor-caju*

O gênero *Pleurotus* pertence à ordem *Agaricales* e à família *Pleurotaceae*. *Pleurotus sajor-caju*, conhecido como cogumelo ostra e também como Houbitake, é um cogumelo comestível de origem asiática, de sabor suave, rico em vitaminas e aminoácidos e que apresenta propriedades terapêuticas (DIAS et al., 2003) e atividade antimicrobiana contra organismos patógenos gram-positivos e gram-negativos (NGAI;

NG, 2004; CONTESSA et al., 2016). Segundo Pramanik (2005), este cogumelo originou-se na Índia, crescendo naturalmente em uma planta suculenta (*Euphorbia royleans*) no sopé dos Himalaias.

É recomendado para iniciantes no hábito de consumir cogumelos, por apresentar sabor suave, saboroso e extremamente saudável, (DIAS et al., 2003). Além disso, são cogumelos de fácil produção, utiliza-se de resíduos agrícolas como, por exemplo, bagaço de cana-de-açúcar e palha de arroz, umedecidos e pasteurizados (FELINTO, 1999).

Segundo Mizuno e Zhuang (1995), alguns dos polissacarídeos pertencentes a este cogumelo apresentam propriedade antitumoral contra o sarcoma 180 em camundongos, demonstrando sua aplicação na área farmacêutica. Conforme Carbonero et al. (2012) alguns polissacarídeos presentes nos cogumelos, e em específico as β -glucanas, cuja presença é reportada nesta espécie, tem a capacidade de atuar como imunomoduladores e antimutagênicos nos sistemas biológicos.

Finimundy et al. (2018) avaliaram a ação anti-inflamatória do cogumelo *P. sajor-caju* utilizando uma linha de células do tipo macrófago de camundongos e observaram que o extrato apresentou atividade na concentração de $339 \pm 115 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, valor IC50 corresponde à concentração de extrato responsável pela inibição de 50 % da produção de óxido nítrico (NO). Carrasco-González et al. (2017) encontraram resultados semelhantes para outras espécies de *Pleurotus*.

A literatura elucidou, recentemente, que o mecanismo de interação entre diferentes ácidos fenólicos ou seus derivados com a enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2), localizada principalmente nas células e tecidos envolvidos em processos inflamatórios, pode estar diretamente relacionado com essa atividade biológica referente a ação anti-inflamatória, devido à inibição da COX-2 (ORLANDO; MALKOWSKI, 2016). Conforme Carvalho (2004), a possibilidade do desenvolvimento de medicamentos mais seletivos, que reduzam a inflamação sem afetar a COX-1 (protetora do estômago e rins) é de suma relevância.

Na Figura 1 pode-se observar a estrutura dos corpos de frutificação do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* (Houbitake) e a Tabela 2 traz os dados referentes a sua composição centesimal estudada por Bonatti (2001).

Figura 1 – Corpos de frutificação do cogumelo *Pleurotus sajor-caju*



Fonte: Cogubras (2017).

Tabela 2 – Composição centesimal do cogumelo *P. sajor-caju* em base seca

Determinação	Valor médio (%)
Cinzas	6,5±0,5
Lipídeos	1,3±0,1
Proteínas	28,2±0,1
Fibras	13,3±0,1
Carboidratos	50,7±0,4

Fonte: Adaptado de Bonatti (2001).

Finimundy et al. (2018) avaliaram o cogumelo *P. sajor-caju* quanto ao seu conteúdo nutricional e encontraram valores iguais a 5,4 % de cinzas, 17,29 % de proteínas, 1,16 % de lipídeos e 76,2 % entre fibras e carboidratos, em base seca. As diferenças de valores obtidos são compreensíveis, pois quando se trabalha com material perecível, a sua composição é função de diversos fatores, como época do ano, região da qual o produto é oriundo, ambiente, natureza do substrato de cultivo, linhagem, estágio de maturação (MAZZUTTI, 2012).

Os dados apresentados na Tabela 2 retratam um alimento de alto valor nutricional. Dados da literatura indicam que os minerais estão presentes em quantidades de 2,6 a 6,5 %, com teores significativos de

cálcio, fósforo, ferro, sódio e potássio, além de rico em vitamina B e aminoácidos essenciais (FINIMUNDY et al., 2013; ALVES, et al., 2013). Segundo dados da FAO, o conteúdo de cinzas no *P. sajor-caju* (6,7 %) é maior que no *Lentinula edodes* (3,7 %), ficando somente inferior ao *Agaricus bisporus* (8,0 %) (PATRABANSH; MADAN, 1997).

É, igualmente, uma boa fonte de vitamina D, proteínas, minerais e carboidratos, bem como possuem baixo teor de gorduras e calorias (ZDRADEK, 2001). O potássio e o fósforo são os dois elementos dominantes do seu conteúdo mineral possuindo, também, uma boa proporção de gordura insaturada, proteínas de alta qualidade e oligoelementos, incluindo o cobre e o zinco (PRAMANIK, 2005).

Os corpos de frutificação do Houbitake, de acordo com Dias et al. (2003), são nutritivos e uma boa fonte de fibras, com ênfase para a presença de beta-glucanas, polissacarídeos complexos compostos por moléculas de glicose, com propriedade antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética e antitumoral (CARBONERO et al., 2012).

A capacidade de desenvolvimento do fungo está associada às condições de cultivo, como meio de cultura, acidez e temperatura, sendo que a temperatura considerada ótima para o desenvolvimento do micélio é de aproximadamente 25 °C. Através do seu metabolismo o cogumelo secreta compostos, os quais muitas vezes são bioativos, podendo assim apresentar atividades biológicas (AKINYELE, 2005).

2.3 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE *P. sajor-caju*

Devido ao envelhecimento da população e doenças relacionadas ao estilo de vida atual, as preocupações relacionadas à saúde estão se tornando cada vez mais importantes. Além disso, a sociedade nos dias de hoje está mais consciente a respeito dos efeitos colaterais potenciais dos medicamentos e está procurando alternativas terapêuticas inovadoras. Assim, o uso de compostos naturais na prevenção de várias doenças e para a manutenção da saúde tem sido estudado. Entre esses compostos naturais estudados estão os cogumelos, que são bem conhecidos pelo seu valor nutricional e propriedades favoráveis à saúde, como por exemplo antienvhecimento, anti-infeccioso, redutor do colesterol e da pressão arterial e, também, do nível de açúcar no sangue (REIS et al., 2017).

Há muito tempo que os fungos têm sido usados para fins medicinais, em especial fungos Basidiomicetos que deram origem a

vários produtos farmacológicos. Chang (2008) acrescenta que as propriedades medicinais dos cogumelos, um dos seus maiores atributos, é a muito tempo muito reconhecido na China, Coreia e Japão. Dentre os produtos de cogumelos medicinais, como suplementos dietéticos por exemplo, cerca de 80 % provêm dos corpos de frutificação, sendo os 20 % restantes correspondentes ao micélio (NGAI; NG, 2003). A estirpe e as condições de cultivo e crescimento do cogumelo vão determinar a qualidade e o conteúdo em substâncias fisiologicamente ativas (BISEN et al., 2010).

Alguns autores consideram os cogumelos como "alimentos funcionais inerentes", alegando que essa é uma característica peculiar dessa matéria-prima (LONDON, 2011; ALVES et al., 2013). Sua composição química inclui vários compostos bioativos que lhes conferem a capacidade de exercer benefícios.

Nesse contexto, várias pesquisas vêm sendo realizadas buscando avaliar o uso terapêutico e a identificação de diferentes substâncias bioativas encontradas nos cogumelos (WASSER, 2002; NGAI; NG, 2004; KITZBERGER, 2005; MAZZUTTI et al., 2012; VALVERDE et al., 2015; CONTESSA et al., 2016). Assim, dentre os potenciais usos estão àqueles ligados às propriedades antioxidantes, antivirais, anti-hipercolesterolemia, anti-inflamatórios, imunomoduladoras, bem como propriedades antitumorais e antimicrobianas, além da diminuição do colesterol e diabetes, como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 – Atividades biológicas do *P. sajor-caju*

Atividade Biológica	Referência
Atividade antitumoral	Finimundy et al. (2013)
Atividade imunomoduladora	Carbonero et al. (2012)
Atividade antibacteriana	Heleno et al. (2015)
Atividade antifúngica	Alves et al. (2013)
Atividade antidiabética	Kanagasabapathy et al. (2012)
Atividade anti-hipertensiva	Chang; Wasser (2012)
Atividade antiviral	Teplyakova; Kosogova (2016)
Atividade antioxidante	Ferreira; Barros; Abreu (2009)
Atividade anti-inflamatória	Valverde et al. (2015)

Fonte: O autor (2018).

2.4 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 (KITZBERGER, 2005).

Um antioxidante é uma substância capaz de neutralizar a ação dos radicais livres. Porém, embora quase todos os organismos possuam defesa antioxidante para atuar na proteção contra danos oxidativos, estes sistemas são insuficientes na proteção completa dos organismos aos danos provocados pela oxidação. Esse fato motivou estudos, os quais indicam que 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).

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).

No corpo humano, assim como em outros organismos aeróbicos, radicais livres e outras espécies reativas estão sendo produzidos continuamente durante o metabolismo celular normal. As espécies reativas do oxigênio (ROS) estão envolvidas em uma série de processos degenerativos, por serem ou gerarem radicais livres. (FERREIRA; BARROS; ABREU, 2009; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). A formação das 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 (RENTZ et al., 2003).

Os radicais livres têm causas diferentes e distintos alvos celulares, nomeadamente proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos. Por esse motivo, muitas doenças foram associadas ao estresse oxidativo, como aterosclerose, diabetes e câncer (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Há, também, muitas evidências de influência dos ROS em doenças degenerativas, como ocorre na catarata, efisema,

artrite, doença de Parkinson, diabetes, câncer e envelhecimento (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 (KITZBERGER, 2005).

As defesas antioxidantes podem ser endógenas ou adquiridas através da dieta. Os compostos naturais surgiram como protagonistas para a obtenção de compostos antioxidantes, devido ao reconhecimento da relação inversa entre a ingestão dietética de antioxidantes naturais e a incidência de doenças humanas, levando, assim, a um crescente interesse mundial no uso de antioxidantes naturais em alimentos, cosméticos e indústrias farmacêuticas (TAOFIQ et al., 2016; VALVERDE et al., 2015).

Nesse sentido, os cogumelos foram relatados como uma fonte de vários antioxidantes. Estes incluem compostos fenólicos, vitamina C, E e carotenóides (FERREIRA et al., 2009). No geral, estudos sugerem que os extratos/compostos de cogumelos podem ser ingredientes potencialmente bioativos para uso na formulação de alimentos funcionais, bem como antioxidantes naturais em sistemas alimentares (DUBOST; OU; BEELMAN, 2007; KAEWNARIN et al., 2016; KIMATU et al., 2017; TEL et al., 2015).

Os antioxidantes sintéticos são amplamente utilizados pela indústria alimentícia. No entanto, a sua segurança e seus possíveis efeitos adversos quando usados como aditivos alimentares vem sendo questionados (ANDRADE, 2015). Já os antioxidantes naturais, como as vitaminas e os polifenóis, podem ser uma alternativa a estas substâncias, além do fato de apresentarem papéis importantes na prevenção de doenças associadas aos radicais livres (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2003; ZHENG; WANG, 2001).

Dois grandes grupos estão relacionados aos efeitos de antioxidantes naturais: antioxidantes hidrofílicos, que compreendem ácido ascórbico e compostos fenólicos, e antioxidantes lipofílicos, como tocoferóis e carotenoides. Sendo assim, diversas técnicas são utilizadas a fim de determinar o potencial antioxidante *in vitro* de diferentes compostos, o que permite uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre estes métodos destacam-se o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e o método de sequestro de radicais livres, tal como DPPH \cdot (2,2-difenil-1-picrilidrazina) e ABTS

2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (KAUR; KAPOOR, 2001; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

2.4.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são definidos quimicamente como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE et al., 2005).

Originados do metabolismo secundário das plantas e fungos, os compostos fenólicos são essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiação ultravioleta, dentre outros (NACZK; SHAHIDI, 2004). São considerados os componentes antioxidantes mais importantes presentes em especiarias e em outros materiais derivados das plantas e fungos, e existe uma grande correlação entre a concentração de fenólicos e a capacidade antioxidante total (HU; SKIBSTED, 2002). Um grande número de plantas aromáticas e medicinais contém compostos químicos que exibem propriedades antioxidantes, e estes efeitos são devidos principalmente aos compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos e diterpenos fenólicos (PIETTA; SIMONETTI; MAURI, 1998; MILIAUSKAS; VENSKUTONIS; VAN BEEK, 2004).

Os ácidos fenólicos estão reunidos em dois grupos: derivados do ácido hidroxicinâmico e derivados do ácido hidroxibenzoico. Os derivados do ácido hidroxicinâmico são compostos fenólicos de ocorrência natural que possuem um anel aromático com uma cadeia carbônica, constituída por três carbonos, ligada ao anel. Os ácidos p-cumárico, ferúlico, caféico e sináptico são os hidroxicinâmicos mais comuns na natureza (BELITZ; GROSCH, 1988; DURÁN; PADILLA, 1993; HARBORNE, 1973).

Os flavonoides, como a quercitina, capferol e miricetina, são polifenóis bioativos que exibem propriedades antioxidantes fortes, proporcionando atividade eliminadora direta ao impedir a reação de Fenton, relacionada com oxigênio (BRANDI, 1992) e contribuem para a prevenção da aterosclerose e do câncer (HOLLMAN; KATAN, 1999). A peroxidação lipídica pode desempenhar um papel importante no envelhecimento celular e toxicidade de oxigênio em geral. De acordo com Mora et al. (1990) e Simões et al. (2010), os flavonoides inibem a peroxidação lipídica não enzimática, sendo encontrados em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais e fungos.

2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

De acordo com Madigan et al. (2004), agentes antimicrobianos são compostos naturais e/ou químicos que podem matar ou inibir o desenvolvimento de micro-organismos, podendo ocasionar a morte destes quando bacteriocidas, fungicidas e virocidas, ou inibi-los quando bacteriostáticos, fungistáticos e viristáticos.

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).

A ação antimicrobiana de micro-organismos é conhecida há muito tempo. Há centenas de anos médicos chineses utilizavam fungos para o tratamento de feridas infecciosas, no entanto, foi em 1929 que estas substancias receberam destaque, com a descoberta da Penicilina. O fato deu-se a partir de ensaios laboratoriais, com o intuito de cultivar bactérias, porém os ensaios foram contaminados com um fungo do gênero *Penicillium* e, em observação Alexander Fleming percebeu que, em torno do fungo, as bactérias cultivadas sofriam lise celular. O cientista, então, isolou o fungo e verificou que o mesmo secretava substância antimicrobiana, a qual hoje é purificada e comercializada. Aí deu-se início ao crescimento de pesquisas a fim de descobrir novas substâncias com atividade antimicrobiana, contra diversas bactérias, fungos e parasitas (CARVALHO, 2007).

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

Atualmente tem-se uma forte tendência na exploração de compostos obtidos de fungos, como enzimas, proteínas e polissacarídeos, por serem substâncias que apresentam propriedades tecnológicas (ALEXANDRE et al., 2010). Estas substâncias muitas vezes são submetidas a técnicas de purificação que tem por finalidade a concentração do composto de interesse (ALBANI, 2008).

No Brasil, as pesquisas sobre antimicrobianos de origem vegetal tiveram início em 1948 com os pesquisadores CARDOSO e SANTOS, 1948 (apud. LIMA, 2001), que avaliaram os extratos de 100 plantas, utilizadas como anti-inflamatórias 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).

Dessa forma, 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 (SMÂNIA, 2003).

2.6 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A extração é uma operação unitária que tem por objetivo a separação de determinadas substâncias a partir de diversas matrizes, sólidas ou líquidas, por meio de processos químicos, físicos ou mecânicos (EGGERS; JAEGER, 2003). Nos processos de extração, a escolha do solvente, a temperatura e a ação mecânica (agitação e pressão) são importantes. A extração é influenciada pela estrutura molecular do soluto, o tamanho, localização e a ligação com outros componentes. As características químicas do solvente e a estrutura e composição da matriz natural asseguram que cada sistema material-solvente mostre comportamento peculiar, o qual não pode ser previsto facilmente. Os processos extrativos dependem em grande parte dos fenômenos de difusão, sendo que a renovação do solvente desempenha um papel importante na velocidade da dissolução, bem como a agitação pode determinar a duração do processo extrativo (SOARES et al., 1998; TSAO; DENG, 2004).

As extrações com solventes orgânicos ou água são usualmente encontradas nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia, enquanto que técnicas inovadoras como a ESC e ELP são métodos alternativos e promissores para aplicações industriais nessas áreas. Cada uma dessas técnicas apresenta vantagens e desvantagens. É importante lembrar que o método de extração a ser selecionado para o processamento de produtos naturais deve levar em conta três fatores, sendo eles a obtenção de produto diferenciado do existente no mercado (qualidade, atividade biológica, composição química, estabilidade, ausência de traços de solvente), em segundo lugar o custo de manufatura mais vantajoso (maior rendimento, menor tempo, menor consumo de energia), bem como o fator de redução no impacto ambiental.

Antes da extração deve-se levar em consideração as características do material, o meio extrator e a metodologia empregada

no processo de extração (SIMÕES et al., 2010). O solvente escolhido deve ser o mais seletivo possível. É graças à seletividade que é possível extrair apenas as substâncias desejadas ou maior quantidade das mesmas. Como a seletividade depende da polaridade, o conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja preferencialmente extrair determina o solvente ou mistura de solventes que mais se aproxima do ótimo de seletividade para uma determinada extração (SMITH et al., 2003; MURGA et al., 2003; GUINDANI, 2014).

2.6.1 Soxhlet

Com o aparato extrator desenvolvido em 1879, este método, desde então vem sendo considerado uma técnica de extração padrão. A extração em Soxhlet apresenta vantagens relacionadas ao contato constante da amostra com o solvente, a ausência da etapa de filtragem ao término da extração, a simplicidade da metodologia e o baixo custo do equipamento (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010). Esses fatores auxiliaram na popularização dessa técnica.

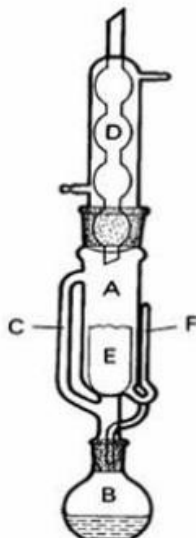
A extração em Soxhlet é um método contínuo, considerado um caso particular da lixiviação (processo de extração de uma substância presente em componentes sólidos através da sua dissolução em um líquido). Ainda que seja um método muito utilizado na extração de compostos orgânicos, ele apresenta elevado tempo de extração, que pode variar de 1 a 72 horas (MIGUEL; ANDRADE, 1989). Além disso, a integridade dos compostos extraídos pode ser afetada pela decomposição térmica ou pela reação com o solvente, já que, durante a extração, o recipiente que contém o solvente e os compostos já solubilizados é mantido na temperatura de ebulição do solvente (ARAÚJO, 2004).

Uma das principais vantagens da extração em Soxhlet é a recirculação de solvente, que aumenta o coeficiente de partição e a eficiência da extração (LUQUE-GARCÍA; CASTRO, 2003). No entanto, mesmo após a evaporação do solvente, o extrato pode conter resíduos do solvente utilizado na extração, que em alguns casos pode levar a restrição da sua aplicação (ANDRADE, 2011).

A Figura 2 ilustra o extrator Soxhlet. Nesse método, o sólido a ser extraído é colocado em um cartucho feito de papel de filtro ou de algodão no centro de uma câmara de vidro. O solvente extrator é aquecido em um balão contendo solvente e os seus vapores sobem até um condensador onde é liquefeito. O líquido permanece na câmara de

vidro aumentando de volume e extraindo o sólido até que o nível de líquido atinja o topo do tubo de sifão do aparato. Nesse ponto, a pressão hidrostática dentro da câmara faz com que o solvente seja sifonado de volta ao frasco de destilação. Este processo continua até que todo o soluto tenha sido removido do sólido. Trata-se, portanto, de uma extração contínua do tipo líquido-sólido (LANÇAS, 2008).

Figura 2 – Extrator Soxhlet.



Fonte: Lanças (2008).

As maiores desvantagens da extração com Soxhlet em comparação a outras técnicas são o longo tempo necessário para a extração e a grande quantidade de solvente utilizado, o que representa um prejuízo econômico e um problema ambiental. Do mesmo modo, a amostra geralmente é extraída no ponto de ebulição do solvente durante longos períodos, o que pode resultar na degradação dos compostos termolábeis. Além disso, há a necessidade de eliminação do solvente, que pode ser incompleta, e o método apresenta baixa seletividade (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

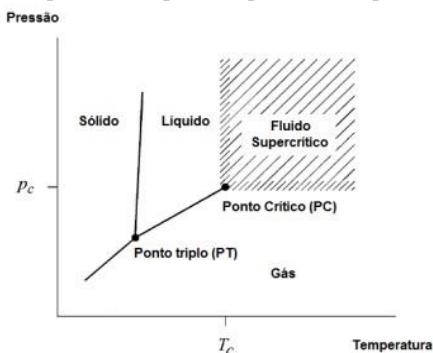
2.6.2 Extração supercrítica (ESC)

Os solventes são utilizados em larga escala nas indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias. Na procura por solventes

ecológicos está aumentando o interesse nos fluidos supercríticos para uma ampla variedade de aplicações (MAZZUTTI, 2012).

Um fluido supercrítico é uma substância cuja temperatura e pressão se encontram, ambas, acima de seu estado crítico, conforme representado no diagrama de fases da Figura 3. Esta característica confere aos fluidos supercríticos propriedades diferentes dos gases e líquidos, as quais podem ser utilizadas com diversas vantagens na área de extração (LEE; MARKIDES, 1990; LANÇAS; PEREIRA, 1999). A temperatura crítica (T_c) é a temperatura mais alta na qual o gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão. A pressão crítica (P_c) é a pressão mais elevada na qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura do líquido (GÓMEZ; OSSA, 2002; FREITAS, 2007).

Figura 3 – Diagrama pressão-temperatura para um componente puro.



Fonte: Andrade (2011), adaptado de Mukhopadhyay (2000).

Os fluidos supercríticos apresentam elevado poder de solvatação, servindo como excelentes solventes, ao mesmo tempo em que sua elevada difusividade permite fácil penetração em matrizes complexas, auxiliando na remoção dos solutos de interesse (KITZBERGER, 2005; LANÇAS, 2008; KALIL et al., 2017).

Os fluidos supercríticos são os únicos solventes em que seu poder de solvatação pode ser controlado por pequenas alterações na pressão e/ou temperatura. Sua massa específica é muito maior do que aquela dos gases típicos e ligeiramente menor do que aquelas dos líquidos orgânicos. Por outro lado, a viscosidade do fluido supercrítico assemelha-se à dos gases típicos, e é muito menor do que a dos líquidos. Esta característica assegura a capacidade elevada da fase fluida para a

transferência de massa, fazendo com que os fluidos supercríticos sejam escolhidos como solvente da extração (BRUNNER, 1994).

A extração com fluidos supercríticos é uma operação unitária por contato que se fundamenta no equilíbrio e nas propriedades físico-químicas dos fluidos supercríticos. Esta técnica é particularmente efetiva no isolamento de substâncias de massa molar média e polaridade relativamente baixa. A principal vantagem da extração supercrítica sobre outro processo de separação muito utilizado na indústria (extração com solvente) é o fato de que quando utilizado dióxido de carbono (CO_2) como solvente, as temperaturas do processo de ESC são moderadas, de modo que os extratos quase não sofrem hidrólise, oxidação, esterificação, caramelização ou outras alterações térmicas (MEIRELES, 2003; PEREDA; BOTTINI; BRIGNOLE, 2008).

A extração supercrítica consiste basicamente de duas etapas: solubilização dos compostos presentes na matriz sólida e separação desses do solvente supercrítico. Durante a extração, o solvente flui através do leito de partículas, solubilizando os compostos presentes na matriz vegetal. O solvente sai do extrator carregando as substâncias solubilizadas, e por meio da redução da pressão, o extrato é liberado do solvente (PEREIRA; MEIRELES, 2010).

As aplicações da ESC na indústria de alimentos, fármacos e cosméticos são inúmeras. Alguns exemplos de processos consolidados que utilizam a extração com fluido pressurizado são a remoção de nicotina do tabaco e cafeína do café e chás, extração de aromas, óleos essenciais e antioxidantes, extração de óleos de sementes oleaginosas, extração de ervas medicinal e produção de extrato de lúpulo para a produção de cervejas. O único resíduo acumulado ao final do processo ESC é o sólido do qual foi extraído o soluto. Como a matéria-prima é uma matriz biológica ou parte desta, o resíduo pode ser incorporado ao solo sem prejuízo ao meio-ambiente. Em alguns casos, como na extração da cafeína do café, tanto o resíduo (grãos de café descafeinados) quanto o extrato (cafeína) são produtos comercializáveis (MUKHOPADHYAY, 2000).

O fluido supercrítico mais usado é o dióxido de carbono, com suas propriedades críticas de temperatura e pressão estabelecidas em $31,1\text{ }^\circ\text{C}$ e $7,38\text{ MPa}$, respectivamente. O CO_2 é barato, ecológico, seguro e apresenta alta difusividade combinada com força de solvente facilmente ajustável. Na temperatura e pressão ambiente o CO_2 é gasoso, o que torna a recuperação do analito muito simples e livre de solventes. Além disso, na preparação de amostras de produtos naturais e alimentos é importante a capacidade de operar em baixas temperaturas

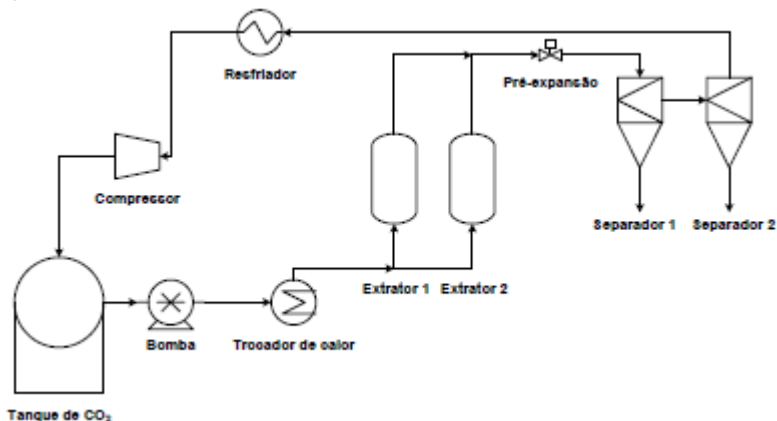
usando um meio não oxidante, o que permite a extração de compostos termicamente lábeis ou compostos facilmente oxidáveis (BRUNNER, 1994; HERRERO et al., 2010).

Na ESC de produtos naturais utilizando CO₂ como solvente, geralmente são extraídas misturas que contenham substâncias apolares e moderadamente polares. O emprego de modificadores orgânicos, chamados cossolventes, é capaz de alterar a polaridade do fluido supercrítico e aumentar o seu poder de diluição no composto de interesse. Estes modificadores também podem reduzir a interação composto-matriz melhorando a sua extração quantitativa (LI, 2008; HERRERO et al., 2010). A seleção do solvente é baseada nos parâmetros de solubilidade e na polaridade do componente de interesse e solvente.

A Figura 4 ilustra um esquema simplificado do processo de ESC. O solvente pressurizado escoam continuamente através do leito de partículas. A matriz sólida o absorve e sua estrutura celular dilata-se, sendo que a resistência ao transporte de massa diminui. Na etapa de difusão, os componentes solubilizados são transportados para a superfície do sólido. Paralelamente, os compostos solúveis são dissolvidos pelo solvente. Estes componentes, agora todos dissolvidos, fazem parte da fase fluida e escoam para a saída do extrator. Após a extração ocorre a etapa de separação em que a pressão do sistema é reduzida, o poder de solubilização do solvente extrato diminui drasticamente e o soluto precipita. Após a separação, o solvente pode ser recirculado no sistema (BRUNNER, 1994; PEREIRA; MEIRELES, 2010).

A extração com fluidos supercríticos tipicamente utiliza pressões entre 10 e 50 MPa, temperaturas de até 80 °C, razão de alimentação de solvente entre 6 e 30 kg de CO₂ por kg de amostra, queda de pressão máxima de 0,1 MPa, e adição máxima de 20 % de cossolvente (KASSING et al., 2010). Os parâmetros que afetam o processo de extração supercrítica podem ser divididos em dois grupos principais. O primeiro grupo inclui características específicas do material, como massa específica, superfície específica, diâmetro do poro, porosidade, geometria e teor de umidade. O segundo grupo inclui parâmetros do processo como pressão e temperatura de extração, vazão do solvente, tempo e temperatura e pressão de separação (MARTÍNEZ; VANCE, 2008).

Figura 4 – Fluxograma simplificado do processo de ESC.



Fonte: Pereira; Meireles (2010).

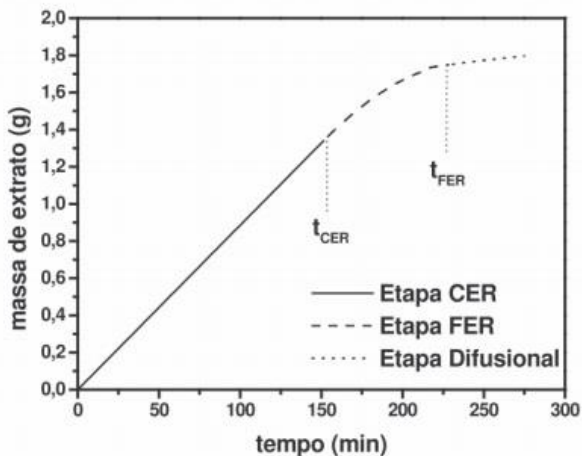
2.6.2.1 Curvas globais de extração

A representação da cinética da ESC é feita através da construção da curva de extração, que se caracteriza como um gráfico da massa acumulada de extrato em função do tempo de extração. Este gráfico fornece informações sobre o comportamento cinético da extração, possibilitando a determinação do tempo de ciclo mais viável para um processo de ESC. A curva obtida depende dos parâmetros de processo e dos fenômenos que ocorrem no leito fixo durante a extração. São vários os fatores que afetam o comportamento das curvas de extração, como por exemplo, vazão de solvente utilizada e tamanho da partícula formadora do leito. Desta forma, é difícil fazer a comparação entre curvas obtidas a partir de matérias-primas diferentes e de diferentes equipamentos, mas as informações que elas podem fornecer como a duração da taxa constante de extração, são úteis para comparar uma série de experimentos com o mesmo substrato e o mesmo equipamento (BRUNNER, 1994).

De acordo com a literatura, as curvas de extração são divididas em três períodos, controlados por diferentes mecanismos de transferência de massa. Na Figura 5 estão representados os períodos: (1) período de taxa constante de extração (CER, do inglês *Constant Extraction Rate*); (2) período de taxa decrescente de extração (FER, do inglês *Falling Extraction Rate*) e (3) período difusional (DCP, do inglês

Diffusion Controlled Period) (SOVOVÁ, 1994; TALANSIER et al., 2008; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; PEREIRA; MEIRELES, 2010).

Figura 5 – Curva de ESC com representação das três etapas da extração.



Fonte: Martinez (2005).

No período CER, o soluto está facilmente acessível na superfície das partículas da matriz. Nesta situação o processo de transferência de massa é controlado pela convecção (escoamento do solvente). Vários autores têm demonstrado que durante este período, aproximadamente entre 50 e 90 % da quantidade total de extrato é obtida. Em geral, este período pode ser caracterizado pelos seguintes parâmetros: t_{CER} (duração do período CER, s); Y_{CER} (razão mássica de soluto na saída do leito); M_{CER} (taxa de transferência de massa, $kg.s^{-1}$) e R_{CER} (rendimento do período CER). No período FER, a taxa de transferência de massa decresce rapidamente como resultado da diminuição da transferência de massa por convecção e passa a ser significativo o processo de transferência de massa por difusão. O período difusional é caracterizado pela ausência de soluto facilmente acessível na superfície das partículas e predomínio do fenômeno difusivo no sólido (MAZZUTTI, 2012; ANDRADE, 2015).

2.6.3 Extração com líquido pressurizado (ELP)

A extração com líquido pressurizado (ELP) pode ser considerada uma tecnologia verde para a extração de compostos bioativos de alimentos e plantas, quando se faz uso de solventes *green*. É uma técnica que permite uma extração rápida dos analitos, geralmente empregando períodos de tempo inferiores a 60 minutos, num ambiente inerte sob alta pressão, normalmente igual ou menor que 20 MPa e temperaturas entre 25 e 200 °C. Por permitir o uso de solventes a temperaturas acima do seu ponto de ebulição, tem as propriedades de solubilidade e transferência de massa melhoradas, resultando em um aumento na eficiência de extração em comparação com as técnicas realizadas a temperatura ambiente e pressão atmosférica (RICHTER et al., 1996; CAMEL, 2001).

No ano de 1995, a empresa Dionex Corporation apresentou pela primeira vez um aparato de ELP chamado de Tecnologia de Extração Acelerada por Solvente (*Accelerated Solvent Extraction - ASE[®]*). Esta técnica também é conhecida como extração de solvente pressurizado; extração líquida pressurizada e extração de solvente reforçada. Quando é utilizado água como solvente de extração, a técnica é referida como extração de água quente pressurizada, extração de água subcrítica ou extração de água superaquecida (MUSTAFA; TURNER, 2011).

Uma grande vantagem desta técnica sobre os métodos convencionais de extração por solventes conduzidos à pressão atmosférica está relacionada ao fato de que os solventes em elevadas pressões (até 200 bar) e temperaturas (até 200 °C) permanecem no estado líquido bem acima dos seus pontos de ebulição, o que permite a melhora da interação analito-solvente, o aumento da solubilidade, a redução da viscosidade e da tensão superficial dos solventes e a melhora na cinética de dessorção dos compostos bioativos a partir das matrizes. Assim, os solventes de extração, tais como o etanol, que não é tão eficiente em extrair antocianinas e outros polifenóis em baixas temperaturas, podem ser mais eficientes na ELP (SANTOS, VEGGI e MEIRELES, 2012; HEO et al., 2014). No estado líquido, é possível obter rendimentos mais elevados de extração num tempo mais curto utilizando volumes significativamente menores de solventes do que em métodos de extração convencionais (CASTRO-PUYANA et al, 2013).

Existem duas configurações possíveis para aplicação desta técnica, sendo elas em modo estático ou dinâmico. Na configuração estática, o processo de extração consiste em um ou vários ciclos de extração com substituição do solvente entre os ciclos (PRONYC;

MAZZA, 2009). Enquanto no modo de operação dinâmico, o fluxo é determinado e ajustado e, então, o solvente de extração é bombeado a uma taxa constante através do recipiente de amostra (MUSTAFA; TURNER, 2011).

Dependendo da matriz da amostra, agentes de papel filtrante, dispersantes ou secantes podem ser usados para facilitar a eficiência da extração. Pérolas de vidro podem ser usadas como agentes dispersantes quando não há necessidade de absorção de umidade da amostra. Os agentes de dispersão também são usados para preencher a célula de extração e reduzir o consumo de solventes (SAITO et al, 2004).

O processo de extração pode ser explicado em dois estágios, primeiramente iniciando com o controle de solubilidade seguida de uma fase controlada por difusão. Em matrizes de amostras controladas por dispersão, geralmente há fortes interações entre matrizes e analitos, ou longos caminhos de difusão para que os analitos passem pela matriz da amostra. Neste caso, a temperatura do solvente e o tamanho de partícula podem ser fatores críticos para melhorar a eficiência de extração. Dessa forma, para evitar longos tempos de extração, aumentar a temperatura e/ou reduzir o tamanho das partículas é uma alternativa viável. Enquanto em matrizes de amostras controladas por solubilidade, as interações analito-matriz são bastante fracas e a taxa de extração depende principalmente da partição do analito entre a matriz e o fluido de extração. Neste caso, o rendimento é aumentado usando uma substituição (reciclo) mais frequente do solvente de extração (TURNER et al., 2001; PRONYC; MAZZA, 2009).

O método de extração por ELP é considerado adequado para uma ampla gama de solutos, polares a não polares. Estudos apontam, no entanto, uma série de fatores que afetam a extração, dentre eles o tipo de solvente, tempo de extração, temperatura, tamanho de partícula e teor de água da amostra (CAMEL, 2001; MUSTAFA; TURNER, 2011).

2.6.4 Extração sequencial (ES)

O dióxido de carbono é o fluido no estado supercrítico mais aplicado em alimentos e produtos farmacêuticos. No entanto, a extração utilizando dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC) é restrita para substâncias apolares ou de baixa polaridade. Diante dessa situação, uma alternativa para a utilização de CO₂-SC na separação de compostos mais polares, é utilizar água ou etanol como cossolvente com objetivo de aumentar a polaridade (BITENCOURT et al., 2014).

Além disso, a utilização de técnicas de extração que envolvem várias etapas sequenciais com CO₂-SC e combinações de CO₂-SC, etanol, e água pressurizados têm sido muito bem sucedidas na extração e fracionamento antocianinas e fenólicos (SEABRA et al., 2010; PAULA et al., 2013; PAULA et al., 2014; GARMUS et al., 2014) obtendo-se extratos enriquecidos em compostos de interesse.

De acordo com Brunner (1994), para um extrato com muitos componentes, uma extração em vários estágios pode gerar diferentes produtos se os componentes apresentarem diferentes polaridades, massa e pressão de vapor. Cada estágio de extração pode ser delineado com diferentes condições de processos e solventes distintos (PEREDA; BOTTINI; BRIGNOLE, 2008).

Na extração supercrítica sequencial é possível realizar uma primeira extração operando a baixa densidade de CO₂ quando, por exemplo, em baixa pressão de operação, seguida por uma segunda etapa de extração com alta densidade de CO₂, em alta pressão operacional (BISCAIA; FERREIRA, 2009). Ainda dentro do processo de extração supercrítica sequencial, pode-se adicionar uma etapa de despressurização rápida do sistema, entre duas etapas de extração supercrítica. Estudos prévios de extração supercrítica com etapas de descompressão do CO₂ relataram aumento no rendimento (SMITH JR et al., 2003; PEREIRA, 2002; SETIANTO, 2009; SANTOS; MEIRELES, 2011).

A otimização do processo de extração por aplicação de uma rápida despressurização do CO₂ é atribuída aos efeitos de libertação de pressão na modificação da membrana celular devido à expansão rápida de gás, aumentando a disponibilidade de substâncias extraíveis no solvente (SMITH JR et al., 2003; SETIANTO, 2009). É observado que o trajeto percorrido pelos compostos é menor e a transferência de massa aumenta se o material, matriz, é triturado, e suas células destruídas. Isso porque a resistência do transporte pelas membranas diminui ou torna-se irrisório (BRUNNER, 1994).

No estudo realizado por Bitencourt et al. (2014), a extração sequencial em leito fixo utilizando solventes *green* provou ser uma excelente alternativa aos solventes orgânicos para extrair e fracionar saponinas de raízes de ginseng brasileiro. O processo foi seletivo de acordo com a polaridade do solvente, dando frações enriquecidas em diferentes grupos de compostos. Em outro trabalho, realizado por Garmus et al., (2014) percebeu-se que a extração sequencial é um

método efetivo para a obtenção de extratos diferenciados utilizando a mesma matéria-prima.

2.7 ESTADO DA ARTE

A sociedade tem buscado cada vez mais hábitos de alimentação saudáveis, devido ao aumento de doenças relacionadas ao estilo de vida atual. Sendo assim, as preocupações relacionadas à saúde estão se tornando cada vez mais importantes.

Além disso, a sociedade de hoje é mais consciente dos efeitos colaterais potenciais dos medicamentos e está procurando alternativas terapêuticas inovadoras. Assim, o uso de compostos naturais na prevenção de várias doenças e manutenção da saúde tem motivado pesquisas e despertado o interesse da população.

Tem-se percebido uma elevada demanda por alimentos funcionais, que forneçam os nutrientes indispensáveis ao organismo e proporcionem benefícios adicionais à saúde. O emprego dos cogumelos comestíveis nesse âmbito vem aos poucos se ampliando, na medida em que as pessoas conhecem melhor o alimento e seus benefícios.

O cogumelo *Pleurotus sajor-caju*, também conhecido como cogumelo ostra, é um fungo de fácil cultivo e que apresenta, além do alto valor nutricional, compostos com atividade biológica, sendo reconhecido na literatura científica por sua ação antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética e antitumoral. Tais relatos justificam o estudo de técnicas que obtenham seus extratos e possibilitem a sua posterior aplicação.

A busca por compostos bioativos de alta qualidade impulsiona as pesquisas acerca de fontes naturais e, na atualidade, cada vez mais se busca uma produção mais limpa e com menor geração de resíduos. Como usualmente os solventes são utilizados no processo de obtenção destes compostos e não são incorporados ao produto final é necessária uma etapa subsequente para a sua remoção, podendo haver geração de uma grande quantidade de resíduo. Logo, a pesquisa por solventes alternativos que tenham um ciclo funcional mais verde se faz necessária, reduzindo o impacto ambiental e também garantindo a obtenção de produtos de qualidade. Nesse âmbito, pode-se destacar o uso de fluidos supercríticos e líquidos pressurizados como técnicas viáveis de extração.

Levando em conta a preocupação com a questão ambiental, é imprescindível alcançar um processo viável de fabricação industrial. A extração supercrítica e com líquido pressurizado são consideradas tecnologias verdes, que não agridem o meio ambiente. Com base em

estudos já existentes, a ESC tem se mostrado uma tecnologia potencial para obtenção de antimicrobianos, enquanto a ELP é considerada um dos métodos promissores para a obtenção de antioxidantes naturais.

Tendo em vista o fato de a literatura reportar estudos de atividade biológica para extratos obtidos a partir do cogumelo *P. sajor-caju* somente empregando extrações com solventes orgânicos, à pressão atmosférica (MIZUNO; ZHUANG, 1995; CARBONERO et al., 2003; NGAI; NG, 2004; PRAMANIK et al.; 2005; CARBONERO et al., 2012; KANAGASABAPATHY et al., 2012; SATITMANWIWAT et al., 2012; ALVES et al., 2013; FINIMUNDY et al., 2013; REIS et al., 2015; VALVERDE et al., 2015; CONTESSA et al., 2016; FINIMUNDY et al., 2018), optou-se por avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante de extratos obtidos a partir de tecnologias a alta pressão [por ESC, ELP e ES (ESC seguida de ELP)], em caráter de inovação, para posterior comparação com aqueles obtidos a baixa pressão utilizando solventes orgânicos.

Esse estudo apresenta grande importância considerando o fato desta espécie de cogumelo ter seu potencial biológico muito conhecido e reportado pela literatura. Até o momento esse cogumelo não foi explorado quanto ao uso de processos a alta pressão, visando a extração dos compostos bioativos de *P. sajor-caju*, além disso, excelentes resultados encontrados em trabalhos anteriores no LATESC, realizados com outras espécies de cogumelos, demonstraram forte potencial da tecnologia a alta pressão na potencialização das atividades biológicas dos extratos obtidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nas dependências da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA). A obtenção dos extratos, bem como as análises de atividade antioxidantes foram realizadas no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC). Já as análises cromatográficas foram desenvolvidas na Central de Análises do EQA, enquanto as análises antimicrobianas foram realizadas em parceria com o Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFSC.

3.1 MATÉRIA-PRIMA

A amostra de cogumelo ostra *P. sajor-caju* desidratado (Figura 6), lote 299/17, utilizado nas extrações foi adquirida junto à empresa Cogubras, de Curitiba – PR. A matéria-prima era composta por cogumelos de diferentes estágios de maturação e todo o corpo de frutificação foi utilizado.

O cogumelo *P. sajor-caju* foi recebido já seco, porém o teor de umidade final foi alcançado após uma etapa posterior de secagem, durante 4 h em estufa com circulação de ar, mantendo a temperatura de 50 °C, conforme procedimento aplicado pela empresa fornecedora. Esta etapa de secagem foi realizada para facilitar a moagem da matéria-prima. A cada hora, as características da matéria-prima passaram por conferência, visando encontrar o ponto ideal de secagem em que pudesse ser moída e, evitando, assim, a perda de grande conteúdo de amostra. Os cogumelos foram moídos em moinho de facas tipo Willey, empacotados em saco plástico identificado e armazenados em congelador doméstico a -18 °C.

Figura 6 – Cogumelo *P. sajor-caju* desidratado (a) e amostra após a moagem (b)



Fonte: O autor (2017).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

O teor de umidade das amostras de cogumelo *P. sajor-caju* desidratado e moído foi determinado por secagem direta em estufa a 105 °C, conforme descrito pelo método 925.09 da AOAC (2005).

Foram medidos 5 g de amostra em balança com precisão ao décimo de miligrama (Shimadzu, AY220, ± 0,0001 g, São Paulo/SP), dispostas em cápsulas de alumínio as quais foram previamente aquecidas a 105 °C durante 1 h em estufa (Odontobrás, Brasil, Brasil) e resfriadas até a temperatura ambiente em dessecador. As amostras permaneceram durante 24 h em estufa a 105 °C, foram resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e, então, tiveram as massas medidas novamente.

Para o cálculo do teor de umidade utilizou-se a Equação 1:

$$\text{Teor de umidade e substâncias voláteis (\%)} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

onde m_i é a massa inicial da amostra (g) e m_f é a massa final da amostra (g). O ensaio foi realizado em triplicata e o resultado expresso como média ± desvio padrão.

O diâmetro médio de partícula da amostra de cogumelo *P. sajor-caju* após a etapa de moagem foi determinado por meio do cálculo proposto por Gomide et al. (1983). Nessa determinação, mediram-se 100 g de amostra em balança com precisão de 0,02 g (Gehaka, BG 2000, ± 0,02 g São Paulo/SP). Posteriormente, as amostras foram dispostas em agitador de peneiras (Bertel Metalurgic, Caieiras/SP) e

agitadas durante 30 min com peneiras da série Tyler de 20, 25, 32, 48, 65 e 80 Mesh (W.S. Tyler, Wheeling, EUA), em duplicata. A massa das frações retidas (x_i) foi medida e o diâmetro médio de partículas (D_p) foi calculado de acordo com as equações. O diâmetro médio de partícula foi expresso em milímetro (mm).

$$D_p = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \frac{x_i}{D_{pi}}}{\sum_{i=1}^n \frac{x_i}{D_{pi}^3}}} \quad (2)$$

$$x_i = \frac{m_i}{m} \quad (3)$$

onde: D_p = diâmetro médio superficial das partículas (mm);

D_{pi} = diâmetro médio da peneira i (mm);

m_i = massa de amostras retidas na peneira i (g);

m = massa total das peneiras (g);

n = número total de frações.

3.3 EXTRAÇÃO A BAIXA PRESSÃO

O processo de extração a baixa pressão do cogumelo *P. sajor-caju* foi efetuado com o objetivo de comparar os resultados obtidos à extração supercrítica e extração com líquido pressurizado em termos de rendimento e atividade biológica.

3.2.1 Soxhlet

A extração em Soxhlet foi realizada de acordo com a metodologia da AOAC (2005), utilizando os solventes orgânicos etanol (P. A. 99,8 % NEON, Vila Prudente, São Paulo) e hexano (P. A. Lafan, Várzea Paulista, São Paulo), que possuem polaridades distintas, nos valores de 5,2 e 0, respectivamente (BYERS, 2007; MAZZUTTI, 2012).

A estrutura do sistema é composta de manta de aquecimento, balão de fundo redondo com solvente, aparato Soxhlet, cartucho de papel filtro com amostra, condensador e banho termostático. A Figura 7 apresenta o sistema utilizado para extração em Soxhlet.

Para cada extração, 5 g de amostra foram envolvidas em um cartucho de papel filtro e inseridas no extrator. O balão foi preenchido com 150 mL de solvente, garantindo uma proporção de 1:30 (m/v). No

processo de extração o solvente foi aquecido até sua temperatura de ebulição por uma manta (Fisatom 102E, São Paulo/SP). O vapor do solvente sobe até o condensador, resfria e condensa gotejando sobre a matriz vegetal, solubilizando os compostos. Quando a mistura soluto/solvente preenche o sifão, este é esvaziado, retornando ao balão onde é novamente aquecido e o processo de refluxo é repetido até o final de extração. As extrações foram realizadas durante 6 h, em duplicata e os extratos brutos obtidos foram submetidos à rotaevaporação à vácuo para o processo de eliminação do solvente, conforme item 3.2.2.

Figura 7 – Equipamento para extração em Soxhlet em funcionamento.



Fonte: O autor (2017).

3.2.2 Eliminação do solvente

Os extratos foram evaporados em rotaevaporador (Fisatom, modelo 801, São Paulo, Brasil) sob vácuo de 650 mmHg e rotação de 30 rpm. As temperaturas de evaporação foram ajustadas para valores inferiores aos pontos de ebulição dos solventes utilizados, a fim de evitar alterações do extrato devido à aplicação de calor. Os extratos foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados em congelador

doméstico a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os resultados de rendimento foram expressos como média \pm desvio padrão.

3.4 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

Os experimentos de extração supercrítica realizados visaram determinar as condições de temperatura e pressão que resultam em maiores valores de rendimento global e também produzem os melhores parâmetros de qualidade dos extratos (composição e atividade biológica). A unidade de extração supercrítica utilizada neste trabalho foi desenvolvida pelo Laboratório Thermische Verfahrenstechnik da Technische Universität Hamburg-Harburg (TUHH), na Alemanha (ZETZL; LOZANO; BRUNNER, 2007) e está representado na Figura 8. A unidade de extração opera até uma pressão máxima de 300 bar e vazões de solvente de $1,67\text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$ a $36,67\text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$.

O equipamento descrito foi empregado para a determinação do rendimento global de extração, com o emprego de dióxido de carbono puro ou com cossolvente. Os ensaios foram realizados através do método dinâmico de extração que se caracteriza pela passagem contínua do solvente supercrítico pela matriz sólida (FERREIRA et al., 1999).

Figura 8 – Extrator supercrítico.



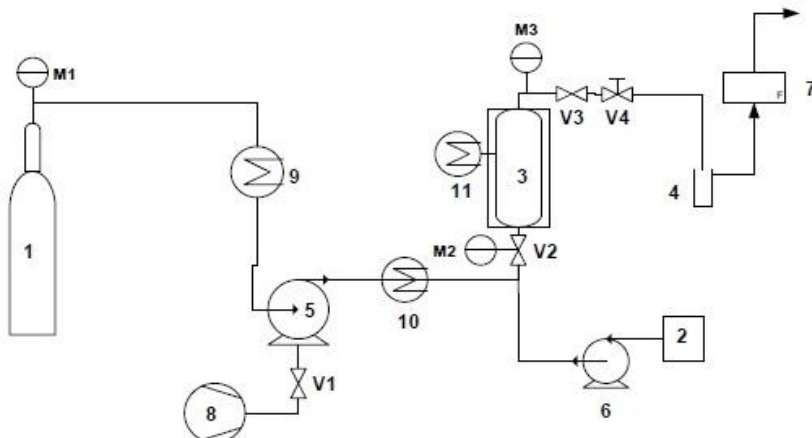
Fonte: O autor (2017).

3.4.1 Procedimento experimental

O procedimento experimental de ESC foi baseado em trabalhos anteriores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do LATESC (MICHIELIN et al. 2005; ANDRADE et al. 2012; MEZZOMO et al. 2013, MAZZUTI, 2016). Conforme o fluxograma apresentado na Figura 9, a unidade supercrítica contém um cilindro de CO₂ (1) com 99,9 % de pureza (White Martins) com tubo pescador que alimenta diretamente a linha de extração com uma pressão de 60 bar. A linha de solvente é imersa em um banho termostático (9) (Thermo Haake, C10 – K10, Alemanha) programado para manter a temperatura inferior a 0 °C, garantindo assim que o CO₂ esteja no estado líquido antes de sua entrada em uma bomba (5) (Maximator, booster M111, Alemanha). Essa bomba trabalha alimentada por uma linha de ar comprimido, filtrado e ajustado na pressão de trabalho.

Durante o funcionamento, a bomba encaminha o CO₂ pressurizado à linha de extração, passando pelo extrator (3), que consiste de um cilindro de aço inox encamisado de 31,6 cm de altura, 2,0 cm de diâmetro interno e volume de 103,3 mL, com extremidades rosqueadas. O banho termostático de aquecimento (10) é mantido a uma temperatura constante de 65 °C, de modo a evitar o congelamento da linha e da válvula micrométrica (V4) durante a despressurização da mistura soluto/solvente. A temperatura de operação do extrator é mantida constante através de um banho termostático de aquecimento (11) (Thermo Haake, DC30 – B30, Alemanha).

Figura 9 – Diagrama da unidade de extração. (1) Cilindro de CO₂; (2) Reservatório de cossolvente; (3) Coluna de extração; (4) Frasco coletor; (5) Bomba de CO₂; (6) Bomba de cossolvente; (7) Rotâmetro; (8) Compressor de ar; (9) Banho de resfriamento do CO₂; (10) Banho termostático; (11)- Banho de aquecimento da coluna de extração.



Fonte: Mazzutti (2012).

A identificação das válvulas é representada por V e os manômetros são indicados pela letra M, onde:

V1 – Válvula de entrada de ar comprimido na bomba;

V2- Válvula de CO₂ no extrator;

V3 – Válvula de saída de CO₂ no extrator;

V4 – Válvula de expansão (micrométrica)

M1 – Manômetro de controle do cilindro de CO₂;

M2 – Manômetro de controle da bomba;

M3 – Manômetro de controle do extrator.

No início do processo de extração as válvulas V2, V3 e V4 são mantidas fechadas. O cilindro (1) é aberto e a bomba (5) é acionada através da regulagem do ar comprimido (V1) estabelecendo a pressão de trabalho desejada, ou seja, multiplica a pressão do ar comprimido para o sistema na ordem 1:130. Após a obtenção da pressão de trabalho desejada o fluxo de CO₂ é aberto e mantido constante através da regulagem das válvulas V3 e V4, auxiliando na despressurização da mistura solvente + solutos. Após passar pela V4, o soluto é coletado em frascos âmbar (4) e o fluxo de CO₂ é medido no rotâmetro (7) (Automation Products, ABB 10A61, Alemanha). No uso de cossolvente, uma bomba de cromatografia líquida de alta eficiência (6) (Waters 515

HPLC, UK; pressão máxima de até 340 bar e vazões entre 0,001 a 10,000 mL.min⁻¹) é conectada na linha de extração e a mistura de solventes se realiza por meio de adaptador antes da entrada do extrator.

Os experimentos de extração supercrítica foram divididos em três grupos: (i) Curva global de extração com CO₂, realizada com a finalidade de identificar os períodos cinéticos da extração (seção 3.4.2); (ii) Extração global com CO₂ como solvente nas condições de 40 °C, 200 e 300 bar, vazão de solvente de 12 ± 2 g.min⁻¹ e tempo de 4 horas; (iii) Ensaios de extração com etanol como cossolvente (selecionado com base em dados da literatura), adicionado ao CO₂ supercrítico nas concentrações de 0; 5,0 e 10,0 % (m/m). Os ensaios de ESC com cossolvente foram realizados, baseados nos dados de rendimento das extrações supercríticas com CO₂, na condição de 300 bar, 40 °C, vazão de CO₂ de 12 ± 2 g.min⁻¹, tempo de 4 h. A eliminação do solvente presente nesses extratos seguiu o procedimento descrito no item 3.2.2. Os resultados dos rendimentos dos extratos foram expressos como média ± desvio padrão (item 4.3).

3.4.2 Determinação da cinética de extração

A curva global de extração fornece informações sobre o comportamento cinético do experimento, possibilitando a determinação do tempo de ciclo mais viável para um processo. No ensaio para a determinação da cinética de extração a coluna foi preenchida com 23 g de matéria-prima, correspondendo à metade do leite, o que permitiu a formação de um leite de partículas com altura de pelo menos o dobro do diâmetro do extrator considerando-se que, com esta relação entre altura e diâmetro do leite, a dispersão axial pode ser desprezada. Os ensaios foram realizados com CO₂ puro a uma vazão de 12 ± 2 g.min⁻¹, pressão de 200 bar e 40 °C, durante 7 horas, baseados em resultados obtidos no LATEC por Kitzberger et al. (2009) e Mazzutti et al. (2012), os quais estudaram a extração supercrítica do cogumelo shiitake e do sol, respectivamente.

Os frascos de coleta tiveram sua massa determinada e a coleta do soluto extraído foi realizada em intervalos de tempo pré-determinados. Após 5 minutos da coleta, a massa dos frascos foi novamente medida e determinou-se a massa de extrato obtida em função do tempo.

Os tempos de cada um dos períodos de extração foram calculados a partir da construção da curva de extração. Os tempos t_{CER} e t_{FER} representam o final das etapas constante e decrescente de extração, respectivamente. A taxa de transferência de massa na etapa CER (M_{CER})

foi obtida a partir de regressão linear da curva de extração no período CER, realizada com o auxílio do *software* Microsoft Excel, enquanto a concentração de soluto na fase solvente na etapa CER (Y_{CER}) foi determinada pela razão entre M_{CER} (taxa de transferência de massa) e Q_{CO_2} (vazão de dióxido de carbono). Os valores experimentais de massa de extrato acumulada estão apresentados no Apêndice A.

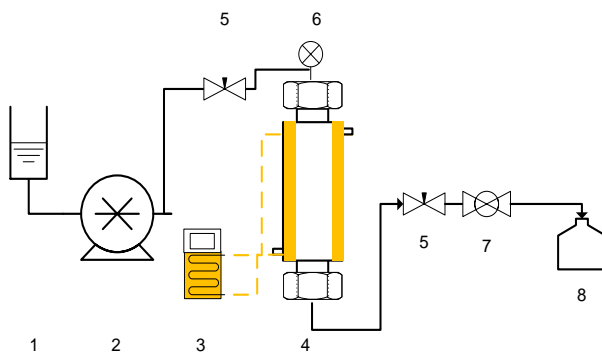
3.5 EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO

As extrações com líquido pressurizado foram realizadas utilizando uma unidade desenvolvida no LATESC (LASTA, 2017), conforme ilustrado na Figura 10. O solvente utilizado foi o etanol 99,8 % (NEON, São Paulo, Brasil) devido a sua polaridade e de modo a ser utilizado como base comparativa ao método convencional de extração por Soxhlet.

Figura 10 – Equipamento de extração com líquidos pressurizados. (a) Imagem do equipamento desenvolvido no LATESC. (b) Fluxograma de ELP.



(a)



(b)

Fonte: O autor (2017).

Na unidade de ELP ilustrada esquematicamente na Figura 10, o solvente (1) é bombeado através da bomba de líquidos de alta eficiência (2) (Waters 515 HPLC, UK), passando através de uma célula de

extração em aço inox encamisada preenchida com a amostra, algodão e pérolas de vidro (4) (25,0 cm de altura, 1,25 cm de diâmetro interno e volume de 30,7 mL, com extremidades rosqueadas), a qual é aquecida por um banho termostático (3) (MQBMP-01, Microquímica, Palhoça/SC) que assegura a temperatura de processo. Duas válvulas de bloqueio (5) (HIP, 10-11NFA, USA), uma válvula back pressure (7) (Swagelok, KPB series, UK) e um manômetro na entrada da coluna (6) (Wika, Germany) foram utilizadas para controlar, manter e observar a pressão do sistema.

3.5.1 Procedimento experimental de ELP

A ELP foi realizada usando 6 g de cogumelo *P. sajor-caju* desidratado e moído, aferidas em balança analítica (SHIMADZU, AY220, São Paulo/SP). Os experimentos de ELP foram divididos em três grupos: (i) Curva global de ELP em modo dinâmico usando etanol; com a finalidade de identificar os períodos cinéticos da ELP (procedimento similar ao descrito no item 3.4.2); (ii) Extração global em modo estático utilizando etanol (30 mL, sendo esta a capacidade total do leite) à temperatura de 40 e 80 °C e pressão de 100 bar, durante 25 minutos e um único ciclo; (iii) Extração global em modo dinâmico utilizando etanol à temperatura de 40 e 80 °C, pressão de 100 bar durante 45 minutos a uma taxa de fluxo de solvente de 2 mL/min. No primeiro grupo de experimentos a curva de extração foi obtida coletando o extrato de 3 em 3 minutos e após 12 minutos de extração a cada 5 minutos, totalizando 92 minutos de ensaio.

Os ensaios foram realizados em duplicata e os extratos recolhidos foram rotaevaporados, conforme procedimento descrito na seção 3.2, e armazenado posteriormente em freezer a -18 °C. Os resultados dos rendimentos dos extratos foram expressos como média \pm desvio padrão (seção 4.3).

3.6 EXTRAÇÃO SEQUENCIAL

No presente estudo a Extração Sequencial (ES) compreende duas etapas de extração, sendo ESC o primeiro passo, seguido de ELP (2º passo), realizado em ambos os extratores (Figura 9 e 10, para o passo 1 e 2, respectivamente), em sequência, sendo os extratos recolhidos em diferentes frascos. A análise foi reproduzida em duplicata. A primeira etapa foi realizada seguindo o procedimento experimental para ESC a

300 bar e 40 °C por 4 h, cujas condições foram selecionadas considerando o maior rendimento de ESC, conforme apresentado na Seção 4.3. Dando sequência, o resíduo da ESC foi coletado (sólidos após ESC), o leito fixo para a ELP foi preparado e a segunda etapa iniciada (segundo passo da ES). A etapa ELP foi conduzida a 100 bar, 25 minutos de tempo estático, na temperatura de 80 °C, sendo esta condição selecionada de acordo com o potencial antioxidante dos extratos analisados (seção 4.5), aliado à economia de solvente e energia gastos no processo. Os experimentos foram realizados com etanol como solvente, bombeado pela bomba de HPLC diretamente para a célula de extração. Os extratos, coletados em distintos frascos de vidro, foram armazenados sob refrigeração e ausência de luz para posterior remoção de solvente por evaporador rotativo.

3.7 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO GLOBAL (X_0)

O rendimento global de extração (X_0) foi calculado através da razão de massa de extrato de *P. sajor-caju* (m_{extrato}) obtida e a massa de amostra (m_{amostra}) utilizada para realizar a extração. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

$$X_0 = \left(\frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{amostra}}} \right) \times 100 \quad (4)$$

3.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

A determinação do teor de compostos fenólicos totais (TFT) presentes nos extratos foi realizada no LATESC utilizando o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, baseado na metodologia de KOSAR et al. (2005). Este método está associado ao aparecimento da coloração azul devido à oxidação dos compostos fenólicos em meio básico (PESCHEL et al., 2006).

Para a análise dos resultados foi necessário preparar uma curva analítica de ácido gálico, com o objetivo de representar a absorbância da amostra frente a concentração de ácido gálico. Os extratos foram diluídos nos solventes utilizados durante sua extração, em uma concentração de 10 mg.mL⁻¹. O meio reacional foi preparado em

triplicata para cada amostra de extrato, em tubos de Eppendorf de 1,5 mL, e cada triplicata teve um branco.

Os reagentes foram adicionados na seguinte ordem: 0,6 mL de água, 10 µL de amostra, 50 µL do reativo de Folin. Agitou-se a mistura e adicionou-se 150 µL de solução 20 % de carbonato de sódio, aguardando repousar por 1 min e, então, inseriu-se 190 µL de água para completar o volume de 1 mL. Após adicionar todos os reagentes, os tubos foram homogeneizados e incubados durante 2 h à temperatura ambiente e na ausência de luz. A leitura das absorvâncias das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Femto 800 XI, São Paulo/SP) calibrado com água e ajustado no comprimento de onda igual a 760 nm. A curva padrão de ácido gálico foi representada por meio do gráfico de absorvância *versus* concentração de ácido gálico ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e está apresentada no Apêndice B.

Os valores de absorvância encontrados para cada tipo de extrato foram correlacionados com a curva padrão, e o teor de compostos fenólicos totais (TFT) foi determinado através da Equação 5.

$$\text{TFT} \left(\frac{\text{mg EAG}}{\text{g ext}} \right) = \frac{\text{EAG}}{D} \quad (5)$$

onde EAG é o equivalente em ácido gálico obtido da curva ($\text{mg}_{\text{EAG}}\cdot\text{mL}^{-1}$), D: diluição das amostras ($\text{g}_{\text{extrato}}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados expressos em mg de EAG.g⁻¹ de extrato, como média ± desvio padrão.

3.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O comportamento da atividade antioxidante dos extratos, avaliado pelas metodologias descritas a seguir, foi determinado para mensurar a qualidade dos extratos obtidos pela extração por Soxhlet à pressão atmosférica, e por tecnologias a alta pressão como a ESC utilizando CO₂ e CO₂ com cossolvente, bem como a ELP e ES. Os resultados obtidos foram comparados com o butil-hidroxitolueno (BHT), um composto sintético de reconhecida atividade antioxidante.

3.9.1 Método DPPH

O potencial antioxidante determinado pela captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi realizado de acordo com a técnica proposta por Mensor et al. (2001). Este ensaio se baseia no

potencial antioxidante de uma substância em sequestrar o radical, reduzindo-o a hidrazina. Quando uma substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada à solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança na coloração do violeta ao amarelo pálido (ALVES et al., 2010).

Nesse método, concentrações crescentes (0,625; 1,25; 5; 10 mg.mL⁻¹) dos extratos obtidos do cogumelo *P. sajor-caju* (710 µL) foram adicionadas a uma solução etanólica de DPPH 0,3 mM (290 µL), em tubos eppendorf de 1 mL. Após um período de tempo de 30 min, ao abrigo da luz e temperatura ambiente, efetuou-se a leitura das absorbâncias no espectrofotômetro a 517 nm. Para eliminar a interferência da cor dos mesmos na análise, preparou-se um branco com 0,710 µL de extrato e 0,290 µL de etanol para cada uma das diluições. O espectrofotômetro foi calibrado com etanol puro.

O percentual de inibição das amostras testadas sobre o radical DPPH foi calculado convertendo-se a absorbância em percentual de atividade antioxidante (AA %), conforme a equação abaixo.

$$AA \% = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) * 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (6)$$

onde: Abs_{amostra} é a absorbância da amostra após 30 min de reação; Abs_{branco} é a absorbância do branco após 30 min de reação; Abs_{controle} é a absorbância do controle após 30 min de reação.

A concentração das amostras necessárias para captar 50 % do radical livre DPPH (EC₅₀ - *Effective concentration*) foi calculada por análise de regressão exponencial e linear. Os resultados encontrados de concentração efetiva (EC₅₀) e atividade antioxidante (AA %) para os extratos analisados foram expressos como média ± desvio padrão.

3.9.2 Método ABTS

A atividade antioxidante pelo método do radical cátion 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico] (ABTS) dos extratos de *P. sajor-caju* foi avaliada de acordo com a técnica proposta por Re et al. (1999). O ensaio ABTS permite a avaliação da atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (SURVESWARAN, et al., 2007).

Para essa análise utilizou-se o Trolox, vitamina E sintética (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) como antioxidante referência. O radical ABTS foi dissolvido em água até a concentração de

7 mM, e submetido à reação com 2,45 mM de persulfato de potássio para a formação do radical em solução de proporção 1:1. A solução foi armazenada no escuro em refrigerador doméstico por 16 horas antes do uso. A solução do radical ABTS foi diluída em etanol até uma absorbância de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm. Em tubos de Eppendorf, foram inseridos 20 μL de extrato (5 concentrações diferentes variando de 0,31 a 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), em triplicata, juntamente com 980 μL da solução de ABTS. Os tubos foram agitados e a reação ocorreu durante 45 min, sob proteção da luz. Ao término desse tempo, foram efetuadas as leituras em absorbância no espectrofotômetro a 734 nm e, a partir destas, a porcentagem de inibição do radical foi calculada através da Equação 7:

$$\% \text{ inibição} = 1 - \left(\frac{\text{abs}_f}{\text{abs}_0} \right) * 100 \quad (7)$$

onde o termo abs_f é a absorbância do radical ABTS adicionado a amostra após um tempo total de reação, e abs_0 é a absorbância do radical. A curva padrão do antioxidante comercial Trolox foi plotada em função da porcentagem de inibição do radical ABTS pelas diferentes concentrações de Trolox ($\text{mM}\cdot\text{mL}^{-1}$). Desta forma, através da obtenção da porcentagem de inibição do extrato analisado, é possível calcular a atividade antioxidante (AA) deste através da Equação 8 com base na curva padrão de Trolox. A curva padrão de Trolox é apresentada no Apêndice C.

$$AA = \left[\frac{Ca}{Ce} \right] \quad (8)$$

onde Ca é a concentração ($\text{mM}\cdot\text{mL}^{-1}$) referente ao percentual de inibição obtido através das leituras espectrofotométricas do extrato e Ce é a concentração do extrato utilizada na técnica. A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol TEAC}$ (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) por g de extrato ($\mu\text{mol de Trolox}\cdot\text{g extrato}^{-1}$), como média \pm desvio padrão (item 4.5.2).

3.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi avaliada através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI). As análises foram realizadas em parceria com o Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFSC.

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, com corante resazurina, conforme a metodologia descrita por Sarker et al. (2007) e Ud-Daulla et al. (2016). Os extratos testados (20 mg) foram dissolvidos em 1 mL de Tween 80 a 1 % e testados quanto ao seu potencial antimicrobiano frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 11229, além da levedura *Candida albicans* MDM8.

Os extratos brutos foram, inicialmente, repicados em ágar Mueller-Hinton para uma avaliação prévia da sua qualidade. Posteriormente, preparou-se a solução de resazurina dissolvendo 270 mg de corante em 40 mL de água estéril, bem como os caldos Mueller-Hinton e Saboraud para as análises. Esse material foi esterilizado para a realização da análise. Preparou-se ainda uma solução de antibiótico ceftazidina em água destilada estéril, na concentração de $74 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, para ser utilizada como controle de inibição.

Preparados todos os meios e soluções iniciou-se o preparo dos poços, em placas estéreis de microdiluição de 96 poços. Em cada orifício-teste foi adicionado $90 \mu\text{L}$ de caldo (Mueller-Hinton frente às bactérias e Saboraud para a avaliação da atividade antifúngica) e $90 \mu\text{L}$ da solução do extrato, para cada amostra em duplicata. Cada placa de microdiluição foi utilizada para um único micro-organismo e diferentes extratos.

Depois de ter todos os poços preenchidos, foi adicionado $10 \mu\text{L}$ da suspensão do micro-organismo, com concentração aproximada de $5 \times 10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para tanto, a cepa do micro-organismo foi sempre ativada no dia anterior ao ensaio.

Foram preparados quatro controles nos poços, em duplicata. O primeiro referente ao controle do antibiótico, onde foi realizado o mesmo procedimento inicial dos demais, no entanto, substituindo a solução do extrato por $90 \mu\text{L}$ da solução de antibiótico no poço controle e, após, realizando diluição seriada nessa coluna. O segundo controle diz respeito ao solvente utilizado para diluir o extrato. Nesse caso, adicionou-se $90 \mu\text{L}$ do solvente (solução 1 % de Tween 80) substituindo a solução do extrato. Já o terceiro controle está relacionado com o controle de crescimento, sendo assim, faz-se o mesmo procedimento inicial, no entanto sem adicionar a solução do extrato. E, por fim, o controle sem micro-organismo, onde seus $10 \mu\text{L}$ devem ser substituídos por $10 \mu\text{L}$ de caldo.

Terminado o preenchimento de todos os poços, conforme as etapas descritas acima foram adicionados $10 \mu\text{L}$ do corante resazurina em cada poço, as placas foram embaladas com papel filme para impedir

a desidratação dos micro-organismos e as mesmas foram incubadas a 35 °C por 24 h para as bactérias e por 48 h para a levedura. A alteração da cor foi avaliada visualmente e o crescimento é indicado por mudança de cor púrpura para rosa. A concentração mais baixa em que houve alteração de cor foi considerada como o valor de CMI, sendo os resultados expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (seção 4.6).

3.11 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

Os principais constituintes dos extratos de *P. sajor-caju* estudados foram quantificados e identificados através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), análise esta que foi realizada junto a Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos EQA-UFSC.

Os extratos analisados foram selecionados em função dos resultados de rendimento e qualidade encontrados. A análise foi realizada em um cromatógrafo a gás (Agilent 7890A GC System), equipado com um espectrômetro de massas (Agilent 5975C inert MSD with Triple-Axis Detector), utilizando hélio como gás de arraste a um fluxo de 1 mL.min^{-1} . A coluna cromatográfica utilizada foi a HP-5MS, com dimensões de 30,0 m x 0,25 mm x 0,25 μm . As amostras foram dissolvidas em diclorometano (1 mg.mL^{-1}) e injetados no volume de 1 μL para a análise. As temperaturas do injetor e detector foram de 290 e 295 °C, respectivamente. A temperatura de programação teve início a 50 °C e temperatura final de 290 °C, com taxa de aquecimento de 5 °C/min. Os compostos majoritários foram identificados usando uma base de dados para produtos naturais (*Standard Reference Data Series of the National Institute of Standard and Technology/NIST - Mass-Spectral Library with Windows Search Program - Version 2*), onde os espectros de massa foram comparados.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de rendimento global, teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana foram avaliados estatisticamente por análise unidirecional de variância (ANOVA), utilizando o software Statística 13.3.0 (StatsoftInc., EUA). A análise estatística foi realizada para detectar diferenças significativas entre os diferentes métodos analisados e dentre as condições de processo

estudadas para o mesmo método. As diferenças significativas ($p < 0,05$) foram analisadas pelo teste de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

Na Tabela 4 pode-se observar os valores determinados para os parâmetros de umidade e diâmetro de partícula da amostra de cogumelo *P. sajor-caju* desidratado e moído.

Tabela 4 – Caracterização do cogumelo *Pleurotus sajor-caju*

Parâmetro	Valor médio
Umidade (% base úmida)	13,6±0,2
Diâmetro de partícula (mm)	0,3±0,1

Fonte: O autor (2018).

Segundo Pourmortazavi e Hajimirsadeghi (2007), a quantidade de água presente na amostra pode afetar negativamente o rendimento da extração supercrítica. Assim, a fim de evitar interações indesejáveis entre a matriz e a água, essa deve ser removida ou ao menos ter seu conteúdo controlado. Sendo assim, realizou-se a secagem da matéria-prima até a umidade final de 13,6 %, o que permitiu melhorar seu manuseio e facilitar sua moagem para posterior utilização nas análises, bem como evitou a formação de aglomerados de amostra durante o armazenamento.

O valor do diâmetro médio de partícula determinado para *P. sajor-caju* (0,3±0,1 mm) se encontra próximo aos valores relatados por Kitzberger (2005) e Mazzutti (2012) de 0,214 (cogumelo shiitake) e 0,316 mm (cogumelo do sol), respectivamente, em estudo de obtenção de extratos de cogumelos em alta e baixa pressão. O valor do diâmetro médio de partícula encontrado e utilizado nesse estudo com cogumelo *P. sajor-caju*, está de acordo com a faixa de valores relatada por Reverchon e Marco (2006), os quais afirmam que o valor médio ideal a ser utilizado em extrações supercríticas está entre 0,25 – 2 mm. De acordo com Martínez (2005), partículas muito grandes ou pequenas demais podem interferir na compactação do leito e comprometer o rendimento da extração devido à formação de caminhos preferenciais de solvente no leito de partículas. O conhecimento das características das partículas, bem como do leito de extração, é importante para o entendimento dos mecanismos de transferência de massa envolvidos no processo de extração, quando estes são avaliados por modelos matemáticos (MAZZUTTI, 2016).

4.2 CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

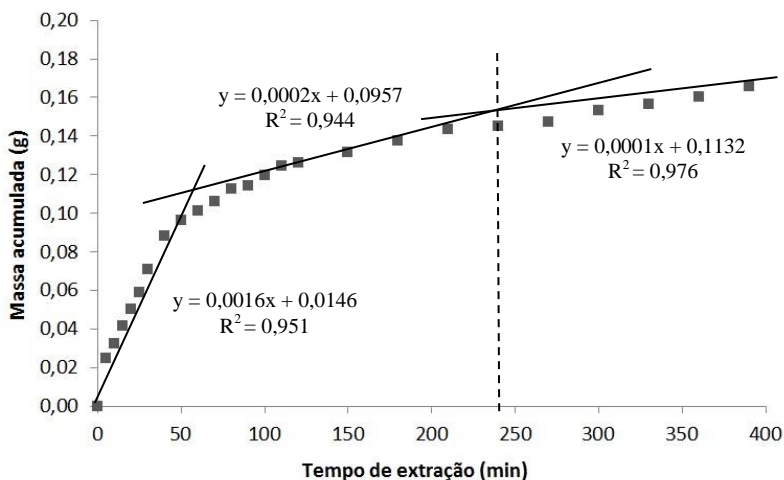
4.2.1 Cinética de extração supercrítica

A avaliação do comportamento cinético da extração supercrítica permite a obtenção de parâmetros que levam às melhores condições operacionais. Sendo assim, testes preliminares foram realizados para definir as condições de operação adequadas para obtenção de extratos de cogumelo *P. sajor-caju* por meio de extrações com CO₂ supercrítico. Os parâmetros de processo determinados nestes ensaios foram: vazão de solvente e tempo de extração. Os ensaios de cinética foram conduzidos na pressão de 200 bar, temperatura de 40 °C, vazão de $12 \pm 2 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$ e com duração máxima de 7 h. A curva cinética de extração foi construída através da obtenção da massa de extrato acumulado em função do tempo de processo. Nesse sentido, a fixação de um tempo de processo é um fator muito importante para a avaliação dos efeitos da pressão e temperatura no rendimento global (X_0) de extração supercrítica. O tempo é fixado com base nas etapas da curva de extração, conforme descrito no item 3.4.2.

A Figura 11 apresenta a curva cinética da extração supercrítica. Analisando o comportamento da curva de extração, foi possível verificar as três etapas de extração, tornando possível o ajuste aos dados experimentais. No Apêndice A são apresentados os dados experimentais, tempo e massa acumulada, utilizados na construção da curva cinética de ESC.

A curva de extração pode ser dividida em três etapas: etapa de velocidade constante de extração (CER), etapa de velocidade decrescente de extração (FER) e o processo difusional (DCP). Nas determinações do rendimento de extração (X_0), o tempo de extração utilizado foi o necessário para assegurar que o período difusional fosse alcançado (FERREIRA; MEIRELES, 2002).

Figura 11 – Cinética de extração supercrítica de cogumelo *P. sajor-caju* a 200 bar, 40 °C e 12 ± 2 g.min⁻¹ de CO₂.



Fonte: O autor (2018)

Na Figura 11 a inclinação da primeira reta representa a taxa de transferência de massa da etapa CER (M_{CER}). O tempo correspondente à intersecção entre as duas primeiras retas é o t_{CER} , o qual pode representar o tempo mínimo de duração de um ciclo de ESC; o tempo de intersecção entre a segunda e terceira reta é o t_{FER} , que em geral, representa a duração máxima que um ciclo ESC pode ter para manter a viabilidade econômica do processo (MEIRELES, 2008).

Observando a curva, percebe-se que após 240 min de extração, a etapa difusional foi alcançada. Dessa forma, o tempo de extração total a ser utilizado nos ensaios de rendimento foi definido como 4 h (linha pontilhada), garantindo assim que a maior parte de soluto tenha sido extraída. A partir dos dados obtidos pela cinética de extração, foram calculados os parâmetros cinéticos, conforme apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros da cinética de extração supercrítica do cogumelo *P. sajor-caju* a 200 bar, 40 °C e 12 ± 2 g.min⁻¹ de CO₂.

Parâmetro	Etapa de extração		
	CER	FER	DCP
t (min)	0-60	60-240	>240
m (g)	0,1014	0,0438	0,0203
X ₀ (%)	0,44	0,19	0,08
M (g.min ⁻¹)	0,0016	0,0002	0,0001

t: duração da etapa de extração; m: massa de extrato aproximada; X₀: rendimento da etapa; M: velocidade de extração; CER: etapa de extração constante; FER: etapa de extração decrescente; DCP: etapa difusional.

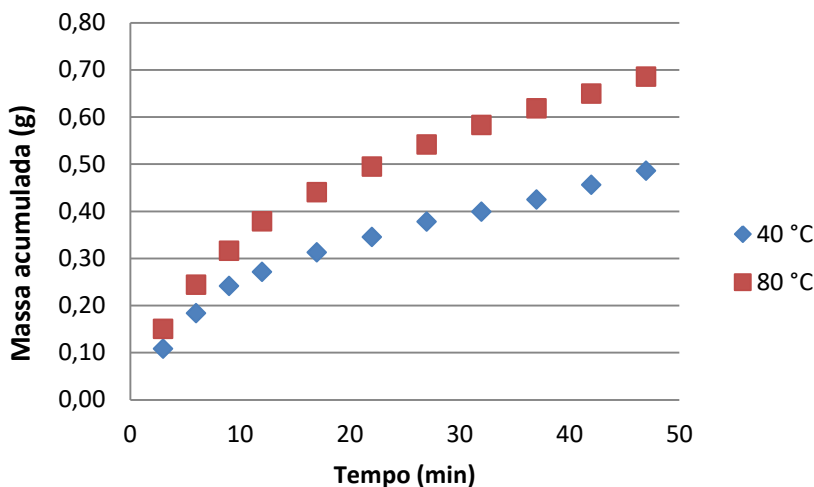
Na etapa CER, cerca de 61 % do extrato foi recuperado, enquanto que ao final da etapa FER recuperou-se 87 % do extrato. Nos experimentos de Mazzutti (2012) para o cogumelo do sol, nas mesmas condições estudadas nesse trabalho, foi verificado um percentual de recuperação igual a 67 e 90 %, para a etapa CER e FER, respectivamente. Já na cinética de extração supercrítica avaliada por Kitzberger (2005) para o cogumelo shiitake a 20 MPa, 40 °C e 3,33 g.min⁻¹ de CO₂, observou-se a recuperação de aproximadamente 78 % do extrato na etapa CER, sendo que ao final da etapa FER, cerca de 94 % do extrato foi recuperado.

De acordo com a Figura 11, o tempo necessário para que a etapa controlada pela difusão fosse alcançada aconteceu por volta dos 240 min. Analisando o rendimento das etapas percebe-se que a extração realizada apenas com dióxido de carbono apresenta baixo rendimento. Com base nesses resultados observou-se a necessidade de estudar a influência do uso de modificadores no rendimento da extração. Dessa forma, os parâmetros de extração com cossolvente foram fixados de acordo com estudos já realizados no LATESC (KITZBERGER, 2005; MAZZUTTI, 2016; LASTA, 2017), utilizando 5 e 10 % de etanol, um solvente GRAS (*Generally Recognized as Safe*).

4.2.2 Cinética de extração com líquido pressurizado

Assim como para a ESC, a curva cinética de ELP é importante na determinação do tempo ideal de processo. Na Figura 12 são apresentadas as curvas cinéticas em modo dinâmico obtidas nas temperaturas de 40 e 80 °C, a uma pressão de 100 bar e vazão de 2 mL.min⁻¹, com etanol (99,8 %).

Figura 12 – Cinéticas de extração com etanol pressurizado para *P. sajor-caju* a 40 e 80 °C, 100 bar e com vazão de 2 mL.min⁻¹



Fonte: O autor (2018).

Analisando as curvas de extração percebe-se que o aumento da temperatura provocou um aumento no rendimento, sob pressão e vazão fixas. Conforme Camel (2001) e Heo et al. (2014), isso pode ser explicado pelo fato de que elevadas temperaturas, acima do ponto de ebulição do solvente, permitem uma maior interação com a matriz, melhorando as propriedades de solubilidade e transferência de massa e resultando em um aumento na eficiência de extração. O tempo de extração é um dos parâmetros a ser avaliado, pois ele influencia não só no rendimento, como também na qualidade dos extratos. Neste trabalho, o tempo de extração por ELP foi estabelecido em 45 min para o modo dinâmico e 25 min para o modo estático, conforme encontrado na literatura (MUSTAFA; TURNER, 2011; PEREIRA et al.; 2016; SMIDERLE et al., 2017).

4.3 RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES

O rendimento global de extração (X_0) é definido como a quantidade total de compostos presente na matriz sólida, possível de ser extraída pelo solvente, em função das condições de extração estabelecidas (SILVA, 2004).

A Tabela 6 apresenta os resultados médios do rendimento global de extração (X_0) obtidos pela técnica de Soxhlet e técnicas de alta pressão (ESC, ELP e ES), realizados em duplicata para os extratos de *P. sajour-caju*.

Tabela 6 – Rendimento global de extração (X_0) para o cogumelo *P. sajour-caju* obtido por diferentes técnicas de extração

Técnica	Solvente	R (%) ⁽¹⁾
ESC 200 bar/40 °C	CO ₂	0,3 ^{gC} ±0,1
ESC 300 bar/40 °C	CO ₂	1,0 ^{fB} ±0,1
ESC 200 bar/40 °C	CO ₂ + 5% etanol	1,1 ^{fB} ±0,1
ESC 300 bar/40 °C	CO ₂ + 5% etanol	1,2 ^{fB} ±0,1
ESC 200 bar/40 °C	CO ₂ + 10% etanol	2,3 ^{eA} ±0,3
ESC 300 bar/40 °C	CO ₂ + 10% etanol	2,5 ^{eA} ±0,1
ELP 100 bar/40 °C DIN*	Etanol	6,8 ^{d5} ±0,2
ELP 100 bar/80 °C DIN	Etanol	15,3 ^{aa} ±0,3
ELP 100 bar/40 °C EST**	Etanol	6,4 ^{d5} ±0,1
ELP 100 bar/80 °C EST	Etanol	10,6 ^{bβ} ±0,2
ES 100 bar/80 °C EST***	Etanol	7,5 ^{cγ} ±0,1
Soxhlet	Etanol	15,6 ^{aΔ} ±0,1
Soxhlet	Hexano	1,2 ^{f□} ±0,1

*DIN = Dinâmico; **EST = Estático; ***ES = Extração sequencial utilizando a matriz residual da ESC 300 bar/40 °C para ELP 100 bar/80 °C. ⁽¹⁾ Média (n=2); Letras iguais indicam que não há diferença significativa para o Teste de Tukey (p>0,05), onde: i) letras minúsculas indicam análise entre todos os métodos, ii) letras maiúsculas indicam análise entre as ESC, iii) símbolos gregos indicam análise entre as extrações ELP e iv) formas geométricas indicam análise entre extrações Soxhlet. Fonte: O autor (2018).

Observando na Tabela 6, as extrações com CO₂ supercrítico e com cossolvente apresentam tendência de aumento de rendimento com o aumento da pressão à temperatura constante, embora o aumento não seja significativo. Esta tendência é justificada pela elevação da massa específica do solvente supercrítico com a pressão. Segundo Angus, Armstrong e De Reuck (1976), a massa específica do CO₂ a 200 bar e 40

°C é igual a $0,840 \text{ g.cm}^{-3}$, enquanto para 300 bar e na mesma temperatura, é $0,911 \text{ g.cm}^{-3}$, ou seja, ocorre um aumento do poder de solvatação do CO_2 com a densidade (BRUNNER, 1994). Ainda, o aumento da pressão pode gerar rupturas na matriz e facilitar a liberação de compostos que não estavam disponíveis em pressões mais baixas, e dessa forma, aumentar o número de compostos solubilizáveis e, conseqüentemente, o rendimento do processo (CAMPOS et al., 2005). Dessa forma, devido ao baixo rendimento das ESC a 200 bar, decidiu-se não avaliar essa condição de extração quanto a atividade biológica, uma vez que a obtenção de uma quantidade razoável de extratos para as análises acarretaria um maior número de experimentos, elevando os custos de processo.

O uso de cossolvente na ESC influenciou positivamente na extração, aumentando significativamente o rendimento, quando empregada a maior concentração estudada (10 %), o que pode estar associado à maior solubilização de compostos polares na mistura cossolvente/ CO_2 , reduzindo desta forma a seletividade do processo e aumentando o rendimento. Esse comportamento se deve à interação cossolvente/soluto e ao inchamento da matriz (PEREIRA, MEIRELES, 2010).

Do mesmo modo, observando a Tabela 6 as ELP apresentaram maiores e significativos rendimentos na comparação com a ESC. O maior rendimento encontrado para a ELP (ELP 100/80 DIN = 15,35 %) apresentou um valor estatisticamente igual ao obtido pelo método de Soxhlet (15,61 %) utilizando etanol como solvente. Esse valor obtido pelo método de Soxhlet era esperado em função do longo período de extração e pela amostra sempre entrar em contato com o solvente puro, durante vários ciclos.

Entretanto esse fato não ocorreu para a técnica de Soxhlet utilizando hexano (1,19 %) e comparável aos valores de ESC com CO_2 . A explicação para isso está relacionada com a polaridade do solvente, ambos solventes apolares, reduzindo a solubilização da fração de compostos polares da amostra. Este comportamento também foi observado no processo sequencial (ESC 300/40 seguido de ELP 100/80 em modo estático), cuja segunda etapa com etanol aumentou o rendimento em relação à etapa inicial de ESC com CO_2 .

Ainda observando a Tabela 6, os rendimentos de extratos obtidos por ELP aumentaram com o uso de temperatura mais elevada e isso pode estar relacionado com fatores ligados à redução da viscosidade e da tensão superficial do solvente, além da abertura da matriz celular das amostras. O modo ELP, dinâmico ou estático, analisando uma mesma

pressão e temperatura não apresentou diferença significativa para ELP 100/40, porém com diferença significativa para ELP 100/80 (15,3 e 10,6 % para o modo dinâmico e estático, respectivamente). Provavelmente, o uso de uma vazão de solvente maior que $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ no processo dinâmico ocasionaria uma maior troca de solvente que aumentaria ainda mais a diferença de rendimento de extrato na comparação com um processo estático.

4.4 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (TFT)

Na Tabela 7 estão apresentados os valores encontrados para o teor de compostos fenólicos totais dos extratos de cogumelo *P. sajor-caju* obtidos por extração em Soxhlet, ESC, ELP e ES. A curva padrão de ácido gálico, utilizada para o cálculo do teor de compostos fenólicos totais consta no Apêndice B. Segundo Velioglu et al. (1998), a atividade antioxidante de extratos está correlacionada com o conteúdo de seus componentes fenólicos, dessa forma torna-se interessante seu estudo.

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos de cogumelo *P. sajor-caju* variou entre $1,1\pm 0,1$ e $25,4\pm 0,3 \text{ mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$. Os valores verificados estão bem abaixo dos $268 \text{ mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$ obtidos por Benelli et al. (2010), para o antioxidante sintético BHT, utilizando o mesmo método de determinação.

Na identificação e isolamento de compostos bioativos em fontes naturais, muitas vezes faz-se necessária a realização da extração com solventes de polaridades diferentes, já que a atividade dessas substâncias depende de que compostos fenólicos estejam presentes. De modo geral, os compostos fenólicos são caracterizados como polares, e por isso são mais facilmente solubilizados em solventes de maior polaridade. Analisando a Tabela 7 pode-se observar que o teor de compostos fenólicos total aumentou para extratos obtidos com a utilização de solventes de maior polaridade.

Tabela 7 – Teor de compostos fenólicos total (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico para os extratos de cogumelo *P. sajor-caju*.

Técnica	Solvente	TFT (mg EAG.g ⁻¹ extrato) ⁽¹⁾
ESC 300 bar/40 °C	CO ₂	7,9 ^{gA} ±0,3
ESC 300 bar/40 °C	CO ₂ + 5% etanol	8,5 ^{gA} ±0,4
ESC 300 bar/40 °C	CO ₂ + 10 % etanol	9,7 ^{gB} ±0,1
ELP 100 bar/40 °C DIN*	Etanol	11,1 ^{ey} ±0,7
ELP 100 bar/80 °C DIN	Etanol	14,1 ^{dB} ±0,4
ELP 100 bar/40 °C EST**	Etanol	10,5 ^{ey} ±0,3
ELP 100 bar/80 °C EST	Etanol	13,3 ^{dB} ±0,3
ES 100 bar/80 °C EST***	Etanol	15,6 ^{ca} ±0,2
Soxhlet	Etanol	25,4 ^{bA} ±0,3
Soxhlet	Hexano	1,1 ^{hc} ±0,1
BHT ⁽²⁾	-	268 ^a ±13

*DIN = Dinâmico; **EST = Estático; ***ES = Extração sequencial utilizando a matriz residual da ESC 300 bar/40 °C para ELP 100 bar/80 °C. ⁽¹⁾ Média (n=3); Letras iguais indicam que não há diferença significativa para o Teste de Tukey (p>0,05), onde: i) letras minúsculas indicam análise entre todos os métodos, ii) letras maiúsculas indicam análise entre as ESC, iii) símbolos gregos indicam análise entre as extrações ELP e iv) formas geométricas indicam análise entre extrações Soxhlet. ⁽²⁾Benelli et al. (2010). Fonte: O autor (2018).

Observa-se que o método de extração por Soxhlet com etanol apresentou o melhor resultado de TFT. Esse bom resultado verificado para o etanol justifica o seu emprego como solvente e cossolvente nos processos ELP e ESC, respectivamente. Segundo Biscaia (2007), o etanol é o solvente mais indicado na extração de compostos antioxidantes, pois, devido à sua característica polar, promove a extração de compostos como ácidos fenólicos.

Nesse contexto, os valores do TFT obtidos por ESC com cossolvente proporcionou um acréscimo de 7 a 21 % na comparação com os encontrados para a extração somente com CO₂. O baixo valor do TFT obtido pela técnica de Soxhlet (1,02±0,13 mgEAG.g⁻¹ extrato) utilizando hexano confirma a tendência de baixa obtenção de compostos fenólicos com solventes apolares.

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos de cogumelo *P. sajor-caju* obtidos pela técnica de ELP apresentaram uma tendência de aumento com o aumento da temperatura. Quando utilizada a maior temperatura (80 °C), o TFT foi superior ao obtido na temperatura mais baixa (40 °C) tanto para o método dinâmico quanto estático. Esse resultado pode estar relacionado a reações que ocorrem durante os processos de extração em temperatura mais elevada, como por exemplo, a formação de novos grupos estruturais de moléculas, ao qual melhoram a atividade antioxidante (KUSZNIEREWICZ et al. 2008; RYAN; PRESCOTT, 2010; JEONG et al, 2004).

O método de extração sequencial (ES) foi o que apresentou o segundo melhor conteúdo de TFT, muito provavelmente pelo fato da primeira extração em ESC recuperar os compostos apolares da matriz, facilitando, dessa forma, a posterior obtenção dos compostos polares por ELP. Esse resultado é muito promissor, pois demonstra que a ES possibilita fracionar os extratos, com uma eficiente separação de duas frações importantes do extrato de cogumelo, ricas em diferentes compostos, sendo a primeira com bom potencial antimicrobiano e a segunda com maior potencial antioxidante, valorizando a matéria-prima e agregando valor aos produtos obtidos. O fato das ELP em modo dinâmico e estático terem apresentado TFT semelhantes e não terem diferido estatisticamente entre si, para as mesmas condições de processo estudadas nos diferentes modos de extração, pode ter ocorrido por se utilizar de uma vazão de solvente relativamente baixa na extração dinâmica (2 mL.min⁻¹), impossibilitando maiores taxas de transferência de massa neste modo.

Observando os resultados encontrados, percebe-se, também, que o aumento do tempo e renovação do solvente não apresentaram diferenças significativas para obtenção de TFT. Há possibilidade de os compostos fenólicos presentes na matriz terem sido extraídos em sua totalidade no menor tempo de extração (estático em 25 min), o que é muito positivo em termos de consumo de solvente e energia que são reduzidos. Seria necessário avaliar o emprego de maiores vazões de solvente na ELP dinâmica para poder confirmar esta hipótese.

Finimundy et al. (2013) estudaram o teor de compostos fenólicos totais no extrato aquoso de *P. sajor-caju* após 1h de extração por maceração, sob agitação a 50 °C. A concentração expressa em teor de ácido gálico obtida foi de 35 mg.g⁻¹, valor superior à De Pauli (2010) que obteve teor baixo de fenólicos (2,57 mgEAG.g⁻¹) no extrato metanólico-aquoso (1:1) para esta mesma espécie de cogumelo.

A composição de fenólicos em cogumelos pode ser afetada por um grande número de fatores como: espécie; composição do meio de cultura (para espécies cultivadas *in vitro*); época de colheita; técnicas de manejo, condições de manipulação e preparação dos substratos (para espécies cultivadas); e a composição solo/substrato ou espécies hospedeiras associadas (para espécies silvestres). Todos esses fatores têm grande influência no metabolismo secundário dos fungos, incluindo as vias dos chiquimato e acetato e, dessa forma, afetam diretamente na produção dos fenóis (HELENO et al., 2010).

Para que um processo de obtenção de extratos seja economicamente viável, deve-se avaliar tanto o rendimento quanto o teor de compostos fenólicos totais apresentados. Assim, para saber qual a melhor condição obtida, multiplicou-se o rendimento pelo resultado do teor de compostos fenólicos total, estando estes resultados apresentados na Tabela 8. O resultado dessa multiplicação foi chamado de índice de eficiência, onde efetuar esse procedimento possibilita determinar a melhor condição de processo (MAZZUTTI, 2012).

Avaliando os resultados apresentados na Tabela 8, verificou-se que os processos que apresentaram melhores resultados foram obtidos na técnica de Soxhlet com etanol (3,82), seguidos pelo método ELP em modo dinâmico (1,55), ES (1,17) e ELP estático (1,12) na maior temperatura estudada (80 °C). Ainda na Tabela 8 observa-se que os valores obtidos para ESC encontrados nesse estudo (entre 0,08 e 0,28) ficaram próximos à faixa entre 0,09 e 0,6 obtidos por Mazzutti (2012), em estudo de obtenção de extratos de cogumelo do sol em baixa e alta pressão.

Tabela 8 – Rendimento (R) x Teor de compostos fenólicos total (TFT).

Técnica	Solvente	Índice de eficiência (R*TFT)
ESC 300 bar/40 °C	CO ₂	0,08
ESC 300 bar/40 °C	CO ₂ + 5% etanol	0,10
ESC 300 bar/40 °C	CO ₂ + 10 % etanol	0,28
ELP 100 bar/40 °C DIN*	Etanol	1,07
ELP 100 bar/80 °C DIN	Etanol	1,55
ELP 100 bar/40 °C EST**	Etanol	0,55
ELP 100 bar/80 °C EST	Etanol	1,12
ES 100 bar/80 °C EST***	Etanol	1,17
Soxhlet	Etanol	3,82
Soxhlet	Hexano	0,01

*DIN = Dinâmico; **EST = Estático; ***ES = Extração sequencial utilizando a matriz residual da ESC 300 bar/40 °C para ELP 100 bar/80 °C.

Fonte: O autor (2018).

4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1 Potencial antioxidante pelo método do radical DPPH

A Tabela 9 apresenta os resultados da atividade antioxidante dos extratos de cogumelo *P. sajor-caju* obtidos em ESC, ELP, ES e Soxhlet. A atividade antioxidante, referente à concentração de extrato de 500 µg.mL⁻¹ é apresentada em % AA e EC₅₀, ou seja, a concentração efetiva a 50 %.

Na presença de compostos antioxidantes, o radical DPPH recebe um elétron, tornando-se mais estável. Com isso, dá-se a redução da sua absorvância, e este processo pode ser avaliado visualmente, por meio da descoloração da solução contendo o DPPH e também com a utilização de espectrofotômetro. Quanto menor o valor de EC₅₀, maior a atividade antioxidante do extrato, já que este valor representa a quantidade de extrato necessária para reduzir em 50 % a atividade do radical livre.

Tabela 9 – Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de cogumelo *P. sajor-caju* através do método DPPH, expressos através do percentual de atividade antioxidante (% AA) e concentração efetiva a 50 % (EC₅₀).

Técnica	Solvente	EC50(µg.mL ⁻¹)	% AA (500 µg.mL ⁻¹) ⁽¹⁾
ESC 300 bar/40 °C	CO ₂	2116 ^{ab} ±36	6,1 ^{1c} ±0,4
ESC 300 bar/40 °C	CO ₂ + 5% etanol	1629 ^{ab} ±14	7,6 ^{hb} ±1,4
ESC 300 bar/40 °C	CO ₂ + 10 % etanol	1436 ^{ac} ±20	10,9 ^{ga} ±1,2
ELP 100 bar/40 °C DIN*	Etanol	1552 ^{dr} ±41	11,6 ^{fb} ±1,9
ELP 100 bar/80 °C DIN	Etanol	953 ^{ib} ±28	23,1 ^{db} ±1,1
ELP 100 bar/40 °C EST**	Etanol	1834 ^{ba} ±22	12,5 ^{ef} ±0,6
ELP 100 bar/80 °C EST	Etanol	1666 ^{cb} ±11	13,8 ^{et} ±0,6
ES 100 bar/80 °C EST***	Etanol	606 ^{ge} ±10	45,7 ^{ca} ±2,2
Soxhlet	Etanol	527 ^{ha} ±8	47,2 ^b ±2,4
Soxhlet	Hexano	2176 ^{ad} ±21	3,4 ^j ±0,6
BHT ⁽²⁾	-	261 ⁱ ±12	89,7 ^a ±0,5

*DIN = Dinâmico; **EST = Estático; ***ES = Extração sequencial utilizando a matriz residual da ESC 300 bar/40 °C para ELP 100 bar/80 °C. ⁽¹⁾Média (n=3); Letras iguais indicam que não há diferença significativa para o Teste de Tukey (p>0,05), onde: i) letras minúsculas indicam análise entre todos os métodos, ii) letras maiúsculas indicam análise entre as ESC, iii) símbolos gregos indicam análise entre as extrações ELP e iv) formas geométricas indicam análise entre extrações Soxhlet. ⁽²⁾Benelli et al. (2010).
Fonte: O autor (2018).

Com base nos dados da Tabela 9, vê-se que a atividade antioxidante (%AA) dos extratos aumentou em função da polaridade dos solventes utilizados. Para ESC pode-se observar que ocorreu aumento significativo na atividade antioxidante quanto maior a concentração de etanol empregada, em relação àquela com CO₂ puro, o que confirma a afinidade dos compostos antioxidantes com os solventes polares.

A maior atividade antioxidante (47,2 %) foi obtida na extração pelo método de Soxhlet com etanol, valor este superior ao encontrado por Mazzutti et al. (2012), igual a 30,2 %, ao utilizar o mesmo método para obtenção de extratos de cogumelo do sol.

Na extração de compostos fenólicos de matrizes naturais, a literatura tem demonstrado que a temperatura ótima de extração é 50 °C (PINELO; SINEIRO; NÚNEZ, 2006). No entanto, observando a Tabela 9 pode-se observar que houve um aumento da atividade antioxidante com a elevação da temperatura de extração, indo de encontro com a literatura. Este episódio pode estar relacionado com as diferentes características dos compostos extraídos, o que também foi observado por Mazzutti (2012) para algumas das condições de extração estudadas para o cogumelo *Agaricus brasiliensis*.

Os valores da atividade antioxidante dos extratos de ESC foram inferiores aos obtidos nas demais técnicas testadas, mesmo quando empregado cossolvente, variando entre 6,1 e 10,9 % e com valores de EC₅₀ muito acima do padrão BHT, 261 µg.mL⁻¹ (BENELLI, 2010), considerado um padrão com bom potencial antioxidante. A baixa atividade antioxidante pode estar associada à pequena quantidade de compostos com atividade antioxidante frente ao DPPH, com polaridade intermediária a alta, presentes nestes extratos, uma vez que o CO₂, solvente apolar, não favorece a solubilização de tais compostos (BENELLI, 2010).

Segundo Roginsky e Lissi (2005), a atividade antioxidante dos extratos é comumente relacionada com o conteúdo de fenólicos total, embora esses compostos apenas representem uma boa estimativa desta propriedade. Pode-se constatar que este fato está de acordo com os resultados obtidos neste estudo, quanto à atividade antioxidante dos extratos testados pelo método DPPH, pois ao analisar os dados das Tabelas 7 e 9 é possível perceber o mesmo comportamento para ambas as técnicas empregadas.

Kitzberger et al. (2007) no estudo da atividade antioxidante através do método DPPH para extratos de cogumelo shiitake obtidos em técnicas de alta e baixa pressão detectou que, dentre os extratos supercríticos, nenhum apresentou atividade antioxidante, comparado ao

valor de até 6,1 % AA para extrato ESC com CO₂ de cogumelo *P. sajor-caju* obtidos a 300 bar e 40°C desse trabalho. Por outro lado, Mazzutti et al. (2012) encontrou valores superiores para o cogumelo do sol (*Agaricus brasiliensis*) pelo método ESC, na mesma condição de pressão e temperatura, com EC₅₀ igual a 4622±8, correspondendo a uma atividade antioxidante de 9,6 %.

Finimundy et al (2013), ao avaliar extratos aquosos de *Pleurotus sajor-caju* e *Lentinula edodes*, obtidos por maceração, sob agitação a 50 °C por 1 h, identificou atividade antioxidante equivalente a 9,01 e 3,45 % para cada cogumelo, respectivamente, o que corrobora com os resultados de ESC do presente estudo.

As ELP apresentaram aumento da atividade antioxidante dos extratos de cogumelo ostra na maior temperatura de extração. O aumento da temperatura pode induzir a uma alta solubilização de compostos antioxidantes. O mesmo comportamento foi observado por Mazzutti (2016) para extratos de *P. major* e *P. lanceolata* onde a atividade antioxidante em altas temperaturas foi maior do que a dos extratos obtidos em condições mais brandas.

A técnica de extração sequencial mostrou-se promissora, produzindo um extrato na segunda etapa com forte potencial antioxidante, alcançando o segundo melhor valor de % AA, muito próxima do valor da extração em Soxhlet. Esse resultado pode estar associado ao fracionamento dos extratos e obtenção de diferentes compostos em cada condição de extração avaliada. Percebe-se que, para este método, a ESC parece estar agindo como um pré-tratamento na matriz. Devido ao fato do CO₂ ter afinidade com os compostos apolares, provavelmente proporcionou a captação dos mesmos na primeira etapa de extração, tornando a matriz mais apta para liberação dos compostos polares na ELP com etanol.

4.5.2 Potencial antioxidante pelo método do radical ABTS

A Tabela 10 apresentam os resultados do potencial antioxidante pelo método ABTS dos extratos obtidos através dos métodos à baixa e alta pressão. A técnica de Soxhlet com etanol e hexano apresentou o maior e menor resultado encontrado (803±11 e 62±3 μmol_{trolox}·g_{extrato}⁻¹, respectivamente) entre todas as técnicas estudadas.

Avaliando os solventes empregados nos processos de extração, os melhores resultados de TEAC encontrados estão relacionados ao etanol, evidenciando a polaridade intermediária dos solutos presentes na matriz do cogumelo *P. sajor-caju*. Na Tabela 10 nota-se que os valores obtidos

para ESC utilizando cossolvente aumentaram entre 1,44 e 1,73 vezes o valor de TEAC, para 5 e 10% de etanol, respectivamente, na comparação com a ESC utilizando somente CO₂.

Tabela 10 – Capacidade antioxidante determinada pelo método ABTS para os extratos de *P. sajor-caju*.

TÉCNICA DE EXTRAÇÃO	SOLVENTE	%INIBIÇÃO ⁽¹⁾	TEAC ($\mu\text{mol}_{\text{trolox}}\text{g}^{-1}\text{extrato}$) ⁽¹⁾
ESC 300 bar/40 °C	CO ₂	13,43 ^{sc} ± 0,3	120,1 ^c ± 5,3
ESC 300 bar/40 °C	CO ₂ + 5% etanol	22,60 ^{tb} ± 0,1	173,3 ^{tb} ± 2,1
ESC 300 bar/40 °C	CO ₂ + 10 % etanol	26,43 ^{efa} ± 0,6	208,2 ^{ba} ± 4,1
ELP 100 bar/40 °C DIN*	Etanol	38,48 ^{dbc} ± 0,2	313,4 ^{db} ± 1,3
ELP 100 bar/80 °C DIN	Etanol	56,13 ^{eb} ± 0,3	640,1 ^{db} ± 8,2
ELP 100 bar/40 °C EST**	Etanol	34,86 ^{dec} ± 0,5	287,5 ^{ef} ± 3,1
ELP 100 bar/80 °C EST	Etanol	48,70 ^{efo} ± 0,4	483,6 ^{ef} ± 2,4
ES 100 bar/80 °C EST***	Etanol	70,82 ^{ba} ± 5	699,5 ^{ca} ± 14,2
Soxhlet	Etanol	74,91 ^{ba} ± 3	803,5 ^{ba} ± 11,3
Soxhlet	Hexano	11,53 ^{gd} ± 0,6	62,3 ^{kd} ± 3,1
BHT ⁽²⁾	-	93,13 ^a ± 0,2	5238 ^a ± 236

*DIN = Dinâmico; **EST = Estático; ***ES = Extração sequencial utilizando a matriz residual da ESC 300 bar/40 °C para ELP 100 bar/80 °C. ⁽¹⁾Média (n=2); Letras iguais indicam que não há diferença significativa para o Teste de Tukey (p>0,05), onde: i) letras minúsculas indicam análise entre todos os métodos, ii) letras maiúsculas indicam análise entre as ESC, iii) símbolos gregos indicam análise entre as extrações ELP e iv) formas geométricas indicam análise entre extrações Soxhlet. ⁽²⁾Cruz (2016). Fonte: O autor (2018).

Quanto à técnica de ELP pode-se observar que os resultados para o modo dinâmico são superiores ($313,4 \pm 1,3$ e $640,1 \pm 8,2 \mu\text{mol}_{\text{trolox}} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ para 40 e 80°C, respectivamente) se comparados a capacidade antioxidante dos extratos obtidos no modo estático ($287,5 \pm 3,1$ e $483,6 \pm 2,4 \mu\text{mol}_{\text{trolox}} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ para 40 e 80°C, respectivamente).

Avaliando o potencial antioxidante dos extratos obtidos pelo método de ELP, cabe ressaltar que o mesmo apresentou aumento significativo com o incremento da temperatura de processo, na mesma condição de pressão, sugerindo que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante, detectáveis por este método, podem ter sofrido algum tipo de reação enzimática que possa ter levado à formação de novos compostos ou também aumentado a sinergia entre eles.

Mazzutti et al. (2017) detectou que a atividade antioxidante apresentada pelos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos em altas temperaturas foi maior do que a dos extratos obtidos em condições mais brandas, pelos métodos de extração com líquido pressurizado (PLE) e extração assistida por micro-ondas (MAE), utilizando água como solvente. Nesse estudo, o autor relata que o tratamento térmico pode induzir a formação de substâncias bioativas, sendo estes novos compostos derivados de reações que ocorrem durante o processo de extração, como reação de Maillard, caramelização e/ou termo oxidação.

Segundo Ahmad e Langrish (2012), esta possibilidade poderia aumentar ainda mais o interesse em processos conduzidos em temperaturas elevadas, tendo em vista que estas técnicas seriam capazes não só de extrair os antioxidantes presentes na amostra, mas também permitir a produção de novos compostos antioxidantes (MAZZUTTI et al., 2017).

Dentre as técnicas a alta pressão, o extrato de *P. sajour-caju* obtido por extração sequencial (ES) destacou-se quanto à atividade antioxidante ($699,5 \pm 14,2 \mu\text{mol}_{\text{trolox}} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$), porém, não comparável com o teor reportado por Cruz (2016) para o antioxidante padrão BHT ($5238 \pm 236 \mu\text{mol}_{\text{trolox}} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$).

A comparação com dados de literatura para os resultados de atividade antioxidante do cogumelo *P. sajour-caju* é dificultada pela escassez de estudos disponíveis e relacionados com as técnicas e as características da matéria-prima.

Tendo em vista os resultados obtidos e percebendo que os valores determinados para a atividade antioxidante dos extratos encontram-se abaixo do antioxidante padrão BHT, vê-se a possibilidade de aplicação de técnica complementar ao estudo, visando concentrar compostos e

aumentar a qualidade do extrato e possibilitando, assim, seu emprego como alternativa aos antioxidantes sintéticos. Segundo Andreo e Jorge (2006) estágios adicionais de purificação dos extratos podem ser necessários remover substâncias indesejáveis.

4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Atualmente há um crescente interesse em encontrar compostos antimicrobianos naturais como uma alternativa às substâncias sintéticas, que são frequentemente utilizadas na indústria de alimentos. A atividade antimicrobiana dos extratos de *P. sajor-caju* obtidos por diferentes técnicas de extração foi determinada pela técnica da microdiluição em meio líquido, descrita por Sarker et al. (2007) e Ud-Daula et al. (2016), frente a micro-organismos de diferentes configurações estruturais como a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, a Gram-negativa *Escherichia coli* e a levedura *Candida albicans*, visando avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos.

As leveduras do gênero *Cândida* podem ser normalmente encontradas nas mucosas da boca e dos tratos digestivo, genital e urinário de indivíduos sadios, podendo desencadear infecções em pessoas que apresentem condições que comprometam o sistema imunológico (LIMA et al., 2006). A candidíase caracteriza-se como a infecção fúngica mais comum, sendo *C. albicans* seu agente etiológico mais frequente (PEIXOTO et al, 2014). Considerando a frequente dificuldade no tratamento de infecções fúngicas, relacionada à aquisição de resistência das leveduras pertencentes ao gênero *Candida* frente à ação dos antifúngicos atualmente utilizados, pode-se inferir que a busca de novos compostos antifúngicos de origem natural mostra-se de relevante significância (ARAÚJO et al., 2004).

A Tabela 11 apresenta a concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de *P. sajor-caju* obtidos pelas diferentes técnicas de extração estudadas, contra os micro-organismos acima citados. De acordo com Sartoratto et al. (2004), Duarte et al. (2007) e Wang et al. (2008) é possível classificar os materiais como agentes antimicrobianos baseando-se no valor de CMI apresentado pelos seus extratos. Dessa forma, a classificação do extrato é comumente estabelecida como forte inibidor para CMI até 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; moderado inibidor para CMI entre 600 e 1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e fraco inibidor para CMI acima de 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ALIGIANNIS et al., 2001).

Tabela 11 – Valores da concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de *P. scijor-caju* para *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*, expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Técnica de extração	Solvente	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
ESC 300 bar/40 °C	CO ₂	28,1 ^{1c}	225 ^{dB}	56,2 ^{1c}
ESC 300 bar/40 °C	CO ₂ + 5% etanol	56,2 ^{EB}	900 ^{bA}	112,5 ^{dB}
ESC 300 bar/40 °C	CO ₂ + 10% etanol	112,5 ^{dA}	900 ^{bA}	225 ^{cA}
ELP 100 bar/40 °C DIN*	Etanol	450 ^{bB}	>2000 ^{aa}	>2000 ^{aa}
ELP 100 bar/80 °C DIN	Etanol	>2000 ^{aa}	>2000 ^{aa}	>2000 ^{aa}
ELP 100 bar/40 °C EST**	Etanol	450 ^{bB}	>2000 ^{aa}	>2000 ^{aa}
ELP 100 bar/80 °C EST	Etanol	>2000 ^{aa}	>2000 ^{aa}	>2000 ^{aa}
ES 100 bar/80 °C EST***	Etanol	>2000 ^{aa}	>2000 ^{aa}	>2000 ^{aa}
Soxhlet	Etanol	>2000 ^{aΔ}	>2000 ^{aΔ}	>2000 ^{aΔ}
Soxhlet	Hexano	225 ^{cB}	675 ^{cB}	450 ^{bB}
Antibiótico				
		9,2 ⁵	0,6 ^c	>74 ^c

*DIN = Dinâmico; **EST = Estático; ***ES = Extração sequencial utilizando a matriz residual da ESC 300 bar/40 °C para ELP 100 bar/80 °C. ⁽¹⁾Média (n=2); Letras iguais indicam que não há diferença significativa para o Teste de Tukey (p>0,05), onde: i) letras minúsculas indicam análise entre todos os métodos, ii) letras maiúsculas indicam análise entre as ESC, iii) símbolos gregos indicam análise entre as extrações ELP e iv) formas geométricas indicam análise entre extrações Soxhlet. Fonte: O autor (2018).

Os extratos de *P. sajor-caju* obtidos por ESC com CO₂ apresentaram uma atividade antimicrobiana maior para todos os micro-organismos avaliados. Para *S. aureus*, os extratos ESC com CO₂ e com cossolvente e a extração Soxhlet com hexano apresentaram os melhores resultados quanto à atividade antimicrobiana (CMI entre 28,1 e 225 µg.mL⁻¹), podendo ser classificados como fortes inibidores, de acordo com a classificação proposta por Aligiannis et al. (2001).

Os extratos obtidos por ELP a 40 °C também apresentaram resultados positivos, CMI de 450 µg.mL⁻¹, podendo ser classificados como fortes inibidores, segundo Aligiannis et al. (2001). Já os extratos obtidos a 80 °C não apresentaram atividade antimicrobiana. Possivelmente a alta temperatura empregada no processo pode ter favorecido a degradação térmica dos componentes responsáveis por essa ação biológica. A polaridade também afetou a extração desses compostos, pois pode-se perceber uma redução significativa na CMI com o emprego de maiores concentrações de etanol. O método de Soxhlet com etanol também não forneceu bons resultados para esse quesito, reforçando a suposição de interferência devido a questão da polaridade e temperatura.

Este resultado corrobora com os trabalhos que vêm sendo realizados no LATESEC, onde se tem observado que solventes mais polares apresentam maior capacidade de recuperação de compostos com atividade antioxidante, enquanto os menos polares recuperam compostos com atividade antimicrobiana. Estudos com diversas matérias-primas têm mostrado que a extração supercrítica possibilita a obtenção de extratos com maior atividade antimicrobiana do que técnicas tradicionais de extração que utilizam solventes polares (BENELLI et al., 2010; KITZBERGER et al., 2007; MAZZUTTI et al., 2012; MICHIELIN et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013).

Dentre os extratos testados para a bactéria Gram-negativa *E. coli*, aquele obtido por ESC com CO₂ a 300 bar e 40 °C apresentou valores de CMI (225 µg.mL⁻¹) que o classifica como forte inibidor, de acordo com Aligiannis et al. (2001). O extrato de Soxhlet com hexano apresentou CMI de 675 µg.mL⁻¹ que o classifica como moderado inibidor conforme a mesma classificação, assim como a CMI encontrada para os extratos obtidos por ESC com emprego de cossolvente a 5 e 10 %, ambos no valor de 900 µg.mL⁻¹. Os demais extratos não apresentaram atividade antibacteriana frente a este micro-organismo.

Os extratos de *P. sajor-caju* obtidos por ESC com e sem o emprego de cossolvente, por ELP a 40 °C em modo estático e dinâmico e através de Soxhlet com hexano apresentaram maiores atividades

antimicrobianas frente a bactéria *S. aureus* (Gram-positiva) em comparação a bactéria *E. coli* (Gram-negativa). A menor inibição das bactérias Gram-negativas pode estar relacionada com as diferenças estruturais que estas bactérias apresentam em relação às Gram-positivas, tornando-as menos sensíveis aos agentes antimicrobianos (KONEMAN et al., 1999). As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa em torno da parede celular, o que restringe a difusão dos compostos hidrofóbicos através do seu revestimento lipopolissacarídico. A parede celular de bactérias Gram-positivas, que não possui uma membrana exterior, pode ser permeada com mais facilidade pelos constituintes dos extratos (TIAN et al., 2009). No entanto, isto não significa que as bactérias Gram-positivas são sempre mais susceptíveis (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

A atividade antifúngica dos extratos de *P. sajor-caju* analisados frente à levedura *C. albicans* continuou destacando a ESC, com a obtenção de valores de CMI de $56 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $112,5$ e $225 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com CO_2 e com 5 e 10 % de etanol como cossolvente, respectivamente, o que os classifica como fortes inibidores, conforme elencamento proposto por Aligiannis et al. (2001). Contudo, a quantidade de etanol utilizada na análise influenciou no potencial antimicrobiano dos extratos, apresentando aumento nos valores de CMI e diferindo estatisticamente entre as técnicas estudadas, quanto maior a inserção desse solvente. Neste caso, os extratos por ELP não se mostraram eficazes na inibição microbiana. O método de Soxhlet com hexano proporcionou extratos com forte potencial inibidor ($450 \mu\text{g.mL}^{-1}$), segundo a classificação de Aligiannis et al. (2001). Os extratos obtidos ESC com CO_2 merecem destaque, pois além de apresentarem o menor valor de CMI, foram os únicos a ser classificados como forte inibidor, conforme a classificação de Aligiannis et al. (2001), para todos os micro-organismos estudados.

Os compostos que exercem essa atividade antimicrobiana ainda não estão completamente esclarecidos na literatura. Dessa forma, tornam-se necessários mais estudos para identificar os compostos com essa atividade e entender seu mecanismo de ação. Fortes e Novaes (2006), ao avaliar o potencial biológico de cogumelos comestíveis, constatou que a atividade antimicrobiana está associada a presença do ácido linoléico.

No estudo de Kitzberger et al. (2007), sobre a avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de cogumelo shiitake obtidos por solventes orgânicos e ESC, os autores verificaram que os extratos obtidos no processo de ESC com CO_2 puro e com a adição de cossolventes não apresentaram nenhuma inibição para *S. aureus* e *E.*

coli, constatando que os mesmos foram mais efetivos contra *Micrococcus luteus* (500-1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e *B. cereus* (250-500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), ambas bactérias Gram-positivas. Os autores também observaram que o extrato obtido a 150 bar e 30 °C foi efetivo na atividade antifúngica contra *C. albicans*, sendo classificado como moderado inibidor. Já quanto aos extratos obtidos a baixa pressão, os autores perceberam que estes não apresentaram atividade antimicrobiana.

Mazzutti et al (2012), ao avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de cogumelo do sol (*Agaricus brasiliensis*) obtidos por diferentes técnicas de extração a alta e baixa pressão, verificaram que as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis ao extrato de cogumelo do que as bactérias Gram-negativas, estando em acordo com o presente trabalho. No entanto, em termo de valores, os CMI determinados para os extratos de *P. sajor-caju* e classificados como forte inibidores são bem inferiores àqueles encontrados pelos referidos autores. Na mesma condição de temperatura e pressão da ESC estudada nesse trabalho (300 bar e 40 °C), os autores encontraram fraca atividade do extrato (>2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) para todos os micro-organismos testados. Sendo assim, comparando os valores encontrados percebe-se que o CMI encontrado para *P. sajor-caju* neste estudo é menor em um teor aproximado de 9, 35 e 70 vezes, para *E. coli*, *C. albicans* e *S. aureus*, respectivamente, ressaltando a qualidade e potencial antimicrobiano do extrato de *P. sajor-caju* obtido por ESC com CO₂. O menor CMI dos extratos de cogumelo do sol avaliados foi 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. aureus* a partir de ESC a 100 bar e 60 °C.

As variações referentes aos valores de CMI de extratos naturais podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, à origem do fungo, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir da matéria-prima frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Assim, torna-se difícil encontrar uma padronização nos métodos para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNELL et al., 2004).

Segundo a literatura, utilizar uma técnica posterior de purificação dos extratos é uma alternativa viável para a concentração dos compostos de interesse. Nesse sentido, Contessa et al. (2016) verificaram, em estudo da atividade biológica do extrato aquoso do micélio de *P. sajor-caju* obtido por maceração (sob agitação por 1h a temperatura ambiente), que a fração não purificada não apresentou potencial inibitório, ao contrário da purificada através de cromatografia de permeação em gel que resultou em um potencial de inibição de 84 e 31

% frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. Souza et al. (2016) observou o mesmo comportamento para a qualidade antimicrobiana dos extratos de *Agaricus blazei* antes e após purificação, demonstrando a eficiência do processo de purificação, visto que a amostra bruta do extrato do cogumelo não apresentou inibição microbiana. Desta forma, esta pode ser uma opção de aprimoramento do extrato quando a técnica empregada não permite um alto potencial biológico inicial.

Isolar e encapsular os compostos de interesse também pode ser uma alternativa viável para posterior aplicação do extrato como bioingrediente alimentar, podendo representar uma estratégia inovadora para prevenir ou reduzir os efeitos negativos da deterioração microbiana dos alimentos, bem como para possibilitar o desenvolvimento de novos suplementos, o que torna o extrato de *P. sajor-caju* consideravelmente relevante para as indústrias alimentar e farmacêutica.

4.7 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

A Tabela 12 apresenta a lista dos compostos identificados nos diferentes extratos de *P. sajor-caju* obtidos pelas técnicas a alta e baixa pressão estudadas. A determinação da composição química desses extratos foi analisada em função dos resultados de rendimento e qualidade encontrados.

No total, foram identificados vinte e um compostos presentes nos diferentes extratos de cogumelo *P. sajor-caju* analisados. O principal componente identificado foi o ácido 9-12-octadecadienoico (ácido linoleico), estando presente na maioria dos extratos. O ômega 6, como também é conhecido, é considerado ácido graxo essencial, visto que, não pode ser produzido pelo organismo, sendo necessário sua ingestão através da dieta (TURATTI, 2000). Tem importância na preservação e desenvolvimento do sistema nervoso, capaz de reduzir os níveis do colesterol LDL e do colesterol total, bem como dos triglicérides (FAGUNDES, 2002). Este ácido graxo apresenta função de reduzir a pressão sanguínea, agregação plaquetária e estimular o sistema imunológico (GREGORIO; LEMOS; CALDAS, 2002).

O ácido linoleico é um ácido graxo insaturado, conhecido, também, por diminuir o risco de arterioesclerose, câncer e doenças alérgicas (SANHUEZA; NIETO; VALENZUELA, 2002). Além disso, o ácido linoleico apresenta uma forte atividade antimicrobiana, que se deve provavelmente, à capacidade destes compostos em romper as membranas das células bacterianas e causar a lise das células (LEE;

KIM; SHIN, 2002). A presença do ácido linoleico nos extratos de cogumelo de *P. sajor-caju* pode ser o principal responsável pela atividade antimicrobiana detectada. No entanto, a atividade biológica de um extrato não pode ser atribuída à ação de um único componente, já que os efeitos de sinergismo entre os componentes desempenham um papel importante (ALVAREZ-CASTELLANOS; BISHOP; PASCUAL-VILLALOBOS, 2001).

A atividade antimicrobiana deve estar associada também ao composto 2-ethylacridine, um alcaloide conhecido na literatura como potencial antimicrobiano frente a diferentes micro-organismos (GRUMEZESCU; HOLBAN, 2017). O ácido pentadecanoico é descrito na literatura como um composto com atividade antimicrobiana (DUKE; BECKSTROM-STERNBERG, 2015). Devido ao fato desses compostos terem sido verificados somente nos extratos de ESC, pode-se dizer que a sua presença pode estar associada e em direta concordância com o maior potencial antimicrobiano encontrado. Além disso, a forte atividade antimicrobiana pode ser produto do sinergismo entre os compostos. Os melhores resultados dos extratos obtidos a alta pressão na temperatura de 40 °C em relação aos extratos de Soxhlet podem estar associados a ausência de oxigênio e luz durante o processo de extração, o que garante a preservação dos compostos (PALMA et al., 1999).

Outro composto de interesse detectado em diferentes extratos foi a feniletilamina, alcaloide natural pertencente ao grupo das monoaminas e é o composto orgânico precursor de muitos outros compostos psicoativos e estimulantes. Funciona como um neurotransmissor no centro nervoso central. É utilizado como terapêutico para controle emocional (DADAKOVA; KALAC; PELIKANNOVA, 2009). O aumento da concentração desta no sistema nervoso central leva à liberação de noradrenalina e dopamina, responsáveis pela motivação e bom-humor. Este composto também pode ser encontrado em alimentos, como o chocolate e estudos reportam sua presença em cogumelos do gênero *Pleurotus* (REIS; CUSTÓDIO; GLÓRIA, 2015). Segundo Bouaziz et al. (2016), alcaloides são amplamente utilizados na medicina como antimicrobianos, antioxidantes, antissépticos e preventivos de câncer.

A fenilefrina, bem como a p-hidroxinorefedrina são descritas como substâncias com propriedades simpatomiméticas, que atuam principalmente causando a liberação de norepinefrina, neurotransmissor muito difundido no sistema nervoso central e autônomo. (MIRANDA et al., 2011; VIEIRA; MATTOS-JUNIOR, 2014). Farmacologicamente, são mais comumente utilizadas como vasoconstritoras nasais

(descongestionante) e inibidoras de apetite (CAPARROZ et al., 2016; DECS, 2018).

Outro composto de interesse detectado no extrato obtido por ELP a 40 °C em modo dinâmico foi a beta-alanina, aminoácido precursor da carnosina, esta que é um dipeptídeo intracelular citoplasmático encontrado em altas concentrações no músculo esquelético, responsável pela manutenção do equilíbrio ácido-base intracelular (HARRIS, TALLON, DUNNETT et al., 2006). Conforme a literatura, a carnosina parece agir como neuroprotetor tendo sido utilizada com sucesso na melhora da função neurológica de pacientes autistas (CHEZ, BUCHANAN, AIMONOVITCH et al., 2002). Outros relatos atribuem à carnosina função antioxidante (BOLDYREV, 1993). A síntese de carnosina é dependente da captação de aminoácidos (L-histidina e beta-alanina) pelas células musculares. De acordo com Artioli et al. (2009) e Sale et al. (2010) a suplementação de beta-alanina vem sendo estudada como uma nova estratégia nutricional para melhorar o desempenho esportivo de atletas, e tem demonstrado ser eficaz na melhora do rendimento, reduzindo a fadiga. A literatura indica que a ingestão de beta-alanina permite aumentar a resistência e força, bem como possibilita o desenvolvimento muscular (EVERAERT et al., 2013; HOFFMAN et al., 2008).

Kitzberger et al. (2007), avaliaram a composição de extratos de cogumelo shiitake obtidos por solventes orgânicos e extração supercrítica. Os autores verificaram que os extratos obtidos eram ricos em niacinamida, ergosterol e ácidos graxos linoleico e palmítico. No estudo de Mazzutti et al. (2012) para os extratos de cogumelo *A. brasiliensis* obtidos a alta e baixa pressão foram identificados vinte e sete compostos presentes nos diferentes extratos analisados. Os principais componentes identificados em termos de percentual de área relativa dos extratos foram o ácido n-hexadecanoico (ácido palmítico) e o ácido 9-12-octadecadienoico (ácido linoleico), independente da técnica de extração empregada, sendo que os extratos obtidos por extração supercrítica apresentaram uma composição mais rica em ácidos graxos, quando comparados aos extratos obtidos por Soxhlet. Nesse trabalho, os autores observaram que o composto majoritário do extrato obtido por ESC com CO₂, a 300 bar e 40 °C foi o ácido linoleico, seguido do ácido esteárico.

Pode-se verificar na Tabela 12 que poucos compostos com atividade antioxidante foram identificados. Acredita-se que atividade antioxidante dos extratos está provavelmente associada a esses compostos identificados e, também, à presença de compostos fenólicos e

flavonoides, os quais não foram identificados por essa análise de cromatografia gasosa. 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 flavonoides, o que limita o uso desta técnica na detecção destes compostos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003). Em virtude destes resultados, sugere-se que seja empregada técnica mais específica para a identificação de flavonoides como análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Os compostos identificados apresentam importantes atividades biológicas, o que pode sugerir a utilização dos extratos em variadas aplicações terapêuticas, considerando, é claro, o efeito sinérgico entre os compostos. Em virtude da inexistência de dados em literatura referentes a ESC e a ELP de cogumelo *P. sajor-caju* não foi possível comparar os compostos detectados neste trabalho com resultados de outros trabalhos.

Tabela 12 – Compostos identificados nos extratos de *P. sajor-caju* avaliados por CG-EM.

COMPOSTO	TR (min)	ÁREA (%)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1-etil-3-metilbenzeno	3,68										2,32
1,2,3-trimetilbenzeno	3,80										1,29
Mesitileno	4,25										4,69
1,2,4-trimetilbenzeno	4,82										2,29
Undecano	6,50										2,11
Ácido hexanoico	7,02										38,68
Isopropilbenzeno	7,82										2,51
tert-butilbenzeno	8,33										4,19
Benzenosulfonamida	22,68		41,60	26,44							
Ácido pentadecanoico	26,30	5,89									
Propanamida	26,30		4,04	9,84	13,34						
Fenilpropanolamina	29,43										43,24
Ácido linoleico	29,46	23,18	17,24	11,15	44,22	30,80					10,16

COMPOSTO	TR (min)	ÁREA (%)								
		Condição de extração								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
p-hidroxinorefedrina	29,98		4,21	16,87				24,30		
beta-alanina	45,01			25,14	42,43					
2-ethylacridine	45,02	70,94	32,92	10,56						
Fenilefrina	45,02					74,94	69,20			26,78
Feniletilamina	45,03					25,06		75,70	56,76	
Bactobolina	45,12									2,27
Norfenfluramina	45,21									1,57
Etilamina	45,89									1,13

5 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nesse trabalho mostram que os extratos de cogumelo *P. sajor-caju* obtidos por diferentes técnicas de extração se apresentaram como matérias-primas viáveis para a obtenção de compostos bioativos com atividade antioxidante e antimicrobiana.

A técnica que apresentou o maior rendimento para extração foi Soxhlet empregando etanol como solvente, seguido da ELP na temperatura de 80 °C e em modo dinâmico. Com base nos resultados encontrados para as ELP nos diferentes modos estudados e, tendo em vista a economia de solvente e energia proporcionados pela ELP estática pode-se considerar este modo de processo como o mais viável e vantajoso. O maior rendimento para a ESC de cogumelo *P. sajor-caju* com CO₂ foi verificado na condição de 300 bar e 40 °C. No entanto, a adição de cossolvente ao processo de extração supercrítica mostrou-se interessante, proporcionando um incremento no rendimento.

Os melhores resultados de teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram verificados no extrato obtido por Soxhlet com etanol, seguido da ES e ELP a 80 °C, em modo dinâmico e estático, respectivamente, seguindo o mesmo comportamento para ambas as análises. A adição de etanol ao processo de extração supercrítica promoveu um incremento do teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos de cogumelo *P. sajor-caju*, confirmando a afinidade dos compostos antioxidantes com os solventes polares.

Quanto à atividade antimicrobiana, os extratos supercríticos com e sem emprego de cossolvente, bem como aqueles obtidos por ELP a 40 °C em modo estático e dinâmico e Soxhlet com hexano apresentaram alto potencial inibidor, sendo maior para bactérias Gram-positivas, com destaque para a ESC com CO₂, a qual, além de apresentar o menor valor de CMI, foi a única a ter o extrato classificado como forte inibidor para todos os micro-organismos estudados. Para a *C. albicans*, apenas os extratos obtidos por ESC e Soxhlet com hexano apresentaram atividade antifúngica. A adição de etanol ao processo de extração promoveu redução na atividade antimicrobiana dos extratos de cogumelo *P. sajor-caju* analisados.

Foi possível observar os bons resultados da extração sequencial relacionados desde o rendimento de extração ao aumento significativo no potencial antioxidante do extrato em comparação àqueles obtidos a partir de técnicas de extração que utilizaram a matéria-prima bruta. Esses resultados indicam que a ES torna possível a obtenção de

diferentes frações de extratos, ricas em compostos distintos. Como observado neste estudo, a primeira fração apresentou ótimo potencial antimicrobiano, enquanto a segunda teve destaque quanto a ação antioxidante. O uso de técnicas sequenciais pode servir como uma estratégia para obter produtos com melhores atividades biológicas, valorizando a matéria-prima e agregando valor aos produtos obtidos. Os principais compostos identificados nos extratos obtidos por extração supercrítica foram o ácido linoleico, ácido pentadecanoico e 2-ethylacridine, ambos com potencial antimicrobiano citado pela literatura. Apesar dos baixos rendimentos observados na ESC, esta técnica torna-se bem interessante na obtenção de compostos de alto valor agregado, devido a seletividade do processo. Dessa forma, a busca por condições operacionais que favoreçam o rendimento das extrações ou a qualidade deste extrato é uma alternativa para este cenário.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Avaliação da composição dos extratos através de técnica cromatográfica líquida;
- b) Extrações convencionais e à alta pressão empregando água e mistura de solventes;
- c) ESC e ES em diferentes temperaturas;
- d) Avaliar a influência da vazão na ELP dinâmica;
- e) Empregar método de purificação nos extratos de *P. sajor-caju* e avaliar seu potencial antimicrobiano e antioxidante.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, J.; LANGRISH, T. A. G. Optimisation of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillard reaction. *Journal of Food Engineering*, v. 109, n. 1, p. 162–174, mar. 2012.
- AKINYELE, B.J.; ADETUYI, F.C. Effect of agrowastes, pH and temperature variation on the growth of *Volvariella volvacea*. *African Journal of Biotechnology*, v.4, n.12, p.1390-1395, 2005.
- AKPAJA, E. O.; ISIKHUEMHEN, O. S.; OKHUOYA, J. A. Ethnomycology and usage of edible and medicinal mushrooms among the Igbo people of Nigeria. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 5, p. 313-319, 2009.
- ALBANI, S. M. F.; Métodos alternativos de purificação do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-graduação Inter unidades em Biotecnologia, USP/Instituto Butantan/IPT. São Paulo, 2008.
- ALEXANDRE, S., M. A., SILVA, M. L. C.; EXPOSTI, D. T. D.; SELVEIRO, G. A.; HIRAÍWA, P. A.; Polissacarídeos da biomassa do basidiomiceto *Rhizoctonia solani*: extrato e purificação. Faculdade de Ciências e Tecnologia – Departamento de Física, Química e Biologia, Presidente Prudente, 2010.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 4168 -4170, 2001.
- ALVAREZ-CASTELLANOS, P. P.; BISHOP, C. D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Antifungal activity of the essential oils of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry*, v. 57, p. 99-102, 2001.
- ALVES, M. J.; FERREIRA, I. C. F. R.; DIAS, J.; TEIXEIRA, V.; MARTINS, A.; PINTADO, M. A review on antifungal activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(21), 2648–2659, 2013.

ANDRADE, K. S. Avaliação das técnicas de extração e do potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir de casca e de borra de café (*Coffea arabica* L.). Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

ANDRADE, K. S. Extração e microencapsulamento de extratos de interesse biológico provenientes de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) e de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* R.). Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

ANDRADE, K. S.; GONÇALVES, R. T.; MARASCHIN, M.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. *Talanta*, v. 88, p. 544-552, 2012.

ANDRADE, K. S.; PONCELET, D.; FERREIRA, S. R. S. Sustainable extraction and encapsulation of pink pepper oil. *Journal of Food Engineering* 204, 38-45, 2017.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *B.CEPPA, Curitiba* v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; DE REUCK, K. M. International thermodynamic tables of the fluid state: Carbon dioxide. Oxford: Pergamon Press, 1976.

ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Jornal Vascular Brasileiro*, v. 3, n. 2, p. 145- 154, 2004.

ANPC. Associação Nacional dos Produtores de Cogumelo. Agronegócio: o consumo e produção de cogumelos cresce no Brasil. Disponível em: < <https://www.anpccogumelos.org/single-post/2018/01/29/Agronego%C3%B3cio-Consumo-e-produ%C3%A7%C3%A3o-de-cogumelos-cresce-no-Brasil> > Acesso em: 30 jan 2018.

ANPC. Associação Nacional dos Produtores de Cogumelo. O setor de cogumelos. Disponível em:

<<http://www.anpc.org.br/index.php/informacoes/setor-de-cogumelos>>
Acesso em: 10 jun 2017.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 2005.

ARAÚJO, J. C. L. V.; LIMA, E. O.; CEBALLOS, B. S. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUZA, E. L.; SANTOS, F. L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. *Rev Patol Trop* 33: 55-64, 2004.

ARAÚJO, J. M. A. Química de Alimentos: Teoria e Prática. 4.ed. Belo Horizonte. Editora UFV - Universidade Federal de Viçosa, 415 p., 2004.

ARTIOLI, G. G.; GUALANO, B.; LANCHÁ-JUNIOR, A. H. Suplementação de β -alanina: uma nova estratégia nutricional para melhorar o desempenho esportivo. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte*, v. 8, n. 1, 2009.

BELITZ, H. D.; GROSCHE, W. Química de los alimentos. Zaragoza: Acribia, p. 645- 656, 1988.

BENELLI, P. Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. *Osbeck*) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010.

BENELLI, P.; RIEHL, C.A.S.; SMÂNIA, A. J.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. *Osbeck*) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2010.

BERNARDI, E.; PINTO, D. M.; COSTA, E. L. G.; NASCIMENTO, J. S. Entomofauna associada ao cultivo de *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer (Agaricales: acariacea) no município do Capão do Leão, RS, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 77, n.3, p. 465-469, 2010.

BISCAIA, D. Comparação entre tecnologia supercrítica e técnicas convencionais de extração para obtenção de extratos de própolis avaliados através de suas atividades biológicas. Florianópolis: UFSC,

2007. Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

BISCAIA, D.; FERREIRA, S. R. S. Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 51, n. 1, p. 17-23, 2009.

BISEN, P. et al. *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities. *Current Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 22, p. 2419-2430, 2010.

BITENCOURT, R. G.; QUEIROGA, C. L.; JUNIOR, I. M.; CABRAL, F. A. Fractionated extraction of saponins from Brazilian ginseng by sequential process using supercritical CO₂, ethanol and water. *The Journal of supercritical Fluids*, v. 92, p.272–281, 2014.

BOLDYREV, A. A. Does carnosine possess direct antioxidant activity? *Int J Biochem*, v.25, n.8, p.1101-1107, 1993.

BONATTI, M. Estudo do potencial nutricional de cogumelos do gênero *Pleurotus* cultivados em resíduos agrícolas. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

BRANDI, M. L. Flavonoids: biochemical effects and therapeutic applications. *Bone and Mineral*, v. 19, p. S3-S14, 1992.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Portaria nº 398 de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. *Diário Oficial da União, Poder Executivo*, 03 mai 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 272, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento técnico para produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis. *Diário Oficial da União, Poder Executivo*, 23 set 2005a.

BRUNNER, G. Gas extraction: in introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process. Darmstadt:Steinkopff, 1994.

CAMEL, V. Recent extraction techniques for solid matrices- supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls, *Analyst* 126 (7), p. 1182–1193, 2001.

CAMPOS, L. M. A. S.; MICHELIN, E. M. Z.; DANIELSKI, L.; FERREIRA, S. R. S. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 34, p. 163-170, 2005.

CAPARROZ, F. A.; GREGORIO, L. L.; BONGIOVANNI, G.; IZU, S. C., KOSUGI, E. M. Rhinitis and pregnancy: literature review. *Braz J Otorhinolaryngol.* 82(1), p. 105-111, 2016.

CARBONERO, E. R., RUTHES, A. C., FREITAS, C. S., UTRILLA, P., GÁLVEZ, J., DA SILVA, E. V., IACOMINI, M. Chemical and biological properties of a highly branched β -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydrate Polymers*, 90(2), 814–819, 2012.

CARBONERO, E. R.; SILVA, E. V.; KOMURA, D. L.; RUTHES, A. C.; GORIN, P. A. J.; LACOMINI, M.; Análise química da β -glucana (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) isolada do corpo de frutificação do cogumelo comestível *Pleurotus sajor-caju*. 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2003.

CARRASCO-GONZÁLEZ, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A. Nutritional composition and nutraceutical properties of the *Pleurotus* fruiting bodies: Potential use as food ingredient. *Journal of Food Composition and Analysis*, 58, 69–81, 2017.

CARVALHO, M. P. de Avaliação da atividade antimicrobiana dos basidiomicetos *Lentinula edodes*, *Lentinus crinitus*, *Amauriderma sp* e *Pycnoporus sanguineus*. 2007. 102p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

CARVALHO, W. A.; CARVAHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Specific Cyclooxygenase-2 Inhibitor Analgesics: Therapeutic Advances. *Rev Bras Anestesiol* 54: 3: 448 – 464, 2004.

CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of chromatography. A*, v. 1217, n. 16, p. 2383–9, 2010.

CASTRO-PUYANA, M., HERRERO, M., URRETA, I., MENDIOLA, J. A., CIFUENTES, A., IBÁÑEZ, E., & SUÁREZ-ALVAREZ, S. Optimization of clean extraction methods to isolate carotenoids from the microalga *Neochloris oleoabundans* and subsequent chemical characterization using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 405, n.13, p. 4607–16, 2013.

CHANG, S. T.; WASSER, S. P. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14(2), 95–134, 2012.

CHANG, S. *Training Manual on Mushroom Cultivation Technology*. Beijing, China: Asian And Pacific Center For Agricultural Engineering And Machinery (APCAEM), 2008.

CHEZ, M. G.; C. P. BUCHANAN; M. C. AIMONOVITCH; M. BECKER; K. SCHAEFER; C. BLACK; J. KOMEN. Double-blind, placebo-controlled study of L-carnosine supplementation in children with autistic spectrum disorders. *J Child Neurol*, v.17, n.11, p.833-837, 2002.

COGUBRAS. Empresa produtora de cogumelos em Curitiba- PR. Disponível em: < <http://cogubras.com.br/>> Acesso em: 11 out 2017.

CONTESSA, C. R.; SOUZA, N. B.; ALMEIDA, L. MANERA, A. P.; MORAES, C. C. Extração e purificação de antimicrobiano do cogumelo *Pleurotus sajor-caju*. *Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos - CSBEA*, v.2, n.1, 2016.

COZZOLINO, S. Nutracêuticos: o que significa? Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade. *Revista ABESO*, ed. 55, p. 5-6 , 2012.

CRUZ, P.N. da. Potencial antioxidante e antimicrobiano dos extratos obtidos da semente de butiá da praia (*Butia catarinensis*). Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. UFSC. Florianópolis, 2016.

DADAKOVA, E.; KALAC, P.; PELIKANOVA, T. P. Content of biogenic amines and polyamines in some species of European wild-growing edible mushrooms. *Eur. Food Res. Technol.*, v. 230, p. 163-171, 2009.

DE PAULI, P. A. Avaliação da composição química, compostos bioativos e atividade antioxidante em cogumelos comestíveis. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, UNESP, Araraquara, 2010.

DECS. Descritores em Ciências da Saúde. p-Hydroxynorephedrine. Disponível em: < http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/?IsisScript=../cgibin/decserver/decserver.xis&task=exact_term&previous_page=homepage&interface_language=p&search_langage=p&search_exp=p-hidroxinorefedrina> Biblioteca virtual. Acesso em: 20 jan 2018.

DEMIATE, M. I; SHIBATA, R. K. C. Cultivo e análise da composição química do cogumelo do sol (*Agaricus blazei* Murril). *Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 9, n. 2, p. 21-32, jun. 2003.

DIAS, E. S., SILVA, R., CHWN, R. F., KOSHIKUMO, E. M., DIAS, E. S., Cultivo do cogumelo *Pleorotus sajor-caju* em diferentes resíduos agroindustriais. 2003 *Ciênc. agrotec.*, Lavrs.V27, n6, p.1363-1369, nov./dez, 2003.

DIAS, E. S.; ABE, C.; SCHWAN, R. F. Truths and myths about the mushroom *Agaricus blazei*. *Scientia Agricola*, v. 61, n. 5, p. 545-549, 2004.

DUARTE, M. C. T., LEME, E. E., DELARMELINA, C., SOARES, A. A., FIGUEIRA, G. M., SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.111, p.197-201, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26(2), p. 446-52, 2006.

DUKE, J. A.; BECKSTROM-STERNBERG, S. M. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database. Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/chem-activities.pl>>. Acesso em: 15 dez. 2017.

DURÁN, R. M.; PADILLA, B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites*, Sevilla, v.44, n.2, p.101-106, 1993.

EGGERS, R.; JAEGER, P. Extraction Systems. In: (Ed.). *Extraction Optimization in Food Engineering*: CRC Press, 2003.

EL SOHAIMY, S. A. Functional foods and nutraceuticals – modern approach to food science. *World Applied Sciences Journal*, 20, 691-708, 2012.

EOL. Encyclopedia of Life. *Pleurotus sajor-caju*. Disponível em: <<http://eol.org/pages/11462933/overview>> Acesso em: 20 de janeiro de 2018.

EVERAERT, I.; STEGEN, S.; VANHEEL, B.; TAES, Y.; DERAIVE, W. Effect of beta-alanine and carnosine supplementation on muscle contractility in mice. *Med Sci Sports Exerc* 45, 43-51, 2013.

FAGUNDES, L. A. *Ômega-3 % ômega-6: o equilíbrio dos ácidos gordurosos essenciais na prevenção de doenças*. Porto Alegre: Fundação de Radioterapia do Rio Grande do Sul, 111p, 2002.

FAN, L. et al. Advances in mushroom research in the last decade. *Food Technology and Biotechnology*, v. 44, n. 3, p. 303-311, 2006.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical. Top production: Mushrooms and truffles. 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> Acesso em: 20 jun 2015.

FELINTO, A. S. Cultivo de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* spp em resíduos agroindustriais. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1999.

FENNELL, C. W. et al. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, n. 2-3, p. 205–217, 2004.

FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L.; ABREU, R. M. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16(12), 1543–1560, 2009.

FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. A. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum*L.) essential oil. *Journal of Food Engineering*, v. 54, p. 263-9, 2002.

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. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 14, p. 235-45, 1999.

FINIMUNDY, T. C. F.; BARROS, L. B.; CALHELA, R. C.; ALVES, M. J.; PRIETO, M. A.; ABREU, R. M.V.; DILLON, A. J. P.; HENRIQUES, J. A. P.; ROESCH-ELY, M.; FERREIRA, I. C. F. R. Multifunctions of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer: A highly nutritious food and a source for bioactive compounds. *Food Chemistry* 245, p. 150–158, 2018.

FINIMUNDY, T. C., G. GAMBATO, R. FONTANA, M. CAMASSOLA, M. SALVADOR, S. MOURA, J. HESS, J.A.P. HENRIQUES, A.J.P. DILLON, M. ROESCH-ELY. Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising in vitro antitumor activity. *Nutrition Research*, Volume 33, Issue 1, January 2013, Pages 76-84, 2013.

FORTES, R. C.; NOVAES, M. R. C. G. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos Agaricales e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 52, n. 4, p. 363-371, 2006.

FREITAS, L. S. Desenvolvimento de Procedimentos de Extração do Óleo de Semente de Uva e Caracterização Química dos Compostos Extraídos. Tese de Doutorado. Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS, 2007.

FUJITA, A. H.; FIGUEROA, M. O. R. Composição centesimal e teor de β -glucanas em cereais e derivados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n. 2, p. 116-120, 2003.

FUJIYAMA. Cogumelo comestível desidratado. Disponível em <<http://www.konbini.com.br/cogumelo-shitake-fatiado-desidratado-fujiyama-50g>>. Acesso em: 5 ago 2017.

FUKUDA, E. K.; VASCONSELOS, A. F. D.; MATIAS, A. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, M. L. C. da; Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 30, nº1, p. 117-134, jan. /mar. 2009.

GARMUS, T. T.; PAVIANI, L. C.; QUEIROGA, C. L.; MAGALHÃES, P. M.; CABRAL, F. A. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora L.*) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents, *The Journal of Supercritical Fluids*, v.86, p.4-14, 2014.

GÓMEZ, A. M.; OSSA, E. M. Quality of borage seed oil extracted by liquid and supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering Journal*, v. 88, p. 103-109, 2002.

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.

GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food. *Handbook of Food Bioengineering*, Academic Press an imprint of Elsevier, v. 4, 2017.

GUINDANI, C. Emprego da Tecnologia Supercrítica para a Valorização do Resíduo de Semente de Chia (*salvia hispanica*). Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

HARBORNE J. B. *Phytochemical methods*, London: Chapman and Hall, Ltd, 1973. p. 49-188.

HARRIS, R. C.; M. J. TALLON; M. DUNNETT; L. BOOBIS; J. COAKLEY; H. J. KIM; J. L. FALLOWFIELD; C. A. HILL; C. SALE; J. A. WISE. The absorption of orally supplied beta-alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. *Amino Acids*, v.30, n.3, p.279-289, 2006.

HELENO, S. A.; BARROS, L.; MARTINS, A.; MORALES, P., FERNANDEZ-RUIZ, V.; GLAMOCLIJIA, J. Nutritional value, bioactive compounds, antimicrobial activity and bioaccessibility studies with wild edible mushrooms. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 799–806, 2015.

HEO, J.-Y., KIM, S., KANG, J.-H. AND MOON, B. Determination of Lutein from Green Tea and Green Tea By-Products Using Accelerated Solvent Extraction and UPLC. *Journal of Food Science*, v.79, p.C816–C821, 2014.

HERRERO, M. et al. Supercritical fluid extraction extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 16, p. 2495-2511, 2010.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANÑES, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from diferente natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry*, v. 98, p. 136-148, 2006.

HOFFMAN, J.; RATAMESS, N.A.; ROSS, R.; KANG, J.; MAGRELLI, J.; NEESE, K.; FAIGENBAUM, A. D.; WISE, J. A. Beta-alanine and the hormonal response to exercise. *International Journal Sports Medicine*, 2008.

HOLLMAN, P. C. H. C.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.*, 37 (1): 937-42, 1999.

HU, M.; SKIBSTED, L. H. Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus (*Nelumbo nucifera*). *Food Chemistry*, v. 76, p. 327-333, 2002.

JEONG, S. M., KIM, S. Y., KIM, D. R., JO, S. C., NAM, K. C., AHN, D. U., & LEE, S. C. Effect of heat treatment on the antioxidant activity

of extracts from citrus peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3389–3393, 2004.

JU, Z.Y.; HOWARD, L.R. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of agricultural and food chemistry*. v, 51. p. 5207-5213, 2003.

KALIL, S. J. ; MORAES, C. C. ; SALA, L. ; BURKERT, C. A. V. . Bioproduct Extraction From Microbial Cells by Conventional and Nonconventional Techniques. In: Alexandru Mihai Grumezescu; Alina Maria Holban. (Org.). *Food Bioconversion*. 1ed.: Elsevier, cap. 5, v. 2, p. 179-206, 2017.

KANAGASABAPATHY, G.; KUPPUSAMY, U. R.; ABD MALEK, S. N.; ABDULLA, M. A.; CHUA, K.-H.; SABARATNAM, V. Glucan-rich polysaccharides from *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer prevents glucose intolerance, insulin resistance and inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12 261-261, 2012.

KASSING, M. et al. New Approach for Process Development of Plant-Based Extraction Processes. *Chemical Engineering & Technology*, v. 33, n. 3, p. 377-387, 2010.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 36, n. 7, p. 703-25, 2001.

KITZBERGER, C. S. G. Obtenção de extrato de cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) com CO₂ a alta pressão. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

KITZBERGER, C. S. G.; SMÂNIA, A. J.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*, v. 80, n. 2, p. 631-638, 2007.

KITZBERGER, C.S.G.; LOMANCO, R. H.; MICHIELIN, E. M. Z.; DANIELSKI, L.; CORREIA, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of shiitake oil: Curve modeling and extract composition. *Journal of Food Engineering* 90, 35–43, 2009.

KONEMAM, E. W. et al. *Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas Color*. 5. ed. Buenos Ayres: Panamericana. 1999.

KOSAR, M.; DORMAN, H. J. D.; HILTUNEN, R.. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chemistry*, v. 91, p. 525-533, 2005.

KUSZNIEREWICZ, B.; SMIECHOWSKA, A.; BARTOSZEK, A.; NAMIESNIK, J. The effect of heating and fermenting on antioxidant properties of white cabbage. *Food Chemistry* 108, 853–861, 2008.

KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control*, v. 12, p. 99-107, 2001a.

KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 2: the impact on current regulatory terminology. *Food Control*, v. 12, p. 109-117, 2001b.

LANÇAS, F. M. *Avanços Recentes e Tendências Futuras das Técnicas de Separação: uma visão pessoal*. Scientia Chromatographica. Universidade de São Paulo. Instituto de Química de São Carlos. SP. 2008.

LANÇAS, F. M.; PEREIRA, D. M.; *Energy Sources* 8, 74, 1999.

LASTA, H. F. B. *Potencial antioxidante dos extratos dos resíduos de beterraba vermelha (*beta vulgaris l.*) obtidos a alta e a baixa pressão*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2017.

LEE, J. Y.; KIM, Y. S.; SHIN, D. H. Antimicrobial Synergistic Effect of Linolenic Acid and Monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 50, n. 1, p. 2193–2199, 2002.

LEE, M.L.; MARKIDES, K.E., Analytical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction, Chromatography Conferences, Inc.: Provo, Utah, 1990.

LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, Barking, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

LI, S. Application of Supercritical Fluids in Traditional Chinese Medicines and Natural Products. In: MARTÍNEZ, J. L. Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds. CRC Press, cap 7, p. 215-242, 2008.

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.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Revista Brasileira de Farmacologia, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LONDON, C. Functional foods that boost the immune system. In: Smith, J.; Charter, E. Functional food product development. Series Editor: Fereidoon Shahidi. United Kingdom: Wiley-Blackwell. Cap 14, 2011.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Ultrasound: a powerful tool for leaching. Trends in Analytical Chemistry, v. 22(1), p. 41-7, 2003.

MADIGAN, M. T.; Microbiologia de Brock. Prentice hall, 2004.

MARTÍNEZ, J. Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO₂ supercrítico: desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos. Campinas: UNICAMP, 2005. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

MARTÍNEZ, J. L.; VANCE, S. W. Fundamentals of Supercritical Fluids Technology. In: MARTÍNEZ, J. L. Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds. CRC Press, cap 2, p. 25-49, 2008.

MASTROIANI. Valor do kg de cogumelos desidratados. Disponível em: <<http://loja.lavioletera.com.br/categorias/501/funghi>> Acesso em: 15 set 2017.

MAZZUTTI, S. FERREIRA, S. R. S.; RIEHL, C. A. S.; SMANIA JR, A.; SMANIA, F. A.; MARTÍNEZ, J. Supercritical fluid extraction of *Agaricus brasiliensis*: Antioxidant and antimicrobial activities. J. of Supercritical Fluids 70, 48–56, 2012.

MAZZUTTI, S. FERREIRA, S. R. S; HERRERO, M.; IBAÑEZ, E. Intensified aqueous-based processes to obtain bioactive extracts from *Plantago major* and *Plantago lanceolata*. J. of Supercritical Fluids 119, 64–71, 2017.

MAZZUTTI, S. Extração de compostos com importância biológica provenientes de *Plantago major* e *Plantago lanceolata* através de técnicas ambientalmente seguras. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2016.

MAZZUTTI, S. Obtenção de extrato de cogumelo do sol (*Agaricus brasiliensis*): atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica. Florianópolis, UFSC, 2012. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

MEIRELES, M. A. A. Extraction of Bioactive Compounds from Latin American Plants. In: J. Martinez (Org.). Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. Boca Raton: CRC Press – Taylor & Francis Group, p. 243-274, 2008.

MEIRELES, M. A. A. Supercritical extraction from solid: process design data (2001-2003). Current Opinion in Solid State and Materials Science, v. 7, p. 321-330, 2003.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; 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*, v.15, 127- 130, 2001.

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus pérsica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 51, p. 10-60, 2009.

MEZZOMO, N.; OLIVEIRA, D. A.; FERREIRA, S.R.S. Antioxidant potential of extracts from processing resifues from brasilian food industries. *Food and Nutrition Sciences*, v. 4, p. 211-218, 2013.

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. *J. of Supercritical Fluids*. v. 33, n.2, p.131-138, 2005.

MICHIELIN, E. M. Z.; ROSSO, S.; FRANCESCHI, E.; BORGES, G. R.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V.; FERREIRA, S. R. S. High-178 pressure phase equilibrium data for systems with carbon dioxide, α -humulene and trans-caryophyllene. *J. Chem. Thermodynamics*. v. 41, p. 130-137, 2009.

MIGUEL, A.; ANDRADE, J. B.; Rapid quantification of ten polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosols by direct HPLC separation after ultrasonic acetonitrile extraction. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 35, p. 35-41, 1989.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, v. 85, p. 231-237, 2004.

MIRANDA, R. E. E. P.; MELLO, M. T.; ANTUNES, H. K. M. Physical Exercise, Mood and Well Being: Considerations of The Prescription of High Intensity Exercise. *Revista Psicologia e Saúde*, v. 3, n. 2, p. 46-54, 2011.

MIZUNO, T.; ZHUANG, C. Houbitake, *Pleurotus sajor-caju*: antitumor activity and utilization. *Food Review International*, New York, v. 11, n.1, p. 185-187, 1995.

MORA A.; PAYA M.; RIOS J. L.; ALCAZAR M. J. Structure-activity relationship of polymethoxyllavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxydation. *Biochemistry Pharmacology*, v.40, p.793-797, 1990.

MUKHOPADHYAY, M. *Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide*. Boca Raton: CRC Press, 2000.

MURGA, R.; SANZ, M. T.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J. L. Solubility of three hydroxycinnamic acids in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical fluids*, v. 27, p. 239-245, 2003.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta* 703, p. 8– 18, 2011.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, New York, n. 1/2, p. 95-111, 2004.

NCCLS. *Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição*; v. 23, nº. 2, 2003.

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

NGAI, P.H.K.; NG, T.B. A ribonuclease with antimicrobial, antimitogenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Peptides* 25, 11–17, 2004.

NOVAES, M. R. C. G.; FORTES, R. C. Efeitos antitumorais de cogumelos comestíveis da família agaricaceae. *Revista de Nutrição*, v. 4, n. 4, p. 207-217, 2005.

OLIVEIRA et al. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. *Journal of Biotechnology*, v. 164, p. 423–432, 2013.

ORLANDO, B. J.; MALKOWSKI, M. G. Substrate-selective inhibition of cyclooxygenase-2 by fenamic acid derivatives is dependent on peroxide tone. *Journal of Biological Chemistry*, 291(29), 15069-15081, 2016.

OYETAYO, V.O. Free radical scavenging and antimicrobial properties of extracts of wild. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 380-386, 2009.

PALMA, M. et al. Fractional Extraction of Compounds from Grape Seeds by Supercritical Fluid Extraction and Analysis for Antimicrobial and Agrochemical Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, n. 12, p. 5044–5048, dez. 1999.

PATRABANSH, S.; MADAN, M. Studied on cultivation, biological efficiency and chemical analysis of *Pleurotus sajor-caju* (FR.) Singer on different bio-wastes. *Acta Biotechnology*, v. 17, n. 2, p. 107-122, 1997.

PAULA, J. T.; PAVIANI, L. C.; FOGGIO, M. A.; SOUSA, I. M. O.; CABRAL, F. A. Extraction of antho-cyanins from *Arrabidaea chica* in fixed bed using CO₂ and CO₂/ethanol/watermixtures as solvents. *Journal of Supercritical Fluids*, v.81, p.33–41, 2013.

PAULA, J. T.; PAVIANI, L. C.; FOGGIO, M. A.; SOUSA, I. M. O.; DUARTE, G. H.; JORGE, M. P.; EBERLIN, M. N.; CABRAL, F. A. Extraction of anthocyanins and luteolin from *Arrabidaea chica* by sequential extraction in fixed bed using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents, *The Journal of Supercritical Fluids* v.86, p.100–107, 2014.

PEIXOTO, J. V.; ROCHA, M. G.; NASCIMENTO, R. T. L.; MOREIRA, V. V.; KASHIWABARA, T. G. B. Candidiasis – a literature review. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, v.8, n.2, p.75-82, 2014.

PEREDA, S.; BOTTINI, S. B.; BRIGNOLE, E. A. Fundamentals of Supercritical Fluids Technology. In: MARTÍNEZ, J. L. *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*. CRC Press, cap 1, p. 1-21, 2008.

PEREIRA, C.G. Extração de alcalóides de *Tabernaemontana*

catharinensis com dióxido de carbono supercrítico + etanol. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

PEREIRA, C.; MEIRELES, M. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, v. 3, n. 3, p. 340-372, 2010.

PEREIRA, R. G.; GARCIA, V. L.; RODRIGUES, M. V. N.; MARTÍNEZ, J. Extraction of lignans from *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn using pressurized liquids and low pressure methods. *Separation and Purification Technology* 158, 204–211, 2016.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZÍA, I.; JIMÉNEZ, D.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; BUXADERAS, S.; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, v. 97, p. 137-50, 2006.

PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; MAURI, P. Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, n. 11, p. 4487-4490, 1998.

PINELO, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. J. Mass transfer during continuous solid–liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering*, v. 77, p. 57-63, 2006.

POURMORTAZAVI, S. M.; HAJMIRSADEGUI, S. H. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J.Chromatogr.A*, v.1163, p. 2-24, 2007.

PRAMANIK, M.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. Structural investigation of a polysaccharide (Fr. II) isolated from the aqueous extract of na edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydr. Res.* 340, 629–636, 2005.

PRONYK, C.; MAZZA, G. Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts, *Journal of Food Engineering* 95 (2), 215–226, 2009.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; EVANS, C. R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26(9-10), p. 1231-1237, 1999.

REIS, F. S.; MARTINS, A.; VASCONCELOS, M. H.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C.F.R. Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. *Trends in Food Science & Technology* 66, p. 48-62, 2017.

REIS, G. C. L.; CUSTÓDIO, F. B.; GLÓRIA, M. B.A. Aminas biogênicas em cogumelos do gênero *Pleurotus*. *Caderno de Ciências Agrárias*, v. 7, n. 2, 2015.

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

REVERCHON, E.; MARCO, I. de. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 38, p. 146-66, 2006.

RICHTER, B.E.; JONES, B.A.; EZZELL, J.L.; PORTER, N.L.; AVDALOVIC, N.; POHL, C. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation, *Analytical Chemistry* 68 (6), p.1033–1039, 1996.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, v. 92, p. 235–254, 2005.

RYAN, L.; PRESCOTT, S. L. Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an *in vitro* digestion. *International Journal of Food Science & Technology*. Volume 45, Issue 6, p. 1191–1197, 2010.

SAITO, K.; SJÖDIN, A.; SANDAU, C.D.; DAVIS, M.D.; NAKAZAWA, H.; MATSUKI, Y.; PATTERSON, D.G. Development of an accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography analytical method for measuring persistent organohalogen compounds in adipose and organ tissue analysis, *Chemosphere* 57 (5), p. 373–381, 2004.

SALE, C.; SAUNDERS, B.; HARRIS, R. C. Effect of beta-alanine supplementation on muscle carnosine concentrations and exercise performance. *Amino Acids* 39, 321-33, 2010.

SANHUEZA, C. J.; NIETO, K. S.; VALENZUELA, B. A. Acido linoleico conjugado: un acido graso con isomeria trans potencialmente beneficioso. *Revista chilena de nutrición*, v. 29, n. 2, 2002.

SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A.; Optimization of bioactive compounds extraction from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins assisted by high pressure CO₂. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.12, p.398-406, 2011.

SANTOS, D.T.; VEGGI, P.C ; MEIRELES, M. A. A. . Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jaboticaba skins. *Journal of Food Engineering*, v. 108, p. 444-452, 2012.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42, 321-324, 2007.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 35, n.4, ISSN 1517- 8382, São Paulo out./dez, 2004.

SATITMANWIWAT, S.; RATANAKHANOKCHAI, K.; LAOHAKUNJIT, N.; CHAO, L. K.; CHEN, S. T.; PASON, P.; TACHAAPAIKOON, C.; KYU, K. L. Improved Purity and Immunostimulatory Activity of β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- Glucan from *Pleurotus sajor-caju* using cell wall-degrading enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, p. 5423-5430, 2012.

SEABRA, I. J.; BRAGA, M. E. M.; BATISTA, M. T.; SOUSA, H. C.; Effect of solvent (CO₂/ethanol/H₂O) on the fractionated enhanced solvent extraction of antho-cyanins from elderberry pomace, *The Journal of Supercritical Fluids* v. 54, p. 145-152, 2010.

SETIANTO, W.B., YOSHIKAWA, S., SMITH JR., R.L, INOMATA, H. FLORUSSED, L.J. PETERS, C.J. Pressure profile separation of phenolic liquid compounds from cashew (*Anacardium occidentale*) shell with supercritical carbon dioxide and aspects of its phase equilibria, *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 48 p. 203–210, 2009.

SILVA, D. C. M. N. Determinação experimental de parâmetros de processo na extração supercrítica de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* Less). Florianópolis: UFSC, 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª Ed. Porto Alegre, Florianópolis; Editora UFRGS, Editora UFSC, 2010.

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

SMIDERLE, F. R.; MORALES, D.; GIL-RAMÍREZ, A.; JESUS, L. I.; GILBERT-LÓPEZ, B.; IACOMINI, M.; SOLER-RIVAS, C. Evaluation of microwave-assisted and pressurized liquid extractionsto obtain β -d-glucans from mushrooms. *Carbohydrate Polymers* 156, 165–174, 2017.

SMITH JR, R. L.; MALALUAN, R. M.; SETIANTO, W. B.; INOMATA, H.; ARAI, K. Separation of cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid with supercritical carbon dioxide, *Bioresource Technology* v.88, p. 1–7, 2003.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Sequestering Ability of Butylated Hydroxytoluene, Propyl Gallate, Resveratrol, and Vitamins C and E against ABTS, DPPH, and Hydroxyl Free Radicals in Chemical and Biological Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 1077-1080, 2003.

SOARES, L. A. L. et al. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus Niruri*. (Quebra-pedra) empregando

planejamento fatorial. Cadernos de farmácia, v. 14, n. 1/2, p. 21–26, 1998.

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

SOUZA, N. B.; CONTESSA, C. R.; ALMEIDA, L.; MANERA, A. P.; MORAES, C. C. Determinação da atividade antimicrobiana do extrato purificado do cogumelo *Agaricus blazei* cultivado por fermentação em estado sólido. Revista CSBEA – v. 2, n. 1, 2016.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂-I. Modelling of extraction curves. Chemical Engineering Science, v. 49, n. 3, p. 409-414, 1994.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, v. 21, n. 9, p. 1199–1218, 2010.

TALANSIER, E. et al. Supercritical fluid extraction of vetiver roots: A study of SFE kinetics. The Journal of Supercritical Fluids, v. 47, n. 2, p. 200-208, 2008.

TAOFIQ, O.; HELENO, S. A.; CALHELHA, R. C.; ALVES, M. J.; BARROS, L.; BARREIRO, M. F. Development of mushroom-based cosmeceutical formulations with anti-inflammatory, anti-tyrosinase, antioxidant, and antibacterial properties. Molecules, 21(10), 1372, 2016.

TEPLYAKOVA, T. V.; KOSOGOVA, T. A. Antiviral effect of Agaricomycetes mushrooms (review). International Journal of Medicinal Mushrooms, 18(5), 375–386, 2016.

TIAN, F. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. Food Chemistry, v. 113, n. 1, p. 173–179, 2009.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 812, n. 1-2 SPEC. ISS., p. 85–99, 2004.

- TURATTI, J. M. Óleos vegetais como fonte de alimentos funcionais. *Óleos & Grãos*. no. 56, p. 20-27, 2000.
- TURNER, C.; KING, J.W.; MATHIASSEN, L. Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis, *Journal of Chromatography A* 936 (1–2), p. 215–237, 2001.
- UD-DAULAA, A.F.M. S.; DEMIRCI, F.; SALIMA, K. A.; DEMIRCI, B.; LIM, L. B. L.; BASER, K. H. C.; AHMADA, N. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from leaves, aerial stems, basal stems, and rhizomes of *Etlingera fimbriobracteata* (K.Schum.) R.M.Sm. *Industrial Crops and Products* 84, 189–198, 2016.
- 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.
- VALVERDE, M. E.; HEMÁNDEZ-PÉREZ, T.; PAREDES-LÓPEZ, O. Edible mushrooms: Improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*, 2015.
- 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.
- VIEIRA, A. C. P.; CORNÉLIO, A. R.; SALGADO, J. M. Alimentos funcionais: aspectos relevantes para o consumidor. *Jus Navigandi*, v. 10, n. 1123, 2006.
- VIEIRA, B. H. B.; MATTOS-JUNIOR, E. Vasoativos para terapia da hipotensão intraoperatória em cães e gatos. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.10, n.18; p. 3039, 2014.
- WANG, YUN-SONG.; HE, HONG-PIN; YANG, JING-HUA; DI, YING-TONG; HAO, XIAO-JIANG. New Monoterpenoid Coumarins from *Clausena anisum-olens*. *Molecules*. 13, 931-937, ISSN 1420-3049, 2008.

WASSER, S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, n. 3, p. 258-274, 2002.

WASSER, S. P. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomedical Journal*, 37, p. 345-356, 2014.

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

ZDRADEK, C. P. Otimização do crescimento dos fungos comestíveis *P. ostreatus* e *P. sajor caju* utilizando resíduos agroindustriais. 2001. 139p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2001.

ZEISEL, S.H. Regulation of nutraceuticals. *Science*, v. 285, p. 55-1853, 1999.

ZETZL, C.; LOZANO, G. A.; BRUNNER, G. Compilation of batch SFE-Models for natural products. In: Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (PROSCIBA). Foz do Iguaçu, Paraná, Caderno de Resumos do PROSCIBA, 2007.

ZHENG, W.; WANG, S. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 5165-70, 2001.

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

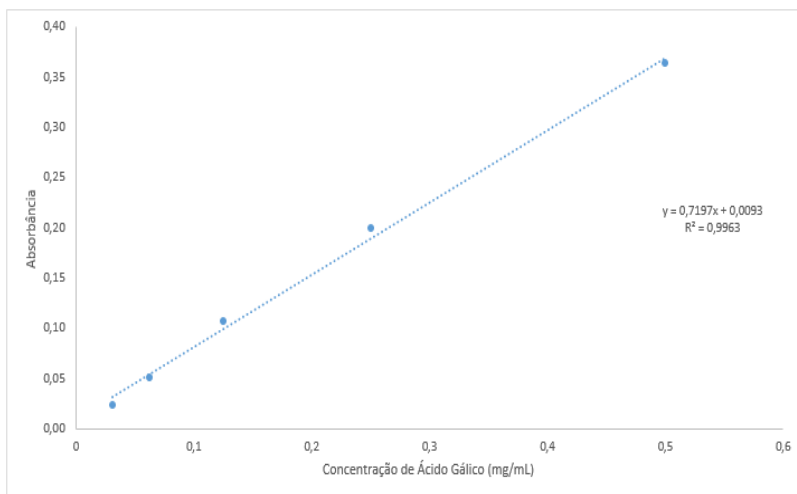
APÊNDICE A – Dados experimentais da curva de extração

Tabela 13 – Tempo de extração, massa de extrato, massa de extrato acumulada e rendimento (X_0) do experimento cinético a 200 bar, 40 °C e $12 \pm 2 \text{ g CO}_2 \cdot \text{min}^{-1}$.

Tempo (min)	Massa ext (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
5	0,0248	0,0248	0,1088
10	0,0077	0,0325	0,1426
15	0,0090	0,0415	0,1821
20	0,0087	0,0502	0,2203
25	0,0084	0,0586	0,2572
30	0,0122	0,0708	0,3107
40	0,0172	0,0880	0,3862
50	0,0083	0,0963	0,4226
60	0,0051	0,1014	0,4450
70	0,0044	0,1058	0,4643
80	0,0068	0,1126	0,4941
90	0,0016	0,1142	0,5011
100	0,0053	0,1195	0,5244
110	0,0047	0,1242	0,5450
120	0,0018	0,1260	0,5529
150	0,0057	0,1317	0,5779
180	0,0060	0,1377	0,6043
210	0,0060	0,1437	0,6306
240	0,0015	0,1452	0,6372
270	0,0020	0,1472	0,6460
300	0,0062	0,1534	0,6732
330	0,0031	0,1565	0,6868
360	0,0040	0,1605	0,7043
390	0,0050	0,1655	0,7263
420	0,0011	0,1666	0,7311

APÊNDICE B – Curva padrão de ácido gálico

Figura 13 – Curva padrão de ácido gálico utilizada no cálculo de TFT dos extratos de *P. sajor-caju*.



APÊNDICE C– Curva padrão de trolox

Figura 14 – Curva de calibração de Trolox, utilizada na determinação de atividade antioxidante pelo método ABTS

