

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

Simone Mazzutti

**OBTENÇÃO DE EXTRATO DE COGUMELO DO SOL
(*Agaricus brasiliensis*): ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA**

Florianópolis – SC

2012

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

Simone Mazzutti

**OBTENÇÃO DE EXTRATO DE COGUMELO DO SOL
(*Agaricus brasiliensis*): ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA**

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

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

Orientador: Prof. Dr. Julian Martínez

Co-orientadora: Prof. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira

Florianópolis – SC

2012

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Julian Martínez e Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira, por toda a contribuição para o meu crescimento profissional, pelas oportunidades concedidas, pela confiança e amizade.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), por oferecer toda a estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Módulo de Cogumelos da Universidade Estadual Paulista (UNESP) pela doação da matéria-prima.

Ao Dr. Carlos Alberto da Silva Riehl pela realização das análises de cromatografia.

Ao Dr. Artur Smania Jr pela realização das análises de atividade antimicrobiana.

À minha mãe e ao meu pai, pelo amor, pelo carinho, pela dedicação, pelo apoio total.

À minha irmã Ana e minhas amigas Taise e Fernanda, por cada momento de VIDA compartilhado.

Aos queridos amigos do LATESC, por toda a contribuição profissional desde que cheguei ao laboratório até à conclusão deste trabalho, e especialmente pela amizade diária.

A todos que de alguma forma contribuíram e torceram por mim e pelo sucesso deste trabalho, mesmo sem saber direito sobre o que se tratava.

“A partir de hoje, só o que for muito, muito leve, bonito e fácil.”

Gabito Nunes

RESUMO

O *Agaricus brasiliensis*, conhecido popularmente no Brasil como cogumelo do sol, é amplamente utilizado nos países orientais como um cogumelo comestível. Além disso, o cogumelo do sol tem sido extensivamente estudado devido a suas propriedades medicinais, havendo uma abundante literatura sobre o tema. O presente trabalho avaliou a composição química e atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos de *A. brasiliensis* obtidos por extração supercrítica (ESC) com CO₂ puro e com a adição de etanol como cossolvente. Para avaliar o método a alta pressão quanto a rendimento, composição e atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos, métodos a baixa pressão, como hidrodestilação, maceração etanólica e soxhlet com diferentes solventes foram aplicados. As condições testadas na ESC foram: 40 °C, 50 °C e 60 °C e pressões entre 10 MPa e 30 MPa. A cinética de extração e o emprego de cossolvente no processo de extração supercrítica também foram avaliados. Os extratos obtidos por soxhlet utilizando água (56,8 %) e etanol (36,7 %) como solventes apresentaram os maiores rendimentos, enquanto que o menor rendimento foi observado na hidrodestilação (0 %). A extração supercrítica de cogumelo do sol apresentou rendimentos inferiores àqueles alcançados nas extrações à baixa pressão, em soxhlet e maceração. O melhor rendimento no processo de extração supercrítica utilizando CO₂ puro foi na condição de 50 °C e 30 MPa (1,2 %). O emprego de 10 % de etanol como cossolvente no processo de extração supercrítica aumentou 3,8 vezes o rendimento de extração. O teor de compostos fenólicos totais foi avaliado pelo método de Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante pelo método DPPH, sendo verificado que os melhores resultados foram obtidos no extrato proveniente da maceração etanólica. A adição de cossolvente ao processo de extração supercrítica promoveu um incremento do teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos de cogumelo do sol. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela concentração mínima inibitória e pelo método de difusão em gel. Os extratos de cogumelos do sol obtidos por técnicas a baixa pressão como por extração supercrítica apresentaram atividade antibacteriana, sendo maior para bactérias Gram-positivas. Apenas os extratos de cogumelos do sol obtidos por ESC (20 MPa/50 °C e 20 MPa/60 °C) apresentaram uma fraca atividade antifúngica frente a espécie *Candida albicans*. A quantificação e a identificação da composição dos extratos foram realizadas por cromatografia. Os

principais compostos identificados nos extratos foram o ácido linoléico e ácido palmítico. Apesar dos baixos rendimentos observados na ESC, esta técnica torna-se bem interessante na obtenção de compostos de alto valor agregado, devido à seletividade do processo. A busca por condições operacionais que favoreçam positivamente o rendimento das extrações é uma alternativa a esta situação.

ABSTRACT

Agaricus brasiliensis, popularly known in Brazil as Sun mushroom, is widely used in oriental countries as an edible mushroom. Furthermore, Sun mushroom is a mushroom extensively studied for its medicinal properties for several years and literature abounds on the topic. The objective of this study was to obtain extracts from the mushroom *A. brasiliensis* using supercritical fluid extraction (SFE) with pure CO₂ and with CO₂ and co-solvent. In order to evaluate the high pressure method in terms of process yield, extract composition and biological activity, low pressure methods were also applied to obtain extracts, such as maceration with ethanol (Mac), Soxhlet (Sox) with different organic solvents, and hydrodistillation (HD). The SFE conditions were temperatures of 40 °C, 50 °C and 60 °C and pressures from 10 to 30 MPa. The SFE kinetic the overall extraction curve (OEC) was investigated. Soxhlet presented the highest yields when using water (56.8 %) and ethanol (36.7 %) as solvent. Hydrodistillation technique showed the lowest extraction yields (0 %). Supercritical extraction of Sun mushroom showed lower yields than the low pressure extraction in Soxhlet and maceration. The best conditions in the studied range to obtain high yields resulted to be 30.0 MPa and 50 °C (1.2 %). When 10 % of ethanol was added as co-solvent, the yield of extraction increased 3.8 times. Total phenol content was evaluated by the Folin-Ciocalteu and antioxidant activity by DPPH method, being verified the best results for the maceration extract. The use of ethanol as a co-solvent in the SFE improves antioxidant activity by DPPH assays and the total phenolic content. Antimicrobial activity was evaluated by minimum inhibitory concentration and gel diffusion assay. The antimicrobial activity presented by SFE and low pressure methods indicated great potential of the extracts as inhibitors of the microorganism growth, especially for Gram-positive bacteria. Only extracts of sun mushroom obtained by SFE (20 MPa/50 °C and 20 MPa/60 °C) showed a weak antifungal activity against *Candida albicans*. The identification and quantification of the composition of the extracts was performed by chromatography. The major compounds identified in extracts were linoleic acid and palmitic acid. Despite the low yields observed in the SFE, this technique is very interesting in obtaining the compounds of high aggregated value due to the selectivity of the process. The optimization of operating conditions that favor a positive yield of extraction is an alternative to this situation.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Atividades biológicas do <i>A. brasiliensis</i>	23
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cogumelo <i>A. brasiliensis</i>	21
Figura 2: Fluxograma simplificado do processo de ESC, o sistema contém controladores de temperatura e pressão que não são mostrados na figura	28
Figura 3: Representação da curva de ESC apresentando as 3 etapas da extração	30
Figura 4: Cogumelo <i>A. brasiliensis</i> desidratado (a) e amostra após a moagem (b)	32
Figura 5: Picnômetro acoplado ao cilindro de gás hélio	34
Figura 6: Diagrama da unidade de extração.....	38
Figura 7: Micrografia da amostra de cogumelo do sol moído com um aumento de 25 vezes.	47
Figura 8: Curva de extração com fluido supercrítico de cogumelo do sol a 20 MPa, 40 °C e 12 ± 2 g/min de CO ₂	49
Figura 9: Valores de rendimento global (X ₀) obtidos da partição líquido-líquido com diferentes solventes da maceração etanólica de cogumelo do sol.	52
Figura 10: Gráfico de Pareto para rendimento.....	54
Figura 11: Comportamento das isotermas de rendimento com a pressão de extração para a ESC do cogumelo do sol.	55
Figura 12: Rendimento global X ₀ para os extratos de cogumelo do sol utilizando etanol como cossolvente.	57
Figura 13: Teor de compostos fenólicos total (TFT), expressos em equivalentes de ácido clorogênico, para os extratos de cogumelo do sol utilizando etanol como cossolvente.	60
Figura 14: Avaliação do potencial antioxidante pelo método DPPH, expressos através do percentual de atividade antioxidante (% AA) para os extratos de cogumelo do sol utilizando etanol como cossolvente.	65
Figura 15: Curva de extração com fluido supercrítico de cogumelo do sol a 20 MPa, 40 °C e 12 ± 2 g/min de CO ₂	94
Figura 16: Curva de extração com fluido supercrítico de cogumelo do shiitake a 20 MPa, 40 °C e 3,33 g CO ₂ /min.	96

Figura 17: Curva padrão de ácido clorogênico utilizada no cálculo de TFT dos extratos de cogumelo do sol	97
Figura 18: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 10 MPa e 40 °C.	98
Figura 19: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 10 MPa e 50 °C.	100
Figura 20: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 10 MPa e 60 °C.	101
Figura 21: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa e 40 °C.	102
Figura 22: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa e 50 °C.	104
Figura 23: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa e 60 °C.	106
Figura 24: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 30 MPa e 40 °C.	108
Figura 25: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 30 MPa e 50 °C.	110
Figura 26: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 30 MPa e 60 °C.	112
Figura 27: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa, 50 °C e 2,5 % de etanol como cossolvente.	114
Figura 28: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa, 50 °C e 5 % de etanol como cossolvente.	115
Figura 29: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa, 50 °C e 10 % de etanol como cossolvente.	116
Figura 30: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por soxhlet utilizando hexano como solvente.	117
Figura 31: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por soxhlet utilizando diclorometano como solvente.	118
Figura 32: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por soxhlet utilizando acetato de etila como solvente.	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Índice de polaridade de solventes utilizados nos processos de extração em soxhlet	35
Tabela 2: Planejamento experimental fatorial completo 3^2 com a temperatura (T) e a pressão (P), variando em três níveis.	41
Tabela 3: Caracterização química do cogumelo <i>A.brasiliensis</i> desidratado.	46
Tabela 4: Caracterização do leite de partículas do cogumelo do sol....	47
Tabela 5: Parâmetros cinéticos da extração com fluido supercrítico do cogumelo do sol, realizada a 20 MPa, 40 °C e 12 ± 2 g/min de CO ₂	50
Tabela 6: Valores de rendimento global (X ₀) obtidos para as extrações a baixa pressão de cogumelo do sol com diferentes solventes.....	51
Tabela 7: Valores de rendimento global (X ₀) obtidos para as diferentes condições de temperatura e pressão para a ESC de cogumelo do sol com vazão de CO ₂ de 12 ± 2 g/min.	54
Tabela 8: Teor de compostos fenólicos total (TFT), expressos em equivalentes de ácido clorogênico para os extratos de cogumelo do sol	59
Tabela 9: Rendimento x Teor de compostos fenólicos total (TFT).....	62
Tabela 10: Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de cogumelo do sol através do método DPPH, expressos através do percentual de atividade antioxidante (% AA) e concentração efetiva a 50 % (EC ₅₀)	63
Tabela 11: Valores da concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de cogumelo do sol para <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	68
Tabela 12: Extratos de cogumelo do sol que apresentaram atividade antifúngica frente a diferentes espécies de <i>Candida</i> utilizando-se técnica de difusão em gel.	70
Tabela 13: Compostos identificados nos extratos de cogumelo do sol com os tempos de retenção (TR) e área relativa (%) detectados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).	74

Tabela 14: Tempo de extração, massa de extrato, massa de extrato acumulada e rendimento (X_0) do experimento cinético a 20 MPa, 40 °C e 12 ± 2 g CO ₂ /min.	93
Tabela 15: Tempo de extração e massa de extrato acumulada de extrato experimento cinético a 20 MPa, 40 °C e 3,33 g CO ₂ /min.	95
Tabela 16: Parâmetros cinéticos da extração com fluido supercrítico do cogumelo do shiitake a 20 MPa, 40 °C e 3,33 g CO ₂ /min.	96
Tabela 17: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 10 MPa e 40 °C.	99
Tabela 18: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 10 MPa e 50 °C.	100
Tabela 19: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 10 MPa e 60 °C.	101
Tabela 20: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa e 40 °C.	102
Tabela 21: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa e 50 °C.	104
Tabela 22: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa e 60 °C.	106
Tabela 23: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 30 MPa e 40 °C.	108
Tabela 24: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 30 MPa e 50 °C.	110
Tabela 25: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 30 MPa e 60 °C.	112
Tabela 26: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa, 50 °C e 2,5 % de etanol como cossolvente.	114

Tabela 27: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa, 50 °C e 5 % de etanol como cossolvente.	115
Tabela 28: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa, 50 °C e 10 % de etanol como cossolvente.	116
Tabela 29: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por soxhlet utilizando hexano como solvente.	117
Tabela 30: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por soxhlet utilizando diclorometano como solvente.....	118
Tabela 31: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por soxhlet utilizando acetato de etila como solvente.....	119

NOMENCLATURA

AA: atividade antioxidante

CER: período de taxa constante de extração;

CMI: concentração mínima inibitória;

CO₂: dióxido de carbono;

ρ_a : massa específica aparente;

ρ_r : massa específica real;

EAC: equivalente em ácido clorogênico;

EC₅₀: *Effective concentration*

ESC: Extração supercrítica;

FER: período de taxa decrescente de extração;

MEV: microscopia eletrônica de varredura;

M_{CER} : taxa de transferência de massa;

Q_{CO₂}: vazão de dióxido de carbono;

R_{CER} : rendimento do período CER;

TFT: teor de compostos fenólicos totais;

t_{CER} : duração do período CER;

t_{FER} : duração do período FER;

X₀: rendimento global;

Y_{CER} : razão mássica de soluto na saída do leito;

ϵ : porosidade total do leito de partículas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Objetivos	20
1.1.1 Objetivo geral	20
1.1.2 Objetivos específicos	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Cogumelo do sol (<i>Agaricus brasiliensis</i>).....	21
2.1.1 Principais substâncias bioativas do <i>A. brasiliensis</i>	23
2.2 Métodos de extração	24
2.2.1 Hidrodestilação	25
2.2.2 Soxhlet	25
2.2.3 Maceração.....	26
2.2.4 Extração supercrítica (ESC)	26
2.2.4.1 Procedimento de extração.....	27
2.2.4.2 Curvas globais de extração	29
2.2.4.3 Rendimento Global de Extração.....	30
2.2.4.4 Extração supercrítica de cogumelos	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 Matéria-prima	32
3.2 Caracterização do leito de partículas da extração supercrítica....	33
3.2.1 Determinação do diâmetro médio da partícula	33
3.2.2 Determinação da massa específica real.....	33
3.2.3 Determinação da massa específica aparente	34
3.2.4 Porosidade	34
3.3 Extração a baixa pressão	35
3.3.1 Extração soxhlet.....	35
3.3.2 Maceração seguida de partição líquido-líquido	36

3.3.3 Hidrodestilação.....	36
3.3.4 Eliminação do solvente.....	37
3.4 Extração supercrítica	37
3.4.1 Unidade de extração supercrítica.....	37
3.4.2 Procedimento experimental	38
3.4.3 Determinação da cinética de extração	39
3.4.4 Determinação do rendimento de extração	40
3.4.5 Emprego de cossolvente	41
3.5 Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	41
3.6 Determinação da atividade antioxidante.....	42
3.7 Determinação da atividade antibacteriana	43
3.8 Determinação da atividade antifúngica.....	44
3.9 Determinação da composição química dos extratos	45
3.10 Análise estatística	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1 Caracterização da amostra	46
4.2 Determinação da cinética de extração	48
4.3 Determinação do rendimento global de extrato (X_0).....	50
4.4 Emprego de cossolvente	56
4.5 Teor de compostos fenólicos totais (TFT).....	58
4.6 Atividade antioxidante.....	62
4.7 Atividade antibacteriana.....	66
4.8 Atividade antifúngica.....	69
4.9 Determinação da composição química dos extratos	70
5 CONCLUSÕES.....	77
5.1 Sugestões para trabalhos futuros.....	78
6 REFERÊNCIAS.....	79

7 APÊNDICES.....	91
Apêndice I - Dados experimentais da curva de extração	93
Apêndice II - Dados experimentais da curva de extração do cogumelo Shiitake (Kitzberger, 2005)	95
Apêndice III - Curva padrão de Ácido Clorogênico	97
Apêndice IV - Cromatogramas e compostos identificados dos extratos de Cogumelo do Sol	98

1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos são alimentos valiosos, com baixos teores energéticos e elevadas quantidades de minerais, aminoácidos essenciais, vitaminas e fibras. O *Agaricus brasiliensis* é um cogumelo nativo do Brasil e alcançou o topo no *ranking* dos melhores cogumelos medicinais e culinários. Este cogumelo é amplamente estudado nas áreas de ciência de alimentos, farmacologia, biotecnologia e medicina (LARGETEAU et al., 2011). Na área medicinal, vários estudos têm reportado que o *A. brasiliensis* apresenta atividade antibactericida (BERNARDSHAW; JOHNSON; HETLAND, 2005), antioxidante (SILVA et al., 2009), antidiabética (KIM et al., 2005), antiangiogênica (TAKAKU; KIMURA; OKUDA, 2001), anticâncer (MANTOVANI et al., 2008), entre outras.

O cogumelo medicinal *A. brasiliensis* é cultivado no Brasil em escala comercial desde o início dos anos de 1990 em regiões próximas à costa atlântica, de temperaturas moderadas a quentes e elevada umidade, dos meses de setembro a abril. As áreas de produção têm se expandido do estado de São Paulo, que se configura ainda como a região mais importante, para outros estados tais como Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Bahia e Ceará (MENDONÇA et al., 2005).

Este cogumelo medicinal recebeu diversos nomes populares. No Brasil é popularmente conhecido como cogumelo Piedade, cogumelo medicinal, cogumelo de Deus e cogumelo do sol. No Japão, seu corpo de frutificação é conhecido como *Himematsutake* ou *Kawariharatake* e na China como *Ji Song* (LARGETEAU et al., 2011).

Os extratos de vegetais e de cogumelos têm importante participação nas composições de produtos e suplementos alimentares, bem como em cosméticos e fármacos. Atualmente, os consumidores estão cada vez mais preocupados com a saúde e buscam produtos naturais de melhor qualidade e livres de traços de solventes orgânicos. Além disso, a legislação que regula os resíduos fica cada vez mais restritiva, pois acidentes envolvendo solventes tóxicos representam riscos para o meio ambiente e para a saúde humana. Este contexto tem criado demanda no setor produtivo por processos que possam minimizar o impacto ambiental, diminuindo ou eliminando totalmente a geração de resíduos tóxicos, tendo também direcionado o setor acadêmico a pesquisar processos alternativos que possam atender a essas novas demandas. O Brasil, como grande produtor de plantas e

cogumelos, precisa aproveitar efetivamente seu potencial e desenvolver e/ou adaptar tecnologias que sejam economicamente viáveis e ecologicamente corretas.

A tecnologia supercrítica, que utiliza solventes a alta pressão, é considerada um processo limpo, sendo que os extratos obtidos através desta técnica apresentam alta pureza. Esta tecnologia tem sido muito empregada na obtenção de extratos que podem ser utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Este processo apresenta vantagens distintas quando comparado com outras técnicas de separação: compostos termicamente instáveis podem ser separados a baixas temperaturas; o solvente pode ser removido facilmente do soluto por redução de pressão e/ou ajuste de temperatura; a necessidade de energia térmica é inferior à do processo de destilação; alta seletividade para os solutos; rápida extração devido à baixa viscosidade do solvente, alta difusividade e bom poder de solvatação do solvente (BRUNNER, 1994).

No que diz respeito a técnicas que envolvem o uso de fluidos supercríticos, o dióxido de carbono é quase impreterivelmente, a substância escolhida. O dióxido de carbono (CO_2) apresenta diversas vantagens que decorrem do fato de ser um solvente barato, não inflamável, sem risco de explosão e quimicamente inerte, produzindo um extrato vegetal com alta pureza. O maior obstáculo ao uso da extração supercrítica na indústria ainda é o alto custo fixo de investimento necessário para a instalação de uma planta de extração (PEREIRA; MEIRELES, 2010).

Para que seja possível a aplicação industrial dessa técnica de extração, é necessária a determinação da eficiência do processo, o que pode ser avaliado pela combinação de qualidade do produto, custo e rendimento. Para atender este objetivo, o presente trabalho se dedica a comparar o extrato obtido por técnicas convencionais de extração com o extrato obtido por tecnologia supercrítica. Além do fundamento tecnológico, é importante determinar a composição química dos extratos e a sua atividade biológica, como a atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é estudar o emprego do processo de extração supercrítica na obtenção de extratos de cogumelo do sol (*Agaricus brasiliensis*) e avaliar a composição química e atividade biológica destes extratos.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar as condições operacionais de temperatura e pressão para a ESC de cogumelo do sol;
- b) Comparar a extração supercrítica à extração convencional (extração por maceração seguida de partição líquido-líquido, soxhlet e hidrodestilação);
- c) Selecionar e avaliar a aplicação de cossolvente ao CO₂ no processo de ESC;
- d) Determinar a composição através de cromatografia gasosa com espectrometria de massas;
- e) Avaliar a qualidade e a funcionalidade dos extratos de cogumelo do sol através da análise da atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COGUMELO DO SOL (*Agaricus brasiliensis*)

O *A. brasiliensis* é um cogumelo originário do Brasil, mais especificamente da Floresta Atlântica localizada no sul de São Paulo (Figura 1). Este cogumelo foi descoberto em 1960 pelo agricultor e pesquisador Takatoshi Furumoto e enviado para o Japão em 1965, onde foram iniciados os estudos sobre seus prováveis efeitos medicinais (AMAZONAS; SIQUEIRA, 2003).

A classificação taxonômica deste cogumelo apresenta algumas divergências, não havendo unanimidade a respeito do nome oficial. Anteriormente, dois conceitos de *Agaricus blazei* existiam: *A. blazei* ss. Murrill, reportado em três localidades dos Estados Unidos e o *A. blazei* ss. Heinemann, reportado no Brasil e cultivado no Japão. Após vários estudos focados no esclarecimento de sua designação botânica foi determinado que o cogumelo *A. blazei* ss. Heinemann não tinha nada em comum com o *A. blazei* ss. Murrill, e então a nova espécie para a ciência foi descrita como *A. brasiliensis* (WASSER et al., 2002).

Figura 1: Cogumelo *A. brasiliensis*



O corpo de frutificação fresco do cogumelo consiste de 85 a 87 % de água. A composição química em base seca do cogumelo é de 40 a 45 % de proteínas, 38 a 45 % de carboidratos, 6 a 8 % de fibras, 5 a 7 % de cinzas e 3 a 4 % de lipídios. O cogumelo é rico em vitaminas como: tiamina, riboflavina, niacina, vitamina K, tocoferol, e minerais como: potássio, cálcio, fósforo, magnésio, zinco, ferro, selênio e cádmio. A composição química dos cogumelos pode sofrer pequenas alterações na qualidade e quantidade em função do local e condições de cultivo, estágio de maturação da colheita, processamento e armazenagem (MIZUNO, 2002).

Não existem estatísticas oficiais sobre a produção de cogumelos no Brasil. De acordo com dados estatísticos do Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio Exterior, em 2009, o volume de exportação de *A. brasiliensis* do Brasil para o Japão foi de 4 t. O valor está bem abaixo do praticado antes de 2006, quando a toxicidade apresentada por alguns produtos de cogumelo *Agaricus* ocasionaram uma redução estimada de 76 % das exportações para o Japão (SECOM, 2010). Ao mesmo tempo em que as exportações diminuíram, ocorreu uma melhoria no mercado nacional motivada pelo interesse da população brasileira com os benefícios desse cogumelo (MENDONÇA et al., 2005).

Os preços médios de importação, praticados atualmente no Japão, alcançam 10.000,00 Ienes/kg (US\$105,00) para aqueles provenientes da China e 17000 a 18000 Ienes/kg (US\$179,00 a US\$189,00) para os originários do Brasil. O preço, por quilograma, dos cogumelos no mercado local é de cerca de US\$270,00. Segundo os importadores japoneses de "*Agaricus*", o produto brasileiro é considerado de melhor qualidade e mais eficaz do que o produto chinês (SECOM, 2010).

O cogumelo do sol é principalmente comercializado na forma desidratada, sendo consumido, sobretudo, como um nutracêutico. Entre 2006 e 2007, a produção brasileira de cogumelos desidratados foi de 40 t (TOMIZAWA et al., 2007). De acordo com os padrões de mercado, estes cogumelos secos são classificados como grau Extra, A, B ou C, segundo critérios de cor, morfologia e tamanho (MENDONÇA et al., 2005). O *A. brasiliensis* também é comercializado na forma de cogumelos em pó, tabletes, cápsulas, extratos e chás. Atualmente, muitos *web sites* oferecem esses produtos, principalmente no Brasil, China e Japão (WASSER et al., 2002).

A indústria de cosméticos, que movimenta dezenas de bilhões de dólares por ano, também tem demonstrado interesse na incorporação de produtos naturais como os cogumelos em seus produtos. No mercado,

são comercializados diversos produtos do *A. brasiliensis*, como cremes, loções, sabonetes, xampus, condicionadores, entre outros. Esses produtos são indicados para os cuidados dos cabelos e cuidados com a pele, como cremes antienvelhecimento, cremes antioxidantes, cremes para a revitalização e clareamento da pele (HYDE; BAHKALI; MOSLEM, 2010).

2.1.1 Principais substâncias bioativas do *A. brasiliensis*

Os cogumelos são bastante empregados no uso terapêutico, devido às várias substâncias bioativas que contém e que estão sendo identificadas. O progresso nos estudos sobre o *A. brasiliensis* coincide com numerosas patentes sobre métodos de isolamento, técnicas de cultivo e suplementos dietéticos (WASSER et al., 2002). Dentre os potenciais usos terapêuticos do cogumelo do sol estão aqueles ligados às propriedades antitumorais, e também a outros benefícios como as propriedades antioxidantes, antivirais, imunomoduladoras, diminuição do colesterol e diabetes, entre outras, como pode ser observado no Quadro 1.

Quadro 1: Atividades biológicas do *A. brasiliensis*

Atividade Biológica	Referência
Atividade antitumoral	Kawagishi et al. (1987); Ohno et al. (2001)
Atividade antimutagênica	Menoli et al. (2001)
Atividade antigenotóxica	Martins de Oliveira et al. (2002)
Atividade do sistema imune	Kawamura e Kasai (2007); Yuminamochi et al. (2007)
Atividade antibacteriana	Bernardshaw; Johnson; Hetland, (2005)
Atividade antidiabética	Hsu et al. (2007)
Atividade antiviral	Sorimachi et al. (2001)
Atividade antioxidante	Silva et al. (2009)

As β -glucanas são um dos compostos ativos do cogumelo *A. brasiliensis* mais pesquisados. Os relatos científicos têm demonstrando que este polissacarídeo pode ser eficiente no tratamento de várias enfermidades, incluindo doenças alérgicas (ELLERTSEN; HETLAND,

2009), inflamações (KOMURA et al., 2010), diabetes (KIM et al., 2005), câncer (HETLAND et al., 2008), entre outras.

O cogumelo *A. brasiliensis* contém outros compostos que também apresentam atividade biológica como a lecitina que exerce propriedade antitumoral, antimutagênica e hemaglutinizante; o ergosterol que funciona como anticarcinogênico e inibidor da angiogênese; o ácido linoléico que atua como bactericida; os esteróides que atuam contra os tumores; a arginina que funciona como anticarcinogênica e a glutamina com efeitos antioxidantes, entre outros (LAKHANPA; RANA, 2005; FORTES; NOVAES, 2006; SORIMACHI; NAKAMOTO, 2011)

2.2 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, através 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 do produto natural asseguram que cada sistema material-solvente mostre comportamento pelicular, 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).

A extração com solvente orgânico ou água e extração líquido-líquido já são incorporados no processamento básico de alimentos, enquanto que a ESC é um método alternativo promissor para novas aplicações ou aplicações melhoradas na engenharia de alimentos. Cada uma destas técnicas apresenta vantagens e desvantagens. É importante lembrar que o método de extração a ser selecionado para o processamento dos produtos naturais deve levar em conta três fatores principais: (i) obtenção de produto diferenciado do existente no mercado (qualidade, atividade biológica, composição química, estabilidade, ausência de traço de solvente, etc.), (ii) custo de manufatura mais

vantajoso (maior rendimento, menor tempo, menor consumo de energia), e/ou (iii) redução no impacto ambiental.

2.2.1 Hidrodestilação

A hidrodestilação é a técnica de destilação mais antiga e consiste na imersão da matéria-prima em água e aquecimento até a ebulição. O método de hidrodestilação utiliza a água como agente de separação. Assim, esta técnica fornece produtos naturais livres de solventes orgânicos e que podem ser diretamente utilizados em outros processos, sem a necessidade de processos de separação adicionais. Os equipamentos necessários para a hidrodestilação são baratos, de fácil construção e com grandes capacidades, o que garante uma boa rentabilidade (CERPA et al., 2008).

Entre as principais desvantagens dessa técnica está a degradação térmica de algumas espécies, o que afeta a qualidade dos produtos, e a reação de hidrólise dos solutos. Além disso, como a matéria-prima deve ser aquecida até a temperatura de ebulição, o consumo energético é alto (CERPA et al., 2008).

2.2.2 Soxhlet

O extrator soxhlet foi desenvolvido em 1879 e esta técnica vem sendo considerada padrão por mais de um século. A extração com soxhlet convencional apresenta diversas vantagens. Nesse processo a amostra está sempre em contato com o solvente, havendo sua constante renovação. Além disso, não há necessidade de filtração ao término da extração, a metodologia é muito simples e não requer treinamento especializado e o equipamento apresenta baixo custo (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

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. A amostra geralmente é extraída no ponto de ebulição do solvente durante longos períodos, o que pode resultar na decomposição térmica das espécies termolábeis. Além disso, há a necessidade de eliminação do solvente, que pode ser incompleta, e o método apresenta baixa seletividade (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

2.2.3 Maceração

A maceração é uma das técnicas extrativas mais usuais devido à simplicidade e custos reduzidos. O processo de maceração consiste em deixar a matéria-prima em contato com o solvente por um determinado tempo à temperatura ambiente para extrair os compostos de interesse.

As principais desvantagens da técnica de maceração são os longos períodos de extração, mesmo com agitação; a necessidade de eliminação do solvente, baixa eficiência e a presença de resíduos de solventes no extrato (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

2.2.4 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. Um fluido supercrítico é qualquer substância a uma temperatura e pressão acima de seu ponto crítico termodinâmico. 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 (CO₂) 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).

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 (propriedades críticas: 31,1^oC e 7,38 MPa). O CO₂ é barato, ecológico, seguro e apresenta alta difusividade combinada com força de solvente facilmente ajustável. Na temperatura e pressão ambiente o CO₂ 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 puro como solvente, geralmente são extraídas misturas que contenham substâncias apolares e moderadamente polares. O emprego de modificadores polares (cossolventes) altera a polaridade do fluido supercrítico e aumenta o seu poder de diluição no composto de interesse. Os 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.

2.2.4.1 Procedimento de extração

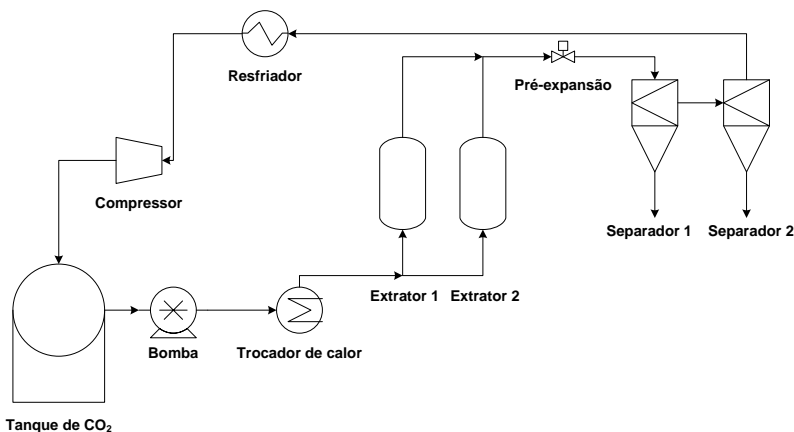
A extração supercrítica é um processo baseado no contato entre um leito fixo da amostra moída com um solvente em estado supercrítico, sendo um processo de separação física que remove um soluto ou mistura de solutos da fase sólida, e consiste em duas etapas principais: extração e separação do extrato do solvente. A Figura 2 ilustra um esquema simplificado do processo de ESC. O solvente pressurizado escoava continuamente através do leito de partículas. A matriz sólida 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 20 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 2: Fluxograma simplificado do processo de ESC, o sistema contém controladores de temperatura e pressão que não são mostrados na figura



Fonte: Pereira; Meireles, (2010)

2.2.4.2 Curvas globais de extração

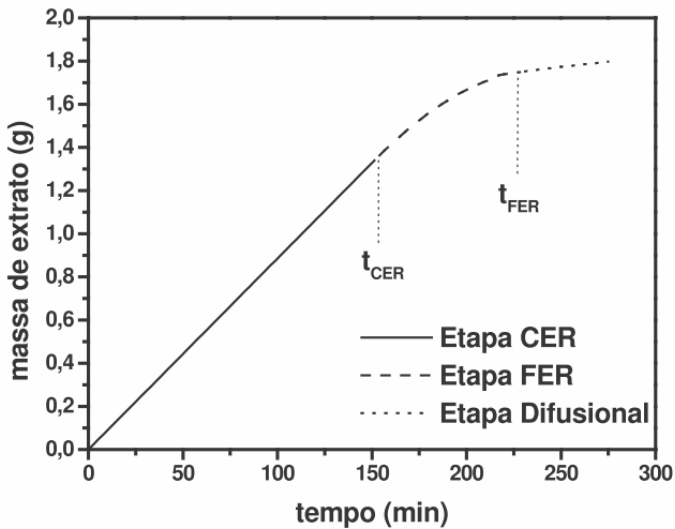
A representação da cinética da ESC é feita através da construção da curva de extração, que se caracteriza como um gráfico da massa acumulada de extrato em função do tempo de extração. Este gráfico fornece informações sobre o comportamento cinético da extração, possibilitando a determinação do tempo de 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 3 estão representados os períodos: (1) período de taxa constante de extração (CER); (2) período de taxa decrescente de extração (FER) e (3) período difusional (SOVOVÁ, 1994; TALANSIER et al., 2008; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; PEREIRA; MEIRELES, 2010).

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 quantia 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) e R_{CER} (rendimento do período CER).

No período FER, a taxa de transferência de massa decresce rapidamente como resultado da diminuição da área efetiva de transferência de massa 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.

Figura 3: Representação da curva de ESC apresentando as 3 etapas da extração



Fonte: Martínez, (2005)

2.2.4.3 Rendimento Global de Extração

O rendimento global é definido como a quantidade máxima de soluto que pode ser extraído do substrato sólido em determinadas condições de temperatura e pressão. Em outras palavras, é o rendimento obtido em um processo exaustivo. A construção de isotermas do rendimento global permite analisar os efeitos da temperatura e da pressão sobre a extração. Esta análise pode ser feita em termos de rendimento global de extração como um todo ou do rendimento global de um composto específico. O rendimento global está estreitamente relacionado com a solubilidade do soluto (ou mistura de solutos) no fluido supercrítico (PEREIRA; MEIRELES, 2010).

2.2.4.4 Extração supercrítica de cogumelos

Abdullah, Young e Games (1994) estudaram a extração supercrítica de ácidos graxos e carboxílicos dos cogumelos *Agaricus siluicola* e *Agaricus bisporus*. A ESC forneceu resultados comparáveis com as técnicas clássicas de extração de ácidos graxos livres e ésteres,

mas com menos etapas de manipulação. Além disso, resultou na caracterização de ácidos não anteriormente relatados para essas fontes.

Coelho et al. (2005) estudaram a extração supercrítica de metabólitos secundários de corpos de frutificação jovens e do micélio de *A. blazei*. Os cogumelos foram submetidos a temperaturas entre 40 e 80 °C, pressões de até 60 MPa e vazão variando entre 2 e 9 g de CO₂/min. A melhor condição utilizando CO₂ puro foi obtida a 40 MPa, 70 °C e vazão de 5,7 g de CO₂/min, sendo que os principais componentes identificados no extrato foram ácido palmítico (49 %) e ácido oléico (34 %). O emprego de 5 a 10 % de etanol como cossolvente aumentou o rendimento da extração, uma vez que os metabólitos secundários estão mais presentes nas frações lipídicas.

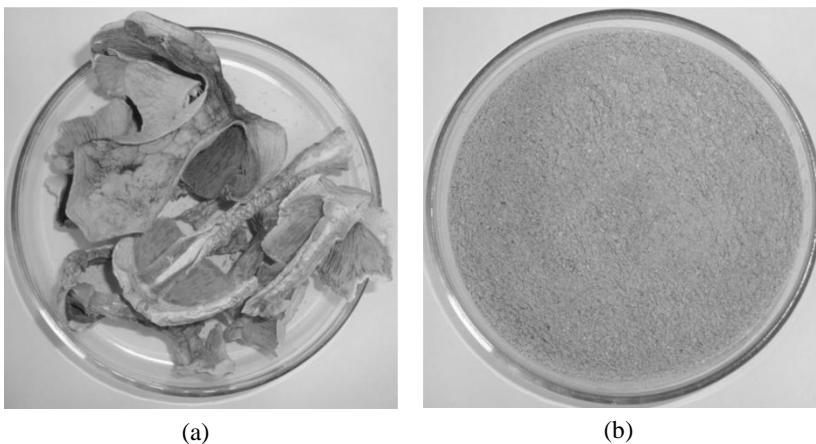
Kitzberger et al. (2007) avaliaram a atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*) obtidos por solventes orgânicos e tecnologia supercrítica empregando diferentes cossolventes (etanol, diclorometano e acetato de etila). Os resultados indicaram que a fração obtida por ESC utilizando CO₂ e 15 % de etanol apresentou atividade antioxidante similar a obtida pela técnica a baixa pressão com diclorometano. Além disso, apenas os extratos obtidos pela ESC apresentam atividade microbiana contra *Micrococcus luteus* e *Bacillus cereus*. De acordo com os autores, a atividade antioxidante do extrato de shiitake pode estar relacionada ao conteúdo de componentes fenólicos, especialmente pela presença de flavonóides.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA-PRIMA

A amostra de cogumelo do sol desidratado (*A. brasiliensis*) utilizada para as extrações foi fornecida pelo Módulo de Cogumelos da Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo – SP. Como pode ser observado na Figura 4, a matéria-prima era composta por cogumelos de diferentes estádios de maturação e foram utilizados tanto a estípite como o píleo. Os cogumelos foram moídos em moinho tipo Willey, empacotados em saco plástico identificado e armazenados em congelador doméstico a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 4: Cogumelo *A. brasiliensis* desidratado (a) e amostra após a moagem (b)



O teor de umidade e substâncias voláteis da amostra foi determinado de acordo com a metodologia proposta pela AOAC (2005). O método nº 925.09 se fundamenta na perda de umidade e substâncias voláteis em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$. O procedimento foi realizado em duplicata e os resultados expressos em porcentagem \pm desvio padrão.

O teor de proteína bruta da amostra foi determinado mediante quantificação do nitrogênio total, pelo método Kjeldahl, utilizando-se o

fator 6,25 para conversão do valor de nitrogênio em proteína, de acordo com a metodologia da AOAC (2005). O procedimento foi realizado em duplicata e os resultados expressos em porcentagem \pm desvio padrão.

O teor de cinzas da amostra foi determinado de acordo com a metodologia da AOAC (2005), por incineração em mufla a 550 °C até massa constante. O procedimento foi realizado em duplicata e os resultados expressos em porcentagem \pm desvio padrão.

A determinação de lipídios totais da amostra foi realizada em aparelho soxhlet utilizando hexano como solvente. O procedimento foi realizado em duplicata e os resultados expressos em porcentagem \pm desvio padrão.

O conteúdo de carboidratos e fibras na amostra foi determinado por diferença, sendo os resultados expressos em porcentagem.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

3.2.1 Determinação do diâmetro médio da partícula

O diâmetro médio de partícula do cogumelo do sol foi determinado através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise de MEV foi realizada em microscópio JEOL JSM- 6390LV, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), da Universidade Federal de Santa Catarina. O diâmetro médio de partícula foi calculado a partir das micrografias pelo emprego do software *Size Meter* versão 1.1 (Luis Henrique Castelan Carlson, LCP/EQA/UFSC, SC, Brasil).

3.2.2 Determinação da massa específica real

A massa específica real (ρ_r) foi determinada no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC), utilizando-se a técnica de picnometria em gás Hélio, que segue o princípio de Arquimedes de deslocamento de fluidos, com o uso do equipamento Accu Pyc II 1340 da Micrometrics (Figura 5). A utilização dessa técnica em geral apresenta bons resultados, uma vez que o gás hélio penetra nos poros da matriz vegetal devido a sua baixa tensão superficial sem alterar as características das partículas.

Figura 5: Picnômetro acoplado ao cilindro de gás hélio

3.2.3 Determinação da massa específica aparente

A massa específica aparente (ρ_a) foi determinada por meio da relação entre a massa de amostra utilizada nas extrações e o volume do leito.

3.2.4 Porosidade

Com os dados da massa específica real (ρ_r) e a massa específica aparente (ρ_a) é determinada a porosidade total do leito de partículas (ε) de acordo com a equação.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r}$$

3.3 EXTRAÇÃO A BAIXA PRESSÃO

Os processos de extração a baixa pressão do cogumelo do sol foram efetuados com o objetivo de comparar os resultados obtidos à extração supercrítica em termos de rendimento e atividade biológica. Além disso, a seleção do cossolvente empregado na extração supercrítica foi baseada nos resultados das extrações a baixa pressão.

3.3.1 Extração soxhlet

A extração soxhlet do cogumelo do sol foi realizada de acordo com o método 920.39C da AOAC (2005), utilizando os solventes orgânicos hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e água. A Tabela 1 apresenta os valores de polaridade dos solventes empregados.

Tabela 1: Índice de polaridade de solventes utilizados nos processos de extração em soxhlet.

Solvente	Índice de polaridade
Hexano	0,0
Diclorometano	3,1
Acetato de etila	4,4
Etanol	5,2
Água	9,0

Fonte: BYERS, (2007).

O sistema soxhlet consiste de um extrator que é acoplado na extremidade inferior a um balão e na extremidade superior a um condensador. 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, o que corresponde a uma proporção de amostra-solvente igual à 1:30.

No processo de extração o solvente é aquecido até sua temperatura de ebulição por uma manta. 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 mantidos em refrigerador doméstico a 2 °C até o processo de eliminação do solvente.

3.3.2 Maceração seguida de partição líquido-líquido

O método de maceração a frio e partição líquido-líquido foi realizado conforme o procedimento descrito por Mezzomo et al. (2010). A extração foi realizada com 50 g de amostra e 200 mL de etanol, por 7 d em temperatura ambiente e uma agitação manual diária. A mistura resultante foi filtrada e concentrada até 10 % do volume inicial em um rotaevaporador. Ao extrato bruto foram adicionados 20 mL de água e o etanol restante evaporado.

O processo de partição líquido-líquido empregado baseou-se na utilização de uma série de solventes com gradiente crescente de polaridade, como segue: hexano, diclorometano e acetato de etila. Para a partição, adicionaram-se 40 mL de hexano ao extrato aquoso e colocou-se a mistura em funil de separação, obtendo-se a fase orgânica e a fase aquosa. A fase orgânica foi adicionada de Na₂SO₄ para eliminar resíduos de água, em seguida filtrada e evaporada para eliminar o solvente. A fase aquosa foi colocada novamente no rotaevaporador para eliminar os resíduos do hexano. O mesmo procedimento foi realizado para os demais solventes e obtiveram-se as respectivas frações: fração hexano, fração diclorometano, fração acetato de etila e fração residual aquosa.

O extrato bruto de etanol foi obtido pelo mesmo processo de maceração, alterando-se apenas a quantidade de amostra utilizada, sendo mantida constante a proporção de amostra/solvente de 1:4. As extrações foram em duplicata e os extratos obtidos mantidos em refrigerador doméstico a 2 °C até o processo de eliminação do solvente.

3.3.3 Hidrodestilação

A hidrodestilação do cogumelo do sol foi realizada conforme o procedimento descrito por Mezzomo et al. (2010) em um aparelho tipo Clevenger. O procedimento consistiu na mistura de 50 g de amostra e 700 mL de água destilada em um balão. O sistema foi mantido em ebulição durante 6 h. No setor de recuperação do óleo foram adicionadas 2 mL de hexano para dissolver o óleo e facilitar a sua separação da água condensada. As extrações foram realizadas em duplicata e os extratos

brutos obtidos mantidos em refrigerador doméstico a 2 °C até o processo de eliminação do solvente.

3.3.4 Eliminação do solvente

Os extratos obtidos através de soxhlet, hidrodestilação e maceração foram evaporados em rotaevaporador, sob vácuo de 400 mmHg e rotação de 30 rpm. Os extratos foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados em congelador doméstico a -18 °C. Os resultados de rendimento foram expressos em base seca como média \pm desvio padrão.

3.4 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

Os experimentos de extração supercrítica foram realizados no LATESC, no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. O método dinâmico de extração supercrítica foi empregado nos experimentos cinéticos e na determinação do rendimento global de extração. O método dinâmico é caracterizado pela passagem contínua do solvente supercrítico pela matriz sólida.

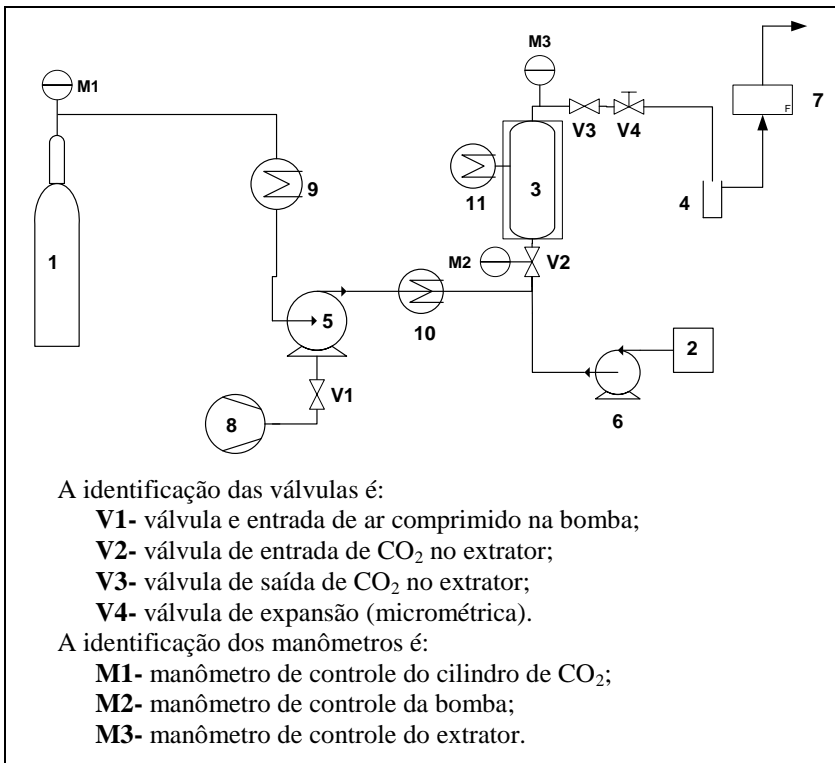
3.4.1 Unidade de extração supercrítica

O equipamento de ESC utilizado foi desenvolvido pelo Laboratório Thermische Verfahrenstechnik da Technische Universität Hamburg-Harburg (TUHH), na Alemanha e está representado na Figura 6. A unidade de extração opera até uma pressão máxima de 30 MPa e vazões de solvente de 1,67 g/min a 36,67 g/min.

O sistema da Figura 6 consiste em:

- 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.

Figura 6: Diagrama da unidade de extração



3.4.2 Procedimento experimental

Na unidade supercrítica representada na Figura 6, o cilindro de CO₂ com tubo pescador alimenta diretamente a linha de extração. A linha de solvente é imersa no banho termostático (9) programado para manter a temperatura inferior a 0 °C, garantindo assim que o CO₂ esteja no estado líquido antes de sua entrada na bomba (5). A bomba trabalha alimentada por uma linha de ar comprimido, filtrado e mantido na pressão adequada para cada condição de trabalho desejada.

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 32,9 cm de comprimento, 2,0 cm de diâmetro interno e volume de 100 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 depressurização da mistura soluto/solvente. A temperatura de operação do extrator é mantida constante através de um banho termostático de aquecimento (11).

No início do processo de extração as válvulas V2, V3 e V4 são mantidas fechadas. O cilindro (1) é aberto e aguarda-se a equalização dos manômetros 1 e 2. A válvula V2 da linha de CO₂ é aberta e mantida assim até a equalização do manômetro 3 com 1 e 2 e após, fechada novamente. A bomba (5) é acionada, e a válvula 2 é aberta e fechada até a obtenção da pressão de trabalho desejada. A válvula V3 conectada na saída do extrator auxilia a V4 na depressurização do solvente e permite o controle do fluxo de solvente. Após passar pela V4, o soluto é conectado em frascos âmbar (4) e o fluxo de CO₂ é medido no rotâmetro (7).

3.4.3 Determinação da cinética de extração

A curva global de extração fornece informações sobre o comportamento cinético da extração, 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 15 g de matéria-prima, o que permitiu a formação de um leito de partículas com altura de pelo menos o dobro do diâmetro do extrator considerando-se que, com esta relação entre altura e diâmetro do leito, a dispersão axial pode ser desprezada. Após a pressurização, o CO₂ puro foi admitido no sistema a uma vazão de 12 ± 2 g/min.

Os ensaios foram realizados a uma pressão de 20 MPa e 40 °C baseados nos resultados obtidos por Kitzberger et al. (2009), os quais estudaram a extração supercrítica do cogumelo shiitake. Os frascos de coleta foram previamente medidos e a coleta do soluto extraído foi realizada em intervalos de tempo pré-determinados. Após 2 min da coleta, os frascos foram medidos e determinou-se a massa de extrato obtida em função do tempo.

A curva global de extração está representada na Figura 8. Os tempos de cada um dos períodos de extração foram calculados a partir 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} e Q_{CO_2} . Os valores experimentais de massa de extrato estão apresentados no Apêndice I.

3.4.4 Determinação do rendimento de extração

O rendimento é definido como a quantidade de soluto extraível presente na matriz sólida (cogumelo do sol) referente a uma dada temperatura e pressão de extração. A influência da pressão e da temperatura no rendimento global (X_0) da ESC foi avaliada por meio de um planejamento experimental com 3 níveis e 2 variáveis, totalizando 9 experimentos (Tabela 2). Nos experimentos, realizados em duplicata, a temperatura variou entre 40 e 60 °C e a pressão entre 10 e 30 MPa. O limite inferior de temperatura (40 °C) está um pouco acima da temperatura crítica do CO_2 (31,1 °C) e é normalmente utilizada na extração de materiais vegetais nos processos de ESC. O limite superior de temperatura (60 °C) é baixo o suficiente para evitar danos aos compostos sensíveis ao calor. O tempo de extração foi definido em 3,5 h por meio da observação da curva global de extração obtida com 20 MPa, 40 °C e vazão de solvente de 12 ± 2 g/min, descrita no item 3.3.3 (Figura 8).

Nos experimentos, a altura de leito foi mantida constante pela utilização de 15 g de matéria-prima. As extremidades da coluna foram revestidas com algodão para evitar a entrada de partículas sólidas na linha de extração e o espaço restante do leito foi preenchido com esferas de vidro.

A massa de extrato obtida nos frascos foi medida em balança analítica e armazenada em congelador doméstico a -18 °C até a realização dos ensaios de avaliação da atividade biológica. O valor de X_0 foi calculado através da razão entre a massa de extrato obtida e a massa de cogumelo do sol utilizada para formar o leito.

Tabela 2: Planejamento experimental fatorial completo 3^2 com a temperatura (T) e a pressão(P), variando em três níveis.

Experimento	Variáveis codificadas de T	Variáveis codificadas de P	Variáveis reais de T	Variáveis reais de P
1	-1	-1	40	100
2	-1	0	40	200
3	-1	+1	40	300
4	0	-1	50	100
5	0	0	50	200
6	0	+1	50	300
7	+1	-1	60	100
8	+1	0	60	200
9	+1	+1	60	300

3.4.5 Emprego de cossolvente

Com base nos resultados de rendimento das extrações em soxhlet, atividade biológica e dados da literatura, o álcool etílico em frações de 0; 2,5; 5,0 e 10,0 % (m/m) foi selecionado como cossolvente.

As condições de operação foram selecionadas com base nos dados de rendimento das extrações supercríticas e respeitando as restrições de trabalho da bomba de cossolvente. As extrações foram realizadas na condição de 20 MPa, 50 °C, vazão de CO₂ de 12 ± 2 g/min e tempo de 3,5 h.

3.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A determinação do teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos de cogumelo do sol foi realizada no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) através do método de Folin-Ciocalteau (ROSSI; SINGLETON, 1965; PESCHEL et al., 2006).

Para a construção de uma curva padrão de ácido clorogênico preparou-se uma solução estoque de 0,005 g/mL de ácido clorogênico

em água destilada. Em balões volumétricos de 100 mL, foram diluídas alíquotas da solução estoque para a obtenção de frações finais de 0, 50, 100, 150, 200, 250, 350 e 500 mg/L. A reação de oxidação foi realizada em balões volumétricos de 10 mL, sendo transferidos para estes 100 µL de cada uma das frações, 2 mL de água destilada e 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocalteu. Após 30 segundos e antes de 8 min após a adição do reativo, foi adicionado 1,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio a 20 % (m/v). Os balões foram completados com água destilada até a marca de 10 mL, agitados e deixados em repouso ao abrigo da luz e a temperatura ambiente por 2 h para que a reação ocorresse. A absorbância de cada uma das soluções foi medida a 765 nm em espectrofotômetro. Para o branco foi realizada a leitura apenas com água destilada. A curva padrão de ácido clorogênico foi representada através do gráfico de absorbância *versus* concentração de ácido clorogênico (mg/L) e está apresentada no Apêndice III.

Os extratos avaliados foram diluídos em álcool etílico absoluto P.A. na fração final de 1667 mg/L, e seguiu-se o mesmo procedimento de reação de oxidação descrito para a curva padrão de ácido clorogênico. Os valores de absorbância 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. Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados expressos em mg de EAC/g de extrato, como média ± desvio padrão.

$$TFT(mgEAC/g) = \left\{ \frac{EAC \cdot 1000}{D_{extrato}} \right\}$$

Onde:

EAC: equivalente em ácido clorogênico, obtido através da curva padrão (mg EAC/L);

D: diluição da amostra (mg extrato/L).

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação da atividade antioxidante presentes nos extratos de cogumelo do sol foi realizada no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) através do método DPPH.

A atividade antioxidante foi determinada em acordo com a metodologia descrita por Mensor et al. (2001). Nesse método, concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 125, 250 e 500 mg/mL) dos extratos obtidos de cogumelo do sol foram adicionadas a uma solução etanólica de DPPH 0,3 mmol/L. Após um período de tempo de 30 min, ao abrigo da luz e temperatura ambiente, efetuou-se a leitura em espectrofotômetro em 517 nm. 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.

$$A \% = 100 \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}}$$

A concentração das amostras necessárias para captar 50 % do radical livre DPPH (EC_{50} - *Effective concentration*) foi calculada por análise de regressão exponencial e linear. Os valores de atividade antioxidante calculados (EC_{50}) são referentes à maior concentração de extrato testado (500 mg/mL). Os resultados encontrados de concentração efetiva (EC_{50}) e atividade antioxidante (AA %) para os extratos analisados foram expressos como média \pm desvio padrão.

3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antimicrobiana foi avaliada através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI). As análises de determinação da concentração mínima inibitória foram realizadas no Laboratório de Antibióticos, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC.

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, conforme a metodologia descrita por Ávila et al. (2008). Os extratos testados (5 mg) foram dissolvidos em 250 μ L de DMSO a 25 %, previamente esterilizado em autoclave. Posteriormente, foram preparadas diluições seriadas desses, no mesmo solvente, e distribuídos 10 μ L em orifícios distintos de uma placa de microdiluição de 96 poços. Em cada orifício-teste ainda foi adicionado 85 μ L de caldo de Müeller-Hinton. Como controles de crescimento e esterilidade foram usados apenas as misturas do meio de cultura e DMSO sem a adição de extrato. Nos orifícios-teste e de controle de

crescimento foram adicionados 5 µL de inóculo bacteriano, o qual consistiu de uma suspensão contendo aproximadamente 10^7 UFC/mL de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Os experimentos foram desenvolvidos em duplicata e as placas foram incubadas por 24 h a 36 °C. A leitura dos experimentos foi realizada através de densidade óptica (DO), com uso de leitora de microplacas e nos casos em que a turvação e/ou a coloração do extrato interferiram na leitura da DO, foi utilizada uma solução reveladora de crescimento bacteriano (cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolium). A CMI foi considerada a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento bacteriano, sendo os resultados expressos em µg/mL.

3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A atividade antifúngica foi avaliada através do método de difusão em gel. As análises foram realizadas no Laboratório de Antibióticos, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC.

Os extratos de cogumelo do sol foram avaliados contra três espécies de *Candida*: *C. albicans* ATCC 14053, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258. O inóculo constou de uma suspensão de células ajustada para uma turvação correspondente ao tubo 0,5 da Escala de McFarland. O meio de cultura utilizado foi o Ágar de Müller-Hinton suplementado com 2 % de glicose. As suspensões de células foram semeadas na superfície do ágar com auxílio de *swab* estéril. Posteriormente, 50 µL de uma suspensão de cada extrato preparada a 20 mg/mL em DMSO a 10 %, foram aplicados diretamente em orifícios de 7 mm de diâmetro feitos no ágar (com auxílio de um furador de aço estéril). Os sistemas foram incubados por 48 h a 35 °C, em estufa de crescimento e em condições aeróbicas. Após a incubação, as placas foram observadas quanto à homogeneidade do crescimento fúngico e nos casos em que foi verificada inibição do crescimento, o diâmetro do halo foi medido em milímetros. Os testes foram realizados em duplicata (NCCLS, 2004).

3.9 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

A análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) dos extratos foi realizada no Departamento de Química Analítica, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

A análise foi realizada em cromatógrafo CG-EM (GC-Varian 3800, MS/MS-Varian 1200L, Varian, Inc., CA, USA) e coluna VF5-MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m, Varian, Inc., CA, USA). As amostras foram dissolvidas em diclorometano e injetadas a uma taxa de 1:10 para a análise seguindo a condição: temperatura inicial da coluna de 50 °C e temperatura final de 320 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, durante 20 min e hélio como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/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.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de rendimento global, teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram avaliados estatisticamente por análise unidirecional de variância (ANOVA), utilizando o software Statistica para Windows 7,0 (Statsoft Inc., EUA). A análise estatística foi realizada para detectar diferenças significativas entre os valores de rendimento em função da temperatura e pressão na ESC, e entre a porcentagem de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. As diferenças significativas ($p < 0,05$) foram analisadas pelo teste de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A caracterização do cogumelo *A. brasiliensis* desidratado está apresentado na Tabela 3. Menezes et al. (2008) estudaram a composição química e nutricional de diferentes cepas e de sua mistura de cogumelo do sol desidratado. Os autores verificaram teores de umidade entre 8,11 e 9,11 %, cinzas entre 4,34 e 7,82 %, proteínas entre 26,49 e 37,58 %, lipídios entre 1,52 e 2,74 % e carboidratos entre 36,32 e 49,06 %. Na caracterização da composição química de cogumelo do sol *in natura* realizada por Kurozawa et al (2011), os autores verificaram teores de umidade de 88,7 %, cinzas de 7,3 %, proteína de 30,4 %, lipídios de 4,1 %, fibras de 6,8 % e carboidrato de 51,5 %.

Tabela 3: Caracterização química do cogumelo *A. brasiliensis* desidratado.

Determinação	Valor médio (%)
Umidade	6,6 ± 0,2
Cinzas	6,39 ± 0,03
Proteínas	51,7 ± 0,2
Lipídios	1,9 ± 0,2
Fibras e carboidratos	33,35

As diferenças apresentadas entre os valores obtidos neste trabalho e os da literatura são compreensíveis, pois quando se trabalha com material perecível, a sua composição centesimal é função de diversos fatores, tais como: época do ano, região da qual o produto é oriundo, ambiente, natureza do substrato de cultivo, linhagem, estágio de maturação, dentre outros.

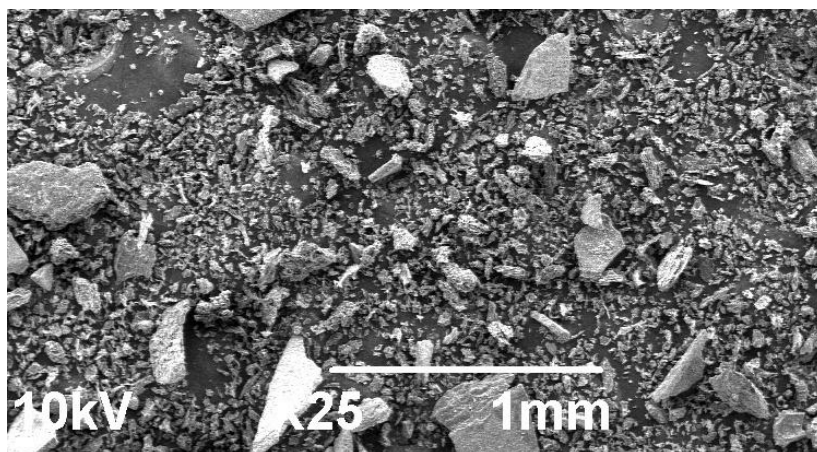
A Tabela 4 apresenta o diâmetro médio de partícula da amostra de cogumelo do sol, a massa específica real do sólido, a massa específica aparente e a porosidade do leito. A caracterização das partículas utilizadas na formação do leito da ESC é importante uma vez

que permite a aplicação de modelos de transferência de massa como o de Sovová (1994). A Figura 7 representa a micrografia da amostra de cogumelo do sol moído com um aumento de 25 vezes.

Tabela 4: Caracterização do leito de partículas do cogumelo do sol.

Diâmetro médio (mm)	Massa específica real (g/cm ³)	Massa específica aparente (g/cm ³)	Porosidade (ϵ)
0,316	0,73	0,23	0,68

Figura 7: Micrografia da amostra de cogumelo do sol moído com um aumento de 25 vezes.



Kitzberger et al. (2009) determinaram a massa específica real do cogumelo shiitake por picnometria com gás hélio e obtiveram um valor igual a 1,45 g/cm³. O diâmetro médio das partículas de shiitake verificada pelos autores foi de 0,214 mm. Os valores da massa específica real e a massa específica aparente calculados foram de 1,45 g/cm³ e 0,32 g/cm³, respectivamente.

4.2 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

A avaliação do comportamento cinético da extração permite a obtenção de parâmetros que levam às melhores condições operacionais para o processamento do cogumelo do sol. Nos experimentos cinéticos e experimentos de rendimento global subsequentes, utilizaram-se 15 g de amostra para a formação do leito. O volume ocupado pela massa de matéria-prima no extrator foi calculado através da altura preenchida pelas partículas sólidas dentro do leito, sendo igual a $63,8 \pm 0,8 \text{ cm}^3$. O restante do volume do leito foi preenchido com esferas de vidro separadas da matéria-prima pela adição de algodão, evitando sua mistura e mantendo constante a altura do leito durante a extração.

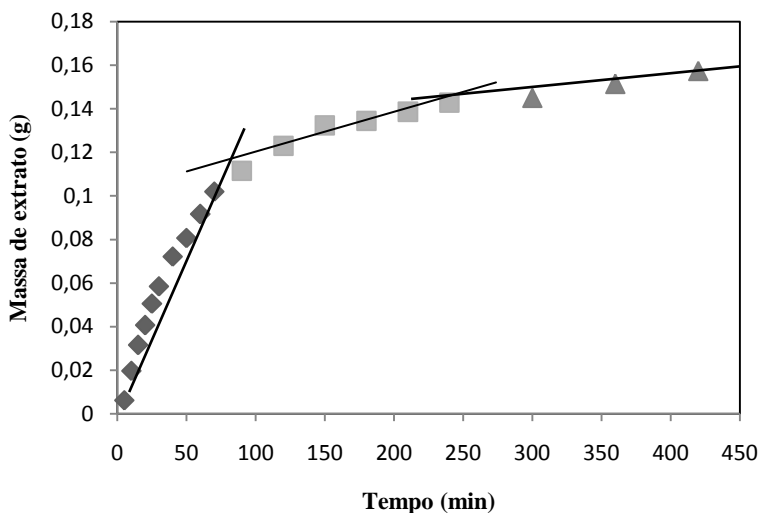
Para avaliar a influência das condições de temperatura e pressão empregadas na determinação do rendimento global de extração (X_0) com fluido supercrítico é necessário fixar um tempo de extração. Este tempo é definido com base nas etapas da curva de extração, a qual foi construída para a condição de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e 20 MPa e está representada na Figura 8. A vazão de solvente de $12 \pm 2 \text{ g/min}$ foi empregada para evitar que ocorresse acúmulo de extrato de cogumelo do sol nas tubulações do equipamento de extração supercrítica.

A curva de extração pode ser dividida em três etapas: etapa de taxa constante de extração (CER), etapa decrescente de extração (FER) e o processo difusional. Para a determinação de X_0 , o tempo de extração deve assegurar que a etapa de extração quase nula, conhecida como período difusional, seja alcançada (PEREIRA; MEIRELES, 2010). Pela análise do comportamento da curva (Figura 8), verifica-se que três períodos de extração podem ser distinguidos, sendo, portanto, o ajuste de três retas o mais adequado para a determinação dos parâmetros cinéticos da extração. Na Figura 8 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 retas é o t_{FER} , que em geral, representa a duração máxima que um ciclo SFE pode ter para manter a viabilidade econômica do processo (MEIRELES, 2008).

De acordo com a Figura 8, o período CER ocorre entre 0 e 80 min, o período FER está compreendido entre 80 e 240 min e a etapa controlada pela difusão inicia-se após 240 min. O tempo necessário para que a etapa difusiva seja alcançada é de aproximadamente 4 h. A partir disto, padronizou-se que um tempo de extração de 3,5 h, sendo este tempo fixado para todos os experimentos de determinação de X_0 devido

à extração da maior parte de soluto disponível. Este tempo e vazão de solvente implicam em um consumo de 2520 g de CO_2 por extração (m solvente /M= 168). O Apêndice I apresenta os dados experimentais de massa acumulada de extrato em função do tempo para a curva de extração com fluido supercrítico de cogumelo do sol a 20 MPa, 40 °C e 12 ± 2 g/min de CO_2 .

Figura 8: Curva de extração com fluido supercrítico de cogumelo do sol a 20 MPa, 40 °C e 12 ± 2 g/min de CO_2 .



A Tabela 5 apresenta os parâmetros cinéticos de cada um dos períodos que foram obtidos a partir da Figura 8. Estes parâmetros cinéticos t_{CER} (tempo de duração da etapa CER) e M_{CER} (taxa de extração da etapa CER) e Y_{CER} (concentração de soluto na fase solvente na etapa CER) foram determinados pela regressão linear dos dados obtidos na curva de extração (Figura 8) e estão apresentados no Apêndice I.

Tabela 5: Parâmetros cinéticos da extração com fluido supercrítico do cogumelo do sol, realizada a 20 MPa, 40 °C e 12 ± 2 g/min de CO₂.

Parâmetro	Período de extração		
	CER ⁽⁶⁾	FER ⁽⁷⁾	Difusional
t ⁽¹⁾ (min)	0 - 80	80 - 240	> 240
m ⁽²⁾ (g)	0,1048	0,0409	0,0187
X ₀ ⁽³⁾ (%)	0,67	0,26	0,11
M ⁽⁴⁾ (g/min)	0,0014	0,0002	0,0001
Y ⁽⁵⁾ (kg/kg)	1,1666 10 ⁻⁴	-	-

⁽¹⁾t: duração da etapa de extração; m⁽²⁾: massa de extrato aproximada; X₀⁽³⁾: rendimento da etapa; M⁽⁴⁾: taxa de extração; Y⁽⁵⁾: concentração de soluto na fase solvente; CER⁽²⁾ etapa de extração constante; FER⁽⁷⁾ etapa de extração decrescente.

Na etapa CER, cerca de 67 % do extrato foi recuperado, enquanto que ao final da etapa FER recuperou-se 90 % do extrato. Com o tempo definido de extração em 210 min, estimou-se que 87 % do extrato foi recuperado. O Apêndice II apresenta os parâmetros cinéticos e dados experimentais de massa acumulada de extrato em função do tempo para a curva de extração com fluido supercrítico de cogumelo shiitake a 20 MPa, 40 °C e 3,33 g/min de CO₂ obtidos por Kitzberger (2005). Para o cogumelo shiitake, recuperou-se cerca de 78 % do extrato na etapa CER, sendo que ao final da etapa FER, cerca de 94 % do extrato foi recuperado. O valor de Y_{CER} obtido no trabalho Kitzberger (2005) foi 4,4 vezes maior do que o obtido no presente estudo devido a menor vazão do solvente utilizada.

4.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRATO (X₀)

Os rendimentos dos extratos de cogumelo do sol obtidos por meio das técnicas de extração a baixa pressão, como soxhlet com diferentes solventes, maceração etanólica e hidrodestilação, estão apresentados na Tabela 6. Os resultados de rendimento apresentaram diferenças significativas entre si, variando entre 0,004 % para a hidrodestilação e 57 % para a extração de soxhlet com água.

Tabela 6: Valores de rendimento global (X_0) obtidos para as extrações a baixa pressão de cogumelo do sol com diferentes solventes.

Técnica	Solvente	Rendimento* (%)
Soxhlet	Hexano	1,9 ^c ± 0,1
Soxhlet	Diclorometano	2,21 ^c ± 0,01
Soxhlet	Acetato de etila	3,2 ^c ± 0,2
Soxhlet	Etanol	37 ^b ± 1
Soxhlet	Água	57 ^a ± 4
Maceração	Etanol	2,4 ^c ± 0,5
Hidrodestilação	Água	0,004 ^c ± 0

* Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

A extração com a técnica de soxhlet empregando os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e água resultou em diferentes valores de rendimento global. Os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila não diferiram significativamente entre si e apresentaram os menores rendimentos. O maior rendimento foi verificado pelo emprego do solvente água e em seguida pelo solvente etanol.

A solubilidade de diferentes compostos naturais varia de acordo com os solventes empregados, por exemplo, solutos polares são solúveis em solventes polares como metanol, etanol, água, etc.; e solutos apolares dissolvem-se em solventes apolares como hexano, benzeno, ciclohexano, tolueno, etc. A solubilidade dos compostos naturais geralmente aumenta com o aumento nos índices de polaridade (JADHAV et al., 2009). No presente trabalho, o extrato de cogumelo do sol apresentou rendimentos mais elevados com a utilização de solventes de maiores índices de polaridade, sugerindo que os compostos presentes na matriz apresentam polaridade de intermediária a alta.

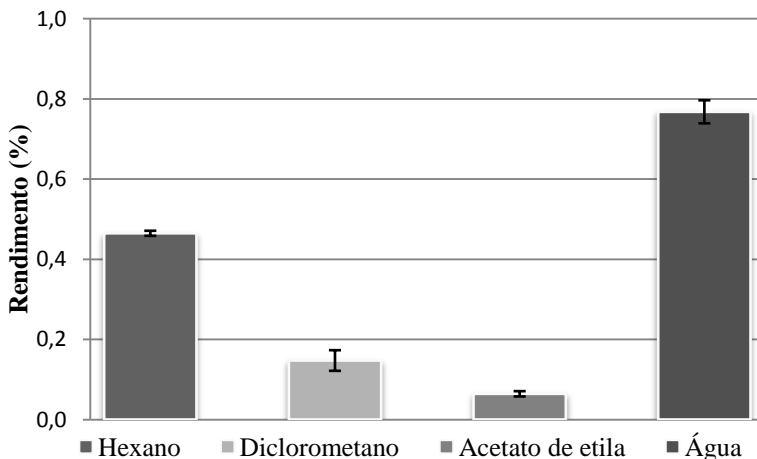
De acordo com Barwick (1997), a polaridade de um composto é definida em função da habilidade da molécula em participar de interações, de todos os tipos, com outras moléculas polares presentes no sistema. Na extração soxhlet o solvente é utilizado na temperatura de ebulição, e nesta condição, a tensão superficial e viscosidade do solvente são grandemente reduzidas quando comparadas com uma temperatura mais baixa, portanto o solvente pode alcançar os sítios ativos dentro da matriz com maior facilidade solubilizando os solutos (MARKOM et al.

2007). A temperatura de operação, o reciclo do solvente e as interações solvente-soluto são fatores que podem ter contribuído para o maior rendimento da técnica soxhlet em comparação a maceração e a hidrodestilação.

O rendimento do extrato obtido pela maceração etanólica foi significativamente igual ao obtido pelas técnicas de soxhlet com hexano, diclorometano e acetato de etila e pela hidrodestilação. Soares et al. (2009) verificaram um rendimento de 31,65 % para a extração com metanol de cogumelo do sol. Tsai, Tsai, e Mau (2007) utilizaram etanol e água quente para extrair compostos solúveis de cogumelo do sol e obtiveram rendimentos de 15,6 % e 47,3 %, respectivamente.

A Figura 9 representa o rendimento das frações obtidas na partição líquido-líquido do extrato de cogumelo do sol. Os valores dos rendimentos globais das frações variaram significativamente entre si. O maior rendimento foi verificado na fração água, seguido pela fração hexano. Kitzberger (2005) estudou a maceração etanólica a frio do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*) seguida da partição líquido-líquido com os mesmos solventes empregados no presente trabalho. O autor verificou maiores rendimentos para os solventes hexano (1,25 %) e água (0,94 %) e menores rendimentos para diclorometano e acetato de etila.

Figura 9: Valores de rendimento global (X0) obtidos da partição líquido-líquido com diferentes solventes da maceração etanólica de cogumelo do sol.



Os baixos rendimentos da maceração etanólica e das frações obtidas pela partição líquido-líquido se devem provavelmente ao uso de baixas temperaturas no processo. Dessa forma, a tensão superficial e viscosidade dos solventes permanecem relativamente altas, dificultando o acesso aos compostos solúveis da matriz e reduzindo o rendimento.

A técnica de hidrodestilação não foi eficiente na extração do cogumelo do sol, apresentando o menor rendimento (0,004 %). Na hidrodestilação a ebulição da água provoca formação de vapor que arrasta os compostos mais voláteis presentes na amostra, sendo o extrato caracterizado como óleo essencial. Nos demais processos de extração os solventes e as condições de processo empregadas permitem a obtenção de misturas mais complexas de compostos e desta forma, maiores rendimentos. O resultado indica que o cogumelo do sol não apresenta compostos voláteis.

O rendimento global da extração para o processo de ESC em leito fixo de partículas e método dinâmico de extração é definido como a quantidade de extrato presente na matriz sólida possível de ser extraído pelo solvente nas condições estabelecidas de temperatura e pressão para um tempo de processo pré-determinado (MARTÍNEZ et al., 2003). A Tabela 7 apresenta os resultados médios de rendimento global de extração (X_0) dos experimentos realizados por ESC com cogumelo do sol e as condições de temperatura e pressão utilizadas nos ensaios. Os dados correspondentes de massa específica (ρ) do CO_2 também estão apresentados na Tabela 7 (ANGUS; ARMSTRONG; DE REUCK, 1976).

O maior rendimento para a ESC de cogumelo do sol foi verificado na condição de 30 MPa e 50 °C, sendo estatisticamente igual aos valores obtidos nas condições de 20 e 30 MPa nas temperaturas de 40 e 60 °C. O menor rendimento global de extração foi verificado na condição de 10 MPa e 60 °C.

Os efeitos encontrados para as variáveis no rendimento global das extrações de cogumelo do sol podem ser observados no Gráfico de Pareto apresentados na Figura 10. O Gráfico de Pareto ilustra graficamente a influência das variáveis independentes sobre as variáveis respostas, considerando-se significativas aquelas cujas colunas horizontais ultrapassam as linhas tracejadas, representativas para intervalo de confiança de 95 % ($p < 0,05$).

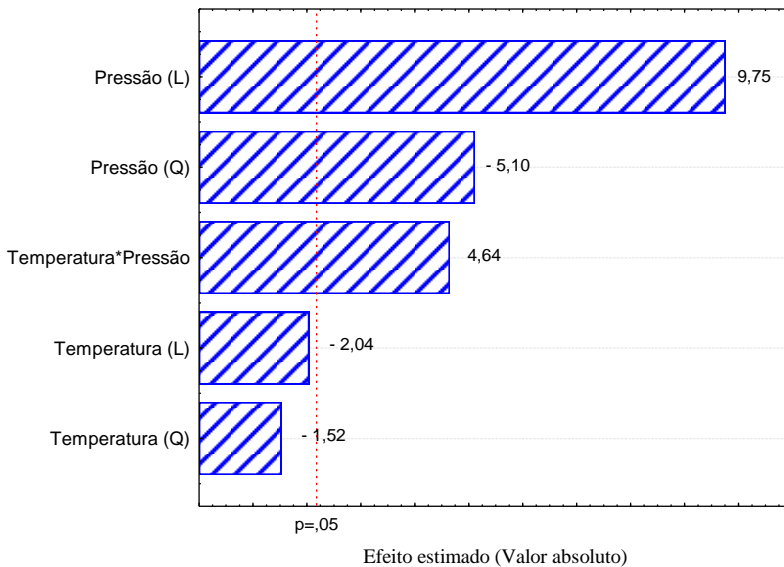
Observando o Gráfico de Pareto pode-se afirmar que pressão e a interação dos fatores pressão e temperatura apresentaram efeito significativo sobre o rendimento, enquanto a temperatura não teve efeito significativo, para um nível de 5 % de significância.

Tabela 7: Valores de rendimento global (X_0) obtidos para as diferentes condições de temperatura e pressão para a ESC de cogumelo do sol com vazão de CO_2 de 12 ± 2 g/min.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Pressão (MPa)	ρCO_2 (g/cm 3)	Rendimento* (%)
40	10	0,629	$0,85^b \pm 0,05$
40	20	0,840	$1,05^{ab} \pm 0,03$
40	30	0,911	$0,98^{ab} \pm 0,01$
50	10	0,385	$0,6^{bc} \pm 0,1$
50	20	0,785	$1,1^{ab} \pm 0,1$
50	30	0,871	$1,19^a \pm 0,01$
60	10	0,295	$0,5^c \pm 0,1$
60	20	0,724	$1,05^{ab} \pm 0,06$
60	30	0,830	$1,11^{ab} \pm 0,01$

* Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

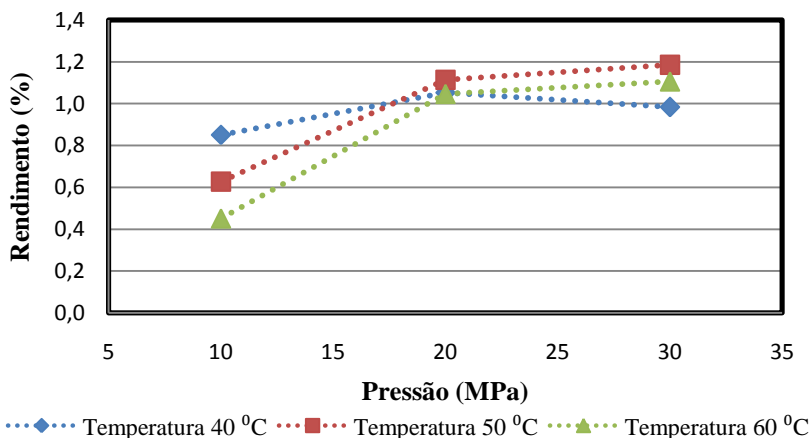
Figura 10: Gráfico de Pareto para rendimento



Os dados da Tabela 7 estão de acordo com a Figura 10, sendo possível observar que resultados do rendimento da extração aumentam com o aumento da pressão a temperatura constante. Para a condição isotérmica de 50 °C, o rendimento aumenta de $0,6 \pm 0,1$ % para $1,19 \pm 0,01$ % quando a pressão de operação é elevada de 10 para 30 MPa, respectivamente. Uma das propriedades físico-químicas que afetam o X_0 e pode explicar esse comportamento é a massa específica do fluido supercrítico. A massa específica do solvente é o fator predominante no rendimento da extração, ou seja, o X_0 aumenta devido ao aumento no poder de solvatação do fluido supercrítico com a pressão (BRUNNER, 1994).

Embora não significativo no Gráfico de Pareto, o efeito da temperatura sobre o rendimento de extração é mais adverso. Em baixas pressões a solubilidade diminui com o aumento da temperatura uma vez que a massa específica do solvente decresce rapidamente com o aumento da temperatura; a altas pressões as mudanças de massa específica com a temperatura são muito mais discretas, de modo que o aumento na pressão de vapor causado pelo aumento de temperatura torna-se mais importante do que a ligeira diminuição de massa específica (BRUNNER, 1994). A Figura 11 apresenta as isotermas de rendimento do extrato de cogumelo do sol em CO₂ supercrítico como função da pressão de operação, de acordo com os resultados da Tabela 7, para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C.

Figura 11: Comportamento das isotermas de rendimento com a pressão de extração para a ESC do cogumelo do sol.



Os efeitos antagônicos da massa específica do solvente e da pressão de vapor do soluto ocasionam uma inversão da curva de solubilidade, fenômeno conhecido como retrogradação, que é resultado da predominância de um dos dois fatores (MICHIELIN et al., 2005). Esse comportamento pode ser observado na Figura 11, onde na condição de 10 MPa, o rendimento global da extração de cogumelo do sol diminui de $0,85 \pm 0,05$ para $0,5 \pm 0,1$ com a elevação da temperatura de 40 °C para 60 °C. Porém, um efeito contrário ocorre para pressões acima de 20 MPa. Em pressões mais baixas o rendimento é influenciado majoritariamente pela pressão, já que a massa específica do solvente diminui consideravelmente com o aumento de temperatura. Nas proximidades de 20 MPa há convergência das isotermas (pressão de inversão), e então, a pressões mais elevadas, o rendimento global aumenta com a temperatura.

Kizberger et al. (2009) relataram que a faixa de inversão das isotermas para o extrato de cogumelo shiitake é próxima a 17 MPa. Segundo Mezzomo et al. (2010), a faixa de inversão das isotermas de 30, 40 e 50 °C para o óleo de amêndoa de pêssego ocorre entre 26 e 28 MPa. A discrepância entre as faixas de inversão mencionadas ocorre devido a diferenças nas matrizes vegetais utilizadas, estando relacionada à composição dos extratos, ou seja, pela influência dos grupos funcionais e da estrutura dos ácidos graxos presentes no soluto sobre a pressão de vapor dos diferentes extratos e, portanto, na solubilidade destes no solvente supercrítico (MEZZOMO et al., 2010).

O efeito não significativo da temperatura no rendimento global de extração de cogumelo do sol pode ser devido ao efeito contrário que a região de inversão das isotermas apresenta.

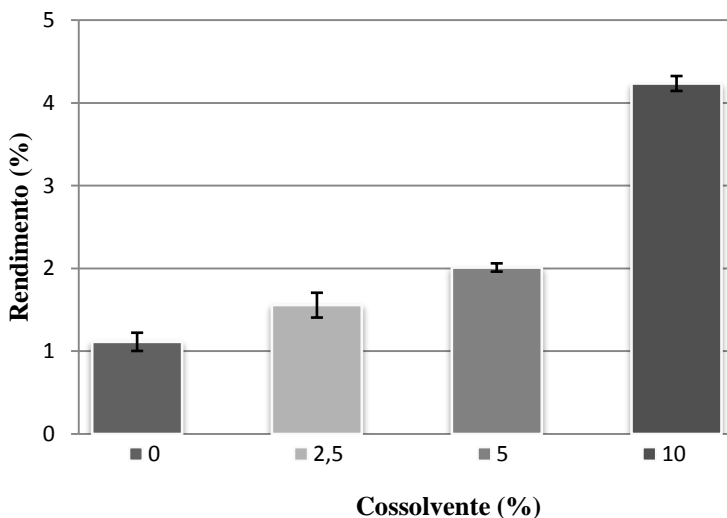
4.4 EMPREGO DE COSSOLVENTE

Apesar de todas as vantagens da utilização do dióxido de carbono em processos de extração supercrítica, nos casos em que os compostos que se pretende isolar são substâncias de maior polaridade, como acontece com boa parte das substâncias com propriedades antioxidantes, o fato de o CO₂ ser um composto apolar torna o processo pouco eficiente. Ao se comparar os rendimentos obtidos por ESC com CO₂ supercrítico puro aos resultados obtidos nas extrações convencionais (Tabelas 6 e 7) observa-se que as extrações obtidos a baixa pressão apresentaram rendimentos superiores. Tais resultados podem ser justificados pela extração de compostos mais polares, não solúveis no

CO₂, e também, no caso da extração em soxhlet, pelo maior tempo de operação e de volume de solvente empregados, quando comparado com a ESC.

O etanol foi escolhido como cossolvente por ser um modificador de grau alimentício que pode ser introduzidos com a finalidade de provocar um incremento de polaridade do solvente de extração e ter apresentado bons rendimentos nos processos de extração a baixas pressões. O uso de cossolvente acrescenta uma etapa ao processo de extração (remoção do solvente do extrato final) e por isso as quantidades de cossolvente utilizadas devem ser reduzidas. Assim, para que todas as vantagens da extração supercrítica fossem mantidas, empregou-se o etanol como cossolvente nas frações de 0; 2,5; 5 e 10 %. Os resultados obtidos para ESC com cossolvente estão representados na Figura 12.

Figura 12: Rendimento global X_0 para os extratos de cogumelo do sol utilizando etanol como cossolvente.



A adição de cossolvente ao processo de extração supercrítica com CO₂ elevou os valores de rendimento de extrato. A adição de 10 % de cossolvente proporcionou um incremento de 3,8 vezes o rendimento obtido. Além do incremento no rendimento de extração, a adição de etanol proporcionou a obtenção de maiores quantidades de compostos

antioxidantes, como pode ser observado no item 4.6 (Atividade antioxidante).

Kitzberger et al. (2007) verificou que o rendimento de extração do cogumelo shiitake aumentou de 0,57 %, quando utilizado CO₂ puro, para 3,81 % com o emprego de 15 % de etanol como co-solvente. Coelho et al. (2005) obtiveram um pequeno incremento no rendimento de extração de cogumelo do sol, quando utilizaram frações de 10 e 15 % de etanol. O rendimento de extração aumentou 1,1 vezes quando utilizado 10 % de etanol, sendo menor do que o incremento verificado no presente estudo.

4.5 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (TFT)

A extração dos compostos fenólicos da matriz constitui uma das etapas mais importantes do processo de análise, pois ela deve promover o maior rendimento possível dessas substâncias. Os valores encontrados para o teor de compostos fenólicos totais dos extratos de cogumelo do sol obtidos por extração em soxhlet, maceração, hidrodestilação e ESC estão apresentados na Tabela 8. A curva padrão de ácido clorogênico, utilizada para o cálculo do teor de compostos fenólicos totais consta no Apêndice III.

O teor de compostos fenólicos total dos extratos de cogumelo do sol variou entre 12,6 e 74,1 mg EAC/g. Os valores verificados estão bem abaixo dos 423 mg EAC/g 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. Nas extrações com soxhlet, o teor de compostos fenólicos total aumentou com a utilização de solventes de maior polaridade, exceto para a água. Um dos fatores que pode explicar esse desvio foi a dificuldade encontrada para solubilizar o extrato para a realização da análise e também da degradação térmica provocada pelo uso de altas temperaturas.

Tabela 8: Teor de compostos fenólicos total (TFT), expressos em equivalentes de ácido clorogênico para os extratos de cogumelo do sol.

Técnica	Solvente	TFT (mg EAC/g)*
Soxhlet	Hexano	12,6 ^f ± 0,5
Soxhlet	Diclorometano	27 ^{cd} ± 2
Soxhlet	Acetato de etila	46 ^b ± 2
Soxhlet	Etanol	47 ^b ± 5
Soxhlet	Água	27 ^{cd} ± 2
Maceração	Etanol	74 ^a ± 4
Hidrodestilação	Água	NT
ESC 10 MPa /40 °C	CO ₂	32 ^c ± 4
ESC 10 MPa /50 °C	CO ₂	22 ^d ± 3
ESC 10 MPa /60 °C	CO ₂	14 ^{ef} ± 3
ESC 20 MPa /40 °C	CO ₂	24 ^d ± 2
ESC 20 MPa /50 °C	CO ₂	22 ^d ± 2
ESC 20 MPa /60 °C	CO ₂	24,6 ^{cd} ± 0,5
ESC 30 MPa /40 °C	CO ₂	21,2 ^{de} ± 0,5
ESC 30 MPa /50 °C	CO ₂	19 ^{df} ± 1
ESC 30 MPa /60 °C	CO ₂	24 ^d ± 1

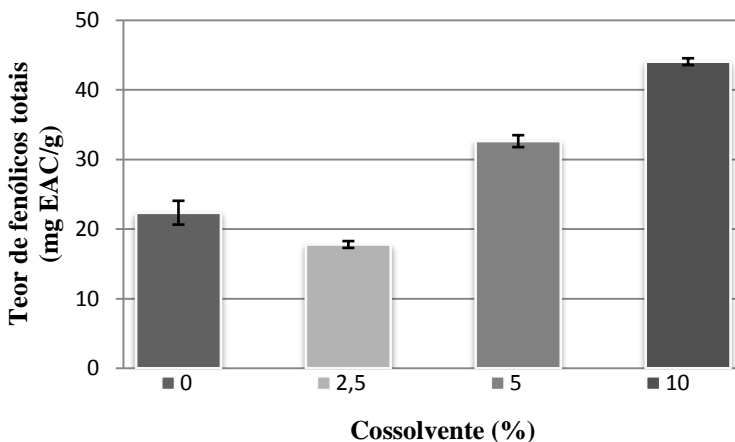
* Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

NT - Não testado

Entre os métodos de extração avaliados o melhor resultado de teor de fenólicos total foi obtido com etanol na técnica de maceração. Apesar disso, o baixo rendimento de extração encontrado para esse extrato (2,4 %) pode se tornar um fator limitante à viabilidade econômica do processo. Nas extrações com soxhlet, os maiores teores de compostos fenólicos foram verificados nos processos utilizando etanol e acetato de etila como solventes. Os bons resultados verificados para o etanol em ambas as técnicas justificam o seu emprego como cossolvente nos processos de extração supercrítica. 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.

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos de cogumelo do sol obtidos por ESC não apresentou uma tendência de variação com a mudança da pressão ou da temperatura. Os valores do teor de compostos fenólicos totais variaram entre 14 e 32 mg EAC/g, sendo estatisticamente iguais aos obtidos na técnica de soxhlet. A utilização de etanol como cossolvente no processo de extração proporcionou um acréscimo no teor de compostos fenólicos obtidos, conforme pode ser observado na Figura 13. O emprego de 10 % de etanol como cossolvente aumentou em 100 % a extração de compostos fenólicos.

Figura 13: Teor de compostos fenólicos total (TFT), expressos em equivalentes de ácido clorogênico, para os extratos de cogumelo do sol utilizando etanol como cossolvente.



Silva et al. (2009) estudaram o teor de compostos fenólicos total no extrato metanólico-aquoso (1:1) de cogumelo do sol com 6 h de extração. A concentração expressa em teor de ácido gálico obtida foi de 15 mg/g de compostos fenólicos totais, valor superior à Tsai et al. (2007), que obtiveram no extrato aquoso de *A. blazei* 5,67 mg/g de compostos fenólicos. Soares et al. (2009) estudou o conteúdo de fenólicos totais em diferentes estádios de maturação e verificou que cogumelos mais jovens apresentaram um teor de 29,64 mg/g e cogumelos mais maduros 28,82 mg/g de extrato, expressos em teor de ácido gálico.

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, portanto, 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 9. O resultado dessa multiplicação foi chamado de índice de eficiência. Avaliando os resultados, verifica-se que os processos mais interessantes foram os obtidos na técnica com soxhlet utilizando etanol e água como solventes. O melhor resultado no processo de extração supercrítica foi verificado na condição que empregou 10 % de etanol como cossolvente, sendo comparável aos resultados das técnicas de maceração etanólica e soxhlet com acetato de etila.

Tabela 9: Rendimento x Teor de compostos fenólicos total (TFT)

Técnica	Solvente	Índice de eficiência
Soxhlet	Hexano	0,2
Soxhlet	Diclorometano	0,6
Soxhlet	Acetato de etila	1,4
Soxhlet	Etanol	17,3
Soxhlet	Água	15,3
Maceração	Etanol	1,7
Hidrodestilação	Água	-
ESC 10 MPa /40 °C	CO ₂	0,3
ESC 10 MPa /50 °C	CO ₂	0,2
ESC 10 MPa /60 °C	CO ₂	0,1
ESC 20 MPa /40 °C	CO ₂	0,1
ESC 20 MPa /50 °C	CO ₂	0,2
ESC 20 MPa /60 °C	CO ₂	0,3
ESC 30 MPa /40 °C	CO ₂	0,09
ESC 30 MPa /50 °C	CO ₂	0,2
ESC 30 MPa /60 °C	CO ₂	0,2
Cossolvente 2,5 %	CO ₂ + etanol	0,2
Cossolvente 5 %	CO ₂ + etanol	0,6
Cossolvente 10 %	CO ₂ + etanol	1,8

4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A investigação da atividade antioxidante e dos compostos fenólicos de cogumelos é importante porque contribui para o estabelecimento de nutraceuticos potencias, uma vez que eles têm provado ser bons sequestrantes de radicais e ter capacidade de inibição da peroxidação lipídica. As fontes de antioxidantes poderosos como fenóis e tocoferóis podem ser usadas contra doenças relacionadas ao estresse oxidativo, aplicações dermatológicas, cosméticos, bem como suplementos na indústria de alimentos (HELENO et al., 2010). A Tabela 10 apresenta os resultados da atividade antioxidante dos extratos de cogumelo do sol obtidos em soxhlet, maceração, hidrodestilação e ESC. A atividade antioxidante, referente à maior concentração de extrato

testada (500 µg/mL) 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. Segundo Campos et al. (2008), valores de EC₅₀ acima de 250 µg/mL são considerados de baixo potencial antioxidante.

Tabela 10: Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de cogumelo do sol através do método DPPH, expressos através do percentual de atividade antioxidante (% AA) e concentração efetiva a 50 % (EC₅₀)

Técnica	Solvente	EC ₅₀ (µg/mL)*	% AA (500 µg/mL)*
Soxhlet	Hexano	2647 ^f ± 72	15,2 ^e ± 0,2
Soxhlet	Diclorometano	1632 ^h ± 27	18 ^d ± 3
Soxhlet	Acetato de etila	1172 ⁱ ± 69	25,5 ^c ± 0,5
Soxhlet	Etanol	1053 ^{ij} ± 30	30,2 ^b ± 0,2
Soxhlet	Água	1033 ^j ± 21	25 ^c ± 0,2
Maceração	Etanol	700 ^k ± 4	37,2 ^a ± 0,3
Hidrodestilação	Água	NT	NT
ESC 10 MPa /40 °C	CO ₂	6952 ^a ± 5	4,64 ⁱ ± 0,06
ESC 10 MPa /50 °C	CO ₂	5187 ^c ± 24	7,42 ^h ± 0,07
ESC 10 MPa /60 °C	CO ₂	7001 ^a ± 3	4,89 ⁱ ± 0,3
ESC 20 MPa /40 °C	CO ₂	4462 ^e ± 14	6,6 ^h ± 0,2
ESC 20 MPa /50 °C	CO ₂	3543 ^c ± 3	9,9 ^g ± 0,1
ESC 20 MPa /60 °C	CO ₂	5765 ^b ± 11	8,0 ^h ± 0,1
ESC 30 MPa /40 °C	CO ₂	4622 ^d ± 8	9,6 ^g ± 0,2
ESC 30 MPa /50 °C	CO ₂	2379 ^g ± 64	10,0 ^g ± 0,4
ESC 30 MPa /60 °C	CO ₂	2527 ^f ± 84	13,0 ^f ± 0,2

* Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa (p < 0,05).

NT - Não testado

A atividade antioxidante dos extratos obtidos pelo método soxhlet aumentou com a polaridade dos solventes utilizados, o que confirma a afinidade dos compostos antioxidantes com os solventes polares. A maior atividade antioxidante foi verificada no extrato obtido com o solvente etanol (30,2%), seguida pelo acetato de etila (25,5 %) e água (25 %). De forma similar ao que ocorreu na determinação dos compostos fenólicos, o extrato aquoso apresentou uma menor performance.

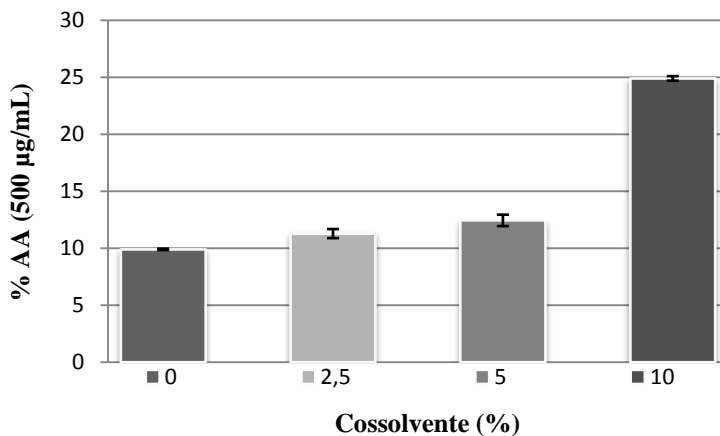
A maior atividade antioxidante (37,2 %) foi obtida na extração por maceração com etanol. Este valor é superior ao encontrado por Silva et al. (2009), no estudo da atividade antioxidante através do método DPPH de extratos de cogumelo do sol obtidos por diferentes solventes e tempos de maceração. A maior atividade antioxidante verificada pelos autores foi de 28,9 %, apresentada pelo extrato metanólico-aquoso (1:1) de cogumelo do sol obtido com um tempo de extração de 6 h. Por outro lado, é inferior a verificada por Kim et al. (2008), no estudo da concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante de cogumelos comestíveis e medicinais da Korea, onde verificaram que o extrato metanólico de *A. blazei* apresentou AA de 67 %.

A maior atividade antioxidante dos extratos de cogumelo do sol obtidos por ESC foi verificada na condição de 60 °C e 30 MPa. Na extração de compostos fenólicos de matrizes vegetais, a literatura tem demonstrado que a temperatura ótima de extração é 50 °C (PINELO;SINEIRO; NÚNEZ, 2006). Na Tabela 10, pode ser observado que para as condições de pressão de 10 e 20 MPa, os resultados de atividade antioxidante e EC₅₀ foram melhores para a temperatura de 50 °C, estando em acordo com a literatura. No entanto, para a condição de 30 MPa, foi verificado que a atividade antioxidante aumentou com a elevação da temperatura de extração. Este comportamento aleatório pode estar associado aos diferentes compostos extraídos em cada uma das condições experimentais, refletindo em variações no potencial antioxidante. Os valores da atividade antioxidante dos extratos de ESC foram inferiores aos obtidos nas demais técnicas testadas, variando entre 4,64 e 13,0 % e apresentaram valores de EC₅₀ muito acima daquele que é considerado o de um bom potencial antioxidante, 250 µg/mL (Campos et al., 2008). A baixa atividade antioxidante pode estar associada à baixa quantidade de compostos fenólicos, de polaridade de intermediária a alta, presentes nos extratos, já que o CO₂, solvente apolar, não favorece a solubilização de tais compostos (BENELLI, 2010).

A Figura 14 representa a avaliação do potencial antioxidante expressa através do percentual de atividade antioxidante (% AA) para os

extratos de cogumelo do sol utilizando etanol como cossolvente. O emprego do etanol promoveu um aumento na extração dos compostos antioxidantes. Na condição estudada, a atividade antioxidante passou de 9,9 %, utilizando CO₂ puro, para 24,9 % com o emprego de 10 % de etanol como cossolvente.

Figura 14: Avaliação do potencial antioxidante pelo método DPPH, expressos através do percentual de atividade antioxidante (% AA) para os extratos de cogumelo do sol utilizando etanol como cossolvente.



A atividade antioxidante dos extratos é comumente relacionada com o conteúdo de fenólicos total, embora esses compostos apenas representem uma boa estimativa desta propriedade (ROGINSKY; LISSI, 2005). Pode-se constatar que a atividade antioxidante dos extratos testados não está diretamente associada ao teor de compostos fenólicos totais dos extratos testados, principalmente relacionando os resultados obtidos por ESC.

O método DPPH é rotineiramente empregado para avaliar o potencial sequestrante de radicais livres de uma molécula antioxidante, sendo considerado como um método colorimétrico padrão de fácil utilização (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012). Na literatura, há diversos outros métodos descritos que podem ser utilizados para avaliar a atividade antioxidante, embora a maioria apresente problemas de interferência, baixa resolução e longo período de tempo requerido (ANDRE et al., 2010). A comparação dos resultados obtidos pelo método DPPH com outros métodos é importante, uma vez que torna

possível avaliar qual método é mais sensível para captar a atividade antioxidante dos compostos presente. Andrade et al. (2012) avaliou a atividade antioxidante de extratos de casca e borra de café empregando os métodos antioxidante DPPH e ABTS e verificou diferenças nos valores quantificados. Diante disso, torna-se interessante a detecção da atividade antioxidante dos extratos de cogumelo do sol empregando outros métodos, sendo esta uma sugestão de trabalhos futuros.

4.7 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A pesquisa de extratos com ação antimicrobiana se apresenta como uma saída para o combate aos microrganismos, em razão do grande aumento da resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, levando assim à procura dessas novas alternativas terapêuticas. A atividade antibacteriana dos extratos de cogumelo do sol obtidos por diferentes técnicas de extração foi determinada pela técnica da microdiluição em meio líquido (ÁVILA et al., 2008), frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e os resultados estão apresentados na Tabela 11. Para as análises foram selecionadas duas bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e duas bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. cereus*).

De forma geral, não há um consenso sobre o nível aceitável de inibição de extratos quando comparado com padrões. 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. Comumente, a classificação do extrato é estabelecida como forte inibidor para CMI até 500 µg/mL; moderado inibidor para CMI entre 600 e 1500 µg/mL e fraco inibidor para CMI acima de 1600 µg/mL (MICHELIN et al., 2009).

Os extratos de cogumelos do sol obtidos por técnicas a baixa pressão assim como por extração supercrítica apresentaram uma atividade antibacteriana maior para bactérias Gram-positivas. Para o *S. aureus*, os extratos obtidos com soxhlet utilizando os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila e os obtidos por extração supercrítica nas condições de 20 MPa e 40 °C e 10 MPa e temperaturas de 50 e 60 °C podem ser classificados como fortes inibidores. A extração com solventes de maior polaridade resultou em extratos com atividade

antibacteriana menor. O emprego de cossolvente também reduziu a atividade antibacteriana, alterando a classificação dos extratos de forte inibidor para moderado inibidor.

Os resultados obtidos para o *B. cereus* foram similares do *S. aureus*. Os extratos provenientes do soxhlet utilizando os solventes hexano e diclorometano e os obtidos por extração supercrítica nas condições de 30 MPa e 60 °C e 10 MPa e temperaturas de 50 e 60 °C podem ser classificados como fortes inibidores. A extração com solventes de maior polaridade resultou em extratos com atividade antibacteriana menor. O emprego de cossolvente também reduziu a atividade antibacteriana, mas os extratos ainda podem ser classificados como moderados inibidores.

Tabela 11: Valores da concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de cogumelo do sol para *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Técnica	Solvente	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Soxhlet	Hexano	500	500	>2000	>2000
Soxhlet	Diclorometano	375	312	1500	>2000
Soxhlet	Acetato de etila	250	1000	>2000	>2000
Soxhlet	Etanol	>2000	>2000	>2000	>2000
Soxhlet	Água	>2000	>2000	>2000	>2000
Maceração	Etanol	>2000	2000	>2000	>2000
Hidrodestilação	Água	NT	NT	NT	NT
ESC 10 MPa /40 °C	CO ₂	1000	1000	>2000	>2000
ESC 10 MPa /50 °C	CO ₂	375	500	>2000	>2000
ESC 10 MPa /60 °C	CO ₂	250	375	>2000	>2000
ESC 20 MPa /40 °C	CO ₂	500	2000	>2000	>2000
ESC 20 MPa /50 °C	CO ₂	750	1000	>2000	>2000
ESC 20 MPa /60 °C	CO ₂	2000	1000	>2000	>2000
ESC 30 MPa /40 °C	CO ₂	>2000	>2000	>2000	>2000
ESC 30 MPa /50 °C	CO ₂	1000	1500	>2000	>2000
ESC 30 MPa /60 °C	CO ₂	1000	500	>2000	>2000
Cossolvente 2,5 %	CO ₂ + etanol	1500	1500	>2000	>2000
Cossolvente 5 %	CO ₂ + etanol	1000	1500	>2000	>2000
Cossolvente 10 %	CO ₂ + etanol	1250	1500	>2000	>2000

NT - Não testado

Os extratos testados para as bactérias Gram-negativas podem ser classificados como fracos inibidores. A única exceção foi o extrato obtido com soxhlet utilizando hexano que pode ser classificado como moderado inibidor. A menor inibição das bactérias Gram-negativas pode estar relacionada com as diferenças estruturais que estas bactérias apresentam em relação às Gram-positivas, tais como a presença de uma membrana externa sobre uma camada delgada de peptidoglicano, ou ao maior número de bombas de fluxo (KONEMAN et al., 1999).

Os compostos que exercem essa atividade antibacteriana 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. Segundo Fortes e Novaes (2006), a atividade bactericida está associada a presença do ácido linoléico.

Kitzberger et al. (2007), avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de cogumelo shiitake obtidos por solventes orgânicos e extração supercrítica. Os autores verificaram que os extratos obtidos no processo de ESC com CO₂ puro e com a adição de cosolventes foram mais efetivos contra *Micrococcus luteus* e *B. cereus*, enquanto que os extratos obtidos a baixa pressão não apresentaram atividade antimicrobiana.

Öztürk et al. (2011), avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de três espécies de *Agaricus*. Os autores 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.

4.8 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Leveduras do gênero *Cândida* podem ser normalmente encontradas nas mucosas da boca e dos trato digestivo, genital e urinário de indivíduos saudáveis, podendo desencadear infecções em pessoas com fatores predisponentes ou condições que comprometam o sistema imunológico (LIMA et al., 2006). Considerando a resistência das leveduras pertencentes ao gênero *Candida* frente aos antifúngicos atualmente utilizados, pode-se inferir que a pesquisa de busca de novos compostos antifúngicos de origem vegetal mostra-se de relevante significância.

Os extratos de cogumelo do sol obtidos pelos diferentes métodos de extração foram testados contra três espécies de *Candida*: *C. albicans* ATCC 14053, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258. Os

resultados dos extratos que apresentaram atividade antifúngica estão apresentados na Tabela 12. Como pode ser observado, apenas o método de extração com fluido supercrítico em duas condições de temperatura a 20 MPa interferiu no crescimento da espécie *C. albicans*, apresentando um discreto halo de inibição. Para *C. parapsilosis* e *C. krusei* não foram verificados halos de inibição para todos os extratos testados. A maior seletividade e a utilização de temperaturas de extração menores da ESC em relação aos métodos convencionais podem explicar os resultados positivos apenas para esta técnica.

Tabela 12: Extratos de cogumelo do sol que apresentaram atividade antifúngica frente a diferentes espécies de *Candida* utilizando-se técnica de difusão em gel.

Técnica	Diâmetro do halo de inibição (mm)*		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>
ESC 20 MPa /50 °C	9	0	0
ESC 20 MPa /60 °C	9,5	0	0

*Resultados dados em tamanho do halo de inibição do crescimento (mm).

Um importante fator a ser considerado quando se realiza qualquer pesquisa envolvendo plantas medicinais e cogumelos e se tenta extrapolar os resultados obtidos, é quanto a fatores ambientais envolvidos no momento da coleta da amostra, como sazonalidade, clima, tipo de solo, estágio de maturação e temperatura do ar. De acordo com Freitas et al. (2004), a produção de metabólitos secundários ocorre em função da interação planta *versus* ambiente em resposta a fatores químicos e biológicos. Este fato pode explicar resultados de atividade antioxidante, antimicrobiana e antifúngica divergentes de extratos da mesma espécie, mas coletado em locais e períodos diferentes.

4.9 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

A Tabela 13 apresenta o percentual relativo dos compostos identificados nos diferentes extratos de cogumelo do sol obtidos pelas técnicas a baixa pressão e com fluido supercrítico. No Apêndice IV, estão apresentados os espectros de massas de todos os extratos de

cogumelo do sol, os tempos de retenção e os percentuais relativos de cada composto majoritário, correspondentes aos dados de CG-EM. Os extratos obtidos por soxhlet empregando água e etanol como solvente e o extrato da maceração etanólica não foram analisados, pois não foi possível a solubilização destes em diclorometano (solvente utilizado para a preparação das amostras).

A partir dos dados da Tabela 13, observa-se que foram identificados vinte e sete compostos presentes nos diferentes extratos de cogumelo do sol analisados. Os principais componentes identificados em termos de percentual de área relativa dos extratos foram o ácido n-hexadecanóico (ácido palmítico) e o ácido 9-12-octadecadienóico (ácido linoléico), independente da técnica de extração empregada. Os ácidos graxos linoléico e palmítico apresentam função de reduzir a pressão sanguínea, agregação plaquetária e estimular o sistema imunológico (GREGORIO; LEMOS; CALDAS, 2002).

O ácido linoléico é um ácido graxo insaturado não sintetizado no organismo, conhecido por diminuir os níveis de colesterol e triglicérides, diminuir o risco de arterioesclerose, câncer e doenças alérgicas (SANHUEZA; NIETO; VALENZUELA, 2002). Além disso, o ácido linoléico 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 linoléico nos extratos de cogumelo do sol 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 grande número de ácidos graxos verificados nos extratos de cogumelo do sol. Estudos têm reportado que os ácidos graxos de cadeia longa, incluindo n-3, n-6, n-7 e n-9, são substâncias que apresentam atividade antibacteriana (HUANG, 2011). Os principais representantes da família n-3 são o ácido α -linoléico, o ácido eicosapentaenóico e o ácido docosahexaenóico e os principais representantes da família n-6 são o ácido linoléico e o ácido araquidônico.

O ácido n-hexadecanóico, comercialmente conhecido como ácido palmítico, possui um tempo de retenção na coluna cromatográfica de 15,65 min e é formado por uma cadeia apolar de 16 carbonos com ligações simples, o que confere maior polaridade a sua molécula quando

comparado com outros ácidos graxos, principalmente os insaturados. Este ácido tem uma ampla aplicação, sendo emprego desde a manufatura de sabões até a utilização desses sabões como antioxidantes em tintas, impermeabilizantes na indústria de tecidos, na fabricação de vela, juntamente com a parafina e preparação de cristal líquido largamente utilizado na indústria eletrônica (WENZEL, 1961).

O ácido benzóico foi verificado em quase todos os extratos analisados. Este composto aromático ocorre naturalmente em bálsamos e resinas vegetais, sendo um dos primeiros conservadores utilizados em alimentos com ação bacteriostática e fungistática (KAWASE; COELHO; LUCHESE, 2009).

O ergosterol, composto identificados em alguns extratos obtidos por soxhlet, é um esteroide da membrana celular que está fortemente ligado nos fungos, sendo capaz de ativar a expressão de vários genes de defesa e aumentar a resistência das plantas contra fungos patogênicos. O ergosterol é encontrado principalmente em fungos e está presente tanto na forma livre como esterificada. As pesquisas têm demonstrando que o ergosterol e seus produtos de peroxidação podem contribuir para benefícios à saúde e significativas funções fisiológicas, entre elas, redução da dor relacionada a inflamação, incidência de doenças cardiovasculares, inibição da enzima ciclooxigenase e atividades antibióticas, anticomplementares e antitumorais. A atividade antitumoral do ergosterol pode ser devido à inibição direta da angiogênese induzida por tumores sólidos (SHAO et al., 2010).

Os extratos obtidos por extração supercrítica apresentaram uma composição mais rica em ácidos graxos, quando comparados aos extratos obtidos por soxhlet. Os componentes identificados foram o ácido hexanóico (ácido caprótico), o ácido octanóico (ácido caprílico), o ácido 9-oxononanoico que é resultante da ozonólise do ácido oleico, o ácido tetradecanoico (ácido mirístico), o ácido pentadecanoico, o ácido heptadecanoico, o ácido oléico, o ácido octadecanoico (ácido esteárico), o ácido eicosanoico e o ácido docosanoico. A menor capacidade dos métodos tradicionais em extrair esses compostos pode estar relacionada a: (i) métodos convencionais não são seletivos e muitas vezes necessitam de várias etapas para obter o composto de interesse, sendo que pode ocorrer perda desse composto durante as etapas de fracionamento e (ii) as altas temperaturas empregadas no Soxhlet podem degradar os compostos termolábeis (MOURA et al., 2012).

Coelho et al. (2005), estudaram a extração supercrítica de metabólitos secundários de corpos de frutificação jovens e do micélio de *A. blazei*. O extrato que apresentou maior rendimento (40 MPa e 70 °C)

foi analisado por cromatografia, sendo o ácido palmítico e o ácido oléico os compostos majoritários identificados. Os autores também identificaram três outros ácidos graxos livres em menores concentrações, sendo eles, o ácido esteárico (ácido octadecanóico), o ácido linoléico e o ácido araquídico.

Abdullah, Young e Games (1994) estudaram a extração supercrítica de ácidos graxos e carboxílicos dos cogumelos *A. siluicola* e *A. bisporus*. Os ácidos orgânicos identificados incluíam todos os ácidos graxos saturados C₅-C₂₆, com predomínio do ácido palmítico e esteárico. O ácido benzóico foi um dos principais constituintes do *A. siluicola*, porém no cogumelo *A. siluicola* apareceu como um constituinte minoritário. Os ácidos graxos insaturados foram identificados em pequenas quantidades, sendo observado os ácidos hexadecanóico e octadecanóico.

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 linoléico e palmítico. O composto majoritário do extrato obtido por ESC com CO₂ puro, 40 °C e 20 MPa foi o ácido linoléico, seguido do ácido palmítico.

Tabela 13: Compostos identificados nos extratos de cogumelo do sol com os tempos de retenção (TR) e área relativa (%) detectados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

Composto	TR (min)	Área relativa (%)														
		Condição de extração*														
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15
2-Pentil furano	3,56	0,29														
Ácido hexanóico	4,28	0,73	1,88	4,67		0,23	0,94	0,29	1,40							
Ácido carbônico, dihexyl ester	5,21					0,06										
Ácido octanóico	6,39		2,55	0,76			0,65	0,94	1,31							
Ácido benzóico	6,86	0,76	1,96	1,13	0,15	0,42	1,30	0,96	1,15		0,09	0,32	0,58		0,51	1,10
(E,E) 2,4- Decadienal	7,50				0,43	1,36			0,79	2,15			0,25			
2,4-Decadienal	7,80				0,93											
Pentadecano	8,42				0,39											
Ácido 9- oxononanoico	10,53	0,57	8,72	8,37	0,66	1,75	10,58	1,21	1,05							
Ácido tetradecanoico	13,13	0,84	1,06	1,75	0,17	0,22		0,66		0,48						
Ácido pentadecanoico	14,15	1,92	1,70	2,94	0,75	0,68	1,57	0,81		0,67						
Ácido n- hexadecanoico	15,44	19,18	57,67	41,41	3,75	22,88	54,10	32,73	53,99	21,44	12,43	15,20	4,61	9,10	10,78	9,98

Composto	TR (min)	Área relativa (%)														
		Condição de extração*														
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15
Ácido heptadecanóico	16,02					0,11										
Ácido oléico	16,62			2,36												
Ácido 9-12-octadecadienóico	16,80	14,41			17,84	17,13	13,08	23,49	18,81	30,20	59,09	44,24	10,80	70,49	39,04	68,8 9
Ácido octadecanóico, 2-(2-hidroxietoxi)etil ester	16,81		2,15													
Ácido octadecanóico	17,02	7,2		3,15	3,83	5,39	6,40	7,69	8,67	5,40						
Ácido eicosanóico	18,51	0,98			0,68											
Bis(2-ethylhexyl) ester ácido hexanodióico	18,64											27,44				
Ácido docosanóico	20,02	0,93			0,76											
9(11)-Dehidroergosteryl benzoate	22,53				0,64											
Anthraergostatetraenol	23,84				0,61											

Composto	TR (min)	Área relativa (%)														
		Condição de extração*														
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15
Ergosterol	24,10														5,89	4,24
5,6-Dihydroergosterol	24,12				0,65											
7,22-Ergostadienol	24,16				1,41				0,80		2,31		2,33	1,44	3,16	
α -Ergosterol	24,49				0,92				0,73		1,34		1,33	1,37	1,87	
γ -Ergostenoll	24,52				1,24											
Outros	-	52,19	22,31	33,46	65,76	48,20	11,38	31,22	12,83	38,12	23,39	36,59	56,32	16,75	40,97	10,7 6

* **A1.** CG-EM ESC 10 MPa/ 40 °C; **A2.** CG-EM ESC 10 MPa/ 50 °C; **A3.** CG-EM ESC 10 MPa/ 60 °C; **A4.** CG-EM ESC 20 MPa/ 40°C; **A5.** CG-EM ESC 20 MPa/ 50°C; **A6.** CG-EM ESC 20 MPa/ 60°C; **A7.** CG-EM ESC 30 MPa/ 40 °C; **A8.** CG-EM ESC 30 MPa/ 50 °C; **A9.** CG-EM ESC 30 MPa/ 60 °C; **A10.** CG-EM ESC 20 MPa/ 50 °C/ 2,5 % de etanol; **A11.** CG-EM ESC 20 MPa/ 50 °C/ 5 % de etanol; **A12.** CG-EM ESC 20 MPa/ 50 °C/ 10 % de etanol; **A13.** CG-EM SOXHLET – Hexano; **A14.** CG-EM SOXHLET – Diclorometano; **A15.** CG-EM SOXHLET – Acetato de etila

5 CONCLUSÕES

A extração de cogumelo do sol em soxhlet utilizando água e etanol como solventes foi a técnica que apresentou o maior rendimento. A hidrodestilação não foi eficiente para a extração de cogumelo do sol com resultados de rendimentos próximos a zero.

A extração supercrítica de cogumelo do sol apresentou rendimentos inferiores àqueles alcançados nas extrações à baixa pressão, em soxhlet e maceração. O maior rendimento para a ESC de cogumelo do sol foi verificado na condição de 30 MPa e 50 °C. No entanto, a adição de cossolvente ao processo de extração supercrítica mostrou-se interessante no que diz respeito ao incremento do rendimento.

Os melhores resultados de teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram verificados no extrato obtido por maceração etanólica. A adição de cossolvente ao processo de extração supercrítica promoveu um incremento do teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos de cogumelo do sol.

Os extratos de cogumelos do sol obtidos por técnicas a baixa pressão como por extração supercrítica apresentaram uma atividade antibacteriana, sendo maior para bactérias Gram-positivas. A adição de cossolvente ao processo de extração supercrítica não promoveu uma melhora na atividade antibacteriana dos extratos de cogumelo do sol analisados.

Os extratos de cogumelo do sol não apresentaram atividade antifúngica frente a *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Para a *C. albicans*, apenas os extratos obtidos por ESC na condição de 20 MPa e temperaturas de 50 e 60 °C apresentaram uma discreta atividade antifúngica.

Os principais compostos identificados nos extratos obtidos por extração supercrítica foram o ácido linoléico e ácido palmítico.

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. A busca por condições operacionais que favoreçam positivamente o rendimento das extrações é uma alternativa a esta situação.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Extrações convencionais utilizando misturas de solventes;
- b) Verificação da atividade antitumoral dos extratos que apresentaram maiores quantidades de ergosterol;
- c) Avaliação do potencial antioxidante por outros métodos e *in vivo* dos extratos empregando culturas de células endoteliais;
- d) Avaliação da composição dos extratos através de outras técnicas cromatográficas;
- e) Fracionamento dos extratos na ESC.

6 REFERÊNCIAS

ABDULLAH, I. M.; YOUNG, J. C.; GAMES, D. E. Supercritical fluid extraction of carboxylic and fatty acids from *Agaricus* spp. mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 718-722, 1994.

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.

AMAZONAS, M. A. L. A.; SIQUEIRA, P. **Champignon do Brasil (*Agaricus brasiliensis*): ciência, saúde e sabor**. Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 45 p

ANDRADE, K. S. et al. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. **Talanta**, v. 88, n. 0, p. 544-552, 2012.

ANDRÉ, C. et al. Analytical strategies to evaluate antioxidants in food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 5, p. 229-246, 2010.

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

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists - Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 18. ed. Maryland: AOAC, 2005.

ÁVILA, H. P. et al. Structure–activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 22, p. 9790-9794, 2008.

BARWICK, V. J. Strategies for solvent selection – a literature review. **Trends in Analytical Chemistry**, v.16, n.6, p.293-309, 1997.

BENELLI, P. et al. 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.

BERNARDSHAW, S.; JOHNSON, E.; HETLAND, G. An Extract of the Mushroom *Agaricus blazei* Murill Administered Orally Protects Against Systemic *Streptococcus pneumoniae* Infection in Mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 62, n. 4, p. 393-398, 2005.

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 em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

BRUNNER, G. **Gas Extraction**: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the applications to separation process. Darmstadt, Alemanha: Steinkopff, Springer, 1994. 387p.

CAMPOS, L. M. A. S. et al. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 163-170, 2005.

CARLSON, L. H. C. **Size Meter**. Florianópolis: LCP/EQA/UFSC, 2001.

CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2383-2389, 2010.

CERPA, M. G. et al. Steam Distillation Applied to the Food Industry. In: MEIRELES, M. A. A. **Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications**. CRC Press, 2008. cap 2, p. 11-73.

COELHO, J. P. et al. **Supercritical CO₂ Extraction of secondary metabolites from *Agaricus blazei*. Experiments and modeling**. In Proceedings do 10th European Meeting on Supercritical Fluids, 2005, Colmar, (France).

DUARTE, M. C. T. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 197-201, 2007.

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

ELLERTSEN, L. K.; HETLAND, G. An extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill can protect against allergy. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 7, n. 6, p. 1-10, 2009.

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, M. S. M. et al. Crescimento e produção de fenóis totais em carqueja (*Baccharis trimera* (Less.) D.C.) em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, na presença e na ausência de adubação mineral. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 30-4, 2004.

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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 5, p. 573-579, 2002.

HELENO, S. A. et al. Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1443-1450, 2010.

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

HETLAND, G. et al. Effects of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on immunity, infection and cancer. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 68, n. 4, p. 363–370, 2008.

HYDE, K. D.; BAHKALI, A. H.; MOSLEM, M. A. Fungi—an unusual source for cosmetics. **Fungal Diversity**, v. 43, n.2, p. 1–9, 2010.

HUANG, C. B. et al. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 7, p. 650-654, 2011.

JADHAV, D. et al. Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 93, n. 4, p. 421-426, 2009.

KAWAGISHI, H. et al. Fractionation and antitumor activity of the water-in-soluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, v. 186, n. 2, p. 267-273, 1989.

KAWAMURA, M.; KASAI, H. Delayed cell cycle progression and apoptosis induced by hemicellulase-treated *Agaricus blazei*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, n. 1, p. 83-94, 2007.

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.

KAWASE, K. Y. F.; COELHO, G. L. V.; LUCHESE, R. H. Uso de ácido benzoico micronizado na conservação de suco de laranja. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 20-26, 2009.

KIM, Y.-W. et al. Anti-diabetic activity of b-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 7, p. 483-487, 2005.

KIM, M.-Y. et al. Phenolic Compound Concentration and Antioxidant Activities of Edible and Medicinal Mushrooms from Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 7265-7270, 2008.

KITZBERGER, C. S. G. Obtenção de Extrato de Cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) com CO₂ a Alta Pressão. Florianópolis: UFSC, 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Pós-Graduação em Engenharia De Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

KITZBERGER, C. S. G. et al. 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. et al. Supercritical fluid extraction of shiitake oil: Curve modeling and extract composition. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 1, p. 35-43, 2009.

KOMURA, D. L. et al. Structure of *Agaricus* spp. fucogalactans and their anti-inflammatory and antinociceptive properties. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6192-6199, 2010.

LAKHANPAL, T. N.; RANA, M. Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. **Plant Genetic Resources**, v. 3, n. 2, p. 288-303, 2005.

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

KUROZAWA, L. E. et al. Drying kinetic of fresh and osmotically dehydrated mushroom (*Agaricus blazei*). **Journal of Food Process Engineering**, v. 34, p.1-19, 2011.

LARGETEAU, M. et al. The medicinal *Agaricus* mushroom cultivated in Brazil:biology, cultivation and non-medicinal valorization.**Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 5, p. 897-907, 2011.

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.

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, 2008. cap 7, p. 215-242.

LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 16, n. 2, p. 197-201.

MANTOVANI, M. S. et al. β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Reviews in Mutation Research**, v. 658, n. 3, p. 154-161, 2008.

MARKOM, M. et al. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, v. 52, n. 3, p. 487-496, 2007.

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(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, 2008. cap 2, p. 25-49.

MARTÍNEZ, J. et al. Multicomponent model to describe extraction of ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 42, p. 1057-1063, 2003.

MARTINS DE OLIVEIRA, J. et al. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 12, p. 1775-1780, 2002.

MEIRELES, M. A. A. Supercritical extraction from solid: process design data (2001-2003).

Current Opinion in Solid State and Materials Science, v. 7, 2003, p. 321-330.

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, 2008, p. 243-274.

MENDONÇA, M. M.; KASUYA, M.C.M.; CADORIN, A.; VIEIRA, A.J. *Agaricus blazei* cultivation for a living in Brazil. In: MushWorld. (Org.). **Shiitake cultivation**. Seoul: Mushworld, 2005, p. 246-257.

MENEZES, M. C. et al. Nutritional and Chemical Composition of Culinary-Medicinal Royal Sun Agaricus (the Himematsutake Mushroom) *Agaricus brasiliensis* (Agaricomycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 10, n. 2, p. 189–194, 2008.

MENOLI, R.C. et al. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. **Mutation Research**, v. 496, n. 1-2, p. 5-13, 2001.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MEZZOMO, N. MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, n. 1, p. 10-16, 2009.

MEZZOMO, N. et al. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5622-5632, 2010.

MIZUNO, T. Medicinal Properties and Clinical Effects of Culinary-Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill (Agaricomycetidae) (Review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, 299-312, 2002.

MICHIELIN, E. M. Z. et al. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 131-8, 2005.

MICHIELIN, E. M. Z. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordiaverbenacea* extracts obtained by different methods. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 6615-6623, 2009.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. H Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n.1 p. 1036–1043, 2012.

MOURA, P. M et al. Supercritical fluid extraction from guava (*Psidium guajava*) leaves: Global yield, composition and kinetic data. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 62, n. 2, p. 116-122, 2012.

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

National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa

OHNO, N et al. Antitumor beta glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. **Biological pharmaceutical bulletin**, v. 24, n. 7, p. 820-828, 2001.

ÖZTÜRK, M. et al. In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1353-1360, 2011.

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, 2008. cap 1, p. 1-21.

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.

PESCHEL, W. et al. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 137-150, 2006.

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

ROSSI, J. A. J.; SINGLETON, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-58, 1965.

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 .

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SECOM. **Boletim de mercado o mercado de cogumelo "Agaricus blazei Murril" (Himematsutake) no Japão**. Disponível em: <<http://www.brasemb.or.jp/portugues/economy/pdf/Agaricus10.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2010.

SHAO, S. et al. Ergosterol profiles, fatty acid composition, and antioxidant activities of button mushrooms as affected by tissue part and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 22, p. 11616–11625, 2010.

SILVA, A. C. et al. Utilização de extrato de cogumelo como antioxidante natural em óleo vegetal. **Ciência e agrotecnologia**, v. 33, n. 4, p. 1103-1108, 2009.

SOARES, A. A. et al. M. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 112, p. 775-781, 2009.

SOARES, L. A. L. et al. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra) empregando planejamento fatorial. **Caderno de Farmácia**, v. 14, n. 1-2, p. 21-26, 1998.

SORIMACHI, K.; NAKAMOTO, T. Alternative Medicine Safety: *Agaricus blazei* and Propolis. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 14, p. 616-621, 2011.

SORIMACHI, K. et al. Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions in vitro. **Cell Structure and Function**, v. 26, n. 2, p. 103-108, 2001.

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.

SU, C. H. et al. The mushroom *Agaricus blazei* Murill in combination with metformin and gliclazide improves insulin resistance in type 2 diabetes: a randomized, double-blinded, and placebo-controlled clinical trial. **Journal of Alternative Complementary Medicine**, v. 13, n. 1, p. 97-102, 2007.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an Antitumor Compound from *Agaricus blazei* Murill and Its Mechanism of Action. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 5. P. 1409-1413, 2001.

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.

TOMIZAWA, M. M. et al. Variabilidade genética de isolados do cogumelo *Agaricus blazei* por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n.4, p. 1242-1249, 2007.

TSAI, S.-Y.; TSAI, H.-L.; MAU, J.-L. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 8, p. 1392-1402, 2007.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 85-99, 2004.

WANG, Y. et al. New Monoterpenoid coumarins from *Clausena anisum-olens*. **Molecules**, v. 13, p. 931-7, 2008.

WASSER, S. P. et al. Is a Widely Cultivated Culinary-Medicinal Royal Sun *Agaricus* (the Himematsutake Mushroom) Indeed *Agaricus blazei* Murrill?. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, n. 1, p. 267-290, 2002.

WENZEL, R. N. Fatty acids; their chemistry, properties, production, and uses. Part 1 (Markley, Klare S., ed.). **Journal of Chemical Education**, v. 38, n. 11, p. 852, 1961.

YUMINAMOCHI, E. et al. Interleukin-12- and interferon-gamma-mediated natural killer cell activation by *Agaricus blazei* Murill. **Immunology**, v. 121, n. 2, p. 197-206, 2007.

7 APÊNDICES

APÊNDICE I - DADOS EXPERIMENTAIS DA CURVA DE EXTRAÇÃO

APÊNDICE II - DADOS EXPERIMENTAIS DA CURVA DE EXTRAÇÃO DO COGUMELO SHIITAKE (KITZBERGER, 2005)

APÊNDICE III - CURVA PADRÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO

APÊNDICE IV - CROMATOGRAMAS E COMPOSTOS IDENTIFICADOS DOS EXTRATOS DE COGUMELO DO SOL

APÊNDICE I:**DADOS EXPERIMENTAIS DA CURVA DE EXTRAÇÃO****Tabela 14: Tempo de extração, massa de extrato, massa de extrato acumulada e rendimento (X_0) do experimento cinético a 20 MPa, 40 °C e 12 ± 2 g CO₂ /min.**

Tempo (min)	Massa (g)	Massa Acumulada (g)	Rendimento (%)
5	0,0061	0,0061	0,04
10	0,0136	0,0197	0,13
15	0,0118	0,0315	0,21
20	0,0091	0,0406	0,27
25	0,0099	0,0505	0,34
30	0,008	0,0585	0,39
40	0,0136	0,0721	0,48
50	0,0085	0,0806	0,54
60	0,011	0,0916	0,61
70	0,0103	0,1019	0,68
80	0,0039	0,1058	0,71
90	0,0057	0,1115	0,74
120	0,0115	0,123	0,82
150	0,0094	0,1324	0,88
180	0,002	0,1344	0,90
210	0,0042	0,1386	0,92
240	0,0042	0,1428	0,95
300	0,0022	0,145	0,97
360	0,0064	0,1514	1,01
420	0,0059	0,1573	1,05

A partir da Figura 15, podem ser obtidas as equações que apresentam as taxas de extração para cada um dos períodos de extração.

Para $t < t_{CER}$ (período CER):

$$m_{EXT} = 0,0014 t + 0,0094$$

$$r^2 = 0,9668$$

Para $t_{CER} \leq t < t_{FER}$ (período FER):

$$m_{EXT} = 0,0002 t + 0,9821$$

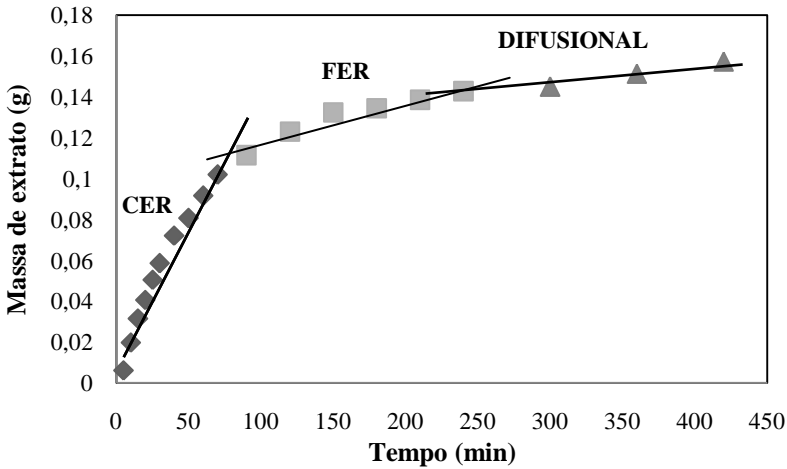
$$r^2 = 0,9221$$

Para $t \geq t_{FER}$ (período difusional):

$$m_{EXT} = 0,0001 t + 0,1143$$

$$r^2 = 0,9221$$

Figura 15: Curva de extração com fluido supercrítico de cogumelo do sol a 20 MPa, 40 °C e 12 ± 2 g/min de CO_2 .



De acordo com a equação:

$$Y_{CER} = \frac{M_{CER}}{Q_{CO_2}}$$

Assim:

$$Y_{CER} = 1,1666 \cdot 10^{-4}$$

APÊNDICE II:

DADOS EXPERIMENTAIS DA CURVA DE EXTRAÇÃO DO COGUMELO SHIITAKE (KITZBERGER, 2005)

Tabela 15: Tempo de extração e massa de extrato acumulada de extrato experimento cinético a 20 MPa, 40 °C e 3,33 g CO₂ /min.

Tempo (min)	Massa Acumulada (g)
5	0,0025
10	0,0052
20	0,0076
30	0,0218
40	0,0438
50	0,0754
60	0,0878
70	0,1244
90	0,1300
110	0,1449
140	0,1494
170	0,1548
200	0,1594

A partir da Figura 16, podem ser obtidas as equações que apresentam as taxas de extração para cada um dos períodos de extração.

Para $t < t_{\text{CER}}$ (período CER):

$$m_{\text{EXT}} = 0,0001 t - 0,0020$$

$$r^2 = 0,941$$

Para $t_{\text{CER}} \leq t < t_{\text{FER}}$ (período FER):

$$m_{\text{EXT}} = 0,0000 t + 0,098$$

$$r^2 = 0,92$$

Para $t \geq t_{\text{FER}}$ (período difusional):

$$m_{\text{EXT}} = 0,000 t + 0,126$$

$$r^2 = 0,997$$

Figura 16: Curva de extração com fluido supercrítico de cogumelo do shiitake a 20 MPa, 40 °C e 3,33 g CO₂ /min.

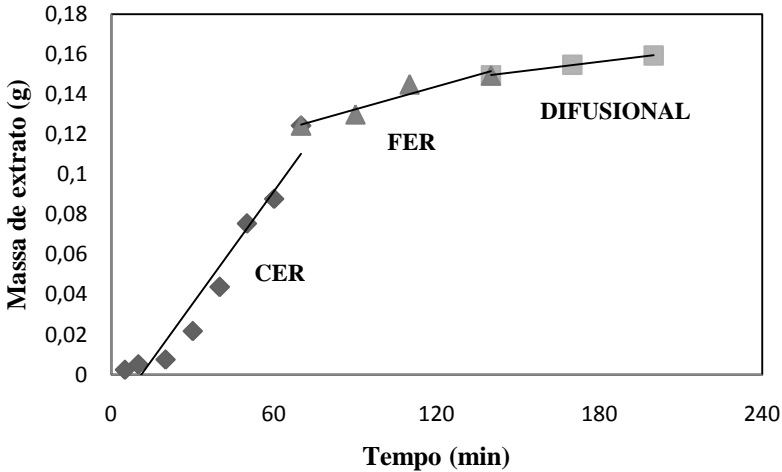
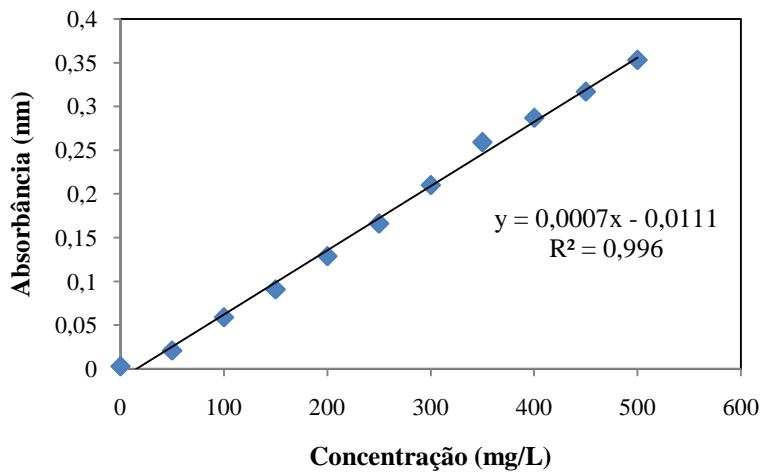


Tabela 16: Parâmetros cinéticos da extração com fluido supercrítico do cogumelo do shiitake a 20 MPa, 40 °C e 3,33 g CO₂ /min.

Parâmetro	Período de extração		
	CER ⁽⁶⁾	FER ⁽⁷⁾	Difusional
$t^{(1)}$ (min)	0 - 70	70 - 140	> 140
$m^{(2)}$ (g)	0,1244	0,03	0,01
$X_0^{(3)}$ (%)	0,78	0,16	0,06
$M^{(4)}$ (g/min)	0,0017	0,0003	0,0001
$Y^{(5)}$ (kg/kg)	$5,105 \cdot 10^{-4}$	-	-

(¹): duração da etapa de extração; (²): massa de extrato aproximada; (³): rendimento da etapa; (⁴): taxa de extração; (⁵): concentração de soluto na fase solvente; CER⁽²⁾ etapa de extração constante; FER⁽⁷⁾ etapa de extração decrescente.

APÊNDICE III:**CURVA PADRÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO****Figura 17: Curva padrão de ácido clorogênico utilizada no cálculo de TFT dos extratos de cogumelo do sol**

APÊNDICE IV:

CROMATOGRAMAS E COMPOSTOS IDENTIFICADOS DOS
EXTRATOS DE COGUMELO DO SOL

A1. CG-EM ESC 10 MPa/ 40°C

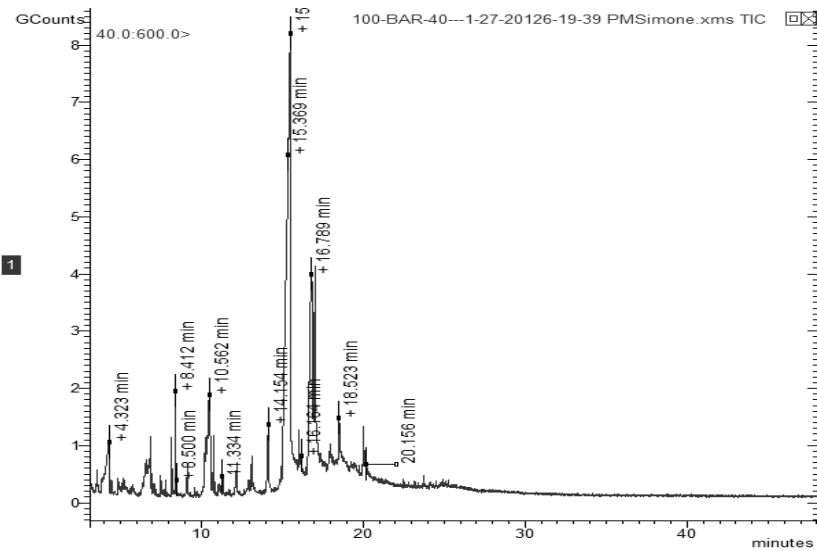
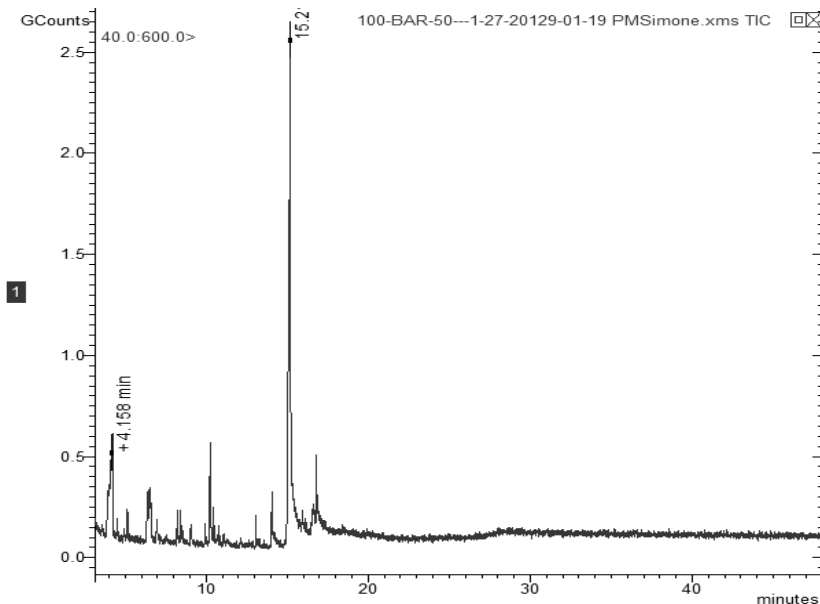
Figura 18: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 10 MPa e 40 °C.

Tabela 17: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 10 MPa e 40 °C.

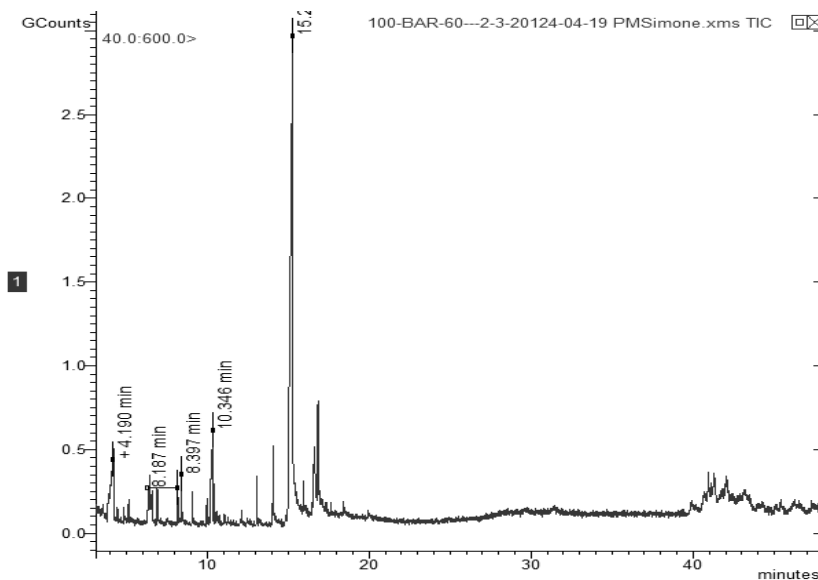
Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
2-pentil furano	3,56	0,29
ácido hexanóico	4,28	0,73
ácido benzóico	6,86	0,76
ácido 9-oxononanóico	10,53	0,57
ácido tetradecanóico	13,13	0,84
ácido pentadecanóico	14,15	1,92
ácido n-hexadecanóico	15,44	19,18
ácido 9-12-octadecadienóico	16,80	14,41
ácido octadecanóico	17,02	7,2
ácido eicosanóico	18,51	0,98
ácido docosanóico	20,02	0,93
outros	-	52,19

A2. CG-EM ESC 10 MPa/ 50 °C

Figura 19: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 10 MPa e 50 °C.**Tabela 18: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 10 MPa e 50 °C.**

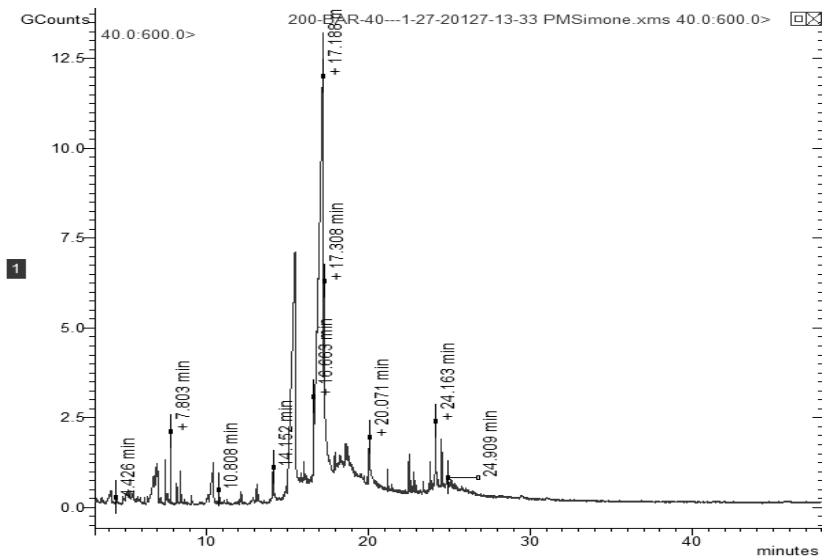
Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
ácido hexanóico	3,93	1,88
ácido octanóico	6,39	2,55
ácido benzóico	6,46	1,96
ácido 9-oxononanoico	10,27	8,72
ácido tetradecanoico	13,06	1,06
ácido pentadecanoico	14,05	1,70
ácido n-hexadecanoico	15,18	57,67
ácido octadecanoico, 2-(2-hidroxi)etil ester	16,81	2,15
outros	-	22,31

A3. CG-EM ESC 10 MPa/ 60°C

Figura 20: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 10 MPa e 60 °C.**Tabela 19:** Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 10 MPa e 60 °C.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
ácido hexanóico	4,21	4,67
ácido octanóico	6,46	0,76
ácido benzóico	6,60	1,13
ácido 9-oxononanóico	10,32	8,37
ácido tetradecanóico	13,09	1,75
ácido pentadecanóico	14,08	2,94
ácido n-hexadecanóico	15,23	41,41
ácido oléico	16,62	2,36
ácido octadecanóico	16,83	3,15
outros		33,46

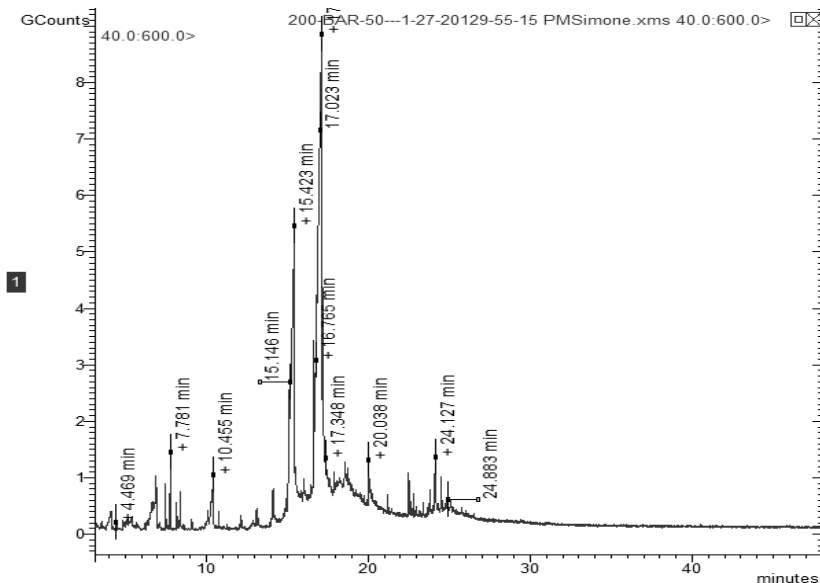
A4. CG-EM ESC 20 MPa/ 40°C

Figura 21: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa e 40 °C.**Tabela 20: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa e 40 °C.**

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
ácido benzóico	6,95	0,15
(E,E) 2,4-decadienal	7,50	0,43
2,4-decadienal	7,80	0,93
pentadecano	8,42	0,39
ácido 9-oxononanoico	10,44	0,66
ácido tetradecanoico	13,13	0,17
ácido pentadecanoico	14,12	0,75
ácido n-hexadecanoico	15,46	3,75
ácido 9-12-octadecadienoico	17,18	17,84

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
ácido octadecanóico	17,31	3,83
ácido eicosanóico	18,61	0,68
ácido docosanóico	20,08	0,76
9(11)-dehidroergosteryl benzoate	22,53	0,64
anthraergostatetraenol	23,84	0,61
7,22-ergostadienol	24,16	1,41
γ -ergostenoll	24,52	1,24
outros		65,76

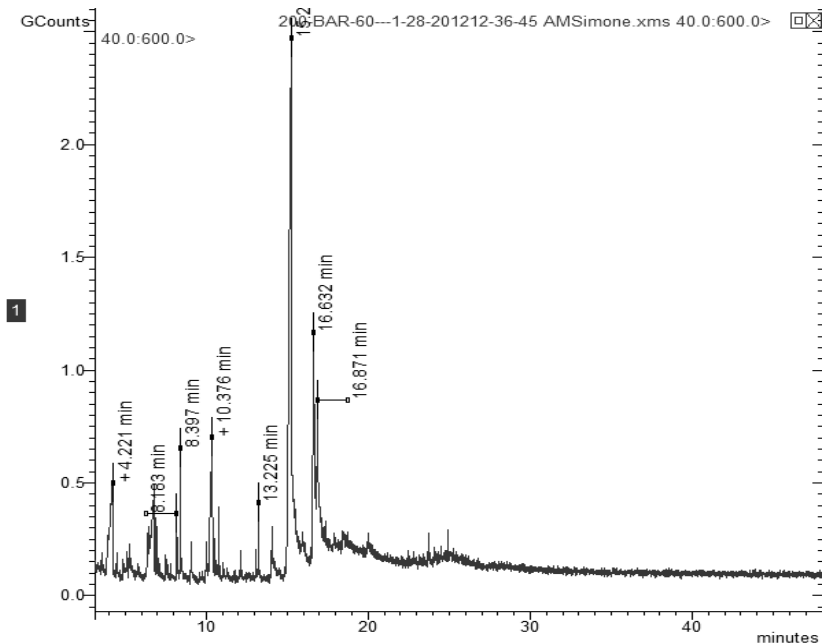
A5. CG-EM ESC 20 MPa/ 50°C

Figura 22: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa e 50 °C.**Tabela 21: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa e 50 °C.**

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
ácido hexanóico	4,11	0,23
ácido carbônico, dihexyl ester	5,21	0,06
ácido benzóico	6,91	0,42
(E,E) 2,4-decadienal	7,78	1,36
ácido 9-oxononanóico	10,45	1,75
ácido tetradecanóico	13,11	0,22
ácido pentadecanóico	14,12	0,68

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
ácido n-hexadecanóico	15,42	22,88
ácido heptadecanóico	16,02	0,11
ácido 9-12-octadecadienóico	17,09	17,13
ácido octadecanóico	17,21	5,39
5,6-dihydroergosterol	24,12	0,65
α -ergostenol	24,49	0,92
outros		48,20

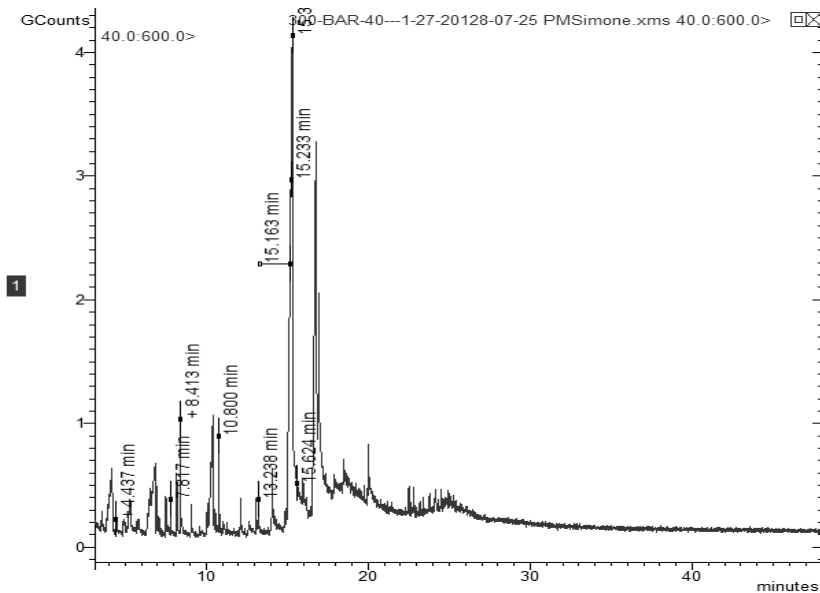
A6. CG-EM ESC 20 MPa/ 60°C

Figura 23: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa e 60 °C.**Tabela 22: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa e 60 °C.**

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
ácido hexanóico	4,19	0,94
ácido octanóico	6,43	0,65
ácido benzóico	6,78	1,30
ácido 9-oxononanoico	10,38	10,58
ácido pentadecanoico	14,06	1,57
ácido n-hexadecanoico	15,24	54,10

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
ácido 9-12- octadecadienóico	16,64	13,08
ácido octadecanóico	16,88	6,40
outros	-	11,38

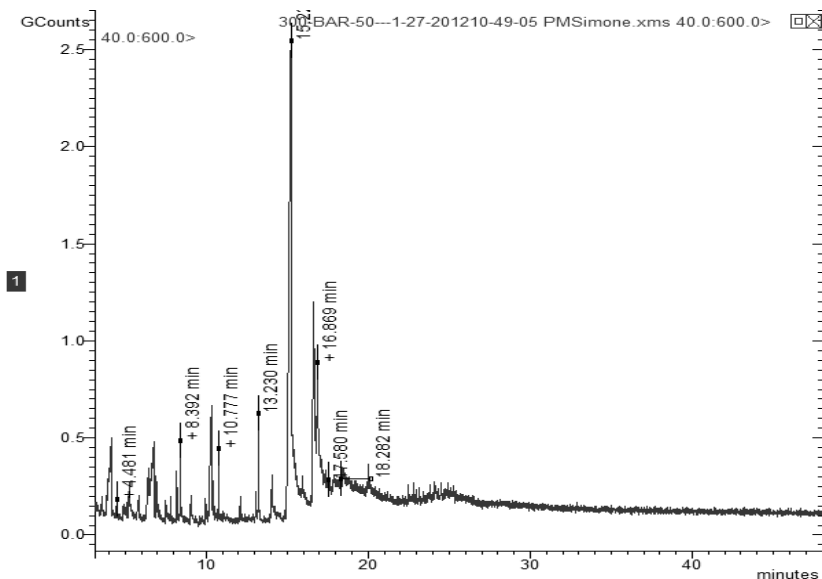
A7. CG-EM ESC 30 MPa/ 40 °C

Figura24: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 30 MPa e 40 °C.**Tabela 23: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 30 MPa e 40 °C.**

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
ácido hexanóico	4,16	0,29
ácido octanóico	6,52	0,94
ácido benzóico	6,83	0,96
ácido 9-oxononanóico	10,41	1,21
ácido tetradecanóico	13,09	0,66
ácido pentadecanóico	14,10	0,81
ácido n-hexadecanóico	15,30	32,73

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
ácido 9-12- octadecadienóico	16,75	23,49
ácido octadecanóico	16,96	7,69
outros	-	31,22

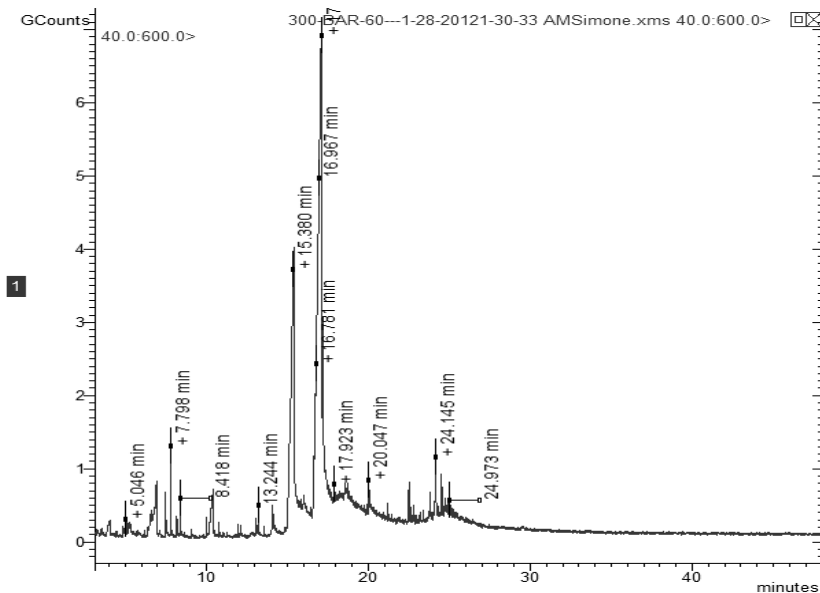
A8. CG-EM ESC 30 MPa/ 50 °C

Figura 25: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 30 MPa e 50 °C.**Tabela 24: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 30 MPa e 50 °C.**

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
ácido hexanóico	4,15	1,40
ácido octanóico	6,45	1,31
ácido benzóico	6,76	1,15
(E,E) 2,4-decadienal	7,82	0,79
ácido 9-oxononanoico	10,31	1,05
ácido n-hexadecanoico	15,21	53,99
ácido 9-12-octadecadienoico	16,64	18,81

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
ácido octadecanóico	16,88	8,67
outros	-	12,83

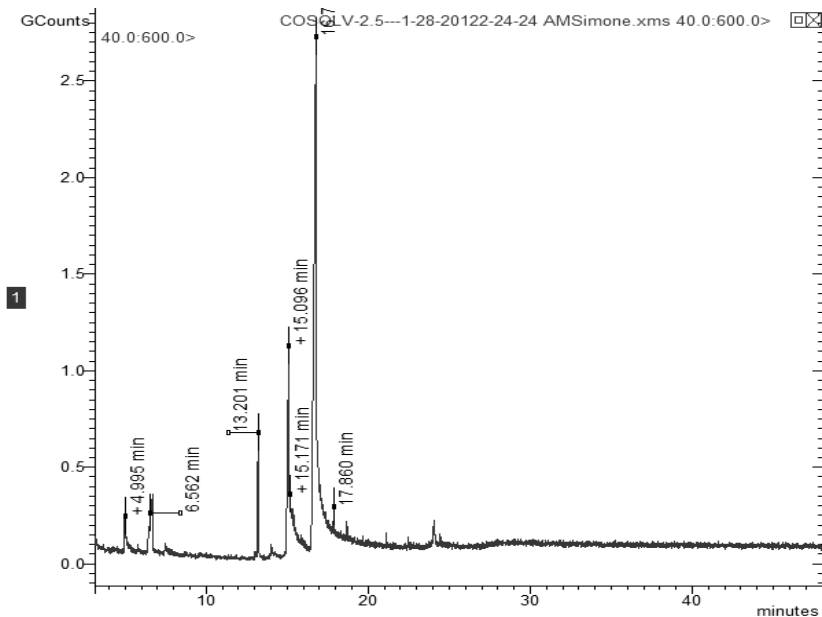
A9. CG-EM ESC 30 MPa/ 60 °C

Figura 26: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 30 MPa e 60 °C.**Tabela 25: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 30 MPa e 60 °C.**

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
2,4-decadienal	7,50	2,15
ácido tetradecanóico	13,09	0,48
ácido pentadecanóico	14,10	0,67
ácido n-hexadecanóico	15,21	21,44
ácido 9-12-octadecadienóico	16,64	30,20
ácido octadecanóico	17,19	5,40

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
7,22-ergostadienol	24,14	0,80
α -ergostenol	24,50	0,73
outros	-	38,12

A10. CG-EM ESC 20 MPa/ 50 °C/ 2,5 % de etanol

Figura 27:CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa, 50 °C e 2,5 % de etanol como cossolvente.**Tabela 26: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa, 50 °C e 2,5 % de etanol como cossolvente.**

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
ácido benzóico	6,56	0,09
ácido n-hexadecanóico	15,09	12,43
ácido 9-12-octadecadienóico	16,77	59,09
outros		28,39

A11. CG-EM ESC 20 MPa/ 50 °C/ 5 % de etanol

Figura 28: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa, 50 °C e 5 % de etanol como cossolvente.

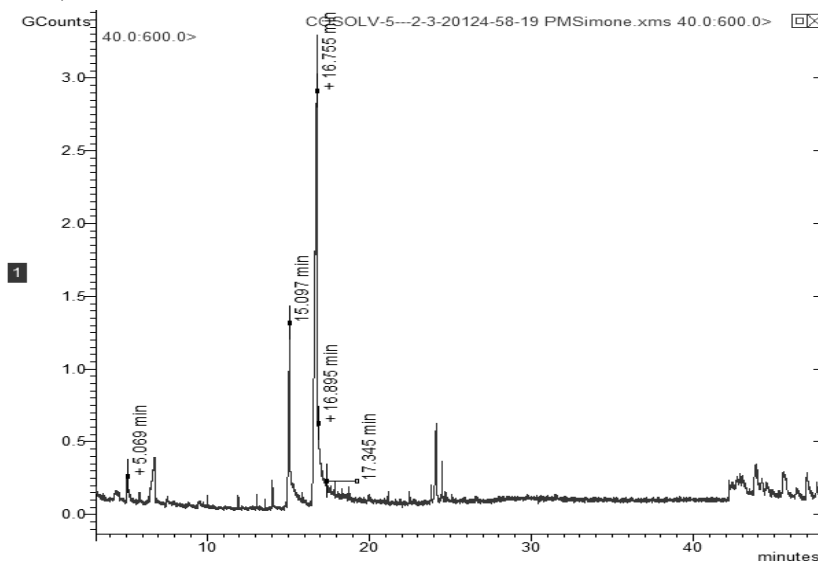
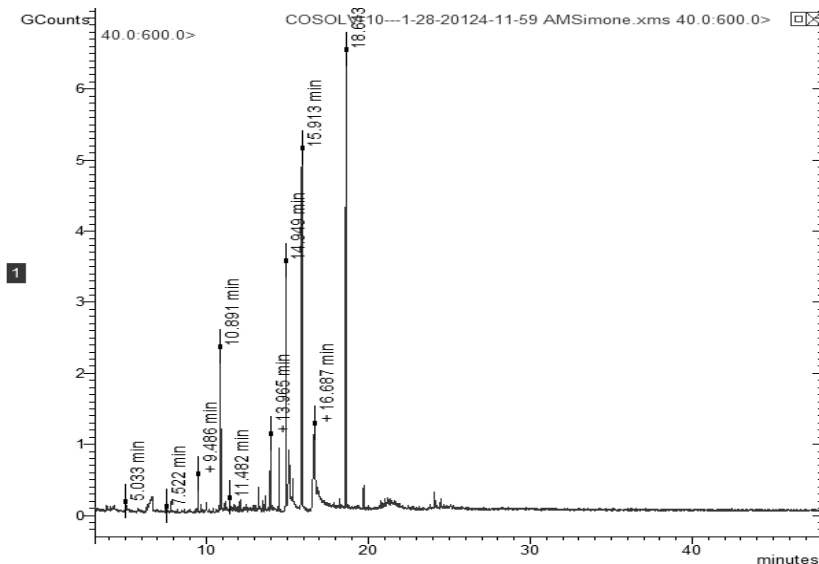


Tabela 27: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa, 50 °C e 5 % de etanol como cossolvente.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
ácido benzóico	6,73	0,32
ácido n-hexadecanóico	15,09	15,20
ácido 9-12-octadecadienóico	16,77	44,24
7,22-ergostadienol	24,11	2,31
α -ergostenol	24,48	1,34
outros		36,59

A12. CG-EM ESC 20 MPa/ 50 °C/ 10 % de etanol

Figura 29:CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa, 50 °C e 10 % de etanol como cossolvente.**Tabela 28: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por ESC a 20 MPa, 50 °C e 10 % de etanol como cossolvente.**

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
ácido benzóico	6,64	0,58
2,4-decadienal	7,80	0,25
ácido n-hexadecanóico	15,12	4,61
ácido 9-12-octadecadienóico	16,70	10,80
bis(2-ethylhexyl) ester	18,64	27,44
ácido hexanodióico		
outros	-	56,32

A13. CG-EM SOXHLET –HEXANO

Figura 30: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por soxhlet utilizando hexano como solvente.

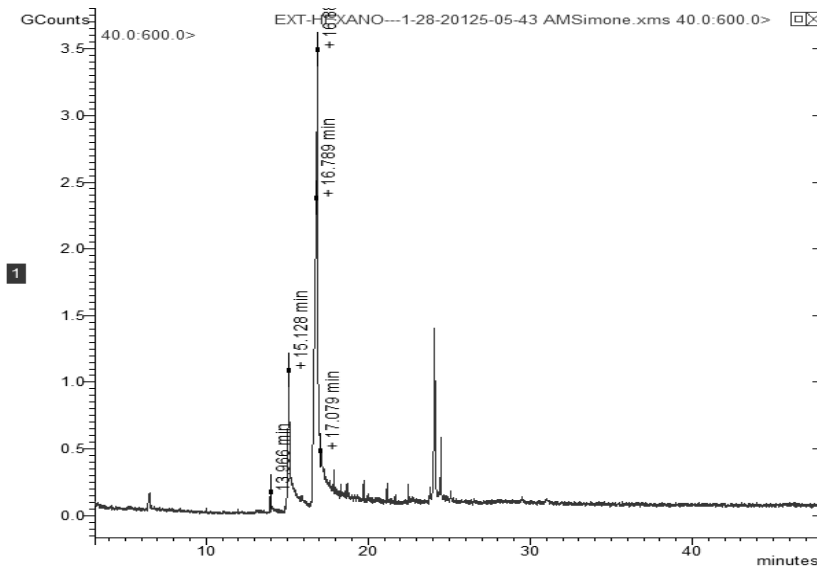


Tabela 29: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por soxhlet utilizando hexano como solvente.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
ácido n-hexadecanóico	15,13	9,10
ácido 9-12-octadecadienóico	16,83	70,49
7,22-ergostadienol	24,13	2,33
α -ergostenol	24,48	1,33
outros	-	16,75

A14. CG-EM SOXHLET – DICLOROMETANO

Figura 31: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por soxhlet utilizando diclorometano como solvente.

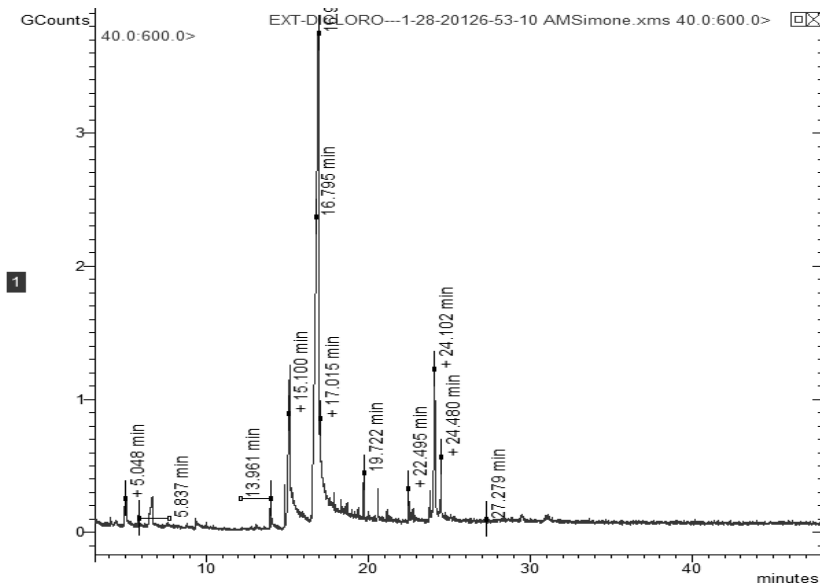
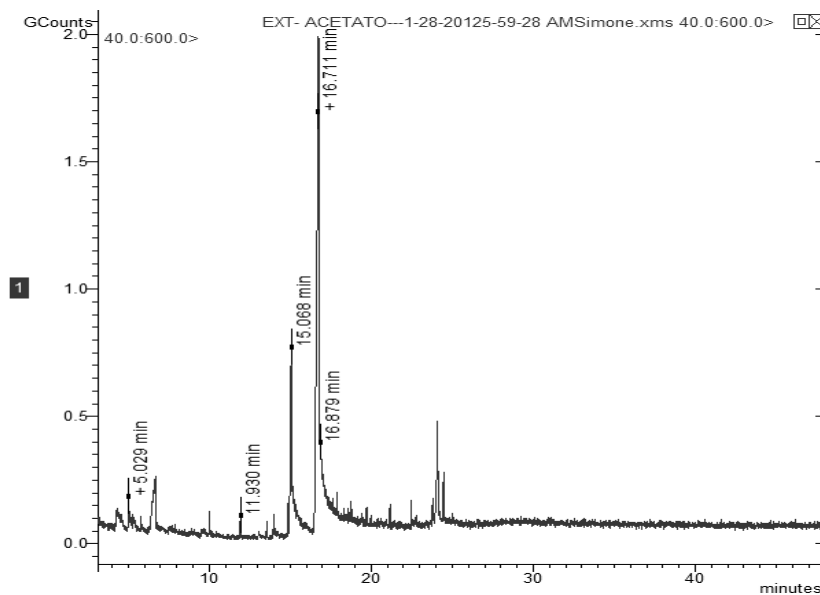


Tabela 30: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por soxhlet utilizando diclorometano como solvente.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
ácido benzóico	6,67	0,51
ácido n-hexadecanóico	15,14	10,78
ácido 9-12-octadecadienóico	16,89	39,04
ergosterol	24,10	5,89
7,22-ergostadienol	24,13	1,44
α -ergostenol	24,47	1,37
outros	-	40,97

A15. CG-EM SOXHLET – ACETATO DE ETILA

Figura 32: CG-EM do extrato de cogumelo do sol obtido por soxhlet utilizando acetato de etila como solvente.**Tabela 31:** Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de cogumelo do sol obtido por soxhlet utilizando acetato de etila como solvente.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
ácido benzóico	6,67	1,10
ácido n-hexadecanóico	15,07	9,98
ácido 9-12-octadecadienóico	16,73	68,89
ergosterol	24,05	4,24
7,22-ergostadienol	24,10	3,16
α -ergostenol	24,46	1,87
outros	-	10,76