

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Francisco Dalcin Vezaro

**EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE β -GLUCANOS DE
Lentinula edodes UTILIZANDO SOLVENTE EUTÉTICO E ÁGUA**

Santa Maria, RS
2022

Francisco Dalcin Vezaro

EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE β -GLUCANOS DE *Lentinula edodes* UTILIZANDO SOLVENTE EUTÉTICO E ÁGUA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Raquel Cristine Kuhn

Santa Maria, RS
2022

Vezero, Francisco
EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE B-GLUCANOS DE
Lentinula edodes UTILIZANDO SOLVENTE EUTÉTICO E ÁGUA /
Francisco Vezero.- 2022.
64 p.; 30 cm

Orientadora: Raquel Kuhn
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, RS, 2022

1. Extração de B-Glucanos 2. Solvente eutético 3.
Ultrasom 4. Compostos antioxidantes I. Kuhn, Raquel II.
Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Fatta CRB 10/1728.

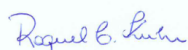
Declaro, FRANCISCO VEZARO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Francisco Dalcin Veزارo

EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE β -GLUCANOS DE *Lentinula edodes* UTILIZANDO SOLVENTE EUTÉTICO E ÁGUA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**.

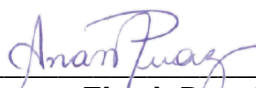
Aprovado em 30 de março de 2022:



Raquel Cristine Kuhn, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Ederson Rossi Abaide, Dr. (UFSM)



Ana Paula Manera Zicotti, Dra. (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS
2022

Resumo

EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE β -GLUCANOS DE *Lentinula edodes* UTILIZANDO SOLVENTE EUTÉTICO E ÁGUA

AUTOR: Francisco Dalcin Veزارo
ORIENTADORA: Raquel Cristine Kuhn

O shiitake é um cogumelo rico em polissacarídeos do tipo β -glucanos, moléculas de cadeia longa, que apresentam propriedades antioxidantes e benéficas para a saúde humana, além de apresentarem propriedades físico-químicas de interesse para a indústria alimentícia. Dessa forma, o principal objetivo deste estudo foi a obtenção de β -glucanos do shiitake através de extração assistida por ultrassom. Ensaio preliminares foram realizados para determinar a temperatura e o tempo de extração. Posteriormente, um delineamento composto central rotacional (DCCR) variando os ciclos de pulsação e a amplitude foi realizado onde o rendimento e a atividade antioxidante dos extratos foram avaliados. As extrações foram realizadas utilizando dois solventes, a água e um solvente eutético (cloreto de colina: glicerol). Os melhores rendimentos utilizando solvente eutético foram de 25,11 e 23,74% sob 88,36% de amplitude e 0,93 ciclo de pulsação e 100% de amplitude e 0,75 ciclo de pulsação, respectivamente. Enquanto que para água o rendimento foi de 23,47 e 22,75% com 100% de amplitude e 0,75 ciclo de pulsação e 88,36% de amplitude e 0,93 ciclo de pulsação, respectivamente. Análises de açúcares totais, proteínas e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) foram realizadas nos extratos precipitados em etanol, obtendo maiores concentrações de açúcares nas mesmas condições que os melhores rendimentos, enquanto que as proteínas foram melhor extraídas em amplitudes intermediárias usando água e maiores amplitudes com solvente eutético. Além disso, foram encontradas bandas no FT-IR semelhantes a outros estudos que analisaram β -glucanos. Assim, este estudo avaliou um solvente eutético até o momento não utilizado na extração por ultrassom de compostos antioxidantes, demonstrando uma alternativa para obtenção de compostos com propriedades de interesse para a indústria de alimentos ou farmacêutica a partir de shiitake fora do prazo para consumo humano.

Palavras-chave: Shiitake. Ultrassom. Solvente eutético. Polissacarídeos.

Abstract

ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF β -GLUCANS FROM *Lentinula edodes* USING DEEP EUTECTIC SOLVENT AND WATER

AUTHOR: Francisco Dalcin Vezero

ADVISOR: Raquel Cristine Kuhn

Shiitake is a mushroom rich in β -glucan type polysaccharides, long-chain molecules that have antioxidant properties that are beneficial to human health, in addition to having isolated physical properties of interest to the food industry. In this way, the main objective of this study was to obtain shiitake β -glucans through ultrasound-assisted extraction. Preliminary tests were carried out to determine the temperature and the extraction time. Subsequently, a central composite rotational design (CCRD) varying the pulsation cycles and amplitude was performed where the yield and antioxidant activity of the extracts were obtained. Extractions were carried out using two solvents, water and a deep eutectic solvent (choline chloride: glycerol). The best yields using eutectic solvent were 25.11 and 23.74% in 88.36% amplitude and 0.93 pulse cycle and 100% amplitude and 0.75 pulse cycle, respectively, while for water it was of 23.47 and 22.75% with 100% amplitude and 0.75 pulse cycle and 88.36% amplitude and 0.93 pulse cycle, respectively. Analyzes of total sugars, proteins, and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) were performed on the ethanol precipitated extracts, obtaining higher concentrations of sugars under the same conditions as the best yields, while proteins were better extracted at intermediate amplitudes using water and higher amplitudes with eutectic solvent. In addition, bands were found in the FT-IR similar to other studies that analyzed β -glucans. Thus, this study evaluated a eutectic solvent not used so far in the ultrasonic extraction of antioxidant compounds, demonstrating an alternative to obtain compounds with properties of interest to the food or pharmaceutical industry from shiitake outdated for human consumption.

Keywords: Shiitake. Ultrasound. Deep eutectic solvent. Polysaccharides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais tipos de moléculas de β -glucanos encontrados em diferentes tipos de alimentos.	14
Figura 2 - Esquema do processo físico da cavitação por ultrassom.	18
Figura 3 - Superfície de resposta do rendimento de precipitados usando água como solvente.	41
Figura 4 - Superfície de resposta da obtenção de proteínas usando água como solvente.	42
Figura 5 - Superfície de resposta da obtenção de açúcares usando água como solvente.	43
Figura 6 - Superfície de resposta do rendimento de precipitados usando solvente eutético.	46
Figura 7 - Superfície de resposta da obtenção de proteínas usando solvente eutético.	47
Figura 8 - Superfície de resposta da obtenção de açúcares usando solvente eutético.	48
Figura 9 - Análise por FT-IR da amostra de shiitake utilizada nas extrações.	52
Figura 10 - Análise por FT-IR do ensaio 4, com 25,11% de rendimento, utilizando solvente eutético.	52
Figura 11 - Análise por FT-IR do ensaio 6, com 23,47% de rendimento, utilizando água.	53
Figura 12 - Análise por FT-IR do controle utilizando água	53
Figura 13 - Análise por FT-IR do controle utilizando solvente eutético.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Experimentos preliminares.....	23
Tabela 2 - Ensaios do planejamento de experimentos utilizando ultrassom, variáveis reais e codificadas (entre parênteses).....	25
Tabela 3 - Extrações utilizando ultrassom com intensidade e pulso máximo e os respectivos resultados de açúcares, análise antioxidante por concentração de trolox e rendimento.	28
Tabela 4 - Resultados da extração assistida por ultrassom utilizando água e solvente eutético.....	32
Tabela 5 - Comparação com outros estudos levando em consideração os resultados do método fenol-sulfúrico como polissacarídeos.....	37
Tabela 6 - Comparação da obtenção de polissacarídeos brutos com outros trabalhos.	38
Tabela 7 - Resultado dos melhores rendimentos de polissacarídeos brutos descontando os valores de proteínas encontrados em comparação a outro estudo que realizou a desproteinização dos polissacarídeos.	38
Tabela 8 - ANOVA dos extratos precipitados utilizando água como solvente no meio ultrassônico.	39
Tabela 9 - ANOVA dos resultados usando solvente eutético na extração.	44
Tabela 10 - Comparação entre as extrações utilizando banho ultrassônico com os melhores resultados obtidos utilizando a sonda ultrassônica.....	50
Tabela 11 - Estudos que realizaram análise por FT-IR de β -Glucanos e seus comprimentos de ondas e ligações atribuídas comparadas às análises por FT-IR realizadas no presente trabalho.	55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVOS	12
1.1.1 Objetivo Geral	12
1.1.2 Objetivos Específicos	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 SHIITAKE (<i>Lentinula edodes</i>)	13
2.2 PROPRIEDADES E CARACTERÍSTICAS DO SHIITAKE	13
2.3 EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS	15
2.3.1 Métodos de extrações convencionais	15
2.3.2 Métodos de extração alternativos	16
2.3.2.1 Extração por Ultrassom	16
2.3.2.2 Extração por meio de solvente eutético	20
3. METODOLOGIA	22
3.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	22
3.2 PREPARAÇÃO DO SOLVENTE EUTÉTICO	22
3.3 EXPERIMENTOS PRELIMINARES	22
3.4 EXTRAÇÃO CONVENCIONAL	24
3.5 EXTRAÇÃO EM BANHO DE ULTRASSOM	24
3.6 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) PARA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM	24
3.7 ANÁLISE DO PODER ANTIOXIDANTE NA REDUÇÃO FÉRRICA (FRAP)	25
3.8 ANÁLISE DE AÇÚCARES	26
3.9 ANÁLISE DE PROTEÍNAS	27
3.10 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
4.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES	28

4.2 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....	31
4.3 EXTRAÇÃO EM BANHO ULTRASSÔNICO	50
4.4 ANÁLISES POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).....	51
5. CONCLUSÕES	57
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	58
6. REFERÊNCIAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

O shiitake (*Lentinula edodes*) é um dos cogumelos mais utilizados na alimentação humana em função do sabor, valor nutritivo e capacidade preventiva para diversas doenças (XUE et al., 2019). Além de possuir vitaminas, também é rico em polissacarídeos, sendo os β -glucanos presente em maior quantidade (LEONG et al., 2021).

Os β -glucanos são moléculas de cadeia longa que possuem propriedades vantajosas à saúde humana (WANG et al., 2017). Entre seus benefícios estão o combate a doenças ou complicações cardiovasculares, hipoglicêmicas, hipocolesterolêmicas e antitumorais, além de potencial antioxidante, antifúngico e antimicrobiano (KHAN et al., 2018; BISEN et al., 2010).

Os β -glucanos também possuem características como solubilidade, poder de intumescimento, viscosidade, formação de gel e propriedades de ligação com outros compostos. Dessa forma, podem atuar como espessantes, estabilizantes, emulsificantes e gelatinizantes, assim, tendo potencial para atuar na indústria alimentícia (VICENZI et al., 2017).

Como os produtores e fornecedores do shiitake costumam descartar a parte inferior do caule, não se faz necessário a utilização de cogumelos que poderiam ser utilizados na alimentação humana para obtenção dos polissacarídeos. (MENK et al. 2019). Além disso, os cogumelos que estão fora do prazo de validade ou estragam, em função da baixa durabilidade do cogumelo *in natura*, de apenas 10 dias, podem ser utilizados para extração dos polissacarídeos sendo, portanto, uma alternativa no descarte desses resíduos.

As extrações dos polissacarídeos podem ser realizadas de diversas formas, sendo a tradicional utilizando água a temperatura elevada em constante agitação pouco eficiente. Métodos mais tecnológicos e agressivos podem ser uma opção para melhorar a capacidade de obtenção desses polissacarídeos, como a extração por fluido supercrítico, extração subcrítica ou ultrassom. Sendo a cavitação gerada pelo ultrassom um processo que pode favorecer o rompimento celular do shiitake, facilitando a passagem do composto alvo para o solvente (CHEUNG et al. 2012, ZHANG et al. 2018, ZHAO et al. 2018 e MORALES et al. 2019a).

Diferentes tipos de solventes podem ser aplicados na extração dos polissacarídeos como água, solventes ácidos, alcalinos e salinos (DOU et al. 2021). Além desses, os solventes eutéticos têm sido empregados devido às suas características semelhantes à dos líquidos iônicos, porém são considerados alternativas ecológicas e baratas em comparação aos líquidos iônicos (SHISHOV et al., 2020). Zhang e Wang (2017), Saravana et al. (2018) e Shafie et al. (2019) extraíram polissacarídeos utilizando diferentes tipos de solventes eutéticos, porém de outras amostras como os tubérculos da *Dioscorea opposita Thunb*, de algas marinhas (*Saccharina japônica*) e *Averrhoa bilimbi* (limão-japonês), respectivamente.

Em vista do que foi apresentado, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a extração assistida por ultrassom utilizando água e solvente eutético a base de cloreto de colina:glicerol. Até o momento não foram encontrados trabalhos na literatura utilizando solventes eutéticos para extração de shitake.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a extração assistida por ultrassom de polissacarídeos do shiitake (*Lentinula edodes*) utilizando solvente eutético e água.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar ensaios de extração assistida por ultrassom de polissacarídeos do shiitake (*Lentinula edodes*) utilizando água como solvente aplicando um delineamento composto central rotacional avaliando a amplitude e o pulso de sonicação;
- Realizar ensaios de extração assistida por ultrassom de polissacarídeos do shiitake (*Lentinula edodes*) utilizando solvente eutético aplicando um delineamento composto central rotacional avaliando amplitude e o pulso de sonicação;
- Avaliar as concentrações de açúcares totais, proteínas e compostos antioxidantes presentes nos extratos obtidos.
- Realizar análises por FT-IR das amostras utilizadas para extração e dos precipitados em etanol extraídos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SHIITAKE (*Lentinula edodes*)

O shiitake, também conhecido como *Lentinula edodes*, é um cogumelo comestível e medicinal que se originou na China, sendo introduzido no Japão, Coréia e Rússia por intermédio de cultivadores chineses. O consumo e utilização do shiitake se devem ao seu valor nutricional, mas também foi muito utilizado em função de suas capacidades medicinais (XUE et al., 2019).

Este macrofungo é o segundo cogumelo mais consumido no mundo. Desde a antiguidade era utilizado como alimento principalmente no continente asiático e considerado um remédio popular preventivo. Estudos comprovaram a eficácia da utilização do cogumelo na prevenção ou combate a doenças ou complicações cardiovasculares, hipoglicêmicas, hipocolesterolêmicas e antitumorais devido à presença de compostos bioativos (KHAN et al., 2018), que segundo a literatura podem apresentar potencial antioxidante, antifúngico e antimicrobiano (BISEN et al., 2010).

A bioatividade presente no shiitake está relacionada a presença de moléculas de proteínas, peptídeos, polissacarídeos, terpenóides e esteróis na sua composição. A *Lentinula edodes* demonstrou que seus constituintes são eficazes no tratamento de vários tumores e infecções. Um dos compostos responsáveis pelos efeitos imunológicos são os polissacarídeos complexos, conhecidos como β -glucanos, que são encontrados nas paredes celulares do cogumelo (FINIMUNDY et al., 2014).

2.2 PROPRIEDADES E CARACTERÍSTICAS DO SHIITAKE

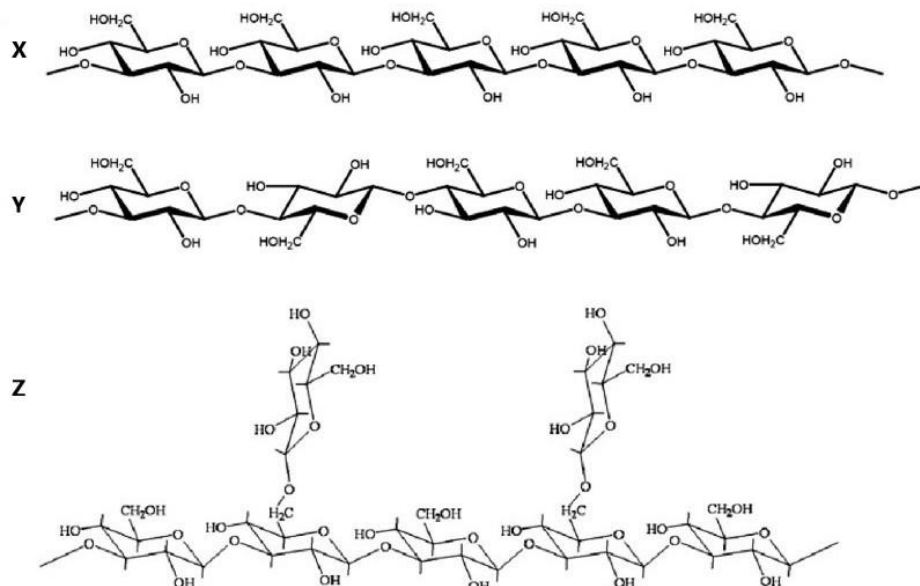
O shiitake possui propriedades funcionais a saúde humana devido a presença de polissacarídeos bioativos. Os β -D-glucanos, heteroglucanos, xilomananos, lentinanos e eritadenina, são uns dos compostos responsáveis pelos benefícios da inclusão desse alimento na dieta, porém ainda há outros nutrientes como, açúcares livres, incluindo arabinose, arabitol, manose, manitol, trealose e glicerol; vitaminas (B2, B12, D2) e fibras alimentares (HOBBS, 2000; XIAOKANG et al., 2020; MAHMOOD et al., 2021).

As propriedades biológicas estão diretamente relacionadas à estrutura molecular dos polissacarídeos, como a forma da cadeia, tipo de ligação, nível de polimerização, composição química, peso molecular e solubilidade em água. Sendo assim, os β -glucanos obtidos de diferentes fontes, compartilhando as mesmas

estruturas básicas, geralmente mostram bioatividades diferentes, devido as possíveis variações estruturais da molécula (WANG et al., 2017).

Há uma quantidade de variações das moléculas de β -glucanos na natureza de forma significativa, sendo as comumente encontradas no shiitake demonstradas na Figura 1. O arranjo mais simples β -(1,3)-glucanos (Figura 1.X) são encontrados principalmente na parede celular ou como polissacarídeos intracelulares de armazenamento de energia em bactérias e fungos. Já a ordenação β -(1,3;1,4)-glucano (Figura 1.Y), frequentemente encontrado na parede celular de grãos de cereais (como cevada e aveia). Outra ordenação molecular é o ramificado β -(1,3; 1,6)-glucanos (Figura 1.Z) que são comuns em algas marrons (conhecidas como laminarina), leveduras de panificação e cogumelos, como *Lentinula edodes* (conhecido como lentinano com capacidade antitumoral) o qual apresenta uma ligação β -(1,3)- com a espinha dorsal da glicose *D*, onde o β -(1,6)-glucopiranosídeo ramifica em cada terceira unidade de glicose (LI e CHEUNG, 2019).

Figura 1 - Principais tipos de moléculas de β -glucanos encontrados em diferentes tipos de alimentos.



Fonte: Adaptado de Li e Cheung (2019)

Os β -glucanos também possuem funcionalidades tecnológicas relacionadas às suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, poder de intumescimento, viscosidade, formação de gel e propriedades de ligação com outros compostos. Essas características físicas diversas podem contribuir em alimentos como espessantes,

estabilizantes, emulsificantes e gelatinizantes, o que possibilita sua utilização na produção de alimentos (VICENZI et al., 2017).

Além disso, Sari et al. (2017) indicaram a quantidade de glucanos no píleo (chapéu) e nos caules do shiitake, já desidratados, o primeiro apresentou 25,309 g/100g de β -glucanos o segundo 19,779 g/100g de β -glucanos, também determinaram a quantidade de α -glucanos de 1,440 e 0,760 g/100g respectivamente. Morales et al. (2019a) demonstraram que as amostras da *Lentinula edodes* utilizadas nos experimentos continham 29% de β -glucanos e um total de 34,3% de polissacarídeos.

Devido às moléculas dos polissacarídeos presentes na *Lentinula edodes* possuem estruturas com funcionalidade a saúde humana e características físico-químicas de utilidade industrial, torna-se proveitosa à extração desses compostos para uma possível aplicação. Além disso, Menk et al., (2019) indicam que o terço inferior dos estipes do shiitake são descartados, mas Sari et al. (2017) confirmam que ainda possuem propriedades similares ou equivalentes ao restante do cogumelo, sendo assim, podem ser aproveitados para outras finalidades.

2.3 EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

2.3.1 Métodos de extrações convencionais

O êxito na realização da extração de compostos provenientes dos grãos, vegetais ou fungos depende de algumas variáveis, sendo o método convencional, através do contato entre o sólido e o solvente sob agitação, muito utilizado. Benito-Román et al. (2011) realizaram testes para obtenção de β -glucanos da cevada com alterações na temperatura, pH, tempo, razão sólido:líquido e tamanho de partícula, além disso, utilizaram água como solvente devido as características polares dos β -glucanos. MAO et al. (2019) apontaram que a extração sólido-líquido pode ser utilizada na obtenção de polissacarídeos como a pectina de frutas e vegetais, sendo o pH, a temperatura e o solvente os principais parâmetros avaliados.

A extração sólido-líquido também foi estudada por outros autores para obtenção de compostos da *Lentinula edodes*. O método que utiliza água quente como solvente é o método mais simples para extração de polissacarídeos do shiitake. Ren et al. (2018) obtiveram um rendimento de 5,03% para polissacarídeos realizando a extração com água a 80 °C durante 3 horas do pó de *Lentinula edodes* seco, seguido

pela precipitação dos polissacarídeos em álcool 1:3 (v:v) por 12 horas a 4 °C, e posterior centrifugação do material

De outro modo, Morales et al. (2019a) efetuaram extrações de pó de shiitake (0,5 g) em 50 mL de água a 100 °C em diferentes tempos (15, 30, 45 e 60 min) sob agitação constante. Na sequência a filtração a vácuo e o congelamento do extrato solúvel foram realizadas. As misturas obtidas das extrações foram combinadas com três volumes de etanol e incubados por algumas horas a 4 °C. Os precipitados foram centrifugados e liofilizados. Os resultados demonstraram que o melhor rendimento (5,02%) foi obtido com tempo de extração de 15 minutos.

Morales et al. (2019b) submeteram o pó do cogumelo (10 g) à extração em diferentes temperaturas (60 a 98 °C) pelo período de 1, 2 e 3 h em frascos com 300 mL de água (33,3 g/L). Na sequência, diferentes razões substrato:solvente 33,3, 50, 66,7, 133,3 e 200 g/L a 98 °C durante 1 h foram avaliadas. Os resultados demonstraram rendimentos semelhantes nas diferentes condições estudadas, sendo o melhor resultado com 5% p:p de rendimento que foi obtido a 98 °C durante 3 h de extração. Ao ser analisado o fator razão substrato:solvente foi verificado que não apresentou efeitos significativos para maior obtenção de β -D-glucanos.

Os estudos abordados utilizando água quente na extração tiveram resultados próximos, com rendimentos entorno de 5% de polissacarídeos. Sabe-se que outros métodos mais agressivos podem favorecer a extração de uma maior porção de polissacarídeos, na sequência, serão descritos outros métodos já utilizados e seus respectivos resultados.

2.3.2 Métodos de extração alternativos

2.3.2.1 Extração por Ultrassom

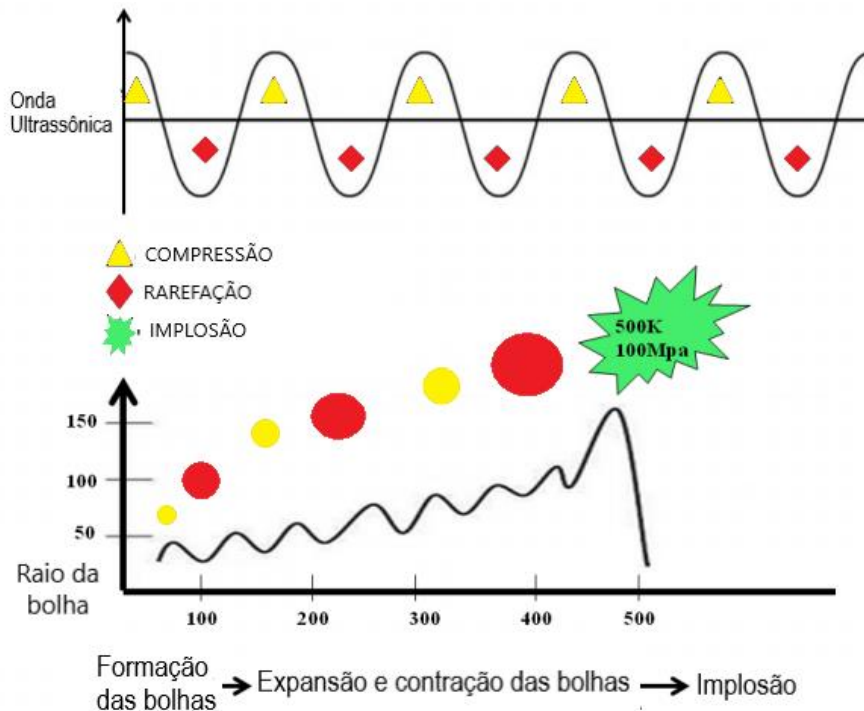
A necessidade de maiores rendimentos em processos extrativos força a utilização de técnicas alternativas, as quais possam aperfeiçoar os rendimentos obtidos. A extração assistida por ultrassom já vem sendo aplicada na obtenção de compostos bioativos (WEN et al., 2018). O objetivo da extração ultrassônica é provocar a dissolução dos compostos no solvente, sendo a cavitação gerada pela oscilação da frequência ultrassônica a responsável pela destruição da estrutura celular. O rompimento celular facilita a transferência das substâncias para o meio

líquido, as quais eram dificilmente acessíveis com a parede celular (ZHAN et al., 2020).

As ondas ultrassônicas de alta intensidade atuam no sistema extrativo por efeitos não lineares ocasionados por altas amplitudes, como a cavitação, pressão de radiação, fluxo e deslocamento de sólidos. Dessa forma, essas atividades ultrassônicas provocam efeitos físicos e químicos, como calor, agitação, difusão, instabilidades da interface, fricção, ruptura mecânica e reações (YAO et al., 2020). Com essas características e mecanismos observados, a extração por ultrassom apresenta vantagens em relação a outros métodos, como, baixa temperatura de operação, curto tempo de extração, alta taxa de conversão e operação simples. Entretanto, uma possível desvantagem desse método, seria a possibilidade de destruição da estrutura molecular dos polissacarídeos em altas potências e longos tempos de extração, exigindo um controle para evitar a degradação (ZHAN et al., 2020).

A intensidade da cavitação é um dos principais encarregados para a extração ultrassônica, sendo o fator determinante na formação dos tamanhos das bolhas que entram em colapso, assim, ocasionando forças de cisalhamento mecânico. Por isso, é relatado que a faixa de frequência entre 20 e 100 kHz são as mais propícias a extrações de moléculas. Elevados níveis de frequência e potência ultrassônica resultam na diminuição do tamanho das bolhas de cavitação, porém tornam-se maior em quantidade (OJHA et al., 2020).

Figura 2 - Esquema do processo físico da cavitação por ultrassom.



Fonte: adaptado de WEN et al., 2018.

As bolhas de cavitação são formadas quando a baixa pressão produzida pela rarefação excede o limite da força intermolecular do meio líquido. Se a pressão acústica for suficiente, as bolhas de cavitação irão aumentar e contrair durante os ciclos de rarefação e compressão até um tamanho crítico e irá ocorrer à implosão como ilustrado na Figura 2. Porém, se as bolhas não atingirem o tamanho necessário para o colapso, reduzirá drasticamente a eficiência de extração. As implosões das bolhas geram de forma instantânea circunstâncias extremas de temperatura e pressão em nível molecular. Esses fenômenos provocam forças de cisalhamento e turbulência que agredem a parede celular corrompendo-a, assim, aumentando a área de superfície de contato entre a fase líquido e sólido, e aumentando a liberação de substâncias para o solvente (FU et al., 2020).

Devido as vantagens proporcionadas pelo uso do ultrassom, alguns autores buscaram otimizar o rendimento de polissacarídeos obtidos do shiitake. Inclusive, em alguns estudos, foram combinadas outras técnicas com ultrassom para aumentar a obtenção dos polissacarídeos.

Morales et al. (2019a) utilizaram ultrassom com potência de 550 W e temperatura de 50 °C variando o tempo de extração em 15, 30, 45 e 60 minutos. Os

melhores resultados foram com 60 minutos de extração, o qual obteve rendimento de 10,14% de β -glucanos. Além disso, realizaram a extração de material lipofílico com dióxido de carbono (CO₂) supercrítico como pré-tratamento para posterior uso do ultrassom. Os parâmetros usados na extração com fluido supercrítico foram CO₂ a pressão de 35 MPa a 40 °C por 3 horas. A eficiência de extração de β -glucanos foi de 14,46%.

Já Cheung et al. (2012) utilizaram 3 g de shiitake moído (partículas inferiores a 250 μ m) em 90 mL de água destilada com proporção sólido líquido 1:30 (p:v). A extração assistida por ultrassom foi na potência de 130 W e intensidade de 26,5 W/cm², sendo a temperatura mantida entre 45-50° C, com variação do tempo entre 1 e 60 min. Após, o extrato foi centrifugado e o polissacarídeo foi precipitando com etanol a concentração final de 80% a 4° C. O precipitado foi centrifugado e liofilizado. Os melhores rendimentos foram com aproximadamente 15 e 60 min de extração obtendo em torno de 12% e 13%, respectivamente.

De outro modo, Zhao et al. (2018) realizaram inicialmente a extração dos lipídeos com éter de petróleo a 30-60 °C por 12 h em um aparelho soxhlet das amostras de *Lentinula edodes* seca. A extração dos polissacarídeos foi avaliada em diferentes potências ultrassônicas (240–320 W), temperatura de extração (40–60 °C) e tempo de extração (15–25 min). Os extratos passaram por centrifugação, foram filtrados e concentrados, para obter os polissacarídeos precipitados foram adicionados 4 volumes de etanol e acondicionado durante algumas horas a 4 °C. Os resultados demonstraram que as condições ideais na faixa estudada foram a 45 °C, tempo de extração de 21 min e potência ultrassônica de 290 W, obtendo um rendimento de 9,75%.

Utilizando uma estratégia diferente, Zhang et al. (2018) realizaram um pré-tratamento com água subcrítica, utilizando 1 g de *Lentinula edodes* na autoclave a 290 °C e pressão de 5 MPa. Após o resfriamento, realizou-se a extração ultrassônica com frequência de 25 kHz. As variáveis utilizadas no procedimento ultrassônico foram temperatura de 120-140 °C, tempo de 40-60 minutos, razão líquido:sólido (25-35 mg/mL) e potência ultrassônica (150-250 W). Os melhores resultados apresentaram 17,34% de polissacarídeos, obtidos à 140 °C por 40 minutos de extração, em uma relação sólido:líquido de 25 mg/mL e potência ultrassônica de 190 W.

Dessa forma, a utilização de diferentes tipos de solventes, juntamente com o ultrassom, podem ser uma opção para otimizar a extração dos compostos alvo. Sendo assim, os solventes eutéticos tem capacidade para serem explorados na obtenção de polissacarídeos do shiitake.

2.3.2.2 Extração por meio de solvente eutético

Os solventes eutéticos são gerados através da combinação de um doador e receptor de ligação de hidrogênio em estado líquido a temperatura ambiente. Por possuírem características como alta estabilidade térmica, não sendo voláteis e possuindo uma capacidade de rápida dissolução de muitos compostos orgânicos e inorgânicos, são considerados alternativas ecológicas e baratas em comparação aos líquidos iônicos. Dessa forma, apresentam uma ampla aplicação na química analítica, na separação cromatográfica, análise eletroquímica, preparação de amostras e principalmente como extratores (SHISHOV et al., 2020).

Os solventes eutéticos podem ser produzidos apenas com a mistura de componentes a temperaturas na faixa de 50 °C a 100 °C e sem formação de subprodutos (ZDANOWICZ et al., 2018). Outros meios de produção são através de técnicas de liofilização e extrusão. Além disso, Vilková et al. (2020) mencionam que as características físico-químicas dos solventes eutéticos podem ser alteradas modificando a razão molar da mistura, o teor de água, o tipo de receptor e doador de hidrogênio. As peculiaridades do solvente gerado, como viscosidade, densidade, condutividade, tensão superficial e polaridade são fatores determinantes para sua aplicação, sendo a alta viscosidade um dos principais obstáculos na implementação de solventes eutéticos na extração, tem-se utilizado água para reduzir a viscosidade e assim melhorar a transferência de massa.

A extração utilizando sistema água-solvente, demonstra ser mais eficaz em comparação ao solvente puro, por conta da formação de ligações de hidrogênio pela água com os vários tipos de analitos favorecer a extração de moléculas mais polares (VILKOVÁ et al., 2020). As características dos solventes eutéticos, como capacidade de dissolução de biopolímeros, biodegradabilidade, não toxicidade, polaridade, reciclagem e baixo custo os fazem compatíveis na extração de polissacarídeos (ZDANOWICZ et al., 2018).

Zhang e Wang (2017) realizaram testes de extração assistida por ultrassom de polissacarídeos de *Dioscorea opposita Thunb* utilizando diferentes tipos de solventes

eutéticos. Os experimentos indicaram que cloreto de colina-1,4-butanodiol (CCB) apresentou melhores resultados, provavelmente devido a maior capacidade de ligação de hidrogênio e mais interações eletrostáticas do CCB com polissacarídeos do que os outros solventes. A proporção molar entre 1,4-butanodiol e cloreto de colina varia entre 0,5:1 até 5:1, a concentração de água verificada a 10-50%, a relação sólido-líquido 10-50 mL/g, temperatura de extração entre 50-100 °C e tempo de extração de 10-60 minutos foram avaliados. Os melhores resultados foram obtidos utilizando teor de água de 32,89%, temperatura de extração de 94 °C, tempo de extração de 45 min, proporção molar 4:1 (1,4-butanodiol:cloreto de colina) e razão líquido-sólido de 30 mL/g produzindo um rendimento máximo de extração de 16,09%.

Saravana et al. (2018) investigaram a extração de polissacarídeos de algas marinhas (*Saccharina japonica*) através da combinação de solvente eutético com extração subcrítica com água. As variáveis estudadas foram a temperatura (100-150 °C), pressão (10–50 bar), conteúdo de água (50-70%) e relação líquido:sólido (30–50 mL/g). As condições ideais foram 150 °C, 19,85 bar e 70% de teor de água, e a razão líquido:sólido de 36,81 mL/g apresentaram alto rendimento de alginato (28,12%) e fucoidano (14,93%). Além disso, o cloreto de colina:glicerol (razão molar 1:2) foi o solvente eutético que resultou em um melhor rendimento para ambos os polissacarídeos, em comparação aos outros solventes eutéticos e com rendimentos duas vezes superior que utilizando água/HCl como solvente.

Nos experimentos realizados por Shafie et al. (2019) foram testadas as aplicações de solventes eutéticos para a obtenção de pectina de *Averrhoa bilimbi* (limão-japonês). Para isso, foram avaliadas quatro variáveis na extração, a porcentagem de solvente eutético (3-5%), o tempo de extração (1,5-2,5 horas), a temperatura (60-80 °C) e a razão molar dos componentes do solvente eutético (cloreto de colina: ácido cítrico monohidratado, 2:1-1:2). A condição ideal foi de 3,74% de solvente (p:v), durante 2,5 h de extração, temperatura de 80 °C e razão molar de 1:1, sendo o máximo rendimento de 14,44%.

Sendo assim, através dos vários tipos de extrações abordados, planeja-se elaborar uma metodologia que resulte em uma maior eficiência de obtenção de polissacarídeos. Para comparação de resultados e avaliação dos melhores métodos foram realizadas extrações convencionais e metodologias de extrações alternativas.

3. METODOLOGIA

3.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

O shiitake *in natura* que estava fora do prazo para consumo humano e seria descartado, foi triturado em um processador de alimentos, distribuído uniformemente em bandejas e levado à estufa sob temperatura de 60 °C; onde ficou por algumas horas até atingir peso constante. Posteriormente a secagem, realizou-se a maceração do cogumelo obtendo-se partículas inferiores a Tyler 10 (1,7 mm).

3.2 PREPARAÇÃO DO SOLVENTE EUTÉTICO

Para preparar o solvente eutético foi realizada a secagem do cloreto de colina (Sigma Aldrich, Brasil) em uma estufa a 120 °C por 4 h. Após, foi misturado 50 g de cloreto de colina e 100 g de glicerol a temperatura de 60 °C até a diluição total do cloreto de colina. Em seguida, foi adicionado 30 g de água (20% de água) para reduzir sua viscosidade e, por fim, o solvente foi levado ao dessecador até posterior uso.

3.3 EXPERIMENTOS PRELIMINARES

O aparelho experimental para extração assistida por ultrassom era composto por um reator (250 mL de capacidade) revestido com uma camisa e conectado a um banho de água termostático (precisão de temperatura de $\pm 1,0$ °C) para controle de temperatura, um processador de ultrassom de alta intensidade de 400 W e frequência de 24 kHz (Hielscher, Modelo UP 400S, Alemanha). O ultrassom foi equipado com uma sonda de titânio (Modelo Horn H22, Dica 22), apresentando uma intensidade máxima de $85 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, sendo a amplitude de operação de 20 a 100% e ciclo de pulsação de 0 a 1.

Foram realizados ensaios preliminares para determinar as melhores condições de tempo e temperatura. Para isso, utilizou-se 1,25 g de shiitake e 50 mL de solvente junto a sonda ultrassônica, operando com ciclo de pulso de 1 e máxima amplitude (100%). Os testes foram realizados nas temperaturas de 10 °C, 25 °C e 80 °C pelo período de 30 min. Na melhor temperatura foram verificados os tempos de extração de 15, 30, 45 e 60 min. Na Tabela 1, verifica-se as condições dos experimentos preliminares realizados.

Também foram avaliados dois tipos de solvente nos ensaios preliminares, água, solvente eutético e algumas combinações: solvente eutético e água na razão de 1:1 e extração com solvente eutético durante 30 min seguido de mais 30 min com água.

Tabela 1 - Experimentos preliminares.

Teste	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	Solvente eutético	25	30
2	Solvente eutético	25	30
3	Solvente eutético	80	30
4	Solvente eutético	80	30
5	Água	25	30
6	Água	25	30
7	Água	25	30
8	Água	80	30
9	Água	80	30
10	Água	80	30
11	Água	80	30
12	Água	10	30
13	Solvente eutético: água (1:1)	25	30
14	Água	25	15
15	Água	25	45
16	Água	25	60
17	Solvente eutético e água*	25	30 + 30

*: Uma extração de 30 min com solvente eutético seguida de outra extração de 30 min com água.

Após a obtenção dos extratos, os mesmos foram centrifugados a 4.000 rpm por 10 min e filtrados em papel filtro. Na sequência, foram adicionados 10 mL do extrato e 40 mL de etanol 95% em tubos tipo Falcon e deixados durante a noite (12 h) para que ocorresse a precipitação. Após isso foram novamente centrifugados a 4.000 rpm por 10 min para a obtenção dos polissacarídeos e o sobrenadante foi descartado.

Após isso, adicionou-se 10 mL de água destilada nos precipitados obtidos depois da centrifugação, sendo os mesmos completamente diluídos para serem utilizados nas análises antioxidante, de proteínas e de açúcares. Um tubo Falcon foi utilizado para análise do rendimento, o qual foi seco em estufa a 70 °C até peso constante. O rendimento de extração foi calculado através da Equação (1).

$$R = \frac{Mp}{Ma} \times 100 \quad (1)$$

Sendo R o rendimento em porcentagem (%), Mp a massa de polissacarídeos precipitados (g) e Ma a massa inicial da amostra utilizada na extração (g).

3.4 EXTRAÇÃO CONVENCIONAL

A extração convencional, que é utilizando água quente sob agitação constante (MORALES et al. 2019a), foi realizada com 1,25 g de shiitake e 50 mL de água em um Becker com agitação provocada por uma barra magnética. No entanto, o tempo e a temperatura de extração foram de 60 min e 25 °C, respectivamente, baseado nas condições que apresentaram melhores resultados nos testes preliminares.

3.5 EXTRAÇÃO EM BANHO DE ULTRASSOM

Extrações com água e solvente eutético em banho ultrassônico (Unique, Modelo USC-1800A), foram realizadas para comparação da influência do uso de ultrassom direto e indireto na extração. Estas extrações foram realizadas em frascos Erlenmeyer, a 25 °C por 60 minutos, utilizando 1,25 g de shiitake com 50 mL de solvente (água e solvente eutético). A frequência ultrassônica foi de 40 kHz e potência de 132 W.

3.6 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) PARA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Para a extração assistida por ultrassom foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 utilizando como variáveis o pulso e a amplitude da sonda, totalizando 11 ensaios, conforme Tabela 2. Para obtenção dos polissacarídeos foram utilizados como solventes a água e solvente eutético (cloreto de colina:glicerol) com 20% de água em razão da massa do solvente, com tempo de extração de 60 minutos.

Tabela 2 - Ensaios do planejamento de experimentos utilizando ultrassom, variáveis reais e codificadas (entre parênteses).

Ensaio	Amplitude (%)	Ciclo de pulso
US 1	31,63(-1)	0,57(-1)
US 2	88,36(1)	0,57(-1)
US 3	31,63(-1)	0,93(1)
US 4	88,36(1)	0,93(1)
US 5	20(-1,41)	0,75(0)
US 6	100(1,41)	0,75(0)
US 7	60(0)	0,5(-1,41)
US 8	60(0)	1(1,41)
US 9	60(0)	0,75(0)
US 10	60(0)	0,75(0)
US 11	60(0)	0,75(0)

Fonte: Próprio autor.

Além desses ensaios também foram realizadas extrações para controle, sem ultrassom, com as mesmas condições de temperatura e tempo de extração. Com isso foi possível determinar a influência do ultrassom sobre os extratos obtidos com água e solvente eutético.

A precipitação dos polissacarídeos foi realizada adicionando 4 volumes de etanol 95% para 1 de amostra e mantendo a mistura durante a noite a 4 °C. Os polissacarídeos precipitados foram recuperados após centrifugação (4.000 rpm, 10 min). Em seguida, foram utilizados os precipitados para análises.

3.7 ANÁLISE DO PODER ANTIOXIDANTE NA REDUÇÃO FÉRRICA (FRAP)

A análise antioxidante foi baseada nos métodos descritos por Benzie e Strain (1996) e Rockenbach et al. (2011). Sendo a solução FRAP produzida pela mistura de 3 reagentes “A”, “B” e “C”:

O reagente “A” consistiu em um tampão de 40,827 g de acetato de sódio e água destilada em um balão volumétrico de 1 L. A correção do pH até 3,6 utilizando ácido acético glacial foi realizada e armazenado em frasco âmbar na geladeira.

O reagente “B” é a mistura de 0,031 g de 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (Sigma Aldrich) em um balão volumétrico de 10 mL, completando-o com HCl (40 mM).

Esse reagente sempre foi preparado no momento em que seria realizada a análise, com as luzes apagadas, além disso, o balão volumétrico foi envolvido em papel alumínio para evitar possíveis degradações caso exposto a luz.

O reagente “C” foi produzido através da mistura de 1,3515 g de cloreto férrico e completado com água destilada em um balão volumétrico de 250 mL, e armazenado em um frasco âmbar na geladeira.

Por fim, obtêm-se o FRAP pela mistura dos reagentes “A”, “B” e “C” na proporção 10:1:1, evitando-se o contato com luz.

Dessa forma, foi utilizado 3600 µL da solução FRAP e 400 µL de amostra, em triplicata. Posteriormente, os tubos de ensaio foram levados a um banho a 37 °C por 30 min, e, após, foram realizadas as leituras de absorbância em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-2600) a 593 nm. Um ensaio branco utilizando água destilada foi realizado como referência.

A curva de calibração padrão foi determinada utilizando uma solução de trolox 10 mM, para tanto foi pesado 0,0125 g de trolox e completado com etanol 99,5 % (v/v) em um balão volumétrico de 5 mL. Na sequência, 500 µL da solução mãe foi misturado com 4500 µL de água destilada, produzindo, assim, uma solução de concentração de 1 mM. Esta solução foi utilizada como amostra para confecção da curva padrão.

3.8 ANÁLISE DE AÇÚCARES

A análise de açúcares foi realizada seguindo o método de Dubois et al. (1956), sendo a curva padrão confeccionada utilizando glicose como padrão. Para isso, foi adicionado nos tubos de ensaio em triplicata 2000 µL de uma solução de glicose com concentrações de 0 a 70 µg/mL, seguido de 50 µL de fenol 80% (p/v) e 5 mL de ácido sulfúrico 98% (v/v). Posteriormente as soluções foram agitadas e colocadas em banho de água durante 15 min a 25 °C. Na sequência, as leituras foram realizadas no espectrofotômetro SHIMADZU UV-2600 com comprimento de onda de 485 nm.

Para análise dos extratos utilizou-se 20 µL de amostra diluída em 1980 µL de água destilada, em função da alta concentração de açúcares obtidos nos extratos. Posteriormente, 50 µL de fenol 80% (p/p) e 5 mL de ácido sulfúrico 98% foram adicionados seguido de agitação. As soluções foram mantidas em banho de água durante 15 min a 25 °C e subsequentemente foram realizadas as leituras da

absorbância no espectrofotômetro. No ensaio do branco foi utilizada água destilada no lugar da amostra.

3.9 ANÁLISE DE PROTEÍNAS

A análise de proteínas dos extratos foi realizada seguindo o método descrito por Bradford (1976). O reagente Bradford foi preparado em um balão volumétrico de 500 mL através da mistura de 0,05 g de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Aldrich) dissolvido em 25 mL de etanol 95% (v/v) com 50 mL de ácido orto-fosfórico 85% e, por fim, completou-se o balão volumétrico com água destilada. Em seguida, a solução foi agitada vigorosamente e filtrada em papel filtro, sendo o papel filtro trocado diversas vezes, evitando-se, assim, a saturação dos poros.

Para a determinação das curvas de calibração padrão foi utilizado 5 mg de albumina de soro bovino (Sigma Aldrich, Brasil) e diluído em água destilada, após, a solução foi acondicionada em um balão volumétrico de 5 mL e preenchido com água destilada. A curva de calibração foi construída adicionando-se de 0 a 100 μL da solução de albumina e completando com água destilada até completar 100 μL nos tubos de ensaio. Na sequência, 5 mL da solução de Bradford foi adicionado sendo os tubos agitados vigorosamente e encaminhados para um banho de água a 20 °C por 10 minutos. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro SHIMADZU UV-2600 em um comprimento de onda de 595 nm.

As análises dos extratos e do branco foram efetuadas igualmente as das curvas de calibração, porém utilizando 100 μL dos extratos os quais já haviam passado pela precipitação com etanol e posterior diluição em água destilada.

3.10 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para a realização da análise por FTIR foi utilizado o equipamento Shimadzu IR Prestige-21, e o método de transmitância direta utilizando a técnica de pastilhas (em forma de discos) de KBr, com faixa de leitura entre 400 e 4500 cm^{-1} e com varredura de 45 scans e resolução de 2,0 cm^{-1} .

As pastilhas foram feitas no acessório KBr TABLET DIE (Shimadzu), usando a prensa HAND PRESS SSP-10^a (Shimadzu). Foram utilizados 100 mg de KBr e aproximadamente 1 mg da amostra, que foram intensamente macerados e misturados

em um gral de ágata liso e posteriormente submetidos a prensagem sob 78,5 KN (8 ton), resultando em finas pastilhas transparentes (menos de 1 mm de espessura) com 13 mm de diâmetro. Além disso, os espectros enviados passaram por um “smoothing” de 10 a 20 pontos para redução de ruído.

Desse modo, foram submetidos a análise FTIR os dois melhores rendimentos obtidos da extração por ultrassom com água e com solvente eutético. Além disso, também foram analisados os precipitados obtidos do controle (sem ultrassom) da água e do solvente eutético e a amostra *in natura* de shiitake.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES

Inicialmente foram realizados experimentos para determinar a melhor temperatura de extração tanto com a água como para o solvente eutético. Observando os resultados dos ensaios 1 ao 11 indicados na Tabela 3, com tempo de extração de 30 min, verifica-se que os melhores rendimentos foram obtidos em temperatura de 25 °C. Sendo a média de rendimento a 25 °C de 17,67% para água e 14,75% para o solvente eutético, enquanto que a 80 °C foi 11,71% e 12,62% respectivamente.

Tabela 3 - Extrações utilizando ultrassom com intensidade e pulso máximo e os respectivos resultados de açúcares, análise antioxidante por concentração de trolox e rendimento.

Teste	Solvente	Temp. (°C)	Tempo (min)	Açúcares totais (µg/mL)	Atividade antioxidante (µg trolox/mL)	Rendimento m:m (%)
1	Solvente eutético	25	30	1223,11 ±187,14	0,19 ±0,05	14,76 ±3,91
2	Solvente eutético	80	30	1758,69 ±102,42	0,16 ±0,02	12,62 ±1,62
3	Água	25	30	2659,98 ±87,25	0,25 ±0,01	19,27 ±0,49
4	Água	80	30	1862,42 ±98,23	0,15 ±0,01	11,71 ±1,08
5	Água	10	30	2852,22	0,23	18,00
6	Solvente eutético: água (1:1)	25	30	2208,44	0,15	14,95
7	Água	25	15	1670,18	0,19	15,56
8	Água	25	45	3268,89	0,26	20,35
9	Água	25	60	3358,30	0,31	25,26
10	Solvente eutético e água*	25	30 + 30	3170,47	0,21	20,70

*: Uma extração de 30 min com solvente eutético seguida de outra extração de 30 min com água

Fonte: Próprio autor.

A concentração de açúcares totais e atividade antioxidante utilizando água a 25 °C foi de 2659,98 ±87,25 µg/mL e 0,25 ±0,01 µg de trolox/mL de solução, respectivamente, por outro lado a 80 °C, obteve-se 1862,42 ±98,23 µg/mL e 0,15 ±0,01 µg de trolox/mL de solução. Observando esses resultados verifica-se que o rendimento, a quantidade de açúcares e atividade antioxidante foram superiores a 25 °C, de modo geral, temperaturas mais elevadas podem agredir mais severamente células, contudo há a possibilidade de promoverem a degradação dos compostos antioxidantes.

Em razão da temperatura de 25 °C ter melhores resultados que a de 80 °C também foram realizados ensaios a temperatura de 10 °C, sendo que o rendimento foi de 18 % e a quantidade de açúcares e atividade antioxidante de 2852,22 µg/mL e 0,23 µg de trolox/mL de solução, respectivamente. Comparando os resultados utilizando água a 25 °C (ensaio 3) com o ensaio 5 a 10 °C, verifica-se um rendimento inferior e também uma menor atividade antioxidante a 10 °C, no entanto, a análise de açúcares demonstrou melhor desempenho. Contudo, optou-se por seguir os experimentos na temperatura de 25 °C, pois o rendimento e a análise antioxidante são de maior interesse tendo em vista as propriedades dos polissacarídeos.

As médias para as análises de açúcares totais e atividade antioxidante, usando solvente eutético, em temperatura de 25 °C foram de 1223,11 ±187,14 µg/mL e 0,19 ±0,05 µg/mL respectivamente enquanto que a 80 °C foi 1758,70 ±102,42 µg/mL e 0,16 ±0,02 µg/mL. Diferente dos resultados obtidos com a água, o solvente eutético demonstrou melhores resultados para a extração de açúcares a 80 °C, possivelmente devido as diferentes propriedades físico-químicas do solvente como maior viscosidade que a água. Apesar disso, o rendimento e análise antioxidante foram melhores a 25 °C, indicando que assim como a água, em temperaturas mais elevadas pode haver a degradação dos compostos antioxidantes e precipitação de outras substâncias que não sejam polissacarídeos.

Al-Dawsari et al. (2020), Canciam (2013), Brunetti (2008) e Granjeiro et al. (2007) relataram que com o aumento da temperatura reduz-se a viscosidade dinâmica dos líquidos, isso devido ao aumento das distâncias intermoleculares e a diminuição das forças de atração entre as moléculas. Desse modo, pode-se supor que a 80 °C a menor viscosidade do solvente eutético em comparação a 25 °C, provocada pelo aumento da temperatura, favoreceu a obtenção de açúcar, mas de modo geral, a

temperatura pode ter prejudicado o rendimento final do extrato e os compostos antioxidantes que possivelmente se deterioraram.

Com o objetivo de averiguar a capacidade de extração de uma combinação água:solvente eutético (1:1) foi realizada uma extração nessas condições (ensaio 6) a 25 °C. Com isso, buscou-se uma maior solubilidade da água, junto com maior capacidade de romper as células do shiitake pela maior viscosidade do solvente eutético. Os resultados utilizando apenas água demonstraram melhores resultados para a análise de açúcares, sendo superior a combinação dos solventes aos obtidos apenas com solvente eutético, no entanto os compostos antioxidantes foram inferiores. Isso denota uma melhor extração de açúcares em água, provavelmente devido a menor viscosidade e talvez apresente uma maior solubilidade para essa classe.

Além desses ensaios, também foi verificado a influência do tempo de extração para obtenção dos polissacarídeos. Para isso, foram realizados ensaios em 15, 45 e 60 min de extração em água (ensaios 7, 8 e 9) da Tabela 3, respectivamente. Observando os resultados obtidos, verifica-se que o rendimento, concentração de açúcares e atividade antioxidante é proporcional ao tempo de extração, sendo os melhores resultados em 60 min. Essa maior eficiência se deve provavelmente ao maior tempo de contato entre o sólido e o solvente e conseqüentemente melhor difusão, além de o shiitake sofrer por mais tempo a cavitação proporcionada pelo ultrassom, ocasionando um maior rompimento de células. Desse modo, optou-se por utilizar 60 minutos como tempo de extração para o planejamento experimental.

No ensaio 10 foi realizada uma extração de 30 min com solvente eutético e na sequência mais 30 min em água. O rendimento obtido foi de 20,7%, 3170,47 µg/mL de açúcares e 0,207 µg/mL na análise antioxidante. Pode-se notar na Tabela 3 que o rendimento foi superior às extrações de 30 min, no entanto inferior às de 45 e 60 min utilizando água como solvente.

No ensaio 10, obteve-se 12,65% de rendimento nos primeiros 30 min com solvente eutético e nos 30 min seguintes utilizando água obteve-se 8,05%, totalizando 20,7% obtidos em 60 min. Comparando o rendimento da primeira batelada, verifica-se um resultado semelhante à faixa testada nos experimentos 1 e 2. No caso da água, é esperado um rendimento inferior ao ensaio 3, pois boa parte já teria sido extraída na primeira batelada. Contudo, verifica-se que no ensaio 9 (60 min) o rendimento foi 25,26%, assim sabe-se que há a possibilidade de um maior rendimento total, uma

possível explicação é que durante a primeira extração os poros do shiitake saturaram de solvente eutético e a água teve dificuldade em extrair o solvente eutético devido as suas características físico-químicas, como a maior viscosidade em relação a água, uma vez que ambos são polares.

4.2 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Após a realização das extrações preliminares, foram definidos os níveis e as variáveis avaliadas no planejamento experimental. A temperatura que demonstrou melhores resultados foi de 25 °C, levando-se em consideração principalmente o rendimento e a análise da atividade antioxidante. O tempo de extração também foi fixado em 60 min, assim, realizou-se as extrações variando a amplitude e o ciclo de pulsação do ultrassom. Na Tabela 4, encontra-se os resultados obtidos da extração utilizando água e solvente eutético.

Tabela 4 - Resultados da extração assistida por ultrassom utilizando água e solvente eutético.

Ensaio	Extração com água						Extração com solvente eutético			
	Amplitude (%)	Ciclo de pulsação	Rendimento (%)	µg trolox/mL	µg pro/mL	Açúcares ug/mL	Rendimento (%)	µg trolox/mL	µg pro/mL	Açúcares µg/mL
1	-1(31,63)	-1(0,57)	7,38	0,67	7,09	902,33	7,99	0,35	9,56	637,1
2	1(88,36)	-1(0,57)	22,61	0,63	30,46	3377,24	16,31	0,67	28,27	1658,6
3	-1(31,63)	1(0,93)	8,19	0,52	6,15	972,22	8,79	0,38	13,60	787,63
4	1(88,36)	1(0,93)	22,75	0,64	25,48	3576,16	25,11	0,73	29,53	2181,9
5	-1,41(20)	0(0,75)	10,1	0,48	9,60	1606,63	9,85	0,46	13,42	755,38
6	1,41(100)	0(0,75)	23,47	0,59	28,33	3070,79	23,74	0,66	33,75	2287,63
7	0(60)	-1,41(0,5)	15,68	0,59	25,18	2117,38	13,54	0,59	21,71	1310,93
8	0(60)	1,41(1)	19,16	0,62	27,35	2604,84	18,21	0,61	24,23	1839,61
9	0(60)	0(0,75)	18,62	0,67	31,30	2269,71	14,34	0,59	23,01	1481,18
10	0(60)	0(0,75)	19,72	0,58	24,06	2321,68	15,18	0,60	23,64	1357,53
11	0(60)	0(0,75)	19,58	0,67	31,67	2371,86	13,98	0,53	21,49	1276,88
Controle*	-	-	6,51	0,64	13,00	534,95	0,8	0,12	5,45	56,45

*controle: ensaio de extração sem ultrassom.

Os melhores rendimentos com água como solvente foram 22,61% (ensaio 2), 22,75% (ensaio 4) e 23,47% (ensaio 6) (Tabela 1), e foram ensaios usando os níveis de amplitude mais altos avaliados, com 88,36% e 100%, assim, demonstrou que a extração teve maior dependência para a amplitude em relação aos ciclos de pulsação. Utilizando solvente eutético o melhor rendimento foi no ensaio 4 (amplitude de 88,36% e 0,93 de ciclo de pulsação), com 25,11%, é 6,99% superior ao melhor resultado obtido com água. O segundo melhor rendimento usando solvente eutético foi de 23,74% (ensaio 6) usando 100% de amplitude e 0,75 de ciclo de pulsação, sendo estes os mesmos parâmetros dos melhores rendimentos usando água. Uma possível razão para o solvente eutético ter apresentado melhores resultados com amplitude de 88,36% e pulso de 0,93 é que, devido à sua maior viscosidade e densidade, os ciclos de pulsação mais frequentes tendem a melhorar a formação e implosão de bolhas de cavitação, enquanto que para a água gera turbulência, dificultando o desenvolvimento de bolhas e acaba tornando a cavitação menos eficiente. Os piores rendimentos foram nos experimentos que utilizaram 31,63% de amplitude e 0,57% de ciclo de pulsação que obteve 7,38% em peso e 7,99% em peso (ensaio 1).

Além dos ensaios com ultrassom, foi realizado um ensaio de extração convencional utilizando água à 25 °C por 60 minutos (parâmetros que apresentaram melhores resultados nos ensaios preliminares com ultrassom), sendo agitado vigorosamente o meio. Obteve-se um rendimento nesse ensaio de 3,96%, 10,45 µg/mL de proteínas, 466,66 µg/mL de açúcares e 0,57 µg de trolox/mL. Nota-se, comparando com a Tabela 4, que o rendimento e a concentração de açúcares foram inferiores a todos os experimentos utilizando ultrassom. Percebe-se também que a análise antioxidante teve uma concentração dentro dos valores encontrados nos ensaios da Tabela 4 e superior aos ensaios 1, 3 e 5, indicando que os compostos antioxidantes são facilmente extraídos ou que o aparelho ultrassom destrói parte das moléculas que apresentam propriedades antioxidantes.

Para investigar minuciosamente o efeito do ultrassom, também foi realizado um teste controle (Tabela 4) sem ultrassom, somente com o controle de temperatura a 25 °C. Obteve-se um rendimento de 6,51% empregando água, inferior a todos que utilizaram ultrassom, contudo superior à extração convencional (3,96%) que, diferentemente do controle, foi exposta a agitação constante. A extração controle obteve 13,00 µg/mL de proteínas e 534,95 µg/mL de açúcares, sendo este inferior às demais concentrações de açúcares dos ensaios apresentados na Tabela 4. A análise

antioxidante do controle apresentou 0,64 µg de trolox/mL sendo superior a 7 dos 11 ensaios utilizando ultrassom e água, porém a análise antioxidante desses ensaios não apresentou uma tendência com a amplitude e ciclo de pulsação, sem apresentar um padrão para obtenção de melhores resultados.

Também foi realizada uma extração controle com solvente eutético, para determinar a influência que o equipamento tem nesse solvente. Desse modo, o controle obteve apenas 0,8% de rendimento, bem inferior aos demais ensaios. Comparando ao controle da água com 6,51% de rendimento, percebe-se que para o solvente eutético o ultrassom é mais impactante, considerando que praticamente não houve extração. Além disso, nas análises antioxidantes, de proteínas e açúcares o controle teve resultados abaixo dos obtidos utilizando ultrassom. Isso decorre provavelmente da dificuldade de ocorrer a difusão do solvente nos poros do shiitake devido sua viscosidade e também a ausência da cavitação e consequentemente da fricção, turbulência, pressão e menor contato sólido-solvente, assim, não ocorrendo o rompimento das células da *Lentinula edodes*.

Pode-se observar, na Tabela 4, que nos ensaios 7 e 8 (utilizando água) foram empregados a mesma amplitude, mas no primeiro 0,5 de pulsação e no segundo 1 de pulsação sendo o rendimento de 15,68% e 19,16% respectivamente. Nota-se que houve uma redução de 18,16% no rendimento, demonstrando que um ciclo de pulsação mais elevado é favorável para obter um melhor resultado, no entanto foi reduzido em 50% o valor da pulsação. Na forma inversa, quando a pulsação é a mesma (ensaio 3 e 4) e a amplitude foi reduzida de 88,36% para 31,63%, diminuiu-se o rendimento em 64%. Demonstrando que a amplitude ocasiona um impacto superior no rendimento.

Percebe-se avaliando os ensaios 2 e 4, utilizando água na extração (Tabela 4), a pequena diferença nos rendimentos encontrados. No ensaio 2 utilizando 88,36% de amplitude e 0,57 de pulsação o rendimento (0,61%) foi inferior ao ensaio 4 que utilizou 0,93 de pulsação. Desse modo, dependendo da economia energética que essa alteração proporcionaria, seria uma possibilidade operar com ciclo de pulsação de 0,57 ainda assim, obtendo bons rendimentos.

Em relação aos ensaios utilizando solvente eutético, analisando os dois melhores rendimentos (ensaio 4 e 6), percebe-se que o experimento com 25,11% de extração apresentou o melhor resultado na análise antioxidante, tendo uma concentração de 0,73 µg de trolox/mL à medida que o ensaio 6 com 23,74% teve

0,66 µg/ml de trolox. Isso pode indicar a presença de mais polissacarídeos, tendo em vista suas propriedades antioxidantes. Por outro lado, a análise de proteínas e de açúcares da extração 4 (29,53 µg/mL e 2181,9 µg/mL, respectivamente) foram inferiores ao da 6 (33,75 µg/mL e 2287,63 µg/mL), no caso das proteínas pode-se levar em consideração, que assim como com a água, as moléculas das proteínas poderiam ter-se rompido com uma pulsação mais frequente. Já a maior concentração de açúcares no ensaio 6 em relação ao ensaio 4, há a possibilidade de simplesmente ser melhor para a obtenção de açúcares uma maior amplitude, assim como para a água. Contudo, uma amplitude de 100% também poderia ocasionar o rompimento de moléculas longas de polissacarídeos em moléculas menores, formando monossacarídeos, e acabar por afetar na coloração das amostras e conseqüentemente na análise de absorvância.

Analisando a Tabela 4, verifica-se que a água obteve melhores resultados de açúcares que usando solvente eutético na extração. No entanto, isso pode ter ocorrido em função do solvente eutético ter prejudicado a reação colorimétrica do método fenol-sulfúrico, tendo em vista, que os melhores rendimentos com solvente eutético tiveram bons resultados de proteínas e compostos antioxidantes. Para realizar a análise de rendimento de precipitados foi necessário passar por uma extração com etanol, para eliminar o solvente eutético remanescente, no entanto para análise de açúcares não foi realizado nenhuma etapa de separação. Dessa forma, após realizar a centrifugação dos precipitados em etanol ainda ficava um pouco de solvente eutético retido nos precipitados. Assim, quando os precipitados foram diluídos em água para posterior análise de açúcares ainda havia a presença do solvente eutético nas amostras, com isso, a presença do glicerol e do cloreto de colina, pode ter influenciado na análise.

De modo geral, de acordo com a Tabela 4, pode-se dizer que amplitudes e ciclos de pulsação mais elevados geraram melhores resultados com solvente eutético, contudo ao avaliar o ensaio 3, verifica-se que utilizando apenas uma pulsação elevada não é suficiente para um bom rendimento (8,79%), enquanto que uma amplitude elevada com uma menor pulsação teve um rendimento de 16,31%. Com essa informação pode-se deduzir que há uma dependência maior da amplitude para uma boa extração, pois seria ela a responsável por uma maior potência nas ondas ultrassônicas, enquanto que a pulsação é responsável pela frequência em que esses choques ocorrem.

Em relação aos resultados da atividade antioxidante (Tabela 4), os maiores rendimentos usando solvente eutético tiveram os melhores resultados. Isso pode indicar uma maior estabilidade do solvente conservando as propriedades antioxidantes dos compostos extraídos sob elevadas amplitudes e pulsações, enquanto talvez a água não teria essa capacidade, porém, a água teria potencial de extrair compostos antioxidantes com maior facilidade, pois têm bons resultados sob baixa amplitude e pulsação.

Outros estudos realizaram a extração de polissacarídeos do shiitake, utilizando ultrassom e combinações de extrações. Dessa forma, alguns autores consideraram como polissacarídeos brutos o rendimento de precipitados em etanol, enquanto outros consideraram a análise pelo método fenol-sulfúrico como polissacarídeos.

Cheung et al. (2012) consideraram os precipitados em etanol como polissacarídeos brutos e tiveram um rendimento de 13% em 60 min de extração na potência de 130 W e intensidade de 26,5 W/cm² utilizando 3 g de shiitake em 90 mL de água com temperatura de 45 a 50 °C. Zhao et al. (2018) realizaram inicialmente um pré-tratamento através de uma extração de lipídeos do shiitake. Posteriormente, determinaram como condições ideais, para a faixa estudada, a temperatura de 45 °C, tempo de extração de 21 min e potência ultrassônica de 290 W, obtendo de 9,75% de precipitados em etanol, considerando-os como rendimento de polissacarídeos. De outra forma, Morales et al. (2019a) conduziram experimentos utilizando ultrassom com uma potência de 550 W com 60% de amplitude e água a temperatura de 50 °C com razão 1 g de shiitake para 100 mL, sendo seus melhores resultados obtidos em 60 min de extração com rendimento de precipitados em etanol de 20,86 % ± 1,91. Além disso, os mesmos autores considerando a análise pelo método fenol-sulfúrico dos precipitados presente em sua totalidade polissacarídeos, encontraram 10,14% ± 2,46. Quando realizaram a extração com água subcrítica de 15 min, seguida de uma extração por ultrassom de 60 min, obteve 55,93% de precipitados e 21,14% de polissacarídeos.

Considerado os açúcares totais obtidos nos precipitados, analisados pelo método fenol-sulfúrico, como polissacarídeos totais, Gil-Ramírez et al. (2019) realizaram extrações da *Lentinula edodes* com micro-ondas e obtiveram um rendimento de precipitados de 15,4%, sendo 8,68% de polissacarídeos. Levando em conta esse mesmo raciocínio (Tabela 5), o melhor resultado encontrado para água (14,30% de polissacarídeos) foi a 88,36% de amplitude e 0,93 de pulsação, enquanto

que para o solvente eutético (9,15% de polissacarídeos) foi com 100% de amplitude e 0,75 e pulsação. Considerando esse parâmetro como método quantitativo para os polissacarídeos, torna-se mais viável a utilização de água como solvente, em função do menor custo e maior extração de polissacarídeos, no entanto há a possibilidade de haver outros tipos de açúcares, monossacarídeos, em meio aos precipitados, o que reduziria a confiabilidade desse método como determinante quantitativo dos polissacarídeos.

Tabela 5 - Comparação com outros estudos levando em consideração os resultados do método fenol-sulfúrico como polissacarídeos.

Método fenol-sulfúrico		
	Rendimentos	Açúcares (polissacarídeos)
Água (Ensaio 4)*	22,75%	14,30%
Solvente eutético (Ensaio 6)*	23,74%	9,15%
Gil-Ramírez et al. (2019)	15,4%	8,68%
Morales et al. (2019a)	20,86%	10,14%

*: extrações deste trabalho.

Na Tabela 6 utilizando água como solvente verifica-se que o melhor rendimento de precipitados foi de 23,47%, sendo neste ensaio utilizado 100% de amplitude e 0,75 de pulsação. Sendo assim, comparando com os resultados encontrados por outros autores, considerando os precipitados como polissacarídeos brutos, percebe-se rendimento 80,54% superior ao de Cheung et al. (2012), 140,72% maior que o de Zhao et al. (2018) e 12,51% que o de Morales et al. (2019a). Nos experimentos empregando solvente eutético (Tabela 6) foi obtido 25,11% de rendimento, utilizando 88,36% de amplitude e 0,93 de pulsação. Esse rendimento correspondeu a 93,15%, 157,54% e 20,37% maiores que os encontrados por Cheung et al. (2012), Zhao et al. (2018) e Morales et al. (2019a) respectivamente. No entanto, considerar todos os precipitados em etanol como polissacarídeos pode ser impreciso. Por isso são considerados polissacarídeos brutos, devido a presença de outros tipos de moléculas, como as proteínas, por exemplo.

Tabela 6 - Comparação da obtenção de polissacarídeos brutos com outros trabalhos.

Polissacarídeos brutos	
	Rendimentos
Água (Ensaio 6)*	23,47%
Solvente eutético (Ensaio 4)*	25,11%
Cheung et al. (2012)	13,00%
Zhao et al. (2018)	9,75%
Morales et al. (2019a)	20,86%

*: extrações deste trabalho.

Zhang et al. (2018) utilizaram a combinação de um pré-tratamento com água subcrítica, seguida de uma extração por ultrassom a 140 °C por 40 minutos, em uma relação sólido:líquido de 25 mg/mL e potência ultrassônica de 190 W. Desse modo, obtiveram os extratos e realizaram a desproteínização dos mesmos, depois disso, a amostra foi liofilizada e considerada como polissacarídeos, sendo obtido 17,34% de rendimento. Nesse mesmo entendimento, pode-se descontar os valores encontrados de proteínas, nos precipitados, no presente trabalho e determinar a concentração de polissacarídeos (Tabela 7). Sendo assim, o rendimento de polissacarídeos seria de 24,99% utilizando solvente eutético em 88,36% de amplitude e 0,93 de pulsação e 23,36% utilizando água sob 100% de amplitude e 0,75 de pulsação.

Tabela 7 – Rendimentos de polissacarídeos brutos descontando os valores de proteínas.

Polissacarídeos Desproteinizados		
	Rendimentos	Polissacarídeos
Água (Ensaio 6)*	23,47%	23,36%
Solvente eutético (Ensaio 4)*	25,11%	24,99%
Zhang et al. (2018)	-	17,34%

*: extrações deste trabalho.

Além disso, Zhang et al. (2018) e Morales et al. (2019a) avaliaram combinações de extrações para melhorar os resultados, sendo que no presente trabalho foi utilizando apenas o ultrassom. De outra forma, Cheung et al. (2012) e Zhao et al. (2018) consideraram os precipitados em etanol como quantidade total de

polissacarídeos bruto, também apresentaram rendimentos inferiores aos 25,11% usando solvente eutético e 23,47% com água.

A influência das variáveis (amplitude e pulsação) foram avaliadas através do planejamento de experimentos, através dos resultados obtidos na Tabela 4 foi possível obter as equações do modelo em função dos parâmetros estudados na análise estatística.

$$Re = 19,31 + 6,1x_1 - 1,74 x_1^2 + 0,74x_2 - 1,42 x_2^2 - 0,16 x_1x_2 \quad (1)$$

$$C_{Prot} = 29,03 + 8,66x_1 - 6,39 x_1^2 - 0,36x_2 - 2,72 x_2^2 - 1,01 x_1x_2 \quad (2)$$

$$C_{açu} = 2321,65 + 895,58x_1 - 27,41 x_1^2 + 119,87x_2 - 16,14 x_2^2 + 32,258 x_1x_2 \quad (3)$$

Onde: x1: amplitude; x2: pulsação

A Tabela 8 apresenta a análise de variância (ANOVA) para as respostas rendimento, atividade antioxidante, teor de proteínas e açúcares.

Tabela 8 - ANOVA dos extratos precipitados utilizando água como solvente no meio ultrassônico.

RENDIMENTO	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal	R ²
Regressão	323,04	5	64,61	13,38	93,04%
Resíduos	24,15	5	4,83		
Total	347,19	10			
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE					
Regressão	0,0251	5	0,0050	1,73	63,31%
Resíduos	0,0145	5	0,0029		
Total	0,0396	10			
AÇÚCARES					
Regressão	6520792,72	5	1304158,54	5,47	84,55%
Resíduos	1191347	5	238269,32		
Total	7712139	10			
PROTEÍNAS					
Regressão	837,19	5	167,44	6,21	86,13%
Resíduos	134,86	5	26,97		
Total	972,05	10			

F tabelado = 5,05

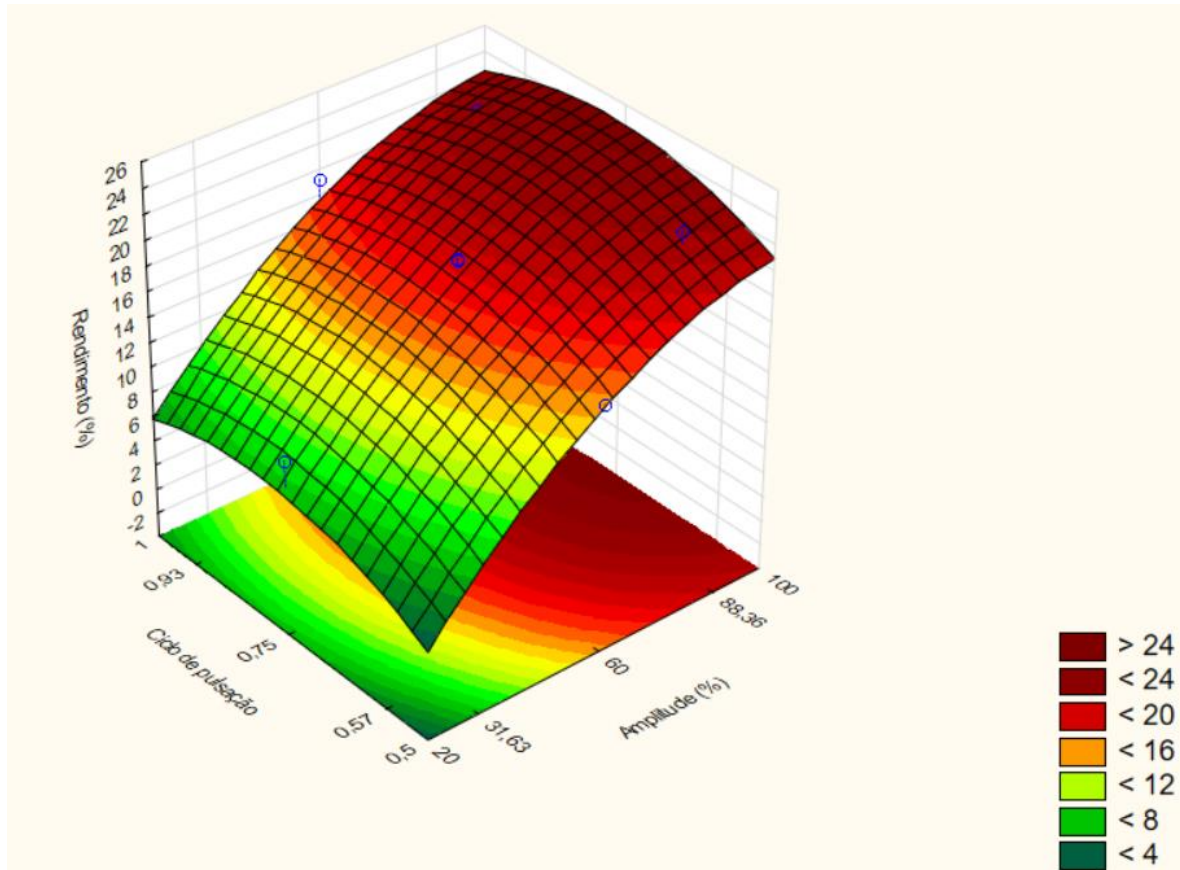
O valor de F calculado (Fcal) para rendimento de precipitado, açúcares e proteínas foi de 13,38, 5,47 e 6,21 respectivamente, além disso, o coeficiente de regressão (R²) apresentou valores de 93,04%, 84,55% e 86,13%. Sendo assim, os dados estão ajustados e as superfícies de resposta podem ser geradas. No entanto, para a análise antioxidante foi encontrado um Fcal de 1,73 e R² de 63,31%, não sendo

possível gerar a superfície para esta resposta, devido aos dados não estarem ajustados.

As concentrações de trolox foram semelhantes independentemente do ciclo de pulsação e amplitude utilizados nos experimentos com água, assim, a maioria dos resultados ficaram entre 0,580 e 0,680 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 4). Com isso, observa-se que teve uma baixa confiabilidade no real impacto que a amplitude e pulsação forneceram na obtenção de compostos antioxidantes. Esses resultados podem ter ocorrido em função de fatores como as características físico-químicas que a água apresenta, como a polaridade, gerando uma fácil ligação com outras moléculas polares, outra possibilidade, é que o equipamento ultrassônico poderia deteriorar os compostos em altas amplitudes e pulsações, pois as moléculas ficaram expostas durante um período de extração de 60 minutos.

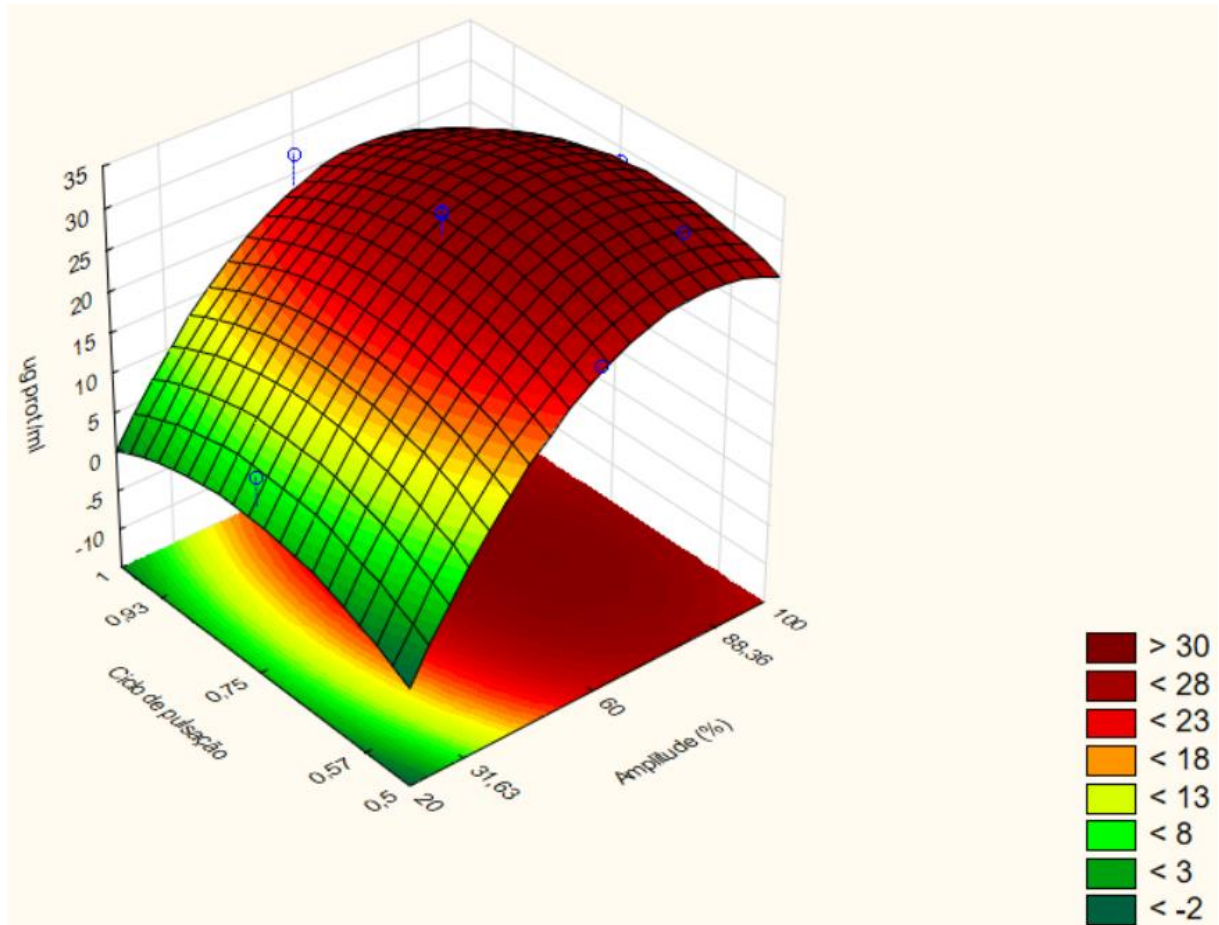
Os dados dos rendimentos ajustados a equação do modelo (Eq. 1) e os valores utilizados na equação representam as regressões obtidas. Sendo, a média e a amplitude linear os fatores que demonstraram ser significativos ($p < 0,05$), os quais tem maior influência no resultado final obtido. Para melhor compreensão da influência da amplitude pode-se observar a Figura 3. Nota-se que quanto maior a amplitude melhores são os rendimentos obtidos. Por outro lado, verifica-se que o ciclo de pulsação não tem influência.

Figura 3 - Superfície de resposta do rendimento de precipitados usando água como solvente.



Para a obtenção de proteínas, três parâmetros demonstraram ser significativos (a média, a amplitude linear (L) e a amplitude quadrática (Q)). A amplitude linear (L), assim como no rendimento, foi a que influenciou positivamente na extração de proteínas, sendo os melhores resultados encontrados nos pontos centrais com 60% de amplitude. Ao observar a Figura 4 percebe-se que amplitudes mais elevadas interferiram negativamente na obtenção de proteínas, uma possível explicação seria que em amplitudes elevadas, devido ao forte atrito e pressão, as moléculas de proteínas acabam se desestruturando.

Figura 4 - Superfície de resposta da obtenção de proteínas usando água como solvente.

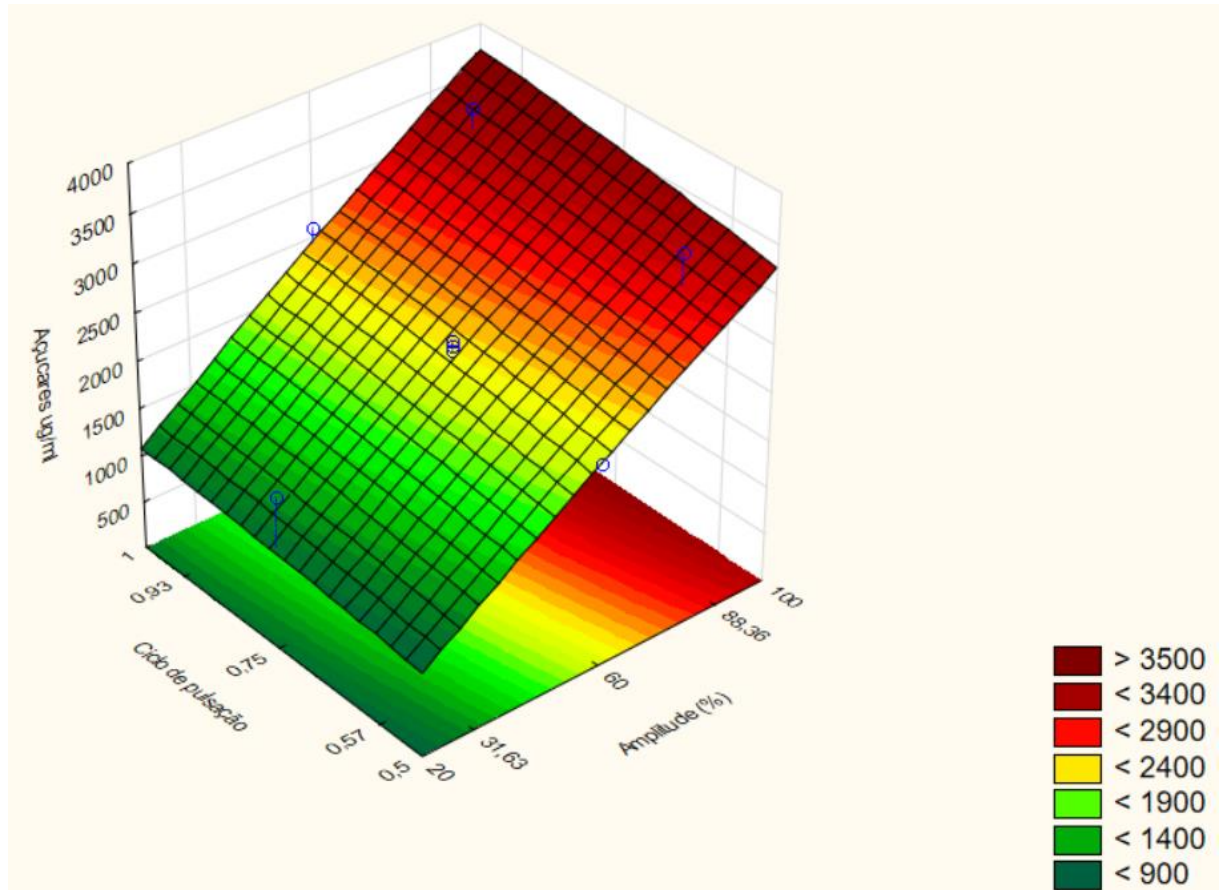


Do mesmo modo, os ciclos de pulsação elevados também foram prejudiciais na extração de proteínas. No ensaio 2 com 0,57 de pulsação teve 30,46 µg/ml de proteínas, o ensaio 6 teve 28,33 µg/ml com 0,75 de pulsação e o 4 utilizando 0,93 de pulsação teve 25,48 µg/ml de proteínas. No entanto, esse impacto negativo da pulsação para obtenção de proteínas, ocorre aparentemente apenas quando combinado a altas amplitudes como no caso dos ensaios 2, 4 e 6 que utilizaram 88,36 e 100%. Isso pode ser notado ao observar os ensaios 7 e 8, sendo que ambos utilizam 60% de amplitude, mas com 0,5 e 1 de pulsação e 25,18 e 27,35 µg/ml de proteínas, respectivamente, podendo ser observado esse comportamento na Figura 4.

Em relação à extração de açúcares, a média e a amplitude linear foram os parâmetros que demonstraram ser significativos para obtenção de maiores concentrações de açúcares utilizando a água como solvente. Ao analisar a Figura 5 nota-se que à medida que aumenta a amplitude, melhoram os resultados. O ciclo de pulsação não foi significativo no resultado final de açúcar, sendo assim, pode-se optar

futuramente em utilizar uma menor pulsação e maior amplitude, visando um melhor rendimento com menor consumo energético.

Figura 5 - Superfície de resposta da obtenção de açúcares usando água como solvente.



Fica evidente, pela Figura 5, que fixando uma amplitude do gráfico, pode-se aumentar de 0,5 até 1 o ciclo de pulsação e há pouca alteração na obtenção de açúcares. Indicando que a água não exige na extração de açúcares uma frequência elevada de pulsos ultrassônicos, mas que quando eles ocorram sejam intensos. Demonstrando que não há necessidade de atritos excessivamente contínuos entre o solvente e a amostra para ocorrer a extração. A baixa densidade da água também pode ter colaborado, pois não haveria necessidade de muitos ciclos de pulsação para ocorrer a implosão das bolhas de cavitação.

Foram realizados experimentos adicionais para determinar se com 100% de intensidade e 1 de ciclo de pulsação seriam encontrados melhores resultados, obtendo-se $3234,4 \pm 176,07 \mu\text{g/mL}$ de açúcares e o rendimento de $23,88 \pm 1,94\%$ utilizando água como solvente. Desse modo, o rendimento de precipitados foi 1,65%

e de açúcares 5,31% superiores ao ensaio 6 (água). Indicando que operando em amplitude e ciclo de pulsação máximo foi possível obter melhores rendimentos, no entanto na obtenção de açúcares teve outros ensaios com melhores resultados (ensaio 2 e 4).

Além dos experimentos empregando água junto à sonda ultrassônica, também foram realizados ensaios com solvente eutético, que foi produzido pela mistura de glicerol e cloreto de colina (1:1), junto de 20 % de água. Sendo as Equações 4, 5 e 6 correspondentes ao rendimento, concentração de proteínas e concentração de açúcares, respectivamente.

$$Re = 14,51 + 5,54x_1 + 0,70 x_1^2 + 2,03x_2 + 0,23 x_2^2 + 2,00 x_1x_2 \quad (4)$$

$$C_{prot} = 22,72 + 7,94x_1 - 0,33 x_1^2 + 1,11x_2 - 0,64 x_2^2 - 0,69 x_1x_2 \quad (5)$$

$$C_{açu} = 1372,79 + 573,74x_1 + 16,17 x_1^2 + 177,94x_2 + 43,22 x_2^2 + 93,19 x_1x_2 \quad (6)$$

onde: x1:amplitude; x2: pulsação

Através da análise de variância (Tabela 9) foram geradas as superfícies de resposta (Figura 6, 7 e 8).

Tabela 9 - ANOVA dos resultados usando solvente eutético na extração.

RENDIMENTO	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal	R ²
Regressão	296,70	5	59,34	26,20	96,32%
Resíduos	11,33	5	2,27		
Total	308,03	10			
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE					
Regressão	0,1197	5	0,0239	4,78	82,69%
Resíduos	0,0251	5	0,0050		
Total	0,1447	10			
AÇÚCARES					
Regressão	2923392,67	5	584678,53	21,30	95,51%
Resíduos	137272	5	27454,36		
Total	3060664	10			
PROTEÍNAS					
Regressão	516,52	5	103,30	20,37	95,32%
Resíduos	25,36	5	5,07		
Total	541,88	10			
F tabelado = 5,05					

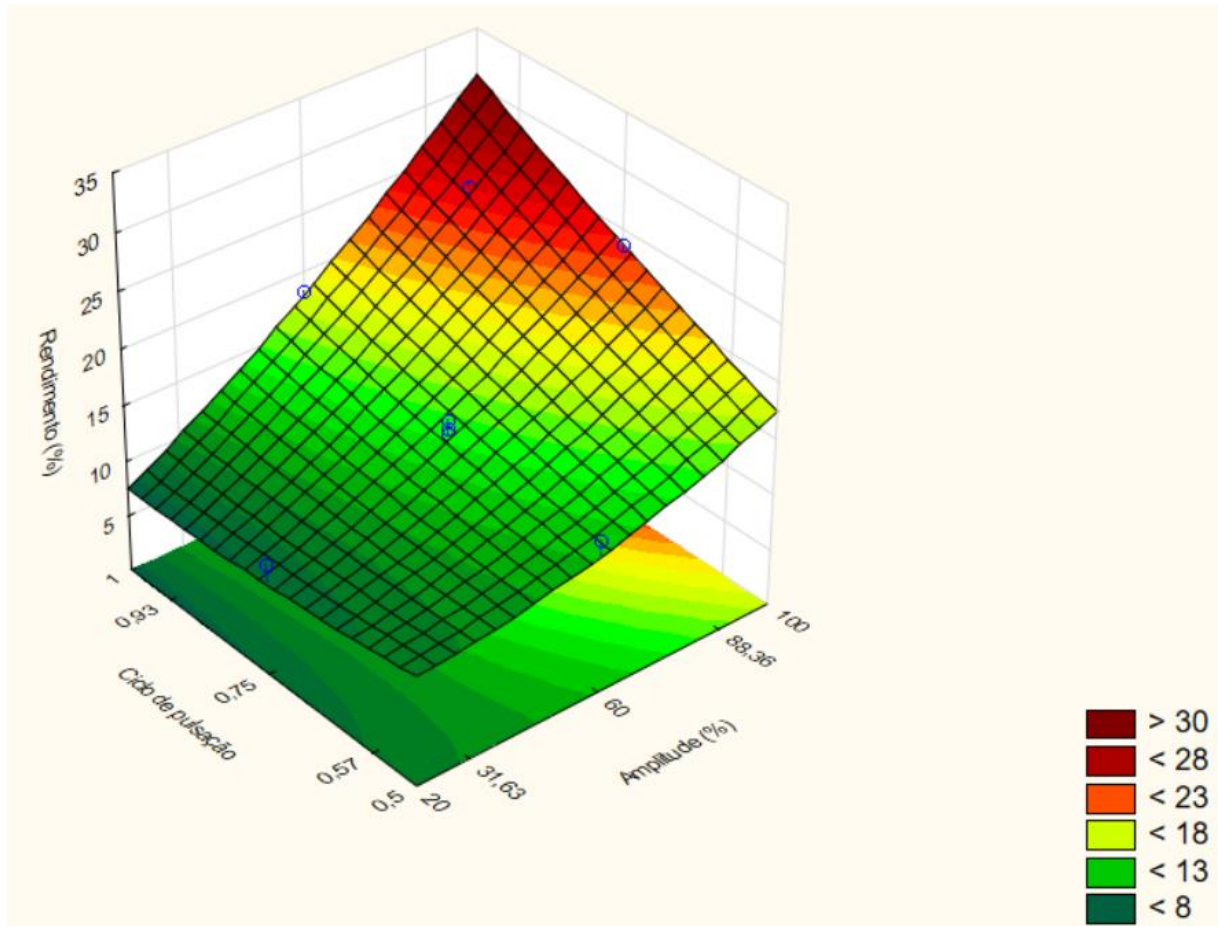
A análise antioxidante demonstrou um F calculado de 4,78, inferior ao F tabelado, desse modo a superfície de resposta da atividade antioxidante não foi gerada, pois os dados não estão bem ajustados ao modelo.

Na Equação 4, para o rendimento de precipitados em etanol, utilizando solvente eutético, 4 fatores do DCCR foram significativos. A média, amplitude linear, pulso linear e a interação entre a amplitude linear e o pulso linear, sendo todos valores positivos, indicando que maiores amplitudes e pulso favorecem o rendimento do extrato.

Possivelmente as extrações com solvente eutético apresentam mais parâmetros significativos que a água devido às diferenças nas propriedades físico-químicas. Quando a sonda ultrassônica operava em potências mais elevadas gerava uma maior turbulência na água e ficava menos evidente a formação de bolhas de cavitação no sistema, já com solvente eutético, potências mais elevadas, formavam visivelmente mais bolhas de cavitação.

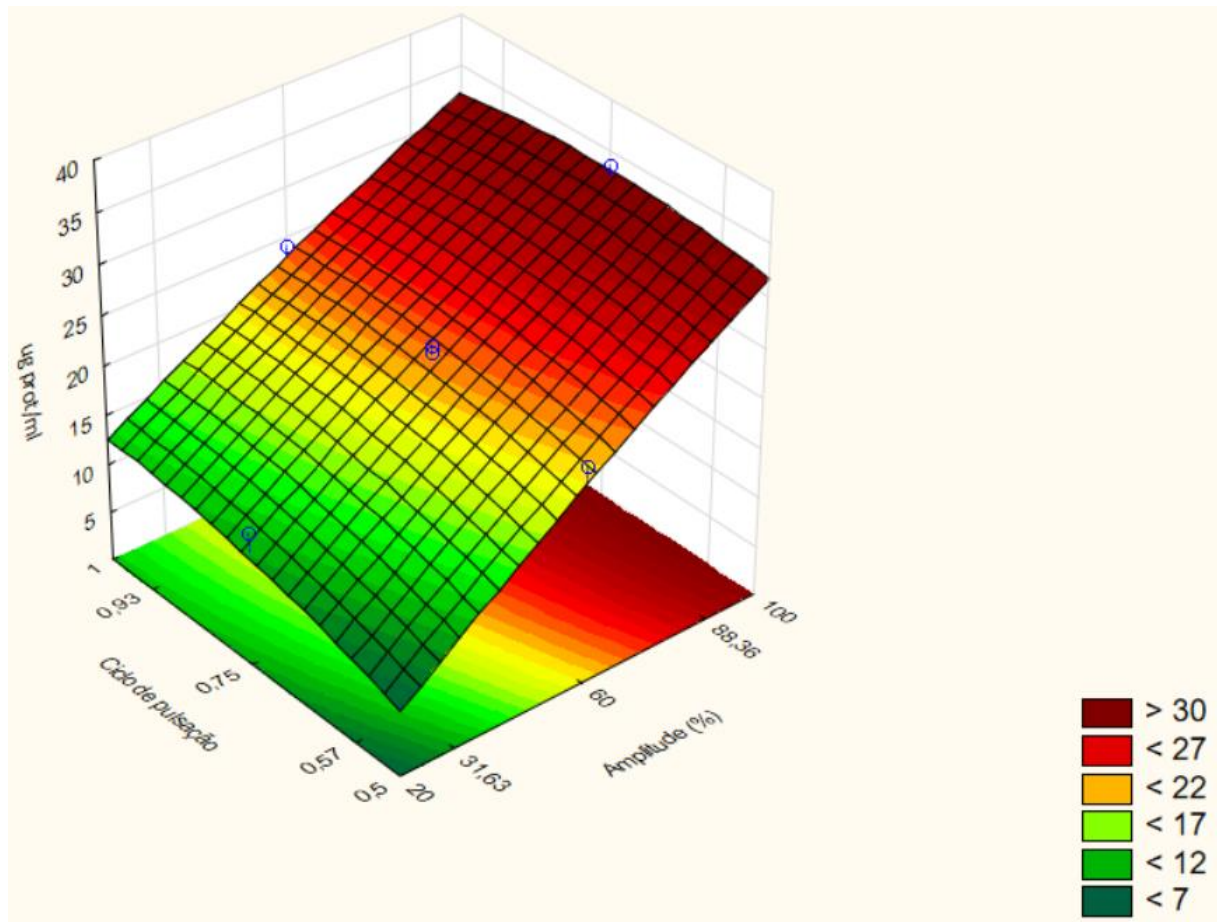
Observando a Figura 6, fica evidente que para obter melhores rendimentos, exige-se que o ciclo de pulsação e amplitude próximos aos valores máximos que o equipamento suporta, enquanto que utilizando água, visualizando a Figura 3, percebe-se que os melhores resultados exigem uma amplitude elevada, mas um ciclo de pulsação em torno de 0,75 enquanto que próximo a 1 já ocasionaria uma redução no rendimento. Nota-se, então, que o solvente eutético precisa de um ciclo de pulsação mais elevado que a água, com isso se forma com maior frequência a interação sólido-líquido, o que favoreceria a difusão do solvente nos poros do shiitake e uma melhor cavitação que romperia as células do cogumelo. Sendo assim, em consequência da água exibir uma menor viscosidade, possivelmente presente uma difusão facilitada, não exigindo maiores pulsações, além disso, a água é menos densa e provocaria com maior facilidade uma turbulência no meio o que geraria um atrito entre sólido e líquido.

Figura 6 - Superfície de resposta do rendimento de precipitados usando solvente eutético.



Na Equação 5, estão os valores dos coeficientes de regressão das análises de proteínas dos precipitados extraídos do shiitake utilizando solvente eutético, sendo somente dois fatores foram significativos, a média e a amplitude linear. Assim, pode ser observado o comportamento da obtenção de proteínas pela Figura 7.

Figura 7 - Superfície de resposta da obtenção de proteínas usando solvente eutético.



Avaliando a Figura 7, precebe-se que não há necessidade de usar amplitudes extremas para extrair as proteínas, pois obtem-se resultados semelhantes com 88,36% de amplitude. Isso pode ter decorrido do fato de haver uma menor turbulência em alta amplitude que na água, mas ocorrer uma maior formação de bolhas de cavitação, o que não provocaria uma possível degradação ou fragmentação das moléculas de proteína.

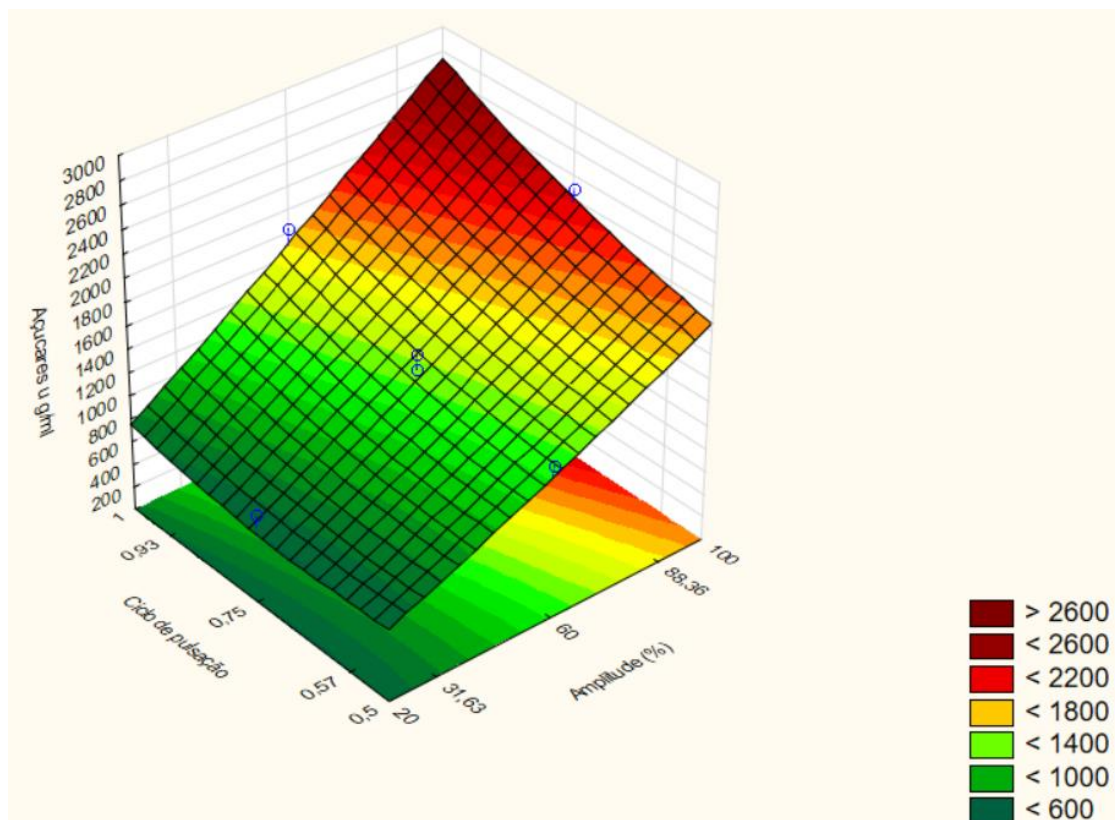
Observando a Figura 7 também pode-se perceber que os ciclos de pulsação afetam em pequena escala nas proteínas obtidas, enquanto que a amplitude que comanda majoritariamente o resultado. Sendo assim, um menor ciclo de pulsação e alta amplitude tiveram resultados quase tão bons quanto quando ambos estão a níveis extremos, indicando que não haveria necessidade de uma pulsação elevada para melhores resultados. No entanto, as proteínas não são as moléculas alvo da extração, por isso, busca-se um região no gráfico que apresentem menores concentrações.

Dessa forma, pelo fato da pulsação no rendimento de precipitados ter-se mostrado significativo, enquanto que para extração de proteínas não foi, considera-

se, assim, que um ciclo de pulsação mais elevado pode ser benéfico para obtenção de polissacarídeos. Isso, baseando-se no sentido de que extrairia mais compostos do shiitake, enquanto as proteínas seriam obtidas na mesma proporção que sob baixo ciclo de pulsação.

Na Equação 6, observa-se os coeficientes de regressão das análises de açúcares sendo três parâmetros significativos, a média, a amplitude linear e o ciclo de pulsação linear. Diferentemente do rendimento de precipitado, a obtenção de açúcar não demonstrou a interação entre a amplitude e ciclo de pulsação lineares como significativo, isso pode ser verificado na Figura 8, que, por mais que os melhores resultados sejam sob amplitude e pulsação elevados simultaneamente, ainda há a possibilidade de obter-se bons resultados utilizando uma amplitude elevada e um menor ciclo de pulsação.

Figura 8 - Superfície de resposta da obtenção de açúcares usando solvente eutético.



Do mesmo modo que para o rendimento de precipitados, para obtenção de açúcares o ciclo de pulsação mais elevado junto à amplitude é fundamental para obter melhores resultados, ao passo que para água apenas a amplitude elevada já é

suficiente. Isso pode ser fundamentado no fato da viscosidade e densidade do solvente eutético exigir uma maior pulsação para formação do processo de cavitação e difusão do solvente nos poros do shiitake. Além disso, parte da amostra do shiitake não ficava totalmente submerso no solvente eutético em baixos ciclos de pulsação e amplitude, prejudicando parcialmente a interação sólido-líquido, assim, exigindo maior potência para uma boa extração, isso ocorria com algumas fibras maiores e menos densas do shiitake que não absorviam inicialmente o solvente, enquanto que na água ocorria facilmente essa absorção.

Analisando as superfícies do rendimento e açúcares, Figuras 6 e 8, respectivamente, percebe-se que sob as mesmas condições do melhor rendimento ocorreu uma maior extração de polissacarídeos, tendo em vista que de acordo com Dubois et al. (1956) a análise de açúcares pelo método fenol-sulfúrico consegue detectar polissacarídeos e seus derivados.

Além da concentração de açúcar no extrato acompanhar o comportamento do rendimento de precipitado, também pode-se salientar que nos ensaios com solvente eutético que obtiveram uma maior extração, também houve uma maior concentração de compostos antioxidantes, corroborando com a possibilidade da obtenção de maiores concentrações de polissacarídeos. Nos ensaios (4 e 6) de 25,11% e 23,74% de rendimento, obteve-se 0,73 µg/mL e 0,66 µg de trolox/mL respectivamente, enquanto que em no ensaio 3 que obteve 8,79% de rendimento conferiu-se 0,38 µg de trolox/mL.

Ao comparar o rendimento máximo obtido experimentalmente de 25,11% e observar a superfície de resposta da Figura 6, nota-se que o gráfico indica que quanto maior a amplitude e os ciclos de pulsação melhor seriam os rendimentos. Nestas condições, de amplitude e pulsação máxima foram realizados ensaios em triplicata para verificar a influência da máxima amplitude e do ciclo de pulsação. Desse modo, o melhor rendimento de precipitados resultou em 24,27% \pm 0,79 da massa da amostra extraída, a concentração de proteínas foi de 30,45 µg/mL \pm 0,99 e a de açúcares 1796,59 µg/mL \pm 205,29. Assim, pode-se verificar que nem sempre uma maior potência será benéfica para obtenção dos compostos alvo, podendo acarretar na degradação e quebra das moléculas desejadas. Além desses fatores, por mais que a extração ocorresse em temperatura controlada de 25° C, as extrações sob potências mais elevadas provocavam o aquecimento da sonda ultrassônica, que por vezes aquecia o solvente utilizado, o que poderia deteriorar os compostos extraídos.

4.3 EXTRAÇÃO EM BANHO ULTRASSÔNICO

Além dos ensaios mencionados, foram realizadas extrações em banho ultrassônico, para verificar o impacto da utilização da sonda ultrassônica junto ao solvente. Um ensaio foi realizado utilizando solvente eutético e outro água, sendo os resultados demonstrados na Tabela 10.

Tabela 10 - Comparação entre as extrações utilizando banho ultrassônico com os melhores resultados obtidos utilizando a sonda ultrassônica.

Equipamento utilizado		Rendimento (%)	µg trolox/mL	µg proteínas/mL	Açúcares µg/mL
Banho em ultrassom	Água	8,91	0,60	10,04	1074,37
Sonda ultrassônica	Água	23,47	0,59	28,33	3070,79
Banho em ultrassom	Solvente eutético	3,95	0,32	8,34	482,97
Sonda ultrassônica	Solvente eutético	25,11	0,73	29,53	2181,9

Verificando os resultados obtidos das extrações em banho ultrassônico com os melhores rendimentos obtidos com os planejamentos de experimentos (Tabela 10), verifica-se que o rendimento aumentou 535,7% usando solvente eutético ao passo que utilizando água o aumento foi de 163,41%. Esse efeito proporcionado pela sonda ultrassônica sucede-se devido a maior interação que o equipamento tem com o solvente e a amostra, provocando uma cavitação de forma mais efetiva, além de uma agitação que favorecia o atrito entre o sólido e líquido, enquanto que no banho as ondas ultrassônicas teriam que passar inicialmente pela água do banho, transpor a vidraria do Erlenmeyer para somente então chegar no sistema em que ocorreria a extração.

Deve-se levar em consideração que a sonda ultrassônica possui uma potência de 400 W, sendo está a que a água apresentou seu melhor rendimento, utilizando 8 W/cm³ de solvente, ao mesmo tempo que o melhor rendimento usando solvente eutético foi com uma potência de 353 W e 7,06 W/cm³. Em contrapartida, o banho ultrassônico apresenta 132 W de potência e 2,64 W/cm³ de solvente, descontando a água do banho. Também pode-se observar que a frequência ultrassônica máxima da sonda é de 24 kHz e do banho ultrassônico de 40 kHz, demonstrando que a frequência

superior não compensou a potência inferior do equipamento. Desse modo, pode-se ponderar que as vantagens de operação da sonda ultrassônica aliada a maior potência que o banho ultrassônico, acaba por favorecer a obtenção de um extrato mais rico em substâncias de interesse do estudo, devido à maior cavitação, turbulência, fricção e ruptura das células do shiitake.

Comparando os resultados de proteínas, açúcares e atividade antioxidante obtidas da extração com solvente eutético com o banho ultrassônico aos estudados no DCCR (Tabela 4), verifica-se que todos os ensaios apresentaram melhores resultados utilizando a sonda ultrassônica comparada ao banho ultrassônico. Isso provavelmente se deve à viscosidade e densidade mais elevadas, assim a sonda proporcionaria, tendo contato direto com o solvente, uma maior eficiência na cavitação.

Ao analisar a utilização da água como solvente no banho e comparar os resultados com os da Tabela 4 que também foi utilizado água junto à sonda ultrassônica, percebe-se que os ensaios 1 e 3 tiveram resultados piores aos do banho ultrassônico, com exceção da atividade antioxidante do ensaio 1. Esses dois ensaios foram realizados utilizando menor amplitude, sendo a potência de 126,52 W o que equivaleria a 2,53 W/cm³ de solvente, isso pode indicar que devido a potência ter sido inferior à do banho (132 W de potência e 2,64 W/cm³ de solvente) seria melhor utilizar o banho ultrassônico. No entanto, o ensaio 5 da Tabela 4, que utilizou apenas 80 W de potência, obteve um rendimento de 10,1%, superior aos 8,91% do banho, contudo nesse ensaio foi utilizado um ciclo de pulsação mais elevado que nos ensaios 1 e 3 e por isso pode ter obtido esse rendimento superior, para mais, o ensaio 5 teve uma atividade antioxidante (0,48 µg de trolox/mL) e concentração de proteínas (9,6 µg/mL) inferiores às do banho ultrassônico (0,60 µg de trolox/mL e 10,04 µg/mL de proteínas).

4.4 ANÁLISES POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

As Figuras 9 a 13 apresentam as análises de FT-IR. Os gráficos gerados pelas análises por FT-IR demonstram os resultados das amostras de shiitake utilizadas na extração, os melhores rendimentos de precipitados dos ensaios empregando solvente eutético e água, os quais correspondem aos ensaios 4 e 6 respectivamente, e também os experimentos considerados como controles, sem utilizar a sonda do ultrassom.

Figura 9 - Análise por FT-IR da amostra de shiitake utilizada nas extrações.

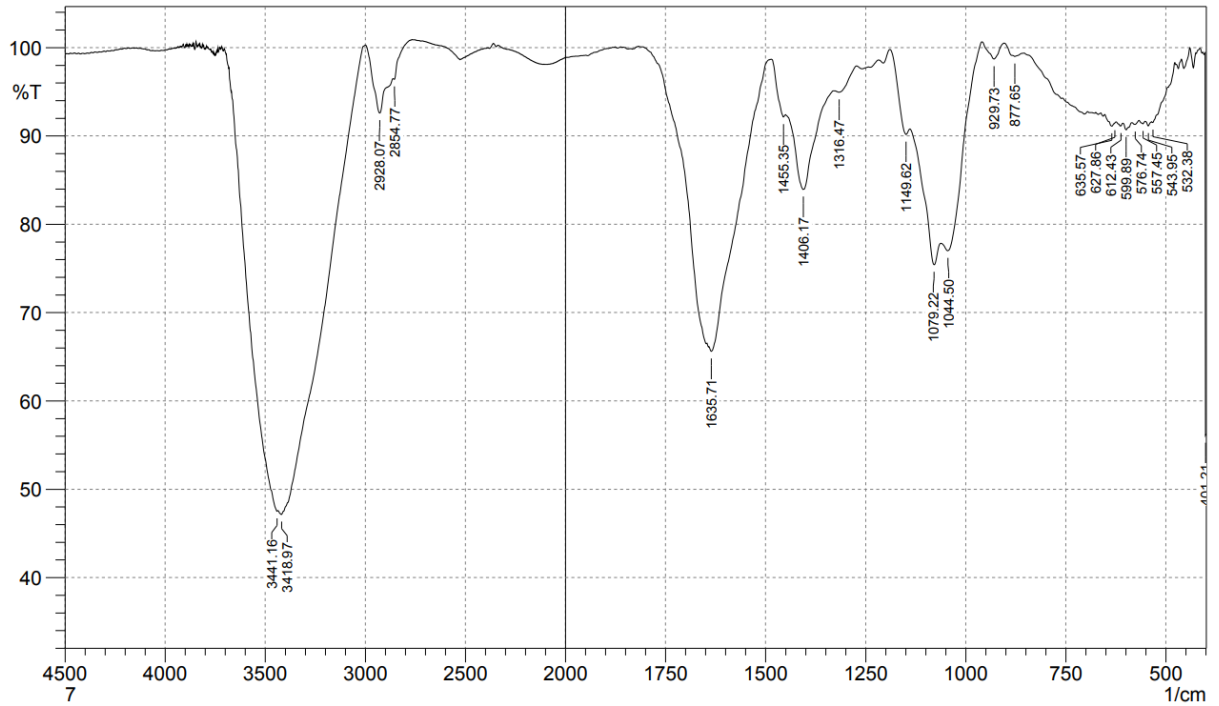


Figura 10 - Análise por FT-IR do ensaio 4 utilizando solvente eutético.

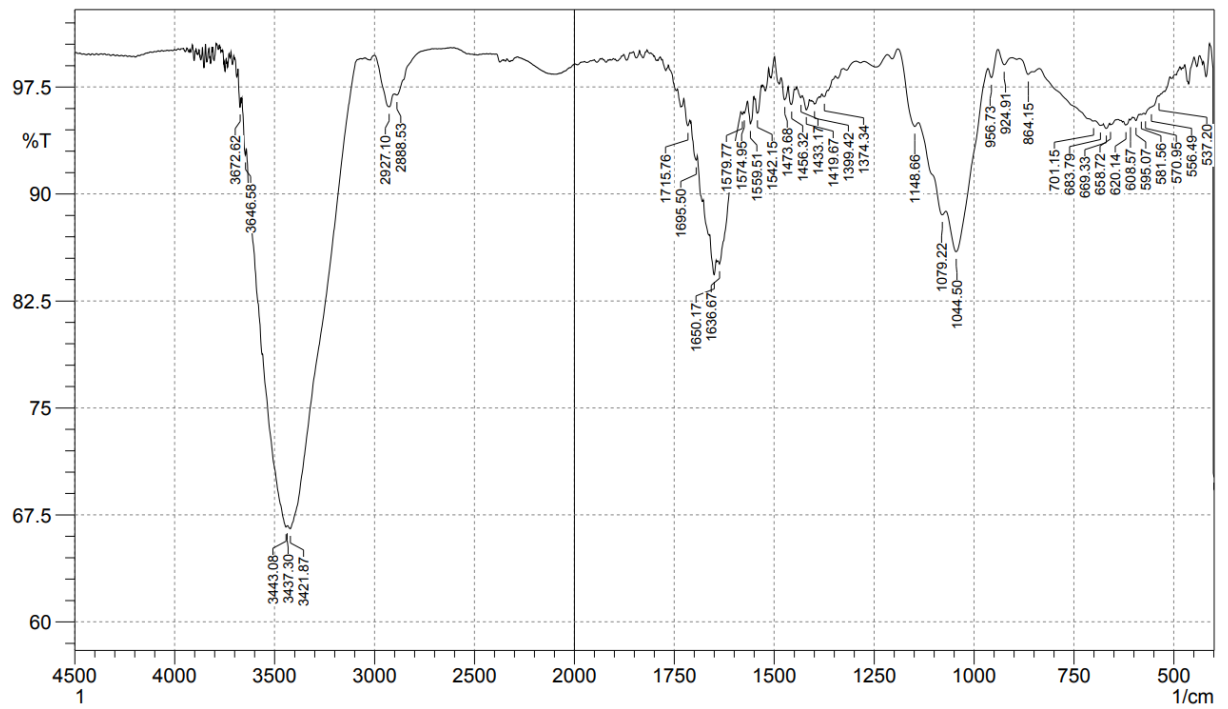


Figura 11 - Análise por FT-IR do ensaio 6 utilizando água.

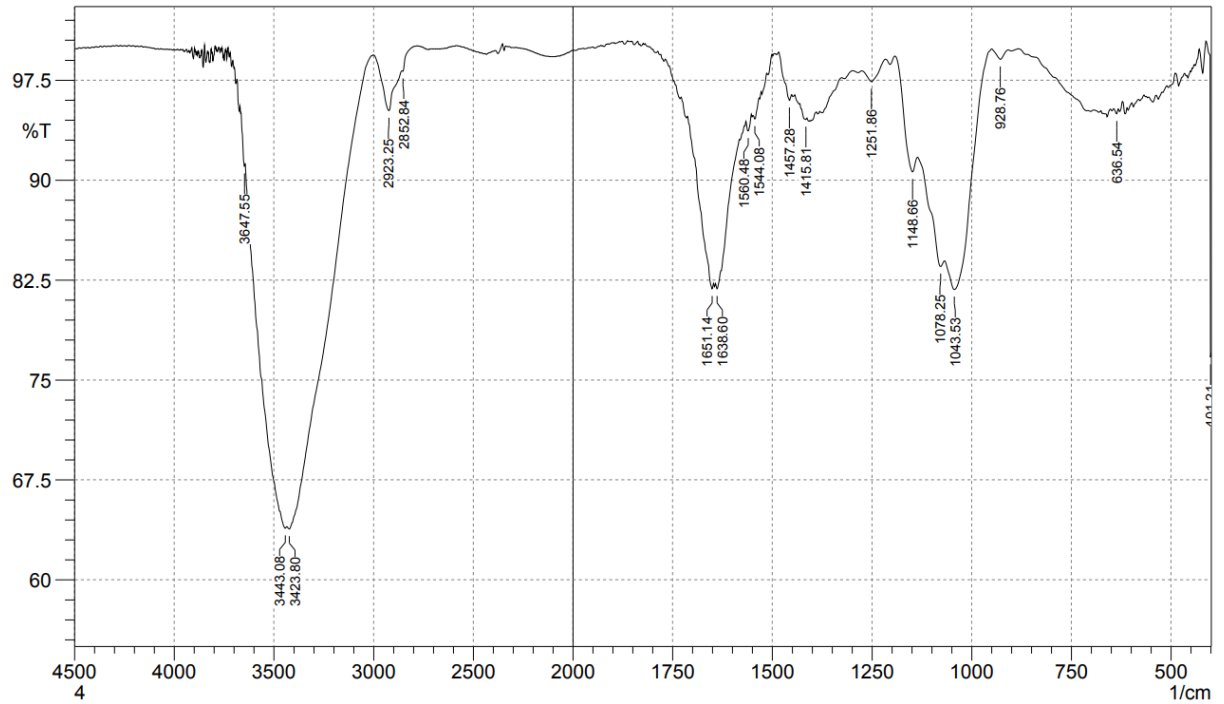


Figura 12 - Análise por FT-IR do controle utilizando água.

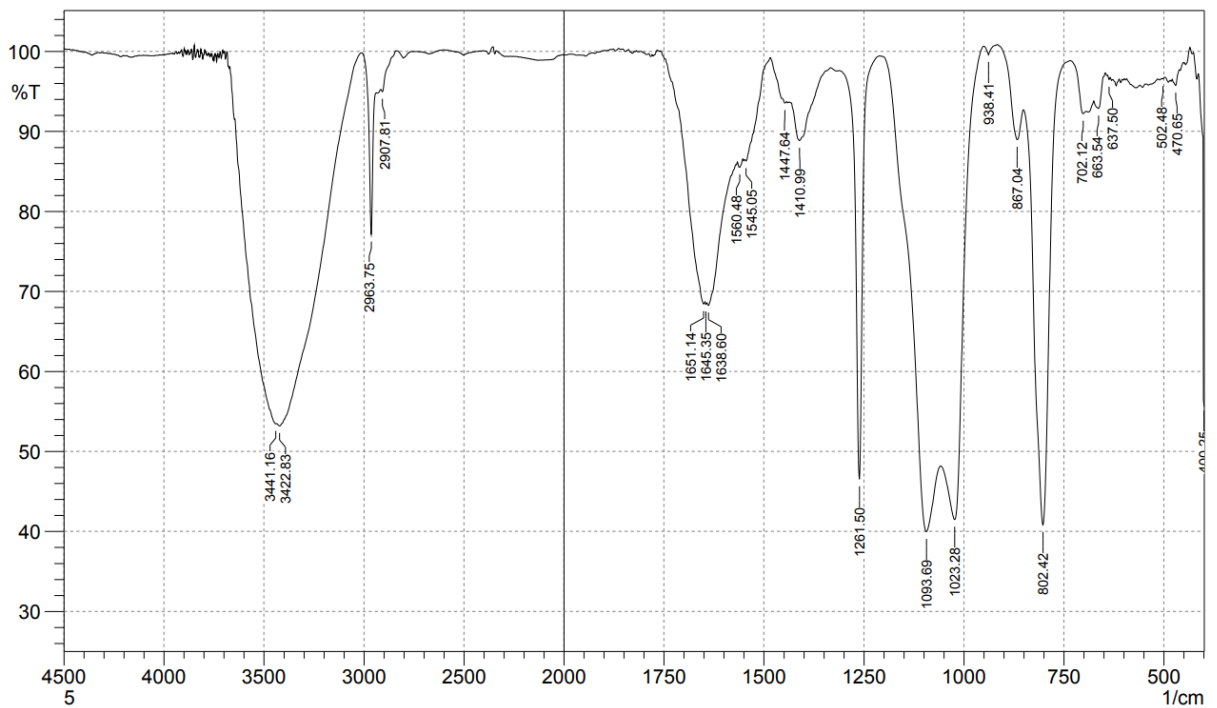


Figura 13 - Análise por FT-IR do controle utilizando solvente eutético.



Gonzaga et al. (2013) realizaram a análise em FT-IR de β -glucanos isolados de cogumelos e obtiveram picos semelhantes aos encontrados nas análises deste trabalho, indicando a presença desses polissacarídeos na amostra e nos precipitados extraídos. Na Figura 9, que corresponde a amostra de shiitake, percebe-se um pico em 3418 cm^{-1} o que corresponderia a uma ligação O-H, a faixa apresentada em 2928 cm^{-1} pode ser atribuída à ligação C-H, as bandas de 1635 e 1406 cm^{-1} ao COO- e COO-CH, já em 1149 cm^{-1} seriam relativas às ligações C-O-C (éter de ligação glicosídica), 1079 e 1044 cm^{-1} seriam ligações de C1-H (carbono anomérico) e C-O (alcool primário), respectivamente, enquanto que em 929 cm^{-1} atribui-se a C1-H de configuração α e 877 cm^{-1} indicaria ligações C1-H de ordenação β . Essas frequências também foram observadas em outros trabalhos da literatura reportados na Tabela 11.

Tabela 11 - Estudos que realizaram análise por FT-IR de β -Glucanos e seus comprimentos de ondas e ligações atribuídas comparadas às análises por FT-IR realizadas no presente trabalho.

Tipo de ligação	Song et al. (2020) (cm ⁻¹)	Sun et al. (2019) (cm ⁻¹)	*Owaid et al. (2019) (cm ⁻¹)	*Wang et al. (2019) (cm ⁻¹)	Hussain et al. (2018) (cm ⁻¹)	Gonzaga et al. (2013) (cm ⁻¹)	Amostra do shiitake (cm ⁻¹)	Precipitados do ensaio 6 com água (cm ⁻¹)	Precipitados do ensaio 4 com solvente eutético (cm ⁻¹)
(O–H)	3500-3200	3000-3700	3357 e 2890	3356-3383	3427-3445	3411	3441 e 3418	3443 e 3423	3443,3437 e 3421
(C–H)	3500-3200, 1640 e 1375	2918 e 2850, 1200-1500	2941 e 1260	2929–2925 1658–1658	2905-2927 1417–1416	2929	2928 e 2854	2923 e 2852	2927 e 2888
(COO-)	1640 e 1375					1650	1635	1651 e 1638	1650 e 1636
Pequenas quantidades de proteínas	-	-	1633		1644-1658, 1539-1545	-	--	1560 e 1544	1579-1542
C=O	-	-		2929–2925 1658–1658	1700-1745	-	-	-	1715
Vibração de flexão das moléculas de água	-	1645				-	-	-	-
(COO–CH)	1410	-	1398 e 1350		-	1406	1406	1457 e 1415	1374-1473
C–OH	-	1200-1500				-	-	-	-
Proteínas não ordenadas (C–O–C) ligação	-	-				1242	-	1251	-
glicosídica em forma de piranose	-	1156, 1078 e 1043	1092	1025–1041	-	1149	1148, 1078, 1044	1148, 1078, 1044	1148, 1078, 1044
(C1–H) carbono anomérico	-	-			-	1074	1079	1078	1079
(C–O) álcool primário	-	-	1260 e 1092		-	1028	1044	1043	1044
C1–H com ligação α	-	-		575–547	840	933	929 e 599- 532	928	924 e 595-537
C1–H com ligação β	887	-	1092		898	852	877	-	864
Estruturas –CH aromáticas			896						

*: Extrato do shiitake.

De acordo com Hussain et al. (2018), Wang et al. (2005) a absorção em torno de 1074 cm^{-1} indica a presença da porção gluco-piranoose das β -D-glucanas. Além disso, também indica a estrutura linear de β -D-glucano ligado através da ligação (1-3) e em 898 cm^{-1} refere-se a ligações glicosídicas ligadas a β . Além disso, Yang et al. (2020) e Dong et al. (2020) indicaram que a banda de absorção em 611 cm^{-1} foi caracterizada por uma vibração angular de C-H na molécula de açúcar, indicando que as ondas encontradas nesta região (600-650) podem estar relacionadas a esse comportamento da molécula.

Observando a Figura 10 (extração com solvente eutético) e a 11 (extração com água) percebe-se que na primeira encontra-se uma maior quantidade de picos. Isso poderia indicar a presença de resquícios do solvente eutético (cloreto de colina e glicerol) no entanto, se for observada a Figura 13 (controle com solvente eutético) nota-se que não apresenta o mesmo comportamento, descartando, assim, essa possibilidade, indicando que a purificação com etanol eliminou o solvente dos precipitados. Uma possibilidade é que as bandas do extrato obtido com água se sobrepuseram às bandas menores, fato que não ocorreu com a análise da Figura 10.

Na Figura 11, que corresponde a extração utilizando água, nota-se que não apresenta um pico de absorbância na onda de aproximadamente 898 cm^{-1} , a qual indicaria ligações glicosídicas ligadas a β , no entanto, as demais bandas que indicam a presença dos β -D-glucano estão presentes. Isso pode ser devido a absorbância ter se arrastado para as bandas de menores comprimentos de onda, formando os picos menores e largos até 711 e 616 cm^{-1} , tendo em vista que os picos das outras amostras analisadas, em 898 cm^{-1} foram sutis. Além disso, observando o controle obtido com a água (Figura 12) percebe-se que houve uma menor transmitância de luz, gerando picos maiores, uma possibilidade seria que haveria maior proporção de proteínas não ordenadas (1261 cm^{-1}), pois na Tabela 4, verifica-se que ocorreu a extração de mais proteínas no controle de água que para 3 extrações em ultrassom com baixa potência, mas mesmo assim o rendimento foi menor.

Ao analisar as Figuras 9 a 13, percebe-se que todas as amostras apresentaram picos de absorbância semelhantes às encontradas na amostra de shiitake desidratado in natura. Do mesmo modo, que em estudos como de Gonzaga et al. (2013), Song et al. (2020), Sun et al. (2019) e Hussain et al. (2018) que analisaram β -glucanos isolados e tiveram resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Isso indica que as moléculas dos polissacarídeos, principalmente de β -glucanos, é o

polissacarídeo em maior proporção presente no shiitake, foram extraídas, e estavam presentes nos precipitados em etanol obtidos por ultrassom e até mesmo nos controles (Morales et al. 2019). Isso indica que os β -glucanos são extraídos apenas com o contato entre a água ou solvente eutético e o shiitake, sem ligar o ultrassom, no entanto os rendimentos encontrados utilizando o ultrassom foram muito superiores.

5. CONCLUSÕES

Este estudo possibilitou o aproveitamento da *Lentinula edodes* para extração de polissacarídeos. Através do planejamento de experimentos realizado os melhores resultados utilizando solvente eutético foram obtidos com 88,36% de amplitude e 0,93 de pulsação, sendo obtido 25,11% de rendimento, 29,53 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas, 0,73 μg de trolox/ml na atividade antioxidante e 2181,9 $\mu\text{g/ml}$ de açúcares. Já quando foi utilizada água como solvente na extração, os melhores resultados foram obtidos com 100% de amplitude e 0,75 de pulsação, sendo o rendimento de 23,47%, 28,33 $\mu\text{g/ml}$ proteínas, 0,59 μg de trolox/ml atividade antioxidante e 3070,79 $\mu\text{g/ml}$ açúcares.

Dessa forma, ficou perceptível que os melhores rendimentos e concentrações de açúcares foram obtidos utilizando amplitudes e ciclos de pulsação mais elevados. Da mesma forma, ocorreu na obtenção de compostos antioxidantes e proteínas empregando solvente eutético, enquanto que utilizando água ocorreram maiores variações.

A análise FT-IR confirmou a presença dos polissacarídeos ao comparar os respectivos resultados com as análises de outros estudos, estes que analisaram β -glucanas isoladas, as quais o shiitake apresenta em grande quantidade, e possuem propriedades de interesse para a saúde humana e propriedades físico-químicas que possibilitam sua utilização na indústria alimentícia ou farmacêutica.

Portanto, em vista dos resultados obtidos verifica-se a possibilidade da utilização de um cogumelo fora do prazo de validade para o consumo humano, possibilitando a obtenção de uma série de compostos de interesse para a indústria de alimentos ou farmacêutica, como os polissacarídeos com propriedades antioxidantes, sendo uma alternativa de utilização deste resíduo.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação de outros tipos de solventes eutéticos;
- Avaliação de outras partes descartadas (parte inferior do caule ou cogumelos deformados) na produção do cogumelo shiitake;
- Identificar quais moléculas são responsáveis pela atividade antioxidante obtida nos extratos;
- Identificar através de cromatografia quais os açúcares extraídos.

6. REFERÊNCIAS

- AL-DAWSARI, J. N. et al. Fitting of experimental viscosity to temperature data for deep eutectic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 310, p. 113127, 2020.
- BENITO-ROMÁN, O. et al. Optimization of the β -glucan extraction conditions from different waxy barley cultivars. **Journal of Cereal Science**, v. 53, n. 3, p. 271-276, mai. 2011.
- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": the frap assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, jul. 1996.
- BISEN P. S. *et al.*, 2010 ***Lentinus edodes: a macrofungus with pharmacological activities***. *Curr. Med. Chem.*, v. 17, p. 2419-2430, (2010).
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, Georgia, v. 1, n. 1, p. 248-254, jan. 1976.
- BRUNETTI, F. *Mecânica dos Fluidos*. Pearson Education, São Paulo, 2008. 431 p.
- CANCIAM, C. A. Efeito da temperatura na viscosidade dinâmica dos óleos lubrificantes SAE 5W20, SAE 5W30 E SAE 5W40. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 11, n. 2, p. 239-250, jan. 2014.
- CHEUNG, Y. C. et al. Kinetic Models for Ultrasound-Assisted Extraction of Water-Soluble Components and Polysaccharides from Medicinal Fungi. **Food And Bioprocess Technology**, v. 6, n. 10, p. 2659-2665, 19 jul. 2012.
- DONG, J. L. et al. Comparative study of thermal processing on the physicochemical properties and prebiotic effects of the oat β -glucan by in vitro human fecal microbiota fermentation. **Food Research International**, v. 138, p. 109818, dez. 2020.
- DOU, Z. M. et al. Comparative study on the effect of extraction solvent on the physicochemical properties and bioactivity of blackberry fruit polysaccharides. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 1548-1559, jul. 2021.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1 mar. 1956. American Chemical Society (ACS).
- FINIMUNDY, T. C. et al. A Review on General Nutritional Compounds and Pharmacological Properties of the *Lentinula edodes* Mushroom. **Food And Nutrition Sciences**, v. 05, n. 12, p. 1095-1105, 2014.

FU, X. et al. Sono-physical and sono-chemical effects of ultrasound: primary applications in extraction and freezing operations and influence on food components. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 60, jan. 2020.

GIL-RAMÍREZ, A. et al. Strengths and weaknesses of the aniline-blue method used to test mushroom (1→3)-β-d-glucans obtained by microwave-assisted extractions. **Carbohydrate Polymers**, v. 217, p. 135-143, ago. 2019.

GONZAGA, M. L. C. et al. Structural characterization of β glucans isolated from *Agaricus blazei* Murill using NMR and FTIR spectroscopy. **Bioactive Carbohydrates And Dietary Fibre**, v. 2, n. 2, p. 152-156, out. 2013.

GRANJEIRO, A. A. et al. Viscosidades de polpas concentradas de figo-da-Índia. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.13, n.2, p.219-224, 2007.

HOBBS, C. **Medicinal value of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (*Agaricomycetidae*) – a literature review.** *Intl. J. Med. Mushr.*, v. 2 p. 90. 2000

HUSSAIN, P. et al. Structural characterization and evaluation of antioxidant, anticancer and hypoglycemic activity of radiation degraded oat (*Avena sativa*) β-glucan. **Radiation Physics And Chemistry**, v. 144, p. 218-230, mar. 2018.

KHAN, A. A. et al. Biological and pharmaceutical activities of mushroom β-glucan discussed as a potential functional food ingredient. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 16, p. 1–13. 2018.

LEONG, Y. K. et al. Extraction of polysaccharides from edible mushrooms: emerging technologies and recent advances. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, p. 117006, jan. 2021.

LI, X.; CHEUNG, P. C. K.. Application of natural β-glucans as biocompatible functional nanomaterials. **Food Science And Human Wellness**, v. 8, n. 4, p. 315-319, dez. 2019.

MAO, G. et al. Reconsidering conventional and innovative methods for pectin extraction from fruit and vegetable waste: targeting rhamnogalacturonan i. **Trends In Food Science & Technology**, v. 94, p. 65-78, dez. 2019.

MAHMOOD, I. et al. Mutated Shiitake extracts inhibit melanin-producing neural crest-derived cells in zebrafish embryo. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 245, p. 109033, jul. 2021.

MENK, J. J. et al. Biosorption of pharmaceutical products by mushroom stem waste. **Chemosphere**, v. 237, p. 124515, dez. 2019.

MORALES, D. et al. Testing the effect of combining innovative extraction technologies on the biological activities of obtained β-glucan-enriched fractions from *Lentinula edodes*. **Journal Of Functional Foods**, v. 60, set. 2019a.

MORALES, D. et al. Production of a β -d-glucan-rich extract from Shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) by an extraction/microfiltration/reverse osmosis (nanofiltration) process. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 51, p. 80-90, jan. 2019b.

OJHA, K. S. et al. Ultrasound technology for the extraction of biologically active molecules from plant, animal and marine sources. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, v. 122, jan. 2020.

OWAID, M. N. et al. Mushroom-assisted synthesis of triangle gold nanoparticles using the aqueous extract of fresh *Lentinula edodes* (shiitake), Omphalotaceae. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 12, p. 100270, dez. 2019.

REN, Zhenzhen; LIU, Wenbo; SONG, Xinling; QI, Yanran; ZHANG, Chen; GAO, Zheng; ZHANG, Jianjun; JIA, Le. Antioxidant and anti-inflammation of enzymatic-hydrolysis residue polysaccharides by *Lentinula edodes*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 811-822, dez. 2018.

ROCKENBACH, I. I. et al. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 174-179, jul. 2011.

SARAVANA, P. S. et al. Green and efficient extraction of polysaccharides from brown seaweed by adding deep eutectic solvent in subcritical water hydrolysis. **Journal Of Cleaner Production**, v. 198, p. 1474-1484, out. 2018.

SARI, M. et al. Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. **Food Chemistry**, v. 216, p. 45-51, fev. 2017.

SHAFIE, M. H. et al. Deep eutectic solvents (DES) mediated extraction of pectin from *Averrhoa bilimbi*: optimization and characterization studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 216, p. 303-311, jul. 2019.

SHISHOV, A. et al. Deep eutectic solvents are not only effective extractants. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, v. 129, ago. 2020.

SONG, J. et al. Synthesis of carboxymethylated β -glucan from naked barley bran and its antibacterial activity and mechanism against *Staphylococcus aureus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 242, p. 116418, ago. 2020.

SUN, C. et al. (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan from yeast cell wall: characteristic and potential application in controlling postharvest disease of pear. **Postharvest Biology And Technology**, v. 154, p. 105-114, ago. 2019.

VICENZI, C. B. et al. Extração e caracterização de Beta-Glucanoas em cultivares de aveia-branca. In: Latin American Symposium Of Food Science, 12., 2017, Campinas-SP. Food Science and its impact on a changing world. Campinas. 2017.

VILKOVÁ, M. et al. The role of water in deep eutectic solvent-base extraction. **Journal Of Molecular Liquids**, v. 304, abr. 2020.

WANG, Q. et al. β -Glucans: relationships between modification, conformation and functional activities. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 257-270, 9 fev. 2017.

WANG, Y. et al. A novel process for preparation of (1 \rightarrow 3)- β -d-glucan sulphate by a heterogeneous reaction and its structural elucidation. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, n. 1, p. 93-99, jan. 2005.

WANG, T. et al. Mycelial polysaccharides of *Lentinus edodes* (shiitake mushroom) in submerged culture exert immunoenhancing effect on macrophage cells via MAPK pathway. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 745-754, jun. 2019.

WEN, C. et al. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 48, p. 538-549, nov. 2018.

XIAOKANG, W. et al. Volatile and non-volatile compounds of shiitake mushrooms treated with pulsed light after twenty-four hour storage at different conditions. **Food Bioscience**, v. 36, p. 100619, ago. 2020.

XUE, Z. et al. Physicochemical and functional properties of extruded dietary fiber from mushroom *Lentinula edodes* residues. **Food Bioscience**, v. 32, dez. 2019.

YANG, Y. et al. Microwave-assisted extraction of an acidic polysaccharide from *Ribes nigrum* L.: structural characteristics and biological activities. **Industrial Crops And Products**, v. 147, p. 112249, mai. 2020.

YAO, Y. et al. Power ultrasound and its applications: a state-of-the-art review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 62, abr. 2020.

ZDANOWICZ, M. et al. Deep eutectic solvents for polysaccharides processing. A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 200, p. 361-380, nov. 2018.

ZHAN, Y. et al. Basil polysaccharides: a review on extraction, bioactivities and pharmacological applications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 1, jan. 2020.

ZHANG, J. et al. Ultrasonic-enhanced subcritical water extraction of polysaccharides by two steps and its characterization from *Lentinus edodes*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 2269-2277, out. 2018.

ZHANG, L.; WANG, M.. Optimization of deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Dioscorea opposita* Thunb. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 675-681, fev. 2017.

ZHAO, Y. M. et al. Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from *Lentinus edodes* and its anti-hepatitis B activity in vitro. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2217-2223, fev. 2018.