

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

Isabela de Lourdes Valente

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS
COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTES A PARTIR DO FUNGO
Botryosphaeria dothidea ISOLADO DO BIOMA PAMPA**

Santa Maria, RS,
2017

Isabela de Lourdes Valente

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS COM
ATIVIDADE ANTIOXIDANTES A PARTIR DO FUNGO *Botryosphaeria dothidea*
ISOLADO DO BIOMA PAMPA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Área de Concentração em Desenvolvimento de Processos Agroindustriais e Ambientais como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lisiane de Marsillac Terra

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Valente, Isabela de Lourdes

Otimização da produção e extração de metabólitos com atividade antioxidante a partir do fungo *Botryosphaeria dothidea* isolados do bioma Pampa / Isabela de Lourdes Valente.- 2017.

84 p.; 30 cm

Orientador: Lisiane de Marsillac Terra

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, RS, 2017

1. *Botryosphaeria dothidea* 2. Ultrassom 3. Extração com fluido supercrítico 4. Extração com GLP comprimido 5. Atividade antioxidante I. Terra, Lisiane de Marsillac II. Título.

Isabela de Lourdes Valente

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS COM
ATIVIDADE ANTIOXIDANTES A PARTIR DO FUNGO *Botryosphaeria dothidea*
ISOLADO DO BIOMA PAMPA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Área de Concentração em Desenvolvimento de Processos Agroindustriais e Ambientais como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**.

Aprovada em 17 de agosto de 2017:

**Lisiane de Marsilac Terra, Dra, (UFSM)
(Presidente/Orientadora)**

Marcio Antônio Mazutti. Dr. (UFSM)

André Aguiar Mendes, Dr.(UNIFEI)-Videoconferência

Santa Maria, RS
2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me guiar, iluminar, me conceder discernimento e por me segurar quando faltaram forças.

A minha família, em especial aos meus pais, Virgínio e Isabel, pelo amor incondicional, por acreditarem em mim, pela dedicação, pelo incentivo, por me tranquilizarem mesmo estando tão longe; e aos meus irmãos, Tatiane, Virgínio Jr. e Janete, também pelo amor, força, apoio e confiança. Sou muito feliz por ter vocês como família e sou eternamente grata!

As minhas amigas Silvinha e Yara, por me ouvirem, pela força e compreensão.

A todos os meus familiares e amigos que sempre estiveram em oração por mim, desejando tudo de melhor e por entenderem minha ausência.

À minha orientadora, prof^a Dr^a Lisiane de Marsillac Terra pela oportunidade concedida, pelos ensinamentos, orientação e paciência.

Ao programa de pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de desenvolver este projeto.

Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Química da UFSM, pela ajuda e por proporcionarem um ambiente de pesquisa agradável; em especial a minha amiga Tássia Confortin por estar sempre presente e disposta, pelo incentivo, companheirismo e sugestões que me ajudaram muito no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de Santa Maria: Matheus Alves, Gabriel Porto, Gislaíne Kummer, Mariana Marion e Iran Almeida, pelas risadas, diversões, força e companheirismo.

E a todos aqueles que fizeram e fazem parte da minha vida e que comigo caminham para sermos contribuintes de um bem maior.

Muito Obrigada!

RESUMO

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTES A PARTIR DO FUNGO *Botryosphaeria dothidea* ISOLADO DO BIOMA PAMPA

Autora: Isabela de Lourdes Valente
Orientador: Lisiane de Marsillac Terra

Neste trabalho o ultrassom foi utilizado para aumentar a produção de metabólitos com atividade antioxidante obtidos a partir da fermentação submersa do fungo *Botryosphaeria dothidea*, seguida por diferentes métodos de extração: com soxhlet, extração com fluido supercrítico com solvente CO₂ e GLP comprimido da biomassa do micro-organismo. O tratamento com o ultrassom foi aplicado através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com diferentes tempos de sonicação (1 a 15 min), em diferentes fases do processo fermentativo, sob várias velocidades de agitação (0 a 150 rpm), tendo como variáveis dependentes a atividade antioxidante do radical hidroxila e DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) analisados no caldo (sobrenadante) fermentado. Para o radical hidroxila, embora o modelo não tenha tido um ajuste significativo a 5% observou-se um aumento na atividade antioxidante comparado ao controle, sem sonicação, em 70% dos experimentos e com valores até 7% superiores. A rotação foi o único parâmetro significativo a 5% na análise do DPPH. Para análise da capacidade antioxidante da biomassa resultante dos processos fermentativos, foram realizadas extrações, em diferentes temperaturas e pressões com os solventes CO₂ do fluido supercrítico (40, 50 e 60 °C e 150, 200 e 250 bar) e GLP comprimido (20, 30 e 40 °C e 15, 25 e 35 bar). O maior rendimento, 1,14 %, foi determinado pelo CO₂ do fluido supercrítico utilizando etanol como co-solvente, seguido de 0,94 % com o solvente GLP e 0,86 % com o solvente CO₂. Compostos bioativos com atividade antioxidante foram encontrados nas extrações com fluido supercrítico solvente CO₂ e com soxhlet utilizando etanol e acetato de etila como solventes, identificando o 1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nanone.

Palavras-chave: *Botryosphaeria dothidea*. Ultrassom. Extração supercrítica. GLP comprimido. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

METABOLITES PRODUCTION OPTIMIZATION WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY FROM THE FUNGUS *Botryosphaeria dothidea* ISOLATE OF THE PAMPA BIOMA

Author: Isabela de Lourdes Valente

Advisor: Lisiane de Marsillac Terra

In this work the ultrasound was used to increase the production of metabolites with antioxidant activity obtained from the submerged fermentation of the fungus *Botryosphaeria dothidea*, followed by different extraction methods: with soxhlet, extraction with supercritical fluid with CO₂ solvent and compressed LPG of the biomass of the microorganism. Ultrasound treatment was applied through a Rotational Central Compound Design (DCCR) with different sonication times (1 to 15 min), at different stages of the fermentation process, under various stirring rates (0 to 150 rpm). Dependent variables to the antioxidant activity of the hydroxyl radical and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) analyzed in the fermented broth (supernatant). For the hydroxyl radical, although the model did not have a significant adjustment to 5 %, there was an increase in antioxidant activity compared to the control, without sonication, in 70 % of the experiments and with values up to 7 % higher. Rotation was the only significant parameter at 5 % in DPPH analysis. In order to analyze the antioxidant capacity of the biomass resulting from the fermentation processes, extractions were carried out at different temperatures and pressures with the supercritical CO₂ (40, 50 and 60 ° C and 150, 200 and 250 bar) and compressed LPG (20, 30 and 40 ° C and 15, 25 and 35 bar). The highest yield, 1.14 %, was determined by the CO₂ of the supercritical fluid using ethanol as co-solvent, followed by 0.94 % with the solvent LPG and 0.86 % with the solvent CO₂. Bioactive compounds with antioxidant activity were found in the extractions with supercritical CO₂ and Soxhlet solvent using ethanol and ethyl acetate as solvents, identifying 1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo [4.3.0] nanone.

Keywords: *Botryosphaeria dothidea*. Ultrasound. Supercritical extraction. Compressed LPG. Antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

APRESENTAÇÃO

Figura 1 - Representação dos biomas presentes no Rio Grande do Sul.....	9
Figura 2 - Vitamina C; Vitamina E com modificações.....	11
Figura 3 - Principais carotenoides presentes na dieta diária por humanos: Carotenos: β -caroteno e licopeno *; Xantofila, derivado do caroteno com presença de oxigênio, zeaxantina, com modificações**.....	13
Figura 4 - Estrutura química básica dos Flavonoide e ácidos Fenólicos (ácido p-hidroxibenzóico, ácido 3,4-dihidroxibenzóico, ácido cafeico e ácido p-cumárico), com modificações.....	14
Figura 5 - Diagrama de fases de uma substância pura.....	20

ARTIGO 1

Figura 1- Diagrama de Pareto para os efeitos da variável agitação.....	32
Figura 2- Gráfico de superfície referente à resposta da atividade antioxidante em relação aos efeitos da agitação: e ao tempo de fermentação (A); e a sonicação (B).....	33

ARTIGO 2

Figura 1-Aparelhos experimentais para extrações de CO ₂ e GLP. Os principais dispositivos são: 1) reservatório do solvente; 2) banhos termostático - à esquerda o de resfriamento e à direita o de aquecimento; 3) bomba de alta pressão de seringa; 4) suporte de extração de aço inoxidável [23] (com permissão).....	45
Figura 2- Curvas cinéticas globais na extração <i>Botryosphaeria dothidea</i> usando CO ₂ supercrítico (a) e GLP comprimido (b) como solventes.....	50
Figura 3- Composição (área, %) identificados do <i>Botryosphaeria dothidea</i> nas condições que obtiveram maior rendimento e atividade antioxidante nas EFS-CO ₂ , EFS-CO ₂ com co-solvente, ELP-GLP e extração com Soxhlet: () 1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nanone; (⊗) 1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutil bicycle[4.3.0]nanone; (⊗) pentadecanoic acid; (■) 3-benzyl-1, 4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nanone; (⊗) ergosta-5,22-dien-3-ol(3 β , 22E); (⊗) ergosta-5,7,22-trien-3-ol(3 β ,22E); (⊗)	

cholesta-5,22-dien-3-ol(3 β); (◊) 9-octadecenoic acid (Z)-methyl ester; (■)
tricosanoic acid, methyl ester.....52

LISTA DE TABELAS

APRESENTAÇÃO

Tabela 1 - Dados dos pontos de fusão de alguns solventes.....	18
Tabela 2 - Comparação entre as propriedades dos gases, fluidos supercríticos e líquidos.....	20

ARTIGO 1

Tabela 1- Variáveis codificadas e não codificadas do planejamento fatorial 23 completo.....	25
Tabela 2- Tratamento com banho de ultrassom.....	30
Tabela 3- ANOVA para os valores da atividade <i>antioxidante com o radical DPPH</i>	32
Tabela- 4- Polaridade e rendimento dos diferentes solventes da extração com soxhlet.....	34
Tabela 5 - Caracterização química dos compostos das extrações com soxhlet.....	38

ARTIGO 2

Tabela 1- Planejamento experimental fatorial 22 com triplicata no ponto central das extrações de CO ₂ e GLP.....	44
Tabela 2- Comparação dos rendimentos das extrações, EFS-CO ₂ , ELP-GLP e Soxhlet, obtidos <i>pele B. dothidea</i>	48
Tabela 3 - Caracterização química dos compostos das extrações EFS-CO ₂ , ELP-GLP e Soxhlet com solvente hexano (HEX).....	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
1.1 OBJETIVO GERAL.....	7
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 ANTIOXIDANTES.....	9
2.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	14
2.2.1 Fungo <i>Botryosphaeria dothidea</i>	15
2.3 EMPREGO DO ULTRASSOM NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOTIVOS DURANTE A FERMENTAÇÃO SUBMERSA	16
2.4 EXTRAÇÃO COM SOLVENTES	18
2.5 EXTRAÇÃO COM FLUÍDO SUPERCRÍTICO	19
2.6 EXTRAÇÃO SUBCRÍTICA	22
3 ARTIGO 1: TRATAMENTO COM ULTRASSOM PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITO COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE A PARTIR DO FUNGO <i>Botryosphaeria dothidea</i>	23
4 ARTIGO 2: EXTRAÇÃO COM DIOXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO E COMPRESSÃO DE GÁS DE PETROLEO LIQUEFEITO NA OBTENÇÃO DE METABÓLITOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>Botryosphaeria dothidea</i>	44
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÃO GERAL	69
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

Agentes exógenos, como exposição ao sol, radiação solar, fumo e drogas medicinais são alguns dos fatores responsáveis pelo desequilíbrio da capacidade oxidativa, denominado estresse oxidativo. Outros fatores motivadores ao estresse oxidativo são as espécies reativas de oxigênio, como o superóxido e radicais hidroxila gerados no metabolismo celular normal, promovendo desestabilização e desintegração da membrana celular e doenças relacionados a idade, além de autismo, acidente vascular cerebral e diabetes (TABARAKI and NATEGHI, 2011; BAJEROVA et al., 2014).

O corpo humano apresenta um sistema próprio de defesa contra os efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio (ROS- Reactive Oxygen Species), mas muitas das vezes este é suplementado por compostos antioxidantes presentes em alimentos, cosméticos e medicamentos, particularmente no caso de idosos. O fato de que compostos sintéticos têm sido relacionados a efeitos adversos como toxicidade, faz com que aumente o interesse em explorar novas fontes eficazes, econômicas e naturais que podem reduzir a incidência de doenças crônicas e degenerativas (TABARAKI and NATEGHI, 2011; WANG, Z. et al., 2014).

Segundo Almeida et al., (2016), o consumo de frutas e vegetais tem demonstrado baixa morbidade de certas doenças crônicas, devido a presença de antioxidantes nos alimentos. Essas substâncias são capazes de inibir a oxidação e reduzir a concentração de radicais livres.

Outra fonte valiosa que está sendo considerada promissora são os fungos, que demonstram atividades biológicas importantes e um atrativo potencial antioxidante em várias fases de seu crescimento (SMITH et al., 2015). Para isto, a fermentação submersa tem sido um dos processos eficientes para produção de biomassa micelial e compostos bioativos (CHING et al., 2014; ZHANG, H. et al., 2014).

Diante disso, alguns estudos têm mostrado métodos para o aumento de certas atividades metabólicas produzidas por micro-organismos, e o uso do ultrassom apresenta certa vantagem (ZHU et al., 2014). Ademais, métodos com solventes, soxhlet e extração com fluido supercrítico têm sido utilizados para a extração de compostos bioativos (CHEN et al., 2015).

A extração supercrítica é uma metodologia testada em produtos naturais e alimentos (AKALIN et al., 2013) e tem demonstrado maior eficiência quando comparado a outros métodos, além de ser menos tóxico.

Em trabalhos anteriores do mesmo grupo de pesquisa, “Produção de metabólitos antioxidantes a partir de fermentação submersa de fungos isolados dos biomas Pampa e Mata Atlântica”, foram identificados fungos como produtores de metabólitos antioxidante. Dentre estes, o fungo *Botryosphaeria dothidea* foi o que apresentou resultados mais expressivos (DRUZIAN, 2016), o que levou ao estudo de condições de fermentação e de extração destes metabólitos que pudessem potencializar esta produção.

1.1 OBJETIVO GERAL

Obter metabólitos com atividade antioxidante a partir de *B. dothidea* isolado da planta *Solanum americanum*, coletada da cidade de Santiago, Vila Paraíso – RS, em regiões que incluem os biomas Pampa e Mata Atlântica.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de metabólitos antioxidantes a partir da fermentação submersa do *B. dothidea*, utilizando diferentes condições de aplicação do ultrassom em fases distintas do processo fermentativo e diferentes velocidades de agitação do meio;

- Avaliar a atividade antioxidante do sobrenadante fermentativo obtido através de um delineamento experimental tendo os radicais hidroxila e DPPH como parâmetros analisados;

- Caracterizar quimicamente as extrações realizadas no ponto em que se obteve melhor atividade antioxidante na análise do caldo fermentado sob diferentes condições;

- Avaliar diferentes processos de extração dos compostos bioativos a partir da biomassa micelial obtida na fermentação: extração utilizando o soxhlet com solventes (etanol, água e acetato de etila); e extração com fluido supercrítico com CO₂ puro e com co-solvente etanol, e extração com Gás Liquefeito de Petróleo (GLP);

- Identificar compostos com atividade oxidante presentes na fração obtida a partir dos extratos obtidos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo o Ministério do Meio ambiente, o Estado do Rio grande do Sul apresenta dois tipos de bioma (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016): o Pampa, ao Sul, e a Mata Atlântica, ao norte. O Pampa é o bioma especificamente da região, apresenta uma área de 176.496 km², conforme o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2004), o que corresponde a 63% do território estadual e 2,07% do nacional, assim como estende-se aos territórios da Argentina e Uruguai (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016; IBF, 2016); apresenta um patrimônio natural, genético e cultural associado à grande biodiversidade de importância nacional e global. Além disso, possui flora e fauna próprios (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016), com notável diversidade de gramíneas (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016; IBF, 2016). Sua paisagem é composta por campos, acompanhado por capões de mata, mata ciliares e banhados. No campo natural se destaca espécies de compostos leguminosos e a principal atividade econômica é a pecuária extensiva (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016; IBF, 2016). E é neste bioma que se apresenta a maior parte do aquífero Guarani (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016).

A outra porcentagem do estado Rio-grandense corresponde ao bioma Mata Atlântica. Por sua vez, consiste em um conjunto de formação de florestas e ecossistemas, áreas essa que amplia também por 17 estados brasileiros. Considera-se que a Mata Atlântica possui cerca de 20.000 espécies vegetais, e assim a região é emergente a conservação da biodiversidade (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016).

Além das leguminosas e da pecuária, como atividade econômica do Rio Grande do Sul, destacam-se a produção de arroz, milho, trigo, fumo e uva. Portanto, devido a ampla diversidade, pesquisadores, por meio de estudo de campo, extraíram amostras de plantações e isolaram alguns micro-organismos presentes. Dentre esses, destacaram-se os que produziram metabólitos com atividade antioxidante, e o que apresentou melhor produção foi o micro-organismo *B. dothidea*, isolado a partir de plantas daninhas infectadas, exibindo

sintomas de enfermidades, em áreas de cultivo de arroz irrigado e pastagens naturais do bioma Pampa.

Figura 1 - Representação dos biomas presentes no Rio Grande do Sul



FONTE: INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORESTAS, 2016

2.1 ANTIOXIDANTES

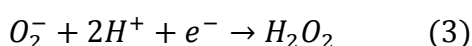
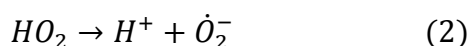
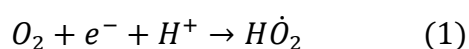
Radicais livres são moléculas instáveis, formadas na transformação do alimento em energia, pelo organismo humano (BAJEROVA et al., 2014; SHARMA et al., 2014) e induzem o estresse oxidativo que provoca modificações fisiológica em moléculas essenciais (ARAB et al., 2011; SHARMA et al., 2014; WALIA et al., 2015) como lipídeos e ácidos nucléicos, danos as células, (XIA et al., 2011; WANG, Z. et al., 2014; WALIA et al., 2015) além de deteriorar a coloração e o sabor de produtos nutritivos, degrada vitaminas e promove envelhecimento, ainda acarreta diversos tipos de doenças como doenças

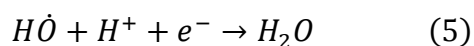
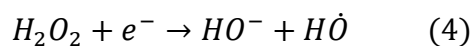
crônicas, cardíacas, inflamações, desordem reumática, cânceres, dentre outras (XIA et al., 2011; WANG, Z. et al., 2014; XUE et al., 2015). O organismo também é exposto a radicais livres por fontes ambientais, como fumaça de cigarro, poluição do ar, luz solar, radiação e drogas medicinais (TABARAKI and NATEGHI, 2011; BAJEROVA et al., 2014; PISOSCHI and POP, 2015).

Seres humanos possuem sistema de defesa que reparam danos oxidativos, mas exíguos (TABARAKI and NATEGHI, 2011; XIA et al., 2011; WANG, Z. et al., 2014). Dessa forma, os antioxidantes salvagam biomoléculas contra ação do estresse oxidativo. Essa insuficiência teve que ser equilibrada com substâncias exógenas, naturais ou sintéticas (TABARAKI and NATEGHI, 2011; XIA et al., 2011; BAJEROVA et al., 2014; SHARMA et al., 2014).

Alguns antioxidantes sintéticos adicionados em produtos alimentares representam risco a saúde (BHATTACHARYA et al., 2014), demonstrando efeitos adversos como toxicidade (TABARAKI and NATEGHI, 2011; ABO-ELMAGD et al., 2014; ELMAGD, 2014; SHARMA et al., 2014). Com isso, houve um aumento no interesse sobre antioxidante naturais, com explorações eficazes e econômicas (TABARAKI and NATEGHI, 2011; MESOMO et al., 2012; ABO-ELMAGD et al., 2014; BHATTACHARYA et al., 2014; SHARMA et al., 2014) e que tem agregado benefícios a saúde (ARAB et al., 2011; LIMA et al., 2014), tais como vitaminas, proteínas e flavonoides que protegem o corpo humano (WANG, Z. et al., 2014; MOO-HUCHIN et al., 2015).

No metabolismo celular, em processo aeróbio para produção de calor e energia química, na oxidação do carbono e biomoléculas, o oxigênio molecular é reduzido por etapas (equações 1,2,3,4 e 5) e assim percebe-se a formação do superóxido, ânion superóxido (equação 2), peróxido de hidrogênio (equação 3) e radical hidroxila (equação 4), que são as espécies reativas de oxigênio, ROS (Reactive Oxygen Species) (TABARAKI and NATEGHI, 2011; ABO-ELMAGD et al., 2014; MOO-HUCHIN et al., 2015; PISOSCHI and POP, 2015):





$H\dot{O}_2$: Radical hidroperoxyl

\dot{O}_2^- : Ânion superóxido

H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio

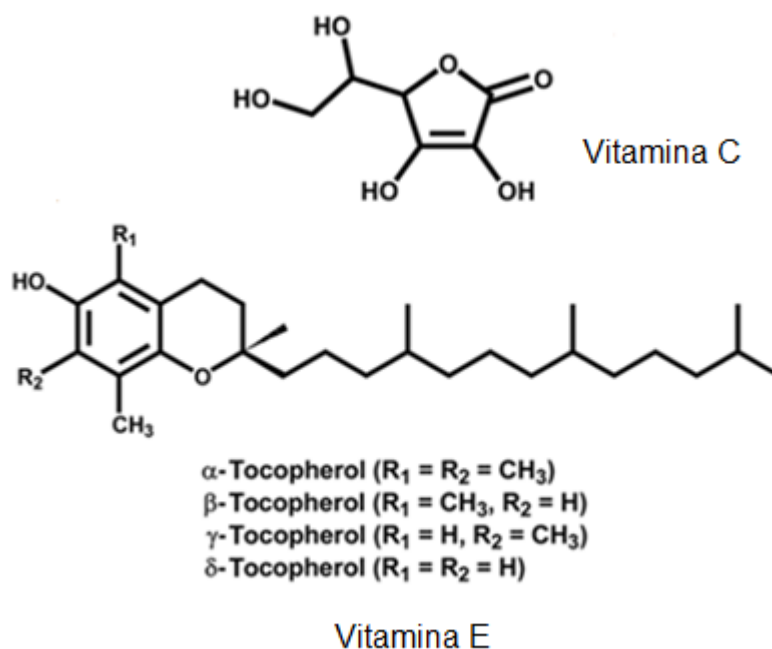
OH^- : Ânion hidroxila

$\dot{O}H$: Radical hidroxila

O estresse oxidativo não ocorre somente aos ROS, mas também devido a perturbação no equilíbrio redox celular (MOO-HUCHIN et al., 2015). Vitaminas C e E, carotenoides e polifenóis (TABARAKI and NATEGHI, 2011; ABO-ELMAGD et al., 2014; MOO-HUCHIN et al., 2015; OROIAN and ESCRICHE, 2015; PISOSCHI and POP, 2015) podem retardar ou inibir os danos causados por esse estresse (SHARMA et al., 2014; OROIAN and ESCRICHE, 2015; MEULLEMIESTRE et al., 2016).

Frutas e vegetais são fontes expressivas de vitaminas C e E, sendo este último presente em óleos vegetais, nozes e sementes. A vitamina C (ácido ascórbico) apresenta em sua estrutura (Figura 2) quatro grupos hidroxila disponíveis para doar um hidrogênio com sistema oxidante (IM et al., 2014; OROIAN and ESCRICHE, 2015) e este nutriente é solúvel em água (ALAVEZ et al., 2014; IM et al., 2014). A vitamina E (Figura 2), presente em membranas lipídica e em lipoproteína, é um nutriente lipossolúvel (IM et al., 2014; OROIAN and ESCRICHE, 2015) e possui 8 compostos naturais (LU et al., 2016), quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis em sua estrutura (ALAVEZ et al., 2014; IM et al., 2014; OROIAN and ESCRICHE, 2015).

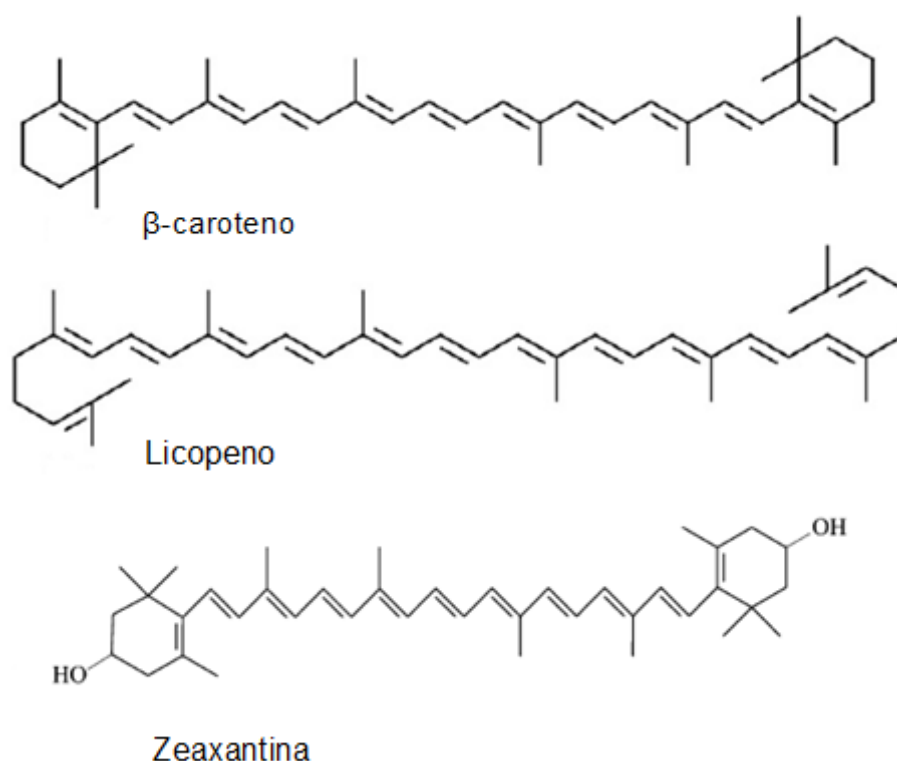
Figura 2 - Vitamina C; Vitamina E com modificações



Fonte: (IM et al., 2014)

Assim como as vitaminas, os carotenoides são encontrados em diversas frutas e vegetais, além de operar como pigmento em organismos fotossintéticos, do mesmo modo como em alguns fungos e bactérias (SAHA et al., 2015). São moléculas lipossolúveis, com duas principais classe, caroteno (α -caroteno, β -caroteno e o licopeno) (SAHA et al., 2015; OROIAN and ESCRICHE, 2015) e xantofilas (violaxantina, anteraxantina, zeaxantina, neoxantina e luteína) (Figura 3), possui aplicação como corantes e aditivos na alimentação animal e exibe características antioxidantes de competência farmacêutica, cosmética e industrial (SAHA et al., 2015).

Figura 3 - Principais carotenoides presentes na dieta diária por humanos: Carotenos: β -caroteno e licopeno *; Xantofila, derivado do caroteno com presença de oxigênio, zeaxantina, com modificações**



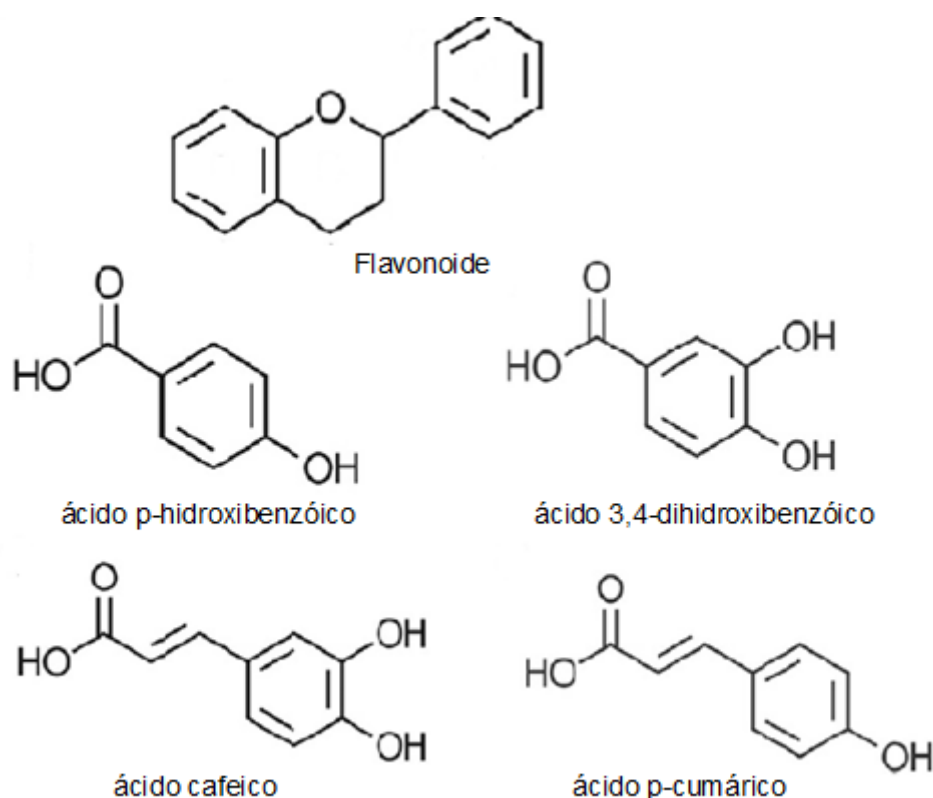
Fonte: *(ORIOAN and ESCRICHE, 2015, com modificações), **(CHENG et al., 2014)

Similarmente, tem-se os polifenóis, compostos naturais onipresentes em plantas (ORIOAN and ESCRICHE, 2015), assim como encontrados em fungos e cogumelos (ABO-ELMAGD et al., 2014) e segundo autores, *in vitro*, a concentração necessária para proteção ao estresse oxidativo é bem mais baixo comparando-o ao antioxidantes químicos. Os polifenóis apresentam como principais grupos os flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos (ORIOAN and ESCRICHE, 2015) com propriedades benéficas a saúde humana (NAKAMURA et al., 2013).

Os flavonoides (Figura 4), presentes nos vegetais (NAKAMURA et al., 2013), doadores de elétrons (GOUFO and TRINDADE, 2014), os estilbenos encontrado em videiras, as lignanas em sementes, linhaças, raízes, folhas, frutas e grãos e os ácidos fenólicos, que evidenciam quase um terço dos fenóis dietéticos possuem ácido carboxílico como grupo funcional e compõem uma subclasse de metabólitos aludidos como “fenólicos” (QIAO et al., 2013). Além

disso, são divididos em dois quadros: ácido carboxílico ligado ao anel benzênico (ácidos benzoicos) ou a um ácido propenóico (ácido cinâmico) (QIAO et al., 2013; OROIAN and ESCRICHE, 2015). Compostos fenólicos doam um átomo de hidrogênio ou um elétron livre a um radical livre, assim eliminam os radicais derivados do oxigênio (SHARMA et al., 2014).

Figura 4 - Estrutura química básica dos Flavonoide e ácidos Fenólicos (ácido p-hidroxibenzóico, ácido 3,4-dihidroxibenzóico, ácido cafeico e ácido p-cumárico), com modificações



Fonte: (OROIAN and ESCRICHE, 2015)

2.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Micro-organismos endofíticos são aqueles que se desenvolvem em plantas sem causar enfermidades, em um primeiro momento, (QIN et al., 2009; CHANDRA, 2012; SAMAGA and RAI, 2016), não excluindo a possibilidade de patogenia (SCHULZ et al., 1993). O endofítico pode, desta forma, apresentar duas versões, podendo ser um patógeno latente ou um parasita ao hospedeiro (SAMAGA and RAI, 2016), mas a maioria apresenta efeito benéfico ao

hospedeiro (LI et al., 2012), auxiliando no crescimento da planta hospedeira (XIAO et al., 2014; CHANDRA, 2012) e na produção de metabólitos secundários de acordo com seu sistema de defesa. Sua penetração nos tecidos ocorrem de maneira específica e, devido a sua biotransformação, proporciona uma nova condição para a produção de metabólitos secundários, ensejando oportunidades na medicina, agricultura e indústria farmacêutica.

Em alguns casos, o fungo endofítico, por exemplo, pode produzir o mesmo metabólito que a planta hospedeira produz (CHANDRA, 2012). Os endofíticos podem ser encontrados em cascas, folhas e xilemas de árvores, gramíneas, algas e musgos (SCHULZ et al., 1993). O fungo *B. dothidea* é exemplo de um micro-organismo, na qual apresenta-se como agente fitopatológico de vastos conjuntos lenhosos (PHILLIPS, 1998).

2.2.1 Fungo *Botryosphaeria dothidea*

Fontes naturais são matérias-primas propícias à obtenção de antioxidante, devido a sua diversidade, estrutura e funcionalidade. Porém extrativismos econômicos exacerbados provocam uma diminuição na diversidade e destruição de espécies raras. Dessa forma, há um interesse por fungos endofíticos, que produzem metabólitos secundários, principalmente por parte de indústrias (SAMAGA and RAI, 2013).

Entre os recursos naturais que apresentam atividade antioxidante, se destacam: ervas, sementes oleaginosas, chás, frutas, vegetais dentre outros (SHARMA et al., 2014; MOO-HUCHIN et al., 2015). E podem ser utilizados em âmbito farmacêutico, cosmético (MOO-HUCHIN et al., 2015; WALIA et al., 2015), indústria alimentícia, (MESOMO et al., 2012; MOO-HUCHIN et al., 2015; WALIA et al., 2015) papel e celulose (WALIA et al., 2015).

Há micro-organismos que produzem substância que apresentam atividade antioxidante, se destacando a micobacteria, fungos como o Shiitake (*Lentinula edodes*), (KITZBERGER et al., 2007; BHATTACHARYA et al., 2014) Cogumelo ostra (BHATTACHARYA et al., 2014), *Phellinus linteus*, espécie de cogumelos pertencentes aos *Hymenochaetaceae Basidiomycetes* (WANG, Z. et al., 2014) e o *B. dothidea*.

O *B. dothidea* é um fungo ascomiceto, de cor cinza escuro, quando cultivado em meio com BDA (Batata Dextrose Ágar) apresenta potencial em colonizar vários hospedeiros (RABARI et al., 2016), sendo identificado como causador da podridão mole durante o armazenamento pós-colheita do kiwi (*Actinidia deliciosa*) (KIM et al., 2009) e motivador das manchas marrons com lesões necróticas nas folhas da mangueira (*Mangifera indica* L.), bem como ocasionador da ferrugem de *Botryosphaeria* na panícula de árvores de pistacheiros (*Pistacia vera* L.), segundo AHIMERA et al., 2004.

Este micro-organismo endofítico penetra no tecido vegetal por meio de rupturas causadas por animais, ou pelas sementes reprodutivas, caules, raízes e folhas (RABARI et al., 2016), devido a seus esporos serem dispersos pelo vento (MEHL et al., 2016). Similarmente é relatado como responsável pela mancha anelar em folhas e caules em pereiras, da mesma forma que podridão nas frutas, pericímio e cancro na haste (WANG, L. et al., 2014).

Por outro lado, esta capacidade invasiva e de rápida adaptação, torna-o de grande importância quando se obtêm metabólitos de interesse industrial e tem sido considerado uma fonte em potencial na obtenção de compostos bioativos para domínio farmacêutico e industrial (XIAO et al., 2014).

2.3 EMPREGO DO ULTRASSOM NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOTIVOS DURANTE A FERMENTAÇÃO SUBMERSA

O ultrassom é uma tecnologia simples, barata em escala laboratorial, de fácil operação, baixo consumo de energia, de relevância industrial no aumento da produtividade de processos biológicos envolvendo células vivas. Tem amplo campo de aplicação: diagnósticos, bioprocessos, como biorremediação, biocatálise e extração (YAO et al., 2014; ZHANG, H. et al., 2014). A técnica com o ultrassom tem aparecido muito em pesquisas como responsável por uma maior liberação de metabólitos e estimulação da sua biossíntese (LIUA et al., 2012; ZHAO et al., 2012; AVHAD et al., 2014; WANG et al., 2013). A sonicação influencia na produção de metabólitos primários e secundários de forma diferente, de acordo com as devidas condições (ZHANG, H. et al., 2014), salientando que inúmeros micro-organismos exibem resistência variadas ao ultrassom (YUSAF, 2015).

Segundo Kwatkowska et al. (2011), a aplicação de ultrassom de baixa potência favorece o crescimento de culturas de células microbianas, e altas potência pode danificar esse aumento (LIUA et al., 2012; KWIATKOWSKA et al., 2011; ZHANG, H. et al., 2014; NAVEENA et al., 2015). Pesquisas realizadas por Sulaimana et al., (2011) afirmam que o ultrassom aplicado de forma adequada enseja aumento na produtividade em células vegetais, certas bactérias, leveduras e fungos filamentosos (SULAIMANA et al., 2011; ZHAO et al., 2012; ZHANG, H. et al., 2014; YAO et al., 2014).

Algumas condições atuam na eficiência do ultrassom quando utilizadas em células procarióticas, como: intensidade do mesmo, profundidade da sonda, concentração de células, volume da amostra, pH, força iônica, e ainda o aumento da temperatura (termossonicação) e/ou da pressão (manossonicação), ou associação de ambos (mano-termossonicação) com o ultrassom, técnicas essas usadas para erradicar bactérias (PIYASENA et al., 2003; ZHANG, L. et al., 2014; ERRIU et al., 2016).

O ultrassom (20-100 KHz) também tem sido usado para aumentar o rendimento da extração, com tempos mais curtos, manipulação simplificada e diminuição no consumo de solvente e energia (TABARAKI and NATEGHI, 2011; NAVEENA et al., 2015). Isso facilita a extração de macromoléculas, como proteínas, polissacarídeos, caroteóides, flavonóide e compostos fenólicos, além de se evitar o efeito do aumento da temperatura (NAVEENA et al., 2015).

A formação de microporos, favorece a transferência de massa e, assim, aumenta o rendimento. Essa formação está associada a cavitação acústica (NAVEENA et al., 2015; ZHAO et al., 2012; AVHAD et al, 2014), que é a combinação entre pressão, calor e turbulência, acelerando o processo de transferência de massa no processo de extração; e a difusão dos solventes através da parede celular. O ultrassom permite a hidratação da biomassa, facilitando seu inchamento provocando uma ampliação dos poros da parede celular, favorecendo a difusão e, por conseguinte transferência de massa, propiciando a extração (NAVEENA et al., 2015; MEULLEMIESTRE et al., 2016; AVHAD et al., 2014).

2.4 EXTRAÇÃO COM SOLVENTES

Os solventes são compostos orgânicos voláteis e inflamáveis, com exceção da água, e que tem como função dissolver grande números de substâncias. O uso indiscriminado de solventes pode causar problemas ambientais devido a evaporação e permanência do mesmo na atmosfera, podendo acarretar aumento na poluição do ar e mudanças climáticas (CORRÊA e ZUIN, 2009).

Em 1990 os solventes mais utilizados foram o tolueno, tetraidrofurano (THF) e o diclorometano. Atualmente a preferência é por solventes alternativos que apresentam nenhum ou menor impacto ambiental, conhecidos como solventes verdes, que se enquadram na Química Verde (Green Chemistry). Assim, devem possuir alto ponto de ebulição (Tabela 1), baixa pressão de vapor, dissolverem grande quantidade de compostos orgânicos, serem atóxicos, apresentarem baixo custo e serem recicláveis. Com isso, em 2005 mudaram-se os solventes mais utilizados para 2-propanol, acetato de etila e metanol por apresentarem menos toxicidade (CORRÊA e ZUIN, 2009).

Tabela 1 - Dados dos pontos de fusão de alguns solventes

Solventes	Ponto de ebulição (°C)
Hexano	69
Acetato de etila	77
2- Propanol	82
Etanol	78
Metanol	65
Água	100

Fonte: Adaptado (CORRÊA e ZUIN, 2009)

A extração de compostos antioxidantes presentes em plantas e alimentos, é influenciada pela natureza do solvente a ser utilizado no intuito de adequar as suas característica polares e assim reaver os compostos fenólicos ali presentes.

Com isso o método tradicional utiliza-se dos solventes orgânicos como o etanol, metanol, acetona e acetato de etila. No entanto, há alternativas de extrações diferentes do tratamento convencional, simplificando o emprego para aplicações em alimentos (YEASMEN and ISLAM, 2015; MALDONADO et al., 2014; COSTA et al., 2012; ARAB et al., 2011).

Outras opções aos solventes tradicionais, segundo grupos de pesquisadores, abrangem: fluidos supercríticos, líquidos iônicos, polímeros de baixo ponto de ebulição, solventes perfluorados e água (CORRÊA e ZUIN, 2009). Segundo Bhattacharya et al., (2014), extrações que utilizam aquecimento, ebulição ou refluxo promovem perda da propriedade antioxidante, proveniente da ionização, oxidação e hidrólise.

Em uma extração com solvente deve-se levar em consideração certas limitações deste: se apresenta custo operacional elevado, requer quantidades e tempo prolongados e se o rendimento é baixo. A extração com solvente de compostos bioativos é comum (NAVEENA et al., 2015).

O solvente metanol em algumas situações é o mais adequado para extração de compostos fenólicos, na obtenção de melhores rendimentos. No entanto, não se adequa ambientalmente, ao contrário há outros solventes não tóxicos, ecologicamente corretos, como o etanol, n-butanol e o isopropanol que são reconhecidos pela FDA (Food and Drug Administration) (KHAN et al., 2010; TABARAKI and NATEGHI, 2011).

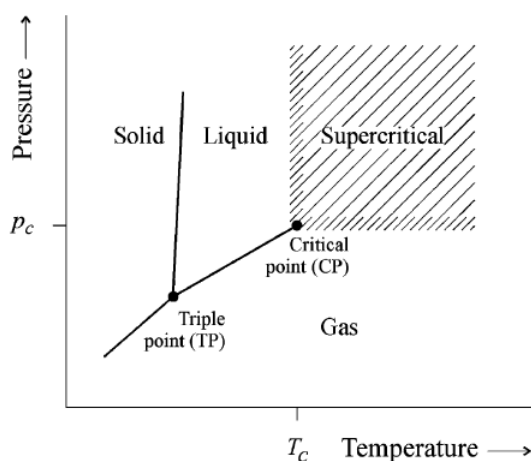
A extração com o aparelho Soxhlet, requer mais tempo para extração, e é considerada técnica clássica para extração de amostras podendo utilizar diferentes solventes como n-hexano e etanol, de acordo com as necessidades da matéria-prima (MAZZUTTI et al., 2012).

2.5 EXTRAÇÃO COM FLUÍDO SUPERCRÍTICO

O fluido supercrítico (FSC) é uma tecnologia verde que vem sendo desenvolvida com o intuito de diminuir os efeitos nocivos de solventes orgânicos convencionais no meio ambiente. Tem aplicação em indústrias alimentícias, em química analítica, na área de cromatografia e também pode ser empregado em biotecnologia e áreas a fins (CORRÊA e ZUIN, 2009; BHATTACHARYA et al., 2014).

O FSC consiste em uma substância que se apresenta na região acima do ponto crítico (PC), retratando altas temperaturas e pressões. Dessa forma, suas propriedades assumem forma interposta entre o líquido e o gás podendo sofrer modificações alterando as condições descritas, Figura 5. Por conseguinte, baixa viscosidade facilita o transporte, proporcionando elevada transferência de massa; a alta difusividade e tensão superficial nula melhora penetração nas matrizes sólidas; e a densidade é o dirigente da dissolução do fluido (Tabela 2) (CORRÊA e ZUIN, 2009).

Figura 5 - Diagrama de fases de uma substância pura



Fonte: Brunner (2005)

Tabela 2 - Comparação entre as propriedades dos gases, fluidos supercríticos e líquidos

Propriedades	Gás	FSC	Líquidos
Densidade (kg/m ³)	1	100-800	1000
Viscosidade (cP)	0,01	0,05-0,1	0,5-1,0
Difusividade (mm ² /s)	1-10	0,01-0,1	0,001

Fonte: CORRÊA e ZUIN, 2009

A extração com fluido supercrítico (SFE- Supercritical Fluid Extraction) com CO₂ é uma tecnologia que tem sido amplamente estudada (CORRÊA e ZUIN, 2009; BHATTACHARYA et al., 2014). O ponto crítico do CO₂, atingido em

laboratórios, é 74,8 atm e 31,1°C (CORRÊA e ZUIN, 2009), enquadrando-se no GRAS, é não tóxico, não inflamável (CORRÊA e ZUIN, 2009; AHANGARI and SARGOLZAEI, 2012; BHATTACHARYA et al., 2014), não corrosivo e barato (AHANGARI and SARGOLZAEI, 2012; BHATTACHARYA et al., 2014), relativamente inerte, é um solvente natural, insípido, removido por despressurização, apresenta alta solubilidade gasosa, não deixa resíduos e a seletividade de uma reação pode ser mudada drasticamente neste fluido ao compara-lo com os solventes orgânicos (CORRÊA e ZUIN, 2009). Além disso apresenta boa capacidade de extração (CORRÊA e ZUIN, 2009; SANTOS et al., 2015).

Esta técnica não extrai compostos polares, como os flavonoides (HE et al., 2005). Para isso precisa-se de um modificador como o etanol que auxilia na capacidade de extração (OMAR et al., 2013), mas em comparação dissolve compostos não polares e apresenta poder solvente para compostos de baixo peso molecular (WANG et al., 2008). O poder de solvatação do CO₂ pode ser aumentado com a introdução de solventes polares (metanol, água ou acetona) conhecido como co-solventes ou modificadores (CORRÊA e ZUIN, 2009). Além disso, a energia necessária para alcançar o estado supercrítico com dióxido de carbono é bem menor do que a energia associado com destilação utilizando solvente orgânico convencional (AHANGARI and SARGOLZAEI, 2012).

A vantagem da extração com CO₂ decorre de um aumento de seletividade, automaticidade, segurança ambiental e diminuição do uso de solventes orgânicos em relação às extrações convencionais (SOARES et al., 2016). As desvantagens devem-se a seu caráter reativo perante nucleófilos fortes, baixa constante dielétrica e assim baixo poder de solvatação, comportando-se como um hidrocarboneto e com isso não solubilizando reagentes/catalisadores mais polares (CORRÊA e ZUIN, 2009). Comparando-o com a extração convencional, a taxa de transferência de massa é diminuída, devido à baixa solubilidade, e são necessários equipamentos de maior custo para sua instalação, por trabalhar com temperaturas e pressões em condições supercríticas (CORRÊA e ZUIN, 2009; SOARES et al., 2016).

Marquez et al., (2011), Gahfoor et al., (2012), Mazzutti et al., (2012), Omar et al., (2013) e Machado et al., (2015) utilizaram da tecnologia supercrítica com solvente CO₂ para extração de compostos com atividade antioxidante a partir de

sementes de uva, cogumelo (*Agaricus brasiliensis*), cascas de frutas cítricas e própolis, respectivamente.

O solvente mais comum utilizado nessa tecnologia é o CO₂, mas há estudos que utilizam o propano ou butano, que são formas alternativas. O propano como solvente apresentou maior poder de solvatação, pressões mais baixas que com o CO₂ e tempo de extração menores (AHANGARI and SARGOLZAEI, 2012; PESSOA et al., 2015) propiciando rendimentos melhores em menos tempo (MESOMO et al., 2012), porém com custo maior do que o solvente CO₂ (PRÁ et al., 2016).

2.6 EXTRAÇÃO SUBCRÍTICA

O uso de fluidos subcríticos ou pressurizados com o Gás Liquefeito de Petróleo (GLP) contém uma mistura de propano (50,3% em peso), n-butano (28,4% em peso), isobutano (13,7% em peso), etano (4,8% em peso) e outros constituintes menores como metano, pentano e isopentano, tem mostrado ser uma metodologia eficiente e rápida para extração de compostos apolares (PRÁ et al., 2016). Suas propriedades físico-químicas, como densidade, difusividade, viscosidade e constante dielétrica, podem ser selecionadas por meio do controle da pressão e temperatura, o que se reflete na potência e seletividade de solvatação do solvente durante a extração (MESOMO et al., 2012). A vantagem em utilizar fluidos pressurizados GLP, inclui extração a temperaturas mais baixas, alta qualidade do produto, menor consumo de energia e método mais rápido e barato. Apesar desta extração não estar no estado supercrítico, seus benefícios são semelhantes (BIER et al., 2016; PRÁ et al., 2016; SOARES et al., 2016).

Kan et al., (2015), utilizaram da extração subcrítica com GLP para extração de uma substância com atividade antioxidante, a partir de um cogumelo (*Ganoderma lucidum*). A tecnologia escolhida apresentou vantagens por utilizar baixas temperaturas e obtém produtos de qualidade além de consumir pouca energia (BIER et al., 2016).

3 ARTIGO 1: TRATAMENTO COM ULTRASSOM PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITO COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE A PARTIR DO FUNGO *Botryosphaeria dothidea*

RESUMO O tratamento com o ultrassom foi testado para aumentar a produção de metabólitos com atividade antioxidante obtidos a partir da fermentação submersa do fungo *Botryosphaeria dothidea* a 28°C, sob diferentes tempos de sonicação (1 a 15 min) aplicados em diferentes fases do processo fermentativo (entre o segundo e o sétimo dia) e sob várias velocidades de rotação (0 a 150 rpm), através de um Planejamento Experimental (DCCR), totalizando 17 experimentos, incluindo três repetições do ponto central. O modelo obtido para o radical hidroxil não foi significativo a 5%, mas nas análises dos caldos fermentados (fração líquida) observou-se um aumento na atividade antioxidante em cerca de 70% dos experimentos realizados e de 7% do valor máximo determinado experimentalmente que foi de 96%. A rotação foi o único parâmetro significativo a 5% na análise do DPPH do caldo fermentado e obteve-se um ajuste de 73% para o modelo. Com relação à fração sólida separada por filtração do caldo fermentado foi realizada a extração dos compostos antioxidantes por soxhlet, empregando água, acetato de etila e etanol como solventes, seguida por identificação por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa, encontrando-se o composto, 1,4-diaza-2,5-dioobicyclo relatado na literatura como sendo um agente antioxidante.

Palavras-chave: Fungo endofítico. Atividade antioxidante. Ultrassom. Sonicação, Fermentação. Rotação.

1 Introdução

Os radicais livres são moléculas instáveis formadas pelo organismo humano, similarmente por exposições a agentes exógenos como sol e drogas medicinais. Dessa forma, o excesso desses radicais promove estresse oxidativo ocasionando um desequilíbrio da capacidade oxidativa (Arab et al., 2011; Bajerova et al., 2014; Sharma and Vig 2014; Walia et al., 2015) e danos a estrutura das células, induzindo o envelhecimento e algumas doenças como

câncer, doenças cardíacas, reumáticas, dentre outros (Jardim et al., 2017; Wang et al., 2014; Xia et al., 2011; Xue et al., 2015), sendo os principais alvos das espécies oxidativas, o DNA, as proteínas e os lipídeos (Tatay et al., 2016).

Na defesa contra radicais livre uso de antioxidantes têm sido propostos, tornando necessário o fornecimento ao organismo humano de uma dieta com alguns nutrientes como vitamina C, E e β -caroteno que oferecem alto poder antioxidante e suprem a carência no organismo (Kumar et al., 2017). Assim como, antioxidantes sintéticos vem sendo utilizados para evitar a deagração oxidativa. Alguns exemplos são: Hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) e Galato de propila que são aditivos alimentares. Mas há dúvida em relação a estes compostos quanto a sua carcinogenicidade (Dutta and Neog, 2016). Por conseguinte, antioxidantes naturais têm sido foco de interesse nos campos da medicina, nas indústrias alimentícias e cosméticas (Dutta and Neog, 2016; Kumar et al., 2017).

Outra alternativa na produção de antioxidante seria por meio de micro-organismos como o fungo endofítico *Botryosphaeria dothidea* (Xiao et al., 2014), que apesar de colonizar tecidos saudáveis em plantas hospedeiras (Samaga and Rai, 2016) e ainda ser provedor de manchas anelares e podridão em plantas e frutos, respectivamente (Mehl et al., 2016), são capazes de produzir metabólitos com atividade antioxidante.

Em vista disso, técnicas como o banho de ultrassom, dispositivo simples e de fácil manuseio (Bayar et al., 2017), sugeridas em trabalhos de Avhad and Rathod, (2014) e Wang et al, (2013), têm sido estudadas com intuito de intensificar os processos biológicos em micro-organismos, aumentando a produção de metabólitos, através do transporte de nutrientes pela membrana celular, da transferência de massa realizada pelas ondas ultrassônicas alterando as células com possível transferência gasosa, submetido ao caldo fermentativo.

Similarmente, Wang et al., (2013), mostrou que sonicação estimulada antes do segundo dia ou após o quinto dia, não confere resultados eficientes devido prematuridade e maturidade das célula. Além disso, assim como Avhad and Rathod (2014), e Yao et al., (2014), indicaram que a estimulação quando excessiva, maior/igual a 20 min promove estresse ao micro-organismo. Sonicação abaixo de 5 min não foi expressivo devido irradiação insuficiente (Wang et al, 2013; Yao et al, 2014).

Portanto, o presente estudo tem como objetivo utilizar do banho de ultrassom para aumentar a produção de metabólitos com atividade antioxidante produzidos por fermentação submersa do *Botryosphaeria dothidea* em que estudos anteriores mostrou-se promissor.

2 Materiais e métodos

2.1 Fungo utilizado

Foi utilizado o micro-organismo *B. dothidea*, isolado da planta *Solanum americanum*, coletada da cidade de Santiago, Vila Paraíso - RS, e identificado pelo Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, São Paulo - SP, Brasil. O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Bioprocessos, Departamento de Engenharia Química na Universidade Federal de Santa Maria, no Rio Grande do Sul.

2.2 Crescimento dos fungos

Os fungos foram inoculados em placas de Petri com 40 mL de meio BDA (Batata Dextrose Ágar) e incubados por um período de 7 dias a temperatura de 28 °C para seu crescimento.

2.3 Condição de cultivo

Após o crescimento, os fungos foram cultivados em fermentação submersa, contendo: 10 g / L de glicose; 7,5 g / L de extrato de levedura; 10 g / L de peptona; 2 g / L de sulfato de amônio; 1 g / L de sulfato ferroso; 1 g / L de sulfato de manganês; 0,5 g / L sulfato de magnésio (Souza et al, 2015) em erlenmeyers, de 250 mL com 150 mL de meio, no shaker, a temperatura de 28 °C com agitação de 120 rpm no período de 10 dias. Foram colocados 1 discos de 1,5 cm de micélio a cada 50 mL de meio e ajustado o pH 5,8 do caldo de cultura. Ao final da fermentação a cultura obtida foi filtrada com auxílio de bomba à vácuo, para separação do extrato e da massa do micélio.

2.4 Tratamento com ultrassom

Os fungos cultivados foram tratados com ultrassom (Modelo USC-1800A, Unique) com frequência e potência fixas, 40 kHz e 130W, respectivamente, durante o processo fermentativo para avaliação do seu efeito no crescimento celular e produção de metabólitos com atividade antioxidante. Os erlenmeyers foram imersos e mantidos a uma altura de 10 mm, a partir do fundo do banho. A frequência e a temperatura do ultrassom foram estabelecidas com base em indicações da literatura (Wang et al., 2013), e empregando-se um planejamento experimental (Rodrigues et al., 2015; Tabaraki and Nateghi, 2011) do tipo DCCR, com 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e repetição de 3 pontos centrais, para avaliação do poder antioxidante.

Os valores das variáveis independentes e seus níveis codificados são representados na Tabela 1: tempo de variação da fermentação de 7 dias, sonicadas unicamente a partir do segundo dia de fermentação, mantendo-se a temperatura controlada a 28 °C, tempo de sonicação de 1 a 15 min, agitação de 0 a 150 rpm. Após a sonicação, os erlenmeyers foram mantidos em agitação a 120 rpm nos shakers, dando continuidade as fermentações inteirando 10 dias de acompanhamento experimental. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se software Statistica 10 (Rodrigues et al., 2015, Yao et al., 2014).

Tabela 1- Variáveis codificadas e não codificadas do planejamento fatorial 2³ completo

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Tempo de fermentação para aplicação da sonicação, em dias	2	3,01	4,5	5,99	7
Tempo de sonicação em min	1	3,83	8	12,17	15
Agitação em rpm	0	30,36	75	119,64	150

Fonte: Produção da autora

2.5 Separação do sobrenadante e micélio

Ao final da fermentação, o caldo (sobrenadante) foi separado do micélio (filtrado) por filtração com auxílio de bomba à vácuo (Marca PHD). O sobrenadante foi analisado pelos métodos DPPH e hidroxila para medição da atividade antioxidante e a fração sólida foi submetida à extração com soxhlet para análise posterior.

2.6 Atividade antioxidante do sobrenadante

2.6.1 DPPH

Para análise da atividade antioxidante preparou-se uma solução de 1500 µL do sobrenadante misturando-o com 1480 µL de solução de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) em 20 µL em que a amostra foi diluída. Para o branco utilizou-se 1500 µL do extrato mais 1500 µL em que a amostra foi diluída. A mistura foi agitada e incubada sob abrigo da luz, a temperatura ambiente por 30 min. Em seguida mediu-se a absorbância a 522 nm, no espectrofotômetro com refletância difusa (Shimadzu modelo IR-Prestige-21). A inibição dos radicais livres nas amostras correlaciona com a diminuição da absorbância obtendo atividade antioxidante máxima, segundo a eq. 1 (Aliabadi et al., 2013; Arab et al., 2011; Sharma et al., 2014; Tabaraki and Nateghi, 2011).

$$\% \text{ da atividade antioxidante} = \left[\frac{A_{DPPH}(A_B - A_A)}{A_{DPPH}} \right] \times 100 \quad (1)$$

A_B: branco da amostra

A_A: amostra

2.6.2 Atividade antioxidante contra o radical hidroxila

A análise pela eliminação dos radicais hidroxila (HRSA), foi realizado usando 100 µL de EDTA, 100 µL de extrato, 100 µL de FeCl₃6H₂O, 100 µL de 2-deoxy-D-ribose, 100 µL de H₂O₂, 100 µL de ácido ascórbico, que reduz o Fe³⁺ a

Fe^{2+} , e 400 μL de tampão fosfato pH 7,4, para o preparo da amostra e do controle. Para os brancos, tanto da amostra quanto o controle, utilizou-se o mesmo preparo com a diferença que no lugar do extrato foi colocado 100 μL de solvente em que a amostra está diluída. Subsequentemente as misturas foram direcionadas a um banho a 37 °C por 1h; ao término adicionou-se 1 mL de TCA (Ácido Tricloroacético) 10 % e 1 mL de TBA (Ácido Tiobarbitúrico) 1 % e os deixou em um banho a 70 °C por 15 min. Em seguida, resfriou-os no congelador por 5 min e completou-os com 2 mL de água deionizada. O registro foi usando absorvância com 532 nm no espectrofotômetro com refletância difusa (Shimadzu modelo IR-Prestige-21) e a atividade do radical hidroxila foi calculado pela eq. 2 (Li et al., 2013; Shamra and Vig, 2014; Zhao et al., 2006):

$$\text{HRSA}(\%) = 100 - \left[\left(\frac{(A_A - A_{BA})}{(A_C - A_{BC})} \right) 100\% \right] \quad (2)$$

A_A : amostra

A_{BA} : branco da amostra

A_C : controle

A_{BC} : branco do controle

2.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se software Statistica 10, assim como, análise de variância com nível de confiança de 95 % (ANOVA) para testar a significância do modelo (Moo-Huchin et al., 2015; Wang et al., 2013). Dezesete experimentos foram realizados de acordo com o DCCR, e os limites de cada variável foi fundamentado com base na literatura (Bhattacharya et al., 2014).

2.8 Tratamento do micélio

Xiao et al., (2014) mostrou que a fermentação no estado sólido com o fungo *B. dothidea* permitiu a identificação de metabólitos com atividade antioxidante. Dessa forma, a extração da fração sólida pelo método com soxhlet

(Mazzutti et al., 2012) foi realizada para verificar se no micélio que podem ser identificados compostos com atividade antioxidante.

2.8.1 Processo de extração pelo Soxhlet

A extração usando o Soxhlet (Marconi, Model MA491/6) empregando diferentes solventes sequencialmente com 100 mL de água, acetato de etila e etanol, com polaridades 9, 4,4 e 5,2 (Mazzutti et al., 2012), respectivamente, foi utilizado na extração de compostos com atividade antioxidante (Ahangari and Sargolzaei, 2012). Trabalhou-se com 1 g de micélio liofilizado (L101, Liotop, São Carlos, Brasil) e macerado em cadinho, enrolado em papel filtro e colocado em um cesto ligado a um aparato em que o solvente foi evaporado e condensado, gotejando sobre o micélio presente no cesto, um ciclo durante um tempo de extração de 120 min cada solvente, em triplicata (Abaide et al., 2017). Os solventes foram removidos da amostra por evaporação ambiente e o solvente utilizado recuperado no final da extração. As amostras foram coletadas em tubos de ensaio e ressuspendidas com etanol e posterior análise química dos compostos. As condições para a determinação do rendimento foram de acordo com a eq. 3:

$$Rendimento(\%) = \frac{massa\ extraída(g)}{massa\ micélio\ macerado\ inicial} * 100 \quad (3)$$

2.9 Caracterização química das frações sólida

A caracterização química da fração líquida como descrito em e 2.8.1, foi analisada em um sistema de Cromatografia Gasosa acoplada a um Espectrômetro de Massa (GC-Q / MS). O auto-amostrador era um injetor da série AOC-20is (Shimadzu), o cromatógrafo de gás era um GC-2010 Plus (Shimadzu), e o espectrômetro de massa era um GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu). A coluna foi de 30 m x 0,25 mm i.d. Coluna capilar de sílica fundida revestida com Rtx-5MS de 0,25 µm (Restek). O hélio era o gás transportador a uma taxa de fluxo de 1 mL / min. A temperatura do injetor foi mantida a 300 ° C. Um volume de 1 µL de cada amostra foi injetado limpo com uma proporção de divisão de 1:30. O

programa de temperatura do forno utilizado foi de 200 ° C (segure 5 min), então 15 ° C / min 200 ° C a 280 ° C (mantenha 1 min), depois 5 ° C / min de 280 a 300 ° C (segure 10 min.). A temperatura da interface foi mantida a 320 ° C e a temperatura da fonte de íons a 260 ° C. Os espectros de massa foram gravados na faixa de 35- 650 amu a 0,30 varredura / s, com uma energia de ionização de 70 eV.

3 Resultados e discussões

A técnica do banho de ultrassom de limpeza, segundo Liu et al., (2012) faz com que o uso da sonicação aumente a liberação de substâncias desejadas. Contudo, diferentes micro-organismos se comportam a sua maneira (Avhad and Rathod, (2014) e de acordo com Naveena et al., (2015), o ultrassom de baixa intensidade ($<1\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ e entre 1 e 10 MHz) não destrói o micro-organismo devido a emissão das ondas permear no meio líquido, não ocasionando mudanças físicas ou químicas permanentes, comparando-o ao de alta intensidade ($10\text{-}1000\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ e entre 10 e 100 kHz). Conforme Sun et al, (2017), Yao et al., (2014) e Wang et al, (2013), que trabalharam com fungos, *Shiraia bambusicola*, *Aspergillus fumigatus* e *Trametes versicolor*, respectivamente, baseando-se em baixa intensidade ($<2\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) e frequência ($<100\text{ kHz}$), o banho de ultrassom utilizado no presente estudo possui frequência fixa, 40 kHz, e potência de 130 W para produção do metabólito de interesse.

3.1 Atividade antioxidante do caldo fermentado

3.1.1 Atividade antioxidante com base no radical hidroxila

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2- Tratamento com banho de ultrassom

Amostra	Tempo de fermentação em dias para a sonicação	Tempo de sonicação em min	Agitação em rpm	Hidroxil (%)	DPPH (%)
1	3,01(-1)	3,83(-1)	30,36(-1)	92,0	48,47
2	5,99(1)	3,83(-1)	30,36(-1)	67,0	76,08
3	3,01(-1)	12,17(1)	30,36(-1)	93,0	19,16
4	5,99(1)	12,17(1)	30,36(-1)	93,0	72,45
5	3,01(-1)	3,83(-1)	119,64(1)	94,0	70,10
6	5,99(1)	3,83(-1)	119,64(1)	63,0	50,13
7	3,01(-1)	12,17(1)	119,64(1)	90,0	24,56
8	5,99(1)	12,17(1)	119,64(1)	91,0	60,65
9	2,00(-1,68)	8,00(0)	75,00(0)	85,0	56,27
10	7,00(1,68)	8,00(0)	75,00(0)	92,0	57,23
11	4,50(0)	1,00(-1,68)	75,00(0)	96,0	73,30
12	4,50(0)	15,00(1,68)	75,00(0)	84,0	81,09
13	4,50(0)	8,00(0)	0,00(-1,68)	54,0	68,66
14	4,50(0)	8,00(0)	150,00(1,68)	93,0	6,80
15	4,50(0)	8,00(0)	75,00(0)	91,0	78,80
16	4,50(0)	8,00(0)	75,00(0)	91,0	64,60
17	4,50(0)	8,00(0)	75,00(0)	92,0	73,94

Fonte: Produção da autora

A análise de variância foi realizada sobre os dados planejamento experimental do tipo DCCR, tendo como fatores, tempo de fermentação quando há aplicação da sonicação e agitação. O modelo gerado não foi significativo para o radical hidroxila a nível de 5 %, mas observam-se que os valores obtidos foram elevados. Com exceção de três experimentos (2, 6 e 13) todos os demais obtiveram valores superiores a 80 %. O valor máximo correspondeu ao experimento 11, realizado aplicando-se a sonicação por 1 min; 4,5 dias após o início da fermentação e agitando-se a 75 rpm. O menor valor, por sua vez, foi

determinado no experimento 13, onde não houve agitação e a demais condições corresponderam a aplicação de ultrassom por 8 min, 4,5 dias após o início da fermentação. Estudos realizados por YAO et al, (2014), revelam que fermentações estáticas tratadas com ultrassom não obtiveram resultados aprimorados como aqueles que continham agitações, devido um meio com escassez de nutrientes, restrição na oxigenação e redução na transferência de massa. Observa-se isso na amostra de número 13, que obteve um resultado inferior de acordo com análise hidroxila, por não ser agitado.

O caldo resultante da fermentação submersa realizada pelo micro-organismo *B. dothidea* sem tratamento subsequente e sem aplicação do ultrassom, apresentou resultados de 89,78 % para o radical hidroxila. Comparando-os com os resultados com tratamento com ultrassom, Tabela 2, em tempos distintos de exposição, associados aos diferentes tempo de fermentação e agitação, encontraram-se diferentes valores de atividade antioxidante. Verifica-se que existe um efeito positivo do uso do ultrassom, sendo que em 70 % dos experimentos realizados, encontram-se valores maiores do que sem sonicação para radical hidroxila e conseguiu-se aumentar em até 7 % o valor máximo obtido.

3.1.2 Atividade antioxidante com o radical DPPH

Para análise de DPPH as variáveis independentes foram analisadas pelo teste t e pela análise de variância (ANOVA), apresentados na Tabela. 3. As variáveis independentes foram descritas pelo gráfico de Pareto, conforme Fig. 1. Ao nível de significância (5 %) explicitou-se melhor resultado para agitação, com isso sua regressão foi significativa ($p < 0,0381$). As superfícies de resposta permitem a visualização das interações entre as variáveis e suas melhores condições, representadas na Fig. 2.

Tabela 3- ANOVA para os valores da atividade antioxidante com o radical DPPH

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p-valor
Regressão	1928,221	1	1928,221	6,503272	0,038095
Erro	2075,501	15	296,500		

% variação explicada (R^2) = 73,06% $F_{1; 7; 0,05} = 5,59$

O coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,7306, indicando ajuste considerável ao modelo proposto, Fig. 3. A eq. 4 representa a equação quadrática do modelo parametrizado a partir do termo estatisticamente significativo da atividade antioxidante:

$$DPPH = 72,6845 + 14,4572x_1 - 12,7147x_1^2 - 8,0430x_2 + 1,7729x_2^2 - 16,8042x_3 - 26,1926x_3^2 \quad (4)$$

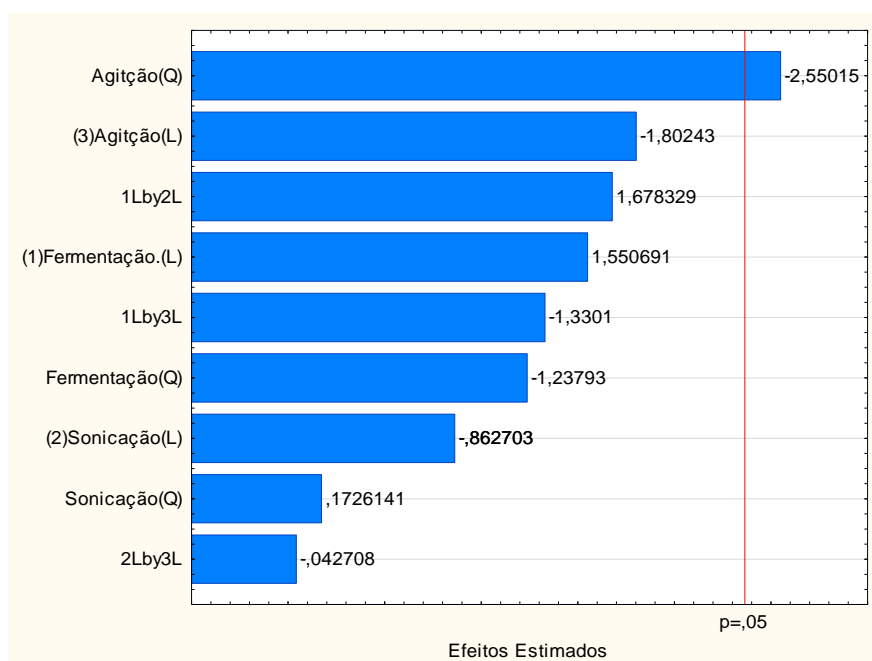


Figura 1- Diagrama de Pareto para os efeitos da variável agitação

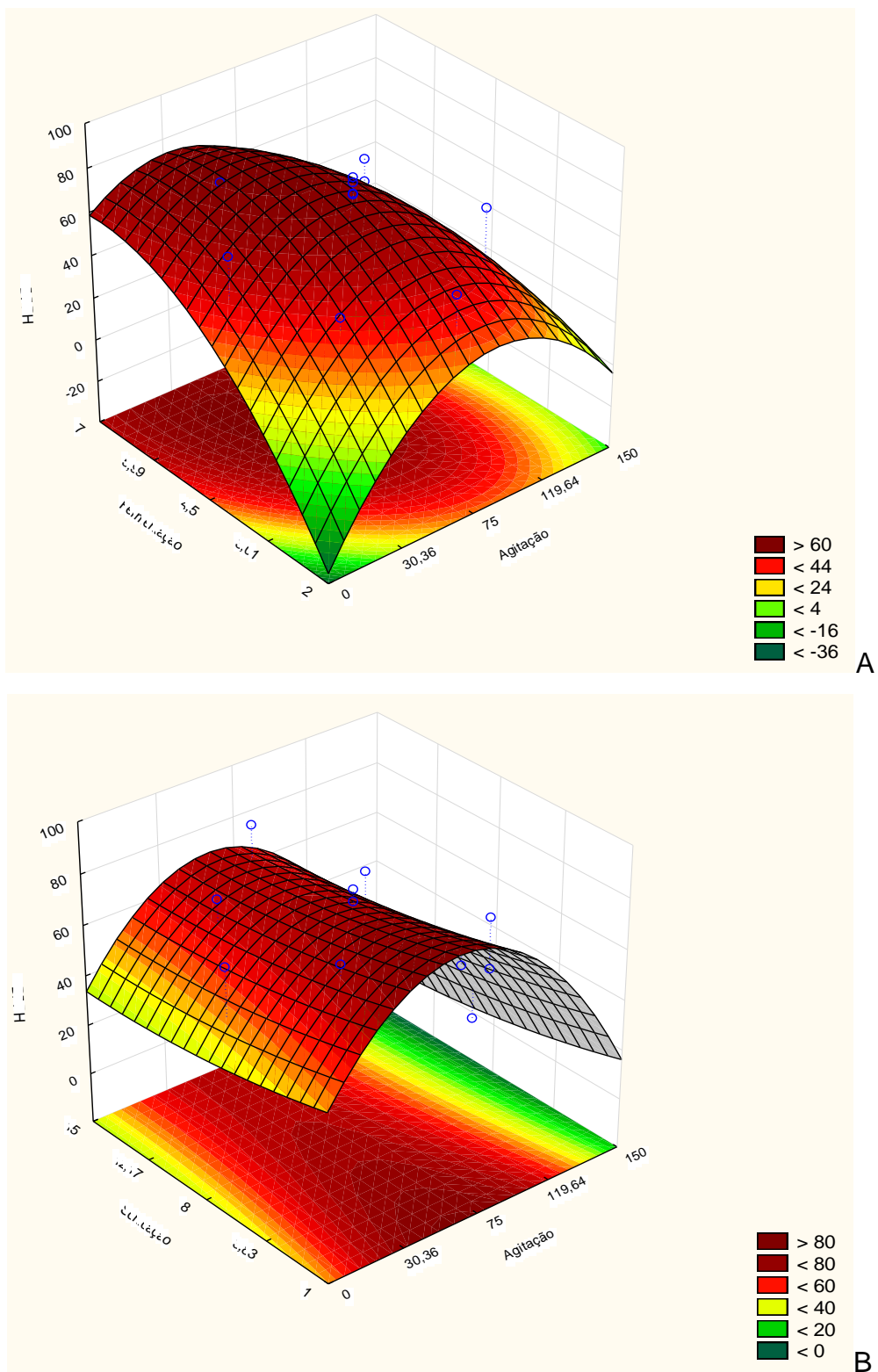


Figura 2- Gráfico de superfície referente à resposta da atividade antioxidante em relação aos efeitos da agitação: e ao tempo de fermentação (A); e a sonicação (B).

O DPPH é uma metodologia que mede a atividade antioxidante em um curto espaço de tempo em relação a outros métodos (Birasuren et al, 2013), medindo a atividade antioxidante de um composto pelo sequestro dos radicais livres presentes na amostras (Walia et al., 2015). Analisando-se os resultados da Tabela 2, observa-se que os maiores valores de DPPH, correspondem aos experimentos 12 e 15, com porcentagens de 81,09 % e 78,08 %, respectivamente. As superfícies de resposta Fig. 2A e 2B, indicam que os melhores valores são obtidos para uma agitação variando entre 52,7 e 75 rpm. Tanto para valores menores do que 52,7 rpm e maiores que 75 rpm, observaram reduções nos valores obtidos.

3.3 Atividade antioxidante da fração sólida (micélio)

Segundo dados do estatística (Tabela 2) com DPPH e os bons resultados com hidroxila, o ensaio significativo em comum a estas análise foi o de número 11 (sonicação de 1,0 minuto; 4,5 dias após o início da fermentação, agitando-se a 75 rpm), uma expressiva atividade antioxidante, cerca de 96 %, do radical hidroxila. Dessa forma, a extração com soxhlet realizada da fração sólida foi referente a esta fermentação.

O soxhlet é uma técnica simples utilizada como técnica padrão, um processo convencional de preparação de amostra, aludido como extração por lixiviação (Castro and Priego-Capote, 2010; Subramanian et al, 2016). Os rendimentos na extração com soxhlet são retratados devido a interação do solvente e sua solubilização com a amostra, dessa forma os solventes são capazes de penetrar com mais facilidade (Mazzutti et al, 2012), expressos na Tabela 4, sendo a água que demonstrou maior valor, seguida do etanol e acetato de etila, mostrando que essa diferença nos rendimentos são pertinentes a polaridade.

Tabela- 4- Polaridade e rendimento dos diferentes solventes da extração com soxhlet

Solventes	Polaridades	Rendimentos (%)
Acetato de Etila	4,4	3,65
Etanol	5,2	20,56
Água	9,0	32

Fonte: Produção da autora

Foram identificados 24 compostos (Tabela 5), todos identificados pelo GC / MS após extração com soxhlet. Nessa conformidade obteve-se o Hexadecanoic acid, methyl ester, com Dong et al., (2015) afirmando que o ácido n-hexdecanóico é um antioxidante, assim como o 1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nanone descrito por Ser et al., (2016). Similarmente, o Pentadecanoic acid sendo um ácido graxo (Smedman et al., 1999), o 2,5-Piperazinedione, 3,6-bis (2-methylpropyl) uma piperazina (Auto et al, 2008), Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) um triglicerídeo (Paris and Clement, 1968) e o ergosta-5,22-dien-3,ol (3beta, 22E) um ácido graxo (Plaza et al., 2012).

Apesar da diferença de polaridade entre os solventes, foi possível diagnosticar os componentes, ressaltando que o solvente água foi o que apresentou menos compostos em sua extração.

A identificação desse compostos, nem todos com característica antioxidante, pode ser explicado de acordo com Mazzutti et al., (2012), em que, como o processo soxhlet possui baixo poder de extração de compostos funcionais por não ser seletivo e/ou a alta temperatura que pode contribuir com a degradação dos compostos termicamente sensíveis, o que sugere o não aparecimento de mais compostos com atividade antioxidante. Portanto, demais métodos de extração devem ser utilizados a fim de extrair maiores compostos com atividade antioxidante.

O estímulo com o ultrassom aumenta a produção de compostos de interesse e, comparando aos trabalhos citados, o melhor desempenho foi obtido com sonicações intermitentes em espaço de tempos de 24 horas, evidenciando maior atividade do que quando irradiado uma única vez como retratado neste trabalho.

Tabela 5 - Caracterização química dos compostos das extrações com soxhlet

Componentes		Composição	RT (min)	Acetato de etila	Etanol	Água
Nome	Área (%)					
1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo [4.3.0] nonane	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂	4,08	12,43	4,77	-	
1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutyl bicyclo [4.3.0]	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	4,54	-	1,01	-	
Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS)	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	5,15	3,31	1,89	45,45	
Pentadecanoic acid (CAS)	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	5,42	24,48	11,93	-	
Succinimide, N-(morpholinomethyl)-	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₃	5,50	3,71	-	-	
Piperidine, 3,5-dimethyl- (CAS)	C ₇ H ₁₅ N	5,52	-	2,21	-	
Hexadecanoic acid, ethyl ester (CAS)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	5,69	-	2,22	-	
9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)- (CAS)	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	6,59	4,08	-	36,42	
9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (CAS)	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	6,60	-	2,25	-	
Octadecanoic acid, methyl ester (CAS)	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	6,67	-	-	18,12	
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- (CAS)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	6,87	-	6,61	-	
Heptadecene-(8)-Carbonic Acid-(1)	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	6,90	21,69	-	-	
9-Octadecenoic Acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	6,91	-	13,71	-	
9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester, (E,E)	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	7,11	-	2,92	-	
9-Octadecenoic acid (Z)-, ethyl ester (CAS)	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	7,14	-	3,59	-	
2,5-Piperazinedione, 3,6-bis (2-methylpropyl)	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₂	7,26	3,74	1,83	-	
3-benzyl-1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo [4.3.0] nonane	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	9,09	-	0,81	-	
Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	9,88	2,35	0,98	-	
1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl)Ester	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	10,21	-	2,91	-	
14-Methyl-8-hexadecyn-1-ol	C ₁₇ H ₃₂ O	11,25	-	1,66	-	
(22E)-Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3.beta.-ol	C ₂₈ H ₄₂ O	13,41	-	0,99	-	
Ergosta-5,22-dien-3-ol, (3.beta.,22E)- (CAS)	C ₂₈ H ₄₆ O	15,02	10,63	4,26	-	
Ergosta-5,7,22-trien-3-ol, (3.beta.,22E) - (CAS)	C ₂₈ H ₄₄ O	15,41	10,39	-	-	
Ergosta-5,8,22-trien-3-ol, (3.beta.,22E) - (CAS)	C ₂₈ H ₄₄ O	15,42	-	25,55	-	

Fonte: Produção da autora

4 Conclusões

Este trabalho mostrou que o ultrassom em conformidade as outras variáveis, como tempo de fermentação, duração da sonicação e agitação influenciou no aumento do produto desejável quando comparado a fermentação sem tratamento com o ultrassom. Em concordância as análises estatísticas, para o radical DPPH obteve-se maior desempenho pela variável agitação entre 52,7 a 75 rpm, com atividades antioxidantes não favoráveis nos ensaios 2 (sonicação de 3,83 min; 5,99 dias após o início da fermentação, agitando-se a 30,36 rpm), 6 (sonicação por 12,17 minutos; fermentação de 5,99 e agitação de 119,64) e 13 (sonicação por 8,0 min; fermentação de 4,5 sem agitação). No radical hidroxila houve um aumento no poder antioxidante de 89% do controle para 96%. A extração da fração sólida por soxhlet foi expressiva, juntamente com a identificação pela GC / MS do composto 1,4-diaza-2,5-dioobicyclo[4.3.0] nanone.

5 Referências

- E. R. Abaide, G. L. Zobot, M. V. Tres, R. F. Martins, J. L. Fagundes, L. F. Nunes, S. P. Druzian, J. F. Soares, J. R. F. Silva, R. C. Kuhn, M. A. Mazutti, A., Yield, composition, and antioxidant activity of avocado pulp oil extracted by pressurized fluids. *Food Biop. Proc.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2017.01.008>
- B. Ahangari, and J. Sargolzaei, Extraction of Pomegranate Seed Oil Using Subcritical Propane and Supercritical Carbon Dioxide. *Theor Found Chem Eng.* 46 (2012) 258–265.
- S. S. Aliabadi, S. M. Hosseini, B. Tiwari, M. Hashemi, G. Fadavi, R. Khahsar, Original article Polyphenols content and antioxidant activity of Ghure (unripe grape) marc extract: influence of extraction time, temperature and solvent type, *Intl. J. Food Sci. Technol.* 48 (2013) 412–418.
- H. F. Auto, J. M. C. Constant, A. B. L. Constant, *Antibióticos e quimioterápicos*, quinta ed. Maceió, Alagoas, 2008.
- D. N. Avhad, V. K. Rathod, Ultrasound stimulated production of a fibrinolytic enzyme, *J. Ultrason. Sonochem.* 21 (2014) 182–188.
- F. Arab, I. Alemzadeh, V. Maghsoudi, Determination of antioxidant component and activity of rice bran extract. *Scien. Iranica C* 18(6) (2011), 1402–1406.

- M. Bhattacharya, P. P. Srivastary, H. N. Mishra, Optimization of process variables for supercritical fluid extraction of ergothioneine and polyphenols from *Pleurotus ostreatus* and correlation to free-radical scavenging activity. *J. Supercrit. Fluids* 95 (2014) 51–59.
- P. Bajerova, M. Adam, T. Bajer, K. Ventura, Comparison of various techniques for the extraction and determination of antioxidants in plants. *J. Sep. Sci.* 37 (2014), 835–844.
- N. Bayar, T. Bouallegue, M. Achour, M. Kriaa, A. Bougatef, R. Kammoun, Ultrasonic extraction of pectin from *Opuntia ficus indica* cladodes after mucilage removal: Optimization of experimental conditions and evaluation of chemical and functional properties. Ultrasonic pectin extraction from prickly pear cladodes, *Food Chem.* (2017), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.029>
- B. Birasuren, N. Y. Kim, H. L. Jeon, M. R. Kim, Evaluation of the Antioxidant Capacity and Phenolic Content of *Agriophyllum pungens* Seed Extracts from Mongolia, *Prev. Nutr. Food Sci.* 18(3) (2013)188-195
- M. D. L. Castro and F. Priego-Capote, Soxhlet extraction: Past and present panacea. *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 2383–2389
- H. Dong, Q. Zhang, L. Li, J. Liu, L. Shen, H. Li, W. Qin, Antioxidant activity and chemical compositions of essential oil and ethanol extract of *Chuanminshen violaceum*. *Ind. Crops and Prod.* 76 (2015) 290–297
- S. C. Dutta and B. Neog, Accumulation of secondary metabolites in response to antioxidant activity of turmeric rhizomes co-inoculated with native arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria. *Sci. Horticult.* 204 (2016) 179–184
- C. Jardim, D. Macedo, I. Figueira, G. Dobson, G.J. McDougall, D. Stewart, R. Ferreira, R. Menezes, C. N. Santos, (Poly)phenol metabolites from *Arbutus unedo* leaves protect yeast from oxidative injury by activation of antioxidant and protein clearance pathways. *J. Funct. Foods* 32 (2017) 333–346
- S. Kumar, M. Yadav, A. Yadav, J. P. Yadav, Impact of spatial and climatic conditions on phytochemical diversity and in vitro antioxidant activity of Indian *Aloe vera* (L.) Burm.f. *South Afr. J. Bot.* 111 (2017) 50–59.
- J. Li, J. Lin, W. Xiao, Y. Gong, M. Wang, P. Zhou, Z. Liu, Solvent extraction of antioxidants from steam exploded sugarcane bagasse and enzymatic convertibility of the solid fraction. *Bioresour. Technol.* 130 (2013) 8–15.
- R. Liu, W. Li, L-Y. Sun, C. Z. Liu, Improving root growth and cichoric acid derivatives production in hairy root culture of *Echinacea purpurea* by ultrasound treatment. *Biochem. Eng. J.* 60 (2012) 62– 66.
- I. R. Maldonade, P. G. B. Carvalho, N. A. Ferreira, Protocolo para determinação de açúcares totatis em hortaliças pelo método de DNS. *Comunicado Técnico*, 85.

Tecnologia de Alimentos, MSc., Embrapa Hortaliças, Universidade de Brasília (UnB), ISSN 1414.9850, Março, 2013. Nota técnica disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/hortalias/busca-de-publicacoes/-/publicacao/956032/protocolo-para-determinacao-de-acucares-totais-em-hortalias-pelo-metodo-de-dns>>. Acessado em: 23. Jun. 2017

S. Mazzutti, S. R. S. Ferreira, C. A. S. Riehl, A. Smania Jr., F. A. Smania, J. Martinez, Supercritical fluid extraction of *Agaricus brasiliensis*: Antioxidant and antimicrobial activities J. Supercrit. Fluids 70 (2012) 48– 56

J. W. M. Mehl, B. Chinelos, J. Roux, M. J. Wingfield, Overlap of latent pathogens in the Botryosphaeriaceae on a native and agricultural host, Fungal Bio. (2016), doi: 10.1016 / j.funbio.2016.07.015.

V. M. Moo-Huchin, M. I. Moo-Huchin, R. J. Estrada-Leon, L. Cuevas-Glory, I. A. Estrada-Mota, E. Ortiz-Vaquez, D. Betancur-Ancona, E. Sauri-Duch, Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. Food Chem. 166 (2015) 17–22

B. Naveena, P. Armsaw, J. T. Pembroke, Ultrasonic intensification as a tool for enhanced microbial biofuel yields. Biotechnol. Biofuels 8 (2015)140

M. Plaza, S. Santoyo, L. Jaime, B. Avalo, A. Cifuentes, G. Reglero, G. G-B. Reina, F. J. Señoráns, Elena Ibáñez, Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*, LWT - Food Sci. Technol. 46 (2012) 245 and 253

R. Paris, and G. Clement, Biosynthese de Triglycerides a partir de 2-monopalmitine doublement marquee dans la muqueuse intestinale de rat. Biochim. et Biophys. ACTA, 152 (1968) 63-74.

S. Rodrigues, F. A. N. Fernandes, E. S. Britoc, A. D. Sousa, N. Narain, Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jabuticaba peel. Ind. Crops Prod. 69 (2015) 400–407

P. V. Samaga, and V. R. Rai, Diversity and bioactive potential of endophytic fungi from *Nothapodytes foetida*, *Hypericum mysorense* and *Hypericum japonicum* collected from Western Ghats of India. Ann Microb. 66 (2016) 229–244

H-L. Ser, U. D. Palanisamy, W-F. Yin, K-G. Chan, B-H. Goh, L-H. Lee, *Streptomyces malaysiense* sp. nov.: A novel Malaysian mangrove soil actinobacterium with antioxidative activity and cytotoxic potential against human cancer cell lines. Scientific Reports, 6 (2016) 24247.

S. Sharma, A. P. Vig, Preliminary Phytochemical Screening and *In Vitro* Antioxidant Activities of *Parkinsonia aculeata* Linn. Hindawi Publishing Corpor. BioMed Res. Intern. ID 756184 (2014) 8

- A. E. Smedman, I. B. Gustafsson, L. G. Berglund, B. O. Vessby, Pentadecanoic acid in serum as a marker for intake of milk fat: relations between intake of milk fat and metabolic risk factors. *Am J Clin Nutr* 69 (1999) 22-9
- A. R. C. Souza, D. B. Baldoni, J. Lima, V. Porto, C. Marcuz, R. C. Ferraz, R. C. Kuhn, R. J. S. Jacques, J. V. C. Guedes, Bioherbicide production by *Diaporthe* sp. isolated from the Brazilian Pampa biome. *Biocatal Agric Biotechnol.* 4 (2015) 575–578.
- R. Subramanian, P. Subbramaniyan, J. N. Ameen, V. Raj, Double bypasses soxhlet apparatus for extraction of piperine from *Piper nigrum*. *Arabian J. Chem.* 9 (2016) S537-S540.
- C. X. Sun, Y. J. Ma, J. W. Wang, Enhanced production of hypocrellin A by ultrasound stimulation in submerged cultures of *Shiraia bambusicola*. *Ultrason. Sonochem.* 38 (2017) 214–224
- R. Tabaraki, and A. Nateghi, Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *J. Ultrason. Sonochem.* 18 (2011) 1279–1286
- E. Tatay, G. Font, M. J. Ruiz, Cytotoxic effects of zearalenone and its metabolites and antioxidant cell defense in CHO-K1 cells *Food Chem. Toxicol.* 96 (2016) 43-49
- M. Walia, S. Kumar, V. K. Agnihotri, UPLC-PDA quantification of chemical constituents of two different varieties (golden and royal) of apple leaves and their antioxidant activity. *J Sci Food Agric;* 96 (2015)1440–1450
- F. Wang, A-Z. Ma, C. Guo, G. Q. Zhuang, C-Z Liu, Ultrasound-intensified laccase production from *Trametes versicolor*. *J. Ultrason. Sonochem.* 20 (2013) 118-124.
- Z-B. Wang, J-J. Pei, H-L. Ma, P-F. Cai, J-K. Yan, Effect of extraction media on preliminary characterizations and antioxidant activities of *Phellinus linteus* polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* 109 (2014) 49–55
- F. Xia, J. Fan, M. Zhu, H. Tong, Antioxidant effects of a water-soluble proteoglycan isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 42 (2011) 402–407.
- J. Xiao, Q. Zhang, Y-Q. Gao, J-J. Tang, A-L. Zhang, J-M. Gao, Secondary Metabolites from the Endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and Their Antifungal, Antibacterial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities. *J. Agric.food Chem.* 62 (2014) 3584–3590
- Z. Xue, J. Li, W. Yu, X. Lu, X. Kou, Effects of nonthermal preservation technologies on antioxidant activity of fruits and vegetables: A review. *Food Sci. Technol. Int.* 22 (2015) 440–458

L-Y. Yao, Y-X., Zhu, R-H. Jiao, Y-H. Lu, R-X. Tan, Enhanced production of fumigaclavine C by ultrasound stimulation in a two-stage culture of *Aspergillus fumigatus* CY018. *J. Bioresour. Technol.* 159 (2014) 112–117

H. Zhao, J. Dong, J. Lu, J. Chen, Y. Li, L. Shan, Y. Lin, W. Fan, G. Gu, Evaluation and Their Extraction Capacity and Selectivity for Free Phenolic Compounds in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 7277-7286

4 ARTIGO 2: EXTRAÇÃO COM DIOXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO E COMPRESSÃO DE GÁS DE PETROLEO LIQUEFEITO NA OBTENÇÃO DE METABÓLITOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *Botryosphaeria dothidea*

RESUMO Este trabalho apresenta rendimento de extração, cinéticas e identificação de compostos com antioxidante pela matriz sólida do *Botryosphaeria dothidea*. Diferentes temperaturas e pressões foram avaliadas com os solventes CO₂ supercrítico (40, 50 e 60 °C e 150, 200 e 250 bar) e GLP comprimido (20, 30 e 40 °C e 15, 25 e 35 bar). O maior rendimento, 1,14 %, foi determinado pelo CO₂ supercrítico utilizando etanol como co-solvente, seguido de 0,94 % com o solvente GLP e 0,86 % com o solvente CO₂. E, os compostos bioativos com atividade antioxidante encontrados foram 1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nanone, 1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutilbicycle[4.3.0] nanone e 3-benzyl-1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0] nanone.

Palavras-chave: *Botryosphaeria dothidea*. Extração supercrítica. GLP comprimido. Atividade antioxidante.

1 Introdução

Micro-organismos endofíticos são hospedeiros, parasitas ou patógenos que colonizam plantas saudáveis, as vezes sem sintomas aparente [24]. Espécie como *Botryosphaeriaceae* podem ocasionar cancro em árvores e podridões em frutas [10], como em produções de manga de acordo com Rabari et. al., [22].

Por mais que estes micro-organismos invadem tecidos vegetais, ainda sim podem produzir metabólitos secundários que estimulam o crescimento ou forneçam defesa ao mesmo. Dessa forma são considerados como potenciais produtores de compostos bioativos para diversos setores industriais [33].

Um dos compostos de interesse industrial é o antioxidante, que são responsáveis por proteger contra aos radicais livres e de espécies reativas de oxigênio [9] que podem ocasionar várias doenças nos humanos, como danos na pele, lesão no fígados, inflamações, dentre outras. Os uso de compostos sintéticos que apresentam antioxidante são um dos métodos utilizados para prevenção dessas doenças, porém,

relatos mostram presença de substâncias tóxicas nesta medicação, Dessa forma, a procura por produtos naturais com a mesma finalidade tem aumentado [2].

Como os produtos naturais tem sido mais procurados, estudos mostram que micro-organismos também são responsáveis pela produção de metabólitos secundários com atividade antioxidante, como o caso do *Botryosphaeria dothidea*.

Portanto, a técnica de extração com fluido supercrítico (EFS- CO₂) e compressão de Gás de Petróleo Liquefeito (ELP – GLP) são tecnologias utilizadas na extração de compostos bioativos.

Os fluidos supercríticos ou pressurizados extrai compostos em determinadas condições de pressão e temperatura, minimiza o custo de energia comparando-os a métodos convencionais e maximiza a recuperação e qualidade do material a ser extraído [1,4].

O solvente CO₂ é reconhecido como seguro (GRAS), não tóxico, não inflamável e permite redução na utilização de solventes orgânicos. O GLP é líquido incolor, permite que seu manuseio seja em baixas temperaturas e pressões, além de ser um material mais barato, vastamente acessível na natureza, o que fundamenta sua baixa energia de recompressão. Mas é altamente inflamável, tóxico e requer mais cuidados como atenção e controle [1,23].

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a extração de metabólitos com atividade antioxidante da biomassa do micro-organismo *Botryosphaeria dothidea* utilizando o supercrítico com solvente CO₂ e compressão de gás de petróleo liquefeito, GLP, como alternativa ao uso de solventes tradicionais, comparando os rendimentos a extração com Soxhlet e análises da atividade antioxidante pelo método FRAP.

2 Materiais e métodos

2.1 Micro-organismo

O micro-organismo *B. dothidea*, foi identificado pelo Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, São Paulo – SP.

2.2 Solventes

Solventes CO₂ (pureza > 99,5 %) adquirida da White Martins SA (Santa Maria, Brasil); GLP adquirido da Liquigás SA (Santa Maria, Brasil) que consiste na mistura de propano (50,3 % em peso), n-butano (28,4 % em peso), isobutano (13,7 % em peso), etano (4,8 % em peso) e outros hidrocarbonetos (2,8 % em peso de metano, pentano, isopentano, etc.). O reagente de análise do poder antioxidante por redução férrica (FRAP) e etanol fornecido pela Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).

2.3 Obtenção da biomassa

O fungo endofítico foi inoculado em meio BDA (Batata Dextrose Ágar) e incubaram-no por 7 dias a temperatura de 28 °C e seguiu para fermentação com meio sintético (10 g / L de glicose; 7,5 g / L de extrato de levedura; 10 g / L de peptona; 2 g / L de sulfato de amônio; 1 g / L de sulfato ferroso; 1 g / L de sulfato de manganês; 0,5 g / L sulfato de magnésio) [29] em erlenmeyers de 250 mL com 150 mL de meio, no shaker, a temperatura de 28 °C com rotação de 120 rpm no período de 10 dias. A cultura obtida foi filtrada com auxílio de bomba à vácuo, para separação do caldo e da massa do micélio.

2.3.1 Tratamento com ultrassom

No segundo dia de fermentação, o fungo cultivado foi tratado com ultrassom (Modelo USC-1800A, Unique), com frequência de 40 kHz e potência de 130 W. Sonicação de 1 min, com mudança de rotação para 75 rpm, durante 4,5 dias. Após esse período voltou-se com a rotação para 120 rpm concluindo seus 10 dias de fermentação. Este tratamento (com modificações) foi realizado no intuito de aumentar a produção de metabólitos com atividade antioxidante, de acordo com a literatura [3,32,34] em tratamentos com ultrassom de limpeza.

2.3.2 Preparação e caracterização da matéria-prima

A biomassa foi filtrada com auxílio da bomba a vácuo para separação do caldo, congelada no congelador por 3 dias e liofilizada (L101, Liotop, São Carlos, Brasil) por 24h. Biomassa seca, foi macerada no cadinho com o pistilo.

2.4 Processo de extração dos metabólitos com atividade antioxidante pela tecnologia com fluido supercrítica (ESC) e compressão do gás de petróleo liquefeito (GLP)

O sistema (Fig. 1) apresenta dois banho termostático (Quimis, São Paulo, Brasil); uma bomba de alta pressão de seringa (ISCO 500 D, Lincoln, EUA); um suporte de extração de aço inoxidável com volume de 100 cm³, diâmetro interno de 2,5 cm, altura de 19,5 cm, com capacidade de suportar 35 Mpa; válvulas de bloqueio e válvula de microrreferência (HIP 15-11AF2 316SS, Erie, EUA); e um transdutor de pressão (Smar, LD301) acoplado a um programador portátil (V) (Smar, HT 201) monitorando pressão, vazão e o intervalo para extração na gama de 0-600 bar com precisão de 0,12 bar.

O cilindro com o solvente e o banho termostático foram acoplados na bomba de seringa. Uma válvula foi aberta para que o solvente pudesse preencher a bomba e ser resfriado pelo banho (5 °C). Volume completado, válvula fechada. No extrator, aquecido com o outro banho termostático (37 °C-100 °C), a segunda válvula foi aberta para controle da entrada do solvente e assim pressurizar a amostra com o mesmo. Extrator estabilizado, deu-se início a extração dinâmica pelo manuseio da válvula de microrreferência [23].

Na extração com ambos solventes utilizou-se 5 g de micélio macerado dispostos no extrator, seguidas de bombardeamento dos solventes conforme temperatura [5,14,15,16,17,21,23,28] e pressão [5,8,15,17,18,23,28] estabelecidas, definidos por um planejamento experimental fatorial 2² (CCD), com triplicata no ponto central, em concordância a literatura, Tabela 1. As vazões consistiram em 4 g / min.

Tabela 1- Planejamento experimental fatorial 2^2 com triplicata no ponto central das extrações de CO_2 e GLP

Experimento	CO_2		GLP	
	T (°C)	P (bar)	T (°C)	P (bar)
1	40(-1)	150(-1)	20(-1)	15(-1)
2	40(-1)	250(1)	20(-1)	35(1)
3	60(1)	150(-1)	40(1)	15(-1)
4	60(1)	250(1)	40(1)	35(1)
5	50(0)	200(0)	30(0)	25(0)
6	50(0)	200(0)	30(0)	25(0)
7	50(0)	200(0)	30(0)	25(0)

Fonte: Produção da autora

A extração com o solvente CO_2 teve um tempo total de 90 min e com o GLP de 20 min, tempos determinados pela cinética. Os solventes restantes foram removidos por descompressão da amostra por pressão ambiente (0,1 Mpa), A densidade do fluido (ρF) foi obtido a partir da Química WebBook do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST, 2011) [4]. As amostras coletadas foram armazenadas no refrigerados para análises posteriores de atividade antioxidante.

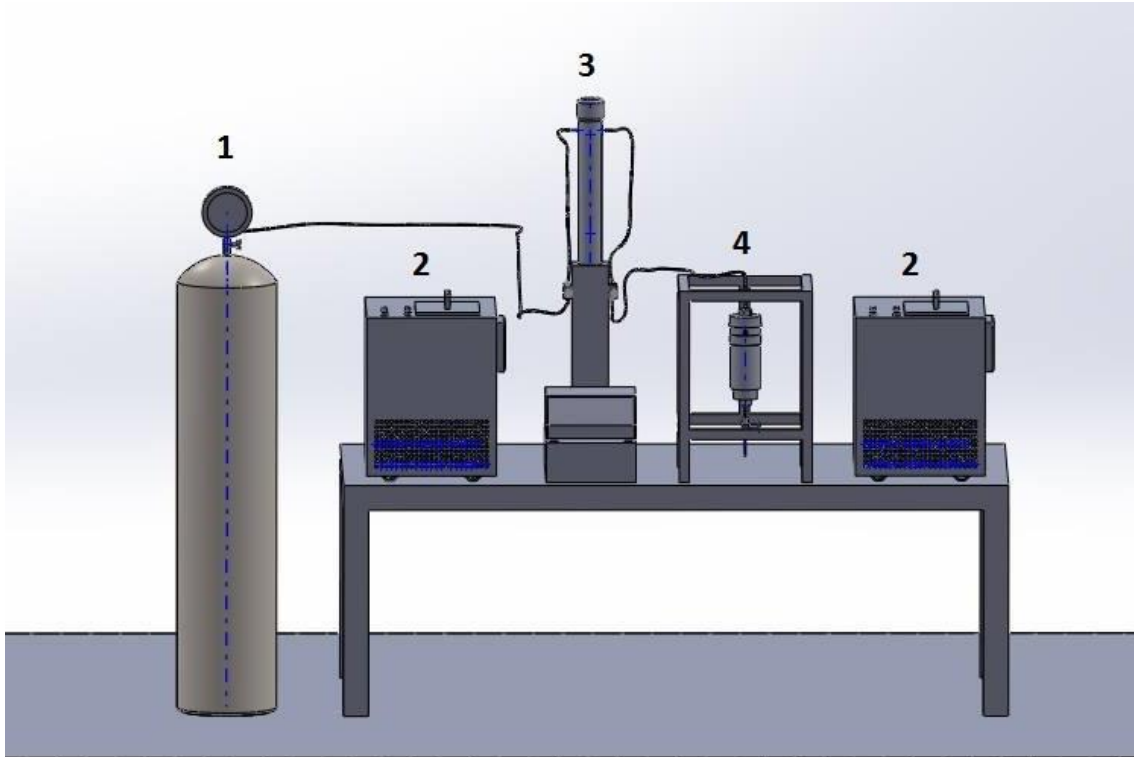


Figura 1-Aparelhos experimentais para extrações de CO₂ e GLP. Os principais dispositivos são: 1) reservatório do solvente; 2) banhos termostático - à esquerda o de resfriamento e à direita o de aquecimento; 3) bomba de alta pressão de seringa; 4) suporte de extração de aço inoxidável [23] (com permissão).

2.5 Processo de extração dos metabólitos com atividade antioxidante pela tecnologia Soxhlet (SOX)

Na extração usando o Soxhlet (Marconi, Model MA491/6) empregando 100 mL de n-hexano, trabalhou-se com 1 g de micélio liofilizado (L101, Liotop, São Carlos, Brasil) e macerado em cadinho com pistilo, com tempo de extração de 120 min em triplicata. O solvente foi removido da amostra por evaporação ambiente (298 K e 0,1 MPa) e o utilizado durante a extração foi recuperado no final. As amostras foram coletadas, ressuspensas com etanol, refrigeradas para posterior análise química dos compostos. A resposta foi expressa como média \pm desvio padrão e utilizada como método de referência comparado as EFS-CO₂ e ELP-GLP [4,28]. A determinação do rendimento foi de acordo com a eq. 1:

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{\text{massa extraída (g)}}{\text{massa micélio macerado inicial (g)}} * 100 \quad (1)$$

2.6 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando o software Statistica 10, e a variância (ANOVA) foi efetuada segundo a influência das variáveis, temperatura e pressão, sobre o rendimento das extrações EFS-CO₂ e ELP-GLP, com nível de confiança de 95 %. O teste Tukey foi empregado para definir a significância nas diferenças dos rendimentos [4,28].

2.7 Análise da atividade antioxidante usando FRAP

O poder antioxidante de redução férrica (FRAP) foi determinado, segundo Liu et al. [13], com modificações, utilizando 400 µL de amostra mais 3600 µL do reagente FRAP (mistura de: 11 mL de tampão acetato de sódio 0,3 M, pH 3,6; 1,1 mL solução TPTZ 10 mM em HCl 40 mM; 1,1 mL cloreto férrico 20 mM) e o branco foi preparado com 400 µL com o solvente que a amostra foi diluída mais 3600 µL do reagente FRAP. As análises foram realizadas em triplicata, os tubos agitados em vórtex, seguido de banho de água a 37 °C por 30 min. Pós deixa-lo esfriar fez-se a leitura a 593 nm, usando o FRAP no espectrofotômetro com refletância difusa (Shimadzu modelo IR-Prestige-21) como branco. O composto TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente de Trolox) (intervalo de 0-25 IM) foi utilizado para a curva de calibração. Os resultados foram expressos em µmol TEAC/ µg de extrato [30].

2.8 Caracterização química dos extratos

As amostras foram analisadas em um sistema GC-Q / MS. O auto-amostrador era um injetor da série AOC-20is (Shimadzu), o cromatógrafo de gás era um GC-2010 Plus (Shimadzu), e o espectrômetro de massa era um GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu). A coluna foi de 30 m x 0,25 mm i.d. Coluna capilar de sílica fundida revestida com Rtx-5MS de 0,25 µm (Restek). O hélio era o gás transportador a uma taxa de fluxo de 1 mL / min. A temperatura do injetor foi mantida a 300 ° C. Um

volume de 1 μL de cada amostra foi injetado limpo com uma proporção de divisão de 1:30. O programa de temperatura do forno utilizado foi de 200 ° C (segure 5 min), então 15 ° C / min 200 ° C a 280 ° C (mantenha 1 min), depois 5 ° C / min de 280 a 300 ° C (segure 10 min.). A temperatura da interface foi mantida a 320 ° C e a temperatura da fonte de íons a 260 ° C. Os espectros de massa foram gravados na faixa de 35- 650 amu a 0,30 varredura / s, com uma energia de ionização de 70 eV. A identificação de componentes individuais foi feita usando seus índices relativos de retenção com o Registro Wiley de dados espectrais de massa (Palisade Corporation, Newfield, NY).

3 Resultados e discussão

3.1 Produção de extrato

Nos resultados das extrações, EFS-CO₂ e ELP-GLP, Tabela 2, os rendimentos dos experimentos variaram de 0,45 e 0,86 % em peso para o solvente CO₂ e entre 0,62 e 0,94 % em peso no GLP. Percebe-se que o ensaio 1 exhibe as condições que referenciam os menores valores de rendimento em ambos solventes, com baixas temperaturas e pressões, T= 40 °C e P=150 bar - CO₂ e T=20 °C e P=15 bar – GLP; e que o ensaio 4 obteve maior rendimento correspondente a 0,86 % em peso usando CO₂ (T= 60 °C e P= 250 bar) e, 0,94 % em peso com GLP (T= 40 °C e P= 35 bar), mostrando que em condições isobáricas e isotérmicas, quanto maior a pressão e temperatura, maior o rendimento para os dois solventes [23].

Nas extrações com CO₂, de acordo com Abaide et al., [1], o aumento da pressão proporciona aumento no rendimento por associar ao aumento da densidade do solvente, e assim, maior o poder de solvatação do solvente, dessa forma maior a solubilidade na matriz sólida. Outra explicação, segundo Prá et al., [21] seria que em temperatura e pressões elevadas, os rendimentos aumentam devido a influência da sobreposição da pressão de vapor a densidade do solvente aumentando a solubilidade dos extratos.

No ensaio 4, o rendimento com solvente GLP apresentou maior extração, mostrando que as condições como solvatação, viscosidade e difusividade foi promissora na solubilização da matriz sólida liofilizadas [1,23] do *B. dothidea*. Assim

como em Soares et al., [28] em que obteve maior rendimento nas condições 40 °C/ 25 bar.

Tabela 2- Comparação dos rendimentos das extrações, EFS-CO₂, ELP-GLP e Soxhlet, obtidos pelo *B. dothidea*

Ensaio	T (°C)	P (bar)	ρ (kg/m ³)	Rendimento (wt.%)	FRAP (μmol TEAC/μg de extrato)
Supercrítico CO₂					
1	(-1) 40	(-1) 150	750.501	0.45 ± 0.001 ^{a, A}	36,50
2	(-1) 40	(+1) 250	887.534	0.74 ± 0.001 ^{b,c, D,E,F}	38,37
3	(+1) 60	(-1) 150	565.509	0.78 ± 0.001 ^{c, C,D,E}	36,71
4	(+1) 60	(+1) 250	776.880	0.86 ± 0.003 ^{c, B,C,D}	36,91
5	(0) 50	(0) 200	765.942	0.62 ± 0.002 ^{b, F}	40,24
6	(0) 50	(0) 200	765.942	0.69 ± 0.002 ^{b, F}	34,84
7	(0) 50	(0) 200	765.942	0.57 ± 0.002 ^{b, F}	40,24
GLP comprimido					
1	(-1) 20	(-1) 15	Nd	0.62 ± 0.001 ^{b, F}	12,69
2	(-1) 20	(+1) 35	Nd	0.66 ± 0.002 ^{b, E,F}	8,88
3	(+1) 40	(-1) 15	Nd	0.74 ± 0.002 ^{b, D,E,F}	33,18
4	(+1) 40	(+1) 35	Nd	0.94 ± 0.001 ^{a, B}	36,08
5	(0) 30	(0) 25	Nd	0.89 ± 0.002 ^{a, B,C}	14,48
6	(0) 30	(0) 25	Nd	0.88 ± 0.002 ^{a, B,C}	13,52
7	(0) 30	(0) 25	Nd	0.87 ± 0.002 ^{a, B,C}	14,64
Soxhlet					
8	Nd	Nd	Nd	1,98 ± 0.01	12,55
Co-solvente Etanol					
9	(+1) 60	(+1) 250	776.880	1,14 ± 0.007	38,79

T: temperatura; P: pressão; ρ: densidade; Nd: não determinado.

a–c Diferentes letras na mesma coluna representam uma diferença significativa em 95% (p < 0.05 – teste Tukey) entre os ensaios para cada solvente, CO₂ e GLP.

A-F Diferentes letras na mesma coluna representam uma diferença significativa em 95% (p < 0.05— teste Tukey) entre os ensaios entre os dois solventes, CO₂ e GLP.

No intuito de melhorar a eficiência da extração com o solvente CO₂ [14,16], segundo as condições do ensaio que obteve maior rendimento, fez-se uma extração utilizando um 10 % de co-solvente, etanol [16]. Dessa forma, obteve-se um aumento no rendimento de 0,86 % em peso de CO₂ puro para 1,14 % em peso com etanol. Segundo Mazzutti et al., [16] esse comportamento pode ser explicado em virtude a solubilidade dos compostos polares presentes na mistura, etanol / CO₂, equiparando-o ao CO₂ puro que é um solvente apolar, aumentando o rendimento, porém pode diminuir a seletividade do extrato.

O método utilizando o co-solvente foi o que alcançou mais proximidade ao método de referência com o rendimento na extração com o soxhlet de 1,98 % em peso. A não proximidade dos rendimentos com os solventes CO₂ e GLP ao rendimento com o soxhlet, pode ser devido, neste último, em sua extração materiais indesejáveis [28].

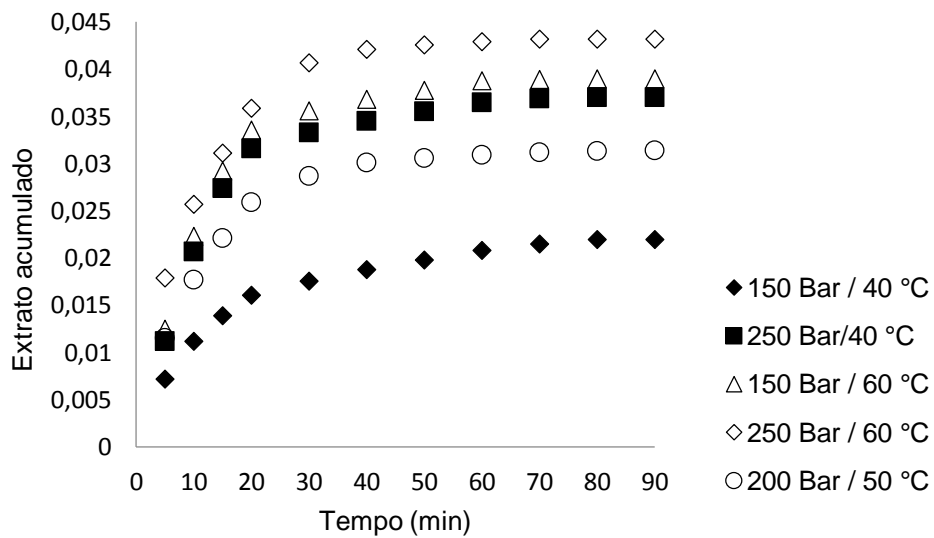
Os solventes utilizados, CO₂ e GLP, foram removidos do extrato por simples descompressão da amostra a pressão ambiente (0,1 MPa), assegurando a utilização dos mesmos.

Dados da Tabela 2 foram utilizados para avaliar as variáveis independentes nos rendimentos das extrações pela análise ANOVA e, tanto a EFS-CO₂, quanto a ELP-GLP não obtiveram valores significativos para pressão e temperatura. No teste Tukey, analisou-se os ensaios de cada solvente e, entre os solventes, fornecendo algumas diferenças estatísticas ($p < 0,05$), visto na Tabela 2. Assim sendo, grande parte dos ensaios possuem efeitos iguais na variável resposta, com exceção do ensaio com solvente CO₂, em que o menor rendimento difere estatisticamente dos outros.

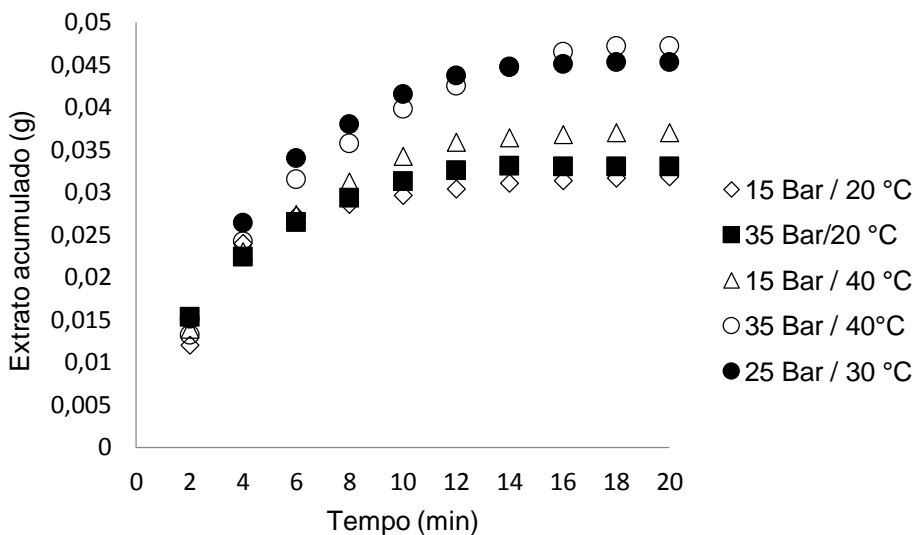
3.2 Parâmetros cinéticos

As curvas cinéticas foram realizadas em função do tempo de extração, conforme as massas acumulativas dos extratos do *B. dothidea*. Nas extrações utilizando CO₂ (Fig.2a) a taxa de extração foi verificada em 90 min e, nas corridas de 1 a 5, foi recuperado 0,022, 0,037, 0,039, 0,043 e 0,033 g da quantidade total de extrato. Nas extrações com solvente GLP (Fig.2b), a taxa de extração foi verificada em 20 min e, nas corridas de 1 a 5, foi recuperado 0,032, 0,033, 0,037, 0,047, 0,045

g da quantidade total de extratos. No período de extração constante teve-se alta transferência de massa, controlada por convecção do filme fluido em torno a matriz sólida liofilizada [21,23]. A maior taxa de extração ocorreu nos ensaios 4 correspondente a 0,043 extrato / g CO₂ e 0,047 extrato/g GLP. A extração com o GLP foi significativamente mais rápida, embora tenha valores mais altos comprados ao CO₂, a diferença não foi muito expressiva.



a)



b)

Figura 2- Curvas cinéticas globais na extração *Botryosphaeria dothidea* usando CO₂ supercrítico (a) e GLP comprimido (b) como solventes.

3.3 Composição dos extratos e atividade antioxidante

A capacidade antioxidante foi analisada pelo método FRAP na redução férrica do complexo, Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina), para a forma ferrosa, Fe^{2+} -TPTZ. A Tabela 2 mostra os resultados da atividade antioxidante obtidos do *B. dothidea* nos métodos de extração com diferentes solventes e identifica-se que na EFS- CO_2 a maior atividade foi referente ao ensaio 5 (T= 50 °C e P= 200 bar) com 40,24 $\mu\text{mol TEAC} / \mu\text{g}$ de extrato, no ponto central; utilizando o co-solvente (T= 60 °C e P= 250 bar) teve-se uma atividade de 38,79 $\mu\text{mol TEAC} / \mu\text{g}$ de extrato; e na ELP-GLP a maior atividade foi no ensaio 4 (T= 40 °C e P= 35 bar) com 36,08 $\mu\text{mol TEAC} / \mu\text{g}$ de extrato. Observa-se que a atividade antioxidante pelo FRAP para o soxhlet (12,55 $\mu\text{mol TEAC} / \mu\text{g}$ de extrato), foi mais baixa que os valores encontrados para todos os ensaios realizados utilizando CO_2 supercrítico e o co-solvente.

Diante desses resultados da atividade antioxidante fez-se a caracterização química dos extratos para identificação de compostos com esta atividade, Tabela 3.

Tabela 3 - Caracterização química dos compostos das extrações EFS-CO₂, ELP-GLP e Soxhlet com solvente hexano (HEX)

(continua)

Nome	Composição	RT	CO ₂ .1	CO ₂ .2	CO ₂ .3	CO ₂ .4	CO ₂ .5	CO ₂ .Co- solvente	GLP.1	GLP.2	GLP.3	GLP.4	GLP.5	HEX
			Área											
3-Pyrrolidin-2-yl-propionic acid	C ₇ H ₁₃ NO ₂	3,75	-	-	7,54	5,71	-	3,33	-	-	-	-	-	-
Hexahydropyrrolizin-3-one	C ₇ H ₁₁ NO	3,76	-	-	-	-	5,07	-	-	-	-	-	-	-
1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo [4.3.0] nonane	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂	4,05	4,71	11,12	7,84	10,20	7,77	4,72	-	-	-	-	-	-
1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutyl bicyclo [4.3.0]	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	4,51	3,72	6,51	13,90	5,89	6,12	2,83	-	-	-	-	-	-
Pentadecanoic acid (CAS)	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	5,40	29,49	13,57	28,16	8,01	-	9,19	-	-	24,43	-	-	-
Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS)	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	5,12	-	-	-	-	10,10	-	-	-	-	-	-	-
9-Octadecenoic acid, 12-(acetyloxy)-, methyl ester, [R-(Z)]- (CAS)	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	5,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,25
Tridecanoic acid (CAS)	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	5,39	-	-	-	-	12,17	-	-	-	-	-	-	-
Hexadecanoic acid, ethyl ester (CAS)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	5,66	-	-	-	-	-	22,08	-	-	-	-	-	-
Ethyl linoleate	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	6,53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27,41	-
9,12-Octadecadienoic acid (ZZ), methyl ester	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	6,54	-	-	-	9,01	-	-	16,51	-	-	-	-	50,54
9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)- (CAS)	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	6,57	-	2,39	-	3,23	39,17	-	11,70	-	-	14,0	8,87	-

Tabela 3 - Caracterização química dos compostos das extrações EFS-CO₂, ELP–GLP e Soxhlet com solvente hexano (HEX)

(continuação)

Nome	Composição	RT	CO ₂ .1	CO ₂ .2	CO ₂ .3	CO ₂ .4	CO ₂ .5	CO ₂ .Co- solvente	GLP.1	GLP.2	GLP.3	GLP.4	GLP.5	HEX
			Área											
Heptadecene-(8)-carbonic acid	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	6,86	-	5,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-octadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	6,87	-	-	-	4,64	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyclopentadecanone, 2-hydroxy	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	6,88	16,38	-	-	-	-	6,42	-	-	-	-	-	-
9-Octadecenoic acid (Z)-, ethyl ester (CAS)	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	7,11	-	-	-	-	-	21,07	-	-	-	-	-	-
Tetradecanamide	C ₁₄ H ₂₉ NO	7,25	-	-	-	-	-	-	-	-	3,60	-	-	-
Hexadecanamide (CAS)	C ₁₆ H ₃₃ NO	7,25	4,09	7,85	4,48	5,74	-	-	-	-	-	-	-	-
Octadecanoic acid, ethyl ester (CAS)	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	7,30	-	-	-	-	-	10,14	-	-	-	-	-	-
9-Octadecenamide (CAS)	C ₁₈ H ₃₅ NO	8,74	2,49	4,94	3,70	-	-	1,07	-	-	-	-	-	-
Nonadecanoic acid, ethyl ester	C ₂₁ H ₄₁ O ₂	8,91	-	-	-	-	-	1,45	-	-	-	-	-	-
3-benzyl-1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo [4.3.0] nonane	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	9,06	2,47	3,98	7,65	4,32	-	2,95	-	-	-	-	-	-
1,2-Oxathiane, 6-dodecyl-, 2,2-dioxide (CAS)	C ₁₆ H ₃₂ O ₃ S	9,42	-	-	-	-	-	1,38	-	-	-	-	-	-
1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl) ester	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	10,18	-	-	-	-	-	-	-	-	8,12	-	-	-
Tricosanoic acid, methyl ester (CAS)	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	10,70	-	-	-	9,55	-	-	-	-	3,34	36,26	13,46	11,50

Tabela 3 - Caracterização química dos compostos das extrações EFS-CO₂, ELP-GLP e Soxhlet com solvente hexano (HEX)

(continuação)

Nome	Composição	RT	CO ₂ .1	CO ₂ .2	CO ₂ .3	CO ₂ .4	CO ₂ .5	CO ₂ .Co-solvente	GLP.1	GLP.2	GLP.3	GLP.4	GLP.5	HEX
			Área											
Silicone oil	C ₆ H ₁₈ OSi ₂	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,01
9-Octadecenoic acid (Z)-, 9-octadecenyl ester,	C ₃₆ H ₆₈ O ₂	11,23	3,69	-	-	2,12	-	-	-	-	-	-	-	-
1,2-Benzenedicarboxylic acid, dioctyl ester (CAS)	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	11,58	-	-	-	-	-	-	-	-	8,61	-	-	9,01
Heptadecanoic acid, 15-methyl-, ethyl ester (CAS)	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	11,87	-	-	-	-	-	2,44	-	-	-	-	-	-
4,9,13,17-Tetramethyl-4,8,12,16-octadecatetraenal	C ₂₂ H ₃₆ O	12,16	-	-	-	-	-	1,80	-	-	-	-	-	-
1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(8-methylnonyl) ester	C ₂₈ H ₄₆ O ₄	12,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,84
Tetracosamethylcyclododecasiloxane	C ₂₄ H ₇₂ O ₁₂ Si ₁₂	12,95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,19
Cholesta-5,22-dien-3-ol, (3.beta.)-(CAS)	C ₂₇ H ₄₄ O	14,97	-	-	-	22,35	17,48	-	-	100	27,71	-	-	-
Ergosta-7,22-dien-3-ol, (3.beta.,22E)-(CAS)	C ₂₈ H ₄₄ O	14,97	-	-	-	-	-	-	36,79	-	-	-	-	-
Ergosta-5,22-dien-3-ol, (3.beta.,22E)-(CAS)	C ₂₈ H ₄₆ O	14,98	21,34	28,04	26,73	-	-	9,83	-	-	-	-	50,27	-

Tabela 3 - Caracterização química dos compostos das extrações EFS-CO₂, ELP–GLP e Soxhlet com solvente hexano (HEX)

(conclusão)

Nome	Composição	RT	CO ₂ .1	CO ₂ .2	CO ₂ .3	CO ₂ .4	CO ₂ .5	CO ₂ .Co- solvente	GLP.1	GLP.2	GLP.3	GLP.4	GLP.5	HEX
			Área											
Ergosta-7,22-dien-3-ol, (3.beta.,5.alpha.,22E)- (CAS)	C ₂₈ H ₄₆ O	14,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	38,77	-	-
Ergosta-5,7,22-trien-3-ol, (3.beta.,22E) - (CAS)	C ₂₈ H ₄₂ O	15,36	7,62	8,99	-	9,22	-	-	-	-	17,87	10,97	-	-

Fonte: Produção da autora

Extrações com fluido supercrítico permite a obtenção de compostos bioativos como antioxidante, carotenoides, ácidos graxos, dentre outros, proporcionando um interesse em tecnologias de alimento, e na prevenção de doenças [7]. A constante dielétrica ou polaridade dos solventes, CO₂ e GLP são semelhantes, 1,6-1,9, respectivamente, assim ambos podem extrair o mesmo perfil de compostos bioativos [1]. Dessa forma, as composições identificadas pelo GC / MS nos extratos obtidos, a partir das matrizes de fungo *B. dothidea* são apresentados na Fig. 3. As composições identificadas foram somente dos ensaios que obtiveram maior rendimento e atividade antioxidante.

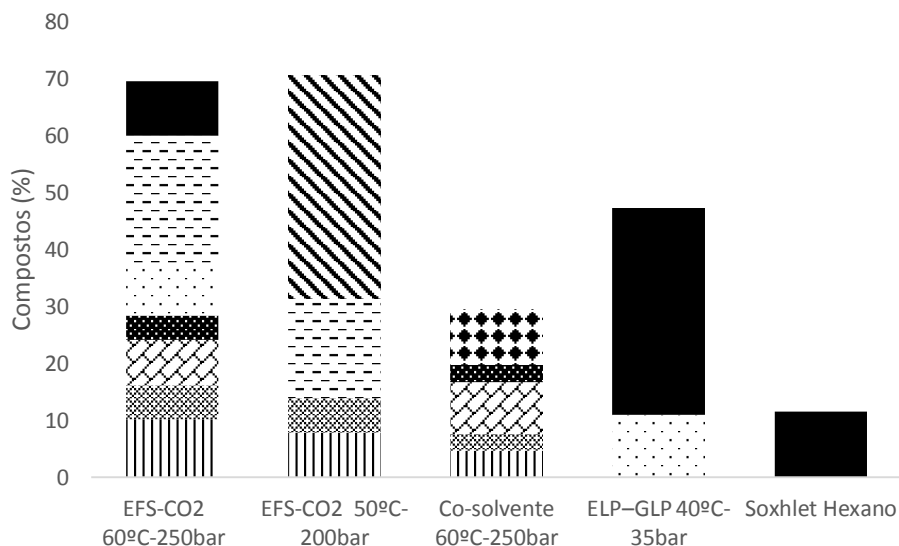


Figura 3- Composição (área, %) identificados do *Botryosphaeria dothidea* nas condições que obtiveram maior rendimento e atividade antioxidante nas EFS-CO₂, EFS-CO₂ com co-solvente, ELP-GLP e extração com Soxhlet: (|||) 1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nanone; (⊗) 1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutil bicycle[4.3.0]nanone; (⊗) pentadecanoic acid; (⊗) 3-benzyl-1, 4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nanone; (⊗) ergosta-5,22-dien-3-ol(3β, 22E); (⊗) ergosta-5,7,22-trien-3-ol(3β,22E); (⊗) cholesta-5,22-dien-3-ol(3β); (⊗) 9-octadecenoic acid (Z)-methyl ester; (■) tricosanoic acid, methyl ester.

Portanto, nove compostos foram relatados e, desses, os compostos 1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nanone [26], 1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutilbicycle[4.3.0]nanone [25] e 3-benzyl-1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nanone [11] possuem

atividade antioxidante; o ergosta-5,22-dien-3-ol(3 β , 22E) [20], ergosta-5,7,22-trien-3-ol(3 β ,22E) [31] e cholesta-5,22-dien-3-ol(3 β) [6] são esteróis; o pentadecanoic acid [27], o 9-octadecenoic acid (Z)-methyl ester [19] e o tricosanoic acid, methyl ester [12] são ácidos graxos.

Mesmo obtendo componentes bioativos com atividade antioxidante, nota-se que a área correspondente a esses compostos foi mais baixa, na extração usando co-solvente, isso pode ser devido a extração de substâncias não voláteis, como os fenólicos [16].

De acordo com Mesomo et al., [17] a atividade antioxidante dos compostos sofre influência da técnica utilizada, pelo método de determinação, o que dificulta sua comparação a dados na literatura.

Considerando que não há muitas informações sobre extrações com supercrítico com o *B. dothidea*, embora o método convencional, Soxhlet, tenha apresentado maior rendimento, o extrato obtido apresentou compostos indesejados de acordo com o propósito que foi a extração de compostos com atividade antioxidante. Essa técnica apresenta capacidade reduzida na extração de compostos funcionais, por ser não seletivo e a temperatura utilizado nesse sistema pode degradar os compostos bioativos [16]. Similarmente, a extração com o solvente GLP teve um rendimento superior a extração com o CO₂ e os compostos identificados não apresentaram atividade antioxidante, somente na extração EFS-CO₂ e utilizando o co-solvente.

Em Mazzutti et al. [16], os compostos identificados pelo GC / MS na extração supercrítica utilizando o CO₂ como solvente do *Agaricus brasiliensis*, não foi detectado atividade antioxidante. Soares et al., [28] utilizou os solventes CO₂ e GLP na extração de farelo de arroz e detectou um compostos com atividade antioxidante na identificação com GC / MS. Semelhantemente, Confortin et al. [4] conseguiu a identificação de compostos com atividade antioxidante na extração de *Lupinus albus* com ambos solventes.

Logo, tratamentos anteriores técnica EFS-CO₂ é adequada para obtenção de compostos funcionais de uma fonte microbiana.

4 Conclusões

A extração com o fluido supercrítico utilizando solvente CO₂ e a compressão do gás usando GLP, utilizadas como uma tecnologia verde na obtenção de compostos com atividade antioxidante através da matriz sólida do fungo x foi realizada e os efeitos de pressão e temperatura foram estudados. As condições que proporcionaram melhores rendimentos foram 0,86 % em 60°C e 250 bar com solvente CO₂ e 0,93 % em 40°C e 35 bar com solvente GLP. Na melhor condição da extração com o solvente CO₂ adicionou-se um co-solvente, etanol, e o rendimento foi ainda maior, 1,14 %, chegando mais próximo do rendimento da técnica convencional, soxhlet com n-hexano. Na avaliação da atividade antioxidante, a análise com o FRAP demonstrou um potencial antioxidante e os compostos indentificados pela CG-MS identificou nove compostos com três deles com atividade antioxidante, segundo a literatura, sendo eles 1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nanone, 1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutilbicycle[4.3.0]nanone e 3-benzyl-1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nanone.

5 Referências

- [1] E. R. Abaide, G. L. Zabet, M. V. Tres, R. F. Martins, J. L. Fagundes, L. F. Nunes, S. Druzian, J. F. Soares, J. R. F. Silva, R. C. Kuhn, M. A. Mazutti, Yield, composition, and antioxidant activity of avocado pulp oil extracted by pressurized fluids. *Bioprocess Technology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biot.2017.01.008>
- [2] Heba. I. Abo-Elmagd, Evaluation and optimization of antioxidant potentiality of *Chaetomium madrasense* AUMC 9376. *J. Genetic Eng. Biotechnol.* 12 (2014) 21–26
- [3] D. N. Avhad, V. K. Rathod, Ultrasound stimulated production of a fibrinolytic enzyme. *J. Ultrason. Sonochem.*, 21 (2014) 182–188
- [4] T. C. Confortin, I. Todero, J. F. Soares, T. Bruna, L. Luft, G. A. Ugalde, V. Dal Prá, M. A. Mazutti, G. L. Zabet, M. V. Tres, Extraction and composition of extracts obtained from *Lupinus albescens* using supercritical carbon dioxide and compressed liquefied petroleum gas. *The J. Supercrit. Fluids* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.06.006>
- [5] M. P. Corso, M. R. Fagundes-Klena, E. A. Silva, L. F. Cardozo, J. N. Santos, L. S. Freitas, C. Dariva, Extraction of sesame seed (*Sesamun indicum* L.) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids* 52 (2010) 56–61.

- [6] M. Deghrigue, C. Festa, L. Ghribi, M. V. D'Auria, S. De Marino, J. H. Ben, A. Bouraoui, Anti-inflammatory and analgesic activities with gastroprotective effect of semi-purified fractions and isolation of pure compounds from Mediterranean gorgonian *Eunicella singularis*, *Asian Pac. J. of Trop. Med.* (2015), doi: 10.1016/j.apjtm.2015.07.019.
- [7] M. A. Elgndi, S. Filip, B. Pavlic, J. Vladic, T. Stanojkovic, Z. Zizak, Z. Zekovic, Antioxidative and cytotoxic activity of essential oils and extracts of *Satureja montana* L., *Coriandrum sativum* L. and *Ocimum basilicum* L. obtained by supercritical fluid extraction, *The J. Supercrit. Fluids* <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.025>
- [8] K. Ghafoor, F. Y. Al-Juhaimi, Y. H. Choi, Y. H. Supercritical Fluid Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidants from Grape (*Vitis labrusca* B.) Seeds. *Plant Foods Hum Nutr* (2012) 67:407–414
- [9] P. Goufo. and H. Trindade, Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol, and phytic acid. *Food Sci. Nutr.* (2014); 2(2): 75-104.
- [10] GuoQing Li, FeiFei Liu, JieQiong Li, QianLi Liu and ShuaiFei Chen , Characterization of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* from English Walnut in China, *J Phytopathol* 164 (2016) 348–353
- [11] Indramsa, E. S. Soetarto, L. H. Nugroho and R. Pratiwi, Antimicrobial activities of endophytic bacteria isolated from *Cotylelobium melanoxylon* (Hook. F.) Pierre. *Int J Pharm Bio Sci* (2016) April; 7(2): (B) 666 – 672
- [12] T. G. Kudre, N. Bhaskar, P. Z. Sakhare, Optimization and characterization of biodiesel production from rohu (*Labeo rohita*) processing waste, *Renewable Energy* (2017), doi: 10.1016/j.renene.2017.06.101.
- [13] Q. Liu, X. Cao, X. Zhuang, W. Han, W. Guo, J. Xiong, X. Zhang, Rice bran polysaccharides and oligosaccharides modified by *Grifola frondosa* fermentation: Antioxidant activities and effects on the production of NO. *Food Chem.* 223 (2017) 49–53
- [14] B.A.S. Machado, Gd. A. BARRETO, A. S. COSTA, S. S. COSTA, R. D. P. SILVA, D. F. SILVA, Determination of Parameters for the Supercritical Extraction of Antioxidant Compounds from Green Propolis Using Carbon Dioxide and Ethanol as Co- Solvent. *PLoS ONE*, 10(8) (2015) e0134489. doi:10.1371/ journal.pone.0134489
- [15] J. L. Marques, G. D. Porta, E. Reverchon, J A. R. Renuncio, A. M. Mainarc, Supercritical antisolvent extraction of antioxidants from grape seeds after vinification. *J. of Supercrit. Fluids* 82 (2013) 238– 243
- [16] S. Mazzutti, S. R. S. Ferreira, C. A. S. Riehl, A. Smania Jr., F. A. Smania, J. Martinez, Supercritical fluid extraction of *Agaricus brasiliensis*: Antioxidant and antimicrobial activities *J. of Supercrit. Fluids* 70 (2012) 48– 56

- [17] M. C. Mesomo, A. P. Scheer, E. Perez, P. M. Ndiaye, M. L. Corazza, Ginger (*Zingiber officinale* R.) extracts obtained using supercritical CO₂ and compressed propane: Kinetics and antioxidant activity evaluation *J. Supercrit. Fluids* 71 (2012) 102–109.
- [18] J. Omar, I. Alonso, A. Garaikoetxea, N. Etxebarria, Optimization of Focused Ultrasound Extraction (FUSE) and Supercritical Fluid Extraction (SFE) of Citrus Peel Volatile Oils and Antioxidants. *Food Anal. Methods* 6 (2013) 1244–1252
- [19] P. D. Patil, V. G. Gude, A. Mannarswamy, S. Deng, P. Cooke, S. Munson-McGee, I. Rhodes, P. Lammers, N. Nirmalakhandan, Optimization of direct conversion of wet algae to biodiesel under supercritical methanol conditions. *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 118–122
- [20] M. Plaza, S. Santoyo, L. Jaime, B. Avalo, A. Cifuentes, G. Reglero, G. G-B. Reina, F. J. Señoráns, Elena Ibáñez, Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*, *LWT - Food Sci. Technol.* 46 (2012) 245 and 253
- [21] V. D. Prá, J. F. Soares, D. L. Monego, R. G. Vendruscolo, D. M. G. Freire, M. Alexandrie, A. Koutinas, R. Wagner, M. A. Mazutti, M. B. Rosa, Extraction of bioactive compounds from palm (*Elaeis guineensis*) pressed fiber using different compressed fluids. *J. Supercrit. Fluids* 112 (2016) 51–56
- [22] V. Rabari, P. Rakhashiya, P. Patel and V. Thaker , First Report of *Botryosphaeria dothidea* on *Mangifera indica* L. in Gujarat, *J Phytopathol* 164 (2016) 286–289
- [23] D. Sallet, E. Abaide, C. Marcuz, G. Ariotti, V. Dal Prá, G. Ugalde, G. L. Zobot,, M. A. Mazutti, R. C. Kuhn, Obtaining fatty acids from *Mortierella isabellina* using supercritical carbon dioxide and compressed liquefied petroleum gas. *J. Supercrit. Fluids* 122 (2017) 79–87
- [24] P. V. Samaga and V. R. Rai, Diversity and bioactive potential of endophytic fungi from *Nothapodytes foetida*, *Hypericum mysorensense* and *Hypericum japonicum* collected from Western Ghats of India. *Ann Microbiol* (2016) 66:229–244
- [25] H.-L. Ser, N.-S. A. Mutalib, W.-F. Yin, K.-G. Chan, B.-H. Goh, L.-H. Lee, Evaluation of Antioxidative and Cytotoxic Activities of *Streptomyces pluripotens* MUSC 137 Isolated from Mangrove Soil in Malaysia. *Front Microbiol.* 2015; 6: 1398
- [26] H-L. Ser, U. D. Palanisamy, W-F. Yin, K-G. Chan, B-H. Goh, L-H. Lee, *Streptomyces malaysiense* sp. nov.: A novel Malaysian mangrove soil actinobacterium with antioxidative activity and cytotoxic potential against human cancer cell lines. *Sci. Reports*, 6 (2016) 24247.
- [27] A. E. Smedman, I. B. Gustafsson, L. G. Berglund, B. O. Vessby, Pentadecanoic acid in serum as a marker for intake of milk fat: relations between intake of milk fat and metabolic risk factors. *Am J Clin Nutr* 69 (1999) 22-9

- [28] J. F. Soares, V. D. Prá, M. Souza, F. C. Lunelli, E. Abaide, J. R. F. Silva, R. C. Kuhn, J. Martinez, M. A. MAZUTTI, Extraction of rice bran oil using supercritical CO₂ and compressed liquefied petroleum gas. *J. Food Eng.* 170 (2016) 58-63.
- [29] A. R. C. Souza, D. B. Baldoni, J. Lima, V. Porto, C. Marcuz, R. C. Ferraz, R. C. Kuhn, R. J. S. Jacques, J. V. C. Guedes, Bioherbicide production by *Diaporthe* sp. isolated from the Brazilian Pampa biome. *Biocatal Agric Biotechnol.* 4 (2015) 575–578
- [30] M. B. Soquetta, F. S. Stefanello, K. M. Huerta, S. S. Monteiro, C. S. Rosa, N. N. Terra, Characterization of physiochemical and microbiological properties, and bioactive compounds, of flour made from the skin and bagasse of kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Chem.* 199 (2016) 471–478
- [31] S. Torres, D. Cajas, G. Palfner, A. Astuya, A. Aballay, C. Pérez, V. Hernández, J. Becerra, Steroidal composition and cytotoxic activity from fruiting body of *Cortinarius xiphidipus*. *Natural Product Research*, 2016, DOI: 10.1080/14786419.2016.1185717
- [32] F. Wang, A-Z. Ma, C. Guo, G. Q. Zhuang, C-Z Liu, Ultrasound-intensified laccase production from *Trametes versicolor*. *J. Ultrason. Sonochem.* 20 (2013) 118-124.
- [33] J. Xiao, Q. Zhang, Y. Gao, J. Tang, A. Zhang, J. Gao, Secondary Metabolites from the Endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and Their Antifungal, Antibacterial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 2014, 62, 3584–3590.
- [34] L-Y. Yao, Y-X., Zhu, R-H. Jiao, Y-H. Lu, R-X. Tan, Enhanced production of fumigaclavine C by ultrasound stimulation in a two-stage culture of *Aspergillus fumigatus* CY018. *J. Bioresour. Technol.* 159 (2014) 112–117

5 DISCUSSÃO

Um planejamento experimental do tipo DCCR foi realizado variando a rotação e sonicação em certos períodos de fermentação. O banho de ultrassom utilizado neste estudo, com frequência e potência fixa, foi manuseado como técnica ultrassônica possibilitando a liberação de substâncias desejadas, quando trabalhada com baixa intensidade para que não ocorresse nenhum dano permanente ao micro-organismo (AVHAD and RATHOD, 2014; NAVEENA et al., 2015).

Na análise com o DPPH as variáveis independentes foram analisadas pelo teste t e pela análise de variância (ANOVA), e ao nível de significância (5%) explicitou-se melhor resultado para agitação. Em relação ao teste F o resultado mostra os dados ajustados ao modelo linear, $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$. E, dos valores obtidos pela análise com o DPPH revelou dois experimentos como os que apresentaram maiores porcentagens, 81,09 % e 78,08 % com melhores valores de agitação, referentes a 52,7 e 75 rpm. E o modelo parametrizado exibiu considerável ajuste, devido ao coeficiente de correlação (R^2) que foi de 0,7306.

O modelo gerado pela análise com o hidroxil não foi significativo a nível de 5%, e com exceção de alguns ensaios, observou-se que os valores encontrados foram elevados. Um dos experimentos, segundo a literatura, obteve um resultado inferior por ser não rotacionado, devido à escassez de nutrientes (YAO et. al., 2014).

Em comparação as análises realizadas, o caldo fermentativo proveniente do micro-organismo *B. dothidea* sem tratamento subsequente e sem aplicação do ultrassom, possibilitou resultados diante análises com Hidroxil de 89,78%. E, os valores encontrados no experimento tem-se que o ultrassom mostrou um efeito positivo em 70 %, encontrando valores maiores do que o sem o tratamento. O valor máximo correspondente ao experimento com tratamento apresentou 96 % de atividade antioxidante.

Diante aos resultados expressos pelo caldo fermentativo de atividade antioxidante, destacando os resultados com o estatística e o mais expressivo valor com o hidroxil, um tratamento com o micélio nas condições de sonicação por 1 minuto; 4,5 dias após o início da fermentação e agitando-se a 75 rpm, foi realizado um trabalho com extrações com Soxhlet, extração supercrítica utilizando o CO₂ como solvente e extração com GLP comprimido, com identificação dos compostos presentes pela

cromatografia gasosa com espectrômetro de massa na obtenção de metabólitos com atividade antioxidante.

Na extração com soxhlet, utilizando quatro solventes subsequentes, acetato de etila, etanol, água e hexano, a interação e solubilização do solvente a amostra micelar liofilizada, penetrando com maior ou menor facilidade a matriz, pode ter sido responsável as diferenças nos valores dos rendimentos (MAZZUTTI et al., 2012), pertinentes a polaridade.

Consequente, a caracterização dos extratos obtido pelo soxhlet identificou-se o éster metílico do ácido hexadecanóico e, Dong et al., (2015) mostrou que o ácido n-hexadecanóico é um antioxidante e o 1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0] nanone, componente este que possui atividade antioxidante (SER et al., 2016).

Com estes resultados, comparou-se as extrações supercrítica utilizando o solvente CO₂ e o GLP comprimido segundo um planejamento experimental fatorial 2² com triplicata no ponto central. Os maiores rendimentos das EFS-CO₂ e ELP-GLP foi de 0,86 % em peso e 0,93 % em peso, assim, quanto maior a pressão e temperatura, em condições isobáricas e isotérmicas maior o rendimento em ambos os solventes (SALLET et al., 2017). O 10% de um co-solvente etanol (MAZZUUTTI et al., 2012), foi empregado e um rendimento de 1,14 % em peso foi adquirido. Os rendimentos nessa avaliação permitiram demonstrar que a análise ANOVA não foi significativa em ambos os solventes.

A atividade antioxidante das extrações com supercrítico foram analisada com o método FRAP, dessa forma, sabendo que os extratos apresentaram atividade antioxidante, fez-se a caracterização química dos experimentos que apresentou maior rendimento, e os compostos identificados com atividade antioxidante foram: 1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nanone (SER et al., 2016) , 1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutilbicycle[4.3.0] nanone (SER et al., 2015) e 3-benzyl-1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0] nanone (INDRAMSA et al., 2016) .

Segudo a literatura, compostos identificados pelo CG-MS na extração supercrítica utilizando o CO₂ como solvente do *Agaricus brasiliensis*, não foi detectado atividade antioxidante (MAZZUTTI et al. 2012). Logo, tratamentos anteriores a técnica EFS-CO₂ é adequada para obtenção de compostos funcionais de uma fonte microbiana.

O estímulo com o ultrassom aumenta sim a produção de compostos de interesse, mas na literatura o melhor desempenho foi obtido com sonicações intermitentes em espaço de tempos de 24 horas, evidenciando maior atividade do que quando irradiado uma única vez como retratado neste trabalho. E, mudanças na forma de tratamento da fermentação pode ser uma outra opção para melhorar a extração de compostos com atividade antioxidante utilizando extração com fluido supercrítica com solvente CO₂ como tecnologia verde e a extração com GLP comprimido devido ao curto tempo de extração e maior rendimento.

6 CONCLUSAO GERAL

O tratamento com o ultrassom de limpeza em concordâncias ao tempo de fermentação e agitação mostrou eficiência na produção do metabólito desejável ao compara-lo com o controle. Nas análises estatísticas, obteve-se um maior desempenho pela variável rotação entre 52,7 a 75 rpm, maiores valores de DPPH aos experimentos 12 e 15, com porcentagens de 81,09% e 78,08%, respectivamente O radical hidroxil apresentou um aumento no poder antioxidante de 89% do controle para 96% e a extração com o soxhlet demonstrou rendimentos consideráveis, possibilitando identificação pela GC-Q / MS do composto 1,4-diaza-2,5-dioobicyclo[4.3.0] nanone.

Como tecnologia verde as extrações com o fluido supercrítico utilizando solvente CO₂ e a compressão do gás, GLP, em condições determinadas de temperatura e pressão, obteve-se bons rendimentos em 0,86 % em 60°C e 250 bar com solvente CO₂ e 0,93 % em 40°C e 35 bar com solvente GLP. Na melhor condição da extração com o solvente CO₂ adicionou-se um co-solvente, etanol, e o rendimento foi ainda maior, 1,14 %, chegando mais próximo do rendimento da técnica convencional, soxhlet com n-hexano. A atividade antioxidante pelo FRAP demonstrou um potencial antioxidante, com identificação de compostos sendo um deles o mesmo descrito na extração com soxhlet utilizando diferentes solventes, 1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo [4.3.0]nanone.

7 SUGESTOES PARA FUTUROS TRABALHOS

- Tratamento com banho de ultrassom na matriz sólida do micro-organismo antes da extração usando os solventes CO₂ e GLP, sem tratamento na durante a fermentação.
- Avaliar a extração com ultrassom assistida e compara o melhor o método
- Testar modelos cinéticos para o processo de extração com fluidos pressurizados e no estado supercrítico

REFERÊNCIAS

ABAIDE, E. R., ZABOT, G. L., TRES, M. V., MARTINS, R. F., FAGUNDEZ, J. L., NUNES, L. F., DRUZIAN, S., SOARES, J. F., SILVA, J. R. F., KUHN, R. C., MAZUTTI, M. A. Yield, composition, and antioxidant activity of avocado pulp oil extracted by pressurized fluids. **Food and Bioproducts Processing** <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2017.01.008>

ABO-ELMAGD, H. I. Evaluation and optimization of antioxidant potentiality of *Chaetomium madrasense* AUMC 9376. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, vol.12, p. 21–26, 10 mar. 2014.

AHANGARI, B. and SARGOLZAEI, J. Extraction of Pomegranate Seed Oil Using Subcritical Propane and Supercritical Carbon Dioxide. ISSN 0040_5795, **Theoretical Foundations of Chemical Engineering**, vol. 46, No. 3, p. 258–265, 2012.

AHIMERA, N., GISLER, S., MORGAN, D. P., MICHAILIDES, T. J. Effects of Single-Drop Impactions and Natural and Simulated Rains on the Dispersal of *Botryosphaeria dothidea* Conidia. **The American Phytopathological Society**, Vol. 94, No. 11, 25 jun. 2004.

AKALIN, M. K.; KARAGÖZ, S.; AKYÜZ, M. Supercritical ethanol extraction of bio-oils from German beech wood: Design of experiments. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 720– 729, 19 jun. 2013.

ALMEIDA, M. L. B., FREITAS, W. E. S., MORAIS, P. L. D., SARMENTO, J. D. A., ALVES, R. E. Bioactive compounds and antioxidant potential fruit of *Ximenia americana* L. **Food Chemistry**, v. 192, p.1078–1082, 27 jul. 2016.

ALAVEZ, M. V., RODRIGUEZ, L. C. M., MONTAÑEZ, J. A. D. A., MEJÍA, C. H., MAGAÑA, F. G., SAVÍN, T. Z. Vitamins C and E concentrations in muscle of elasmobranch and teleost fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A v. 170, p. 26–30, 21 jan. 2014.

ARAB, F.; ALEMZADEH, I.; MAGHSOUDI, V. Determination of antioxidant component and activity of rice bran extract. **Scientia Iranica C**, v. 18 (6), p. 1402–1406, 16 aug. 2011.

AUTO, H. F., CONSTANT, J. M. C., CONSTANT, A. B. L. **Antibióticos e quimioterápicos**, 5 ed. Maceió, Algas, 2008.

AVHAD, D. N. and RATHOD, V. K. Ultrasound stimulated production of a fibrinolytic enzyme. **Journal Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, p.182–188, 23 may 2014

BAJEROVA, P., ADAM, M., BAJER, T., VENTURA, K. Comparison of various techniques for the extraction and determination of antioxidants in plants. **Journal of Separation Science**, v. 37, p. 835–844, 19 jan. 2014.

BHATTACHARYA, M.; SRIVASTARY, P. P.; MISHRA, H. N. Optimization of process variables for supercritical fluid extraction of ergothioneine and polyphenols from *Pleurotus ostreatus* and correlation to free-radical scavenging activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 51–59, 31 jul. 2014.

BIER, M. C. J.; MEDEIROS, A. B. P.; OLIVEIRA, J. S.; CÔCCO, L. C.; COSTA, J. L.; CARVALHO, J. C.; SOCCOL, C. R. Liquefied gas extraction: A new method for the recovery of terpenoids from agroindustrial and forest wastes. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 110, p. 97–102, 31 dez. 2016.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 21-33, 01 may. 2005.

CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 47–59, 20 abr. 2012.

CHEN, M., ZHAO, Y., YU, S. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. **Food Chemistry**, v. 172, p. 543–550, 19 set. 2015.

CHENG, H., HAN, R-M., ZHANG, J-P., SKIBSTED, L. H. Electron Transfer from Plant Phenolates to Carotenoid Radical Cations. Antioxidant Interaction Entering the Marcus Theory Inverted Region. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 942-949, 09 jan. 2014.

CONFORTIN, T. C., TODERO, I., SOARES, J. F., BRUN, T., LUFT, L., UGALDE, G. A., PRÁ, V. D., MAZUTTI, M. A., ZABOT, G. L., TRES, M. V., Extraction and composition of extracts obtained from *Lupinus albescens* using supercritical carbon dioxide and compressed liquefied petroleum gas. **The Journal of Supercritical Fluids**, 10 jun. 2017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.06.006>

CORRÊA, A. G. e ZUIN, E. V. G. **Química verde: fundamentos e aplicações**. Série de Textos da Escola de Verão em Química. Universidade Federal de São Carlos – EDUFScar, v. 1, p. 171, 2009.

COSTA, P., GONÇALVES, S., VALENTÃO, P., ANDRADE, P. B., COELHO, N., ROMANO, A. *Thymus lotocephalus* wild plants and in vitro cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1253–1260, 2012.

DEGHRIGUE, M., FESTA, C., GHRIBI, L., D'AURIA, M. V., MARINO, S., BEM, J. H., BOURAOUI, A., Anti-inflammatory and analgesic activities with gastroprotective effect of semi-purified fractions and isolation of pure compounds from Mediterranean gorgonian *Eunicella singularis*, **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 15 jul. 2015, doi: 10.1016/j.apjtm.2015.07.019.

DRUZIAN, S. P., **Produção de metabólitos antioxidantes a partir de fermentação submersa de fungos isolados dos biomas Pampa e Mata Atlântica**, 2016.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Universidade Federal de Santa Maria- RS, 2016.

ERRIU, M., GENTA, G., RIPA, D. M., BUOGO, S., PILI, F. M. G., PIRAS, V., BARBATO, G., LEVI, R. Ultrasonic transparency of sonication tubes exposed to various frequencies: A metrological evaluation of modifications and uncertainty of acoustic pressures. **Measurement**, v. 80, p. 148–153, 03 nov. 2016.

HE, G-G., XIONG, H-P., CHEN, Q-H., RUAN, H., WANG, Z-Y., TRAORÉ, L. Optimization of conditions for supercritical fluid extraction of flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.). **Zhejiang Univ SCI**, v. 6B(10), p. 999-1004, 09 jun. 2005.

IM, S., NAM, T. G., LEE, S. G., KIM, Y. J., CHUN, O. K., KIM, D. O. Additive Antioxidant Capacity of Vitamin C and Tocopherols in Combination. **Food Science and Biotechnology**. v. 23(3), p.693-699, 30 jun. 2014.

INDRAMSA, SOETARTO, E. S., NUGROHO, L. H. and PRATIWI, R., Antimicrobial activities of endophytic bacteria isolated from *Cotylelobium melanoxylon* (Hook. F.) Pierre. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 7(2): (B), p. 666 – 672, abril 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORESTAS, IBF, Bioma Pampa <
<http://www.ibflorestas.org.br/bioma-pampa.html> > Acesso em: 24 outubro de 2016

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE, Mapas de
Biomass e de Vegetação <
<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm> >
Acesso em: 04 de outubro de 2016

KAN, Y., CHEN, T., WUB, Y., WU, J., WU, J., WU, J. Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 151–157, 2015.

KHAN, M. K., ABERT-VIAN, M., FABIANO-TIXIER, A-S., DANGLES, O., CHEMAT, F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. **Food Chemistry**, v. 119, p. 851–858, 2010.

KIM, K. H. and YOOK, H. S. Effect of gamma irradiation on quality of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayward) **Radiation Physics and Chemistry**, v. 78, p. 414–421, 07 mar. 2009.

KITZBERGER, C. S. G., SMÂNIA, A. Jr., PEDROSA, R. C., FERREIRA, S. R. S. Atividades antioxidantes e antimicrobianas de shiitake (*Lentinula edodes*) extractos obtidos por solventes orgânicos e fluidos supercríticos. **Journal of Food Engineering** v. 80, p. 631–638, 2007.

KUDRE, T. G., BHASKAR, N., SAKHARE, P. Z. Optimization and characterization of biodiesel production from rohu (*Labeo rohita*) processing waste, **Renewable Energy** 30 jun. 2017, doi: 10.1016/j.renene.2017.06.101.

KWIATKOWSKA, B., BENNET, J., AKUNNA, J., WALKER, G. M., BREMNER, D. H. Stimulation of bioprocesses by ultrasound. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 768–780, 09 jun. 2011.

LI, X-J., ZHANG, Q., ZHANG, A-L., GAO, J-M. Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an Endophytic Fungus Associated with *Melia azedarach*, and Their Antifungal, Antifeedant, and Toxic Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 3424–3431, 13 mar. 2012

LIMA, M. S., SILANI, I. S. V., TOALDO, I. M., CORRÊA, L. C., BIASOTO, A. C. T., PEREIRA, G. E., BORDIGNON-LUIZ, M. T., NONOW, J. L. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. **Food Chemistry**, v. 161, p. 94–103, 22 mar. 2014.

LIUA, R., LI, W., SUN, L.Y., LIU, C. Z. Improving root growth and cichoric acid derivatives production in hairy root culture of *Echinacea purpurea* by ultrasound treatment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 62– 66, 2012.

LU, Y.; LIANG, X. P.; JIN, M.; SUN, P.; MA, H. N.; YUAN, Y.; ZHOU, Q. C. Effects of dietary vitamin E on the growth performance, antioxidant status and innate immune response in juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). **Aquaculture**, v. 464, p. 609–617, 04 aug. 2016

MACHADO, B.A.S., BARRETO, Gd. A., COSTA, A. S., COSTA, S.S., SILVA, R. P. D., DA SILVA, D.F. Determination of Parameters for the Supercritical Extraction of Antioxidant Compounds from Green Propolis Using Carbon Dioxide and Ethanol as Co- Solvent. **PLoS ONE** 10(8): e0134489. 07 aug. 2015. doi:10.1371/journal.pone.0134489

MALDONADO, A. F. S., MUDGE, E., GÄNZELE, M. G., SCHIEBER, A. Extraction and fractionation of phenolic acids and glycoalkaloids from potato peels using acidified water/ethanol-based solvents. **Food Research International**, v. 65, p.27-34, 04 jun. 2014.

MAZZUTTI, S., FERREIRA, S. R. S., RIEHL, C. A. S., SMANIA, A. JR., SMANIA, F. A. MARTINEZ, J. Supercritical fluid extraction of *Agaricus brasiliensis*: Antioxidant and antimicrobial activities, **Journal of Supercritical Fluids**, v. 70, p. 48– 56, 19 jun. 2012

MEHL, J. W. M., CHINELOS, B., ROUX, J., WINGFIELD, M. J. Overlap of latent pathogens in the Botryosphaeriaceae on a native and agricultural host, **Fungal Biology**, 27 jul. 2016, doi: 10.1016 / j.funbio.2016.07.015.

MESOMO, M. C.; SCHEER, A. P.; PEREZ, E.; NDIAYE, P. M.; CORAZZA, M. L. Ginger (*Zingiber officinale* R.) extracts obtained using supercritical CO₂ and

compressed propane: Kinetics and antioxidant activity evaluation, **Journal of Supercritical Fluids**, v. 71, p.102– 109, 02 aug. 2012.

MEULLEMIESTRE, A.; PETICOLAS, E.; MAACHE-REZZOUG, Z.; CHEMAT, F.; REZZOUG, S. A. Impact of ultrasound on solid–liquid extraction of phenolic compounds from maritime pine sawdust waste. Kinetics, optimization and large-scale experiments. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 28, p.230–239, 2016.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, Biomas < <http://www.mma.gov.br/biomas> > Acesso em: 04 de outubro de 2016

MOO-HUCHIN, V. M.; MOO-HUCHIN, M. I.; ESTRADA-LEÔN, R. J.; CUEVAS-GLORY, L.; ESTRADA-MOTA, I. A.; ORTIZ-VÁZQUEZ, E.; BETANCUR-ANCONA, D.; SAURI-DUCH, E. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food Chemistry**, v. 166, p.17–22, 2015.

NAKAMURA, T.; SILVA, F. S.; SILVA, D. X.; SOUZA, M. W.; MOYA, H. D. Determination of total antioxidant activity and total content of polyphenols in samples of tea leaves marketed in bags. **ABCS Health Sciences**, v. 38(1), p. 8-16, 14 feb.2013.

NAVEENA, B.; ARMSHAW, P.; PEMBROKE, J. T. Ultrasonic intensification as a tool for enhanced microbial biofuel yields. **Biotechnology Biofuels**, v. 8, p.140, 2015.

OMAR, J., ALONSO, I., GARAIKOETXEA, A., ETXEBARRIA, N. Optimization of Focused Ultrasound Extraction (FUSE) and Supercritical Fluid Extraction (SFE) of Citrus Peel Volatile Oils and Antioxidants. **Food Analytical Methods**, v.6, p.1244–1252, 2013

OROIAN, M. and ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v.74, p.10–36, 12 apr. 2015.

P. D. Patil, V. G. Gude, A. Mannarswamy, S. Deng, P. Cooke, S. Munson-McGee, I. Rhodes, P. Lammers, N. Nirmalakhandan, Optimization of direct conversion of wet algae to biodiesel under supercritical methanol conditions. **Bioresource Technology**, v. 102, p.118–122, 2011.

PESSOA, A. S., PODESTÁ, R., BLOCK, J. M., FRANCES, E., DARIVAC, C., LANZA, M. Extraction of pequi (*Caryocar coriaceum*) pulp oil using subcritical propane: Determination of process yield and fatty acid profile. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 101, p. 95–103, 14 mar. 2015.

PHILLIPS, A. J. L. Botryosphaeria dothidea and Other Fungi Associated with Excoriose and Dieback of Grapevines in Portugal. **Journal Phytopathology**, v. 146, p. 327-332, 1998

PISOSCHI, A. M. and POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55 e 74, 18 apr. 2015

PIYASENA, P., MOHAREB, E., MCKELLAR, R. C. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, p. 207–216, 10 jan 2003

PLAZA, M., SANTOYO, S., JAIME, L., AVALO, B., CIFUENTES, A., REGLERO, G., REINA, G. G-B., SENORÁS, F. J., IBÁÑEZ, E., Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*, **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, p. 245 e 253, 2012

PARIS, R. and CLEMENT, G. Biosynthese de Triglycerides a partir de 2-monopalmitine doublement marquee dans la muqueuse intestinale de rat, **Biochimica et Biophysica ACTA**, v.152, p.63-74, 1968.

PRA, V. D., SOARES, J. F., MONEGO, D. L., VENDRUSCOLO, R. G., FREIRE, D. M. G., ALEXANDRIE, M. KOUTINAS, A., WAGNER, R., MAZUTTI, M. A., ROSA, M. B. Extraction of bioactive compounds from palm (*Elaeis guineensis*) pressed fiber using different compressed fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, v.112, p.51–56, 23 feb. 2016

QIAO, L., YE, X., SUN, Y., YING, J., SHEN, Y., CHEN, J. Sonochemical effects on free phenolic acids under ultrasound treatment in a model system. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, p.1017–1025, 22 dez. 2013.

QIN, J.C., ZHANG, Y.M., GAO, J. M., BAI, M. S., YANG, S. X., LAATSCH, H., ZHANG, A. L. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p.1572–1574, 06 feb.2009

RABARI, V.; RAKHASHIYA, P.; PATEL, P.; THAKER, V. FIRST Report of *Botryosphaeria dothidea* on *Mangifera indica* L. in Gujarat. **Journal of Phytopathology**, v. 164, p. 286-289, 2016.

SAHA, N., SAMANTA, A. K., CHAUDHURI, S., DUTTA, D. Characterization and Antioxidant Potential of a Carotenoid from a Newly Isolated Yeast. **Food Science and Biotechnology**, v. 24 (1), p.117-124, 2015

SALLET, D., ABAIDE, E., MARCUZ, C., ARIOTTI, G., PRÁ, V. D., UGALDE, G., ZABOT, G. L., MAZUTTI, M. A., KUHN, R. C. Obtaining fatty acids from *Mortierella isabellina* using supercritical carbon dioxide and compressed liquefied petroleum gas. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 122, p.79–87, 2017

SAMAGA, P. V. and RAI, V. R. Free radical scavenging activity and active metabolite profiling of endophytic fungi from *Nothapodytes foetida* and *Hypericum mysorensense*. **International Journal of Chemical and Analytical Science**, v.4, p. 96 -101, 31 jul. 2013.

SAMAGA, P. V. and RAI, V. R. Diversity and bioactive potential of endophytic fungi from *Nothapodytes foetida*, *Hypericum mysorensense* and *Hypericum japonicum* collected from Western Ghats of India. **Annals of Microbiology**, v. 66, p.229–244, 2016

SANTOS, P., AGUIAR, A. C., BARBERO, G. F., REZENDE, C. A., MARTINEZ, J. Supercritical carbon dioxide extraction of capsaicinoids from malagueta pepper (*Capsicum frutescens* L.) assisted by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22 p. 78–88, 24 may. 2015.

SCHULZ, B.; WANKE, U.; DRAEGER, S.; AUST, H-J. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological Research**. v.97 (12), p. 1447-1450, 1993

SER, H.-L., MUTALIB, N.-S. A., YIN, W.-F., CHAN, K.-G., GOH, B.-H., LEE, L.-H., Evaluation of Antioxidative and Cytotoxic Activities of *Streptomyces pluripotens* MUSC 137 Isolated from Mangrove Soil in Malaysia. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p. 1398, 24 nov. 2015

SER, H.-L., PALANISAMY, U. D., YIN, W.-F., CHAN, K.-G., GOH, B.-H., LEE, L.-H. *Streptomyces malaysiense* sp. nov.: A novel Malaysian mangrove soil actinobacterium with antioxidative activity and cytotoxic potential against human cancer cell lines. **Scientific Reports**, v. 6, p. 24247, 23 mar. 2016.

SMEDMAN, A. E., GUSTAFSSON, I. B., BERGLUND, L. G., VESSBY, B. O. Pentadecanoic acid in serum as a marker for intake of milk fat: relations between intake of milk fat and metabolic risk factors. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 22-9, 1999

SHARMA, S. and VIG, A. P. Preliminary Phytochemical Screening and *In Vitro* Antioxidant Activities of *Parkinsonia aculeata* Linn. Article ID 756184, **BioMed Research International**, v. 2014, p. 8, 29 mar. 2014.

SMITH, H., DOYLE, S., MURPHY, R. Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. **Food Chemistry**, v. 185, p.389-397, 25 mar. 2015.

SOARES, J. F., PRÁ, V. D., SOUZA, M., LUNELLI, F. C., ABAIDE, E., SILVA, J. R. F., KUHN, R. C., MARTINEZ, J. MAZUTTI, M. A. Extraction of rice bran oil using supercritical CO₂ and compressed liquefied petroleum gas. **Journal of food Engineering**, v. 170, p. 58-63, 2016.

SULAIMANA, A. Z.; AJITA, A. YUNUSB, R. M.; CHISTIA, Y. Ultrasound-assisted fermentation enhances bioethanol productivity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, p. 141–150, 21 jan. 2011.

TABARAKI, R. and NATEGHI, A. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 1279–1286, 04 may. 2011.

WALIA, M.; KUMAR, S.; AGNIHOTRI, V. K. UPLC-PDA quantification of chemical constituents of two different varieties (golden and royal) of apple leaves and their antioxidant activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p.1440–1450, 27 apr. 2015.

WANG, F.; MA, A.; GUO, C.; ZHUANG, G. Q.; ZHAO, C. Ultrasound-intensified laccase production from *Trametes versicolor*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 118-124, 2013.

WANG, L.; JIANG, J. J.; WANG, Y.F.; HONG, N.; ZHANG, F.; XU, W. X.; WANG, G. P. Hypovirulence of the Phytopathogenic Fungus *Botryosphaeria dothidea*: Association with a Coinfecting Chrysovirus and a Partitivirus. **Journal of Virology**, v. 88, n° 13, p. 7517–7527, 08 apr. 2014.

WANG, L.; YANG, B.; DUA, X.; YI, C. Optimisation of supercritical fluid extraction of flavonoids from *Pueraria lobata*. **Food Chemistry**, v.108, p.737–741, 04 mar. 2008.

WANG, Z.; PEI, J.; MA, H.; CAI, P.; YAN, J. Effect of extraction media on preliminary characterizations and antioxidant activities of *Phellinus linteus* polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 109, p. 49–55, 21 mar. 2014.

XIA, F.; FAN, J.; ZHU, M.; TONG, H. Antioxidant effects of a water-soluble proteoglycan isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*, **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, p. 402–407, 2011.

XIAO, J.; ZHANG, Q.; GAO, Y.; TANG, J.; ZHANG, A.; GAO, J. Secondary Metabolites from the Endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and Their Antifungal, Antibacterial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 62, p. 3584–3590, 01 apr. 2014.

XUE, Z.; LI, J.; YU, W.; LU, X.; KOU, X. Effects of nonthermal preservation technologies on antioxidant activity of fruits and vegetables: A review. **Food Science and Technology International**, v. 22(5), p. 440–458, 24 aug. 2015.

YAO, L. Y.; ZHU, Y. X.; JIAO, R. H.; LU, Y. H.; TAN, R. X. Enhanced production of fumigaclavine C by ultrasound stimulation in a two-stage culture of *Aspergillus fumigatus* CY018. **Journal Bioresource Technology**, v. 159, p. 112–117, 19 feb. 2014.

YEASMEN, N. and ISLAM, M. N. Ethanol as a solvent and hot extraction technique preserved the antioxidant properties of tamarind (*Tamarindus indica*) seed. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 2(3), p. 332-337, 06 aug. 2015

YUSAF, T. Evaluating the effect of heat transfer on cell disruption in ultrasound processes. **Annals of Microbiology**, v. 65, p.1447–1456, 2015.

ZHANG, H.; MA, H.; PEI, W. J.; WANG, Z.; ZHOU, H.; YAN, J. Ultrasound enhanced production and antioxidant activity of polysaccharides from mycelial fermentation of *Phellinus igniarius*. **Journal Carbohydrate Polymers**, v.113, p. 380–387, 15 jul. 2014.

ZHANG, L.; JIN, Y.; XIE, Y.; WU, X.; WU, T. Releasing polysaccharide and protein from yeast cells by ultrasound: Selectivity and effects of processing parameters. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, p. 576–581, 2014

ZHAO, Y.; ANG, W. T.; XING, J.; ZHANG, J.; CHEN, J. Application of ultrasound to enhance mycophenolic acid productions. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 38, n^o. 9, p. 1582–1588, 20 apr. 2012.

ZHU, Z. Y.; PANG, W.; LI, Y. Y.; GE, X. R.; CHEN, L. J.; LIU, X. C.; LV, Q.; DONG, G. L.; LIU, A. J.; ZHANG, Y. Effect of ultrasonic treatment on structure and antitumor activity of mycelial polysaccharides from *Cordyceps gunnii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p.12–20, 2014