



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GLIDES RAFAEL OLIVO URBINA

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE CIPÓ-DE-ALHO (*Mansoa standleyi*)
(STEYERM.) A. H. GENTRY (BIGNONIACEAE) OBTIDO VIA EXTRAÇÃO
SUPERCRÍTICA

BELÉM - PARÁ

2019

GLIDES RAFAEL OLIVO URBINA

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE CIPÓ-DE-ALHO (*Mansoa standleyi*)
(STEYERM.) A. H. GENTRY (BIGNONIACEAE) OBTIDO VIA EXTRAÇÃO
SUPERCRÍTICA**

Dissertação IV apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior.

BELÉM - PA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- O48a Olivo Urbina, Glides Rafael
Avaliação da composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo de cipó-de-alho (*Mansoa standleyi*) (Steerm.) A. H. Gentry (BIGNONIACEAE) obtido via extração supercrítica / Glides Rafael Olivo Urbina. — 2019.
66 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. *M. standleyi*. 2. Extração com fluido supercrítico. 3. CCDAE. 4. Atividade antioxidante. 5. Atividade antimicrobiana. I. Título.

CDD 664.02

GLIDES RAFAEL OLIVO URBINA

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE CIPÓ-DE-ALHO (*Mansoa standleyi*)
(STEYERM.) A. H. GENTRY (BIGNONIACEAE) OBTIDO VIA EXTRAÇÃO
SUPERCRÍTICA**

Data da Avaliação: ____/____/____

Nota/Conceito: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Orientador)

Prof.^a Dr.^a Geormenny Rocha dos Santos
(FEA/ITEC/UFPA – Membro Interno)

Prof.^a Dr.^a Silvia Helena Marques da Silva
(IEC/SABMI - Membro Externo)

Prof.^a Dr.^a Luiza Helena Meller da Silva
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Suplente Interno)

Prof.^a Dr.^a Marilena Emmi Araújo
(PPGEQ/ITEC/UFPA - Suplente Externo)

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Virgem do Valle, por me conceder sabedoria e ânimos ao longo de minha trajetória acadêmica.

Aos meus pais Glides Rafael Olivo e Linda Urbina, aos meus irmãos e minha família, por apoiar-me, guiar-me e dar-me força em cada momento de minha vida.

À minha avó Irma Ofélia Olivo por todos os momentos dedicados a mim, pelas palavras, pelos conselhos e pelo amor.

À minha esposa Marielba Rodriguez, por seu amor incondicional, paciência, apoio, por sempre estar ao meu lado quando precisei e por aguentar todas minhas loucuras.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Engenharia de Alimentos, e o CNPq pela Bolsa.

À Prof.^a Dr.^a Maria Iracilda da Cunha Sampaio por sua infinita paciência e carinho conosco (seus alunos estrangeiros), muito obrigado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior, por aceitar-me em seu grupo de pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, pelas contribuições para a realização desta pesquisa.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Extração (LABEX) da Universidade Federal do Pará, pela amizade, ajuda e apoio.

“Para el logro del triunfo siempre ha sido indispensable pasar por la senda de los sacrificios.”

Simón Bolívar

RESUMO

Mansoa standleyi é conhecida popularmente como "cipó-de-alho" em virtude do seu odor característico de alho (*Allium sativum*). A planta possui efeito inibitório no crescimento de bactérias e fungos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo obtido das folhas de *M. standleyi* via extração com fluido supercrítico (SFE) e extração convencional (Hidrodestilação). Os ensaios da SFE foram realizados utilizando CO₂ supercrítico, tempo de extração estática de 30 min e tempo dinâmico de 180 min, vazão de CO₂ de 2,5 L/min e massa de matéria-prima de 10 g. A seleção das variáveis temperatura e pressão foi realizada a fim de obter uma diferença da densidade do CO₂ (ρ_{CO_2}) nas isotermas de 35 e 45 °C combinadas com os valores de pressão de 100, 200, 300 e 400 bar. Os resultados obtidos permitem constatar que os valores de rendimento global da SFE em base seca apresentam diferenças significativas entre si ($p \leq 0,05$), com valores variando de 0,87 a 2,02%. A maior média encontrada refere-se à condição de 400 bar/35 °C ($\rho_{CO_2} = 972,26 \text{ kg/m}^3$). Entretanto, na extração por Hidrodestilação o rendimento do óleo foi de 0,14%. Os resultados da triagem fitoquímica por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) evidenciaram a presença de terpenos, ácidos graxos, compostos fenólicos e flavonoides. Foi demonstrada a presença de substâncias com atividade antioxidante para todos os óleos obtidos com SFE, sendo observado uma melhor identificação nos óleos extraídos nas condições de pressões mais altas. Na análise quantitativa de composição química, foi observado que os valores variaram de 31,87 a 72,06 mg EAG/g óleo no conteúdo de compostos fenólicos totais. Em relação a atividade antioxidante os valores variaram de 457,64 a 2475,55 EC₅₀ expresso em g de óleo/ g de DPPH, sendo os melhores resultados obtidos na condição de 400 bar/35 °C. Nos perfis de ácidos graxos do óleo de *M. standleyi* obtido por SFE os resultados indicaram que houve diferença na composição qualitativa dos ácidos graxos detectados, em função da condição operacional de extração, onde foi observada a presença de ácido linoleico ($\cong 95\%$), palmítico ($\cong 12\%$) e oleico ($\cong 5\%$). Os constituintes químicos identificados no óleo obtidos por Hidrodestilação foram compostos sulfurados, fenóis e álcoois. A análise da atividade antimicrobiana *in vitro* demonstrou que o óleo obtido por SFE apresenta ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Por fim, óleo de *M. standleyi* representa uma alternativa para utilização futura no tratamento de doenças causadas por microrganismos.

Palavras-chave: *M. standleyi*; Extração com fluido supercrítico; CCDAE; Atividade antioxidante; Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Mansoa standleyi is popularly known as "cipó-de-alho" because of its characteristic garlic odor (*Allium sativum*). The plant has an inhibitory effect on bacteria and fungi growth. The objective of this work was to evaluate the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the oil obtained from *M. standleyi* leaves via supercritical fluid extraction (SFE) and conventional extraction (Hydrodistillation). The SFE tests were performed using supercritical CO₂, static extraction time of 30 min and dynamic time of 180 min, CO₂ flow of 2.5 L/min and raw material mass of 10 g. The temperature and pressure variables were selected in order to obtain a difference in the CO₂ density (ρ_{CO_2}) in the 35 and 45 °C isotherms combined with the pressure values of 100, 200, 300, and 400 bar. The results obtained allow us to verify that the global yield values of SFE on dry basis show significant differences between them ($p \leq 0.05$), with values varying from 0.87 to 2.02%. The highest average found refers to 400 bar/35 °C condition ($\rho_{CO_2} = 972.26 \text{ kg/m}^3$). However, in Hydrodistillation extraction the oil yield was 0.14%. The results of phytochemical screening by high performance thin layer chromatography (HPTLC) evidenced the presence of terpenes, fatty acids, phenolic compounds, and flavonoids. It was demonstrated the presence of substances with antioxidant activity for all oils obtained with SFE, being observed a better identification in the oils obtained at high pressures. In the quantitative analysis of chemical composition, it was observed that the values ranged from 31.87 to 72.06 mg EAG/g oil in the content of total phenolic compounds. In relation to the antioxidant activity, the values ranged from 457.64 to 2475.55 EC₅₀ expressed in g of oil/g of DPPH, the best results being obtained in the condition of 400 bar/35 °C. In the fatty acid profiles of *M. standleyi* oil obtained by SFE, the results indicated that there was a difference in the fatty acids qualitative composition detected, in function of the operational extraction condition, where the presence of linoleic ($\cong 95\%$), palmitic ($\cong 12\%$), and oleic ($\cong 5\%$) acid was observed. The chemical constituents identified in the obtained oil by Hydrodistillation were identified as sulfur compounds, phenols, and alcohols. The antimicrobial activity *in vitro* analysis showed that the oil obtained by SFE presents an antibacterial action against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Finally, *M. standleyi* oil represents an alternative for future use in the treatment of diseases caused by microorganisms.

Keywords: *M. standleyi*; Supercritical fluid extraction; HPTLC; Antioxidant activity; Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de fases PT de uma substância pura.	21
Figura 2. Fluxograma das atividades realizadas no presente trabalho.	27
Figura 3. Ilustração do leito de extração.	30
Figura 4. Disposição dos óleos de <i>M. standleyi</i> na placa para a análise por CCDAE.	32
Figura 5. CCDAE dos óleos de <i>M. standleyi</i> , obtido por SFE (ensaio 1-8); Hidrodestilação (HD); padrão (P): β -mirina placa (A) reveladas com VAS e t-Resveratrol placa (B) reveladas com FBS.	39
Figura 6. CCDAE dos óleos de <i>M. standleyi</i> , obtido por SFE (ensaio 1-8); Hidrodestilação (HD); padrão (P) t-Resveratrol placa (A) revelada com NP/PEG e placa (B) revelada com DPPH.	40
Figura 7. Cromatograma de íons-totais do óleo das folhas de <i>M. standleyi</i> obtidos via SFE utilizando 35 °C. Pico 1; ácido palmítico. Pico 2; ácido linoleico. Pico 3; ácido oleico.	46
Figura 8. Cromatograma de íons-totais do óleo das folhas de <i>M. standleyi</i> obtidos via SFE utilizando 45 °C. Pico 1; ácido palmítico. Pico 2; ácido esteárico. Pico 3; ácido linoleico. Pico 4; ácido oleico.	47
Figura 9. Cromatograma de íons-totais do óleo essencial das folhas de <i>M. standleyi</i> obtidos por Hidrodestilação.	48
Figura 10. Atividade antimicrobiana do óleo de <i>M. standleyi</i> frente ao <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i> , obtido por extração de SFE (1), Hidrodestilação (HD) (2), controle (3).	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação de propriedades físicas e de transporte de gases, líquidos e fluidos supercríticos.....	21
Tabela 2. Valores médios de rendimento global de extração, compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante, referentes ao óleo obtido das folhas de <i>M. standleyi</i>	37
Tabela 3. Composição de ácidos (%) do óleo das folhas de <i>M. standleyi</i> obtido por SFE.	45
Tabela 4. Constituintes químicos identificados no óleo das folhas de <i>M. standleyi</i> obtido por Hidrodestilação e analisados por CG/EM/DIC.	48
Tabela 5. Atividade antimicrobiana do óleo de <i>M. standleyi</i> obtido pela extração de SFE e Hidrodestilação (HD) frente ao <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

bs: Base seca;

CCDAE: Cromatografia em camada delgada de alta eficiência;

CFT: Compostos fenólicos totais;

CG: Cromatografia gasosa;

CO₂: Dióxido de carbono;

DIC: Detector de ionização em chama;

d_{mg}: Diâmetro médio geométrico;

EC₅₀: 50% a concentração inicial do radical DPPH;

EM: Espectrometria de massa;

F: Matéria-prima;

HD: Hidrodestilação;

IR: Índice de retenção;

P: Pressão;

P_c: Pressão crítica;

PT: Pressão-temperatura;

PV: Pressão-volume específico;

Q_{CO₂}: Vazão de dióxido de carbono;

R_f: Fator de retenção

SF: Fluido supercrítico (*Supercritical fluid*);

SFE: Extração com fluido supercrítico (*Supercritical fluid extraction*);

T: Temperatura;

t: Tempo de extração;

T_c: Temperatura crítica;

*t*_D: Tempo de extração dinâmico;

*t*_E: Tempo de extração estático;

U: Umidade;

V_c: Volume específico;

X₀: Rendimento global;

ε: Porosidade do leito de extração;

ρ: Densidade;

ρ_a: Densidade aparente do leito;

ρ_r: Densidade real da partícula;

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1 Cipó-de-alho (<i>Mansoa standleyi</i>)	16
3.1.1 Descrição Botânica.....	16
3.1.2 Composição Química	16
3.1.3 Atividade Biológica.....	17
3.2 Hidrodestilação	19
3.3 Extração com Fluido Supercrítico	20
3.3.1 Parâmetros de Processos	24
3.3.1.1 Pressão	24
3.3.1.2 Temperatura.....	24
3.3.1.3 Densidade	25
3.3.1.4 Vazão	26
3.3.1.5 Solubilidade	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Matéria-prima	28
4.1.1 Caracterização da Matéria-prima	28
4.1.1.1 Secagem e moagem	28
4.1.1.2 Determinação da umidade	28
4.1.1.3 Determinação do diâmetro da partícula.....	29
4.1.1.4 Determinação da densidade aparente do leito, densidade real da partícula e porosidade do leito.	29
4.2 Extração com Fluido Supercrítico (SFE).....	30

4.2.1	Unidade de Extração Supercrítica	30
4.2.2	Procedimento Operacional	30
4.2.3	Preparação do Leito de Extração.....	30
4.2.4	Determinação das Isotermas de Rendimento Global.	31
4.3	Hidrodestilação	31
4.4	Determinação da Composição Química dos Extratos.....	31
4.4.1	Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE).....	31
4.4.2	Análise por Cromatografia Gasosa (CG/EM/DIC)	33
4.4.3	Análise de Compostos Fenólicos Totais (CFT)	33
4.5	Atividade Antioxidante dos Óleos	34
4.6	Atividade Antimicrobiana do Óleo	34
4.6.1	Avaliação da Sensibilidade da Amostra pelo Método de Difusão em Agar	34
4.6.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	35
4.7	Análise Estatística.....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Caracterização da Matéria-prima e Leito de Extração.....	36
5.2	Extração com Fluido Supercrítico (SFE).....	36
5.2.1	Determinação dos Rendimentos Globais de Extração	36
5.3	Extração Convencional por Hidrodestilação (HD).....	38
5.4	Determinação da Composição Química dos Óleos.....	38
5.4.1	Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE).....	38
5.4.2	Análise de Compostos Fenólicos Totais (CFT)	42
5.4.3	Análise Quantitativa da Atividade Antioxidante	43
5.4.4	Análise por Cromatografia Gasosa (CG/EM/DIC)	44
5.5	Atividade Antimicrobiana do Óleo	50
6	CONCLUSÕES	53
7	LISTA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA	54

8 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO	57
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

Mansoa standleyi (steyererm.) A. H. Gentry (bignoniaceae) é conhecida popularmente como "cipó-de-alho" em virtude do seu odor característico de alho (*Allium sativum*), a planta pertence à família Bignoniaceae, e está distribuída na região neotropical (FISCHER, THEISEN, LOHMANN, 2004). É encontrada em florestas no Brasil, na Argentina e no Sudeste do México, sendo o Brasil um centro de variedade com grande ocorrência no Nordeste do estado do Pará (GENTRY, 1980; ZOGHBI, OLIVEIRA e GUILHON, 2009; ZOGHBI et al., 2010). A composição química da *M. standleyi* já vem sendo estudada e foi demonstrado que os principais constituintes químicos identificados no óleo a partir de folhas de *M. standleyi*, obtidos por Hidrodestilação, foram compostos sulfurados como o dissulfeto, trissulfeto e tetrassulfeto de dialila (SOUZA FILHO et al., 2009; ZOGHBI et al., 2010; GUILHON et al., 2012). Além disso, a análise química dos componentes fixos presentes no óleo levou à identificação de triterpenóides, flavonóides, naftoquinonas e aminoácidos (VILHENA-POTIGUARA et al., 2012).

A *M. standleyi* tem vários usos na medicina tradicional, entre eles, os mais conhecidos são para o tratamento da gripe, febre, dor, artrite e reumatismo (ZOGHBI et al., 1984; OLIVEIRA e ZOGHBI, 2012). Seus efeitos terapêuticos também são destacados na redução da gordura no sangue, na prevenção de trombose, alergias, no tratamento da fadiga e na proteção contra o desenvolvimento do câncer de mama (MORAES, 2008). Segundo Bastos et al. (2012) e Horita et al. (2016) a planta possui atividades biológicas como atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-histamínica (antialérgica), antitrombótica, antibacterianas e antifúngicas. Estes efeitos são atribuídos à presença de compostos sulfurados principalmente os sulfetos, dissulfetos, trissulfetos e tetrasulfetos de dialila (DVOŘÁKOVÁ et al., 2015).

Segundo Ross et al. (2001) e Tedeschi et al. (2007) o alho (*Allium sativum*) com composição e efeitos semelhantes às plantas pertencentes aos gêneros *Mansoa* DC mostrou um potencial efeito inibitório no crescimento de bactérias (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) e fungos (*Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum* e *Aspergillus* sp). Sua ação antifúngica atua na inibição do crescimento de esporos (estruturas reprodutivas) fúngicos. No estudo realizado por Santos et al. (2012) sobre a avaliação do potencial antifúngico do óleo essencial das folhas de *M. standleyi*, o óleo foi apresentado como uma alternativa para uso no controle da candidíase, que é uma infecção causada por fungos do gênero *Candida* (*Candida*

albicans), a qual afeta os lábios, a boca, a orofaringe, a vagina e o trato gastrointestinal (DEUTSCH et al., 1989).

Os compostos sulfurados presente na espécie de *M. standleyi* são instáveis em altas temperaturas, especialmente à temperatura de ebulição da água e apresentam um caráter apolar. Portanto, a sua obtenção depende do método e do solvente utilizado durante a extração. Neste sentido, a utilização de extração com fluido supercrítico (SFE-*Supercritical fluid extraction*) é uma alternativa que apresentaria alta seletividade para os compostos de interesse. A SFE é uma tecnologia utilizada particularmente para obtenção de compostos bioativos sem os inconvenientes geralmente associados aos processos de extração convencionais, que se baseia no uso de solventes a baixas temperaturas e altas pressões, os quais possuem um elevado poder de solubilidade. O processo de extração utilizando essa tecnologia se justifica quando se deseja obter óleos de alto valor agregado, necessários principalmente em algumas áreas das indústrias de alimentos e farmacêuticas (HERRERO, CIFUENTES, e IBAÑEZ, 2006; FERREIRA et al., 2013; GROSSO et al., 2015; PEREIRA et al., 2016).

Em geral, o dióxido de carbono (CO₂) é o solvente comumente utilizado nos processos de extração supercrítica aplicada à extração de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais, por ser não-inflamável, inerte, não-corrosivo, disponível em alto grau de pureza, baixo custo e por apresentar condições críticas amenas (T_c= 31 °C e P_c= 72,9 bar). Possui grande aplicação em processos de extração de compostos sensíveis ao calor e de caráter apolar (ZOUAGH, VALCARCEL e RÍOS, 2004; BRUNNER, 2005; MACÍAS-SANCHEZ et al., 2007; HERRERO, CIFUENTES e IBAÑEZ, 2006; PEREIRA e MEIRELES, 2010; HERRERO et al., 2013). Portanto, foi proposto um método de extração com CO₂ supercrítico para obter óleo a partir de folhas de *M. standleyi*, determinar as melhores condições operacionais e avaliar a composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana dos óleos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo obtido das folhas de cipó-de-alho (*Mansoa standleyi*) via SFE e extração convencional (Hidrodestilação).

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a matéria-prima quanto seu teor de umidade, diâmetro da partícula, densidade aparente, densidade real e porosidade do leito;
- Obter o óleo por extração com fluido supercrítico (SFE);
- Obter o óleo utilizando um método de extração convencional (Hidrodestilação) (HD);
- Determinar a composição química dos óleos;
- Determinar a atividade antioxidante dos óleos;
- Avaliar o potencial antimicrobiana dos óleos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Cipó-de-alho (*Mansoa standleyi*)

3.1.1 Descrição Botânica

O gênero *Mansoa* DC pertence à família Bignoniaceae, distribuído especialmente na região neotropical (FISCHER, THEISEN, LOHMANN, 2004). É encontrado em florestas no Brasil, na Argentina e no sudeste do México, sendo o Brasil o principal centro de diversidade com grande ocorrência na Amazônia (ZOGHBI, OLIVEIRA e GUILHON, 2009). O gênero *Mansoa* DC é composto por 11 espécies, sendo a *Mansoa standleyi* a espécie com maior ocorrência no Nordeste do estado do Pará (GENTRY, 1980; GENTRY, 1990; OLIVEIRA e ZOGHBI, 2012; ZOGHBI et al., 2010). A planta é um arbusto de escalada, que atinge até 3 m de altura, com folhas opostas, que exibem uma cor verde-oliva brilhante. Tem flores de cor vermelho-violeta, diferindo de outras espécies, apenas porque apresenta uma fruta com forma capsular com 9 - 10 cm de comprimento. A *M. standleyi* é popularmente conhecida como cipó-de-alho, que significa videira de alho, devido ao seu cheiro e aroma de alho (*Allium sativum*) que exala após o esmagamento das folhas. Sendo assim, a *M. standleyi* foi taxonomicamente caracterizada da seguinte maneira: reino: Plantae, divisão: Magnoliopsida, ordem: Lamiales, família: Bignoniaceae, gênero: *Mansoa* e epíteto específico: *standleyi* (BASTOS et al., 2012).

3.1.2 Composição Química

Do mesmo modo que ocorre no alho (*Allium sativum*), quando as folhas ou outros órgãos da *M. standleyi* estão intactos, a planta não apresenta odor de alho, somente após estes serem esmagados. No alho quando os tecidos são esmagados, a aliína presente no citoplasma e a aliínase localizada nos vacúolos se misturam, ocorrendo uma reação de hidrólise formando alicina, que é um tiosulfinato e é um dos compostos responsáveis pelo odor característico do alho. Alicina é um composto instável em altas temperaturas, especialmente à temperatura de ebulição da água se degradando a sulfetos, principalmente em dissulfetos e trissulfetos de dialila (BASTOS et al., 2012).

A composição química do óleo de *M. standleyi* já vem sendo estudada. Souza Filho et al. (2009) demonstraram que os principais constituintes químicos identificados no óleo das folhas de *M. standleyi*, obtidos por Hidrodestilação, foram compostos sulfurados como o dissulfeto de dialila (42,15%) e trissulfeto de dialila (11,25%). Zoghbi et al. (2010) realizaram um estudo dos compostos voláteis nos óleos da *M. standleyi* coletados em quatro municípios do estado do

Pará. Os óleos das folhas, caules, raízes, gavinhas, sementes e frutos foram obtidos separadamente por Hidrodestilação e analisados por GC-EM e GC-DIC. Todas as amostras analisadas apresentaram um teor elevado de compostos sulfurados, entre eles dissulfeto de dialila (42,2 - 69,2%) e trissulfeto de dialila (20,1 - 37,0%).

Guilhon et al. (2012) analisaram a variação dos principais compostos sulfurados presentes no óleo obtido por Hidrodestilação e óleo hexânico por maceração, a partir das folhas de *M. standleyi*, onde os componentes voláteis foram identificados por CG/EM. De acordo com os resultados obtidos, os principais compostos sulfurados foram o dissulfeto, trissulfeto e tetrassulfeto de dialila, sendo que para o óleo obtido por Hidrodestilação as concentrações dos compostos foram maiores. As folhas de *M. standleyi* apresentaram composição química diferente em função do tipo de extração e o solvente empregado. Além disso, a análise química dos componentes fixos presentes no óleo essencial das folhas de *M. standleyi* levou à identificação de triterpenoides, flavonoides, naftoquinonas e aminoácidos (VILHENA-POTIGUARA et al., 2012).

3.1.3 Atividade Biológica

A espécie *M. standleyi* tem vários usos na medicina tradicional. Entre eles, os mais citados são para o tratamento da gripe, febre, dor, artrite e reumatismo (ZOGHBI et al., 1984; OLIVEIRA e ZOGHBI, 2012). Seus efeitos terapêuticos também são destacados na redução da gordura no sangue, na prevenção de trombose, alergias, no tratamento da fadiga e dor muscular (MORAES, 2008). Além disso, de acordo com Bastos et al. (2012) e Horita et al. (2016) a planta possui atividade biológica como: antioxidante, anti-inflamatória, anti-histamínica (antialérgica), antitrombótica, antibacterianas e antifúngicas. Estes efeitos são atribuídos à presença de compostos sulfurados principalmente os sulfetos, dissulfetos, trissulfetos e tetrassulfetos de dialila (DVOŘÁKOVÁ et al., 2015).

Segundo Ross et al. (2001) o alho (*Allium sativum*) com composição e efeitos semelhantes às plantas pertencentes aos gêneros *Mansoa* DC mostrou um potencial efeito inibitório no crescimento de bactérias, como *Escherichia coli* e *Streptococcus faecali*. Neste estudo, a atividade antimicrobiana foi atribuída aos sulfetos presentes na planta, principalmente ao dissulfeto de dialila e trissulfeto de dialila. Por estas razões, concluiu-se que os sulfetos têm um potencial efeito antibacteriano considerável. Além disso, o estudo realizado por Tedeschi et al. (2007) mostrou que o alho inibiu completamente o crescimento de fungos como o *Fusarium*

culmorum, *Fusarium avenaceum* e *Aspergillus* sp., mostrando que os componentes presentes no alho apresentam uma forte atividade antifúngica para as espécies de fungo estudadas. Do mesmo modo, o trabalho realizado por Santos et al. (2012) sobre a avaliação do potencial antifúngico do óleo das folhas de *M. standleyi*, indicaram que o óleo representa uma alternativa para uso no controle da candidíase, que é uma infecção causada por fungos do gênero *Candida* (*Candida albicans*), que afeta os lábios, a boca, a orofaringe, a vagina e o trato gastrointestinal (DEUTSCH et al., 1989). *Candida albicans* é a espécie que mais causa infecção no ser humano. Várias espécies de *Candida* são microbiota normal da pele, do trato gastrointestinal e geniturinário. A forma habitual de infecção por *Candida* é o deslocamento de seu nicho normal para a corrente sanguínea ou outros tecidos. O tratamento é a base de antifúngicos, preferivelmente de origem natural e o prognóstico é favorável na maioria dos casos (PEIXOTO et al., 2014).

Além dessas propriedades antimicrobianas da *M. standleyi*, os constituintes organossulfurados também apresentam outras propriedades biológicas. De acordo com Yun et al. (2014) vários estudos indicam que uma dieta rica em alho diminui o risco de alguns tipos de câncer, como o de estômago e o de cólon. Os estudos demonstraram que aqueles que consumiram alho mais de 3 vezes por semana, apresentam menor risco de câncer de estômago do que aqueles que nunca ou raramente consumiram (POURFARZI et al., 2009). Observou-se uma diminuição significativa no risco de câncer de estômago com aumento da ingestão de alho (OK BAN et al., 2007).

Os análogos naturais dos compostos organossulfurados são altamente eficazes em proporcionar proteção contra o câncer induzido por diferentes agentes cancerígenos em diferentes animais experimentais. O sulfeto, dissulfeto e trissulfeto de dialila presentes em extratos de alho são documentados para inibir o desenvolvimento de câncer de pulmão, fígado, próstata e câncer de pele (CHANDRA-KUNTAL e SINGH, 2010). O tratamento tópico com sulfeto de dialila (10 mg / kg, 3 vezes por semana, durante 28 semanas) inibiu o crescimento tumoral induzidos em ratos albinos suíços (KALRA, ARORA e SHUKLA, 2006).

Entretanto, Nasim et al. (2009) realizaram um estudo onde compararam o potencial efeito antidiabético do extrato de folhas de alho obtido a partir de plantas normais e plantas tratadas com enxofre. Os resultados mostraram que a alicina a partir de plantas tratadas com enxofre foi mais eficaz em comparação com o obtido a partir de plantas cultivadas em condições normais. Os níveis de glicose apresentaram uma redução significativa de 50% em ratos tratados com

extrato foliar de plantas tratadas com enxofre, em comparação com 37% observados em ratos tratados com extrato de folhas de plantas normais, representando maior potencial antidiabético. Finalmente, o aumento da produção de alicina em extrato de folhas de tratadas com enxofre altera significativamente o potencial terapêutico.

Assim, os componentes funcionalmente ativos isolados do alho e da espécie *M. standleyi* têm efeitos benéficos em uma variedade de doenças e tem uma ampla gama de aplicações. Sugere-se que esta revisão revele uma base para estudos adicionais para investigar mecanismos subjacentes aos efeitos dos componentes ativos e as aplicações clínicas, farmacêuticas e alimentares desses componentes.

3.2 Hidrodestilação

A Hidrodestilação é um método tradicional de extração de compostos bioativos e óleos essenciais de plantas. Os solventes orgânicos não são envolvidos e pode ser realizado antes da desidratação da matriz vegetal (VANKAR, 2004). Na Hidrodestilação, primeiro, o material da planta é embalado em um compartimento imóvel; segundo, a água é adicionada em quantidade suficiente, em seguida é levado a ferver. Alternativamente, o vapor direto é injetado na amostra da planta. A água quente e o vapor agem como o principal fator influente para liberar os compostos bioativos do tecido vegetal. Indiretamente o arrefecimento por água condensa a mistura de vapor de água e óleo. Essa mistura condensada flui do condensador para um separador, onde óleo e compostos bioativos são separados automaticamente da água (SILVA et al., 2005).

A Hidrodestilação envolve três principais processos físico-químicos: Hidrodifusão, hidrólise e decomposição pelo calor. Em uma alta temperatura de extração, alguns componentes voláteis podem ser perdidos. Esta é uma limitação para seu uso na extração de compostos termosensíveis. A eficiência de extração de qualquer método convencional depende principalmente da escolha de solventes. A polaridade do composto alvo é o fator mais importante para a escolha do solvente. Entretanto, a afinidade molecular entre solvente e soluto, transferência de massa, uso de cossolvente, segurança ambiental, toxicidade humana e a viabilidade econômica também devem ser considerados na seleção de solventes para a extração de compostos bioativos (AZMIR et al., 2013).

Existem vários estudos para obtenção de óleos essenciais ricos em compostos bioativos usando a Hidrodestilação como método de extração convencional. Entre esses estudos Bezerra,

et al. (2017) realizaram um trabalho sobre composição química e atividade antioxidante do óleo essencial em folhas de *Plectranthus amboinicus*. Os resultados indicaram que a Hidrodestilação é um método eficiente na obtenção do produto volátil, sendo observado o carvacrol (monoterpeno fenólico) como composto majoritário, e com propriedades antioxidantes. Entretanto, Abdel-Hameed et al. (2018) avaliaram a composição química do óleo obtido das folhas de *Mentha piperita* L. Os resultados mostraram que os óleos são constituídos principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos nos quais a carvona é o principal componente da *M. piperita*. Também foi verificado a atividade anticancerígena e alta atividade antimicrobiana dos óleos obtidos.

Em um estudo realizado por Da Silva et al. (2017) dos óleos essenciais das partes aéreas de *Lippia origanoides*, foram identificados mono e sesquiterpenoides. Por sua parte, De Azevedo et al. (2017) estudaram a composição química do óleo das folhas de *Myrciaria floribunda*. Os ácidos platânico triterpenoides nor-lupano e ácido messagênico foram identificados, juntamente com outros triterpenóides (aldeído betulínico, acetato de ácido ursólico e betulínico ácido), e flavonoides (catequina, quercetrina e miricitrina). Além disso, a pesquisa da atividade antimicrobiana mostrou que o óleo apresentou um potencial inibitório contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

3.3 Extração com Fluido Supercrítico

Um componente puro é considerado um fluido supercrítico (*SF-Supercritical fluid*) quando sua temperatura e pressão estão acima do seu ponto crítico (T_c e P_c , respectivamente). Em condições críticas de pressão e temperatura, não há mudança das propriedades dos componentes. A variação de propriedades com condições de estado é monótona, ao cruzar as condições críticas, como indicado na Figura 1 pelas linhas tracejadas. No entanto, a magnitude da variação pode ser grande, causando efeitos diferentes sobre solutos e reagentes nas condições de estado vizinhas (BRUNNER, 2005). A Figura 1 apresenta o diagrama de fases PT para uma substância pura. Observa-se que as curvas que separam cada uma das regiões são chamadas de curva de saturação e representam o equilíbrio entre as fases. Assim, a curva de vaporização representa o equilíbrio líquido-vapor, a curva de fusão, o equilíbrio sólido-líquido, e a curva de sublimação representa o equilíbrio sólido-vapor. O ponto que une as três curvas é chamado de ponto triplo e representa a coexistência entre as três fases. A curva de vaporização é finalizada em um ponto definido como ponto crítico; a partir desse ponto o fluido se encontra no estado supercrítico. O ponto crítico é a máxima condição de temperatura e pressão que um vapor pode

condensar (ÇENGEL e BOLES, 2006; SMITH, VAN NESS e ABBOTT, 2007; BORGNAKKE e SONNTAG, 2009; MEIRELES e PEREIRA, 2013).

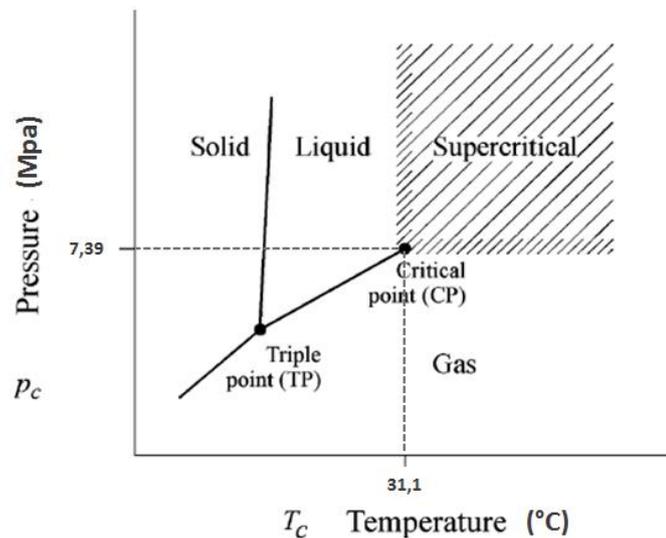


Figura 1. Diagrama de fases PT de uma substância pura.

Fonte: BRUNNER (2005).

Uma das propriedades do fluido supercrítico está em apresentar características intermediárias entre as de um líquido e de um gás. Apresentam densidade e difusividade similares às do líquido e viscosidade próxima às dos gases. Portanto, baixos valores de viscosidade aliados à ausência de tensão superficial, facilitam a penetração do fluido na matriz sólida, enquanto que altos valores de densidade conferem elevado poder de solubilização (BRUNNER, 2005; HERRERO, CIFUENTES e IBAÑEZ, 2006; ROSA et al., 2009; DE MELO, SILVESTRE e SILVA, 2014). Na Tabela 1, é apresentada uma comparação entre os valores de densidade, viscosidade e difusividade de gases, líquidos e fluidos supercríticos.

Tabela 1. Comparação de propriedades físicas e de transporte de gases, líquidos e fluidos supercríticos.

Estado de Agregação	Densidade (g/cm ³)	Difusividade (cm ² /s)	Viscosidade (g/cm/s)
Gás			
1atm e 15-30°C	(0,6-2,0) x 10 ⁻³	0,1-0,4	(0,6-2,0) x 10 ⁻⁴
Líquido			
1atm e 15-30°C	0,6-1,6	(0,2-2,0) x 10 ⁻⁵	(0,2-3,0) x 10 ⁻²
Fluido Supercrítico			
P _c , T _c	0,2-0,5	0,7 x 10 ⁻³	(1-3) x 10 ⁻⁴

Fonte: BRUNNER (2005).

A extração com fluido supercrítico (SFE-*Supercritical fluid extraction*) baseia-se na utilização de um solvente puro mantido à temperatura e pressão acima do seu ponto crítico. Em geral, o dióxido de carbono (CO₂) é o composto mais comumente utilizado em processos de extração supercrítica aplicada à extração de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais, por ser um composto não-inflamável, inerte, não-corrosivo, disponível em alto grau de pureza, baixo custo e por apresentar condições críticas amenas (T_c= 31 °C e P_c= 72,9 bar). Possuindo grande aplicação em processos de extração de compostos termosensíveis (ZOUAGH, VALCARCEL e RÍOS, 2004; HERRERO, CIFUENTES e IBAÑEZ, 2006; MACÍAS-SANCHEZ et al., 2007; PEREIRA e MEIRELES, 2010; HERRERO et al., 2013; DE MELO, SILVESTRE e SILVA, 2014; PEREIRA et al., 2016).

A SFE apresenta vantagens consideráveis com relação aos métodos convencionais de extração. Além de que o solvente pode ser facilmente removido do soluto através da redução da pressão e/ou ajuste da temperatura, apresentando menor requerimento energético quando comparado a outros métodos e possibilita uma rápida extração devido à baixa viscosidade, alta difusividade e alto poder de solvatação do fluido supercrítico. Incluso, tem-se que a SFE requer o uso de pouco ou nenhum solvente orgânico, apresentando-se, portanto, como uma tecnologia segura e ecologicamente correta (ZOUAGH, VALCARCEL e RÍOS, 2004; BRUNNER, 2005; MACÍAS-SANCHEZ et al. 2007).

Brunner (1994) afirma que durante a extração dos compostos solúveis de matrizes vegetais, algumas etapas paralelas e consecutivas ocorrem na SFE. Mas também, a extração de matrizes sólidas ou semissólidas, pode dividir-se em duas etapas: a primeira etapa é a extração, onde o sistema é formado pelo sistema ternário (matriz vegetal + extrato + CO₂), o fluido supercrítico escoia através de um leito fixo de partículas sólidas solubilizando os componentes extraíveis. O solvente é alimentado no extrator e uniformemente distribuído no interior do leito fixo. A mistura de solvente e os componentes extraídos deixa o extrator e passa para o separador. A segunda etapa é a separação que consiste na remoção do solvente, na qual se considera a interação extrato + CO₂, no separador a pressão da solução é reduzida, originando na vaporização do solvente e na precipitação do soluto, o qual será coletado e analisado.

Antes da SFE, o substrato sólido requer pré-tratamento pelo menos, que inclua a moagem ou redução do tamanho de partícula, a fim de evitar aparição de caminhos preferenciais o entupimento na célula de extração. Também por causa da forte interação entre água e o solvente, a desidratação do soluto é necessária se o teor de água é superior a 20%. Portanto, o pré-

tratamento do substrato sólido promove a ruptura das paredes celulares e aumenta a taxa de extração (HERRERO et al. 2013; MEIRELES, 2008).

Existem vários estudos que utilizam a técnica SFE para obtenção de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais. Goyeneche et al. (2018) realizaram um estudo com folhas de rabanete (*Raphanus sativus* L.) para extração de compostos bioativos. Os resultados obtidos indicaram uma fonte interessante de agentes antioxidantes e anti-inflamatórios para uso futuro nas indústrias farmacêuticas e alimentícias. Também, Conde-Hernández, Espinosa-Victoria e Guerrero-Beltrán (2017) realizaram a extração de óleos essenciais a partir de folhas de piper (*Piper auritum*). Os principais componentes identificados por GC-MS no óleo foram safrol e fitol, com uma elevada atividade antioxidante. Entretanto, Ma et al. (2018) realizaram a extração das partes aéreas de *Elsholtzia ciliata*. O resultado demonstrou que os óleos de *E. ciliata* são ricos em ácidos graxos e podem ser uma fonte potencial natural de conservantes de alimentos e antioxidantes. Como também, Lee et al. (2017) em um estudo realizado com folhas de amoreira branca (*Moringa oleifera* Lam.), revelaram a presença de ácido palmitoleico, ácido oleico, ácido linoléico, ácido linolênico, ácido cis-11-eicosenóico e ácido cis-11,14-eicosadienoico, indicando que essa composição de ácidos graxos insaturados é potencialmente útil para controlar a proliferação de *Staphylococcus aureus*.

Entre os óleos obtidos com SFE que apresentam alto potencial terapêutico, o alecrim, jambu, erva-doce, cravo da índia, copaíba, jucá e açai podem ser destacados. A folha de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) apresentou resultados mais satisfatórios de rendimento e atividade antioxidante (CARVALHO-JUNIOR et al., 2005). O óleo da flor de Jambu (*Spilanthes acmella*), que apresentou alta seletividade para obter o espilantol (DIAS et al., 2017); o óleo da semente de erva-doce (*Foeniculum vulgare*), que constituiu uma excelente fonte de compostos bioativos, como o anetol, bem como os ácidos graxos (MOURA et al., 2005) o óleo de cravo da índia (*Syzygium aromaticum*), que possui alto teor de eugenol, composto que possui alta atividade antimicrobiana (CARRASCO et al., 2012; MAZZARRINO et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016). Os óleos das sementes de gergelim preto (*Sesamum indicum* L.), a folha e a oleoresina da copaíba (*Copaifera* sp.), nos quais os efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores contra acidentes vasculares cerebrais foram verificados em relação aos sesquiterpenos, incluindo o β -cariofileno (GUIMARÃES-SANTOS et al., 2012; BOTELHO et al., 2014; BOTELHO et al., 2015), o óleo de frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*), que apresenta uma elevada capacidade anti-inflamatória, sendo usado em curativos bioativos para cicatrização de feridas

(DIAS et al., 2013); e óleo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), que mostrou aplicações potenciais para nutracêuticos devido ao alto teor de antocianinas (BATISTA et al., 2016).

3.3.1 Parâmetros de Processos

3.3.1.1 Pressão

A pressão exercida por um fluido ou material é definida como a força normal sobre uma unidade de área da superfície na qual se distribui. Portanto, a pressão de um material em um recipiente é devida às moléculas individuais que o compõem e às colisões contra a superfície ou paredes do recipiente. Essa força é proporcional à velocidade média das moléculas e ao número de moléculas por unidade de volume dentro do recipiente. A pressão exercida pelo fluido ou material depende fortemente da densidade e da temperatura (ÇENGEL e BOLES, 2006; SMITH, VAN NESS e ABBOTT, 2007; BORGNAKKE e SONNTAG, 2009; BROWN e HOLME, 2009; MEIRELES e PEREIRA, 2013).

A SFE é uma tecnologia baseada no uso de solventes a altas pressões, onde se utiliza elevadas forças no sistema, por conseguinte, é preciso de rigorosos cuidados operacionais nos processos que envolvem fluidos supercríticos. Também, o custo de investimento para montagem de um sistema de SFE é elevado, pois o equipamento utilizado deve suportar altas pressões. Assim, a propriedade que mais sofre influência com variações de pressão no processo de SFE é a densidade, que está intimamente relacionada ao poder de solvatação do solvente (HERRERO et al., 2013; DE MELO, SILVESTRE e SILVA, 2014; PEREIRA et al., 2016).

3.3.1.2 Temperatura

A temperatura é uma grandeza física que está relacionada com o conteúdo de energia do sistema. Do mesmo modo, é uma propriedade que nos permite quantificar a sensação de calor e de frio. Na termodinâmica, é definida como uma função de estado que está associada ao movimento aleatório de vibração das partículas ou moléculas que compõem um determinado sistema (ÇENGEL e BOLES, 2006; BORGNAKKE e SONNTAG, 2009; MEIRELES e PEREIRA, 2013).

Na SFE, o solvente empregado (CO₂ gasoso) é condensado pela diminuição de temperatura, em seguida é submetido a uma pressão e temperatura acima do seu ponto crítico e, então, é transformado em um fluido supercrítico (Figura 1) (BRUNNER 2005; HERRERO, CIFUENTES e IBAÑEZ, 2006; HERRERO et al., 2013). No processo de SFE, o aumento da

temperatura leva a uma redução do poder de solvatação do fluido supercrítico, em virtude da diminuição da densidade, se a pressão se encontra abaixo do ponto de inflexão. Mas também, pode melhorar a eficiência da extração, embora ocorra a redução da densidade do fluido supercrítico, uma vez que a pressão de vapor do soluto é aumentada e o fluido encontra-se em pressões elevadas acima de ponto crítico (BRUNNER, 2005; ROSA et al. 2009; DE MELO, SILVESTRE e SILVA, 2014; CORNELIO-SANTIAGO et al., 2017).

3.3.1.3 Densidade

A densidade (ρ) é uma propriedade intensiva onde seu valor nominal representa quanto de massa (m) ocupa o valor nominal unitário de volume (V) de uma determinada substância. Representando, também, a noção dos caminhos livres médios dos átomos ou moléculas destas substâncias. O poder de solvatação de um fluido supercrítico é relacionado com a densidade, que é geralmente controlada por alterações nos valores nominais de temperatura e principalmente pela pressão do sistema. Por meio do controle da densidade é possível simular e/ou substituir as propriedades de inúmeros solventes orgânicos como hexano, metanol, cloreto de metileno e clorofórmio (GOODSHIP e OGUR, 2004). Para relacionar as variáveis intensivas (temperatura, pressão e densidade), se sugere que sejam utilizadas equações de estado a fim de determinar os valores de densidade do solvente e/ou da mistura solvente-soluto (BRUNNER, 1994).

A densidade dos fluidos supercríticos pode ser alterada por uma pequena modificação da pressão ou da temperatura do sistema, especialmente na região próxima do ponto crítico. A densidade aumenta com o incremento da pressão a uma temperatura constante; entretanto, diminui com o aumento da temperatura a uma pressão constante. Este efeito proporciona um grau de seletividade para estes fluidos. As mudanças de seletividade com alterações de pressão e temperatura permitem selecionar quais dos principais compostos que se deseja extrair da matriz sólida (BRUNNER, 1994; BRUNNER, 2005; ROSA et al. 2009; HERRERO et al., 2013; PEREIRA et al., 2016).

De acordo com a porosidade a densidade é dividida em três tipos: densidade real ou verdadeira que é a densidade do material que foi moído ou triturado desconsiderando o efeito da porosidade; densidade aparente que é a porosidade do material (sólido ou líquido) considerando a existência de todos os poros e densidade da partícula que é a densidade de uma partícula ou material não modificado estruturalmente, mas que possui poros internos em sua

estrutura. A relação entre as densidades fornece o valor de porosidade do material (MEIRELES e PEREIRA, 2013).

3.3.1.4 Vazão

A vazão do solvente é um parâmetro que pode controlar a extração se as condições de equilíbrio ou de transferência de massa da superfície da partícula para o fluido é o fator predominante durante o processo de extração. No entanto, se o mecanismo de resistência à transferência de massa interna é a etapa controladora do processo, a vazão do solvente não influenciará significativamente o processo de extração (BJÖRKLUND et.al., 1998). Na SFE de substratos sólidos, o processo de extração ocorre naturalmente em uma coluna particular, o fluxo de solvente que passa através da coluna deve ser interrompido para executar as etapas de descompressão, descarga do material esgotado e recarga do novo material.

3.3.1.5 Solubilidade

Tal como a diferença de temperatura para a transferência de calor e a diferença de pressão para a transferência de quantidade de movimento, a força motriz do fenômeno de transporte de massa é a diferença de concentração da espécie química. Contudo, esta transferência de massa é limitada pelas condições de equilíbrio. A solubilidade é utilizada para estimar o quanto de um soluto pode dissolver-se em um solvente específico, assim, a característica principal de uma solução é que os solutos se dissolvem no solvente. Para estudar o equilíbrio de fases e diante da complexidade em termos de substâncias presentes numa amostra vegetal, geralmente uma modelagem empírica é adotada (MEIRELES, 1999; BROWN e HOLME, 2009).

A solubilidade dos fluidos supercríticos é maior à medida que a pressão é aumentada. Consequentemente, o poder de solvatação do solvente é elevado devido ao aumento da densidade. No entanto, a temperatura tem influência nas propriedades do solvente e do soluto, com o aumento da temperatura, a densidade diminui (menor solubilidade dos fluidos supercríticos), além disso, aumenta a pressão de vapor (maior solubilidade dos fluidos supercríticos). Portanto, a seleção da temperatura na SFE requer atenção destes dois efeitos opostos sobre a solubilidade (BRUNNER, 1994; BRUNNER, 2005; DE MELO, SILVESTRE e SILVA, 2014; CORNELIO-SANTIAGO et al., 2017).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo da obtenção de óleo via extração com SFE e extração convencional a partir de folhas de *M. standleyi*, foi realizado de acordo com o fluxograma de atividades descrito na Figura 2.

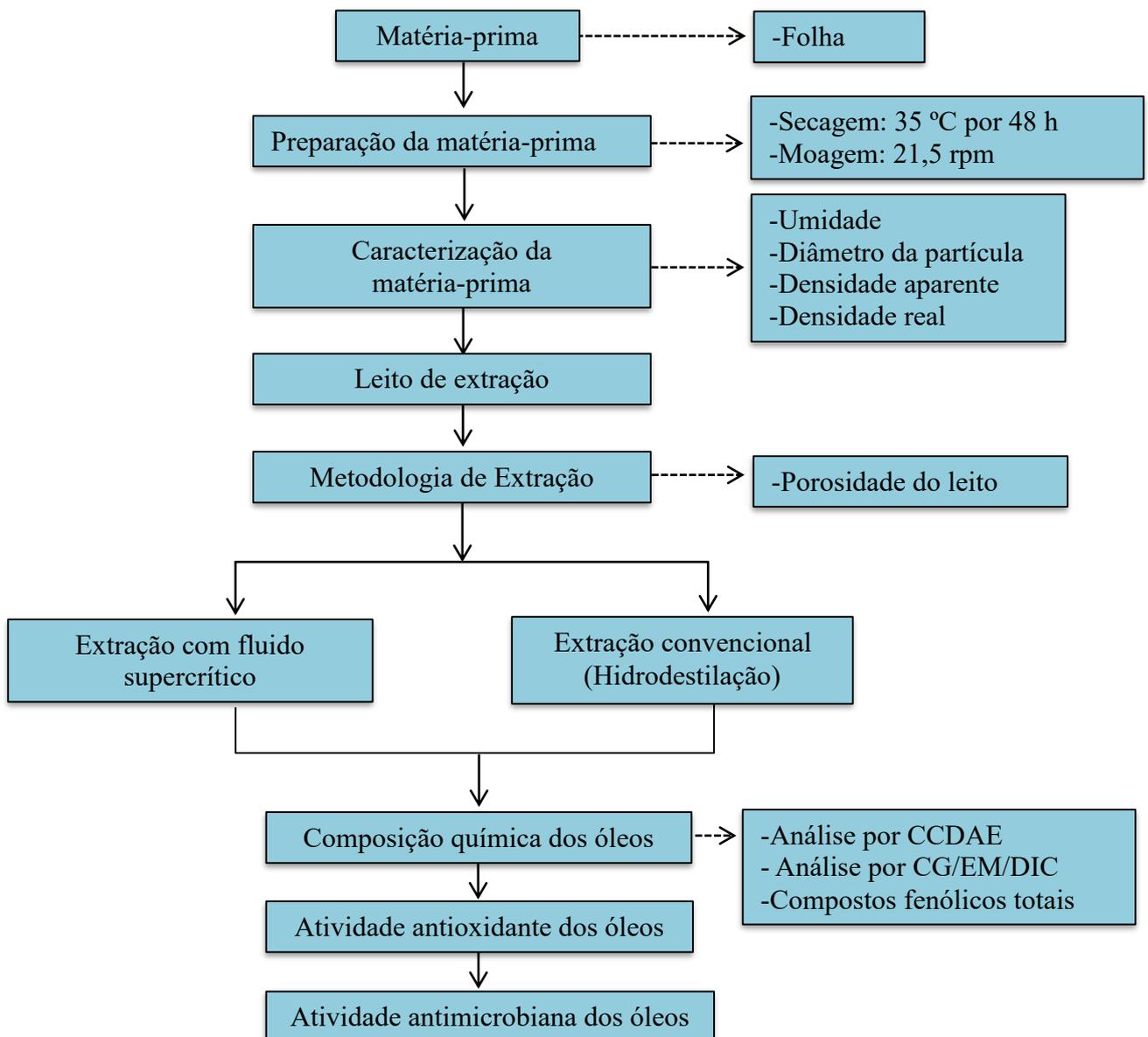


Figura 2. Fluxograma das atividades realizadas no presente trabalho.

4.1 Matéria-prima

As folhas de cipó-de-alho (*Mansoa standleyi*) foram coletadas (5 kg) no campo experimental de plantas medicinais da Embrapa Amazônia Oriental (EMBRAPA), localizado em Belém, PA. A partir de uma única safra, para evitar variações da composição química do óleo. A coleta foi feita de manhã devido a que nesse horário a temperatura ambiente é relativamente baixa e há menos probabilidade de degradação dos compostos. A coleta foi feita de várias árvores e em diferentes posições dessas árvores, para que amostragem seja representativa. Uma exsicata encontra-se depositada no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi (MG 188.707). Após a coleta, as folhas foram colocadas em sacolas plásticas e transportadas até o Laboratório de Extração (LABEX, FEA-UFPA) para a realização do presente estudo.

4.1.1 Caracterização da Matéria-prima

4.1.1.1 Secagem e moagem

As folhas de *M. standleyi* foram secadas a 35 °C por 48 h em estufa de circulação de ar (Modelo 225, Fabbe-Primar[®], Brasil) de acordo com os parâmetros relatados por Guilhon et al. (2012) no Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais (LEPRON/FEQ-UFPA). Em seguida a matéria-prima seca foi moída em um moinho de facas (Modelo ma 048, Marconi[®], China) com velocidade de 21,5 rpm no Laboratório de Extração (LABEX/FEA-UFPA).

4.1.1.2 Determinação da umidade

A matéria-prima foi caracterizada quanto ao seu teor de água segundo o método de destilação do solvente imiscível de Jacobs (1973) no Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais (LEPRON/FEQ-UFPA). Este procedimento foi realizado em triplicata. A umidade da amostra foi calculada pela Equação 1:

$$U = \left(\frac{V_{H_2O} \cdot \rho_{H_2O}}{m_{amostra}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

U: umidade;

V_(H₂O): volume de água extraída da amostra;

ρ_{H₂O}: densidade da água;

m_(amostra): massa da amostra.

4.1.1.3 Determinação do diâmetro da partícula

Para determinar a granulometria, uma amostra do material moído (cerca de 100 g) foi classificada de acordo com uma série de peneiras Tyler de 20 a 60 mesh (Bertel, Brasil), no Laboratório de Medidas Físicas (LAMEFI/FEA-UFPA). As frações de 20, 28 e 35 mesh foram misturadas e homogeneizadas, logo foram utilizadas para o empacotamento do leito de extração. O diâmetro médio das partículas foi determinado de acordo com o método recomendado pela ASAE Standart (ASAE, 1993) através da Equação 2:

$$d_{mg} = \log^{-1} \left[\frac{\sum_{i=1}^n \left(w_i \log \bar{d}_i \right)}{\sum_{i=1}^n w} \right] \quad (2)$$

Onde:

$$\bar{d}_i = (d_i \cdot d_{i+1})^{0,5};$$

d_i : abertura nominal da i -ésima peneira (mm);

d_{i+1} : abertura nominal da peneira maior que a i -ésima peneira (mm);

w_i : massa do material retida na i -ésima peneira.

4.1.1.4 Determinação da densidade aparente do leito, densidade real da partícula e porosidade do leito.

A densidade aparente (ρ_a) foi calculada dividindo-se a massa total necessária da matéria-prima (F) para empacotar o leito, pelo volume total (V) do leito de extração, conforme Equação 3:

$$\rho_a = \frac{F}{V} \quad (3)$$

A densidade real (ρ_r) das partículas foi determinada por picnometria com gás hélio na Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp utilizando densímetro (Micrometrics, modelo Multivolume Pycnometer 1305, USA), uma balança analítica (QUIMIS, modelo AS 210, Brasil) e um pesa filtro. A porosidade do leito (ϵ) foi calculada pela relação matemática da densidade real e aparente, através da Equação 4:

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (4)$$

4.2 Extração com Fluido Supercrítico (SFE)

4.2.1 Unidade de Extração Supercrítica

As extrações foram realizadas no Laboratório de Extração (LABEX/FEA-UFPA), na unidade de extração supercrítica *Spe-ed*TM SFE (Applied Separations modelo 7071, USA). O *Spe-ed*TM SFE está acoplado a um compressor de volume interno 19,7 L (Schulz, modelo CSA 7,8, Brasil), recirculador (Polyscience modelo F08400796, USA), um cilindro com CO₂, e medidor de vazão de CO₂ na saída do sistema (Dwyer, modelo RMA, USA).

4.2.2 Procedimento Operacional

O Procedimento operacional foi realizado segundo o manual de operações da Applied Separations (2004).

4.2.3 Preparação do Leito de Extração

O empacotamento da célula de extração, com dimensões de 0,125 m de altura e de 0,032 m de diâmetro interno, foi realizado com 10 g de matéria-prima. A fim de evitar a migração de particulados da matéria-prima para os dutos capilares, foram inseridas pequenas porções de algodão nas extremidades internas da célula e esferas de vidro. Posteriormente, foi fechada e inserida dentro do forno de *Spe-ed*TM SFE para iniciar o processo de extração (Figura 3).

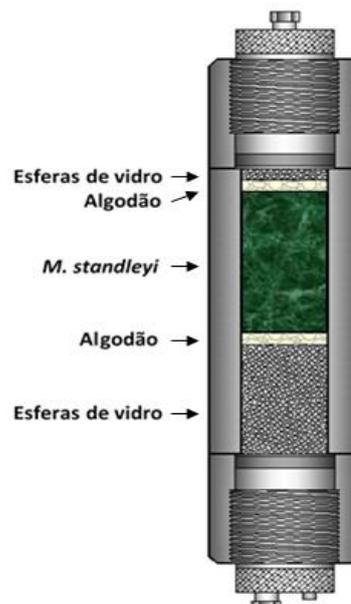


Figura 3. Ilustração do leito de extração.

4.2.4 Determinação das Isotermas de Rendimento Global

Os ensaios SFE foram realizados em folhas de *M. standleyi* secas, moídas e peneiradas, utilizando CO₂ como solvente os parâmetros operacionais mantidos constantes foram o tempo de extração estática (*tE*) de 30 min e o tempo dinâmico (*tD*) de 180 min, a vazão volumétrica de CO₂ (*Q*_{CO₂}) de 2,5 L/min e massa de matéria-prima (*F*) de 10 g. Para a obtenção do óleo de *M. standleyi* a seleção das variáveis temperatura e pressão foi realizada a fim de obter uma diferença da densidade do CO₂ nas isotermas de 35 e 45 °C combinadas com os valores de pressão de 100, 200, 300 e 400 bar. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os rendimentos globais foram calculados a partir da razão matemática entre a massa de óleo e a massa de amostra em base seca, como pode ser visualizada na Equação 5:

$$X_{0.B.S}(\%) = \frac{m_o}{m_a \times \left(1 - \frac{U_a}{100}\right)} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

m_o: massa de extrato (g);

m_a: massa de amostra em (g);

U_a: umidade da amostra (%).

4.3 Hidrodestilação

O processo de extração foi realizado de acordo com os parâmetros descritos por Zoghbi, Pereira e Oliveira (2012) no Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais (LEPRON/FEQ-UFPA), em sistema de vidro do tipo Clevenger, a partir do material seco, usando 100 g de amostra. O período de extração foi de 3 h, com temperatura de 100 °C. A bateria de destilação foi acoplada a um sistema de refrigeração para manutenção da água de condensação em torno de 12 °C. Os óleos obtidos foram centrifugados a 3000 rpm durante 5 min, desidratados com sulfato de sódio (Na₂SO₄), novamente centrifugados nas mesmas condições para ficar livre de umidade. O rendimento de óleo foi calculado em base seca pela Equação 5.

4.4 Determinação da Composição Química dos Extratos

4.4.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE)

A triagem fitoquímica dos óleos de *M. standleyi* foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) de acordo com o método de Wagner e Bladt (2001) e Srivastava (2011) no Laboratório Central de Extração (ICN/UFPA). Utilizando um CAMAG-TLC/HPTLC (CAMAG, Suíça), equipado com automatic TLC sampler (ATS 4),

Automated Multiple Development (AMD 2) e TLC Visualizer. Os óleos de *M. standleyi* obtidos pela extração supercrítica (ensaios 1-8), o óleo obtido por Hidrodestilação (H) e os padrões utilizados (β -mirina e *t*-Resveratrol) (P), foram dispostos nas placas conforme mostra a Figura 4. Os óleos foram dissolvidos em etanol (99,9%, Tedia[®], Brasil), a uma concentração de 5000 ppm, e os padrões a uma concentração de 200 ppm, foram aplicados 20 μ L dos óleos e 5 μ L dos padrões, em forma de banda em placas de sílica gel 60 Å (SiliCycle Inc, Canada). Foi utilizado como fase móvel diclorometano (99,9%, Tedia[®], Brasil) e metanol (99,9%, Tedia[®], Brasil), acidificada com 1% ácido fórmico (85%, Isotar[®], Brasil) em uma proporção de (95:4:1) (v/v/v). As placas foram derivatizadas com vanilina-ácido sulfúrico (VAS) (Merck[®], Brasil) específico para identificação de terpenos, esteróides e ácidos graxos, usando a β -mirina (pureza 98,5%, Sigma-Aldrich[®], Brasil), o Fast Blue Salt (FBS) (95%, Sigma-Aldrich[®], Brasil) para identificação de compostos fenólicos, difenilboriloxietilamina (NP) (Sigma-Aldrich[®], Brasil) e polietilenoglicol 4000 (PEG) (Sigma-Aldrich[®], Brasil) (NP/PEG) para identificação de flavonoides e com uma solução metanólica (99,9%, Tedia[®], Brasil) do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (Sigma-Aldrich[®], Brasil) para avaliação qualitativa da atividade antioxidante. Usando o *t*-Resveratrol (pureza 99,0%, Sigma-Aldrich[®], Brasil) para as placas derivatizadas com FBS, NP/PEG e radical DPPH•. As placas foram visualizadas sob luz visível e luz UV a λ de 366 nm.

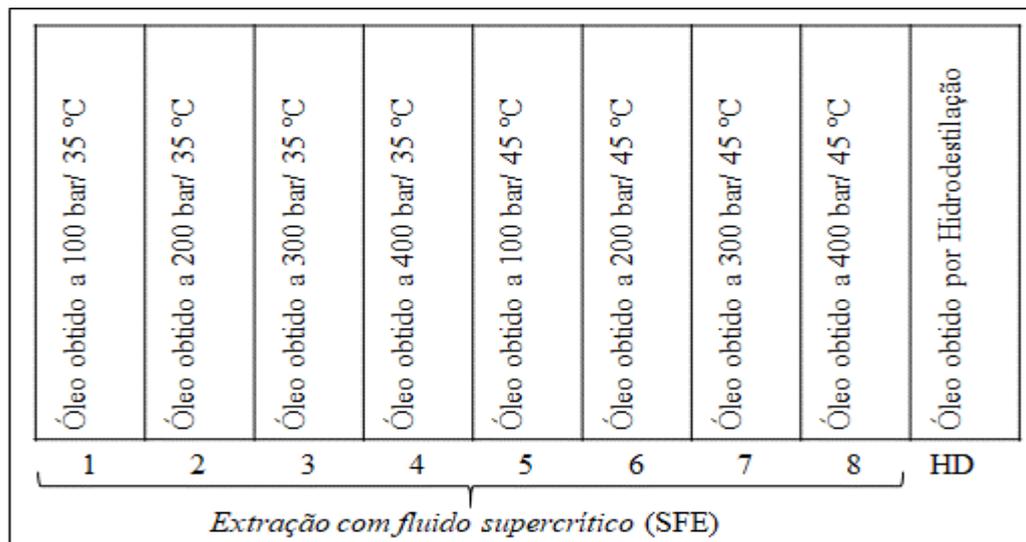


Figura 4. Disposição dos óleos de *M. standleyi* na placa para a análise por CCDAE.

4.4.2 Análise por Cromatografia Gasosa (CG/EM/DIC)

Foi feita por cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama e um espectrômetro de massa (CG/EM/DIC) de acordo com o método descrito por Souza Filho et al. (2009) no Laboratório Adolpho Ducke (LAD) do Museu Paraense Emílio Goeldi, utilizando os óleos de *M. standleyi* obtidos pela extração supercrítica e o óleo obtido por Hidrodestilação, empregando um QP 2010 sistema Shimadzu equipado com um auto injetor de AOC-20i, RTX-5MS, uma coluna capilar de sílica (30 mx 0,25 mm, espessura de filme de 0,25 µm), as temperaturas de 60 a 250 °C, com um gradiente de 3 °C / min e a temperatura do injetor de 250 °C; hélio como gás de arraste, a um caudal de 1,2 mL / min (medido a 100 °C), injeção de 2 µL de óleo, impacto de elétrons de 70 eV e temperatura da fonte de íons de 200 °C. Os compostos foram identificados com base nos índices de retenção (IR), determinados pelo tempo de retenção dos compostos em uma série homóloga de hidrocarbonetos (C8-C20), comparando-se os seus espectros de massa com os descritos na literatura (ADAMS, 2007) e na base de dados NIST (STEIN et al., 2002). A quantificação foi obtida por CG, equipado com detector de ionização de chama (DIC), nas mesmas condições operacionais, exceto o gás de arraste, que foi o hidrogênio. A porcentagem da composição foi obtida pela área dos picos, sem uso de fator externo.

4.4.3 Análise de Compostos Fenólicos Totais (CFT)

A determinação de CFT foi realizada utilizando o método de Folin-Ciocalteu segundo a metodologia descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos, (1999) e Georgé et al. (2005). Os óleos de *M. standleyi*, foram dissolvidos em etanol (96%, Dinamica®, Brasil) a 7% (v/v), na concentração de 140 mg/L. Em seguida, 0,5 mL desta solução, foi submetida à reação com 2,5 mL de Folin-Ciocalteu (Tedia®, Brasil) a 10% (v/v) e 2 mL de solução de carbonato de sódio (99,5%, Vetec®, Brasil) a 7,5% (m/v). Após 60 min de incubação à temperatura ambiente e no escuro, as medidas das absorbâncias foram realizadas a 760 nm em um espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific, modelo Evolution 60, USA). O teor de compostos fenólicos foi expresso como miligrama equivalente de ácido gálico (EAG) (98%, Vetec®, Brasil) por grama de óleo em base seca (b.s.) (mg EAG/g) a partir da equação da curva de calibração ($y=0,0099x-0,0277$; $R^2=0.9971$). A análise foi realizada em triplicata.

4.5 Atividade Antioxidante dos Óleos

A determinação quantitativa da atividade antioxidante dos óleos de *M. standleyi* pelo método DPPH foi realizada no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LABIOTEC/FEA-UFPA) de acordo com o método proposto por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998). Foi preparada uma solução de DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil) (Sigma-Aldrich, Brasil) a 60 μM em etanol (96%, Dinamica[®], Brasil). Em seguida, 3,9 mL desta solução foi adicionado em 0,1 mL do óleo em diferentes concentrações (20, 15, 10, e 8 mg/mL). Essas soluções foram mantidas à temperatura ambiente e no escuro. Após estabilização do t_{EC50} (tempo necessário para reduzir em 50% a quantidade inicial do radical DPPH•) a absorbância foi medida a 515 nm utilizando um espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific, modelo Evolution 60, USA). Foi realizado o cálculo do EC_{50} (quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial do radical DPPH•) e atividade antioxidante foi expresso como grama de óleo por grama de DPPH em base seca (b.s.) (EC_{50} expresso em g de óleo/g de DPPH). A análise foi realizada em triplicata.

4.6 Atividade Antimicrobiana do Óleo

Para a análise da atividade antimicrobiana *in vitro* foi utilizado nos ensaios cepas padrão *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213); *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 10231) adquirido da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ) e pertencente ao banco de padrões do Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico de Medicamentos do Centro Universitário do Pará-CESUPA. O inóculo de cada microrganismo foi obtido a partir de uma suspensão microbiana de cultura recente (máximo 24 h) em solução salina 0,85% (m/V) pela comparação da turbidez do inóculo com a escala MacFarland equivale a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (NCCLS M7-A7, 2006) em turbidímetro (Maca: Grant bioModelo: DEN-1). O meio de cultura utilizado para o teste de sensibilidade em placa foi o ágar caseína soja (ACS) e o caldo cérebro e coração (BHI) contendo polissorbato 80 a 0,3% (m/V).

4.6.1 Avaliação da Sensibilidade da Amostra pelo Método de Difusão em Agar

Em uma placa de Petri foram vertidos 10 mL do ágar caseína soja (15x100 mm). Em seguida, inoculou-se o microrganismo (10^6 UFC/mL) com o auxílio de um *swab* estéril e sobre o meio adicionou-se discos papel impregnados com 10 μL de óleo (obtido por SFE na condição de 400 bar/35 °C e por Hidrodestilação). As placas foram incubando à 30 ± 5 °C por 24 h em ambiente de aerobiose (NCCLS M7-A7, 2006). Após o período de incubação, as placas foram

reveladas com cloreto de trifeniltetrazólico à 7 mg/mL em ágar bacteriológico à 1% (m/V). Os halos foram mensurados com auxílio de um paquímetro (mm) e avaliados por meio de análise descritiva. O halo de inibição a ser considerado foi aquele em que o halo apresentou diâmetro ≥ 8 mm (CHANDA e BARAVALLIA, 2010). Como droga antifúngica controle foi utilizado a Nistatina e como droga antibacteriana a Estreptomicina e Vancomicina. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi realizada com o óleo essencial e foi adaptada da microdiluição proposta por NCCLS M7-A7 (2006). O teste ocorreu em placa de Elisa® onde uma alíquota de 100 μ L da amostra foi diluída na proporção 1:2 (v/v) em caldo BHI contendo 10^6 UFC/mL até 10 diluições consecutivas. As placas foram incubadas à 30 ± 5 °C por 48h. O teste foi realizado em triplicata. Após a incubação, as placas foram reveladas com caldo bacteriológico à 1% (m/V) contendo solução de cloreto de trifeniltetrazólico 7 mg/mL e incubadas por mais 30 min à 30 ± 5 °C para bactérias. A cor vermelha no meio foi interpretada como crescimento microbiano.

A revelação do resultado para *C. albicans* deu-se a partir dos poços onde, após 24 h de incubação não havia crescimento bacteriano visíveis. De cada poço transferiu-se uma alíquota de 10 μ L para a superfície do ágar BHI. Após 24 h de incubação a 35 °C, registrou-se a menor concentração do óleo, no qual não se evidenciava crescimento bacteriano. Esses ensaios foram realizados em triplicatas.

4.7 Análise Estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão de três repetições independentes (n=3). Para verificar a existência de diferença significativa entre o rendimento, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos óleos de *M. standleyi*, as médias dos resultados foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e, quando significativas, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do programa STATISTICA® versão 7.0 (Statsoft, Inc. Tulsa, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da Matéria-prima e Leito de Extração

A matéria-prima de estudo constituída de folha de *M. standleyi* apresentou $10,01 \pm 0,03\%$ de umidade, diâmetro médio das partículas de $0,65 \pm 0,03$ mm, densidade aparente (ρ_a) de $0,30 \pm 0,01$ g/cm³, densidade real (ρ_r) de $1,24 \pm 0,02$ g/cm³ e porosidade do leito (ϵ) de 0,76. Estes valores dos parâmetros avaliados na matéria-prima são adequados para SFE, e são considerados uns dos principais parâmetros que influenciam diretamente na taxa de transferência de massa do processo. Portanto, a matéria-prima deve ser pré-tratada ou acondicionada corretamente, para aumentar a taxa de extração (PEREIRA e MEIRELES, 2010; HERRERO et al., 2013; SALAZAR et al., 2018). Estes parâmetros foram mantidos constantes no processo de SFE, a fim de que estes não exercessem influência nos rendimentos globais de extração, uma vez que não foram avaliados neste trabalho como variáveis do processo.

5.2 Extração com Fluido Supercrítico (SFE)

5.2.1 Determinação dos Rendimentos Globais de Extração

Na Tabela 2 são apresentados os dados médios dos valores de rendimento global de extração em base seca. Os resultados obtidos permitem constatar que os valores de rendimento global de extração, apresentam diferenças significativas entre si ($p \leq 0,05$), com valores variando de 0,87 a 2,02%. A maior média encontrada refere-se à condição de 400 bar, 35 °C e com uma densidade de 972,26 kg/m³ (ensaio 4), a qual difere estatisticamente dos demais, a exceção do óleo obtido na condição de 400 bar, 45 °C e com uma densidade de 939,75 kg/m³ (1,83%) (ensaio 8) em que não apresentam diferenças entre si ($p > 0,05$). Foi observado que com o aumento da densidade do solvente houve um aumento sequencial do rendimento global de extração. Esse comportamento pode ser explicado devido ao processo de extração que sofre influência da pressão e temperatura.

Em geral, a taxa de extração aumenta por causa do aumento da solubilidade do soluto no solvente. Com o acréscimo da pressão, aumenta a densidade do fluido supercrítico, elevando assim o seu poder de solvatação. Em relação à temperatura, há influência nas propriedades do solvente e do soluto; com o aumento da temperatura, aumenta a pressão de vapor, elevando a solubilidade dos fluidos supercríticos (BRUNNER, 2005; DE MELO et al., 2014; CORNELIO-SANTIAGO et al., 2017).

Tabela 2. Valores médios de rendimento global de extração, compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante, referentes ao óleo obtido das folhas de *M. standleyi*.

Extração com fluido supercrítico (SFE)						
Nº de ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Densidade (Kg/m ³)	Rendimento (%)	CFT (mg EAG/g de óleo)	DPPH (EC ₅₀ expresso em g de óleo/ g de DPPH)
1	35	100	712,81	1,17±0,03 ^d	31,87±0,19 ^h	2475,55±63,05 ^a
2		200	865,72	1,31±0,03 ^d	44,96±0,05 ^f	1721,02±17,28 ^b
3		300	929,11	1,65±0,05 ^{bc}	61,86±0,13 ^b	1059,46±1,26 ^c
4		400	972,26	2,02±0,01 ^a	72,06±0,08 ^a	457,64±4,52 ^e
5	45	100	498,25	0,87±0,02 ^e	33,79±0,24 ^g	1583,17±0,30 ^f
6		200	812,69	1,55±0,06 ^c	47,58±0,40 ^e	1548,36±0,04 ^f
7		300	890,33	1,78±0,05 ^b	49,61±0,44 ^d	1479,16±1,92 ^f
8		400	939,75	1,83±0,01 ^{ab}	56,01±0,12 ^c	731,93±0,01 ^d
Hidrodestilação (HD) a 100 °C				0,14±0,01	58,71±0,52	38764,67±773,35

Dados representam a média ± desvio-padrão (base seca). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

É importante destacar que atualmente na literatura não existe nenhum estudo da *M. standleyi* empregando a tecnologia supercrítica. De acordo com os estudos publicados na literatura para SFE de outras plantas, foi possível observar que existem resultados semelhantes aos obtidos neste estudo. Assim, Veggi, Cavalcanti e Meireles (2011) acharam um rendimento para folhas de ingá-cipó (*Inga edulis*) de 0,2% e 1,8% e em nó-de-cachorro (*Heteropterys afrodisiaca*) de 0,1% e 2,0%. De Souza et al. (2018) reportaram um rendimento para folhas de bardana (*Arctium lappa*) de 1,4%. Entretanto, foram reportados valores superiores ao deste estudo, por Del Valle et al. (2005), para folhas de boldo (*Peumus boldus* M.), onde o rendimento global de extração variou de 2,8 a 4,9%. Radojkovic et al. (2016) acharam um rendimento para folhas de amoreira branca (*Morus alba*) de 2,9%. Lee et al. (2017) reportaram um rendimento em folhas de amoreira branca (*Moringa oleífera* Lam) de 2,3%. Al Bulushif et al. (2018) em folhas de tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) obtiveram um rendimento de 3,7%.

Alguns estudos reportam que o rendimento global de extração pode ser aumentado com um incremento do fluxo ou vazão de CO₂, onde conseqüentemente ocorre um acréscimo da transferência de massa, como também, com adição de um cossolvente ou modificador ao CO₂

supercrítico. Esse efeito é atribuído a diversos fatores: alteração na estrutura da matriz, mudança nas propriedades de transporte do solvente, interações soluto/cossolvente/solvente, modificação da força ligante soluto-matriz (principalmente relacionada com pontes de hidrogênio) (HERRERO et al., 2013; COSTA et al. 2015; PEREIRA et al., 2016).

5.3 Extração Convencional por Hidrodestilação (HD)

A extração por HD foi realizada como extração de referência a fim de comparar os resultados de rendimento e a composição química dos óleos obtidos por SFE. O rendimento em base seca foi de 0,14% (Tabela 2). Este resultado encontra-se em concordância com os valores encontrados por Zoghbi et al. (2010); Zoghbi, Pereira e Oliveira (2012) em um estudo com folhas de *M. standleyi*, onde o rendimento do óleo em base seca foi de 0,15%. Entretanto, Guilhon et al. (2012) reportaram um valor superior de rendimento de óleo obtido a partir de folhas de *M. standleyi* de 0,22%. Estas diferenças encontradas nos teores de rendimento podem ser explicadas devido aos métodos de secagem da matéria-prima e às condições de extração utilizadas (BASTOS et al., 2012). Comparando os resultados da SFE com a extração por HD, pode ser observado na Tabela 2 que para os óleos obtidos por SFE independentemente da condição operacional utilizada, o rendimento foi superior ao obtido por HD. O incremento do rendimento global na SFE pode ser devido à polaridade do solvente e as baixas temperaturas utilizadas no processo, evitando a perda de muitos compostos sensíveis ao calor.

5.4 Determinação da Composição Química dos Óleos

5.4.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE)

A triagem fitoquímica por CCDAE dos óleos de *M. standleyi* obtidos pela extração com fluido supercrítico (SFE), conforme apresentado na Tabela 2 (ensaios 1-8), e o óleo obtido por Hidrodestilação (HD) é mostrada nas Figuras 5 e 6. As placas foram derivatizadas com diferentes reagentes que produzem cor característica para classes específicas de compostos químicos. Assim, a placa derivatizada com VAS (Figura 5 A) mostra a formação de bandas com coloração roxa/lilás indicando a presença de terpenos e bandas com coloração cinza características de ácidos graxos (JORK et al., 1990; WAGNER e BLADT, 2001) para os óleos obtidos com SFE (ensaios 1-8), que também apresentam atividade semelhantes ao padrão positivo (β -amirina).

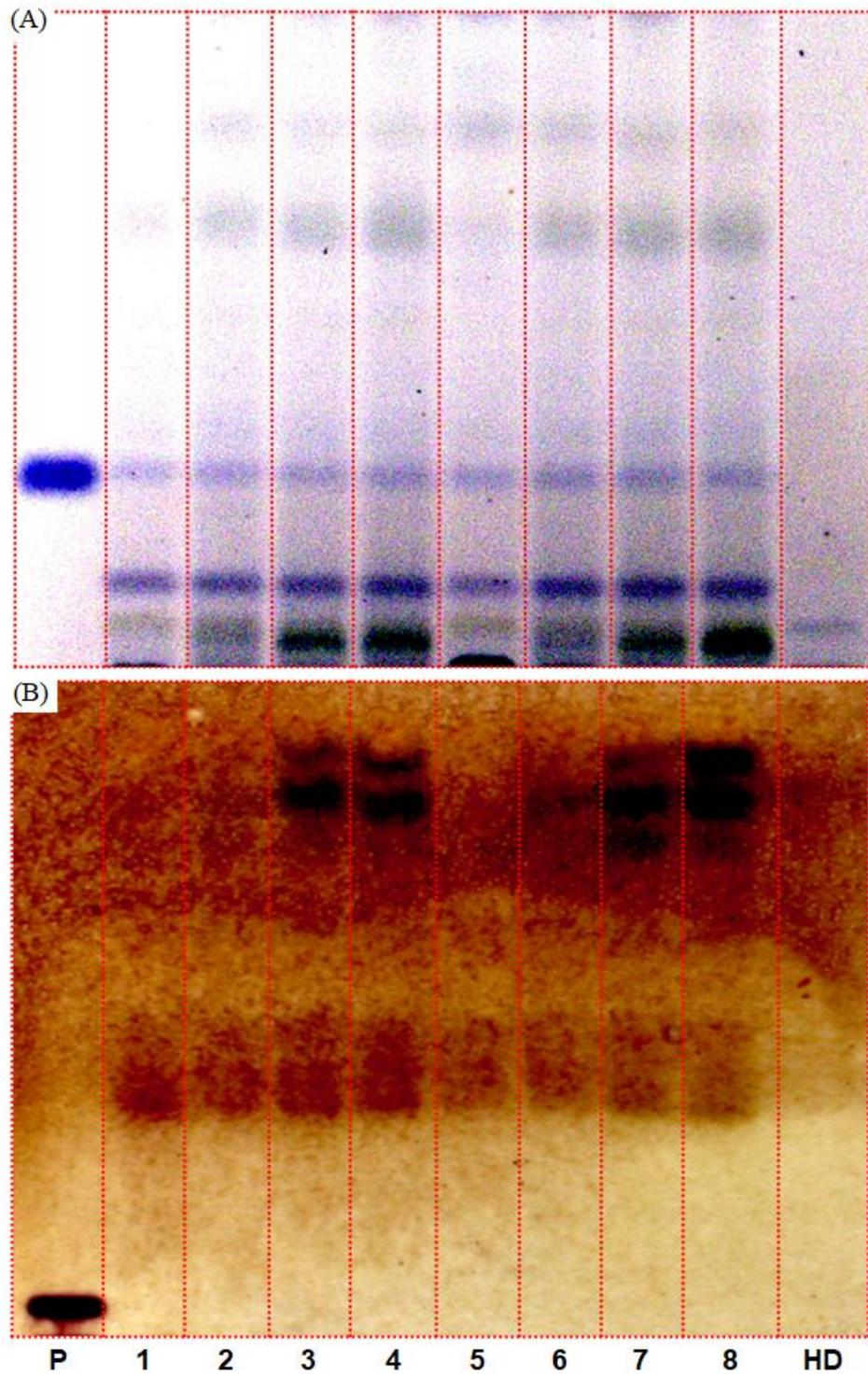


Figura 5. CCDAE dos óleos de *M. standleyi*, obtido por SFE (ensaio 1-8); Hidrodestilação (HD); padrão (P): β -mirina placa (A) reveladas com VAS e t-Resveratrol placa (B) reveladas com FBS.

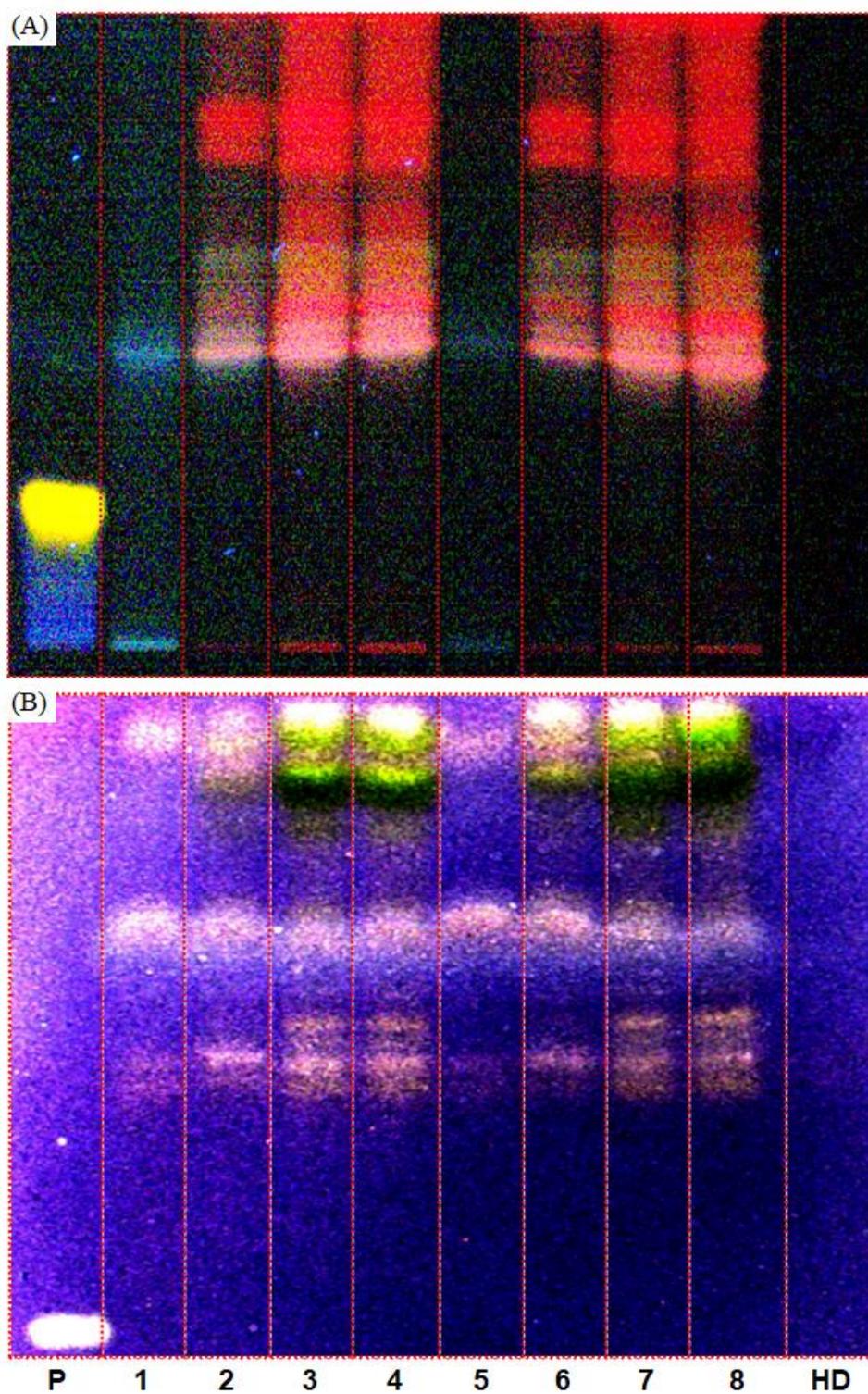


Figura 6. CCDAE dos óleos de *M. standleyi*, obtido por SFE (ensaio 1-8); Hidrodestilação (HD); padrão (P) *t*-Resveratrol placa (A) revelada com NP/PEG e placa (B) revelada com DPPH.

No entanto, foi observado que óleo obtido por HD não apresenta o mesmo perfil fitoquímico, é possível afirmar que esta classe de compostos é extraída preferencialmente utilizando CO₂ como solvente. A placa derivatizada com FBS (Figura 5 B) indica a presença de compostos fenólicos devido à formação de bandas de coloração alaranjado-marrom (JORK et al., 1990). De acordo com os resultados, foi observado que os óleos obtidos com SFE (ensaios 3, 4, 7 e 8) apresentam um perfil fotoquímico semelhante, verificando-se notoriamente a presença de compostos fenólicos. Porém, os óleos não têm bandas com o mesmo fator de retenção (Rf) que o padrão utilizado (*t*-Resveratrol). Em relação ao óleo obtido por HD não foi evidenciado claramente esta classe de compostos.

Na placa derivatizada com NP/PEG (Figura 6 A) visualizada em luz UV no λ de 366 nm, os compostos presentes nos óleos tornaram-se fluorescentes ao serem excitadas por essa radiação e há a possível presença de flavonoides pela coloração verde-amarela das bandas (JORK et al., 1990; WAGNER e BLADT, 2001). Observasse que nos óleos obtidos com SFE (ensaios 2, 3, 4, 6, 7 e 8) há uma melhor identificação dos compostos. Deste modo, são visualizadas bandas de cor amarela com o mesmo Rf para estes óleos, no entanto apresentam Rf diferente ao padrão utilizado (*t*-Resveratrol). Em contraste, no óleo obtido por HD não há identificação para esta classe de composto. Na placa derivatizada com DPPH (Figura 6 B) para a avaliação qualitativa da atividade antioxidante, se evidenciou a presença de bandas amarelas sobre o fundo púrpura da placa para todos os óleos obtidos com SFE, sendo observado uma melhor identificação nos óleos obtidos em altas pressões (ensaios 3, 4, 7 e 8) resultantes da redução do radical DPPH• (KEDARE e SINGH, 2011). Isto porque, na presença de substâncias antioxidantes, é reduzido a 2,2-difenil-picril-hidrazina, perdendo sua coloração púrpura (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995; RAMADAN et al., 2012). No entanto, os óleos apresentam bandas com Rf diferente ao padrão utilizado (*t*-Resveratrol). Em relação ao óleo obtido por HD não foi evidenciado a presença de substâncias com atividade antioxidante.

Os resultados para os óleos obtidos com SFE evidenciaram a presença (reação positiva) de constituintes químicos característicos desta planta, como os terpenos, ácidos graxos, compostos fenólicos e flavonoides. Resultados semelhantes já haviam sido encontrados por Pereira et al. (2017) em extrato etanólico e hidroalcoólico, a partir de uma planta da mesma família (*Mansoa hirsuta*) analisados por CCD.

5.4.2 Análise de Compostos Fenólicos Totais (CFT)

Em relação ao conteúdo de CFT, os valores encontrados para cada ensaio são mostrados na Tabela 2. Os resultados obtidos permitem constatar que os teores médios de CFT em base seca, apresentam diferenças significativas entre si ($p \leq 0,05$), com valores variando de 31,87 a 72,06 mg EAG/g óleo. A maior concentração fenólica foi observada para a condição de 400 bar, 35 °C e com uma densidade de 972,26 kg/m³ (ensaio 4), a qual foi significativamente superior aos valores obtidos para os demais ensaios. De modo geral, notasse que o conteúdo de CFT sofre influência direta da pressão, ou seja, a medida que é aumentada (nas duas isoterms 35 e 45 °C) há um incremento no conteúdo de CFT. Esse comportamento pode ser explicado, devido a que, com aumento da pressão há um aumento da densidade do solvente (CO₂) e conseqüentemente um aumento na solubilidade desses compostos. Além disso, o uso de baixa temperatura no processo de SFE evita a degradação de composto termosensíveis (HERRERO et al., 2013; MEIRELES e PEREIRA, 2013; DE MELO et al., 2014).

Comparando estes resultados com os estudos realizados empregando a SFE para outras plantas, observou-se que seguem a tendência apresentada por Barroso et al. (2011) em folhas de aroeira salsa (*Schinus molle*) onde reportaram valores de 31,91 para 64,16 mg EAG/g material obtidos nas condições de 100 e 200 bar respectivamente, utilizando uma temperatura de 50 °C. Salazar et al. (2018) utilizando folhas e caules de cipó puçá (*Cissus silyoides*) reportaram valores de 37,83 para 44,09 mg EAG/g de material obtidos nas condições de 200 e 400 bar respectivamente, utilizando uma temperatura de 50 °C, indicando que, com aumento da pressão há um aumento no conteúdo de CFT. Entretanto, Kazan et al. (2014), no estudo realizado com folhas de pessegueiro (*Prunus pérsica*) encontraram um teor de 70,92 mg EAG/g de material obtido nas condições de 150 bar e 60 °C. Justo et al. (2015) em um estudo com folhas de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) reportaram um teor de 62,70 mg EAG/g de material nas condições de 250 bar e 40 °C, sendo que, estes valores são semelhantes aos obtidos neste estudo.

Comparando os resultados da SFE com a extração por HD apresentados na Tabela 2, em relação ao conteúdo de CFT, o óleo obtido por HD apresentou um menor valor (58,71 mg AGE/g de óleo) em comparação ao óleo com maior conteúdo de CFT obtido com SFE (72,15 mg EAG/g de óleo). Assim, Pereira et al. (2017) realizaram um estudo com uma planta do mesmo gênero e diferente espécie (*Mansoa hirsuta*) utilizando a extração hidroalcolica, reportando um teor de 55,7 mg EAG/g de material, sendo que este valor é semelhante aos

resultados obtido neste estudo. As diferenças nos teores de CFT podem variar de acordo com o solvente usado, método de extração e a matriz vegetal. Geralmente, são extraídos usando solventes mais polares como: etanol, metanol, propanol, acetona, acetato de etila (GARCIA-SALAS et al., 2010; DO et al., 2014).

5.4.3 Análise Quantitativa da Atividade Antioxidante

Na Tabela 2 são apresentados os dados médios dos valores de EC_{50} em base seca. Os resultados obtidos permitem verificar que os valores de EC_{50} apresentam diferenças significativas entre si ($p \leq 0,05$), com valores variando de 457,64 a 2475,55 g de óleo/ g de DPPH. O menor valor de EC_{50} foi observado para a condição de 400 bar, 35 °C e com uma densidade de 972,26 kg/m³ (ensaio 4), sendo sua média estatisticamente diferente das demais ($p \leq 0,05$). No entanto, o potencial antioxidante do óleo é inversamente proporcional ao valor do EC_{50} , ou seja, quanto menor o valor de EC_{50} apresentado pelo óleo, menor quantidade de amostra (óleo) é necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH• e dessa forma, maior sua atividade antioxidante. Além disso, o óleo obtido na condição de 400 bar, 45 °C e com uma densidade de 939,75 kg/m³ (ensaio 8) (731,93 g de óleo/ g de DPPH) também apresentaram uma boa capacidade antioxidante, sendo sua média estatisticamente diferente das demais ($p \leq 0,05$). O inverso foi observado para os óleos obtidos em pressões baixas (100 e 200 bar), evidenciando uma baixa atividade antioxidante quando comparados aos demais. Os resultados da atividade antioxidante dos óleos estão relacionados aos resultados de CFT. Isso confirma que a atividade antioxidante das plantas é dependente da quantidade de compostos fenólicos (GARCIA-SALAS et al., 2010; DO et al., 2014). Observou-se que os valores de EC_{50} dos óleos obtidos por SFE sofrem influência da pressão, ou seja, quando a pressão aumenta o valor de EC_{50} diminui e consequentemente maior é sua atividade antioxidante.

Estes resultados estão de acordo com aquele relatado no item 5.4.1 para a análise qualitativa da atividade antioxidante por CCDAE (Figura 6B) onde foi observada a mesma tendência, sendo evidenciada uma melhor identificação da atividade antioxidante nos óleos obtido em pressões mais altas (ensaios 4 e 8). De acordo com o estudo realizado por Salazar et al. (2018) com folhas e caules de cipó-pucá (*Cissus silyoides*) reportaram valores de EC_{50} que variaram de 899,14 para 897,36 g de extrato/ g de DPPH obtidos nas condições de 200 e 400 bar respectivamente, utilizando uma temperatura de 50 °C e CO₂ como solvente, indicando, que houve um pequeno aumento na atividade antioxidante com aumento da pressão. Além disso,

reportaram que o extrato obtido com CO₂ + EtOH adicionado como cossolvente a 400 bar e 50 °C apresentam uma alta atividade antioxidante (379,50 g de extrato/ g de DPPH). Entretanto, De Sousa et al. (2018) em um estudo realizado com polpa de bacaba-de-leque (*Oenocarpus distichus*) que é um fruto rico em compostos fenólicos, os quais são os responsáveis pela elevada capacidade antioxidante, reportaram valores de EC₅₀ que variaram de 1510,48 para 6504,11 g fruta/ g de DPPH. Embora a matriz vegetal seja diferente à usada neste estudo, os resultados obtidos na melhor condição de SFE (457,64 g de óleo/ g de DPPH) estão em concordância com os reportados pelos autores acima mencionados, evidenciando que a *M. standleyi* apresenta uma importante fonte de compostos bioativos com elevada atividade antioxidante.

Comparando os resultados da SFE com a extração por HD (Tabela 2), em termos de atividade antioxidante, pode-se observar que os óleos obtidos por SFE em todas as condições operacionais usadas, apresentaram valores de EC₅₀ inferiores ao valor de EC₅₀ obtido por HD. Ou seja, independentemente da condição operacional, todos os óleos obtidos por SFE apresentaram maior atividade antioxidante em relação ao óleo obtido por HD. Estas diferenças podem estar relacionadas aos teores de CFT (72,15 mg EAG/g de óleo) com elevada atividade antioxidante (457,64 g de óleo/g de DPPH). Na literatura, vários autores têm relacionado os compostos fenólicos com a capacidade antioxidante de plantas, a qual pode ser atribuída às propriedades de oxi-redução dos mais variados polifenóis, que desempenham papel importante na absorção e neutralização de radicais livres (RUFINO et al., 2010; BORGES et al., 2011; KARABIN et al., 2015).

5.4.4 Análise por Cromatografia Gasosa (CG/EM/DIC)

Na tabela 3, estão apresentados os perfis de ácidos graxos do óleo de *M. standleyi* obtido por SFE sobre diferentes condições operacionais. Os resultados indicam que houve diferença na composição qualitativa dos ácidos graxos detectados no óleo de *M. standleyi*, em função da condição operacional de extração. Também, em termos quantitativos, foi observada a presença significativa de alguns compostos, como o ácido linoleico, que foi o principal ácido graxo presente no óleo ($\cong 95\%$), seguido pelos ácidos palmítico ($\cong 12\%$) e oleico ($\cong 5\%$). Como pode ser visto, o óleo foi caracterizado predominantemente por ácidos graxos insaturados (AGI=100%), cuja concentração foi muito maior que a de ácidos graxos saturados (AGS $\cong 15\%$).

Tabela 3. Composição de ácidos (%) do óleo das folhas de *M. standleyi* obtido por SFE.

Ácidos graxos	Concentração de ácidos graxos (%)							
	35°C				45°C			
	Pressão (bar)							
	100	200	300	400	100	200	300	400
Palmítico (C16:0)	6,63	5,46	10,69	12,79	10,80	10,84	3,13	-
Estearico (C18:0)	-	-	-	-	4,67	-	-	-
Oleico (C18:1)	5,84	-	-	-	2,90	-	-	4,84
Linoleico (C18:2)	87,53	94,54	89,31	87,21	81,63	89,16	96,87	95,16
AGS ^a	6,63	5,46	10,69	12,79	15,47	10,84	3,13	-
AGI ^b	93,37	94,54	89,31	87,21	84,53	89,16	96,87	100
AGMI ^c	5,84	-	-	-	2,9	-	-	4,84
AGPI ^d	87,53	94,54	89,31	87,21	81,63	89,16	96,87	95,16

^aAGS=Ácidos graxos saturados; ^bAGI= Ácidos graxos insaturados; ^cAGMI= Ácidos graxos monoinsaturados; ^dAGPI= Ácidos graxos poli-insaturados.

Entretanto, presença de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI \cong 96%) foi predominante em relação aos monoinsaturados (AGMI \cong 6%) para todas as condições operacionais. Entre os AGS, o ácido palmítico foi o principal ácido graxo presente no óleo, com menor concentração obtida na condição de 300 bar e 45 °C (3,13%) e a maior obtida a 400 bar e 35 °C (12,79%). Com relação aos AGI o principal ácido graxo encontrado foi o ácido linoleico, com concentração de aproximadamente 90% em quase todas as condições operacionais. As Figuras 7 e 8 mostram os cromatogramas de íons-totais para os óleos de *M. standleyi* obtidos via SFE.

Os resultados seguem a mesma tendência dos estudos realizados por Marija et al. (2016) com folhas de amoreira branca (*Morus alba*) extraído por SFE, com concentração de 14,76% para o ácido palmítico; e de 26,38% para o ácido linoleico. E Lee et al. (2017) no estudo com folhas de acácia-branca (*Moringa oleífera* Lam.) também obtido via SFE reportou concentrações de 6,84% de ácido palmítico e 23,65% de ácido oleico.

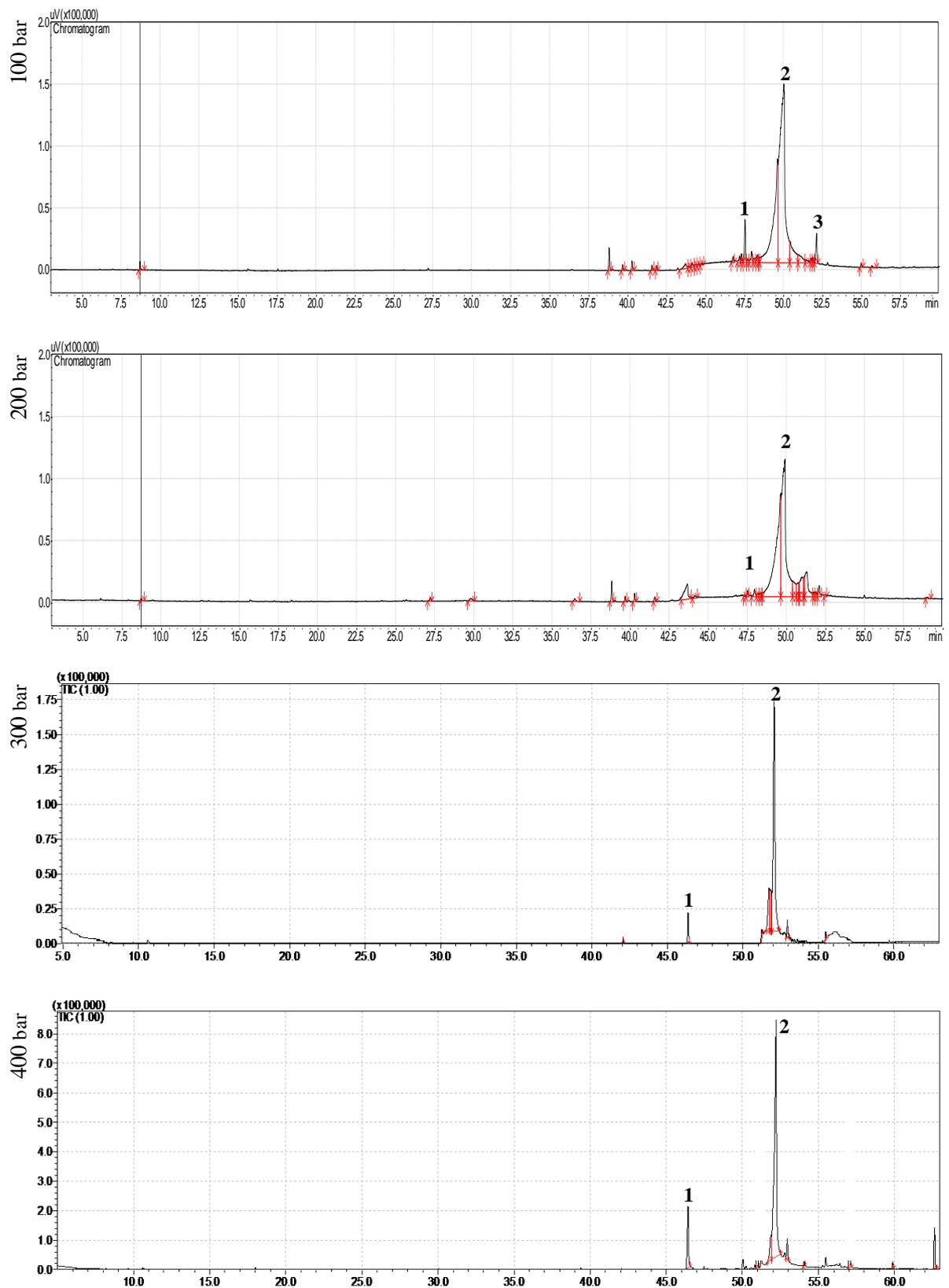


Figura 7. Cromatograma de íons-totais do óleo das folhas de *M. standleyi* obtidos via SFE utilizando 35 °C. Pico 1; ácido palmítico. Pico 2; ácido linoleico. Pico 3; ácido oleico.

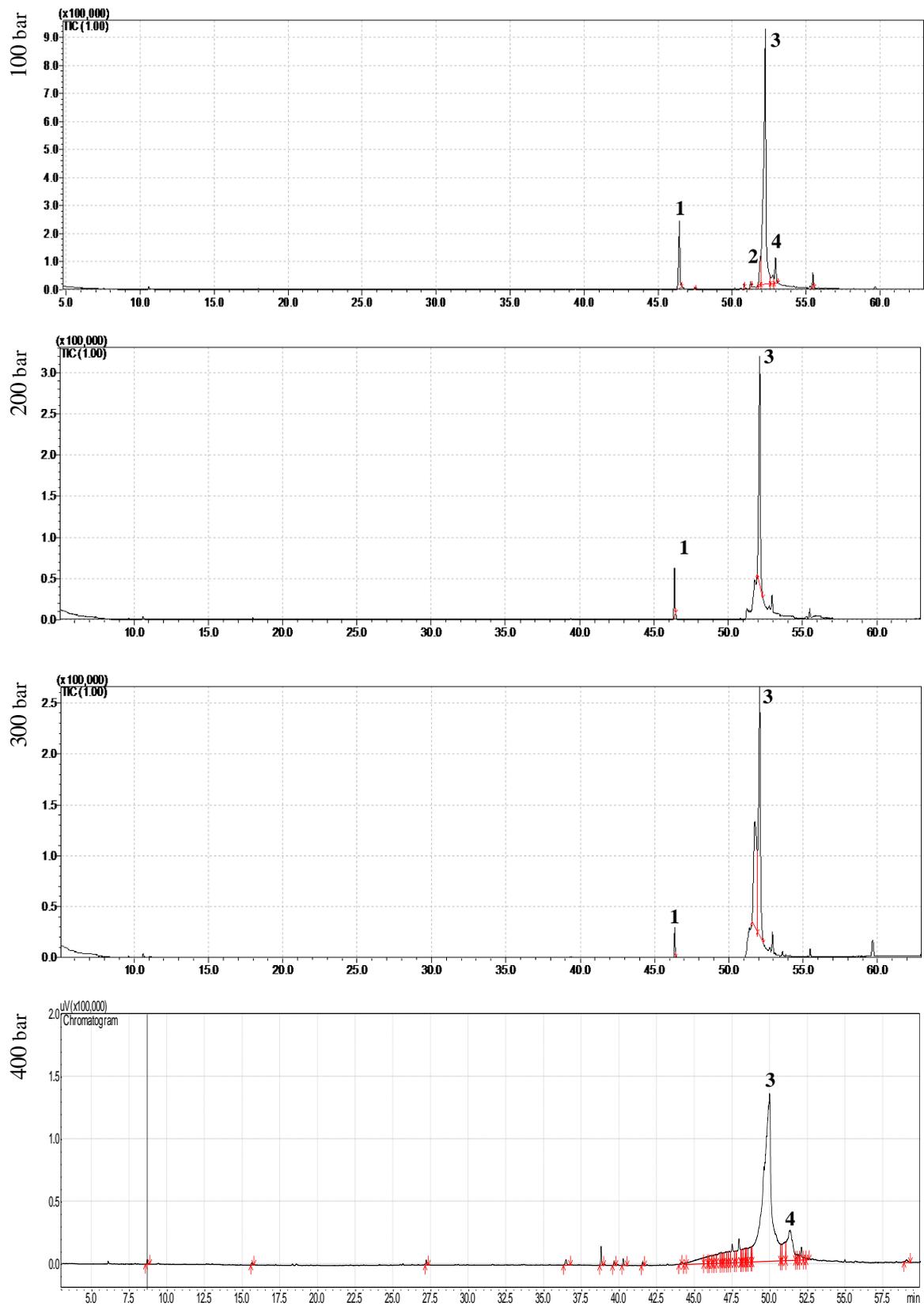


Figura 8. Cromatograma de íons-totais do óleo das folhas de *M. standleyi* obtidos via SFE utilizando 45 °C. Pico 1; ácido palmítico. Pico 2; ácido esteárico. Pico 3; ácido linoleico. Pico 4; ácido oleico.

Outro composto presente no óleo de *M. standleyi*, foi o ácido esteárico, com uma baixa concentração (4,67%). Sendo que, a composição obtida neste trabalho foi semelhante à relatada por Marija et al. (2016) para folhas de amoreira branca (*Moringa oleífera* Lam) onde a concentração de ácido esteárico foi de 4,91%. Esses resultados mostraram que o óleo apresentou uma quantidade satisfatória de ácidos graxos essenciais, onde uma dieta rica nesses compostos ajuda a combater doenças como obesidade, cardiovasculares, câncer, osteoporose, artrite, diabetes, colesterol entre outros (YADAV et al., 2012; CHAUHAN et al., 2013; ZÁRATE et al., 2017). Entretanto, os constituintes químicos identificados no óleo de *M. standleyi* obtidos por HD encontram-se relacionados na Tabela 4, em ordem crescente de seus índices de retenção calculados neste trabalho. O cromatograma de íons-totais do óleo é apresentado na Figura 9.

Tabela 4. Constituintes químicos identificados no óleo das folhas de *M. standleyi* obtivo por Hidrodestilação e analisados por CG/EM/DIC.

Número do sinal cromatográfico	Constituintes	Tempo de Retenção (min)	Índice de Retenção	Concentração (%)
1	Ditiaciclo-pentano	6,450	955	12,41
2	Dissulfeto de dialila	10,667	1078	66,18
3	Naftaleno	15,075	1183	1,17
4	Ciclohexano	15,750	1198	5,83
5	Trissulfeto de propil propenila	20,292	1268	9,23
6	5-metil-1,2,3,4-tetraiano	23,342	1368	2,63
7	S8 cíclico	48,983	2038	1,24

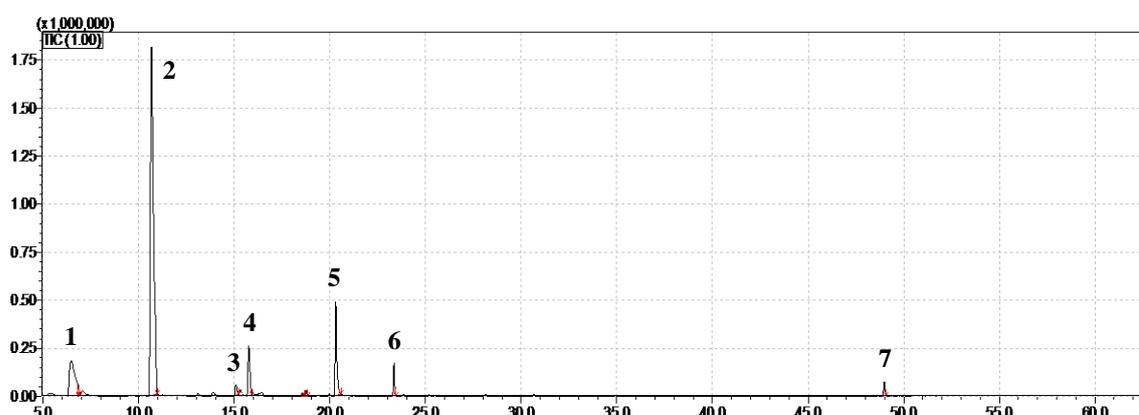


Figura 9. Cromatograma de íons-totais do óleo essencial das folhas de *M. standleyi* obtidos por Hidrodestilação.

No óleo de *M. standleyi* foram identificados compostos sulfurados, fenóis e álcoois. Observou-se que o constituinte majoritário é um polissulfeto (dissulfeto de dialila) que pertence aos compostos sulfurados e é um produto formado a partir da degradação da alicina, devido a ser um composto instável em altas temperaturas, especialmente à temperatura de ebulição da água, onde degradam-se em sulfetos, principalmente dissulfetos e trissulfetos de dialila (BASTOS et al., 2012). Outros compostos que apresentaram um teor considerável foram o trissulfeto de propil propenila e o ditiacíclopentano. Rose et al. (2005) em uma revisão sobre as espécies do gênero *Allium*, mostrou que a 150 °C ocorre a formação de vários sulfetos, entre os quais, trissulfeto, tetrassulfeto, e tiosulfeto de metil alila, são formados a partir do dissulfeto de dialila.

Há estudos com óleo de *M. standleyi* onde foram identificados alguns constituintes como ditiacíclopentano, dissulfeto de dialila, trissulfeto de propil propenila, 5-metil-1,2,3,4-tetraiano e S8 cíclico em diferentes concentrações. Neste contexto, Zoghbi et al. (2010) reportaram um valor para o dissulfeto de dialila de 60,2% sendo este valor similar ao obtido neste estudo, e com um índice de retenção de 1078 igual ao reportado na Tabela 4. Entretanto, Guilhon et al. (2012) encontraram uma concentração de dissulfeto de dialila menor (23,46%) e um índice de retenção de similar (1085) ao obtido neste estudo. Foi identificado a presença de ditiacíclopentano (17,31%), trissulfeto de propil propenila (0,95%), 5-metil-1,2,3,4-tetraiano (4,14%) e S8 cíclico (0,95%) com sus índices de retenção de 963, 1268, 1367 e 2041 respectivamente, sendo estes semelhantes aos reportados neste estudo. Zoghbi, Pereira e Oliveira (2012) no estudo da composição química dos óleos de *M. standleyi*, quantificaram a concentração de ditiacíclopentano (0,13%), dissulfeto de dialila (52,22%), trissulfeto de propil propenila (0,16%) e S8 cíclico (0,87%), onde esses valores são inferiores aos encontrados neste estudo (Tabela 4). Essas diferenças na composição química do óleo de *M. standleyi* podem ser atribuídas às condições de cultivo (cultivadas na sombra ou cultivadas no sol) ao local de coleta, preparo da matéria-prima (condições e métodos de secagem), método de extração e solvente utilizado (GUILHON et al., 2012; VILHENA-POTIGUARA et al., 2012; DVOŘÁKOVÁ et al., 2015).

Comparando os resultados da SFE com a extração por HD, em relação ao perfil químico usando a cromatografia gasosa é possível afirmar que, os óleos obtidos apresentam um perfil químico diferente em função do método de extração empregado, sendo que os óleos obtidos por SFE são caracterizados pela presença de ácidos graxos essenciais, entretanto, o óleo obtido por

HD é caracterizado por apresentar compostos sulfurados, fenóis e álcoois. As diferenças no perfil químico podem ser atribuídas ao solvente usado e principalmente ao método de extração (GARCIA-SALAS et al., 2010; DO et al., 2014).

5.5 Atividade Antimicrobiana do Óleo

Na Tabela 5 e Figura 10, estão apresentados os resultados da análise da atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo de *M. standleyi*, estes resultados indicam que o óleo apresenta ação antimicrobiana. Os resultados qualitativos mostraram que o óleo obtido via SFE apresentou o halo de inibição de 10 mm para *S. aureus* e 8 mm para *E. coli*. Entretanto, o resultado qualitativo do óleo obtido por HD apresentou um halo de inibição de 14,25 mm para *S. aureus*; 13,50 mm para *E. coli* e 25,30 mm para *C. albicans*, equivalentes aos halos obtidos com os controles positivos de Estreptomicina (15 mm), Vancomicina (13,70 mm) e Nistatina (28 mm). Quando comparadas as CIMs dos óleos obtidos por SFE e HD, observa-se que o óleo obtido por SFE apresentou ação antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli*, onde a CIM foi de >1000 µg/mL. Porém, o óleo não demonstrou ação antifúngica contra *C. albicans* nas concentrações avaliadas. Em relação ao óleo obtido por HD o mesmo apresentou melhor potencial de ação antimicrobiana frente a *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* com CIM de >1000; >1000; e 31,25 µg/mL respectivamente.

O gênero *Mansoa* DC representa um grupo de plantas que possui em sua composição compostos bioativos com atividade antimicrobiana e, analisando-se diferentes estudos realizados, nota-se que tanto extratos vegetais quanto óleos essenciais deste gênero apresentam ação antimicrobiana. Do mesmo modo, no trabalho realizado por Santos et al. (2012) sobre a avaliação do potencial antifúngico do óleo das folhas de *M. standleyi* obtido por HD, indicaram que o óleo apresentou atividade antifúngica com um halo de 22,0±2,1 mm, ou seja, equivalente ao halo obtido neste estudo (25,30 mm). Os autores consideraram que o óleo representa uma alternativa para uso no controle da candidíase, que é uma infecção causada por fungos do gênero *Candida*.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana do óleo de *M. standleyi* obtido pela extração de SFE e Hidrodestilação (HD) frente ao *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*.

	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	
	Halo (mm)	CIM μg/mL	Halo (mm)	CIM μg/mL	Halo (mm)	CIM μg/mL
Extração com Fluido Supercrítico (SFE)	10	>1000	8,00	>1000	-	-
Hidrodestilação (HD)	14,25	>1000	13,50	>1000	25,30	31,25
Nistatina 50 μg/mL	-	-	-	-	28,00	-
Estreptomicina 15 μg/mL	-	-	13,70	-	-	-
Vancomicina 10 μg/mL	15,00	-	-	-	-	-

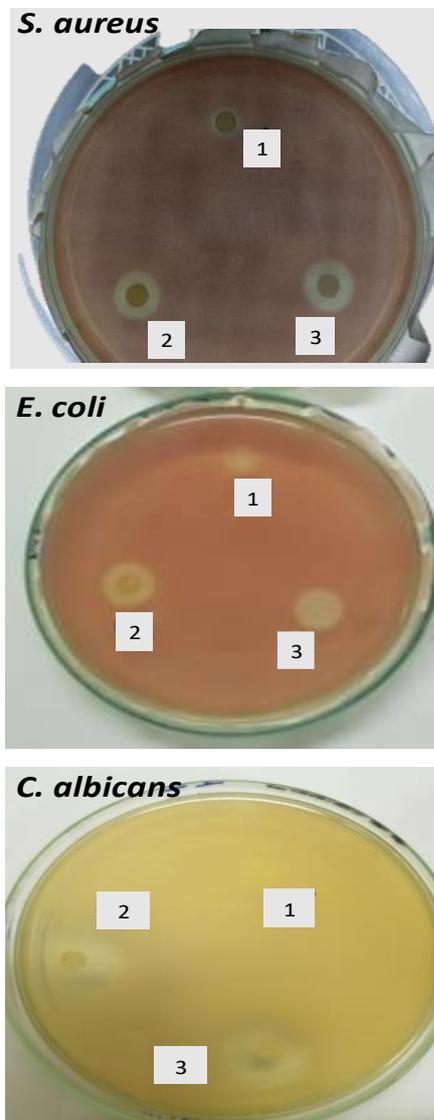


Figura 10. Atividade antimicrobiana do óleo de *M. standleyi* frente ao *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*, obtido por extração de SFE (1), Hidrodestilação (HD) (2), controle (3).

Além disso, o estudo realizado por Ross et al. (2001) mostrou que o alho (*Allium sativum*) com composição e efeitos semelhantes às plantas pertencentes aos gêneros *Mansoa* DC, tem um potencial efeito inibitório no crescimento de bactérias, como *Escherichia coli* onde sua CIM foi de 5,5 mg/mL. Neste estudo, a atividade antimicrobiana foi atribuída aos sulfetos presentes na planta, principalmente ao dissulfeto de dialila e trissulfeto de dialila. Por estas razões, concluiu-se que os sulfetos têm um potencial efeito antibacteriano considerável (ROSS et al., 2001). Além disso, o estudo realizado por Cordeiro et al. (2018) estudaram o efeito antimicrobiano do óleo de sementes de ucuúba (*Virola surinamensis*) obtido por SFE e encontraram resultados semelhantes aos do presente estudo, onde não foi observada zona de inibição contra *C. albicans*.

6 CONCLUSÕES

O maior rendimento global para o processo de SFE a partir de folha *M. standleyi*, foi obtido na condição operacional de 400 bar/35 °C ($\rho_{CO_2} = 972,26 \text{ kg/m}^3$). Nesta condição foi obtido, também, o óleo com um alto teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. Entretanto, na extração por HD o óleo obtido apresentou o menor rendimento, baixo teor de compostos fenólicos e uma baixa atividade antioxidante, quando comparado aos óleos obtidos por SFE. A triagem fitoquímica por CCDAE evidenciou a presença de terpenos, ácidos graxos, compostos fenólicos e flavonoides. Foi demonstrada a presença de substâncias com atividade antioxidante para todos os óleos obtidos com SFE, sendo que foi observado uma melhor identificação nos óleos extraídos nas condições de pressões mais altas.

Nos perfis de ácidos graxos do óleo de *M. standleyi* obtido por SFE foi observada a presença de ácido linoleico, palmítico, oleico e esteárico. No entanto, os constituintes químicos identificados no óleo obtidos por HD foram compostos sulfurados, fenóis e álcoois. As diferenças no perfil químico podem ser atribuídas ao solvente usado e principalmente ao método de extração.

A análise da atividade antimicrobiana *in vitro* demonstrou que o óleo obtido por SFE apresentou ação antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli*. Em relação ao óleo obtido por HD o mesmo apresentou ação antimicrobiana e antifúngica frente a *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. Por fim, óleo de *M. standleyi* representa uma alternativa para utilização futura no tratamento de doenças causadas por microrganismos.

7 LISTA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA

7.1 Artigos publicados

SALAZARA, M. A. R.; JONABETO V. C.; **URBINA, G. R. O.**; CUNHA, V. M. B.; SILVA, M. P.; BEZERRA, P. N.; PINHEIRO, W. B. S.; LEAL, W. G.; LOPES, A. S., CARVALHO JUNIOR, R. N. Chemical composition, antioxidant activity, neuroprotective and anti-inflammatory effects of cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) extracts obtained from supercritical extraction. The Journal of Supercritical Fluids. v. 138, p. 36-45, 2018. DOI: 10.1016/j.supflu.2018.03.022

7.2 Capítulos do Livro Publicados

SALAZAR, M. A. R; **URBINA, G. R. O.**; BEZERRA, P. N.; MARIA BORGES CUNHA, CUNHA, V. M. B.; SILVA; PIRES, F. C. S.; SILVA, A. P. S.; SOUSA, S. H. B.; CARVALHO-JUNIOR, R. N. Antioxidant and Biological Activity of *Cissus sicyoides* and *Rosmarinus officinalis* Extracts. In. Emad Shalaby. (Ed.). Antioxidants. IntechOpen, ISBN 978-1-78923-920-1, 2019.

DE OLIVEIRA, M. S.; ALMEIDA, M. M.; SALAZAR, M. A. R.; PIRES, F. C. S.; BEZERRA, F. W. F.; CUNHA, V. M. B.; CORDEIRO, R. M.; **URBINA, G. R. O.**; DA SILVA, M. P.; SILVA, A. P. S.; PINTO, R. H. H.; CARVALHO-JUNIOR, R. N. Potential of medicinal use of essential oils from aromatic plants. In. Hany El-Shemy (Ed.). Essential Oils. IntechOpen. ISBN 978-953-51-5874-5, 2018.

SILVA, A. P. S.; COSTA, W. A.; SALAZAR, M. A. R; BEZERRA, P. N; PIRES, F. C. S.; FERREIRA, M. C. R.; MENEZES, E. G. O; **URBINA, G. R. O.**; BARBOSA, J. R.; CARVALHO-JUNIOR, R. N. Commercial and Therapeutic Potential of Plant-Based Fatty Acids. In. Viduranga Waisundara (Ed.). Biochemistry and Health Benefits of Fatty Acids. IntechOpen. ISBN: 978-1-78984-873-1, 2018.

PIRES, F. C. S.; ALMEIDA, M. M.; SILVA, A. P. S.; SALAZAR, M. A. R.; **URBINA, G. R. O.**; SILVA, P. S.; SILVA, S. G.; BEZERRA, P. N.; MARQUES-DA-SILVA, S. H.; CARVALHO JUNIOR, R. N. Therapeutic potential of extracts from Amazonian plants with antimicrobial activity. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.). Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs. Badajoz: Formatex Research Center, 2017, v. 6, p. 504-515.

7.3 Resumos Expandidos Publicado em Anais de Evento

URBINA, G. R. O.; SALAZAR, M. A. R.; SILVA, A. P. S.; CUNHA, V. M. B.; DA SILVA, M. P.; CARVALHO-JUNIOR, R. N. Determinação da composição química do óleo essencial das folhas de cipó-de-alho (*Mansoa standleyi*) obtido por Hidrodestilação. **XXVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA)**, 2018.

SALAZAR, M. A. R.; **URBINA, G. R. O.**; SILVA, A. P. S.; CUNHA, V. M. B.; DA SILVA, M. P.; CARVALHO-JUNIOR, R. N. Obtenção de fração enriquecida em flavonoides do extrato etanólico do *Cissus sicyoides* L. A partir de extração em fase sólida e identificação por cromatografia líquida de alta eficiência. **XXVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA)**, 2018.

SILVA, A. P. S.; MENEZES, E. G. O.; SALAZAR, M. A. R.; **URBINA, G. R. O.**; ARAÚJO, M. E.; CARVALHO JUNIOR, R. N. Predição da solubilidade de constituintes do óleo de jambu em CO₂ supercrítico, utilizando contribuição de grupos e equações de estado. **XXVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA)**, 2018.

SILVA, A. P. S.; DE SOUZA, S. H. B.; SALAZAR, M. A. R.; **URBINA, G. R. O.**; PIRES, F. C. S.; CARVALHO JUNIOR, R. N. Influência da sazonalidade nos teores de compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de flores de duas cultivares de jambu (*Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen). **XXVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA)**, 2018.

SALAZAR, M. A. R.; **URBINA, G. R. O.**; CUNHA, V. M. B.; BEZZERA, V. M. S.; CARVALHO JUNIOR, R. N. Identificação e quantificação de compostos fenólicos dos extratos etanólico e hexânico de *Cissus sicyoides* L. **XX Encontro Nacional e VI Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos-ENAAL, 2017. (Premiado com o diploma de honra ao mérito).**

SALAZAR, M. A. R.; **URBINA, G. R. O.**; SANTOS, D. C. S.; BARROS, F. S.; CARVALHO JUNIOR, R. N. Determinação do teor de umidade de cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) através do método de destilação de Jacobs e métodos convencionais. **15º Encontro de Profissionais de Química da Amazônia - 15º EPQA, 2017.**

URBINA, G. R. O.; SALAZAR, M. A. R.; CUNHA, V. M. B.; BEZZERA, V. M. S.; CARVALHO JUNIOR, R. N. Caracterização de folhas de cipó-de-alho (*Mansoa standleyi*)

quanto ao seu teor de umidade e densidade para a extração com CO₂ supercrítico. **XX Encontro Nacional e VI Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos - ENAAL, 2017.**

7.4 Resumos Publicado em Anais de Evento

SALAZAR, M. A. R.; URBINA, G. R. O.; CARVALHO JUNIOR, R. N. Otimização da extração com fluido supercrítico a partir de extratos de cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) por meio do delineamento de experimentos de Box-Behnken. **III Simpósio de Alimentos e Nutrição - III SIAN, 2017.**

8 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Atividades	1º 2017	2º 2017	1º 2018	2º 2018
Revisão da literatura	✓	✓	✓	✓
Coleta da matéria-prima (<i>M. standleyi</i>)	✓			
Preparo da matéria-prima	✓	✓		
Apresentação da Dissertação II		✓		
Extração			✓	
Realização das análises			✓	✓
Análise dos resultados			✓	
Apresentação da Dissertação III			✓	
Discussão dos resultados			✓	✓
Elaboração de artigos				✓
Apresentação da Dissertação IV				✓
Divulgação dos resultados e submissão de artigo				X

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAMEED, E. et al. Chemical composition of hydrodistillation and solvent free microwave extraction of essential oils from *Mentha piperita* L. growing in taif, kingdom of Saudi Arabia, and their anticancer and antimicrobial activity. *Oriental journal of chemistry*, v. 34, p. 222-233, 2018.

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4th ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.

AL BULUSHIF, K. et al. Optimisation and economic evaluation of the supercritical carbon dioxide extraction of waxes from waste date palm (*Phoenix dactylifera*) leaves. *Journal of Cleaner Production*, v. 186, p. 988-996, 2018.

AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERS (ASAE). Method of determining and expressing fineness of feed materials by sieving. [s.l.] American Society of Agricultural Engineers Standard, 1993.

APPLIED SEPARATIONS. Applied separations Spe-ed SFE operations manual. Hamilton Street: Allentown, 2004. Disponível em: <http://www.appliedseparations.com/>. Acesso em: 24 out, 2017.

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, v. 117, p. 426-436, 2013.

BARROSO, M.S.T. et al. Supercritical fluid extraction of volatile and non-volatile compounds from *Schinus molle* L. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 28, p. 305-312, 2011.

BASTOS, G.N.T. et al. Óleo essencial de *Mansoa standleyi*: utilizações etnofarmacológicas. In: SOUZA-FILHO, A.P.S.; NASCIMENTO, J.L.M. Cipó-de-alho: aspectos botânicos, químicos e moléculas bioativas. 1ed. Brasília: Embrapa, 2012. 157-165 p.

BATISTA, C.C.R. et al. Supercritical CO₂ extraction of açai (*Euterpe oleracea*) berry oil: Global yield, fatty acids, allelopathic activities, and determination of phenolic and anthocyanins total compounds in the residual pulp. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 107, p. 364-69, 2016.

BEZERRA, R.C.F. et al. Seasonal effect in essential oil composition and antioxidant activity of *Plectranthus amboinicus* leaves. *Bioscience Journal*, v. 33, p. 1608-1616, 2017.

BJÖRKLUND, E. et al. Illustration of important mechanisms controlling mass transfer in supercritical fluid extraction. *Analitica Chimica Acta*, v. 368, p.117-128, 1998.

BORGES, G.S.C. et al. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidante capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Research International*, v. 44, p. 2128-2133, 2011.

BORGNACKE, C.; SONNTAG, R.E. Fundamentos da termodinâmica. 7. ed. São Paulo: Blucher, 2009. 461 p.

- BOTELHO, J.R.S. et al. Black sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds extracts by CO₂ supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, total fatty acids, phytosterols and neuroprotective effects. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 93, p. 49-55, 2014.
- BOTELHO, J.R.S. et al. Copaíba (*Copaifera* sp.) leaf extracts obtained by CO₂ supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, antioxidant activity and neuroprotective effects. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 98, p. 167-71, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidante activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BROWN, L.S.; HOLME, T.A. Química geral aplicada à engenharia. São Paulo: CengEAG Learning, 2009. 651 p.
- BRUNNER, G. Gas extraction. An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes. Darmstadt; New York: Steinkopff; Springer, 1994.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, v. 67, p. 21-33, 2005.
- CARRASCO, H. et al. Antifungal activity of eugenol analogues. Influence of different substituents and studies on mechanism of action. *Molecules*, v. 7, p. 1002-24, 2012.
- CARVALHO-JUNIOR, R.N. et al. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 35, p. 197-204, 2005.
- ÇENGEL, Y.A.; BOLES, M.A. Termodinâmica. 5. ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2006. 740 p.
- CHANDA, S.; BARAVALIA, Y. Screening of some plant extracts against some skin diseases caused by oxidative stress and microorganisms. *Journal of Biotechnology*, v. 9, No. 21, p. 3210-3217, 2010.
- CHANDRA-KUNTAL, K.; SINGH, S.V. Diallyl trisulfide inhibits activation of signal transducer and activator of transcription 3 in prostate cancer cells in culture and *in vivo*. *Cancer Prevention Research*, 2010.
- CHAUHAN, B. et al. Current concepts and prospects of herbal nutraceutical: A review. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, v. 4, p. 4-8, 2013.
- CONDE-HERNÁNDEZ, L.A.; ESPINOSA-VICTORIA, J.R.; GUERRERO-BELTRÁN, J.A. Supercritical extraction of essential oils of *Piper auritum* and *Porophyllum*. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 127, p. 97-102, 2017.
- CORDEIRO, R.M. et al. Supercritical CO₂ extraction of ucuúba (*Virola surinamensis*) seed oil: global yield, kinetic data, fatty acid profile, and antimicrobial activities. *Chemical Engineering Communications*, v. 206, p. 86-97, 2018.
- CORNELIO-SANTIAGO, H.P.; GONÇALVES, C.B.; DE OLIVEIRA, N.A.; DE OLIVEIRA, A.L. Supercritical CO₂ extraction of oil from green coffee beans: solubility, triacylglycerol

composition, thermophysical properties and thermodynamic modelling. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 128, p. 386-394, 2017.

COSTA, A.R.M. et al. *Copaifera langsdorffii* supercritical fluid extraction: chemical and functional characterization by LC/MS and *in vitro* assays. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 100, p. 86-96, 2015.

DA SILVA, A.P. et al. Tyrosinase inhibitory activity, molecular docking studies and antioxidant potential of chemotypes of *Lippia organoides* (Verbenaceae) essential oils. *Bioscience Journal*, v. 12, 2017.

DE AZEVEDO, M.M.L. et al. Lupane triterpenoids, antioxidant potential and antimicrobial activity of *Myrciaria floribunda* (H.West ex Willd.) O. Berg. *Natural Product Research*, v. 13, 2017.

DE MELO, M.M.R.; SILVESTRE, A.J.D.; SILVA, C.M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 92, p. 115-176, 2014.

DE SOUSA, S.H.B. et al. Phenolic compounds are highly correlated to the antioxidant capacity of genotypes of *Oenocarpus distichus* mart fruits. *Food Research International*, v. 108, p. 405-412, 2018.

DE SOUZA, A.R.C. et al. Extraction of *Arctium Lappa* leaves using supercritical CO₂+ethanol: Kinetics, chemical composition, and bioactivity assessments. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 140, p. 137-146, 2018.

DEL VALLE, J.M. et al. Extraction of boldo (*Peumus boldus* M.) leaves with supercritical CO₂ and hot pressurized water. *Food Research International*, v. 38, p. 203-213, 2005.

DEUTSCH, D.; ADLER, S.; TELLER, J.; SAVIR H. Endogenous candidal endophthalmitis. *Annals of Ophthalmology*, v. 21, p. 260-65, 1989.

DIAS, A.M.A. et al. Temperature and density effects of the SCCO₂ extraction of spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 121, p. 32-40, 2017.

DIAS, A.M.A. et al. Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 74, p. 34-45, 2013.

DO, Q.D. et al. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*, *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 22, p. 296-302, 2014.

DVOŘÁKOVÁ, M. et al. Garlic sulfur compounds suppress cancerogenesis and oxidative stress: A Review. *Animal Sciences. Scientia Agricultura e Bohemica*, v. 46, p. 65-72, 2015.

FERREIRA, S.R.S.; CARDOZO FILHO, L.; CABRAL, V. F. Equilíbrio de fases para sistemas multicomponentes: usando equações de estado. In: MEIRELES, M.A.A.; PEREIRA, C.G. *Fundamentos de engenharia de alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2013. v. 6, cap.7, 217-259 p.

- FISCHER, E.; THEISEN, I.; LOHMANN, L.G. Bignoniaceae. In: Kadereit, J.W. (ed.) The families and genera of vascular plants: Bignoniaceae. Heidelberg: Springer-Verlag, 2004. v. 7, 9-38 p.
- GARCIA-SALAS, P. et al. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, v. 15, p. 8813-8826, 2010.
- GENTRY A.H. BIGNONIACEAE. Part I. Tribes crescentieae and tourrentieae. *Flora Neotropica*, v. 25, p. 1-13, 1980.
- GENTRY, A.H. Floristic similarities and differences between Southern Central America and upper and Central Amazonia. In: Gentry, A.H. Four neotropical rain forests. London: Yale University Press, 1990. 141-60 p.
- GEORGÉ, S. et al. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1370-1373, 2005.
- GOODSHIP, V.; OGUR, E.O. Polymer processing with supercritical fluids. *Rapra Review Reports*, v. 15, No. 8. 2004.
- GOYENECHE, R. et al. Supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from radish leaves: yield, antioxidant capacity and cytotoxicity. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 135, p. 78-83, 2018.
- GROSSO, C. et al. Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds-review. *Marine Drugs*, v. 13, p. 3182-3230, 2015.
- GUILHON, G.M.S.P. et al. A influência do tipo de secagem na distribuição de compostos organossulfurados em Cipó-de-alho. In: Souza-Filho, A.P.S.; Nascimento, J.L.M. Cipó-d'alho: aspectos botânicos, químicos e moléculas bioativas. Brasília: Embrapa, 2012. 157-65 p.
- GUIMARÃES-SANTOS, A. et al. Copaiba oil-resin treatment is neuroprotective and reduces neutrophil recruitment and microglia activation after motor cortex excitotoxic injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Online)*, p. 1-9, 2012.
- HERRERO, M. et al. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 43, p. 67-83, 2013.
- HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Sub - and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae a review. *Food Chemistry*, v. 98, p. 136-148, 2006.
- HORITA, C.N. et al. The antimicrobial, antioxidant and sensory properties of garlic and its derivatives in Brazilian low-sodium frankfurters along shelf-life. *Journal Food Research International*, v. 84, p. 1-8, 2016.
- JACOBS, B.M. The chemical analysis of foods and food products. 3. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1973.
- JORK, H.; FUNK, W.; FISCHER, W.; WIMMER, H. Thin-layer chromatography, New York: VCH, 1990.

- JUSTO, O.R. et al. Evaluation of in vitro anti-inflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO₂ extraction on macrophage and tumor cell line: the influence of vehicle type. *Complementary and Alternative Medicine*, v. 15, 2015.
- KALRA, N.; ARORA, A.; SHUKLA, Y. Involvement of multiple signaling pathways in diallyl sulfide mediated apoptosis in mouse skin tumors. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 7, p. 556-562, 2006.
- KARABIN et al. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances*, v. 33, p. 734-750, 2015.
- KAZAN et al. Supercritical fluid extraction of *Prunus persica* leaves and utilization possibilities as a source of phenolic compounds. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 92, p. 55-59. 2014.
- KEDARE, S.B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, v. 48, p. 412422, -2011.
- LEE et al. Supercritical fluid extracts of *Moringa oleifera* and their unsaturated fatty acid components inhibit biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, v. 80, p. 74-82, 2017.
- MA, J. et al. Composition, antimicrobial and antioxidant activity of supercritical fluid extract of *Elsholtzia ciliata*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v. 21, p. 556-562, 2018.
- MACÍAS-SÁNCHEZ, M.D. et al. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Synechococcus* sp. *Journal of Supercritical Fluids*. v. 39, p. 323-329, 2007.
- MARIJA, R. et al. Biological activities and chemical composition of *Morus* leaves extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 117, p. 50-58, 2016.
- MAZZARRINO, G. et al. *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control*, v. 50, p. 794-803, 2015.
- MEIRELES, M.A.A. Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications. New York: CRC Press, 2008. cap. 6, p. 269-402 p.
- MEIRELES, M.A.A; PEREIRA, C.G.A. Origem da termodinâmica clássica e seus fundamentos. In: *Fundamentos de Engenharia de alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2013. v. 6, cap.1, 3-8 p.
- MORAES, M.L. Tradição e modernidade no uso de essências. *Informativo do Museu Paraense Emílio Goeldi, Destaque Amazônia*, v. 24, p.1-8, 2008.
- MOURA, L.S. et al. Supercritical fluid extraction from fennel (*Foeniculum vulgare*): global yield, composition and kinetic data. *The Journal of Supercritical Fluids*. v. 35, p. 212-19, 2005.
- NASIM, S.A. et al. Sulphur treatment alters the therapeutic potency of alliin obtained from garlic leaf extract. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, p. 888-892, 2009.

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. NCCLS document M7-A7. Approved Standard— Seventh Edition, which describes standard broth dilution (macrodilution and microdilution) and agar dilution techniques for measuring the in vitro susceptibility of bacteria to antimicrobial agents, 2006.

OK BAN, J. et al. inhibition of cell growth and induction of apoptosis via inactivation of NF- κ B by a sulfurcompound isolated from garlic in human colon cancer cells. Journal of Pharmacological Sciences, v. 104, p. 374-83, 2007.

OLIVEIRA, M.S. et al. Chemical composition and phytotoxic activity of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil obtained with supercritical CO₂. The Journal of Supercritical Fluids, v. 118, p.185-93, 2016.

OLIVEIRA, J.; ZOGHBI, M.G.B. Espécies de bignoniaceae conhecidas por Cipó-de-alho: ocorrência e usos de *Mansoa standleyi* (Steyerm.) A. H. Gentry no Nordeste Paraense. In: Souza-Filho, A.P.S.; Nascimento, J.L.M. Cipó-de-alho: aspectos botânicos, químicos e moléculas bioativas. Brasília: Embrapa, 2012. 19-33 p.

PEIXOTO, J.V. et al. Candidiasis – a literature review. Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research, v. 8, p. 75-82, 2014.

PEREIRA, J.R. et al. Evaluation of cytogenotoxicity, antioxidant and hypoglycemiant activities of isolate compounds from *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoniaceae). Annals of the Brazilian Academy of Sciences, v. 89, p. 317-331, 2017.

PEREIRA, C.G. et al. In: TADINI, C.C.; TELIS, V.R.N.; MEIRELES, A.J.A.; PESSOA FILHO, P. A. Operações unitárias na indústria de alimentos. Livros técnicos e científicos (LTC), Rio de Janeiro, v. 1, cap.18, p. 168-208, 2016.

PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. Food Bioprocess Technology, v. 3, p. 340-372, 2010.

POURFARZI, F. et al. The role of diet and other environmental factors in the causation of gastric cancer in Iran—A population based study. International journal of Cancer, v. 125, p. 1953-1960, 2009.

RADOJKOVIC, M. et al. Biological activities and chemical composition of *Morus* leaves extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. Journal of Supercritical Fluids, v. 117, p. 50-58, 2016.

RAMADAN, A. et al. Evaluation of the safety and antioxidant activities of *Crocus sativus* and *Propolis* ethanolic extracts. Journal of Saudi Chemical Society, v. 16, p. 13-21, 2012.

ROSA, P.T.V. et al. Supercritical and pressurized fluid extraction applied to the food industry. In: MEIRELES, M.A.A. Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications, New York: CRC Press, 2009. cap. 6, 269-402 p.

ROSE, P. et al. Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. Natural Product Reports, v. 22, p. 351-368, 2005.

- ROSS, Z.M. et al. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 475-480, 2001.
- RUFINO, M.S.M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, v. 121, p. 996-1002, 2010.
- SALAZAR, M.A.R. et al. Chemical composition, antioxidant activity, neuroprotective and anti-inflammatory effects of cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) extracts obtained from supercritical extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 138, p. 36-45, 2018.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 76, p. 270-276, 1998.
- SANTOS, A.S. et al. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Mansoa standleyi* (Steud.) A. H. Gentry, do Acará, Pará, Brasil. In: Souza-Filho, A.P.S.; Nascimento, J.L.M. Cipó-de-alho: aspectos botânicos, químicos e moléculas bioativas. Brasília: Embrapa, 2012. 157-65 p.
- SILVA, L.V. et al. Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. *Food Research International*, v. 38, p.1087-1096, 2005.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, v. 299, p.152-178, 1999.
- SMITH, J.M.; VAN NESS, H.C.; ABBOTT, M.M. Introdução à termodinâmica da engenharia química. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 626, 2007.
- SOUZA FILHO, A.P.S. et al. Comparative analyses of the allelopathic potential of the hydroalcoholic extract and essential oil of “cipó-de-alho” (Bignoniaceae) leaves. *Planta Daninha, Viçosa-MG*, v. 27, n. 4, p. 647-653, 2009.
- SRIVASTAVA, M.M. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC), Munchen: Springer, 2011.
- STEIN, S.E. et al. The NIST mass spectral search program for the nist/epa/nih mass spectra library. Standard Reference Data Program of the National Institute of Standards and Technology. Gaithers-burg, MD, US., 2002. Disponível em: <https://bit.ly/2MeFywf>.
- TEDESCHI, P. et al. Fungitoxicity of lyophilized and spray-dried garlic extracts. Part B. *Journal of Environmental Science and Health*, v.42, p. 795-99, 2007.
- VANKAR, P.S. Essential oils and fragrances from natural sources. *Resonance*. v. 9, p. 30-41, 2004.
- VEGGI, P.C.; CAVALCANTI, R.N.; MEIRELES, M.A.A. Modifier effects on supercritical fluid extraction (SFE) of some brazilian plants: antioxidant activity and economical evaluation. *Procedia Food Science*, v. 1, p. 1717-1724, 2011.

VILHEMA-POTIGUARA, R.C. et al. Estruturas secretoras em Cipó-de-alho (*Mansoa standleyi* Steyerm.) A. H. Gentry, (Bignoniaceae): ocorrência e morfologia. *Acta Amazônica*, v. 42, No. 3, p. 321-328, 2012.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant drugs analysis: thin-layer chromatography atlas*, 2. ed., Munchen: Springer, 2001.

YADAV, V. et al. An overview on nutraceuticals as pharmacological agents. *Advances in Bioresearch*, v. 3, p. 113-128, 2012.

YUN, H. et al. Potential therapeutic effects of functionally active compounds isolated from garlic. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 142, p. 183–195, 2014.

ZÁRATE, R. et al. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and Translational Medicine*, v. 6, 2017.

ZOGHBI, M.G.B. et al. Volatile sulfides of the amazonian garlic bush. *Journal Agricultural Food Chemical*, v. 32, p.1009-10, 1984.

ZOGHBI, M.G.B. et al. Volatiles from *Mansoa standleyi* (Steyerm.) A. H. Gentry. *Journal of Essential Oil Research*, v. 22, p. 247-49, 2010.

ZOGHBI, M.G.B.; OLIVEIRA, J.; GUILHON, G. M. S. P. The genus *Mansoa* (Bignoniaceae): a source of organosulfur compounds. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 19, No. 3 p. 795-804, 2009.

ZOGHBI, M.G.B.; PEREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J. Composição química dos óleos essenciais de cipó-de-alho em função do local de coleta e das condições de secagem e extração. In: SOUZA-FILHO, A.P.S.; NASCIMENTO, J.L.M. *Cipó-de-alho: aspectos botânicos, químicos e moléculas bioativas*. 1ed. Brasília: Embrapa, 2012. 157-165 p.

ZOUGAGH, M.; VALCARCEL, M.; RÍOS, A. Supercritical fluid extraction: vs critical review of its analytical usefulness. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, No. 5, p. 1-7, 2004.