



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

MARIELBA DE LOS ÁNGELES RODRÍGUEZ SALAZAR

**Avaliação da Composição Química, Efeito Neuroprotetor e
Anti-inflamatório de Extratos de Cipó-pucá
(*Cissus sicyoides* L.) Obtidos Via Extração Supercrítica.**

BELÉM

2017



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

MARIELBA DE LOS ÁNGELES RODRÍGUEZ SALAZAR

**Avaliação da Composição Química, Efeito Neuroprotetor e
Anti-inflamatório de Extratos de Cipó-pucá
(*Cissus sicyoides* L.) Obtidos Via Extração Supercrítica.**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADOR:

Prof Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior.

BELÉM

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Salazar, Marielba de los Angeles Rodriguez, 1989

Avaliação da composição química, efeito neuroprotetor e anti-inflamatório de extratos de cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) obtidos via extração supercrítica /Marielba de los Angeles Rodríguez Salazar.- 2017.

Orientador: Raul Nunes de Carvalho Junior

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará. Instituto de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belém, 2017

1. Plantas medicinais- Composição 2. Extração com fluidos supercrítico 3. Superfície de resposta- Metodologia 4. Compostos bioativos das plantas I. Título

CDD 22.ed.581.634

MARIELBA DE LOS ÁNGELES RODRÍGUEZ SALAZAR

Avaliação da Composição Química, Efeito Neuroprotetor e Anti-inflamatório de Extratos de Cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) Obtidos Via Extração Supercrítica.

Data da Avaliação: ____/____/____

Nota/ Conceito: _____

BANCA EXAMINADORA:

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

Prof Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues
(PPGCTA/ITEC/UFPA-Membro Interno)

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

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

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Virgem do Valle, por ouvir as minhas orações todas as noites.

Aos meus pais Elbinellys Salazar e Eulalio Rafael Rodríguez, aos meus irmãos e minha família, por apoiar-me, proteger-me, guiar-me e estar presente em cada momento da minha vida.

A meu noivo e companheiro Glides Rafael Olivo, por seu amor incondicional, paciência, apoio e por sempre estar ao meu lado quando precisei.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, por aceitar o pedido de transferência a seu programa e pela oportunidade que ofereceu de concluir meu curso de mestrado na área de alimentos.

Ao Programa de Alianças para Educação e a Capacitação (PAEC), no âmbito do Acordo de Cooperação dos Estados Americanos (OEA) e o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB), pela concessão da bolsa de estudos.

A Prof.^a Dr.^a Maria Iracilda da Cunha Sampaio, coordenadora do PAEC na UFPA, por seu conselho, motivação e incentivo. Sua dedicação e amor pelo que faz permite que ganhe o amor e o respeito de todos seus alunos de PAEC. Muito obrigada pelo carinho!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior, por aceitar-me em seu grupo de pesquisa, sua orientação durante o curso deste trabalho foi primordial para a sua conclusão.

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

Aos Professores Dr. Renan Chisté, Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza e Dr.^a Alessandra, assim como aos pesquisadores MSc. Wandson de Souza Pinheiro e Jonabeto Vasconcelos Costa pelas contribuições e por proporcionar os meios necessários para o desenvolvimento de minha pesquisa.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Extração (LABEX) da Universidade Federal do Pará, especialmente a Vânia Cunha, Marcilene Paiva e Marcos Almeida, pela amizade, ajuda, apoio, minha escrita e fala do português melhor graças a vocês!

A minhas amigas Yorgana Carolina Yajure e Valentina de los Ángeles Castillo, pela amizade, carinho e palavras de alento.

“Un buen método de enseñanza no tanto se propone comunicar mucha ciencia al estudiante, cuanto dar a su entendimiento poderoso impulso y rumbo cierto.”

Andrés Bello

RESUMO

Cissus sicyoides L. pertencente à família Vitaceae, é uma planta tradicionalmente utilizada no tratamento contra a diabetes, acidente vascular cerebral (AVC) e abscessos. A sua composição química destaca-se pela presença de compostos bioativos com alta atividade antioxidante, como os compostos fenólicos. A extração com fluido supercrítico (SFE) é uma tecnologia utilizada para extração desses compostos, por apresenta-se como um método seguro e ecologicamente correto. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química, o efeito neuroprotetor e anti-inflamatório de extratos de cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) obtidos via extração supercrítica, utilizando CO₂ e CO₂+cossolvente (etanol), comparado à extração convencional (Soxhlet). A matéria-prima foi constituída de folha e caule de *C. sicyoides*, os ensaios da SFE foram realizados com base em uma metodologia de superfície de resposta com um planejamento estatístico de Box-Behnken, para três variáveis independentes: pressão (200 a 400 bar), temperatura (40 a 60 °C) e % de cossolvente (etanol) (0 a 10 %), com as variáveis dependentes: rendimento global de extração, compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante. Os resultados demonstraram que o maior rendimento global para a SFE (3,21 %) foi obtido na condição operacional de 400 bar, 50 °C e 10 % de cossolvente (etanol), onde foi observado um extrato com um alto teor de compostos fenólicos totais (65,20 mg EAG/g de extrato). A condição ótima do processo correspondeu a uma pressão de 400 bar, temperatura de 40 °C e 10 % de cossolvente. A pressão e % de cossolvente (etanol) foram os fatores que mais influenciaram na SFE. Em termos de atividade antioxidante, em ambos os métodos (SFE e Soxhlet), foram obtidos extratos com baixos valores de EC₅₀, relacionado a uma alta atividade antioxidante; o extrato etanólico obtido por Soxhlet apresentou 325,67 g de extrato/g de DPPH e o extrato obtido com SFE-CO₂+cossolvente (etanol) apresentou de 379,50 g de extrato/g de DPPH. Na análise por CCDAE, é comprovada a presença de terpenos, compostos fenólicos, flavonoides e a atividade antioxidante nos extratos. O ensaio *in vivo* preliminar demonstrou que o extrato obtido por SFE tem efeito neuroprotetor e anti-inflamatório, estes efeitos são associados à presença de compostos fenólicos e à alta atividade antioxidante que possui o extrato. Por fim, a obtenção de extrato de *C. sicyoides* via SFE empregando quantidades baixas de cossolventes (5 e 10 %), representa uma grande oportunidade para a obtenção de compostos bioativos polares, sem os inconvenientes associados aos processos de extração convencionais.

Palavras-chave: *Cissus sicyoides* L.; Extração com fluido supercrítico; Metodologia de superfície de resposta; Compostos fenólicos; Neuroproteção.

ABSTRACT

Cissus sicyoides L. belongs to the Vitaceae family. It is a plant traditionally used in the treatment against diabetes, stroke and abscesses. Its chemical composition is distinguished by the presence of bioactive compounds with high antioxidant activity, such as phenolic compounds. Supercritical fluid extraction (SFE) is a technology used particularly for extraction of compounds like these, and it is presented as a safe and ecologically correct method. Therefore, the objective of this work was to evaluate the chemical composition, and the neuroprotective and anti-inflammatory effects of cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) extracts obtained by supercritical extraction, using CO₂ and CO₂+co-solvent (ethanol), compared to conventional extraction (Soxhlet). The raw material consisted of leaves and stems of *C. sicyoides*. SFE assays were performed based on a response surface methodology with a Box-Behnken statistical design, for three independent variables: pressure (200 to 400 bar), temperature (40 to 60 °C) and percentage of co-solvent (0 to 10 %), and four dependent variables: total extraction yield, total phenolic compounds, total flavonoids and antioxidant activity. The results showed that the highest overall yield for SFE (3.21 %) was obtained in the operating condition of 400 bar, 50 °C and 10 % of co-solvent, which also presented an extract with a high content of total phenolic compounds (65.20 mg GAE/g extract). The optimal process condition corresponded to a pressure of 400 bar, temperature of 40 °C and 10 % of co-solvent. The pressure and percentage of co-solvent were the factors that most influenced SFE. Regarding the antioxidant activity, extracts with low EC₅₀ values were obtained in both methods (SFE and Soxhlet), and are related to a high antioxidant activity; the ethanol extract obtained by Soxhlet and SFE-CO₂+co-solvent presented 325.67 and 379.50 g of extract/g of DPPH, respectively. In the HPTLC analysis, the presence of terpenes, phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in the extracts is proven. The preliminary *in vivo* test with the extract obtained by SFE showed that the extract had neuroprotective and anti-inflammatory effects. These effects are associated with the presence of phenolic compounds and the high antioxidant activity of the extract. Finally, extracting *C. sicyoides* via SFE using low amounts of co-solvent (5 and 10 %) represents a great opportunity to obtain polar bioactive compounds without the drawbacks associated with the conventional extraction processes.

Keywords: *Cissus sicyoides* L.; Supercritical fluid extraction; Response surface methodology; Phenolic compounds; Neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Descrição de partes de <i>C. sicyoides</i>	17
Figura 2. Estrutura química dos principais compostos encontrados na <i>C. sicyoides</i>	19
Figura 3. Diagrama de fases PT de uma substância pura.	21
Figura 4. Diagrama de fases PV de uma substância pura.....	22
Figura 5. Fluxograma das atividades realizadas no presente trabalho.	28
Figura 6. Folha e caule de <i>C. sicyoides</i> utilizados neste trabalho.	29
Figura 7. Esquema do aparelho utilizado para a determinação de umidade em sólidos contendo substâncias voláteis, segundo o método de Jacobs.	30
Figura 8. <i>Spe-ed</i> TM SFE da Applied Separations, modelo 7071.....	32
Figura 9. Diagrama esquemático de <i>Spe-ed</i> TM SFE.	33
Figura 10. Ilustração do leito extração.	34
Figura 11. Esquema do aparato experimental utilizado na extração convencional por Soxhlet.	37
Figura 12. Disposição dos extratos de <i>C. sicyoides</i> na placa para o análise por CCDAE.	38
Figura 13. Imagens dos extratos <i>C. sicyoides</i> : (A) SFE-CO ₂ ; (B) SFE-CO ₂ +cossolvente (etanol); (C) extrato hexânicos; (D) extrato etanólico.....	40
Figura 14. Imagens obtidas por MEV da <i>C. sicyoides</i> : (A) folha e (B) caule (x 25).	45
Figura 15. Imagens obtidas por MEV da <i>C. sicyoides</i> : (A) folha e (B) caule (x 40).	45
Figura 16. Imagens obtidas por MEV da <i>C. sicyoides</i> : (A) folha e (B) caule (x 80).	46
Figura 17. Superfície de resposta para rendimento global de extração em função da pressão e % de cossolvente.	49
Figura 18. Superfície de resposta para rendimento global de extração em função da pressão e temperatura.	49
Figura 19. Superfície de resposta para rendimento global de extração em função da % de cossolvente e temperatura.....	50
Figura 20. Teste de seletividade dos extratos de <i>C. sicyoides</i> : placas eluídas com (A) tolueno; (B) clorofórmio; (C) diclorometano; (D) acetato de etila; (E) acetona; (F) etanol; (G) metanol; visualizadas na luz visível.	52
Figura 21. Teste de seletividade dos extratos de <i>C. sicyoides</i> : placas eluídas com (A) tolueno; (B) clorofórmio; (C) diclorometano; (D) acetato de etila; (E) acetona; (F) etanol; (G) metanol; visualizadas na luz UV 366 nm.	53

Figura 22. CCDAE dos extratos de <i>C. sicyoides</i> , placas reveladas com: (A) VAS; (B) FeCl ₃ ; (C) NP/PEG.	55
Figura 23. Superfície de resposta de compostos fenólicos totais em função da pressão e % de cossolvente.	57
Figura 24. Superfície de resposta para flavonoides totais em função da % de cossolvente e temperatura.	61
Figura 25. Cromatograma de extrato <i>C. sicyoides</i> e padrões externos, registrados a 245 nm.	63
Figura 26. Espectros de absorção dos compostos presentes nos extratos de <i>C. sicyoides</i>	64
Figura 27. CCDAE dos extratos de <i>C. sicyoides</i> , para a avaliação qualitativa da atividade antioxidante pelo método do DPPH.	65
Figura 28. Superfície de resposta para atividade antioxidante em função da pressão e % de cossolvente.	67
Figura 29. Valores preditos e desejabilidade para as respostas de rendimento global de extração; compostos fenólicos totais (CFT); flavonoides totais (FT); atividade antioxidante (DPPH) para os extratos de <i>C. sicyoides</i> obtido via SFE.	70
Figura 30. Análise histopatológica revelada com violeta de cresila: (A-C) grupo controle; (D-F) grupo tratado; (*) asterisco aponta para o centro da lesão; (→) setas para células mononucleares; (C) córtex motor e (CC) corpo caloso; com aumento: A, D x 40; B, E x 100; C, F x 400.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação de propriedades físicas e de transporte de gases, líquido e fluido supercrítico.	23
Tabela 2. Variáveis independentes com seus valores reais e codificados, utilizadas no planejamento estatístico de Box-Behnken.....	35
Tabela 3. Condições de extração com fluido supercrítico (SFE) segundo o planejamento estatístico de Box-Behnken.	36
Tabela 4. Planejamento Box-Behnken, com as variáveis independentes sobre as variáveis de respostas avaliadas para os extratos de <i>C. sicyoides</i> obtidos via SFE, comparado à extração convencional (Soxhlet).	47
Tabela 5. Estimativa dos efeitos e coeficientes de regressão para o rendimento global de extração.....	48
Tabela 6. Análise de variância (ANOVA) para o rendimento global de extração.	48
Tabela 7. Triagem fitoquímica dos extratos de <i>C. sicyoides</i>	54
Tabela 8. Estimativa dos efeitos e coeficientes de regressão para compostos fenólicos totais.	56
Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) para compostos fenólicos totais.	57
Tabela 10. Estimativa dos efeitos e coeficientes de regressão para flavonoides totais.	59
Tabela 11. Análise de variância (ANOVA) para flavonoides totais.	60
Tabela 12. Tempo de retenção, absorção máxima dos compostos presentes nos extratos de <i>C. sicyoides</i>	65
Tabela 13. Estimativa dos efeitos e coeficientes de regressão para atividade antioxidante.	66
Tabela 14. Análise de variância (ANOVA) para atividade antioxidante.	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AVC: Acidente vascular cerebral;

ε : Porosidade do leito de extração;

ρ_a : Densidade aparente do leito;

ρ_r : Densidade real da partícula;

bs: Base seca;

CO₂: Dióxido de carbono;

d_{mg} : Diâmetro médio geométrico;

HEp-2: Carcinoma epidermoide humano (*Human Epidermoid Carcinoma* nº 2)

MSR: Metodologia de superfície de resposta;

P_c: Pressão crítica;

P_T: Pressão-temperatura;

P_V: Pressão-volume específico;

SF: Fluido supercrítico (*Supercritical Fluid*);

SFE: Extração com fluido supercrítico (*Supercritical Fluid Extraction*);

SPE: Extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*);

T_c: Temperatura crítica;

X₀: Rendimento global.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 Cipó-pucá (<i>Cissus sicyoides</i> L.).....	17
3.1.1 Descrição Botânica.....	17
3.1.2 Composição Química	18
3.1.3 Aplicação Farmacológica	18
3.2. Extração com Fluido Supercrítico	21
3.2.1 Parâmetros de Processo	24
3.2.1.1 Pressão	24
3.2.1.2 Temperatura.....	24
3.2.1.3 Densidade	25
3.2.1.4 Solubilidade	26
3.2.1.5 Cossolvente.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Matéria-prima	29
4.1.1 Preparação e Caracterização da Matéria-prima.....	29
4.1.1.1 Secagem e moagem	29
4.1.1.2 Determinação da umidade	29
4.1.1.3 Determinação do diâmetro da partícula.....	30
4.1.1.4 Determinação da densidade aparente do leito, densidade real da partícula e porosidade do leito.	31
4.2 Extração com Fluido Supercrítico (SFE).....	32
4.2.1 Unidade de Extração Supercrítica	32

4.2.2 Procedimento Operacional	33
4.2.3 Preparação da Célula de Extração	34
4.2.4 Determinação das Melhores Condições Operacionais	34
4.2.5 Determinação dos Rendimentos Globais de Extração	35
4.2.6 Cálculo de Densidade.....	36
4.3 Extração Convencional por Soxhlet	36
4.4 Determinação da Composição Química dos Extratos.....	37
4.4.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE).....	37
4.4.2 Análise de Compostos Fenólicos Totais (CFT)	38
4.4.3 Análise de Flavonoides Totais (FT)	39
4.4.4 Extração em Fase Sólida (SPE).....	39
4.4.5 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	40
4.5 Atividade Antioxidante dos Extratos	41
4.5.1 Análise Qualitativa da Atividade Antioxidante	41
4.5.2 Análise Quantitativa da Atividade Antioxidante	41
4.6 Avaliação do Potencial Neuroprotetor e Anti-inflamatório do Extrato Obtido Via Extração Supercrítica em Ensaios <i>in vivo</i> de Isquemia Cerebral Focal Induzida em Ratos.	42
4.6.1 Animais e Procedimentos Cirúrgicos	43
4.6.2 Microtomia e Análise Imunohistoquímica.....	43
4.6.3 Tratamento com Extrato de <i>C. sicyoides</i> Obtido por SFE	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Caracterização da Matéria-prima e Leito de Extração.....	45
5.2 Extração com Fluido Supercrítico (SFE).....	46
5.2.1 Determinação dos Rendimentos Globais de Extração	46
5.3 Extração Convencional por Soxhlet	51
5.4 Determinação da Composição Química dos Extratos.....	51
5.4.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE).....	51

5.4.2 Análise de Compostos Fenólicos Totais (CFT)	56
5.4.3 Análise de Flavonoides Totais (FT)	59
5.4.4 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	62
5.5 Atividade Antioxidante dos Extratos	65
5.5.1 Análise Qualitativa da Atividade Antioxidante	65
5.1.2 Análise Quantitativa da Atividade Antioxidante	65
5.6 Análise Estatística.....	69
5.7 Avaliação do Potencial Neuroprotetor e Anti-inflamatório do Extrato Obtido Via Extração Supercrítica em Ensaios <i>in vivo</i> de Isquemia Cerebral Focal Induzida em Ratos.	71
6 CONCLUSÕES	73
7 LISTA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA	74
8 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO	75
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1 INTRODUÇÃO

A *Cissus sicyoides* L. ou *Cissus verticillata* L. pertence à família Vitaceae, é também conhecida como insulina vegetal, cipó-pucá e anil-trepador. Considera-se uma planta da região Neotropical e é encontrada normalmente na região Amazônica (Lombardi, 2000; Drobnik e de Oliveira, 2015). De acordo com os estudos da composição do extrato de *C. sicyoides*, descobriu-se a presença de compostos bioativos com alta atividade antioxidante como carotenoides e compostos fenólicos (flavonoides, resveratrol, taninos e cumarinas), que são compostos que previnem ou retardam o estresse oxidativo, atuando como sequestrantes de radicais livres, e assim reduzem o aparecimento de diferentes doenças crônicas (Barreiros e David, 2005; Mustafa *et al.*, 2010). A *C. sicyoides* é tradicionalmente utilizada pela medicina popular para tratar reumatismo, epilepsia, Acidente Vascular Cerebral (AVC), abscessos, artrite e diabetes, também tem sido utilizada para tratar doenças respiratórias (Pepato *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2004; Salgado *et al.*, 2009; Beserra *et al.*, 2016).

O AVC é uma doença neurológica causada pela ruptura dos vasos sanguíneos cerebrais (hemorrágico) pela obstrução por trombozes ou embolia (isquêmico) (Lloyd-Jones *et al.*, 2009). Não há nenhuma terapia aprovada eficaz para o AVC, além do ativador do plasminogênio tecidual recombinado (rt-PA) (Moskowitz *et al.*, 2010). Portanto, estes fatos são a motivação para o desenvolvimento de novas terapias envolvendo medicamentos neuroprotetores a partir de fontes naturais. A extração com fluido supercrítico (SFE-*Supercritical Fluid Extraction*) já vem sendo estudada para a obtenção de compostos bioativos a partir de fontes naturais. Botelho *et al.* (2015) demonstraram que a aplicação da tecnologia de SFE é bem sucedida para a obtenção de extratos a partir de folha de copaíba (*Copaifera sp.*) com efeitos neuroprotetores contra isquemia cerebral focal induzida em ratos.

A SFE é uma tecnologia utilizada particularmente para extração de compostos bioativos sem os inconvenientes geralmente associados aos processos de extração convencionais, como por exemplo, o emprego de solventes orgânicos, que apresentam toxicidade e contaminam os extratos. A SFE baseia-se no uso de solventes com temperaturas e pressões acima dos seus pontos críticos, os quais possuem alto poder de solvatação. O processo de extração utilizando essa tecnologia se justifica quando se deseja obter extratos de alto valor agregado, necessários principalmente em algumas áreas das indústrias de alimentos e farmacêutica (Herrero *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2013; Grosso *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2016).

Diversos solventes podem ser utilizados na SFE, entre eles o propano, etano, butano, éter dimetílico, água e o dióxido de carbono (CO₂), que é o solvente supercrítico de maior aplicabilidade por ser atóxico, não inflamável, disponível em alto grau de pureza e por apresentar condições críticas amenas (T_c= 31 °C e P_c= 72,9 bar) proporcionando temperaturas de processamento baixas, evitando, portanto, a degradação de compostos termossensíveis. Este solvente é usado principalmente para extrair compostos apolares (lipídeos e carotenoides), no entanto, compostos polares como os flavonoides, apresentam solubilidade reduzida nesse solvente. Para contornar essa limitação, normalmente é adicionado um cossolvente ou modificador polar para mudar a polaridade do fluido supercrítico (Rosa *et al.*, 2009; Pereira e Meireles, 2010; Herrero *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2016).

As técnicas de extração são seguidas de métodos de separação para a purificação de compostos bioativos. Os métodos cromatográficos realizam a separação, identificação e quantificação das espécies químicas de matrizes complexas. Variam desde os de extrema simplicidade como Cromatografia Camada Delgada (CCD), até os de alta sofisticação como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e gasosa (CG) (Collins *et al.*, 2006).

Por fim, a obtenção de extratos de *C. sicyoides* via SFE, sua identificação química, estimação de sua atividade antioxidante e o teste *in vivo* contra isquemia cerebral focal representam uma grande oportunidade para a extração ou obtenção de novos compostos bioativos de origem natural, que podem ser utilizados para desenvolver novos tratamentos contra doenças. Além disso, podem ser empregados na indústria de alimentos como ingredientes de alimentos funcionais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a composição química, o efeito neuroprotetor e anti-inflamatório de extratos de cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) obtidos via extração supercrítica, utilizando CO₂ e CO₂+cossolvente (etanol), comparado à extração convencional (Soxhlet).

2.2 Objetivos Específicos

- Preparar e caracterizar a matéria-prima (*C. sicyoides*);
- Determinar as melhores condições operacionais da extração supercrítica utilizando CO₂ e CO₂+cossolvente (etanol), por meio do delineamento de experimentos de Box-Behnken;
- Obter extrato hexânico e extrato etanólico de *C. sicyoides*, utilizando um método de extração convencional (Soxhlet);
- Determinar a composição química dos extratos;
- Estimar a atividade antioxidante dos extratos;
- Avaliar o potencial neuroprotetor e anti-inflamatório do extrato obtido via extração supercrítica em ensaios *in vivo* de isquemia cerebral focal induzida em ratos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.)

3.1.1 Descrição Botânica

A *Cissus sicyoides* L. pertencente à família Vitaceae, é também conhecida como insulina vegetal, anil-trepador, achite, bejuco-caro e uva-brava, tem como sinônimo *Cissus verticillata* L., sendo que no âmbito farmacêutico é mais conhecida como *Cissus sicyoides* L. (Figura 1). Considera-se uma planta da região Neotropical e é encontrada normalmente na região Amazônica, é uma planta trepadeira, que pode atingir até seis metros de comprimento, apresenta galho articulado carnoso, folha alternada de formato ovado com ápice agudo, flores verdes-amareladas e fruto redondo carnoso, com variações de cor de violeta a preto, com uma única semente inclusa (Lombardi, 2000; Drobnik e de Oliveira, 2015).

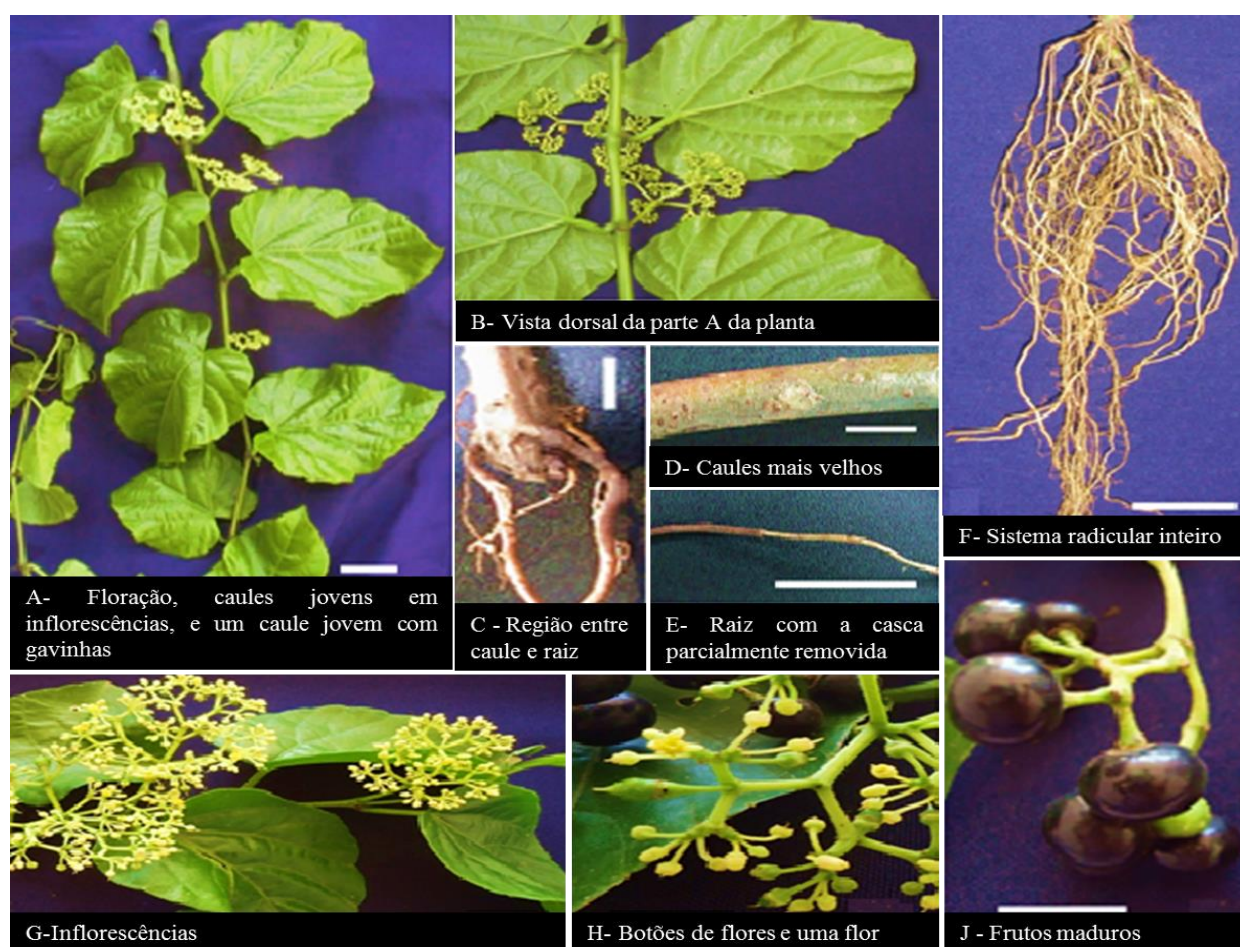


Figura 1. Descrição de partes de *C. sicyoides*.

Fonte: Drobnik e de Oliveira (2015).

3.1.2 Composição Química

De acordo com a literatura, as diferentes partes da planta apresentam composição distinta. Os compostos bioativos presentes na folha e no caule são representados por carotenoides (α -caroteno e o β -caroteno) (Silva *et al.*, 1996) e compostos fenólicos como os flavonoides (kaempferol 3-raminosídeo e quercetina 3-raminosídeo) (Beltrame *et al.*, 2001). Mas também, Xu *et al.* (2009) encontraram três novos glicosídeos de flavonoides denominados cissosídeos I, II e III (kaempferol 3-arabinofuranosil-(5-acetil)-7-rhamnopiranosídeo, quercetina 3-arabinofuranosil-7-rhamnopiranosídeo e quercetina 3-arabinofuranosil-(5-acetil)-7-rhamnopiranosídeo).

Beserra *et al.* (2016) identificaram a três flavonoides diferentes (kaempferol 3-deoxyhexosídeo, quercetina 3-hexosídeo e quercetina 3-deoxyhexosídeo). Além disso, foi encontrado o resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) (Quílez *et al.*, 2004) e um novo estilbeno de tipo benzofurano (cissusina) (Xu *et al.*, 2009), taninos (Oliveira *et al.*, 2012) e cumarinas (glicosídeo 5, 6, 7, 8-tetra-hidroxycumarina-5-xilopiranosídeo e sabadina) e os esteroides (β -sitosterol e 3-glicopiranosídeo do sitosterol) (Beltrame *et al.*, 2002). Também foi detectada a presença de óleos essenciais (Oliveira *et al.*, 2012). Na Figura 2 estão representadas as estruturas químicas dos principais compostos da *C. sicyoides*.

Na composição dos frutos, foram encontradas três antocianinas (delfinidina-3-rutinosídeo, cianidina-3-ramnosil-arabinosídeo e delfinidina-3-raminosídeo) (Toledo *et al.*, 1983). Os autores consideraram que o fruto desta planta pode ter uso potencial como um corante alimentício. Além disso, em plantas da mesma família (Vitaceae) foram isolados alcaloides e terpenoides especificamente da *Cissus rhoifolia* (Saifah *et al.*, 1983). Da parte aérea do uva-do-diabo (*Cissus quadrangularis*) foram identificados os flavonoides: kaempferol e quercetina (Kumar *et al.*, 2015), assim como, também foram extraídos e purificados polissacarídeos de *Cissus pteroclada* (Li *et al.*, 2015).

3.1.3 Aplicação Farmacológica

A *C. sicyoides* é tradicionalmente utilizada pela medicina popular para tratar reumatismo, epilepsia, Acidente Vascular Cerebral (AVC), abscessos, artrite e diabetes, também tem sido utilizada para tratar doenças respiratórias. Deste modo, são atribuídas à planta atividades anti-inflamatórias, antirreumáticas, antiepiléticas, anti-hipertensivas, antibacterianas, antigripal, antitérmica, antioxidante, antialérgica e antidiabéticas. As partes

áreas da planta, folha e caule, são tradicionalmente as mais usadas no preparo de infusões ou chás (Pepato *et al.*, 2003; Quílez *et al.*, 2004; Viana *et al.*, 2004; Salgado *et al.*, 2009; Beserra *et al.*, 2016).

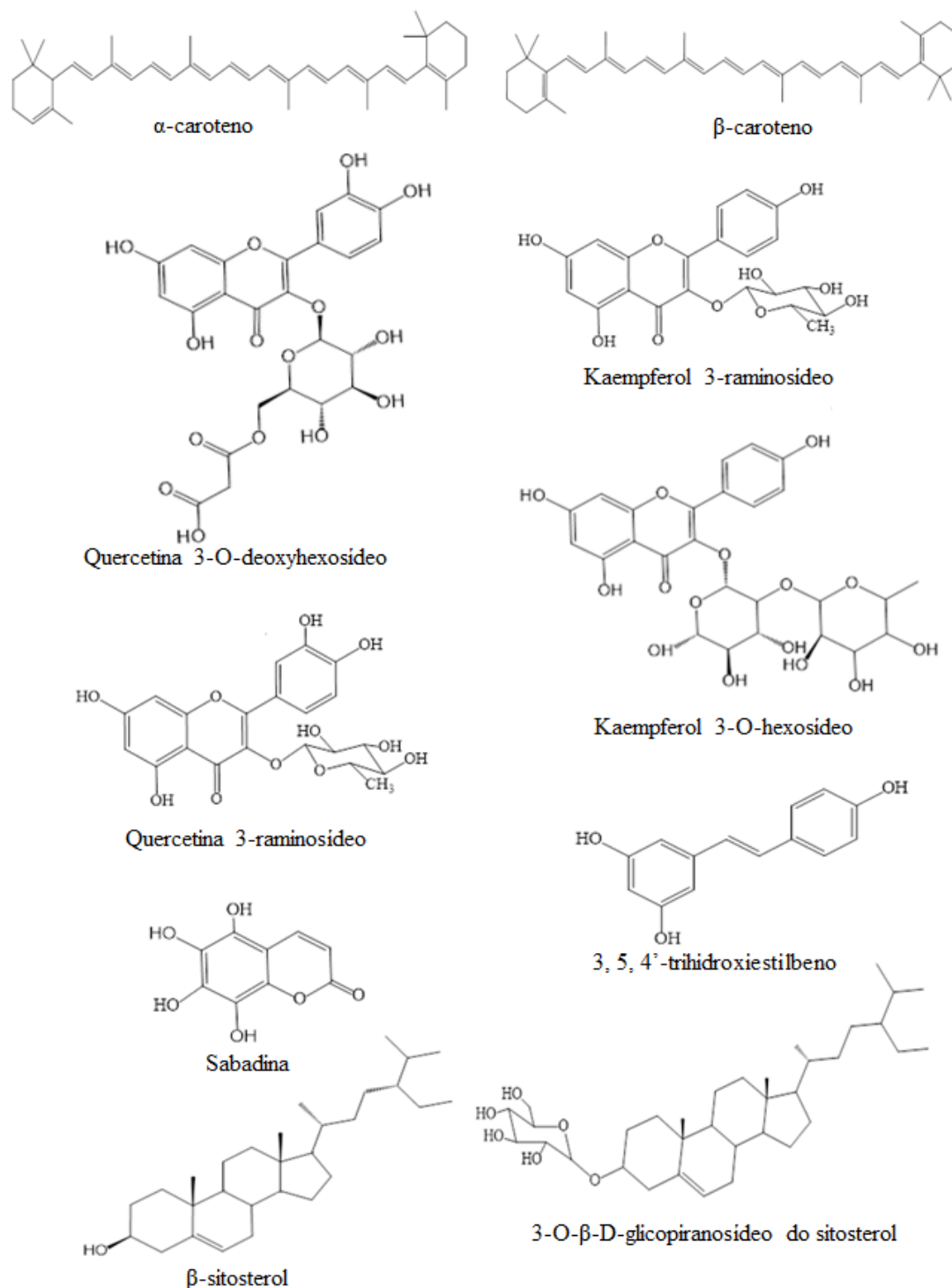


Figura 2. Estrutura química dos principais compostos encontrados na *C. sicyoides*.

Fonte: Adaptada pelo autor a partir de Silva *et al.* (1996); Beltrame *et al.* (2002); Quílez *et al.* (2004); Beserra *et al.* (2016).

Estudos apontam a aplicação da *C. sicyoides*, como tratamentos de doenças, de forma que García *et al.* (2000) demonstraram que a administração oral do extrato de caules de *C. sicyoides*, em ratos com edemas induzido, tem uma potente atividade anti-inflamatória, e a administração do extrato produziu uma redução de aproximadamente 50 % do edema induzido. Segundo Quílez *et al.* (2004), o resveratrol pode ser apontado como um dos constituintes responsáveis pelas propriedades anti-inflamatórias apresentada pela *C. sicyoides*. Mas também, o uso etnofarmacológico moderno relata que o extrato de *C. sicyoides* tem ações anti-inflamatórias, devido à abundante presença de flavonoides, sendo este o principal responsável pelos efeitos farmacológicos da planta (Beserra *et al.*, 2016).

García *et al.* (1999) demonstraram a atividade antibacteriana dos extratos aquosos da *C. sicyoides*, apresentando atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo que essa atividade é atribuída à alta proporção de compostos fenólicos encontrados na planta. Além disso, Silva *et al.* (2007) determinaram a atividade antifúngica de extratos de folhas e de caules da planta e demonstraram que esses extratos causaram inibição do crescimento dos fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides*.

Beltrame *et al.* (2001) e Pepato *et al.* (2003) avaliaram o potencial antidiabético de *C. sicyoides*, sendo que Pepato *et al.* (2003) estudaram os efeitos do chá de folhas da planta. O modelo experimental escolhido mostrou ser um tratamento apropriado, reduzindo significativamente os níveis de glicose no sangue e na urina. Viana *et al.* (2004) mostraram que o tratamento de ratos diabéticos com extrato aquoso do *C. sicyoides* durante 7 dias (100 e 200 mg/kg) reduziu significativamente os níveis de glicose no sangue em 22 % e 25 %, respectivamente. Entretanto, Santos *et al.* (2008) utilizaram chá das folhas de *C. sicyoides* para investigar a eficácia terapêutica da planta em pessoas voluntárias intolerantes à glicose e diabéticas. Usou-se uma única dose de chá (1g do pó das folhas secas em 150 mL de água), por um período de 7 dias. Foi observado nas pessoas intolerantes à glicose que o chá teve atividade antidiabética significativa. Por conseguinte, os resultados dos estudos justificam o uso tradicional de *C. sicyoides*, apontando para o potencial benefício do extrato da planta como um possível medicamento alternativo no tratamento da diabetes.

Sáenz *et al.* (2000) demonstraram uma atividade citotóxica na *C. sicyoides* contra células HEP-2 (*Human Epidermoid Carcinoma* nº 2), mostrando uma completa inibição da divisão celular após de 24 h de tratamento. Porém, Lucena *et al.* (2010), que investigaram as

atividades citotóxica e antitumoral do extrato de *C. sicyoides* em animais (ratos) com doses de 300 e 600 mg/kg de peso, demonstraram que o extrato não apresentou atividade citotóxica, mas mostrou uma inibição da atividade tumoral em sarcoma-180 de 49 e 62 % e carcinoma de Ehrlich de 69 e 84 %.

3.2. Extração com Fluido Supercrítico

Um componente puro é considerado um fluido supercrítico (SF-*Supercritical Fluid*) quando sua temperatura e pressão estão acima de suas temperatura crítica (T_c) e pressão crítica (P_c). A figura 3 apresenta o diagrama de fases PT para uma substância pura. 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 (Brunner, 2005; Çengel e Boles, 2006; Smith *et al.*, 2007; Borgnakke e Sonntag, 2009; Meireles e Pereira, 2013).

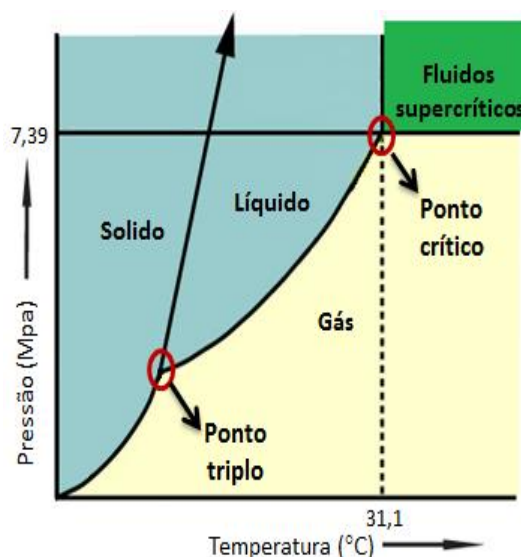


Figura 3. Diagrama de fases PT de uma substância pura.

Fonte: Adaptada pelo autor a partir de <http://www.appliedseparations.com/>; Brunner (2005); Çengel e Boles (2006); Smith *et al.* (2007); Borgnakke e Sonntag (2009); Meireles e Pereira, 2013).

A Figura 4 mostra o diagrama de fases PV de uma substância pura. Observa-se que a isoterma em temperatura superior à crítica (Isoterma $T > T_c$) é uma curva suave que não cruza uma fronteira entre as fases, entretanto, na isoterma crítica ($T = T_c$), verifica-se que o ponto crítico consiste no ponto de inflexão da curva, onde as fases líquida e vapor se tornam indistinguíveis, o que caracteriza uma alta taxa de variação da densidade do solvente com a pressão e temperatura, aumentando, assim, o coeficiente de compressibilidade isotérmica. De tal modo que, nas proximidades do ponto crítico, pequenas mudanças da pressão e temperatura causam grandes variações de densidade e no poder de solubilização ou solvatação do solvente, permitindo uma maior seletividade dos compostos de interesse (Brunner, 1994; Çengel e Boles, 2006; Smith *et al.*, 2007; Terron, 2009; Herrero *et al.*, 2013).

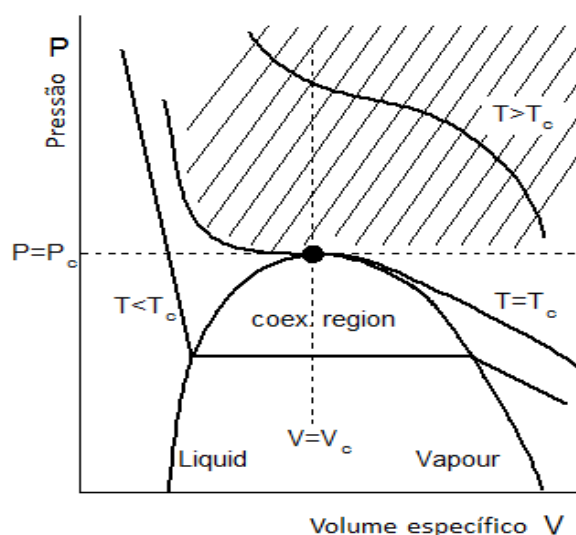


Figura 4. Diagrama de fases PV de uma substância pura.

Fonte: Brunner (1994); Çengel e Boles (2006); Smith *et al.* (2007); Terron (2009).

Uma das propriedades do fluido supercrítico é apresentar características intermediárias entre líquido e gás. Possuem densidade e difusividade similar à do líquido, porém sua viscosidade é semelhante a um gás. Deste modo, a alta densidade e difusividade, combinadas com os baixos valores de viscosidade atribuem ao fluido supercrítico alto poder de solvatação e penetração na matriz sólida, o que leva a elevadas taxas de transferência de massa (Brunner, 2005; Herrero *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2016). Na Tabela 1, é apresentada uma comparação entre os valores típicos para densidade, viscosidade e difusividade de gases, líquidos e fluidos supercríticos.

Tabela 1. Comparação de propriedades físicas e de transporte de gases, líquido e fluido supercrítico.

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 x10 ⁻³	(1-3) x 10 ⁻⁴

Fonte: Brunner (2005).

Diversos solventes têm sido aplicados para a extração de compostos bioativos de alimentos ou plantas. Em geral, o CO₂ é o solvente mais utilizado em processos de extração com fluido supercrítico (SFE-*Supercritical Fluid Extraction*) por ser um composto atóxico, não inflamável, inodoro, não corrosivo, disponível em alto grau de pureza e a baixo custo. Além disso, apresenta condições críticas amenas (T_c= 31 °C e P_c= 72,9 bar) proporcionando temperaturas de processamento baixas, evitando, portanto, a degradação de compostos termossensíveis (Brunner, 2005; Rosa *et al.*, 2009; Herrero *et al.*, 2006; Gil-Chávez *et al.*, 2013; de Melo *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2016).

A SFE apresenta vantagens consideráveis com relação aos métodos convencionais de extração. O solvente pode ser facilmente removido do soluto através da redução da pressão e/ou ajuste da temperatura, apresentando menor gasto energético quando comparado a outros métodos e possibilita uma alta taxa de extração. Também, requer o uso de pouco ou nenhum solvente orgânico, apresentando-se, portanto, como uma tecnologia segura e ecologicamente correta (Zougagh *et al.*, 2004; Brunner, 2005; Rosa *et al.*, 2009).

Brunner (1994) afirma que, durante a extração dos compostos solúveis de matrizes vegetais, algumas etapas paralelas e consecutivas ocorrem na SFE, que podem ser divididas em duas etapas:

- Extração: onde é formado um sistema ternário (matriz vegetal + extrato + CO₂). O fluido supercrítico escoar através de um leito fixo de partículas sólidas dissolvendo os componentes extraíveis. O solvente é alimentado no extrator e uniformemente distribuído no interior do leito fixo. A mistura do solvente e os componentes extraídos deixa o extrator e passa para o separador.

- Separação: etapa de remoção do solvente, na qual considera-se a interação extrato + CO₂. No separador, a pressão da solução é reduzida, acarretando na vaporização do solvente e na precipitação do soluto, o qual será coletado e analisado.

Antes da SFE, o substrato sólido requer pré-tratamento que, pelo menos, inclua moagem ou redução do tamanho de partícula a fim de evitar caminhos preferenciais ou entupimento na célula de extração. Devido à forte interação entre água e solvente, a desidratação do soluto é necessária no caso de o teor de água for superior a 20 %. Portanto, o pré-tratamento do substrato sólido promove a ruptura das paredes celulares e aumenta a taxa de extração (Maireles, 2008; Pereira e Maireles, 2010; Herrero *et al.*, 2013).

3.2.1 Parâmetros de Processo

3.2.1.1 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, ou seja, 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. Desse modo, a pressão exercida pelo material depende fortemente da densidade e da temperatura (Çengel e Boles, 2006; Smith *et al.*, 2007; Borgnakke e Sonntag, 2009; Brown e Holme, 2009; Pereira e Maireles, 2013).

A SFE é uma tecnologia baseada no uso de solventes a altas pressões, que implicam em elevadas forças sobre o sistema e, conseqüentemente, necessita de cuidados operacionais distintos nos processos que envolvem fluidos supercríticos. Por outro lado, o custo de investimento para montagem de um sistema de SFE é elevado, devido o equipamento ter que suportar altas pressões. 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 *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2016).

3.2.1.2 Temperatura

A temperatura é definida como sendo uma grandeza física que está relacionada com o conteúdo de energia do sistema. É a propriedade que nos permite quantificar a sensação de calor e de frio. Na termodinâmica, essa propriedade é definida como sendo 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; Pereira e Meireles, 2013). Em temperaturas mais altas, uma fração maior das moléculas se movimenta em altas velocidades. Desse modo, as reações tendem a prosseguir mais rapidamente (Brown e Holme, 2009).

No processo de SFE, o 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 num fluido supercrítico (Brunner 2005; Herrero *et al.*, 2006; Herrero *et al.*, 2013). Na 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 encontra-se 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 de inflexão (ponto crítico) (Brunner, 2005; Rosa *et al.* 2009; de Melo *et al.*, 2014; Cornelio-Santiago *et al.*, 2017).

3.2.1.3 Densidade

A densidade (ρ) é definida como a razão entre a massa e o volume ocupado por uma determinada substância. Essa é uma propriedade que dá uma indicação do grau de distribuição de quantidade de matéria no corpo (Çengel e Boles, 2006; Pereira e Meireles, 2013). A densidade de uma substância está diretamente relacionada com a distância média entre as moléculas (Brunner, 1994).

Em geral, a densidade de uma substância depende da temperatura e da pressão. A densidade da maioria dos gases é proporcional à pressão e inversamente proporcional à temperatura. Os líquidos e sólidos, por outro lado, são substâncias essencialmente incompressíveis, e a variação de suas densidades com a pressão é geralmente desprezível (Çengel e Boles, 2006). A densidade dos fluidos supercríticos pode ser facilmente alterada por uma pequena modificação da pressão ou da temperatura do sistema, especialmente na região próxima do ponto crítico. Ela 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; de Castro *et al.* 1994; Brunner, 2005; Rosa *et al.* 2009; Herrero *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2016).

A densidade pelo feito da porosidade 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 (Pereira e Meireles, 2013).

3.2.1.4 Solubilidade

O termo solubilidade é utilizado 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 dissolvem-se no solvente. Quando uma substância se dissolve, suas partículas são dispersas no solvente e normalmente muitas moléculas deste irão circundar qualquer molécula ou íon individual do soluto, deste modo, as características da solubilidade devem ser visualizadas no contexto do equilíbrio (e da constante de equilíbrio) das reações. A solubilidade é frequentemente vital no isolamento de compostos (Brown e Holme, 2009).

Os solventes no estado supercrítico ou em condições próximas possuem propriedades que aumentam significativamente o poder de solubilização de compostos. A solubilidade dos fluidos supercríticos é maior à medida que a pressão é aumentada. Consequentemente, o poder de solvatação ou capacidade de solubilização 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 *et al.*, 2014; Cornelio-Santiago *et al.*, 2017).

3.2.1.5 Cossolvente

O CO₂ supercrítico é um excelente solvente para extrair compostos apolares. No entanto compostos mais polares, como flavonoides, apresentam solubilidade reduzida nesse solvente.

Para contornar essa limitação, normalmente é adicionado um cossolvente ou modificador ao fluido supercrítico. Portanto, os cossolventes têm sido utilizados em estudos de extração supercrítica de compostos polares com a finalidade de melhorar a solubilidade e aumentar o rendimento e/ou taxas de extração destes compostos no 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). As interações intermoleculares específicas entre cossolventes e solutos podem ser particularmente benéficas para melhorar a seletividade na obtenção de compostos bioativos (Eltringham e Catchpole, 2008; Herrero *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2016).

Os cossolventes mais utilizados são etanol, isopropanol, metanol, água e misturas dessas substâncias. Uma vez que a solubilidade e a seletividade dos compostos-alvo no fluido supercrítico pode depender fortemente do cossolvente utilizado e de sua concentração, a composição da mistura de solvente+cossolvente tem que ser controlada dentro de limites estreitos. O etanol e a água são os cossolventes mais adequados para aplicações relacionadas à indústria alimentar e farmacêutica, pois podem ser facilmente removido do produto final, têm baixa toxicidade e miscibilidade no CO₂. Portanto, o etanol é amplamente utilizado para melhorar a eficiência da extração de compostos fenólicos, terpenos e carotenoides, na faixa de 5 a 15 % de fluxo de CO₂ (Brunner, 1994; Rosa *et al.*, 2009; Sahena *et al.*, 2009; Gil-Chávez *et al.*, 2013; Herrero *et al.*, 2013; de Melo *et al.*, 2014).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo da obtenção de extrato via SFE e por extração convencional (Soxhlet), a partir de folha e caule de *C. sicyoides*, foi realizado conforme ao fluxograma de atividades descrito na Figura 5.

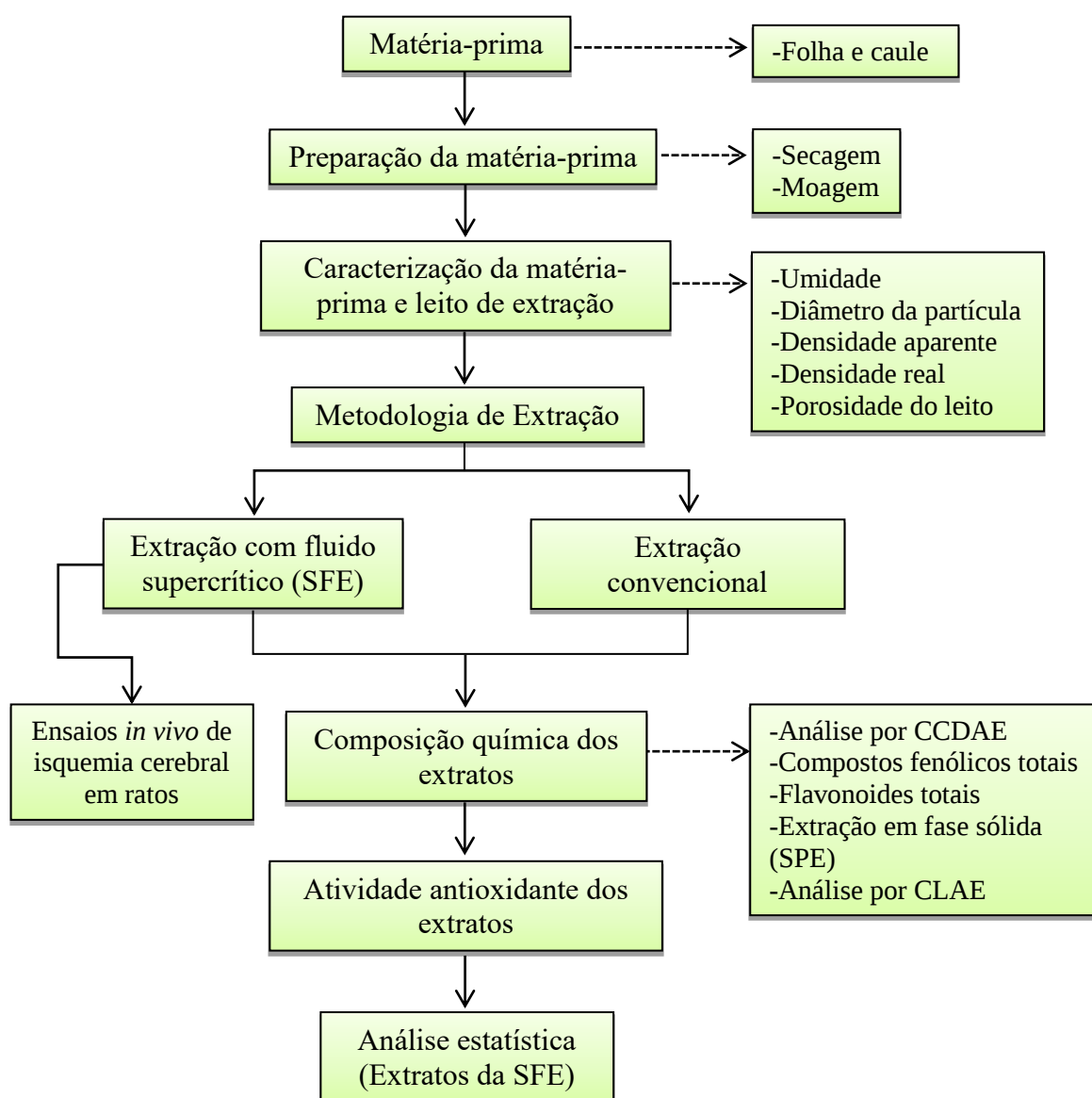


Figura 5. Fluxograma das atividades realizadas no presente trabalho.

4.1 Matéria-prima

A matéria-prima de estudo foi constituída de folha e caule de *C. sicyoides* (Figura 6) devidamente coletados no horto de plantas medicinais no município de Salinópolis, estado do Pará, Brasil, em uma única safra para evitar a variação da composição química do extrato. A matéria-prima foi colocada em sacolas plásticas e transportada até o Laboratório de Extração (LABEX/FEA-UFPA). A identificação botânica foi realizada no Herbário do Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Oriental da EMBRAPA (IAN) sob a supervisão da pesquisadora Silvane Tavares Rodrigues, conforme laudo de identificação (ANEXO I, p.88). A coleta foi registrada sob nº 194178.

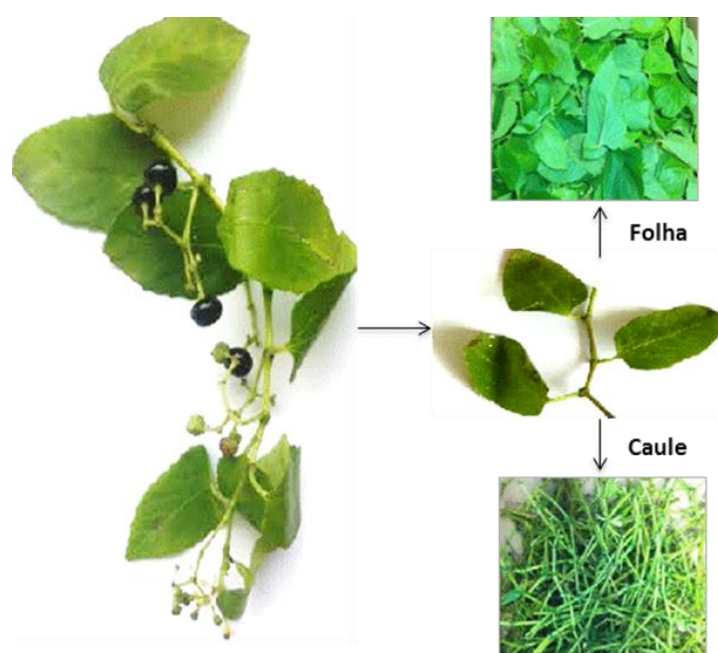


Figura 6. Folha e caule de *C. sicyoides* utilizados neste trabalho.

4.1.1 Preparação e Caracterização da Matéria-prima

4.1.1.1 Secagem e moagem

A folha e o caule de *C. sicyoides* foram pré-tratados, realizando a secagem a 35 °C por 48 h em estufa de circulação de ar (Fabbe-Primar, modelo 225, Brasil). Em seguida, a matéria-prima seca foi moída no Laboratório de Medidas Físicas (LAMEFI/ FEA - UFPA) e o equipamento utilizado foi um moinho de facas (Tecnal, modelo TE-631/3, Brasil).

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). Na Figura 7, está representado o equipamento utilizado para a determinação da umidade. O equipamento é constituído de um condensador, um tubo coletor graduado que recebe a água evaporada da amostra, uma manta de aquecimento e um balão de 250 ml. Para o experimento, foram utilizados 15 g de folha e caule de *C. sicyoides* imerso em 80 ml de xilol (pureza 98,5%, Dinâmica, Brasil). Conectou-se o tubo coletor graduado ao condensador e ao balão, ligou-se a manta de aquecimento e iniciou-se o refluxo até o esgotamento da água por cerca de 2 h. 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_{H_2O} : volume de água extraída da amostra;

ρ_{H_2O} : densidade da água;

$m_{amostra}$: massa da amostra.

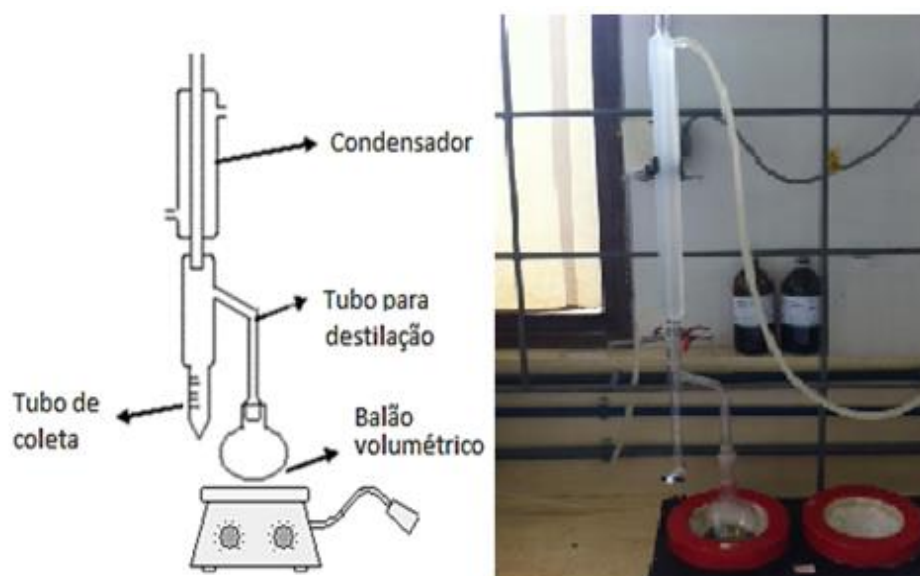


Figura 7. Esquema do aparelho utilizado para a determinação de umidade em sólidos contendo substâncias voláteis, segundo o método de Jacobs.

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 a série padrão de peneiras Tyler de 20 a 60 mesh (Bertel, Brasil) no Laboratório de Medidas Físicas (LAMEFI/FEA-UFPA) depois do peneiramento, a

matéria-prima foi colocada num agitador magnético (Produtest, modelo 3580, Brasil) até completa separação das partículas. As frações de 20, 28 e 35 mesh foram homogeneizadas e utilizadas para o empacotamento do leito de extração. Posteriormente a matéria-prima foi acondicionada em sacos plásticos de polipropileno, submetidas a vácuo, e armazenadas em freezer doméstico (Brastemp, Brasil) em temperatura inferior a 5 °C. O diâmetro médio das partículas foi determinado de acordo com o método recomendado pela ASAE Standart (ASAE, 1998) 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.

As capturas de imagens das partículas, para determinar suas formas foram realizadas no Laboratório de Microscopia (LMEV/ITEC-UFPA), pela medida visual por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Hitachi, modelo TM 3000, Japão).

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 (ANEXO II, p.89). Com os dados de densidade real e aparente foi calculada a porosidade do leito (ε) 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-UFGA), no *Spe-ed*TM SFE (Applied Separations, modelo 7071, USA) (Figura 8). O diagrama esquemático é apresentado na Figura 9. O *Spe-ed*TM SFE está acoplado com compressor de volume interno 19,7 L (Schulz, modelo CSA 7,8, Brasil), recirculador (Polyscience, modelo F08400796, USA), um cilindro CO₂ (pureza 99,9 %, White Martins, Brasil), bomba de cossolvente (serie 1500) e medidor de vazão na saída do sistema (Dwyer, RMA, USA).



Figura 8. *Spe-ed*TM SFE da Applied Separations, modelo 7071.

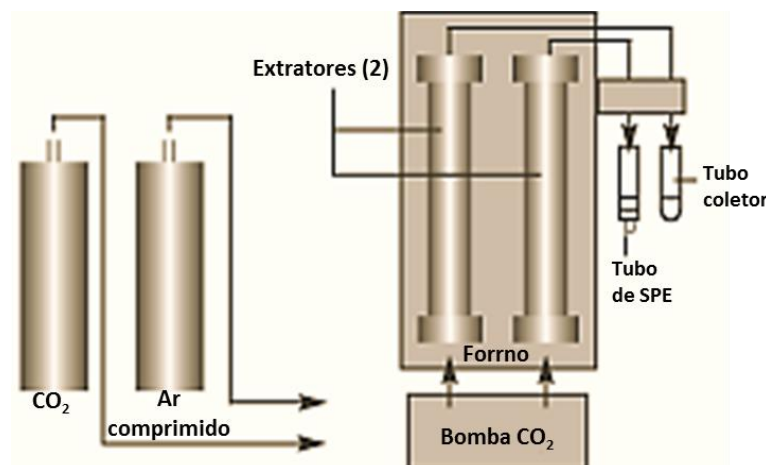


Figura 9. Diagrama esquemático de *Spe-ed*TM SFE.

Fonte: Applied separations (2004).

4.2.2 Procedimento Operacional

Segundo o manual de operações da Applied separations (2004), os passos para a operação do *Spe-ed*TM SFE tiveram a seguinte sequência:

- a) A amostra foi colocada na célula de extração e em seguida realizou-se o acoplamento da célula no forno de extração;
- b) As válvulas de entrada, saída, ventilação e micrométricas foram fechadas;
- c) As temperaturas desejadas do forno e do sistema de aquecimento da válvula micrométrica foram estabelecidas;
- d) Ajustou-se o regulador de pressão de ar até que o CO₂ atingisse a pressão desejada. A pressão de CO₂ foi apresentada digitalmente no painel frontal do módulo da bomba.
- e) As válvulas de entrada foram abertas girando em sentido anti-horário;
- f) Verificaram-se possíveis vazamentos de CO₂, pressurizando o módulo de bomba na metade da pressão desejada, em seguida certificou-se se a célula extração não tinha vazamento;
- g) A válvula de saída foi aberta na parte superior do forno. O fluido supercrítico após extração permitiu a coleta do extrato num tubo coletor;
- h) A válvula micrométrica foi aberta e a taxa de fluxo desejada foi mantida constante, utilizando um medidor de fluxo;
- i) Finalizando a extração, o processo seguiu com a despressurização;
- j) As válvulas de entrada foram fechadas e o forno foi desligado e a porta aberta;
- k) A válvula de ventilação do forno foi aberta;

- l) As tubulações foram lavadas, ligando uma seringa com uma placa de aço inoxidável na linha de extração. A lavagem foi realizada com etanol;
- m) O vaso de coleta foi retirado do sistema para a medição da massa de extrato e consequente determinação do rendimento global. Em seguida, o extrato foi armazenado em frasco protegido da luz, oxigênio e temperatura inferior a 5 °C.

4.2.3 Preparação da Célula de Extração

O empacotamento da célula de extração, com dimensões de 3,20 cm de diâmetro interno e 15,60 cm de comprimento, 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 10).

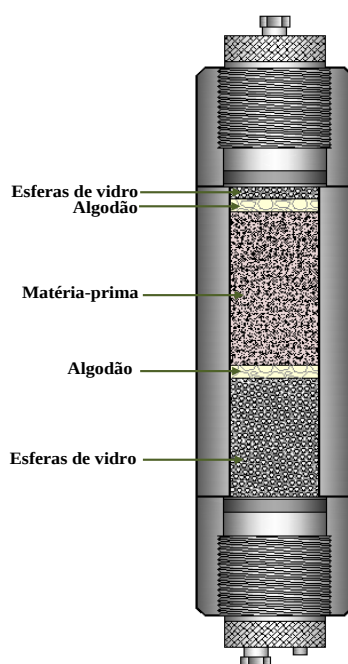


Figura 10. Ilustração do leito extração.

4.2.4 Determinação das Melhores Condições Operacionais

Os ensaios da SFE foram realizados em folha e caule de *C. sicyoides*, utilizando CO₂ e CO₂+cossolvente (etanol) (pureza 96,0 %, Dinâmica, Brasil). Os parâmetros operacionais mantidos constantes foram o tempo de extração estática (t_E) de 30 min, tempo de extração dinâmica (t_D) de 180 min, a vazão de CO₂ de 2,5 L/min e a massa de matéria-prima de 10 g. O procedimento de extração foi realizado com base em uma Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) com um planejamento estatístico de Box-Behnken, para três fatores ou

variáveis independentes: pressão, temperatura e % de cossolvente (etanol) e três níveis (−1, 0 e +1), como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Variáveis independentes com seus valores reais e codificados, utilizadas no planejamento estatístico de Box-Behnken.

Variáveis de independentes	Unidade	Notação	Níveis		
			− 1	0	+ 1
Pressão	bar	X_1	200	300	400
Temperatura	°C	X_2	40	50	60
Cossolvente (etanol)	%	X_3	0	5	10

As variáveis independentes foram estudadas para obter as variáveis respostas: rendimento global de extração, compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante. Na Tabela 3 são apresentados os 15 ensaios experimentais do planejamento estatístico de Box-Behnken. O número de ensaio é dado pela Equação 5:

$$N = 2k(k - 1) + C_0 \quad (5)$$

Onde:

k: número de variáveis;

C_0 : número de réplicas no ponto central que equivale a três.

Os experimentos foram realizados em duplicatas com a execução aleatorizada. O programa Statistica versão 7.0 foi utilizado para a análise de variância (ANOVA) e definir o coeficiente de determinação (R^2). Para os testes estatísticos foi utilizado um nível de significância de 5 %.

4.2.5 Determinação dos Rendimentos Globais de Extração

Os rendimentos globais foram calculados a partir da razão matemática entre a massa de extrato (os extratos com cossolvente foram submetidos à evaporação) e a massa de amostra (folha e caule) em base seca (b.s.) como pode ser visualizada na Equação 6:

$$X_{0 \text{ b.s.}}(\%) = \frac{m_o}{m_a \times \left(1 - \frac{U_a}{100}\right)} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

m_o : massa de extrato (g);

m_a : massa de amostra em (g);

U_a : umidade da amostra (%).

Tabela 3. Condições de extração com fluido supercrítico (SFE) segundo o planejamento estatístico de Box-Behnken.

Nº de Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Cossolvente (etanol) (%)
1	-1	-1	0	200	40	5
2	+1	-1	0	400	40	5
3	-1	+1	0	200	60	5
4	+1	+1	0	400	60	5
5	-1	0	-1	200	50	0
6	+1	0	-1	400	50	0
7	-1	0	+1	200	50	10
8	+1	0	+1	400	50	10
9	0	-1	-1	300	40	0
10	0	+1	-1	300	60	0
11	0	-1	+1	300	40	10
12	0	+1	+1	300	60	10
13	0	0	0	300	50	5
14	0	0	0	300	50	5
15	0	0	0	300	50	5

4.2.6 Cálculo de Densidade

A densidade do CO₂ foi calculada no simulador *Aspen Hysys* (parte integrante do pacote comercial *Aspen One* 8.6) empregando a equação de estado Redlich-Kwong-Aspen (RK-Aspen). Para as misturas solvente (CO₂)+cosolvente (etanol), a densidade foi calculada utilizando a equação de estado Redlich-Kwong-Aspen (RK-Aspen) com a regra de mistura de RK-Aspen com dois parâmetros de interação binária determinados por Silva (2015) a partir de dados experimentais de equilíbrio de fases de Secuianu *et al.*, 2008.

4.3 Extração Convencional por Soxhlet

Os ensaios para a obtenção do extrato hexânico e extrato etanólico, foram realizados no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LABIOTEC/FEA-UFPA), utilizando-se uma relação soluto-solvente de 1:10. Foi empregado 15 g de folha e caule de *C. sicyoides* para 150 mL de etanol e 8 g para 80 mL de hexano (pureza 65,0 %, Vetec, Brasil). As misturas de (*C. sicyoides*+solvente) foram mantidas em refluxo por 3 h em aparelho Soxhlet de 500 ml (Figura 11). Os solventes foram removidos por evaporação. O rendimento do extrato bruto foi calculado pela Equação 6.

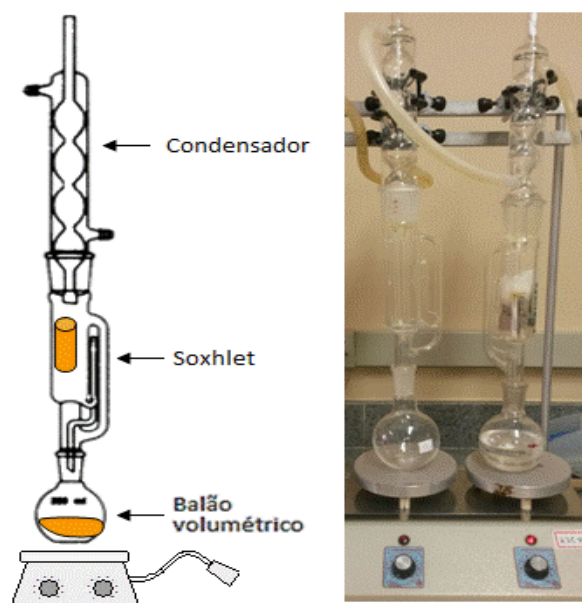


Figura 11. Esquema do aparato experimental utilizado na extração convencional por Soxhlet.

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 extratos de *C. sicyoides* 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 (ICEN/UFPA). Foram aplicados 50 µg de cada extrato (10 µL de uma solução de 5.000 ppm) em forma de banda em placas de sílica gel SiliaPlate TLC Glass Backed TLC Extra Hard Layer 60 Å (SiliCycle Inc, Canada) com o auxílio do módulo aplicador automático de amostras (CAMAG, ATS 4-Automatic TLC Sampler, Suíça) os extratos foram dispostos nas placas conforme mostra a Figura 12.

O método de eluição cromatográfica foi realizado em módulo de desenvolvimento múltiplo automático (CAMAG, AMD 2-Automated Multiple Development, Suíça) onde foi utilizado um sistema de eluição em gradiente amplo, composto por dez passos, tendo como fase móvel diclorometano (pureza 99,9 %, Tedia, Brasil) e metanol (pureza 99,9 %, Tedia, Brasil) em uma proporção de (95:5), acidificado com 1 % ácido fórmico (pureza 85 %, ISO FAR, Brasil). Para a escolha dos solventes que compõem o gradiente ou fase móvel, realizou-se previamente um teste de seletividade até que se encontrasse o sistema ideal para a visualização de cada banda, usando-se clorofórmio (pureza 99,8 %, Tedia, USA), tolueno (pureza 99,5 %, Tedia, USA), diclorometano, acetato de etila (pureza 99,5 %, Tedia, USA), acetona (pureza 99,5 %, Tedia, USA), metanol e etanol (pureza 99,5 %, Tedia, USA), com os

extratos de *C. sicyoides*, utilizando placa de sílica SiliaPlate TLC-Alumínio 60 F₂₅₄ (SiliCycle Inc, Canada). Nesta etapa as placas foram eluídas em cubas de eluição contendo 100 % de cada solvente orgânico e foram observadas sob luz visível e sob luz Ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 366 nm.

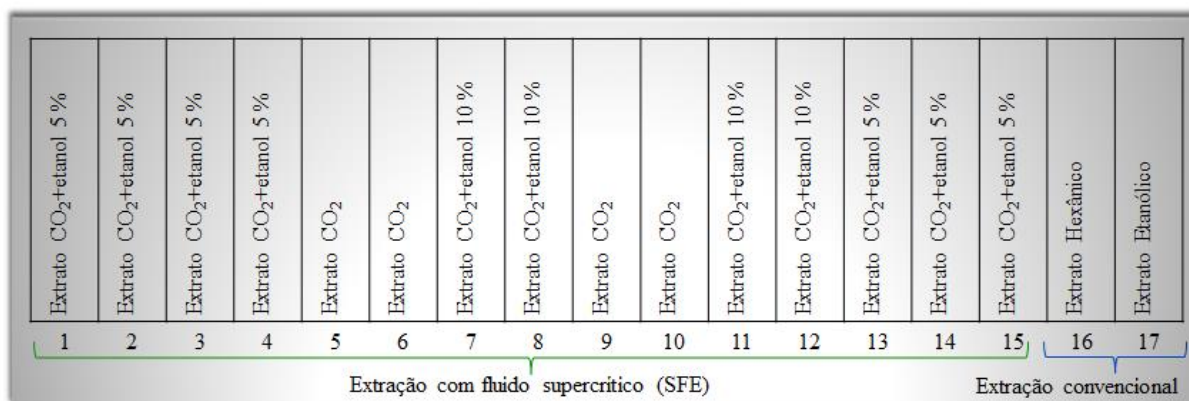


Figura 12. Disposição dos extratos de *C. sicyoides* na placa para o análise por CCDAE.

Para a identificação das classes específicas de compostos químicos, as placas desenvolvidas foram reveladas até o aparecimento de bandas com coloração característica, com os reveladores químicos: Vanilina Ácido Sulfúrico (VAS) (Merck, Brasil) específico para identificação de terpenos, esteróides e ácidos graxos, e com cloreto férrico (FeCl₃) (pureza 97 %, Sigma-Aldrich, Brasil) para identificação de compostos fenólicos e visualizadas sob luz visível. Além disso, foi revelada com reagente de Produto Natural/Polietilenoglicol (NP/PEG), uma mistura de Difenilboriloxietilamina (NP) (Sigma-Aldrich, Brasil) e Polietilenoglicol 4000 (PEG) (Sigma-Aldrich, Brasil) para identificação de flavonoides e observadas sob luz UV a 366 nm. Todas as placas foram fotodocumentadas com o auxílio do módulo TLC Visualizer (CAMAG, Suíça).

4.4.2 Análise de Compostos Fenólicos Totais (CFT)

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LABIOTEC/FEA-UFPA) utilizando o método de Folin-Ciocalteu segundo a metodologia descrita por Singleton *et al.* (1999) e Georgé *et al.* (2005). Os extratos de *C. sicyoides*, foram dissolvidos em uma solução de etanol a 7 %, na concentração de 140 mg/L. Assim, 0,5 mL desta solução, foi submetida à reação com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (Tedia, Brasil) a 10 % por 2 min e, finalmente, adicionou-se 2 mL de solução de carbonato de sódio (99,5 %, Vetec, Brasil) a 7,5 %. Após a incubação, à temperatura

ambiente, no escuro, por 60 min e as medidas das absorvâncias foram realizadas em um espectrofotômetro (Thermo Scientific, modelo Evolution 60, USA) a 760 nm contra o branco, preparado similar aos extratos.

Para a quantificação, foi utilizado como padrão o ácido gálico (98,0 %, Vetec, Brasil) nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L, para construção da curva analítica. A partir da equação da reta ($Y=0,0099x-0,0277$) onde y é a absorvância e x é a concentração com $R^2=0,9971$, foi realizado o cálculo do teor de fenólicos totais, expresso em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato de *C. sicyoides* em base seca (b.s.) (mg EAG/g de extrato).

4.4.3 Análise de Flavonoides Totais (FT)

A determinação de flavonoides totais foi realizada no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LABIOTEC/FEA-UFPA) usando o procedimento descrito por Dowd (1959) e Meda *et al.* (2005), onde 0,5 mL de solução etanólica de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) (pureza 99,0 %, Fluka, Alemanha) a 2 %, foi misturada com o mesmo volume da solução de amostra (extratos de *C. sicyoides*, dissolvidos em etanol na concentração de 140 mg/L). Após 10 min à temperatura ambiente e no escuro, leu-se a absorvância a 425 nm em um espectrofotômetro (Thermo Scientific, modelo Evolution 60, USA) contra um branco, consistindo de uma solução de 0,5 mL de amostra com 0,5 mL de etanol sem $AlCl_3$. Para a quantificação foi utilizado como padrão a quercetina (pureza $\geq 95,0$ %, Sigma-Aldrich, Brasil) nas concentrações 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 mg/L, para construção da curva analítica. A partir da equação da reta ($Y=0,0355x+0,0127$) com $R^2=0,9983$, foi realizado o cálculo do teor de flavonoides totais, expresso como mg de equivalentes de quercetina (EQ) por grama de extrato de *C. sicyoides* em base seca (b.s.) (mg EQ/g de extrato).

4.4.4 Extração em Fase Sólida (SPE)

Os extratos obtidos por SFE e Soxhlet apresentaram, em termos qualitativos, uma coloração verde escura indicando a presença de clorofila (Figura 13). Portanto, durante o preparo da amostra foi realizada a extração em fase sólida (SPE-Solid Phase Extraction) com o propósito da remoção de compostos interferentes como a clorofila a fim de continuar com o desenvolvimento da análise cromatográfica e permitir a identificação dos compostos alvo. A SPE foi realizada no Centro de Valorização Agroalimentar de Compostos Bioativos da Amazônia (CVACBA) segundo o procedimento descrito por Irakli *et al.*, (2012) utilizando-se

cartuchos C₁₈ (Strata, 55 µm, 70 Å, 200 mg/ 3 mL, Phenomenex, Torrance, CA) os quais foram acondicionados com 3 mL de metanol e 3 mL água ultrapura acidificadas com 1 % de ácido fórmico (pureza 85 %, ISOFAR, Brasil). Logo, 10 mg de extrato diluído em metanol a 33,3 % foi colocado no cartucho C₁₈ e eluído. Depois, verteu-se sobre o cartucho 3 mL de água ultrapura acidificada. Os analitos que ficaram adsorvidos no cartucho foram eluídos com metanol a 70 % acidificado. As frações foram secas e reconstituídas com metanol a 80 %. Posteriormente as frações foram analisadas por HPLC-DAD.

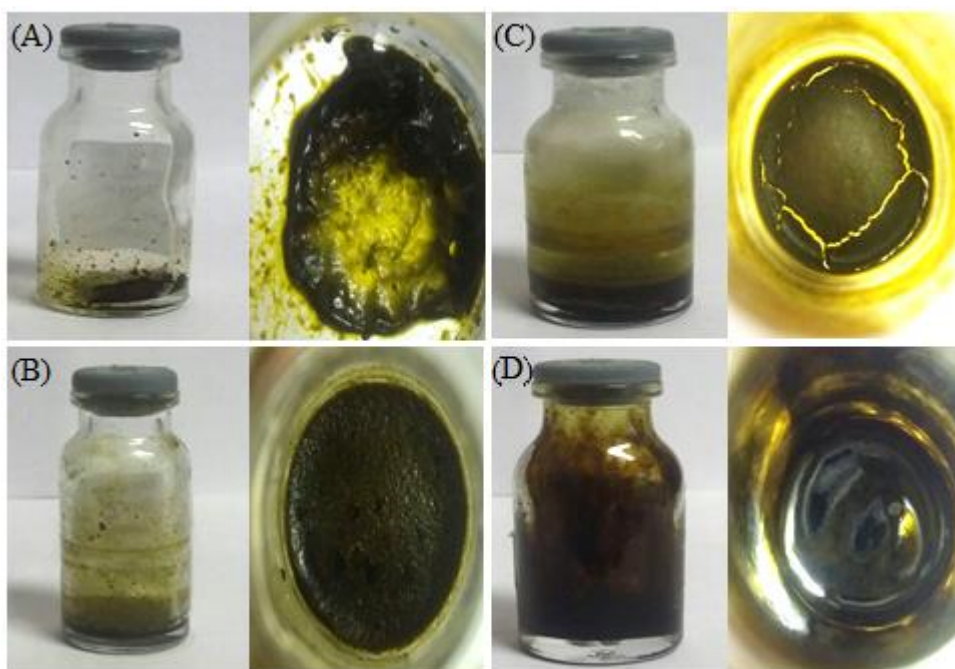


Figura 13. Imagens dos extratos *C. sicyoides*: (A) SFE-CO₂; (B) SFE-CO₂+cossolvente (etanol); (C) extrato hexânicos; (D) extrato etanólico.

4.4.5 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A identificação de flavonoides nos extratos de *C. sicyoides* foi realizada no Centro de Valorização Agroalimentar de Compostos Bioativos da Amazônia (CVACBA) de acordo com o método descrito por Beserra *et al.* (2016) empregando um sistema de cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Thermo Fisher Scientific, serie Ultimate™ 3000, Bremen, Alemanha), que consiste de um detector de arranjo de diodos DAD (DAD-3000), equipado com uma bomba quaternária (LPG-3400RS) e injetor automático de amostra. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa (Phenomenex C₁₈ 250 mm x 4,6 mm, 4µm de tamanho da partícula). As análises foram realizadas nos extratos obtido no item 4.4.4 dissolvidos em metanol 80 % com uma concentração final de 1 mg/mL, para injeção no cromatógrafo foram filtrados em filtros (Filtrilo em Nylon, com tamanho de poro

de 0,45 μm) o volume de injeção foi de 20 μL de amostras e as separações foram feitas com uma taxa de fluxo constante de 0,6 mL/min, a temperatura de 25°C.

As fases móveis utilizadas foram água ultrapura (solvente A) e metanol grau HPLC (solvente B), ambas acidificadas com 0,1 % de ácido fórmico (pureza 85,0%, ISO FAR, Brasil) a proporção foi de: 5-100 % de B em A por 70 min. Os espectros foram obtidos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas foram processados a 254 nm. A identificação dos compostos baseou-se nos tempos de retenção, nos espectros, comparados com os padrões externos (quercetina, quercetina 3-glicosídeo e quercetina 3-raminosídeo) todos adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil).

4.5 Atividade Antioxidante dos Extratos

4.5.1 Análise Qualitativa da Atividade Antioxidante

Os extratos de *C. sicyoides* foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) de acordo com o método descrito no item 4.4.1. A placa desenvolvida foi revelada sob luz visível com uma solução metanólica do radical DPPH• (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil) (Sigma-Aldrich, Brasil) a 25 μM até o aparecimento de manchas amarelas sob fundo de coloração púrpura, indicativo de possível atividade antioxidante.

4.5.2 Análise Quantitativa da Atividade Antioxidante

A análise quantitativa da atividade antioxidante dos extratos de *C. sicyoides* pelo método DPPH foi realizada no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LABIOTEC/FEA-UFGA) de acordo com o método proposto por Brand-Williams *et al.* (1995) baseado na captura do radical DPPH• pelos antioxidantes presentes na amostra, produzindo decréscimo da absorbância a 515 nm. Esse método foi modificado por Sánchez-Moreno *et al.* (1998) para medir os parâmetros cinéticos: EC₅₀ (quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50 % a quantidade inicial do radical DPPH•) e t_{EC50} (tempo que a amostra necessita para reduzir em 50 % a quantidade inicial do radical).

A partir de uma solução inicial de DPPH a 60 μ M (2,4 mg de DPPH diluído em 100 mL de etanol) com absorbância inicial em torno de $0,70 \pm 0,05$, foram preparadas em balões volumétricos de 10 mL soluções variando a concentração de 10 a 60 μ M, para a construção da curva analítica do DPPH, as medidas das absorbâncias foram realizadas em um espectrofotômetro (Thermo Scientific, modelo Evolution 60, USA) a 515 nm utilizando etanol como branco.

A partir dos extratos de *C. sicyoides* foi realizada uma cinética para determinar o tempo de estabilização da absorbância para cada amostra. Foram preparadas em tubos de ensaio cinco diluições diferentes (10, 7, 6, 5 e 4 mg/mL). Uma alíquota de 0,1 mL dos extratos foi transferida para tubos de ensaio previamente revestidos com papel alumínio. Em seguida foram adicionados 3,9 mL de solução de DPPH a 60 μ M. O decréscimo da absorbância foi monitorado a cada minuto, a 515 nm, até sua estabilização. Foi utilizado etanol, como branco, para calibrar o espectrofotômetro.

Determinado o tempo de estabilização, foram preparadas diluições diferentes a partir do extrato. Uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi adicionada a 3,9 mL de solução de DPPH a 60 μ M. Todas as determinações foram acompanhadas de um controle feito substituindo-se o volume do extrato por igual volume (0,1 mL) de etanol. A leitura da absorbância final para o cálculo do EC₅₀ foi feita após a estabilização da absorbância (tempo EC₅₀). A atividade antioxidante foi expressa como a concentração de antioxidante necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial do radical DPPH• (EC₅₀). O decréscimo da absorbância do DPPH foi expresso como g de extratos de *C. sicyoides* por g de DPPH base seca (b.s.) (g de extrato/g de DPPH).

4.6 Avaliação do Potencial Neuroprotetor e Anti-inflamatório do Extrato Obtido Via Extração Supercrítica em Ensaios *in vivo* de Isquemia Cerebral Focal Induzida em Ratos

O extrato de *C. sicyoides* obtido por SFE nas condições operacionais de 50 °C, 400 bar e 10 % de cossolvente (etanol), foi utilizado no Laboratório de Neuroproteção e Neurorregeneração Experimental (LNNE/ICB-UFPA) para testar o potencial neuroprotetor e anti-inflamatório do extrato após isquemia cerebral focal induzida em ratos adultos machos da raça *Wistar*, de acordo com o modelo experimental proposto por Franco *et al.* (2012) e Guimaraes-Santos *et al.* (2012), utilizando os efeitos vasoconstritores do peptídeo endotelina-

1 (ET-1) para induzir isquemia focal no córtex motor dos animais segundo protocolo adaptado por Fuxe *et al.* (1997) e Hughes *et al.* (2003).

4.6.1 Animais e Procedimentos Cirúrgicos

Foram utilizados oito ratos adultos machos da raça *Wistar*, sendo cinco animais isquêmicos e três animais controle, com peso de aproximadamente 0,250 kg, alojados em gaiolas padrão com alimento e água fornecidos *ad libitum*, cedidos pelo biotério central da Universidade Federal do Pará. Todos os procedimentos experimentais foram realizados em obediência às normas sugeridas pela *Society for Neuroscience, National Institute of Health* (NIH, USA), Conselho Nacional de Controle de Animais de Experimentação (CONCEA) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE-UFPA: 137-13).

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal (i.p.) com injeção de uma mistura de cloridrato de cetamina (Vetanarcol®, Köning. 72 mg/kg) e cloridrato de xilazina (Kensol®, Köning. 9 mg/kg). Após a ausência dos reflexos, foram colocados sobre o estereotático (Insight® EFF-336), sob a proteção de uma manta térmica. Adotou-se a partir do bregma as seguintes coordenadas: médio-lateral: 2,3; anteroposterior: 1,2; dorsoventral: 0,5. Realizou-se a craniotomia para exposição da superfície cortical, injetou-se a concentração de 80 pMols de Endotelina-1 (ET-1) (E7764 Sigma-Aldrich, USA) diluída em 1 µL de corante azul colanil.

Após os procedimentos cirúrgicos os animais permaneceram alojados em gaiolas padrão com alimento e água fornecidos *ad libitum*, temperatura controlada em 24°C, ciclo circadiano 12/12 h claro-escuro durante a sobrevivência de sete dias, onde foram novamente anestesiados (i.p.) e submetidos a perfusão para exposição do saco pericárdico com solução salina 0,9 % heparinizada seguida de Paraformaldeído a 4 %.

4.6.2 Microtomia e Análise Imunohistoquímica

Os encéfalos foram crioprotetidos em diferentes concentrações com solução a base de glicerol com 30 % de sacarose e seccionadas utilizando um criostato (Zeiss HM505E) em 50 µm de espessura. A área de lesão e as células inflamatórias foram identificadas utilizando o corante violeta de cresila.

4.6.3 Tratamento com Extrato de *C. sicyoides* Obtido por SFE

O extrato de *C. sicyoides* foi administrado via intraperitoneal (i.p) em uma concentração diária de 100 mg/kg logo após a injeção de ET-1, a dose foi aplicada em um ciclo de 12/12 h durante o período de sobrevida. O grupo controle foi constituído por animais isquêmicos, tratados apenas com uma solução fisiológica com 5 % de tween.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da Matéria-prima e Leito de Extração

A matéria-prima de estudo constituída de folha e caule de *C. sicyoides* apresentou $7,75 \pm 0,31$ % de umidade, diâmetro médio das partículas de $0,50 \pm 0,07$ mm, densidade aparente (ρ_a) de $0,24 \text{ g/cm}^3$, densidade real (ρ_r) de $1,32 \pm 0,02 \text{ g/cm}^3$ e porosidade do leito (ϵ) de 0,82. Nas Figuras 14, 15 e 16, são apresentadas as imagens obtidas por MEV exibindo a forma e o aspecto das partículas da folha e caule de *C. sicyoides*. Observa-se que as partículas apresentaram formas e tamanhos variados, mostrando uma forma irregular para as folhas e cilíndrica para o caule.

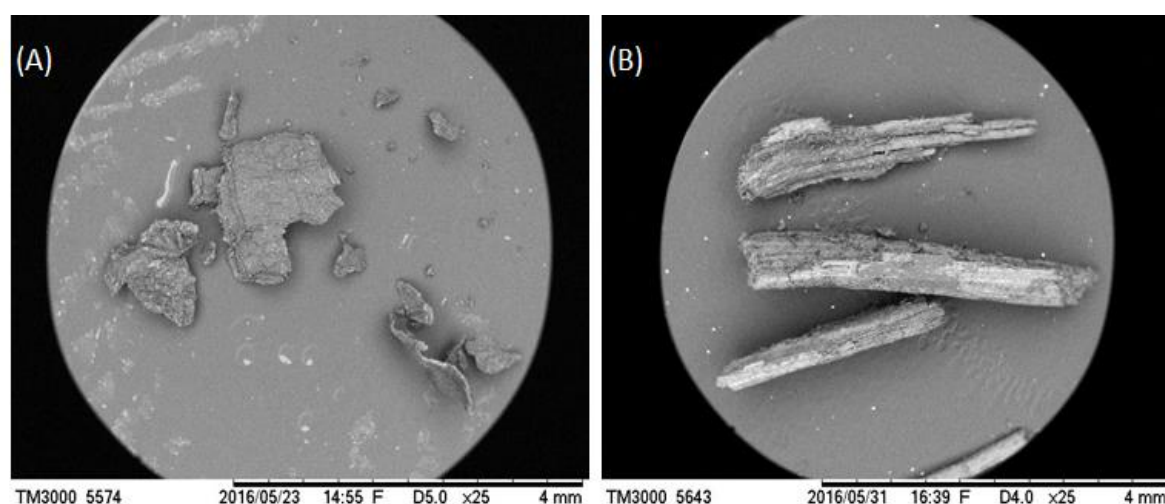


Figura 14. Imagens obtidas por MEV da *C. sicyoides*: (A) folha e (B) caule (x 25).

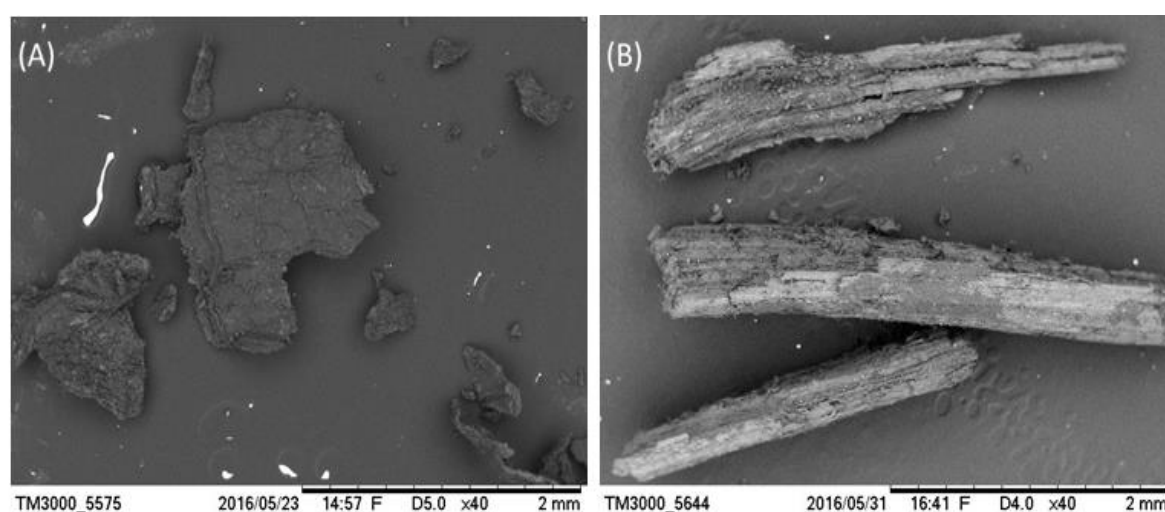


Figura 15. Imagens obtidas por MEV da *C. sicyoides*: (A) folha e (B) caule (x 40).

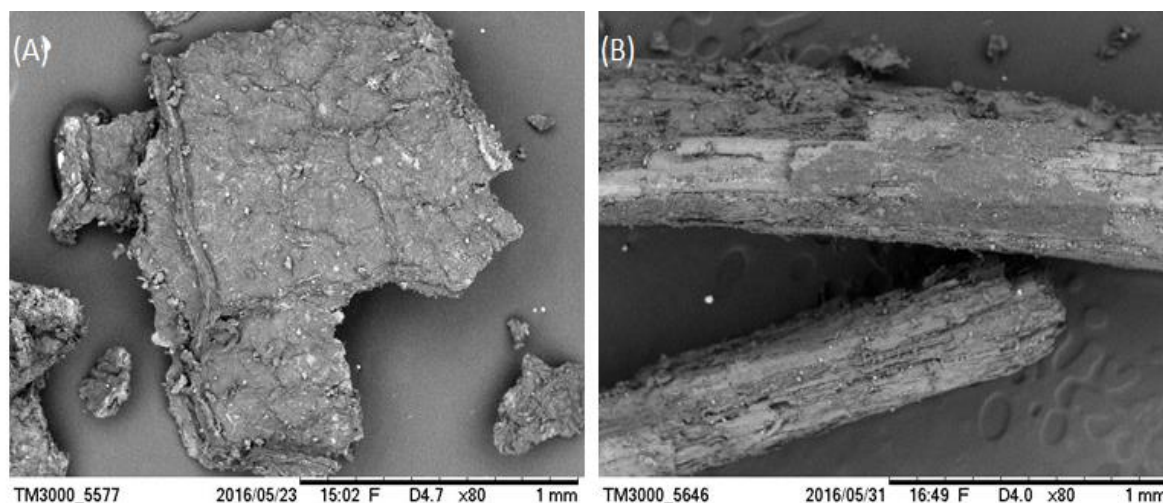


Figura 16. Imagens obtidas por MEV da *C. sicyoides*: (A) folha e (B) caule (x 80).

5.2 Extração com Fluido Supercrítico (SFE)

5.2.1 Determinação dos Rendimentos Globais de Extração

Conforme a Tabela 4 é possível verificar que o rendimento global de extração em base seca variou de 1,27 a 3,21 % sendo que o menor rendimento foi obtido na condição de 200 bar, 50 °C, sem emprego de cossolvente e densidade de 692,8 kg/m³, enquanto o maior rendimento foi obtido na condição de 400 bar, 50 °C, 10 % de cossolvente (etanol) e com uma densidade de 861,3 kg/m³. Na estimativa dos efeitos e o coeficiente de regressão das variáveis independentes em função da resposta apresentados na Tabela 5, pode-se observar que a pressão e a % de cossolvente (etanol) influenciaram significativamente ($p \leq 0,05$) a resposta na sua forma linear. No entanto, foi analisado o p-valor para a variável não significativa (temperatura) e observou-se que na sua forma linear deve ser considerada significativa porque apresentou um p-valor próximo ao de alfa (0,05). Entretanto, as interações entre as variáveis em estudo não foram significativas ($p > 0,05$). O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,97 mostrando que 97,0 % da variação da resposta pode ser explicada pelo modelo.

O resultado da análise de variância (ANOVA) para esta resposta apresentado na Tabela 6, observa-se que a falta de ajuste não foi significativa, o que permite a utilização do modelo matemático. Isto significa que o rendimento global de extração é máximo quando a pressão, temperatura e a % de cossolvente (etanol) estão em seus níveis maiores de 400 bar, 60 °C e 10 % respectivamente. As superfícies de respostas foram plotadas para ajudar a avaliar os resultados (Figuras 17, 18 e 19).

Tabela 4. Planejamento Box-Behnken, com as variáveis independentes sobre as variáveis de respostas avaliadas para os extratos de *C. sicyoides* obtidos via SFE, comparado à extração convencional (Soxhlet).

Extração com fluido supercrítico (SFE)											
Nº de Ensaio	Pressão (bar)		Temperatura (°C)		Cossolvente (etanol) (%)		Densidade (kg/m ³)	Rendimento (%)	CFT (mg EAG/g de extrato)	FT (mg EQ/g de extrato)	DPPH (EC ₅₀ expresso em g de extrato/ g de DPPH)
1	−1	(200)	−1	(40)	0	(5)	775,6	1,84	52,43	3,85	596,34
2	+1	(400)	−1	(40)	0	(5)	889,7	2,08	53,21	4,43	595,62
3	−1	(200)	+1	(60)	0	(5)	678,5	1,94	51,12	3,70	610,38
4	+1	(400)	+1	(60)	0	(5)	831,3	2,69	56,08	8,06	597,71
5	−1	(200)	0	(50)	−1	(0)	692,8	1,27	37,83	1,08	899,14
6	+1	(400)	0	(50)	−1	(0)	859,9	1,80	44,09	0,14	897,36
7	−1	(200)	0	(50)	+1	(10)	756,1	2,37	57,38	10,97	415,34
8	+1	(400)	0	(50)	+1	(10)	861,3	3,21	65,20	9,01	379,60
9	0	(300)	−1	(40)	−1	(0)	836,1	1,52	43,82	0,28	896,28
10	0	(300)	+1	(60)	−1	(0)	753,8	2,03	41,74	0,72	898,50
11	0	(300)	−1	(40)	+1	(10)	845,2	2,58	49,04	13,44	460,81
12	0	(300)	+1	(60)	+1	(10)	784,3	2,76	47,21	3,12	440,88
13	0	(300)	0	(50)	0	(5)	809,4	2,35	38,61	3,70	609,80
14	0	(300)	0	(50)	0	(5)	809,4	2,16	43,56	4,50	598,23
15	0	(300)	0	(50)	0	(5)	809,4	2,38	40,96	5,52	599,33
Extração convencional por Soxhlet											
Extrato hexânico			-	-	-	-	-	5,06	60,51	6,97	897,99
Extrato etanólico			-	-	-	-	-	11,02	150,19	53,94	325,67

Tabela 5. Estimativa dos efeitos e coeficientes de regressão para o rendimento global de extração.

	Efeitos	Coeficientes regressão	p
Média/Interc.	2,1742	2,1742	0,0003
Pressão (L)	0,5900	0,2950	0,0198*
Pressão (Q)	0,1096	0,0548	0,2196
Temperatura (L)	0,3500	0,1750	0,0535*
Temperatura (Q)	0,0496	0,0248	0,5083
Cossolvente (etanol) (L)	1,0750	0,5375	0,0061*
Cossolvente (etanol) (Q)	0,0246	0,0123	0,7304
P*T	0,2550	0,1275	0,1660
P*E	0,1550	0,0775	0,3235
T*E	-0,1650	-0,0825	0,3008
R ²	0,97	-	-
R ² _{adj}	0,91	-	-

(*)= $p \leq 0,05$; L= efeito linear; Q= efeito quadrático.

Tabela 6. Análise de variância (ANOVA) para o rendimento global de extração.

	SQ	GL	MQ	Teste F	p
Pressão (L)	0,6962	1	0,6962	48,9133	0,0198*
Pressão (Q)	0,0443	1	0,0443	3,1152	0,2196
Temperatura (L)	0,2450	1	0,2450	17,2131	0,0535*
Temperatura (Q)	0,0091	1	0,0091	0,6378	0,5083
Cossolvente (etanol) (L)	2,3113	1	2,3113	162,3829	0,0061*
Cossolvente (etanol) (Q)	0,0022	1	0,0022	0,1568	0,7304
P*T	0,0650	1	0,0650	4,5685	0,1660
P*E	0,0240	1	0,0240	1,6879	0,3235
T*E	0,0272	1	0,0272	1,9128	0,3008
Falta de ajuste	0,0829	3	0,0276	1,9415	0,3578
Erro puro	0,0285	2	0,0142		
Total	3,5313	14			

(*)= $p \leq 0,05$; L= efeito linear; Q= efeito quadrático; SQ= soma quadrática; GL= Grau de liberdade; MQ= média quadrática.

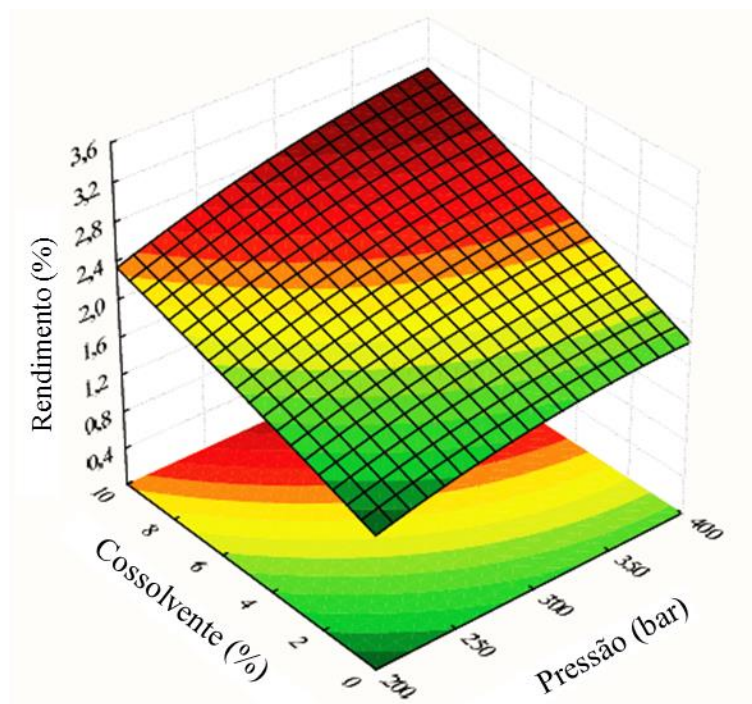


Figura 17. Superfície de resposta para rendimento global de extração em função da pressão e % de cossolvente.

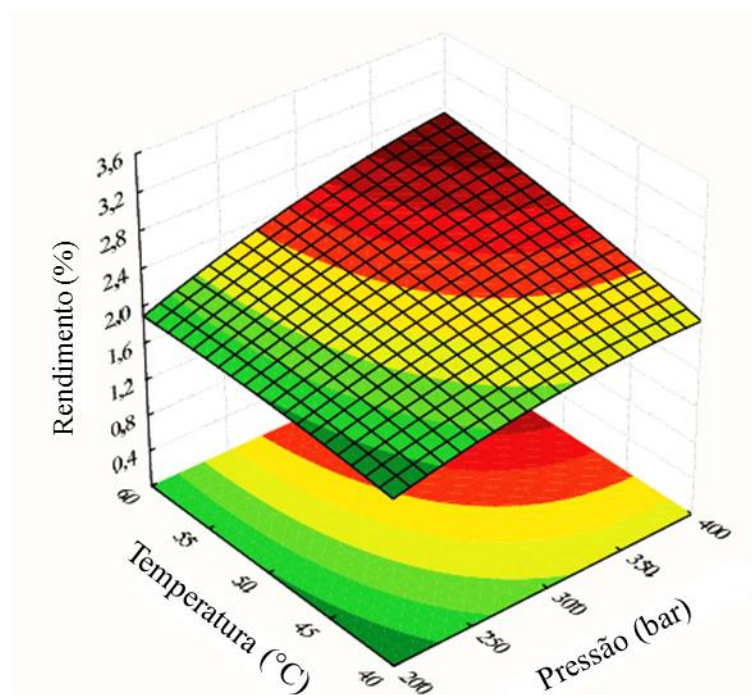


Figura 18. Superfície de resposta para rendimento global de extração em função da pressão e temperatura.

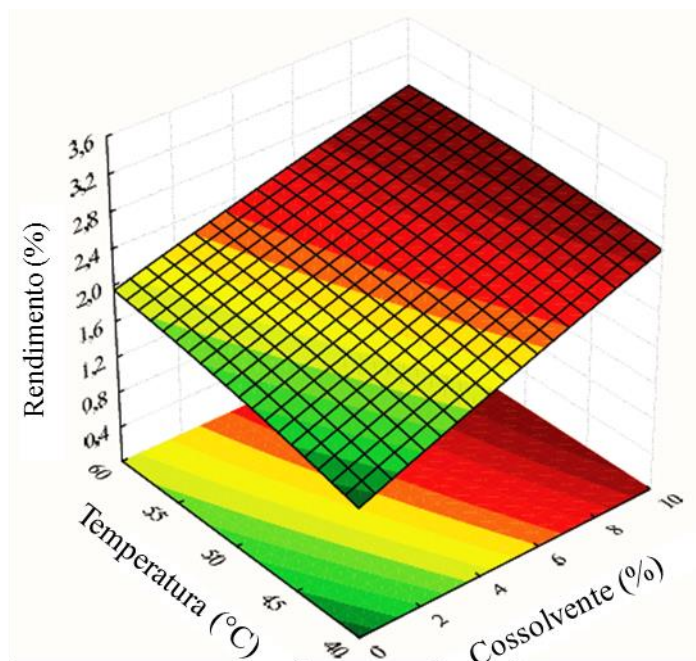


Figura 19. Superfície de resposta para rendimento global de extração em função da % de cossolvente e temperatura.

Resultados semelhantes aos deste trabalho já foram relatados na literatura para SFE de outras plantas. Del Valle *et al.* (2005) reportaram, para folhas de boldo (*Peumus boldus* M.), que o rendimento global de extração variou de 2,8 a 4,9 % para extratos obtidos utilizando CO_2 e CO_2 + 5 % de cossolvente (etanol), respectivamente. Veggi *et al.* (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 2,5 % utilizando CO_2 e CO_2 + 10 % de cossolvente (etanol), respectivamente. Com um percentual de cossolvente maior que 10 %, é notório o aumento do rendimento apresentado no trabalho de Dias *et al.* (2012) para folha de Jambú (*Spilanthes oleracea*), cujo rendimento variou de 1,59 a 5,82 % utilizando CO_2 e CO_2 + 50 % de cossolvente (etanol), respectivamente. Costa *et al.* (2015) encontraram nas folhas de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) um rendimento entre 0,31 a 14,5 % utilizando CO_2 e CO_2 + 25 % de cossolvente (etanol), respectivamente.

O rendimento global de extração sofre influência direta da pressão, temperatura e da adição de cossolvente, ou seja, estas variáveis afetam o processo de extração. 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. Além disso, quantidades baixas de cossolventes (5-10 %) têm sido utilizadas em estudos de extração supercrítica de compostos polares com a finalidade de aumentar o rendimento de extração destes compostos no CO₂ supercrítico (Brunner, 2005; Herrero *et al.*, 2013; de Melo *et al.*, 2014; Cornelio-Santiago *et al.*, 2017).

5.3 Extração Convencional por Soxhlet

As extrações por Soxhlet foram realizadas como extração de referência a fim de comparar os resultados de rendimento e a composição química dos extratos obtidos por SFE. Os rendimentos em base seca foram de 5,06 % para o extrato hexânico e de 11,02 % para o extrato etanólico (Tabela 4). Os resultados encontrados estão em conformidade com os valores obtidos por Murthy *et al.* (2003) que realizou extração por Soxhlet a partir de caule de uva-do-diabo (*Cissus quadrangularis*) utilizando hexano como solventes. Porém, maiores valores de rendimento foram reportados por Braga *et al.* (2007), Vasconcelos *et al.* (2007) e Beserra *et al.* (2016) de 23,65 %, 19 % e 27,6 % respectivamente, em estudos feitos na folha de *C. sicyoides* utilizando outros solventes e método de extração (maceração e percolação). Comparando os resultados da SFE com a extração por Soxhlet, pode ser observado que para os extratos obtidos por SFE o maior rendimento foi de 3,21 %, sendo inferior aos rendimentos obtidos por extração em Soxhlet utilizando solventes orgânicos, que representaram aproximadamente 1,57 (extrato hexânico) e 3,43 (extrato etanólico) vezes o valor do maior rendimento da SFE. O incremento do rendimento global é devido à reciclagem y/o refluxo do solvente e alta temperatura utilizada, que ajuda a reduzir a tensão superficial e viscosidade, aumentando a transferência de massa.

5.4 Determinação da Composição Química dos Extratos

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

Para a triagem fitoquímica dos extratos de *C. sicyoides* em Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE), realizou-se previamente um teste de seletividade, onde diferentes sistemas de solventes foram testados, as imagens das placas eluídas com 100 % de cada solvente orgânico estão apresentadas nas Figuras 20 e 21. Foram selecionados dois solventes orgânicos, sendo um de baixa polaridade (diclorometano) e outro de alta polaridade (metanol). O sistema ideal foi constituído de diclorometano/metanol (95:5), que permitiu a visualização e separação de cada banda, ou seja, apresentou uma boa separação dos compostos presentes nos extratos.

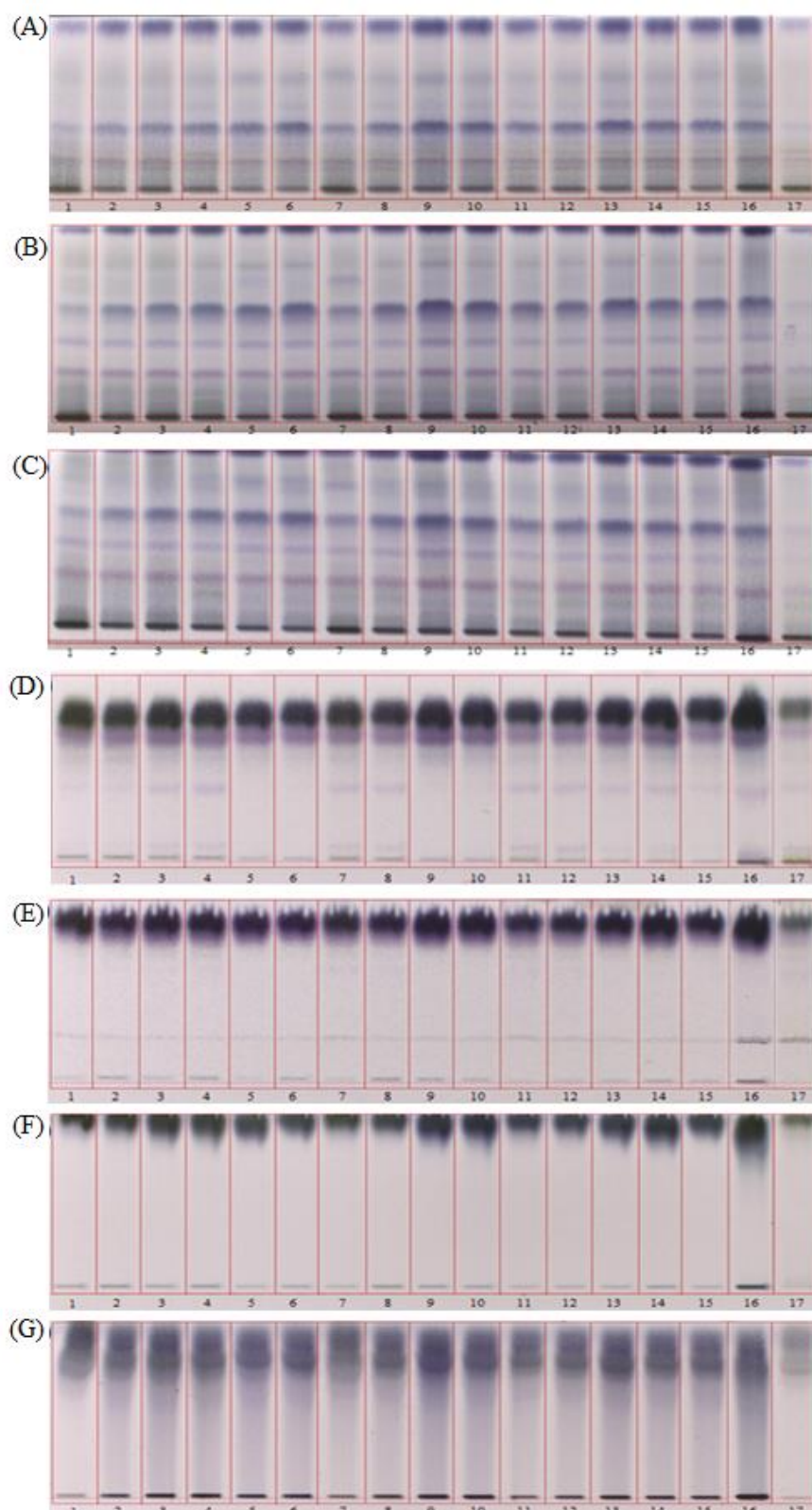


Figura 20. Teste de seletividade dos extratos de *C. sicyoides*: placas eluídas com (A) tolueno; (B) clorofórmio; (C) diclorometano; (D) acetato de etila; (E) acetona; (F) etanol; (G) metanol; visualizadas na luz visível.

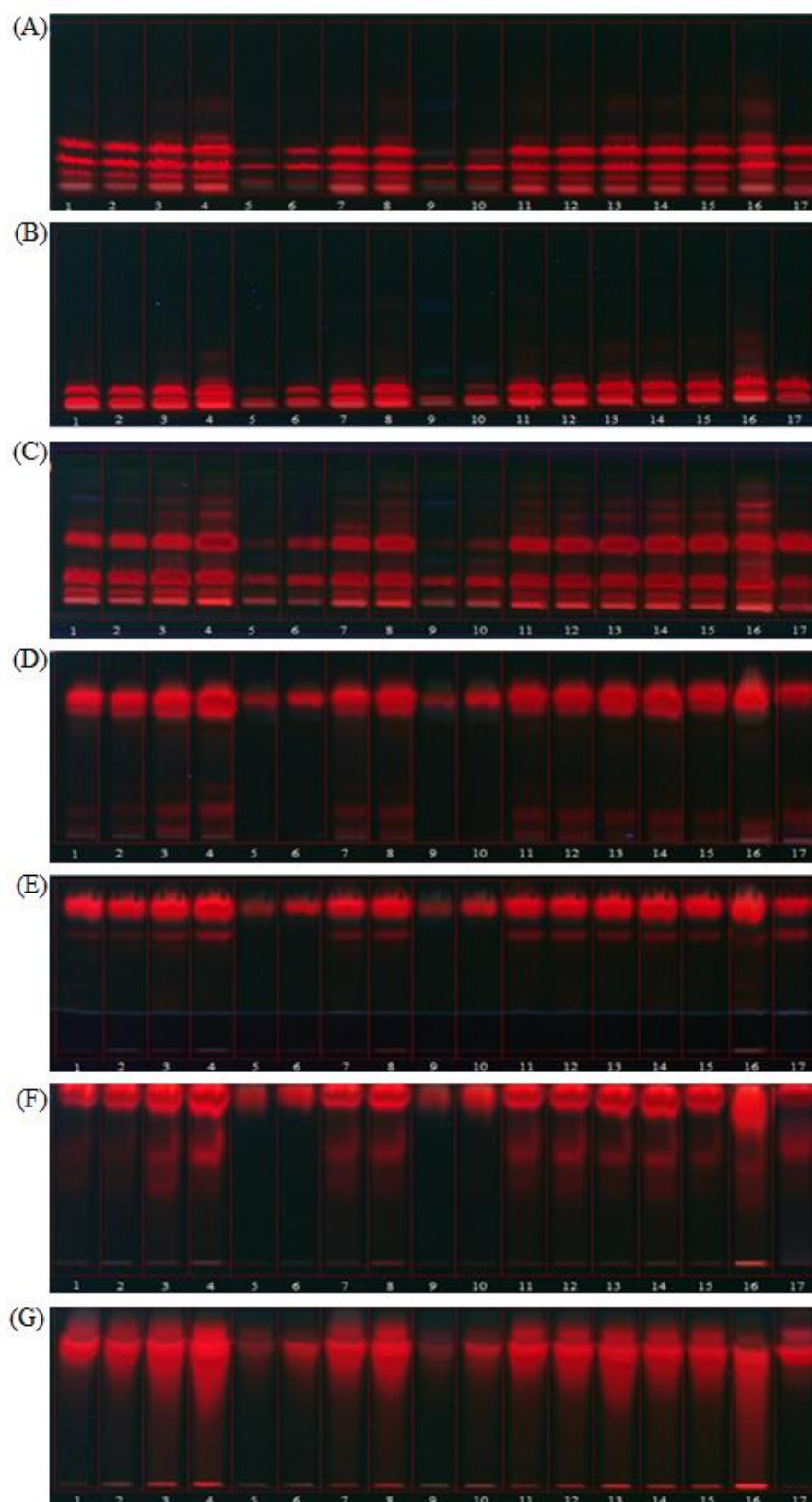


Figura 21. Teste de seletividade dos extratos de *C. sicyoides*: placas eluídas com (A) tolueno; (B) clorofórmio; (C) diclorometano; (D) acetato de etila; (E) acetona; (F) etanol; (G) metanol; visualizadas na luz UV 366 nm.

As placas desenvolvidas foram reveladas com diferentes reagentes que produzem cor característica para classes específicas de compostos químicos (Figura 22). Os compostos tornaram-se visíveis havendo a formação de bandas quando as placas foram borrifadas com os reveladores. Na placa (A) revelada com VAS demonstra a formação de bandas com coloração roxa/lilás indicando a provável presença de terpenos (Jork *et al.*, 1990; Wagner e Bladt, 2001). A placa (B) reveladas com FeCl_3 indica a possível presença de compostos fenólicos devido à formação de bandas de coloração alaranjado-marrom (Wagner e Bladt, 2001). Na placa (C) revelada com NP/PEG, quando é visualizada em luz UV no comprimento de onda de 366 nm, os compostos dos extratos tornaram-se fluorescentes ao serem excitadas por essa radiação e há a possível presença de flavonoides pela coloração amarela das bandas (Jork *et al.*, 1990; Wagner e Bladt, 2001). No extrato etanólico, há uma melhor identificação dessa classe de compostos.

Na Tabela 7, estão apresentados os resultados da triagem fitoquímica dos extratos que evidenciaram a presença (reação positiva) de constituintes químicos característico do *C. sicyoides* como os terpenos, compostos fenólicos e flavonoides. Resultados semelhantes já haviam sido encontrados por Viana *et al.* (2004) em extrato aquoso de *C. sicyoides* e Dias *et al.* (2017) para extrato hidroalcoólico de *C. sicyoides* analisados por CCD.

Tabela 7. Triagem fitoquímica dos extratos de *C. sicyoides*.

Nº de Ensaio	Extrato	Triagem Fitoquímica		
		Terpenos	Compostos Fenólicos	Flavonoides
1	CO ₂ + 5 % etanol	+	+	+
2	CO ₂ + 5 % etanol	+	+	+
3	CO ₂ + 5 % etanol	+	+	+
4	CO ₂ + 5 % etanol	+	+	+
5	CO ₂	+	+	+
6	CO ₂	+	+	+
7	CO ₂ + 10 % etanol	+	+	+
8	CO ₂ + 10 % etanol	+	+	+
9	CO ₂	+	+	+
10	CO ₂	+	+	+
11	CO ₂ + 10 % etanol	+	+	+
12	CO ₂ + 10 % etanol	+	+	+
13	CO ₂ + 5 % etanol	+	+	+
14	CO ₂ + 5 % etanol	+	+	+
15	CO ₂ + 5 % etanol	+	+	+
16	Hexânico	+	+	+
17	Etanólico	+	+	+

Reação positiva (+) para os compostos químicos avaliados.

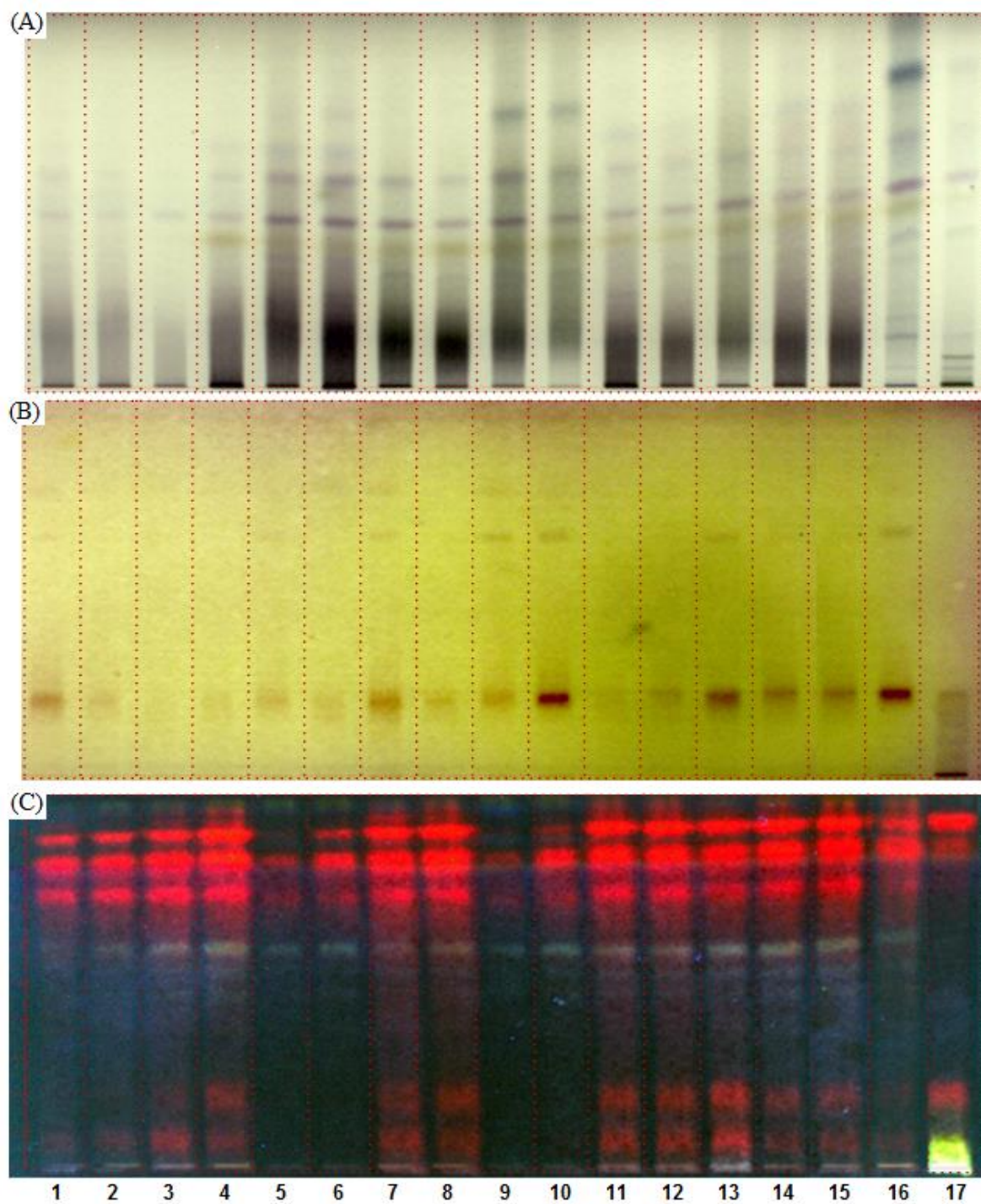


Figura 22. CCDAE dos extratos de *C. sicyoides*, placas reveladas com: (A) VAS; (B) FeCl_3 ; (C) NP/PEG.

5.4.2 Análise de Compostos Fenólicos Totais (CFT)

A quantificação de Compostos Fenólicos Totais (CFT) é uma estimativa do teor de todos os compostos pertencentes às subclasses de compostos fenólicos presentes nos extratos. Assim, os valores de compostos fenólicos totais encontrados para cada ensaio realizado a partir do planejamento deste estudo são mostrados na Tabela 4. Observa-se que o extrato com menor valor (37,83 mg EAG/g de extrato) nas condições de 200 bar, 50 °C, sem emprego de cossolvente e densidade de 692,8 kg/m³ e o maior valor (65,20 mg EAG/g de extrato) nas condições de 400 bar, 50 °C, 10 % de cossolvente (etanol) e com uma densidade de 861,3 kg/m³. A estimativa dos efeitos e o coeficiente de regressão das variáveis independentes em função da resposta são apresentados na Tabela 8. Pode-se observar que as variáveis que influenciaram significativamente ($p \leq 0,05$) o conteúdo de compostos fenólicos totais foram a pressão com efeito negativo sobre a resposta e a % de cossolvente (etanol) com efeito positivo, ambos na sua forma linear. Sugerindo então que foram as principais variáveis que influenciaram na resposta. Entretanto, a temperatura de extração e as interações entre as variáveis em estudo não foram significativas ($p > 0,05$). O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,84, mostrando que apenas 84,0 % da variação da resposta pode ser explicada pelo modelo.

Tabela 8. Estimativa dos efeitos e coeficientes de regressão para compostos fenólicos totais.

	Efeitos	Coeficientes regressão	p
Média/Interc.	49,9292	49,9292	0,0002
Pressão (L)	4,9550	2,4775	0,1055
Pressão (Q)	-8,9196	-4,4598	0,0202*
Temperatura (L)	-0,5875	-0,2938	0,7691
Temperatura (Q)	-3,2471	-1,6235	0,1279
Cossolvente (etanol) (L)	12,8375	6,4188	0,0181*
Cossolvente (etanol) (Q)	-1,1621	-0,5810	0,4623
P*T	2,0900	1,0450	0,4875
P*E	0,7800	0,3900	0,7826
T*E	0,1250	0,0625	0,9643
R²	0,84	-	-
R²_{adj}	0,54	-	-

(*)= $p \leq 0,05$; L= efeito linear; Q= efeito quadrático.

O resultado da análise de variância (ANOVA) para esta resposta, apresentado na Tabela 9, observa-se que a falta de ajuste não foi significativa, o que permite a utilização do modelo matemático. Isto significa que o teor de compostos fenólicos totais é máximo quando

a pressão e a % de cossolvente (etanol) estão em seus níveis maiores de 400 bar e 10 % respectivamente (Figura 23).

Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) para compostos fenólicos totais.

	SQ	GL	MQ	Teste F	p
Pressão (L)	49,1041	1	49,1041	8,0094	0,1055
Pressão (Q)	293,7562	1	293,7562	47,9146	0,0202*
Temperatura (L)	0,6903	1	0,6903	0,1126	0,7691
Temperatura (Q)	38,9300	1	38,9300	6,3499	0,1279
Cossolvente (etanol) (L)	329,6028	1	329,6028	53,7615	0,0181*
Cossolvente (etanol) (Q)	4,9862	1	4,9862	0,8133	0,4623
P*T	4,3681	1	4,3681	0,7125	0,4875
P*E	0,6084	1	0,6084	0,0992	0,7826
T*E	0,0156	1	0,0156	0,0026	0,9643
Falta de ajuste	124,7097	3	41,5699	6,7805	0,1312
Erro puro	12,2617	2	6,1308		
Total	839,7976	14			

(*)= $p \leq 0,05$; L= efeito linear; Q= efeito quadrático; SQ= soma quadrática; GL= Grau de liberdade; MQ= média quadrática.

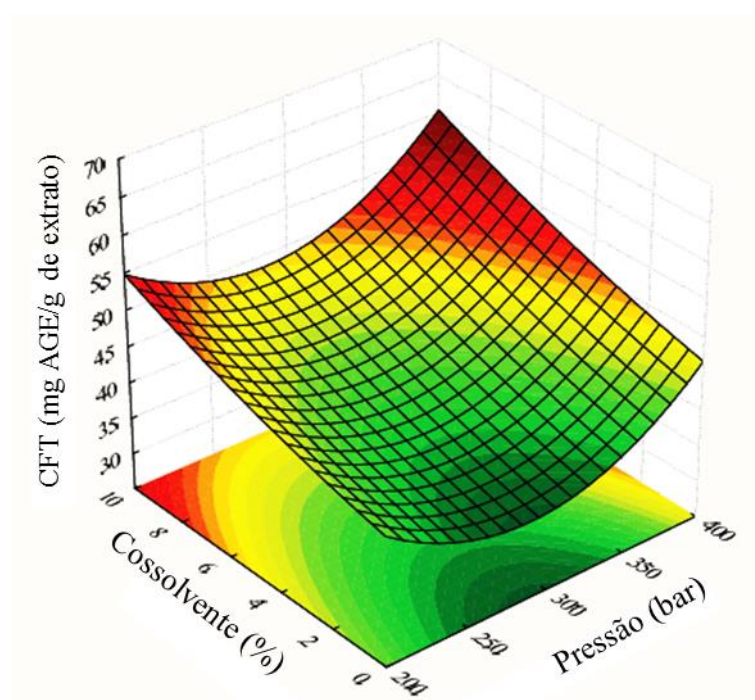


Figura 23. Superfície de resposta de compostos fenólicos totais em função da pressão e % de cossolvente.

Os resultados expostos na Tabela 4 também mostram que, além de melhorar rendimentos de extração, o aumento da densidade, a pressão e o uso de cossolvente também

melhoraram o conteúdo de compostos fenólicos totais nos extratos de *C. sicyoides*, quando são comparados aos resultados dos extratos obtidos a partir de SFE nas condições de 200 bar, 50 °C e sem emprego de cossolvente (37,83 mg EAG/g de extrato), com o extrato obtido nas condições de 400 bar, 50 °C e 10 % de cossolvente (etanol) (65,20 mg EAG/g de extrato). Esses resultados seguem a tendência apresentada por Murga *et al.* (2000) em extratos de sementes de uva (*Vitis vinifera*) obtidos a 200 bar e 10 % de cossolvente (etanol) com um valor de 23,86 mg EAG/g de extrato e a 300 bar e 10 % de cossolvente (etanol) com um valor de 31,39 mg EAG/g de extrato, sendo estes valores inferiores aos deste estudo. Assim, Martinez-Correa *et al.* (2011), em extratos de folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) (*Eugenia uniflora* L.), encontraram um valor de 51 mg EAG/g de extrato nas condições de 60 °C, 400 bar utilizando CO₂ +cossolvente (água e etanol). Kazan *et al.* (2014), em extrato de folhas de pessegueiro (*Prunus pérsica*) obtido nas condições de 60 °C, 150 bar e 6 % de cossolvente (etanol), encontraram um valor superior (79,92 mg EAG/g extrato) aos citados pelos autores acima.

Estes resultados corroboram que CO₂ supercrítico é capaz de extrair compostos com grande peso molecular ou polares com o aumento da pressão. Apesar disso, sua baixa polaridade pode ser melhorada com o emprego de cossolventes polares para mudar a polaridade e aumentar o seu poder de solvatação de compostos bioativos polares (de Castro, 1994; Brunner, 2005; de Melo *et al.*, 2014). Esse efeito tem sido atribuído às interações intermoleculares específicas entre solvente/ cossolvente/ soluto que aumentam a solubilidade dos compostos fenólicos, consequentemente melhorando sua extração (Eltringham e Catchpole, 2008; Herrero *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2016). Comparando os resultados da SFE com a extração por Soxhlet apresentados na Tabela 4, em relação ao conteúdo de compostos fenólicos, o extrato etanólico obtido por Soxhlet apresentou o maior teor (150,19 mg AGE/g de extrato) em comparação ao extrato com maior teor de compostos fenólicos totais obtido com SFE-CO₂+cossolvente (etanol) (65,20 mg EAG/g de extrato), enquanto que o extrato hexânico, obtido por Soxhlet, apresentou um valor inferior (60,51 mg EAG/g de extrato). Chipiti *et al.* (2015) em extrato etanólico de caule de cipó-uva (*Cissus cornifolia*), mostraram um teor de compostos fenólicos (136,1 ± 6,7 mg EAG/g de extrato) semelhante ao do extrato etanólico de *C. sicyoides*. Valores menores aos deste estudo foram reportados por Teixeira *et al.* (2013) a partir de extratos hidroalcóolicos de *C. sicyoides* (41,50 mg EAG/g de extrato) e Akomolafe *et al.* (2013) em extrato aquoso de caule de *Cissus populnea* (17,33 mg EAG/g de extrato). Os teores de compostos fenólicos totais podem variar de acordo com o solvente

usado, método de extração e a matriz vegetal. Geralmente, são extraídos usando etanol, metanol, propanol, acetona, acetato de etilo (Garcia-Salas *et al.*, 2010; Do *et al.*, 2014).

5.4.3 Análise de Flavonoides Totais (FT)

A quantificação de Flavonoides Totais (FT) é uma estimativa do teor de todos os subgrupos dessa classe de compostos, tais como: flavonóis, flavanonas, isoflavonas, antocianinas e flavanóis presente no extrato. Os valores de flavonoides totais encontrados para cada ensaio realizado a partir do planejamento deste estudo são mostrados na Tabela 4. Observa-se que o extrato com menor valor (0,14 mg EQ/g de extrato) foi obtido nas condições de 400 bar, 50 °C, sem emprego de cossolvente e densidade de 859,9 kg/m³ e o de maior valor (13,44 mg EQ/g de extrato) foi obtido nas condições de 300 bar, 40 °C, com a adição de 10 % de cossolvente e com uma densidade de 845,2 kg/m³. A estimativa dos efeitos e o coeficiente de regressão das variáveis independentes em função da resposta são apresentados na Tabela 10, pode-se observar que a variável que influencia significativamente ($p \leq 0,05$) o teor de flavonoides totais foi % de cossolvente (etanol) com efeito positivo na sua forma linear. Porém, a interação da temperatura e a % de cossolvente (T*E) foi significativa ($p \leq 0,05$) com um efeito negativo na resposta. Entretanto, a pressão e a temperatura de extração e o resto das interações entre as variáveis em estudo não foram significativas ($p > 0,05$). O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,85, mostrando que 85,0 % da variação da resposta pode ser explicada pelo modelo.

Tabela 10. Estimativa dos efeitos e coeficientes de regressão para flavonoides totais.

	Efeitos	Coeficientes regressão	p
Média/Interc.	4,9000	4,9000	0,0029
Pressão (L)	0,5100	0,2550	0,5120
Pressão (Q)	-0,6733	-0,3368	0,2919
Temperatura (L)	-1,6000	-0,8000	0,1313
Temperatura (Q)	0,2368	0,1183	0,6675
Cossolvente (etanol) (L)	8,5800	4,2900	0,0056*
Cossolvente (etanol) (Q)	-0,0533	-0,0267	0,9208
P*T	1,8900	0,9450	0,1741
P*E	-0,5100	-0,2550	0,6324
T*E	-5,3800	-2,6900	0,0276*
R²	0,85	-	-
R²_{adj}	0,58	-	-

(*)= $p \leq 0,05$; L= efeito linear; Q= efeito quadrático.

O resultado da análise de variância (ANOVA) para esta resposta, apresentado na Tabela 11, observa-se que a falta de ajuste não foi significativa, o que permite a utilização do modelo matemático. Isto significa que o teor de flavonoides totais é aumentado quando a % de cossolvente (etanol) está em seu nível maior de 10 % (Figura 24).

Conforme ao observado na Tabela 4, os valores de flavonoides totais dos extratos de *C. sicyoides*, encontrados neste estudo, estão dentro dos padrões achados por outros autores, sendo que os valores de flavonoides totais são inferiores aos de compostos fenólicos totais (Moreira *et al.*, 2008; Do *et al.*, 2014). Além disso, comparando os resultados dos extratos obtidos a partir de SFE nas condições de 300 bar/40 °C sem cossolvente (0,28 mg EQ/g de extrato) e com 10 % de cossolvente (13,44 mg EQ/g de extrato), percebe-se que o uso de cossolvente aumentou o teor de flavonoides totais nos extratos. Esses resultados seguem a tendência apresentada por Costa *et al.* (2015) em extratos de folhas de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) obtidos a 250 bar, 40 °C e sem cossolvente (8,32 mg EQ/g de extrato), e com 50 % de cossolvente (56,98 mg EQ/g de extrato) sendo estes valores maiores aos deste estudo.

Tabela 11. Análise de variância (ANOVA) para flavonoides totais.

	SQ	GL	MQ	Teste F	p
Pressão (L)	0,5202	1	0,5202	0,6251	0,5120
Pressão (Q)	1,6740	1	1,6740	2,0117	0,2919
Temperatura (L)	5,1200	1	5,1200	6,1529	0,1314
Temperatura (Q)	0,2068	1	0,2068	0,2485	0,6675
Cossolvente (etanol) (L)	147,2328	1	147,2328	176,9341	0,0056*
Cossolvente (etanol) (Q)	0,0105	1	0,0105	0,0126	0,9208
P*T	3,5721	1	3,5721	4,2927	0,1741
P*E	0,2601	1	0,2601	0,3126	0,6324
T*E	28,9444	1	28,9444	34,7834	0,0276*
Falta de ajuste	31,2744	3	10,4248	12,5278	0,0748
Erro puro	1,6643	2	0,8321		
Total	220,5732	14			

(*)=p ≤ 0,05; L= efeito linear; Q= efeito quadrático; SQ= soma quadrática; GL= Grau de liberdade; MQ= média quadrática.

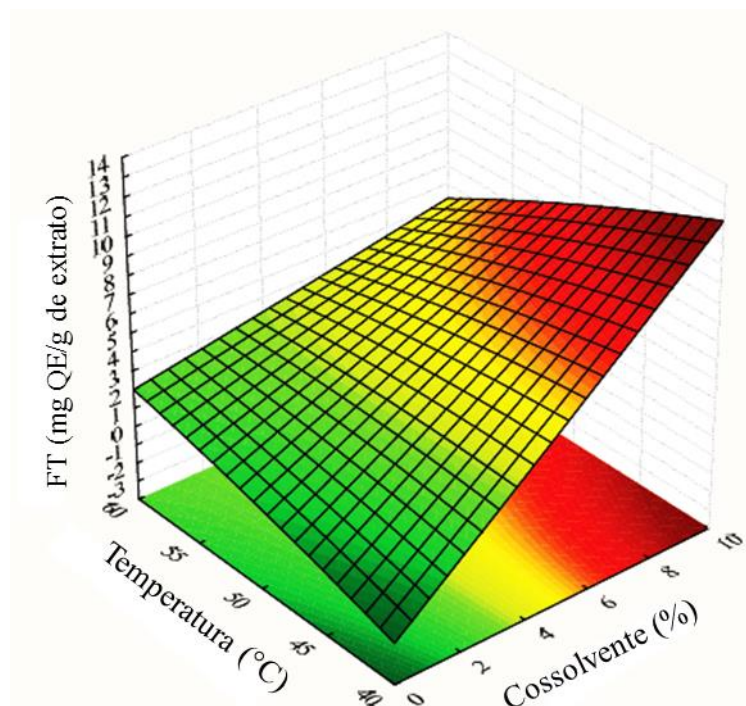


Figura 24. Superfície de resposta para flavonoides totais em função da % de cossolvente e temperatura.

Estes resultados estão de acordo com aquele relatado no item anterior para compostos fenólicos, pois os flavonoides são uma classe específica destes compostos, que apresentam solubilidade reduzida em CO_2 supercrítico. Portanto, para contornar essa limitação, normalmente é adicionado um cossolvente ao fluido supercrítico, com a finalidade de aumentar a solubilidade destes compostos e consequentemente melhorar sua extração (Brunner, 2005; Eltringham e Catchpole, 2008; Herrero *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2016). Na Tabela 4 é importante notar que o extrato de *C. sicyoides* com maior teor de flavonoides totais, foi diferente do extrato com maior rendimento de extração em massa e teor de compostos fenólicos totais, obtido na condição de 400 bar, 50 °C e 10 % de cossolvente o qual apresentou um valor de flavonoides totais menor (9,01 mg EQ/g de extrato), devido a influência direta da temperatura, o que explica esse comportamento.

Comparando os resultados da SFE com a extração por Soxhlet apresentados na Tabela 4, em relação ao teor de flavonoides totais, o extrato etanólico obtido por Soxhlet apresentou maior conteúdo (53,94 mg EQ/g de extrato) em comparação ao extrato com maior teor de flavonoides totais obtido com SFE- CO_2 +etanol (13,44 mg EQ/g de extrato), enquanto que o extrato hexânico obtido por Soxhlet apresentou um valor inferior (6,97 mg EQ/g de extrato). Valor similar ao deste estudo foi reportado por Teixeira *et al.* (2013) a partir de

extratos hidroalcóolicos de *C. sicyoides* (10,59 mg EQ/g de extrato). Entretanto, Akomolafe *et al.* (2013) reportaram um teor de flavonoides totais menores em extrato aquoso de caule de *Cissus populnea* (0,059 mg EQ/g de extrato).

5.4.4 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

De acordo com os resultados obtidos da identificação e quantificação de compostos fenólicos totais, selecionou-se o extrato obtido na SFE nas condições 400 bar, 50 °C e 10 % de cossolvente e o extrato etanólico obtido por Soxhlet para a avaliação do perfil químico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Na Figura 25, são apresentados os cromatogramas, os picos identificados estão numerados de 1 a 8, sendo que a altura dos picos mostra as concentrações relativas dos compostos presentes nos extratos. Na Figura 26, mostram-se os espectros de absorção, que são impressões digitais de classe específicas de compostos, os quais permitem a sua identificação. Observa-se que não foi possível identificar os compostos, pois nenhum dos picos tinha o mesmo comportamento cromatográfico ao dos padrões externos disponíveis (quercetina 3-glicosídeo, quercetina 3-raminosídeo e quercetina), no entanto, os compostos apresentaram o mesmo tempo de retenção dos padrões, mas não exibiram o mesmo espectro (Tabela 12).

Entretanto, os dados espectrais UV/Visível revelaram, para o **pico 2**, duas bandas de absorção em torno de λ 257 e 314 nm, o **pico 5** λ de 269 e 338 nm, o **pico 6** λ de 255 e 346 nm, o **pico 7** λ de 255 e 349 nm, **pico 8** λ de 253 e 346 nm, as quais são bandas de absorção em comprimentos de ondas característicos de flavonoides glicosilados de acordo com os dados da literatura reportados por Beltrame *et al.* (2001) e Xu *et al.* (2009) que encontraram diferentes flavonoides glicosilados derivados do kaempferol e quercetina em extratos das partes aéreas de *C. sicyoides*. Convém destacar que o tempo de retenção, é um parâmetro baseado na polaridade da molécula, influenciado pelo grau de glicosilação e pela natureza dos açúcares presentes nas moléculas (Moco *et al.*, 2006; Welch *et al.*, 2008).

Por fim, a análise CLAE é um excelente método cromatográfico para conhecer a natureza dos compostos bioativos presentes em matrizes vegetais. No entanto, no tratamento da amostra, além de realizar SPE com o propósito da remoção de compostos interferentes como a clorofila, é preciso realizar uma hidrólise ácida a fim de continuar com o desenvolvimento da análise cromatográfica e permitir a identificação e quantificação dos compostos com padrões externos disponível de quercetina e kaempferol.

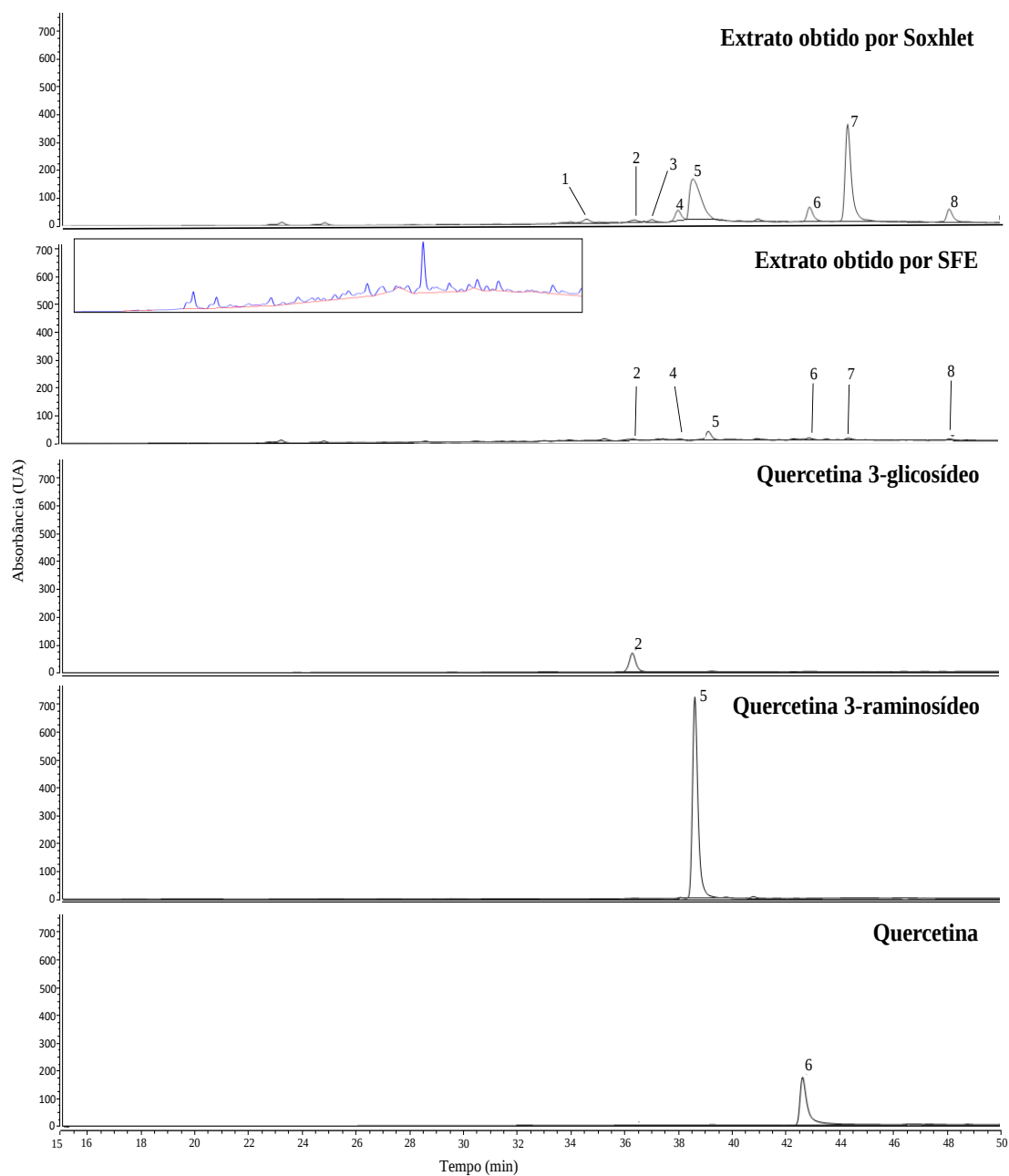


Figura 25. Cromatograma de extrato *C. sicyoides* e padrões externos, registrados a 245 nm.

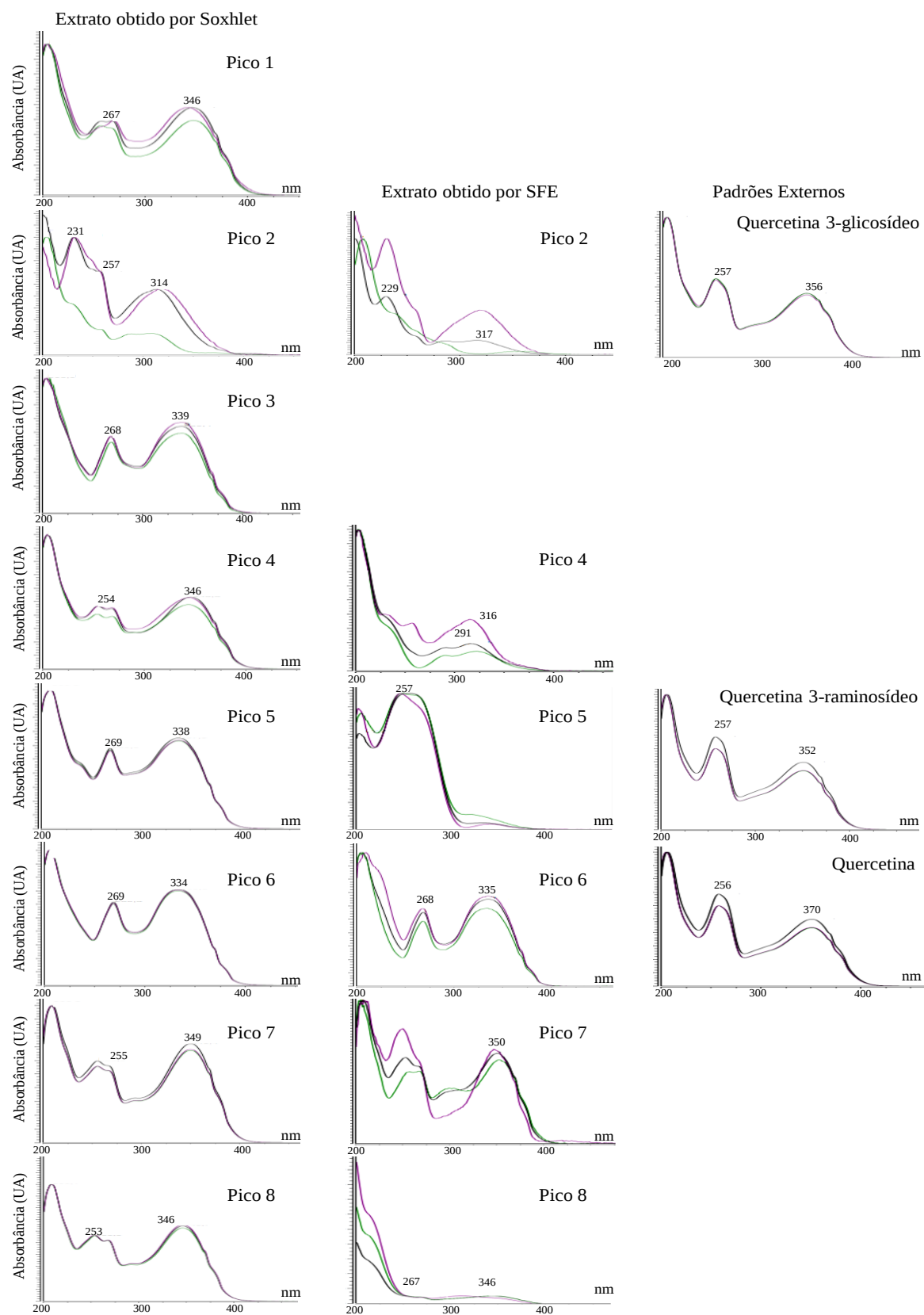


Figura 26. Espectros de absorção dos compostos presentes nos extratos de *C. sicyoides*.

Tabela 12. Tempo de retenção, absorção máxima dos compostos presentes nos extratos de *C. sicyoides*.

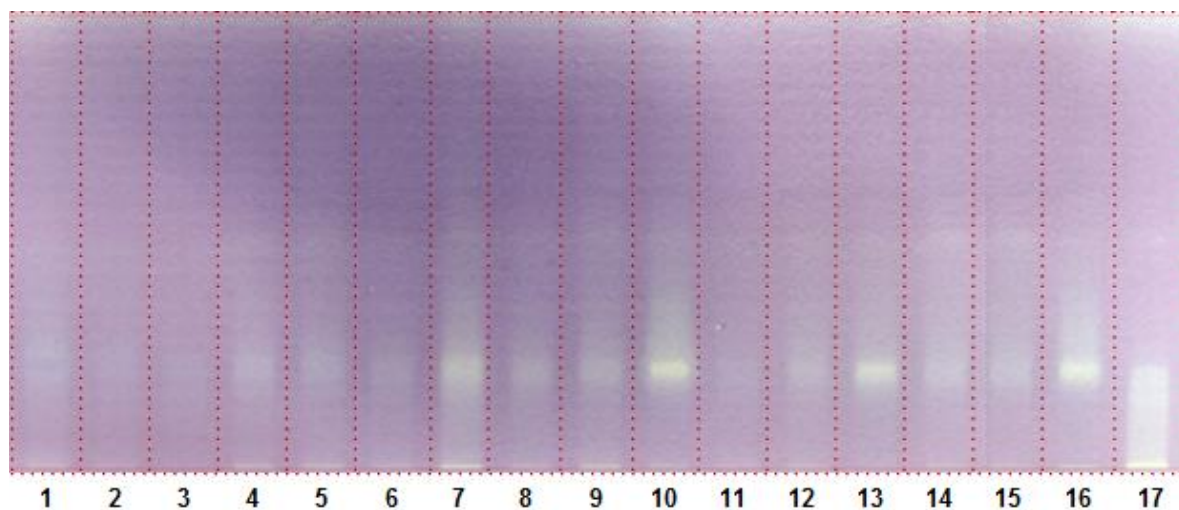
Pico	R_t (min)	λ (nm)	Composto	Metodologia de extração	
				SFE	Soxhlet
1	34,4 - 34,5	267, 346	Não-identificado	(-)	(+)
2	36,1 - 36,2	231, 257, 314		(+)	(+)
3	36,8 - 36,9	268, 339		(-)	(+)
4	37,8 - 37,9	254, 346		(+)	(+)
5	38,4 - 39,0	269, 338		(+)	(+)
6	42,7 - 42,8	268, 334		(+)	(+)
7	44,1 - 44,2	255, 349		(+)	(+)
8	47,9 - 48,0	253, 346		(+)	(+)

R_t = tempo de retenção; λ = comprimento de onda.

5.5 Atividade Antioxidante dos Extratos

5.5.1 Análise Qualitativa da Atividade Antioxidante

Dentre os resultados obtidos após a avaliação qualitativa pelo método do DPPH, na Figura 27 se evidenciou a presença de manchas amarelas sobre o fundo púrpura na placa resultantes da redução do radical DPPH•. Isto porque, na presença de substâncias antioxidantes, é reduzido a 2,2-difenil-picril-hidrazina, perdendo sua coloração púrpura (Brand-Williams *et al.* 1995; Kedare e Singh, 2011).

**Figura 27.** CCDAE dos extratos de *C. sicyoides*, para a avaliação qualitativa da atividade antioxidante pelo método do DPPH.

5.1.2 Análise Quantitativa da Atividade Antioxidante

Os resultados quantitativos da atividade antioxidante pelo método de DPPH foram expressos por meio do cálculo da quantidade de antioxidante necessária para consumir metade

do radical DPPH contido na solução. A Tabela 4 apresenta os valores de EC_{50} encontrados para cada ensaio realizado a partir do planejamento deste estudo, onde é mostrado o extrato com menor valor (379,50 g de extrato/ g de DPPH) nas condições 400 bar, 50 °C, 10 % de cossolvente (etanol) e com uma densidade de 861,3 kg/m³, e o maior valor (899,14 g de extrato/g de DPPH) foi obtido nas condições de 200 bar, 50 °C, sem emprego de cossolvente e densidade de 692,8 kg/m³. No entanto, o potencial antioxidante do extrato é inversamente proporcional ao valor do EC_{50} , ou seja, quanto menor o valor de EC_{50} apresentado pelo extrato, menor quantidade de amostra (extrato) é necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial do DPPH e, dessa forma, maior sua atividade antioxidante.

De acordo com a Tabela 13, pode-se observar que as variáveis que influenciaram significativamente ($p \leq 0,05$) a atividade antioxidante foram a pressão com efeito positivo na sua forma linear e a % de cossolvente (etanol) com efeito negativo sobre a resposta na sua forma linear e quadrática. No entanto, a temperatura de extração e as interações entre as variáveis em estudo não foram significativas ($p > 0,05$). O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,99, mostrando que 99,0 % da variação da resposta pode ser explicada pelo modelo. No resultado da análise de variância (ANOVA), na Tabela 14, nota-se que a falta de ajuste não foi significativa, o que permite a utilização do modelo matemático. Portanto, isso significa que a % de cossolvente (etanol) em seu nível maior de 10 % contribui diretamente para diminuição do valor de EC_{50} , ou seja, maior atividade antioxidante no extrato. A superfície de resposta é apresentada na Figura 28.

Tabela 13. Estimativa dos efeitos e coeficientes de regressão para atividade antioxidante.

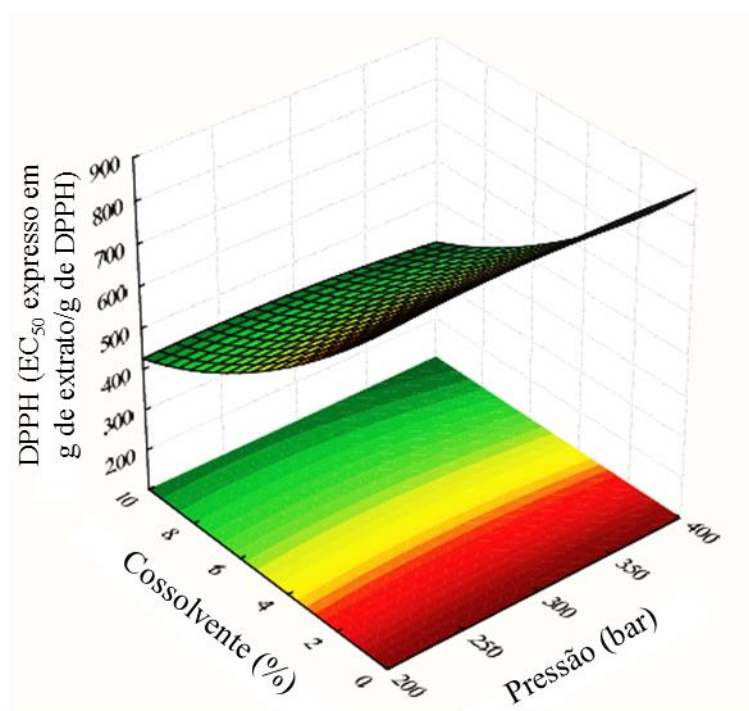
	Efeitos	Coefficientes regressão	p
Média/Interc.	640,6633	640,6633	0,0000
Pressão (L)	-12,7275	-6,3638	0,1062
Pressão (Q)	14,3492	7,1746	0,0497*
Temperatura (L)	-0,3950	-0,1975	0,9383
Temperatura (Q)	-11,9083	-5,9542	0,0698
Cossolvente (etanol) (L)	-473,6625	-236,8313	0,0001*
Cossolvente (etanol) (Q)	-59,7558	-29,8779	0,0031*
P*T	-5,9750	-2,9875	0,4482
P*E	-16,9800	-8,4900	0,1171
T*E	-11,0750	-5,5375	0,2250
R²	0,99		-
R²_{adj}	0,98		-

(*)= $p \leq 0,05$; L= efeito linear; Q= efeito quadrático.

Tabela 14. Análise de variância (ANOVA) para atividade antioxidante.

	SQ	GL	MQ	Teste F	p
Pressão (L)	323,9785	1	323,9785	7,9440	0,1062
Pressão (Q)	760,2409	1	760,2409	18,6413	0,0497*
Temperatura (L)	0,3120	1	0,3120	0,0077	0,9383
Temperatura (Q)	523,6003	1	523,6003	12,8388	0,0698
Cossolvente (etanol) (L)	448712,3278	1	448712,3278	11002,5344	0,0001*
Cossolvente (etanol) (Q)	13184,3432	1	13184,3432	323,2833	0,0031*
P*T	35,7006	1	35,7006	0,8754	0,4482
P*E	288,3204	1	288,3204	7,0697	0,1171
T*E	122,6556	1	122,6556	3,0075	0,2250
Falta de ajuste	1686,6429	3	562,2143	13,7856	0,0684
Erro puro	81,5653	2	40,7826		
Total	466049,3672	14			

(*)= $p \leq 0,05$; L= efeito linear; Q= efeito quadrático; SQ= soma quadrática; GL= Grau de liberdade; MQ= média quadrática.

**Figura 28.** Superfície de resposta para atividade antioxidante em função da pressão e % de cossolvente.

Os resultados da atividade antioxidante dos extratos apresentados na Tabela 4 estão relacionados aos resultados de compostos fenólicos totais e do rendimento de extração, pois o extrato com maior rendimento em massa (3,21 %), compostos fenólicos totais (65,20 mg EAG/g de extrato) e atividade antioxidante (379,50 g de extrato/ g de DPPH) foi aquele obtido nas condições 400 bar, 50 °C e 10 % de cossolvente. Isso confirma que a capacidade antioxidante das plantas está relacionada à quantidade de compostos fenólicos.

Resultados semelhantes já foram relatado na literatura para SFE de outras plantas. Costa *et al.* (2015), em extrato obtidos de folhas de copaíba (*Copaifera langsdorffii*), afirmaram que o uso de cossolvente (etanol) influenciou significativamente no processo de extração, aumentando o rendimento, teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos. Assim del Valle *et al.* (2005) reportaram, para folhas de boldo (*Peumus boldus* M.), que a atividade antioxidante dos extratos é influenciada pelo uso de cossolvente e altas pressão.

Comparando os resultados da SFE com a extração por Soxhlet (Tabela 4), em termos de atividade antioxidante, pode-se observar que ambos apresentaram valores de EC₅₀ semelhantes, relacionando o extrato etanólico obtido por Soxhlet (325,67 g de extrato/g de DPPH) e o extrato com maior atividade antioxidante obtido com SFE-CO₂+etanol (379,50 g de extrato/g de DPPH), enquanto que o extrato hexânico obtido por Soxhlet apresentou o maior valor de EC₅₀ (876,99 g de extrato/g de DPPH) associado com uma menor atividade antioxidante. No entanto, Teixeira *et al.* (2013) em extratos hidroalcóolicos de *C. sicyoides* reportaram valores inferiores de EC₅₀ (248,32 g de extrato/g de DPPH) aos obtido neste estudo. Estes resultados sugerem que a metodologia SFE+cossolvente foi seletivo para obter compostos fenólicos com atividade antioxidante a partir de folhas e caule de *C. sicyoides*.

Além disso, estes resultados indicam que os extratos de *C. sicyoides* são uma fonte potencial de antioxidantes naturais e podem ser úteis na prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo. A atividade antioxidante pode ser atribuída aos compostos fenólicos presentes nos extratos. Este resultado corrobora o relatado por Khalil *et al.* (2008) para *C. sicyoides*, e para extratos de plantas pertencente à família Vitaceae por Murthy *et al.* (2003); Vijayalakshmi *et al.* (2013); Chandra e Suhashini (2015); Prabhavathi *et al.* (2016) para *Cissus quadrangulares*, por Akomolafe *et al.* (2013) para *Cissus populnea* e por Chipiti *et al.* (2015) para *Cissus cornifolia*.

5.6 Análise Estatística

A finalidade desta pesquisa foi avaliar as variáveis do processo (temperatura, pressão e % cossolvente) que influenciaram nas respostas de rendimento de extração, compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante para os extratos de *C. sicyoides* obtidos via SFE. Por conseguinte, na Figura 29 é apresentado o gráfico de desejabilidade em função de todas as respostas estudadas. A função desejabilidade (d ou D) é uma metodologia utilizada na otimização de procedimentos, pode ser utilizada dependendo da resposta que se deseja obter, ou seja, se a mesma deve ser maximizada, minimizada ou mesmo assumir um valor intermediário, baseia-se na transformação de uma função de desabilidade para cada variável resposta, com valores descritos entre 0 e 1, onde $D = 0$ representa um valor completamente indesejável e $D = 1$ o valor mais desejável (Vojnovic *et al.*, 1993; Bezerra *et al.*, 2008).

Portanto, a função desejabilidade foi empregada para otimizar o processo, ou seja, obter um maior rendimento de extração, teor de compostos fenólicos totais e teor de flavonoides totais e um menor valor de EC_{50} (maior atividade antioxidante), observa-se que os comportamentos dos dados definem valores exatos de operação para cada variável, a linha azul tracejada no gráfico representa o valor ótimo.

O intercepto da linha azul tracejada demonstra claramente a condição ótima, a qual corresponde a uma pressão de 400 bar, temperatura de 40 °C e 10 % de cossolvente. Assim, as linhas verticais, em vermelho, sinalizam as condições de máxima desejabilidade global, que alcançou $D = 0,87743$, como pode ser visualizado na última linha azul tracejada, que é considerado um valor ótimo já que esta próximo de um (1).

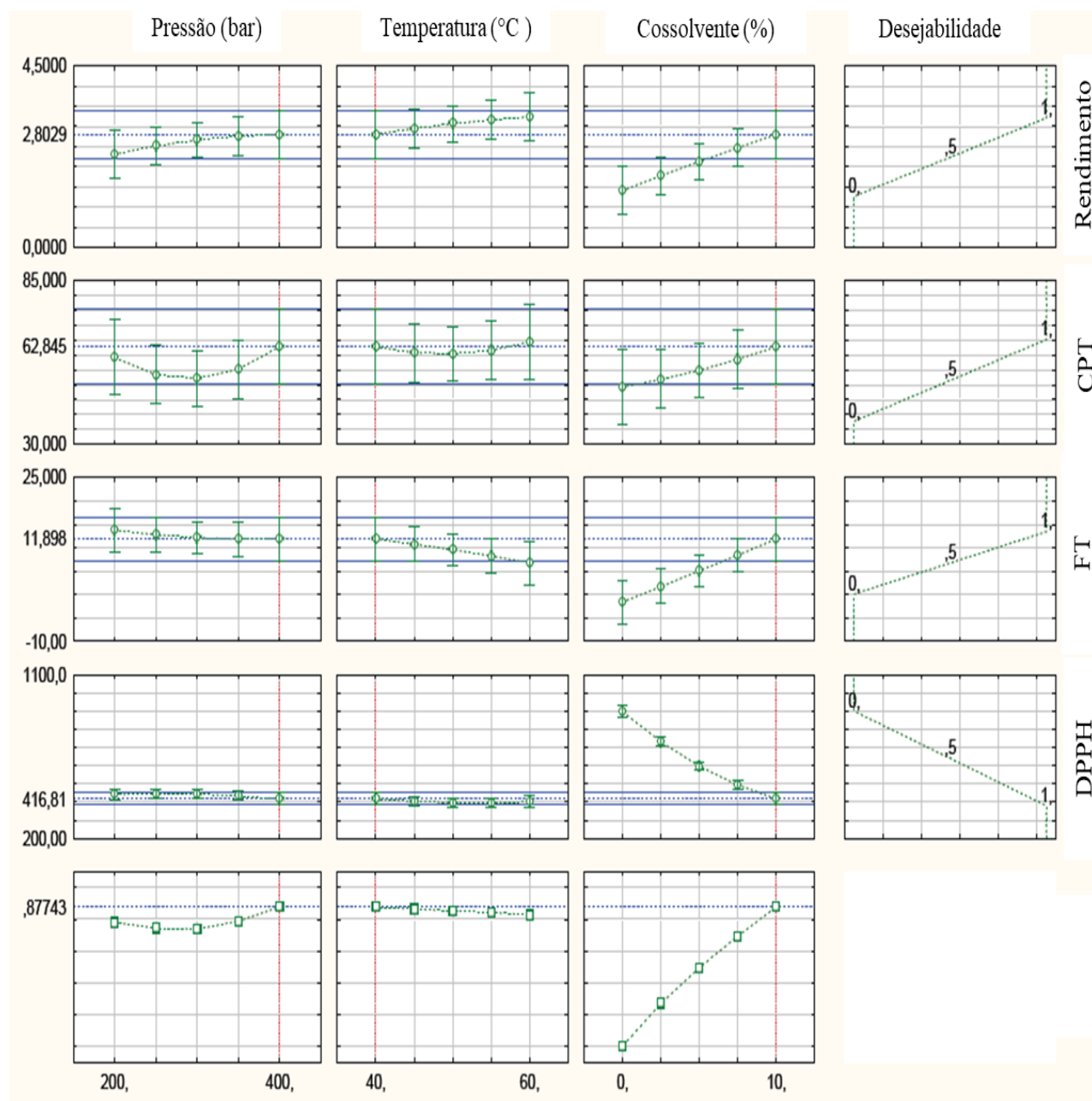


Figura 29. Valores preditos e desejabilidade para as respostas de rendimento global de extração; compostos fenólicos totais (CFT); flavonoides totais (FT); atividade antioxidante (DPPH) para os extratos de *C. sicyoides* obtido via SFE.

5.7 Avaliação do Potencial Neuroprotetor e Anti-inflamatório do Extrato Obtido Via Extração Supercrítica em Ensaios *in vivo* de Isquemia Cerebral Focal Induzida em Ratos

A injeção de 80 pMols de ET-1, diluída em 1 µl de corante azul colanil, no córtex motor de ratos adultos machos da raça *Wistar* induziu a isquêmica e aparente perda tecidual, bem como intenso recrutamento de células mononucleares nos dois grupos experimentais, verificada após coloração histoquímica por violeta de cresila no sétimo dia após a lesão (Figura 30 A-C; D-F). Nota-se que o infiltrado de células foi melhor evidenciado na periferia e centro de lesão, porém com uma maior densidade celular no grupo controle em relação ao grupo tratado.

Assim, no grupo isquêmico tratado com extrato de *C. sicyoides* obtido por SFE nas condições operacionais de 50 °C, 400 bar e 10 % de etanol, observou-se uma diminuição da resposta inflamatória e menor perda tecidual (Figura 30 D-F) em comparação com o grupo controle (Figura 30 A-C).

Neste prévio estudo utilizando um modelo experimental de isquemia com injeção de ET-1 em ratos adultos, mostrou-se que o extrato de *C. sicyoides*, assim como o óleo resina de copaíba (Guimaraes-Santos *et al.*, 2012), o extrato de sementes do gergelim-preto (Botelho *et al.*, 2014) e o extrato de folha de copaíba (Botelho *et al.*, 2015) promoveram uma melhor preservação tecidual e diminuição do recrutamento de células inflamatórias. Como também, corrobora com os estudos de García *et al.* (2000), Quílez *et al.* (2004) e Beserra *et al.* (2016) onde reportaram ações terapêuticas e anti-inflamatória no extrato de *C. sicyoides*, associados à presença de compostos fenólicos, sendo os principais responsáveis pelos efeitos farmacológicos da planta, além, da alta atividade antioxidante que possui o extrato. Por conseguinte, justifica-se o uso tradicional na medicina popular como agentes anti-inflamatórios e/ou neuroprotetores para doenças do sistema nervoso central.

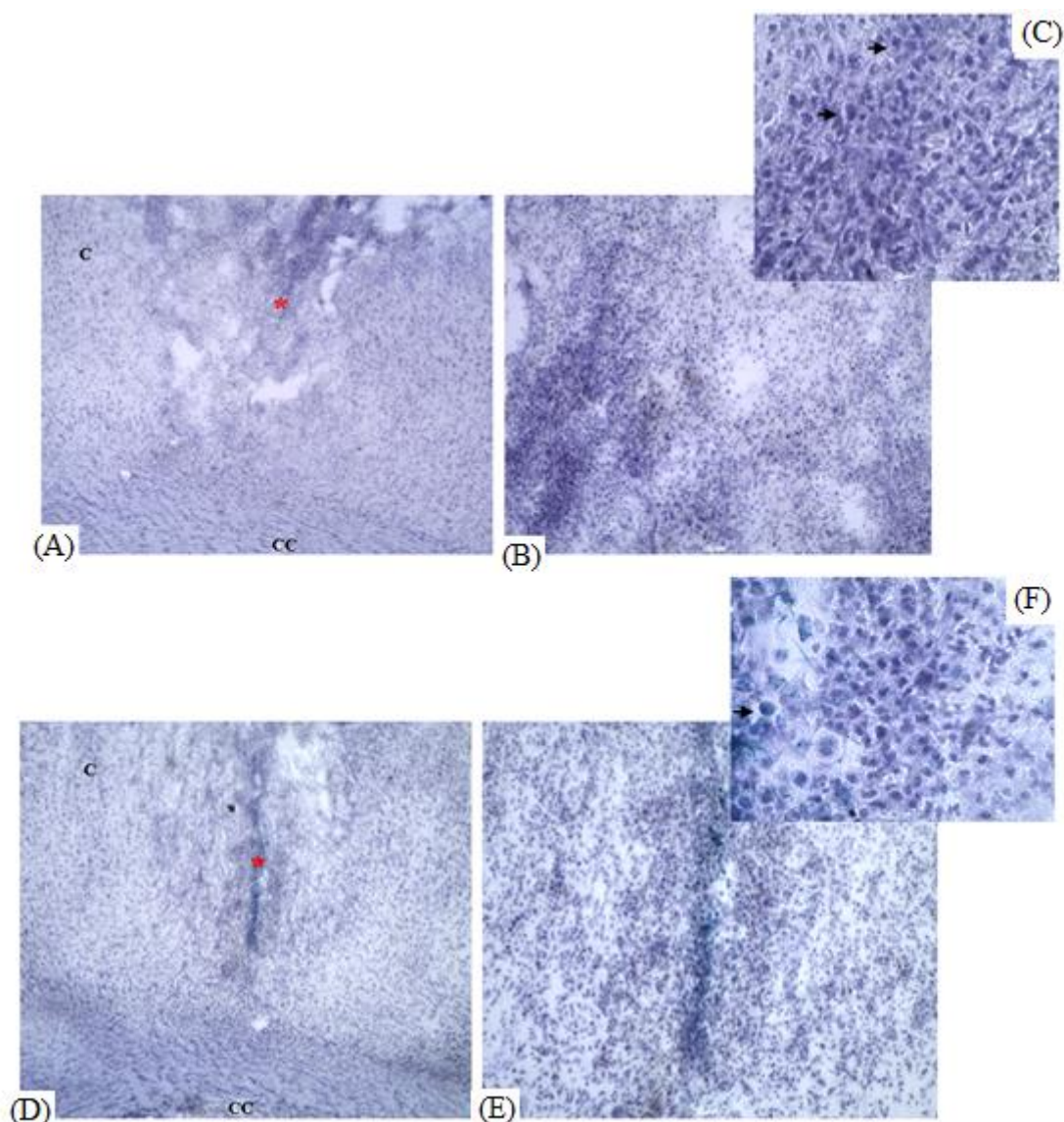


Figura 30. Análise histopatológica revelada com violeta de cresila: (A-C) grupo controle; (D-F) grupo tratado; (*) asterisco aponta para o centro da lesão; (→) setas para células mononucleares; (C) córtex motor e (CC) corpo caloso; com aumento: A, D x 40; B, E x 100; C, F x 400.

6 CONCLUSÕES

O maior rendimento global para o processo de SFE a partir de folha e caule de *C. sicyoides*, foi obtido na condição operacional de 400 bar, 50 °C e 10 % de cossolvente (etanol). Nesta condição foi observado, também, o extrato com um alto teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. A metodologia de superfície de resposta com o planejamento estatístico de Box-Behnken determinou que a pressão e % de cossolvente (etanol) adicionado ao fluxo de CO₂ foram os fatores que mais influenciaram na SFE. A condição ótima do processo correspondeu a uma pressão de 400 bar, temperatura de 40 °C e 10 % de cossolvente. Em termos de atividade antioxidante, ambas metodologias de extração (SFE e Soxhlet) apresentaram extratos com baixos valores de EC₅₀, relacionado a uma alta atividade antioxidante.

A triagem fitoquímica dos extratos realizada por CCDAE evidenciou a presença de terpenos, compostos fenólicos e flavonoides. O ensaio *in vivo* preliminar demonstrou que o extrato obtido por SFE tem efeito neuroprotetor e anti-inflamatório, estes efeitos são associados à presença de compostos fenólicos e à alta atividade antioxidante que possui o extrato. Por fim, a obtenção de extrato de *C. sicyoides* via SFE empregando quantidades baixas de cossolventes (5 e 10 %), representa uma grande oportunidade para a obtenção de compostos bioativos polares, sem os inconvenientes associados aos processos de extração convencionais.

7 LISTA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA

7.1 Capítulo do Livro Publicado

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.

7.2 Resumos Expandidos Publicado em Anais de Evento

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.**

7.3 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	2º 2015	1º 2016	2º 2016	1º 2017
Revisão de literatura	✓	✓	✓	✓
Apresentação da D ₁		✓		
Coleta das amostras		✓		
Realização das análises		✓		
Apresentação da D ₂		✓		
Realização das análises			✓	
Apresentação da D ₃			✓	
Análise dos resultados			✓	
Elaboração de artigos				✓
Discussão dos resultados				✓
Apresentação da D ₄				✓
Divulgação dos resultados e submissão de artigo				X

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOMOLAFE, S. F.; OBOH, G.; AKINDAHUNSI, A. A.; AKINYEMI, A. J.; TADE, O G. Inhibitory effect of aqueous extract of stem bark of *Cissus populnea* on ferrous sulphate- and sodium nitroprusside-induced oxidative stress in rat's testes *in vitro*. *ISRN Pharmacol*, 2013.

APPLIED SEPARATIONS. Applied separations Spe-ed SFE operations manual. Hamilton Street: Allentown, 2004. Disponível em: <http://www.appliedseparations.com/>. Acesso em: 24 out. 2016.

ASAE. AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERS. Method of determining and expressing particle size of chopped forEAG materials by screening. St. Joseph, 1998. p. 562-564. (ASAE Standards S424.1).

BARREIROS, A. L. B.; DAVID, J. M. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2005.

BELTRAME, F. L.; FERREIRA, A. G.; CORTEZ, D. A. Coumarin glycoside from *Cissus sicyoides*. **Natural Product Letters**, v. 16, p. 213-216, 2002.

BELTRAME, F. L.; SARTORETTO J. L.; BAZOTTE R. B.; CUMAN R. N.; CORTEZ D. A. G. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Química Nova**, v. 24, p. 783-785, 2001.

BESERRA, F. P.; SANTOS, R. C.; PÉRICO, L. L.; RODRIGUES, V. P.; KIGUTI, L. R. A.; SALDANHA, L. L.; PUPO, A. S.; DA ROCHA, L. R. M.; DOKKEDAL, A. L.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Cissus sicyoides*: pharmacological mechanisms involved in the anti-inflammatory and antidiarrheal activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 149, 2016.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry-review. **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.

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

BOTELHO, J. R. S.; MEDEIROS, N. G.; RODRIGUES, A. M. C.; ARAÚJO, M. E.; MACHADO, N. T.; GUIMARÃES-SANTOS, A.; SANTOS, I. R.; GOMES-LEAL, W.; CARVALHO JUNIOR, R. N. 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. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 93, p. 49-55, 2014.

BOTELHO, J. R. S.; OLIVEIRA, M. S.; SANTOS, A. G.; ARAÚJO, M. E.; BRAGA, M. E. M.; GOMES-LEAL, W.; CARVALHO-JUNIOR, R. N.; MEIRELES, M. A. A. Copaíba (*Copaifera* sp.) leaf extracts obtained by CO₂ supercritical fluid extraction: isotherms of global yield, kinetics data, antioxidant activity and neuroprotective effects. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 98, p. 167-171, 2015.

BRAGA, T.V.; OLIVEIRA, T. T.; PINTO, J. T.; DORES, R. G. R.; NEAGM, T. J. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 287-290, 2007.

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.

ÇENGEL, Y. A.; BOLES, M. A. Termodinâmica. 5. ed. São Paulo: McGraW-Hill, 2006. 740 p.

- CHANDRA, J. H.; SUHASHINI, R. *In vitro* screening of antibacterial and antioxidant activity and *in silico* analysis of three sided *Cissus quadrangularis*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, p. 657-665, 2015.
- CHIPITI, T.; IBRAHIM, M. A.; KOORBANALLY, N. A.; ISLAM, MD. S. *In vitro* antioxidant activity and gc-ms analysis Of the ethanol and aqueous extracts of *Cissus cornifolia* (baker) splanh (vitaceae) parts. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, v. 72. p. 119-127, 2015.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da UNICAMP. 2006. 452 p.
- 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** (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.030>.
- COSTA, A. R. M.; FREITAS, L. A. P.; MENDIOLA, J.; IBÁÑEZ, E. *Copaifera langsdorffii* supercritical fluid extraction: chemical and functional characterization by LC/MS and *in vitro* assays. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 100, p. 86-96, 2015.
- DE CASTRO, M. D.; VALCARCEL, L. M.; TENA, M. T. Analytical Supercritical Fluid Extraction. Heidelberg: Springer-Verlag, 1994, 321 p.
- 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-a review. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 115-176, 2014.
- DEL VALLE, J. M.; ROGALINSKI, T.; ZETZL, C.; BRUNNER, G. Extraction of boldo (*Peumus boldus* M.) leaves with supercritical CO₂ and hot pressurized water. **Food Research International**, v. 38, p. 203-213, 2005.
- DIAS, A. M. A.; SANTOS, P.; SEABRA, I. J.; JÚNIOR, R. N. C.; BRAGA, M. E. M.; DE SOUSA, H. C. Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 68, p. 62-70, 2012.

- DIAS, G. T.; LIMA, C. M. B. L.; LIRA, A. B.; RAMALHOA, J. A.; OLIVEIRA, K. M.; DINIZ, M. F. F. M. Toxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides*. *Acta Brasiliensis*, v. 1, p. 8-12, 2017.
- DO, Q. D.; ANGKAWIJAYA, A. E.; TRAN-NGUYEN, P. L.; HUYNH, L. H.; SOETAREDJO, F. E.; ISMADJI, S.; JU, Y. H. 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.
- DOWD, L. E. Spectrophotometric determination of quercetin. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 184-187, 1959.
- DROBNIK, J.; DE OLIVEIRA, A. B. *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis (Vitaceae): its identification and use in the sources from 16th to 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 317-329, 2015.
- ELTRINGHAM, W.; CATCHPOLE, O. Processing of fish oils by supercritical fluids. In: Martínez. J. L. Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2008. cap. 5, p. 141-188.
- 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. Atheneu, São Paulo, 2013. v. 6, cap.7, p. 217-259.
- FRANCO, E. C. S.; CARDOSO, M. M.; GOUVEIA, A.; PEREIRA, A.; GOMES-LEAL, W. Modulation of microglial activation enhances neuroprotection and functional recovery derived from bone marrow mononuclear cell transplantation after cortical ischemia. **Neuroscience Research**, v. 73, p. 122-132, 2012.
- FUXE, K.; BJELKE, B.; ANDBJER, B.; GRAHN, H.; RIMONDINI, R.; AGNATI, L. F. Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. a possible model of focal cortical ischemia. **Neuroreport**, v. 8, p. 2623-2629, 1997.
- GARCÍA, M. D.; QUÍLEZ, A. M.; SAENZ, M. T.; MARTINEZ-DOMINGUES, M. E.; PURETA, R. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. And *Cissus sicyoides* L.

species used in the Caribbean traditional medicine. **Journal Ethnopharmacol**, v. 71, p. 395-400, 2000.

GARCÍA, M. D.; SAENZ, M. T.; PUERTA, R.; QUILEZ, M. A.; FERNANDEZ, M. A. Antibacterial activity of *Agave intermixta* and *Cissus sicyoides*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 71-73, 1999.

GARCIA-SALAS, P.; MORALES-SOTO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples, **Molecules**, v. 15, p. 8813-8826. (2010).

GEORGÉ, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M. J. Rapid determination of polyphenols and vitamin c in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1370-1373, 2005.

GIL-CHAVEZ, G. J.; VILLA, J. A.; AYALA-ZAVALA, J. F.; HEREDIA, J. B.; SEPULVEDA, D.; YAHIA, E. M.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, p. 5-23, 2013.

GROSSO, C.; VALENTÃO, P.; FERRERES, F.; ANDRADE, P. B. Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds-review. **Marine Drugs**, v. 13, p. 3182-3230, 2015.

GUIMARAES-SANTOS, A.; SANTOS, D. S.; SANTOS, I. R.; LIMA, R. R.; PEREIRA, A.; MOURA, L. S.; CARVALHO JR., R. N.; LAMEIRA, O.; GOMES-LEAL, W. Copaiba oil-resin treatment is neuro-protective and reduces neutrophil recruitment and microglia activation after motor cortex excitotoxic injury. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-9. 2012.

HERRERO, M.; CASTRO-PUYANA, M.; MENDIOLA, J. A.; IBANEZ, E. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 67-83, 2013.

- HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, 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.
- HUGHES, P. M.; ANTHONY, D. C.; RUDDIN, M.; BOTHAM, M. S.; RANKINE, E. L.; SABLONE, M.; BAUMANN, D.; MIR, A. K.; PERRY, V. H. Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v.62, p.1276-1286. 2003.
- IRAKLI, M. N.; SAMANIDOU, V. F.; BILIADERIS, C. G.; PAPADOYANNIS, N. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in rice using solid-phase extraction and RP-HPLC with photodiode array detection. **Journal of Separation Science**, v. 35, p. 1603-1611, 2012.
- JACOBS, B. M. Determination of moisture, in: the chemical analysis of food 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.
- KAZAN, A.; KOYU, H.; TURU, I. C.; YESIL-CELIK TAS, O. Supercritical fluid extraction of *Prunus persica* leaves and utilization possibilities as a source of phenolic compounds. **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. 412-422, 2011.
- KHALIL, N. M.; PEPATO, M. T.; BRUNETTI, I. L. Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. **Biological Research**, v. 41, p. 165-171, 2008.
- KUMAR, R.; GUPTA, Y. K.; SINGH, S.; ARUNRAJA, S. *Cissus quadrangularis* attenuates the adjuvant induced arthritis by down regulating pro-inflammatory cytokine and inhibiting angiogenesis. **Journal Ethnopharmacol**, v. 75, p. 346-355, 2015.
- LI, Y. J.; LIN, D. D.; JIAO, B.; XU, C. T.; QIN, J. K.; YE, G. J.; SU, G. F. Purification, antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharide from *Cissus pteroclada* Hayata. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 307-313, 2015.

- LLOYD-JONES, D.; ADAMS, R.; CARNETHON, M.; DE SIMONE, G.; FERGUSON, T. B.; FLEGAL, K.; FORD, E.; FURIE, K.; GO, A.; GREENLUND, K. American heart association statistics committee and stroke statistics subcommittee. (2009). Heart disease and stroke statistics-2009 update: a report from the american heart association statistics committee and stroke statistics subcommittee. **Circulation**, v. 119, p. 480-486, 2009.
- LOMBARDI, J. A. Vitaceae-Gêneros Ampelocissus, Ampelopsis e Cissus. **Flora Neotropica**, v. 80, p. 1-250, 2000.
- LUCENA, F. R. S.; ALMEIDA, E. R.; AGUIAR, J. S.; SILVA, T. G.; SOUZA, V. M. O.; NASCIMENTO, S. C. Cytotoxic, antitumor and leukocyte migration activities of resveratrol and sitosterol present in the hidroalcoholic extract of *Cissus sicyoides* L., Vitaceae, leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 729-733, 2010.
- MARTINEZ-CORREA, H. A.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L.; PEIXOTO, C. A.; OLIVEIRA, A. L.; CABRAL, F.A. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 998-1006, 2011.
- MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.
- MEIRELES, M. A. A. Extraction of bioactive compounds from latin american plants. In: MARTÍNEZ, J. L. Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2008. cap. 8, p. 243-274.
- MEIRELES, M. A. A; PEREIRA, C. G. A. Origem da termodinâmica clássica e seus fundamentos. In:____.Fundamentos de Engenharia de alimentos. Atheneu, São Paulo, 2013. v. 6, cap.1, p. 3-8.
- MOCO, S.; BINO, R. J.; VORST, O.; VERHOEVEN, H. A.; DE GROOT, J.; VAN BEEK, T. A.; VERVOORT, J.; RIC DE VOS, C. H. A. Liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. **Plant Physiology**, v. 141, p. 1205-1218, 2006.

- MOREIRA, L.; DIAS, L.G.; PEREIRA, J. A.; ESTEVINHO, L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3482-3485, 2008.
- MOSKOWITZ, M. A.; LO, E. H.; IADECOLA, C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. **Neuronal**, v. 67, p. 181-198, 2010.
- MURGA, R.; RUIZ, R.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J.L. Extraction of natural complex phenols and tannins from Grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3408-3412, 2000.
- MURTHY, K. N. C.; VANITHA, A.; SWAMY, M. M.; RAVISHANKAR, G.A. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cissus quadrangularis* L. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, p. 99-105, 2003.
- MUSTAFA, R. A.; ABDUL, H. A.; MOHAMED, S.; BAKAR, F. A. Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. **Journal of Food Science**, v.75, p. 28-35, 2010.
- OLIVEIRA, A. B.; MENDONÇA, M. S.; AZEVEDO, A. A.; MEIRA, R. M. S. A. Anatomy and histochemistry of the vegetative organs of *Cissus verticillata*-a native medicinal plant of the Brazilian Amazon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 1201-1211, 2012.
- PEPATO, M. T.; BAVIERA, A. M.; VENDRAMINI, R. C.; PEREZ, M. P. M. S.; KETTELHUT, I. C.; BRUNETTI, I. L. *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin-diabetic rats. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 37, p. 15-20, 2003.
- PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Grandezas físicas e termofísicas. In: MEIRELES, M. A. A; PEREIRA, C.G. Fundamentos de Engenharia de alimentos. Atheneu, São Paulo, 2013, v. 6, cap. 11, p. 387-404.
- PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives-review. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 340-372, 2010.

- PEREIRA, C. G.; PRADO, J. M.; MEIRELES, A. J. A.; MEIRELES, M. A. A. Extração sólido-líquido. 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, 2016. v. 1, cap.18, p. 168-208.
- PRABHAVATHI, R. M.; PRASAD, M. P.; JAYARAMU, M. *In-vitro* antioxidant studies of *Cissus quadrangularis (L) extracts*. **European Journal of Experimental Biology**, v. 6, p. 1-6, 2016.
- QUÍLEZ, A. M.; SAENZ, M. T.; GARCÍA, M. D.; PUERTA, R. Phytochemical analysis and anti-allergic study of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 1185-1189, 2004.
- ROSA, P. T. V.; PARAJO, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; MOURE, A.; DÍAZ-REINOSO, B.; R. L. SMITH, JR.; TOYOMIZU, M.; FLORUSSE, L. J.; PETERS, C. J.; GOTO, M.; LUCAS, S.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical and pressurized fluid extraction applied to the food industry. In: MEIRELES, M. A. A. Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications, CRC Press, New York, 2009. cap. 6, p. 269-402.
- SÁENZ, M. T.; GARCIA, M. D.; QUÍLEZ, A.; AHUMADA, M. C. Cytotoxic activity of *Agave intermixta* I. (Agavaceae) and *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Phytherapy Research**, v. 14, p. 552-554, 2000.
- SAHENA, F.; ZAIDUL, I. S. M.; JINAP, S.; KARIM, A. A.; ABBAS, K. A.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction - a review. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 240-253, 2009.
- SAIFAH, E.; KELLEY, C. J.; LEARY, J. D. Constituents of the leaves of *Cissus rhoifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 46, p. 353-358, 1983.
- SALGADO, J. M.; MANSI, D. N.; GAGLIARDI, A. *Cissus sicyoides*: analysis of glycemic control in diabetic rats through biomarkers. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, p. 722-727, 2009.
- 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, H. B.; FILHO, J. M.; DINIZ, M. F. F. M.; VASCONCELOS, T. H. C.; PEREIRA, F. S. B.; RAMALHO, F. S. B.; DANTAS, J.G.; SANTOS, E. B. Avaliação do efeito hipoglicemiante de *Cissus sicyoides* em estudos clínicos fase II. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 70-76, 2008.

SECUIANU, C.; FEROIU, V.; GEANA, D. Phase behavior for carbon dioxide + ethanol system: Experimental measurements and modeling with a cubic equation of state. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 109-116, 2008.

SILVA, G. A.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; AKISUE, G.; FERRO, V. D. O. Padronização dos extratos de *Cissus sicyoides* L. (insulina vegetal) e identificação de carotenos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, p. 144-155, 1996.

SILVA, L.; CARREIRA, R. C.; ONIKI, G. H.; AGRIPINO, D. G.; OUNG, M. C. M.; LADEIRA, A. M. Crescimento e análise do potencial antifúngico em plantas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, p. 73-79, 2007.

SILVA, M. P. Simulação do fracionamento em coluna em contracorrente de óleo de peixe e de solução aquosa com dióxido de carbono supercrítico. Dissertação de Mestrado. UFPA, Pará, 2015.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reEAGnt. **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, 2007. 626 p.

SRIVASTAVA, M. M. High-performace thin-layer chromatography (HPTLC), Munchen: Springer, 2011.

SUPERCritical FLUIDS. In: Applied Separations: página web. Allentown, PA. Disponível em: < <http://www.appliedseparations.com/index.html>>. Acesso em: 02 jun. 2016.

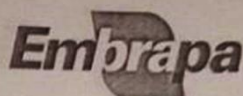
TEIXEIRA, T. S.; GUIMARÃES, L. G. L. Atividade antioxidante de extratos etanólicos de espécies vegetais do Tocantins. Seminário de iniciação científica, UFT, Tocantins, 2013.

- TERRON, L. R. Termodinâmica Química Aplicada. 1. ed. São Paulo: Manole Ltda, 2009. 836 p.
- TOLEDO, M. C. F.; REYES, F. G. R.; IADEROZA, M.; FRANCIS, F. J.; DRAETTA, I. S. Anthocyanins from aniltrepador (*Cissus siyoides*, linn). **Journal of Food Science**, v. 48, p. 1368, 1983.
- VASCONCELOS, T. H. C.; MODESTO-FILHO, J.; DINIZ, M. F. F. M.; SANTOS, H. B.; AGUIAR, F. B.; MOREIRA, P. V. L. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 583-591, 2007.
- 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.
- VIANA, G. S. B.; MEDEIROS, A. C. C.; LACERDA, A. M. R.; LEAL, K. A. M.; VALE, T. G.; MATOS, F. J. A. Hipoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. **BMC Pharmacology**, v. 4, p. 1-7. 2004.
- VIJAYALAKSHMI, A.; KUMAR, P. R.; PRIYADARSINI, S. S.; MEENAXSHI, C. *In vitro* antioxidant and anticancer activity of flavonoid fraction from the aerial parts of *Cissus quadrangularis* Linn. against human breast carcinoma cell lines. **Journal of Chemistry**, 2013.
- VOJNOVIC, D.; MONEGHINI, M.; RUBESSA, F.; ZANCHETTA, A. Simultaneous optimization of several response variables in a granulation process. **Drug Development and Industrlal Pharmacy**, v. 19, p. 1479-1496, 1993.
- WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drugs analysis: Thin-layer chromatography atlas, 2. ed., Munchen: Springer, 2001.
- WELCH, C. R.; WU, Q.; SIMON, J. E. Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. **Current Analytical Chemistry**. v. 4, p. 75-101, 2008.
- XU, F.; MATSUDA, H.; HATA, H.; SUGAWARA, K.; NAKAMURA, S.; YOSHIKAWA, M. Structures of new flavonoids and benzofuran-type stilbene and degranulation inhibitors of

rat basophilic leukemia cells from the brazilian herbal medicine *Cissus sicyoides*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, p. 1089-1095, 20009.

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.

ANEXO I - Laudo de Identificação Botânica



LABORATÓRIO DE BOTÂNICA-HERBÁRIO LAUDO DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

1) Dados do Solicitante

Pessoa Física ou Jurídica: ANTÔNIO PEDRO SOUZA FILHO - EMBRAPA			
CPF ou CNPJ:		C.I. ou Inscrição Estadual	
Endereço: EMBRAPA			
Bairro:	CEP:	Cidade:	UF:
Telefone:	FAX:	E-mail:	

2) Dados do Material para Análise – Nº do NID: 17/2016 (controle do laboratório)

Local de Origem: Horto de Plantas Medicinais		Quantidade de Amostras: 01
Tipo de Amostra: (X) Fértil () Estéril		
Nome do Coletor: Marielba Rodriguez		
Data de Entrada no Laboratório: 16.02.2016		Analisado por: Manoel Cordeiro
Destino e/ou Utilização do Laudo: Publ. e dissertação		Supervisionado por: Silvane Tavares

3) Processo utilizado para Identificação:

Comparação com exsicatas do acervo do herbário IAN.
Classificação dos gêneros em família segundo APG III.
Lista de espécie da Flora do Brasil.

RESULTADO DAS ANÁLISES

Cód.	Nome Comum	Nome Científico	Família
01 (IAN 194 178)	Trepadeira	<i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C.E.Jarvis	Vitaceae

Obs: Prazo de permanência do material no laboratório: 60 dias; a partir dessa data, o material ficará a critério do laboratório.

= Coleta registrada sob nº IAN 194178 e será inserido na coleção do Herbário IAN=

Laudo digitado em: 23.02.2016

Supervisionado em: 24.02.2016

Recebido em:

Digitado: Orlando

Silvane Tavares Rodrigues
Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental

Ministério da
Agricultura e do
Abastecimento

Empresa Brasileira de
Pesquisa Agropecuária

Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n
Bairro do Marco
CEP: 66.095-100 – Belém-Pa

Telefax (091) 3276-8945
Fone: 32041143/32041141
regina@cpatu.embrapa.br

ANEXO II–Análise de Densidade Real (pr)



Central Analítica – Instituto de Química – UNICAMP

CA 190/16

RESULTADO DE ANÁLISE CA 190/16

Empresa	Marielba de los Angeles Rodrigues Salazar
Endereço	PS Mariuadir Santos – Av. João Pablo II, Prédio 21, Apartamento 23 CEP: 66610-120 – Belém/PA - Curio Utinga
A/C	Marielba de los Angeles Rodrigues Salazar
E-mail	marielba434@hotmail.com
Telefone	(91) 9-8948-4358

1. OBJETIVO

Determinação da densidade por picnometria de gás hélio.

2. AMOSTRA

A amostra foi recebida em 07 de Junho de 2016 a temperatura ambiente. A amostragem foi de responsabilidade do cliente e a identificação da amostra está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Legenda de identificação da amostra.

Central Analítica	Cliente
AM 0642/16	Amostra de folha e caule cipó-puca

3. MÉTODO DE ANÁLISE

A amostra foi analisada em picnômetro de gás hélio conforme manual de operação do equipamento.

Equipamento: Picnômetro automático Quantachrome Ultrapyc 1200e.

4. RESULTADO

O resultado obtido está resumido na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultado obtido na análise.

Amostra	Densidade (g/cm ³) ¹
Amostra de folha e caule cipó-puca	1,32 (± 0,02)

¹ Resultados expressos como média e estimativa do desvio padrão de dez determinações.