



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA  
DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS



ALINE GARCIAS DE VARGAS

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E  
NAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DAS  
FOLHAS DE ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata* Miller)**

Dissertação

PATO BRANCO

2017

ALINE GARCIAS DE VARGAS

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E  
NAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DAS  
FOLHAS DE ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata* Miller)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Área de Concentração: Química Biotecnológica.

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Sirlei Dias Teixeira;  
Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup> Raquel Dalla Costa da Rocha.

PATO BRANCO

2017



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Câmpus Pato Branco  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de  
Processos Químicos e Bioquímicos



## TERMO DE APROVAÇÃO Nº 51

### Título da Dissertação

**“Influência da sazonalidade na composição química e nas atividades antioxidante e antimicrobiana das folhas de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller)”**

### Autora

**Aline Garcias de Vargas**

Esta dissertação foi apresentada às 13 horas e 50 minutos do dia 23 de fevereiro de 2017, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em biotecnologia – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira  
UTFPR/PB  
Orientadora

Prof. Dr. Rodrigo Hinojosa Valdez  
IFPR/Capanema  
Examinador

Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira  
UTFPR/PB  
Examinador

Visto da Coordenação

**Prof. Dra. Cristiane Regina Budziak Parabocz**  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em  
Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - PPGTP

**O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus, por iluminar minha trajetória e por me dar forças para sempre seguir em frente.

Agradeço imensamente aos meus pais pelo incentivo, apoio, carinho e companheirismo concedidos ao longo de todo o curso. E a meu irmão, Vagner, sua esposa Daiane e seu filho Otávio por estarem sempre por perto e proporcionarem momentos de descontração.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sirlei Dias Teixeira pela orientação deste trabalho, por todo o conhecimento transmitido, e por seu apoio em meus momentos de dificuldade.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raquel Dalla Costa da Rocha pela co-orientação e pela forte colaboração nas tomadas de decisão deste trabalho.

Aos membros da banca de qualificação, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tatiane Luiza Cadorin Oldoni e Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira, pela contribuição na melhoria deste trabalho.

Ao Laboratório de Análise de Água e Alimentos (LAQUA) e à Central de Análises, pelo espaço concedido para a realização de análises.

À Cledes Terezinha de Oliveira, pela ajuda com as análises de atividade antimicrobiana e pelo conhecimento transmitido, bem como ao Instituto Federal do Paraná (IFPR) pelo espaço concedido para realização dessas análises.

Ao Michel Fonseca e a Vidianny Queiroz, pelo aporte no desenvolvimento das análises de atividade antioxidante.

À minha amiga e comadre de coração, Estela Iara Bandeira, por ser quem me estimulou a ingressar neste curso de mestrado.

Às minhas amigas Anne, Caroline, Geórgia e Maiara, pelo companheirismo e pelos momentos descontraídos proporcionados durante o curso.

Por fim, agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram com a realização deste trabalho.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.*

*(José de Alencar)*

## RESUMO

VARGAS, Aline Garcias de. Influência da sazonalidade na composição química e nas atividades antioxidante e antimicrobiana das folhas de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller). 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2017.

Em meio a grande biodiversidade da flora brasileira, a ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) começou a ganhar visibilidade principalmente devido ao alto teor de proteínas presente em suas folhas, passando a ser utilizada então na alimentação. Visto que a colheita pode se dar durante todo o ano, não são raras as possíveis variações sazonais em sua composição e atividade. Com o objetivo de melhor conhecer as propriedades biológicas e os constituintes químicos desta espécie, considerando duas estações de coleta do material vegetal (inverno e verão), foi realizada a análise da composição centesimal das folhas secas à sombra e o estudo da cinética de secagem das folhas frescas ajustados aos modelos matemáticos de Lewis e de Page. Além disso, foram obtidos diferentes extratos das folhas secas por meio de extração sucessiva com solventes em gradiente de polaridade – éter de petróleo, diclorometano e etanol – para determinação de compostos fenólicos por Folin-Ciocalteu, de taninos condensados por Stiasny, da atividade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP, e da atividade antimicrobiana por difusão em disco e concentração inibitória mínima (CIM). As folhas frescas apresentaram alto teor de umidade, chegando a 87,7% no período do inverno e 85,54% no verão. O estudo da cinética de secagem das folhas de *P. aculeata* revelou que os dados experimentais melhor se ajustaram ao modelo de Page. No que se refere a composição centesimal das folhas secas, os principais constituintes são os carboidratos, seguido pelas cinzas, para ambas as coletas. Todos os extratos apresentaram algum teor de taninos condensados, sendo o extrato etanólico o mais rico em tais compostos (47,83% no inverno e 38,71% no verão). Em relação aos compostos fenólicos, os extratos que exibiram os maiores conteúdos foram os etanólicos (295,08 mg EAG g<sup>-1</sup> no inverno e 336,35 mg EAG g<sup>-1</sup> no verão) e diclorometânicos (244,29 mg EAG g<sup>-1</sup> no inverno e 280,79 mg EAG g<sup>-1</sup> no verão). Em se tratando do potencial antioxidante, os resultados diferiram expressivamente entre os métodos DPPH, ABTS e FRAP, o que pode ocorrer devido a singularidade de cada ensaio e de cada matriz vegetal. O extrato obtido com éter de petróleo, da coleta de inverno, foi o único que apresentou atividade antimicrobiana, manifestando ação bacteriostática frente a bactéria *S. aureus*, na concentração inibitória mínima (CIM) de 2.500 µg mL<sup>-1</sup>. De modo geral, as folhas coletadas no verão apresentaram maior riqueza de constituintes e/ou metabólitos, com exceção do teor de taninos condensados dos extratos e dos teores de cinzas e de umidade das folhas, que se mostraram maiores na coleta de inverno.

**Palavras-chave:** Produtos naturais. Análise sazonal. Metabólitos. Nutrientes. Atividade biológica.

## ABSTRACT

VARGAS, Aline Garcias de. Seasonality influence on the chemical composition and on antioxidant and antimicrobial activities of the ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) leaves. 2017. 80 p. Dissertation (Masters in Chemical and Biochemical Processes Technology), Federal University of Technology – Paraná. Pato Branco, PR, 2017.

Within the large biodiversity of Brazilian flora, the ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) started gaining visibility mostly due to the high protein content of its leaves, which made it valuable to feed. Since harvest can occur throughout the year, seasonal variations in composition and activity are normal. With the goal of exploring the biological properties and the chemical components of this species, considering two sampling seasons of the plant (winter and summer), the drying kinetic of fresh leaves were adjusted to Lewis and Page math models and also was determined the proximate composition of the leaves dried under shade. Furthermore, the extracts of dried leaves were obtained by successive extraction using solvents in polarity gradient – petroleum ether, dichloromethane and ethanol –, to determine phenolic compounds by Folin-Ciocalteu reagent, condensed tannins by Stiasny, antioxidant activity by DPPH, ABTS and FRAP, and antimicrobial activity by disc diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC). The fresh leaves presented high moisture content, getting 87.7% in the winter and 85.54% in the summer. Drying kinetic study of *P. aculeata* leaves showed that experimental data fit better to Page model than Lewis model. Regarding proximate composition, main constituents are carbohydrate, followed by ashes, for both sampling. All of the extracts showed some condensed tannin content, and the ethanolic extract was the richest (47.83% in the winter and 38.71% in the summer). The highest content of phenolic compounds were checked in the ethanolic extract (295.08 mg EAG g<sup>-1</sup> in the winter and 336.35 mg EAG g<sup>-1</sup> in the summer), followed by dichloromethane extract (244.29 mg EAG g<sup>-1</sup> in the winter and 280.79 mg EAG g<sup>-1</sup> in the summer). About the antioxidant power, results expressively diverged among the methods DPPH, ABTS and FRAP, which can occur due to the singularity of each approach and each plant. The extract obtained with petroleum ether, from winter sampling, was the only one which exhibited antimicrobial activity, by manifesting bacteriostatic action against *S. aureus* bacteria in a minimum inhibitory concentration (MIC) of 2.500 µg mL<sup>-1</sup>. In general, leaves collected in the summer presented more abundance of components and/or metabolites, except the tannin content of the extracts and the ashes and moisture content of the leaves, which were higher in the winter sampling.

**Keywords:** Natural products. Seasonal analysis. Metabolites. Nutrients. Biological activities.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias metabólicas de obtenção de compostos fenólicos, terpenos e alcaloides .....	20
Figura 2 - Molécula de cafeína, exemplo de alcaloide .....	21
Figura 3 - Molécula de limoneno, exemplo de monoterpene .....	22
Figura 4 - Núcleo fundamental de flavonoides .....	23
Figura 5 - Estrutura química de tanino hidrolisável .....	25
Figura 6 - Estrutura química genérica de tanino condensado .....	26
Figura 7 - Reação de Mannich (genérica) .....	27
Figura 8 - Formas radicalar (1) e não-radicalar (2) do DPPH.....	28
Figura 9 - Reação do FRAP: redução do complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe III-TPZ) em complexo ferroso (Fe II-TPZ) em meio ácido .....	29
Figura 10 - Estabilização do radical ABTS·+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio .....	29
Figura 11 - Aspecto vegetativo da ora-pro-nobis.....	31
Figura 12 - Flores da <i>P. aculeata</i> Miller.....	32
Figura 13 - Frutos da ora-pro-nobis. Em (a) ainda imaturos, apresentando folhas e espinhos. Em (b) quando estão totalmente maduros. Em (c), a aparência interna do fruto maduro .....	32
Figura 14 - Fluxograma das análises para caracterização da ora-pro-nobis.....	34
Figura 15 – a) Preparo das amostras para análise de umidade; b) amostras ao final do processo de secagem .....	46
Figura 16 - Curvas de secagem das folhas de ora-pro-nobis.....	47
Figura 17 - Comparação das modelagens com os dados experimentais da coleta de inverno .....	48
Figura 18 - Comparação das modelagens com os dados experimentais da coleta de verão .....	49
Figura 19 - Preparação dos extratos brutos .....	53
Figura 20 - Teste qualitativo para taninos condensados – coleta de inverno. Extratos obtidos com: etanol, diclorometano, éter de petróleo, e o teste do branco (água), respectivamente .....	54

Figura 21 – Precipitados formados pela reação com formaldeído (Stiasny) nos extratos obtidos com etanol, diclorometano e éter de petróleo, respectivamente, para: a) coleta de inverno; b) coleta de verão. ....	55
Figura 22 - Formação da resina tanino-formaldeído pela reação entre tanino condensado e formaldeído .....	57
Figura 23 - Curva de calibração do padrão ácido gálico .....	58
Figura 24 - Conteúdo fenólico dos extratos de folhas de ora-pro-nobis coletadas em diferentes épocas .....	58
Figura 25 - Resultados das análises de atividade antioxidante dos extratos em função da sazonalidade .....	61
Figura 26 - Placas de teste de difusão em disco dos extratos EPV (a) e EPI (b) frente a bactéria <i>S. aureus</i> . Discos: (1) extrato a 10.000 µg mL <sup>-1</sup> ; (2) extrato a 5.000 µg mL <sup>-1</sup> ; (3) extrato a 2.500 µg mL <sup>-1</sup> ; (4) Tetraciclina; (5) Norfloxacino; (6) DMSO.....	63
Figura 27 - Oxirredução do 2,3,5 trifeniltetrazólio (incolor) a 1,3,5 trifenilformazan (avermelhado), em presença de células vivas .....	65
Figura 28 - Placa de teste de microdiluição após aplicação do revelador TTC .....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos ajustes dos modelos utilizados, a 70 °C.....	48
Tabela 2 – Composição centesimal das folhas de ora-pro-nobis secadas a sombra	51
Tabela 3 – Massa e rendimento dos extratos brutos de <i>P. aculeata</i> .....	53
Tabela 4 - Determinação de taninos condensados pela reatividade ao formaldeído (Número de Stiasny) .....	56
Tabela 5 - Resumo dos resultados de atividade antioxidante dos extratos.....	60

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Siglas para identificação dos extratos analisados .....	38
--	----

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
3.1 BIODIVERSIDADE DA VEGETAÇÃO BRASILEIRA.....	17
3.2 COMPOSIÇÃO GERAL DOS VEGETAIS .....	17
3.2.1 Metabólitos secundários (especializados) .....	19
3.2.1.1 Alcaloides .....	20
3.2.1.2 Terpenos .....	21
3.2.1.3 Compostos fenólicos .....	22
3.2.1.3.1 Taninos hidrolisáveis .....	24
3.2.1.3.2 Taninos condensados .....	25
3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	27
3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	29
3.5 O GÊNERO <i>Pereskia</i> E A ORA-PRO-NOBIS .....	30
<b>4 MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	35
4.1.1 Curva de secagem .....	35
4.1.2 Caracterização centesimal .....	36
4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS .....	38
4.3 ANÁLISES DE METABÓLITOS .....	39
4.3.1 Teste qualitativo para taninos condensados .....	39
4.3.2 Determinação de taninos condensados – Número de Stiasny (NS).....	39
4.3.3 Determinação de compostos fenólicos por Folin-Cicalteau.....	40
4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA <i>P. Aculeata</i> .....	41
4.4.1 DPPH .....	41
4.4.2 ABTS .....	41
4.4.3 FRAP .....	42
4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA <i>P. aculeata</i> .....	42
4.5.1 Difusão em disco .....	43
4.5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	44

4.5.3 Atividade bactericida/bacteriostática .....	45
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	46
5.1.1 Curva de secagem .....	46
5.1.2 Composição centesimal .....	50
5.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	52
5.3 ANÁLISE DE METABÓLITOS.....	54
5.3.1 Análise qualitativa e determinação de taninos condensados .....	54
5.3.2 Determinação de compostos fenólicos por Folin-Ciocalteu.....	57
5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	59
5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	62
5.5.1 Difusão em disco.....	62
5.5.2 Concentração inibitória mínima (CIM) .....	64
5.5.3 Atividade bactericida/bacteriostática .....	66
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Uma vasta biodiversidade de vegetais é encontrada no Brasil, cujas propriedades são utilizadas para os mais diversos fins, sejam eles alimentícios, farmacológicos, ambientais, entre outros. A grande extensão do nosso país abrange vários tipos de clima, o que propicia o desenvolvimento e o cultivo de uma infinidade de espécies nativas e/ou exóticas.

A diversidade da flora brasileira apresenta uma das mais ricas fontes de substâncias naturais com potencial químico, recebendo atenção especial de pesquisadores preocupados com os avanços científicos e tecnológicos (FILHO, 2010). São inúmeras as substâncias que compõem os materiais vegetais, divididas em dois grandes grupos: os metabólitos primários e os metabólitos secundários, ou especializados.

Os metabólitos primários consistem nas substâncias responsáveis por fazer com que os organismos sejam capazes de viver, crescer e se reproduzir. Dentre eles, estão as proteínas, os carboidratos, os lipídios e os ácidos nucleicos. Já os metabólitos secundários expressam a individualidade das espécies e compreendem os compostos que desempenham algum papel importante para o bem-estar da espécie que o produz, como a atuação na defesa contra predadores (DEWICK, 2002). As aplicações desses metabólitos para o ser humano são variadas, pois podem agir como agentes antimicrobianos ou antifúngicos, redutores do colesterol, imunossupressores, antiparasitários, herbicidas, entre outros (VAISHNAV; DEMAIN, 2010).

Diversos fatores influenciam na composição dos vegetais, tais como a região e o clima onde pertencem. Contudo, as plantas também podem ter sua produção de metabólitos modificada sazonalmente, o que acarreta em alterações na bioatividade dos mesmos, como atividade antioxidante e antimicrobiana, dependendo da época em que o material é coletado e analisado (FIGUEIREDO, 2010; HUSSEIN et al., 2008; MATIAS et al., 2016), pois a quantidade e/ou natureza das substâncias ativas não é constante durante todo o ano (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Uma espécie vegetal que vem chamando atenção de pesquisadores, atualmente, é a ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller), planta tropical que faz parte da flora brasileira nativa (TOFANELLI; RESENDE, 2011) pertencente à

família Cactaceae. Ela é conhecida por seu emprego na culinária e, também, na ornamentação de jardins (ALMEIDA; CORRÊA, 2012) e, além de sua função nutricional, é considerada uma planta medicinal (COUTO, 2006).

A fim de explorar outras propriedades e aplicações da ora-pro-nobis, neste trabalho foi realizado um estudo comparativo, levando em consideração a sazonalidade, a partir da caracterização centesimal das folhas frescas e da determinação de metabólitos especializados nos extratos das folhas secas, obtidos por solventes em um gradiente de polaridade. Foram analisadas, também, as atividades antioxidante e antimicrobiana desses extratos, tendo em vista que a ora-pro-nobis é considerada uma planta medicinal pela medicina popular.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as folhas da ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller), fazendo um comparativo, em termos de composição e/ou concentração de metabólitos presentes e de seu potencial antioxidante e antimicrobiano, em amostras de diferentes coletas (inverno e verão).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar caracterização centesimal (umidade, proteínas, lipídios, carboidratos e cinzas) das folhas secas de ora-pro-nobis, coletadas no inverno e no verão;
- Estudar a cinética de secagem das folhas de ora-pro-nobis e ajustar modelos matemáticos aos valores experimentais em função da época de colheita.
- Obter diferentes extratos das folhas secas (inverno e verão) por meio de extrações sucessivas, utilizando solventes em ordem crescente de polaridade: éter de petróleo, diclorometano e etanol;
- Estimar o conteúdo de compostos fenólicos dos extratos utilizando o método de Folin-Ciocalteu;
- Verificar a presença de taninos condensados nos extratos e quantificá-los por método de Stiasny;
- Determinar a atividade antioxidante dos extratos por DPPH, ABTS e FRAP;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos por difusão em disco, microdiluição e tipo de ação antimicrobiana (bactericida/bacteriostática).

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 BIODIVERSIDADE DA VEGETAÇÃO BRASILEIRA

De modo geral, o termo biodiversidade pode ser definido como a variedade e complexidade de organismos vivos, abrangendo espécie, DNA, genes, proteoma, metaboloma, etc. Contudo, a biodiversidade deve levar em consideração a abundância das espécies dentro dos sistemas ecológicos dos quais fazem parte (YUNES; CECHINEL FILHO, 2012).

O Brasil abrange quase metade do continente sul-americano e apresenta a maior biodiversidade animal e vegetal do mundo. São conhecidas 43.020 espécies vegetais, espalhadas em todos os seis biomas do país: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. Devido a sua grande extensão, o território brasileiro engloba várias zonas climáticas, tornando favorável ao desenvolvimento das mais diversas espécies de vida (BRASIL, 2015).

A vegetação brasileira se sobressai como a principal fonte renovável para o desenvolvimento de novos fármacos, além de apresentar importante papel nas indústrias de alimentos, cosméticos e herbicidas. A diversidade estrutural das substâncias naturais encontradas nas plantas brasileiras, bem como seu potencial químico, recebeu atenção especial dos pesquisadores preocupados com os avanços da ciência e da tecnologia (FILHO, 2010).

#### 3.2 COMPOSIÇÃO GERAL DOS VEGETAIS

Todos os organismos precisam transformar e converter vários compostos orgânicos para serem capazes de viver, crescer e se reproduzir. Uma rede integrada de enzimas media e, cuidadosamente, regula as reações químicas que são usadas para tal. Isso é denominado metabolismo intermediário, e os caminhos envolvidos são chamados de vias metabólicas. Algumas das mais importantes moléculas da vida são carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Apesar das características

variadas entre um organismo e outro, os caminhos para modificar e sintetizar essas moléculas são essencialmente os mesmos. Sendo assim, essas são algumas das substâncias denominadas metabólitos primários (DEWICK, 2002) e se apresentam em maior quantidade nas espécies.

Quando se deseja comparar a composição química de alguma matéria-prima coletada em diferentes épocas ou localidades, esta deve ser feita baseada em sua matéria seca. Quando as amostras são secas ao ar, elas conterão cerca de 90% de matéria seca (aproximadamente 10% de umidade) (SILVA; QUEIROZ, 2012).

A fim de exprimir o valor nutritivo de alguma espécie vegetal, faz-se uso do estudo da composição centesimal dessa espécie, que corresponde à proporção dos grupos umidade, lipídios (extrato etéreo), proteínas, fibras, cinzas e glicídios presentes em 100 g do material vegetal (LUZIA et al., 2010).

As moléculas de lipídios são altamente energéticas e são responsáveis pelo transporte de vitaminas lipossolúveis. Além disso, também abrangem os ácidos graxos essenciais ao organismo, lecitinas, ceras, carotenoides, clorofila, óleos essenciais, entre outros. Os carboidratos (ou glicídios) também englobam diversos tipos de substâncias, desde monossacarídeos como a glicose, dissacarídeos como a sacarose, e até polissacarídeos como amido e celulose (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

As proteínas formam polímeros, cujos monômeros são ligados entre si por ligações peptídicas. O termo proteína bruta abrange uma variedade de substâncias semelhantes estruturalmente, mas que diferem em suas funções fisiológicas. Pelo fato de as proteínas terem um percentual de nitrogênio quase constante (16 %), usa-se determinar a quantidade de nitrogênio presente na amostra e, então, utilizar um fator de conversão para obter tal resultado em proteína bruta (SILVA; QUEIROZ, 2012).

As fibras abrangem os polissacarídeos (exceto amido) e a lignina que não são digeridos pelo intestino humano. Gomas, mucilagens, algumas pectinas e hemiceluloses são exemplos de fibras solúveis. Já as fibras insolúveis compreendem a celulose, a lignina, a maioria das hemiceluloses e algumas pectinas. Em hortaliças, encontram-se principalmente as fibras insolúveis (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). O termo fibra bruta abrange frações de celulose e de lignina insolúvel, que compreendem os carboidratos resistentes ao tratamento com ácidos e bases diluídos e representam a maioria das fibras alimentares (SILVA; QUEIROZ, 2012).

Também chamadas de matéria mineral, as cinzas são os resíduos obtidos após a calcinação de uma amostra. Essa determinação indica a riqueza da amostra quanto a seus constituintes minerais (SILVA; QUEIROZ, 2012).

### 3.2.1 Metabólitos secundários (especializados)

Além dos metabólitos primários, existem também os processos metabólicos voltados aos compostos que têm uma distribuição mais limitada na natureza. Tais compostos são denominados metabólitos secundários e são encontrados apenas em organismos específicos ou grupos de organismos, podendo expressar a individualidade das espécies. Apesar dos conceitos utilizados para explicar os metabólitos primários e secundários, o que os diferencia é apenas uma linha tênue, de modo que algumas substâncias se enquadram nos dois grupos (DEWICK, 2002).

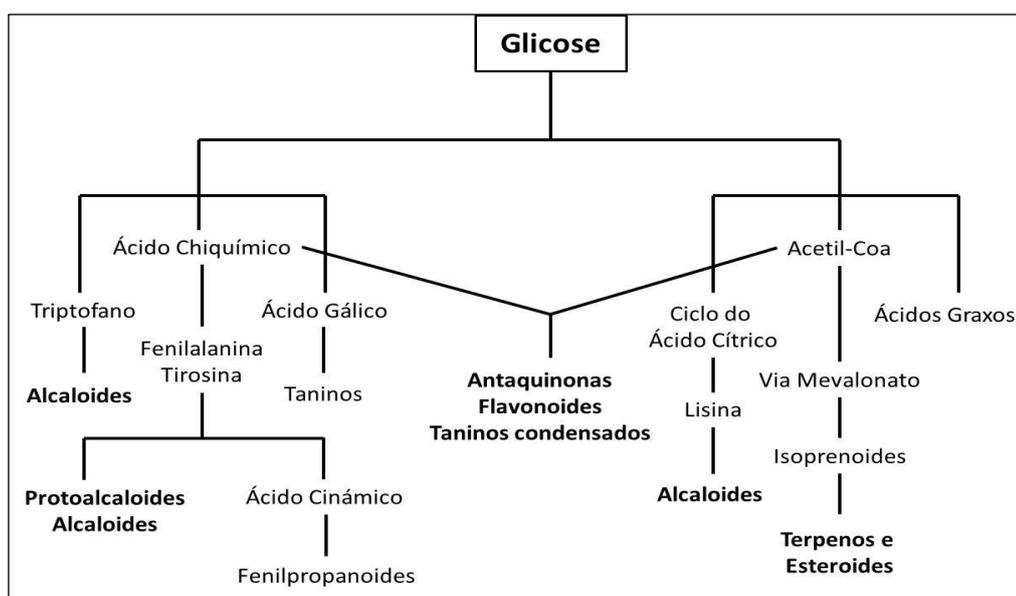
Os metabólitos secundários são oriundos da evolução biológica das espécies e passaram, então, a ter importância na sobrevivência das mesmas (YUNES; CECHINEL FILHO, 2012), sendo indispensáveis em sua adaptação (OLIVEIRA et al., 2011). Como as plantas também carecem de sistemas imunológicos, seus metabólitos secundários podem atuar na defesa contra vírus e outros agentes infecciosos (YUNES; CECHINEL FILHO, 2012). Além disso, são compostos que desempenham algum papel importante para o bem-estar da espécie que o produz, havendo outras razões pelas quais são produzidos, dentre elas: serem substâncias tóxicas para atuar na defesa contra predadores; serem atrativos voláteis para determinadas espécies; apresentarem coloração que atraia ou afaste outras espécies (DEWICK, 2002); e poderem auxiliar no processo de polinização ao produzir substâncias que atraem os agentes vivos (FILHO, 2010). Eles também podem atuar como agentes antimicrobianos ou antifúngicos, redutores do colesterol, imunossupressores, antiparasitários, herbicidas, entre outros (VAISHNAV; DEMAINE, 2010).

Os metabólitos secundários têm sua bioatividade sendo investigada desde a Grécia antiga na experimentação *in vivo* com diferentes plantas (PAVARINI et al., 2012). Muitos fármacos importantes são provenientes de produtos naturais ou tem estes como protótipo, considerando a quase infinita diversidade e complexidade de estruturas moleculares que a natureza fornece (YUNES; CECHINEL FILHO, 2012). O

isolamento e a identificação da estrutura dos metabólitos secundários apresentam papel fundamental para o desenvolvimento científico da química dos produtos naturais dos vegetais, hoje denominada fitoquímica. Além da caracterização estrutural, esta também avalia as propriedades e estuda as rotas biossintéticas das substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário dos vegetais (FILHO, 2010).

Atualmente sabe-se que as plantas podem ter sua produção de metabólitos secundários modificada sazonalmente, acarretando em alterações na atividade biológica dos mesmos e em sua composição química (FIGUEIREDO, 2010; HUSSEIN et al., 2008; MATIAS et al., 2016).

De forma geral, há três grandes grupos de metabólitos secundários: alcaloides, terpenos e compostos fenólicos (Figura 1) (TAIZ; ZEIGER, 2006).



**Figura 1 - Vias metabólicas de obtenção de compostos fenólicos, terpenos e alcaloides**

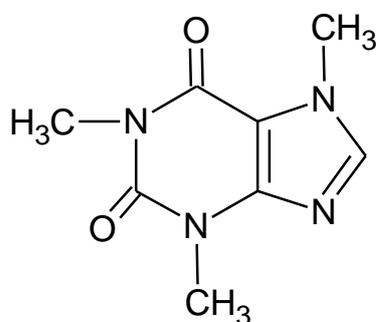
Fonte: Klein (2015)

### 3.2.1.1 Alcaloides

Os alcaloides são substâncias farmacologicamente ativas que apresentam nitrogênio em sua estrutura (BESSA; TERRONES; SANTOS, 2007). Devido a biodisponibilidade e propriedades biológicas, são muito utilizados na dieta humana e

na composição de medicamentos (HE et al., 2014). A atividade biológica desses compostos compreende propriedades antimicrobiana, anticancerígena, anti-inflamatória, inseticida, entre outras (NEBO et al., 2014).

Em sua maioria, os alcaloides são tóxicos quando ingeridos em quantidade suficiente. No entanto, em doses menores estes compostos têm aplicações importantes, como a morfina que é largamente utilizada na medicina (TAIZ; ZEIGER, 2006). Há também a cafeína (Figura 2), conhecida por ser uma substância psicoativa que age contra a sensação de fadiga e afeta o sono e o humor, pois provoca um aumento da atividade do Sistema Nervoso Central (HO; CHUNG, 2013).



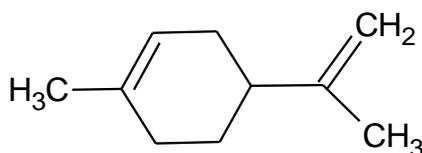
**Figura 2 - Molécula de cafeína, exemplo de alcaloide**  
**Fonte: Autoria própria**

### 3.2.1.2 Terpenos

Os terpenos são formados pela união de isopentenilpirofosfatos (IPP), bem como de seu isômero dimetilalilpirofosfato (DMAPP), que são unidades de cinco carbonos derivados do ácido mevalônico e que dão origem aos outros terpenos (DEWICK, 2002).

A fórmula geral dos terpenos é  $(C_5H_8)_n$ , podendo possuir grupos hidroxila ou carbonila em sua estrutura, geralmente cíclica. Estes compostos podem ser classificados em: monoterpenos (Figura 3), que possuem duas unidades de isoprenos; sesquiterpenos, que possuem três unidades; diterpenos, que possuem quatro unidades; triterpenos, com 30 átomos de carbono; entre outros (ARAÚJO, 2008; DEGENHARDT; KOLLNER; GERSHENZON, 2009).

De modo geral, os terpenoides constituem uma importante fonte de fragrâncias, óleos essenciais, agentes antibacterianos, antioxidantes e antifúngicos. Os monoterpenos (C10) e os sesquiterpenos (C15) são os principais responsáveis pelo aroma das plantas. Alguns diterpenos (C20) são conhecidos por apresentar atividade antitumoral, e os triterpenoides (C30), por apresentar atividade antioxidante (YUNES; CECHINEL FILHO, 2012).



**Figura 3 - Molécula de limoneno, exemplo de monoterpene**  
**Fonte: Autoria própria**

Entre os 30.000 terpenos, são mais de 400 os monoterpenos com características de sabor e atividade biológica conhecida. Estes apresentam importância na saúde humana devido as suas atividades antibacteriana, antiviral, entre outras, e são produzidos naturalmente pelos vegetais, como frutas, legumes e ervas (KUPSKA, et al., 2014).

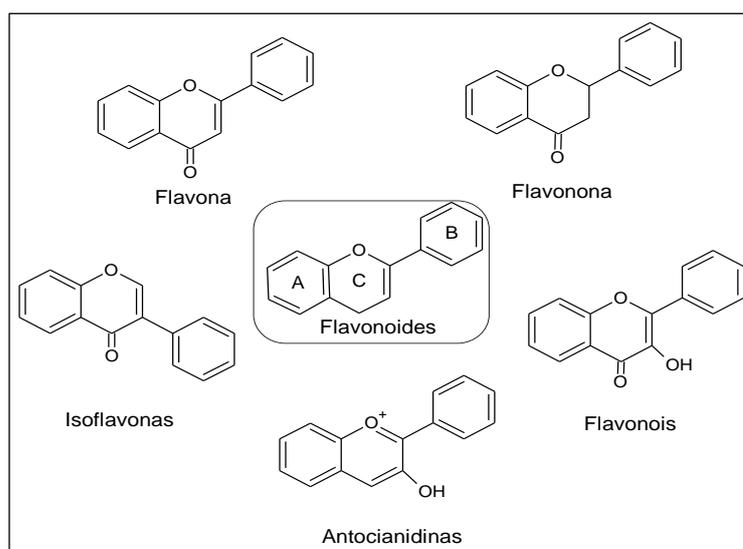
### 3.2.1.3 Compostos fenólicos

Grande parte dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, e sim na forma de ésteres ou de heterosídeos. Dessa forma, são solúveis em água e em outros solventes orgânicos polares (MONTEIRO et al., 2005). Os compostos fenólicos apresentam pelo menos um anel aromático, no qual ao menos um hidrogênio é substituído por uma hidroxila (DÔRES, 2007). Em plantas, esses compostos englobam diversas classes de substâncias, tais como fenóis simples, polifenóis, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (SOUSA et al., 2007).

Nos últimos anos, os polifenóis têm sido amplamente estudados devido ao seu crescente valor comercial nas áreas de nutrição, cosméticos e indústria

farmacêutica. Vários deles são associados a diferentes atividades biológicas, incluindo antimutagênica, anticarcinogênica, antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória (AIRES et al., 2016).

Os flavonoides têm sua estrutura básica formada por dois anéis aromáticos (anéis A e B) unidos por uma ponte de três átomos de carbono (SIMÕES et al., 2004). A classificação dos flavonoides é baseada em diferenças na estrutura desses três átomos de carbono que ligam os dois anéis aromáticos, seja na presença ou ausência de ligação dupla, de uma porção carbonila ou carboxila ou na possibilidade de formação de um anel C penta- ou hexagonal (TARAHOVSKY et al., 2014). Em meio a essa diversidade de flavonoides possíveis, pode-se destacar os flavonóis, as flavonas, as flavanonas, os flavanóis (ou catequinas), as antocianidinas e as isoflavonas (Figura 4) (OLIVEIRA et al., 2010).



**Figura 4 - Núcleo fundamental de flavonoides**  
**Fonte: Klein (2015)**

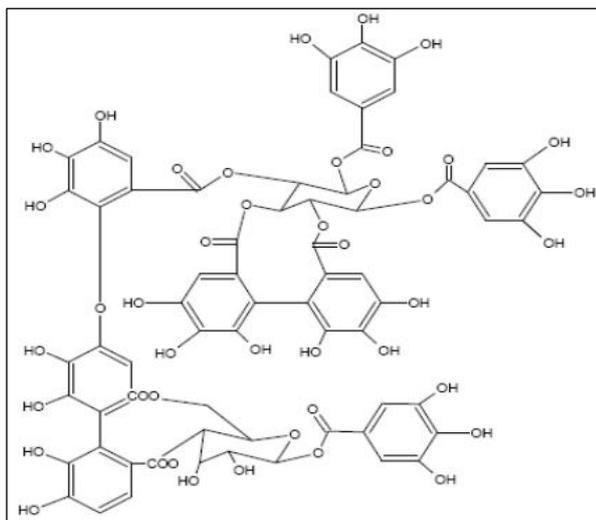
Os taninos são compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário vegetal e despertam grande interesse econômico e ecológico (MONTEIRO et al., 2005). Estão presentes em uma grande variedade de plantas, podendo ser encontrados nas raízes, na casca, nas folhas, nas sementes, nos frutos e na seiva. Porém, a quantidade de taninos nas plantas pode variar de acordo com as condições climáticas e geográficas, com a espécie de planta e com as partes do vegetal

(BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004). Há estudos que mostram variações no teor de taninos quando as plantas são coletadas e analisadas em épocas diferentes (MONTEIRO et al., 2005).

Como são compostos fenólicos, os taninos tendem a ser muito reativos quimicamente, formando ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Podem ser facilmente oxidáveis por enzimas vegetais específicas ou por influência de metais, como no caso do cloreto férrico, que causa o escurecimento de suas soluções (MONTEIRO et al., 2005). A estrutura química desses metabólitos secundários apresenta elevado peso molecular e, devido a seus grupamentos hidroxila-fenólicos, permitem a formação de ligações cruzadas com proteínas. Os taninos apresentam como principais características: a solubilidade em água, exceto aqueles com peso molecular muito elevado, a habilidade de ligarem-se a proteínas e a de combinar-se com celulose e pectina para formar complexos insolúveis (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004). Classicamente, de acordo com suas estruturas químicas, os taninos são subdivididos em hidrolisáveis e condensados (MONTEIRO et al., 2005).

#### 3.2.1.3.1 Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis (Figura 5) são ésteres de ácido gálico e de ácido elágico glicosilados, formados a partir do chiquimato, em que as hidroxilas do açúcar são esterificadas com os ácidos fenólicos. Em geral, os taninos elágicos são mais frequentes que os gálicos (MONTEIRO et al., 2005). Os taninos hidrolisáveis são unidos por ligações éster-carboxila, podendo ser facilmente hidrolisáveis quando estão em meio ácido ou básico. Apresentam como unidade básica estrutural um poliol, geralmente D-glucose, com seus grupos hidroxila esterificados pelo ácido gálico (galotaninos) ou pelo hexadihidroxifênico (elagitaninos) (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).



**Figura 5 - Estrutura química de tanino hidrolisável**

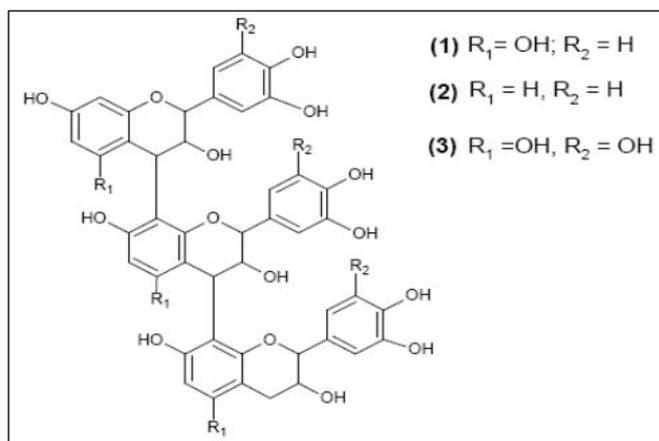
**Fonte: Mangrich et al. (2014)**

Uma das aplicações dos taninos hidrolisáveis é na indústria de cervejas, a qual é um produto de origem vegetal e é muito suscetível a alterações em sua composição e estabilidade físico-química. Uma forma de reduzir a concentração de proteínas na cerveja é com a utilização de ácido tânico (tanino hidrolisável) através da precipitação dos mesmos como complexo tanino-proteico, que podem ser retirados da cerveja por sedimentação ou centrifugação/filtração (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).

### 3.2.1.3.2 Taninos condensados

Os taninos condensados (Figura 6), também chamados de proantocianidinas, são amplamente encontrados no reino vegetal e compreendem os polímeros de flavan-3-ol e/ou de flavan-3,4-diol, derivados do metabolismo do fenilpropanol. Essa classe de compostos apresenta uma rica diversidade estrutural devido aos padrões de substituições entre as unidades flavânicas, a diversidade de posições em suas ligações e a estereoquímica de seus compostos (MONTEIRO et al., 2005). Os taninos condensados podem conter de duas a cinquenta unidades de flavanoides, possuindo

uma estruturação complexa. São resistentes a hidrólise, porém, podem ser solúveis em solventes orgânicos aquosos (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).



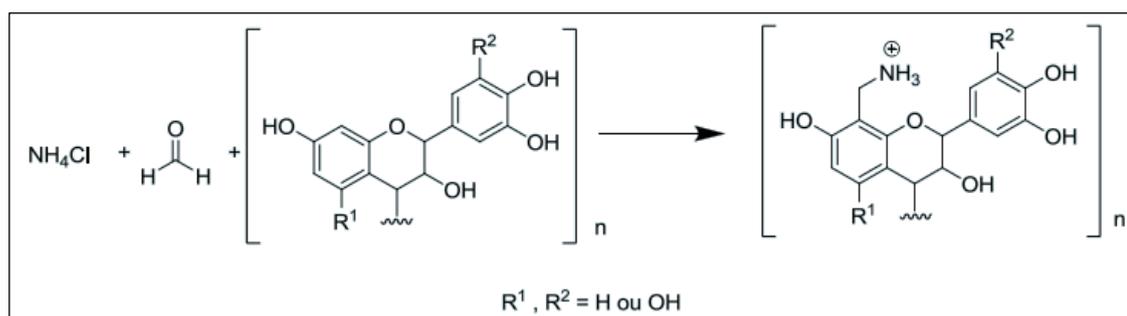
**Figura 6 - Estrutura química genérica de tanino condensado**

Fonte: Mangrich et al. (2014)

Os taninos condensados têm sido amplamente pesquisados para substituir as resinas sintéticas utilizadas na fabricação de painéis de madeira, os quais vêm utilizando resinas de Ureia-Formaldeído (UF), Fenol-Formaldeído (FF), entre outros que apresentam alto custo de produção. Uma típica característica do tanino condensável é a formação de precipitado ao reagir com formaldeído em meio ácido, denominada Reação de Stiasny, na qual ele pode ser quantificado. Essa reação tanino-formaldeído faz com que surjam moléculas policondensadas de alto peso molecular, sendo o que fundamenta seu emprego na fabricação de painéis de madeira (GONÇALVES et al., 2003).

Uma das aplicações dos taninos condensados que vem ganhando espaço no âmbito tecnológico e ambiental é a utilização desses metabólitos como recurso alternativo (e natural) para minimizar problemas nas estações de tratamento de águas (ETA) e de esgotos (ETE) e nos projetos de despoluição de rios em áreas urbanas. Para tal, está sendo proposto o uso de polímeros catiônicos orgânicos, como substituintes dos compostos sintéticos ou dos sais de alumínio e ferro utilizados atualmente. Esses polímeros catiônicos orgânicos podem ser preparados a partir de produtos naturais, como os taninos condensados extraídos da *Acacia mearnsii*, ou acácia negra, planta de origem australiana com teor de taninos entre 20 e 30% em

sua casca. A preparação do polímero catiônico pode ser feita pela reação de Mannich (Figura 7), em que ocorre a formação do cloreto de imínio pela reação do cloreto de amônio, ou outra amina que se queira usar, com o aldeído fórmico. Em seguida, o cátion imínio ( $-\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ ) é inserido na posição 6 ou 8 do anel A do tanino condensado, formando um polímero orgânico catiônico (MANGRICH et al., 2014).



**Figura 7 - Reação de Mannich (genérica)**  
**Fonte: Mangrich et al. (2014)**

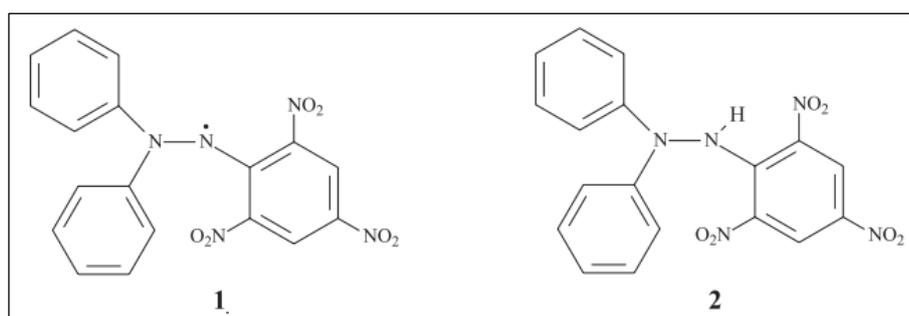
### 3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O termo oxidação designa não apenas a incorporação de oxigênio em alguma substância, mas, também, a conversão de uma substância química em outra de menor número de elétrons (perda de elétrons). Essa transferência de elétrons é um processo químico fundamental para a sobrevivência das células, porém, como efeito colateral, ocorre a produção de radicais livres e de outras espécies reativas de oxigênio (ERO) (ALVES et al., 2010).

As substâncias designadas como antioxidantes têm a capacidade de prevenir, impedir ou reduzir danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídios. Para tal, atuam como sequestradoras de ERO, que são os causadores da iniciação ou da propagação de doenças. Os antioxidantes também são de grande importância na prevenção de distúrbios causados por reações com radicais livres, os quais são encontrados em excesso em casos de doenças cardíacas, arteriosclerose, alguns tipos de câncer, Alzheimer e diabetes. O fato de essas substâncias retardarem a oxidação permite que também sejam utilizadas como conservantes em alimentos, em ração animal, em

cosméticos, etc. devido a inibição ou redução da oxidação lipídica. O grupamento fenólico é o principal responsável pela estabilização de radicais livres, pois este é capaz de formar estruturas de ressonância, fazendo com que os ácidos fenólicos, flavonoides e compostos polifenólicos sejam as classes de compostos naturais que apresentam mais elevada atividade antioxidante (SOUSA et al., 2014).

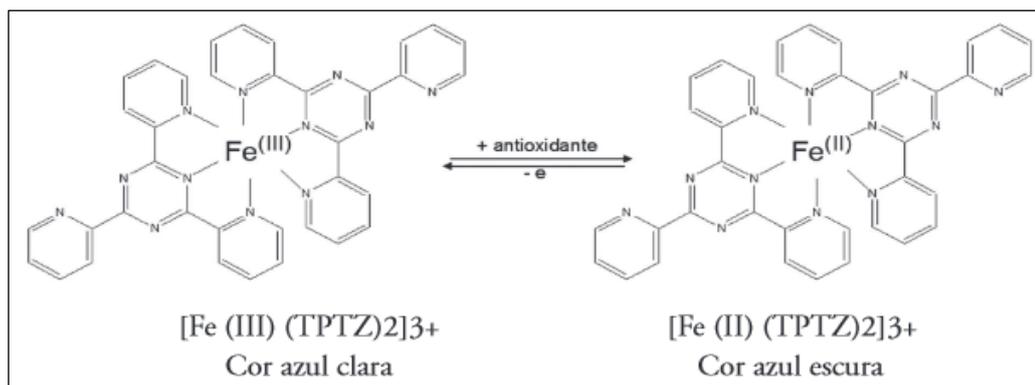
São diversas as metodologias existentes para avaliar a atividade antioxidante de substâncias biologicamente ativas. Uma delas tem base no sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), o qual é considerado estável devido a deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Este ensaio espectrofotométrico se baseia na medida da capacidade de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH (Figura 8), reduzindo-o a hidrazina (ALVES et al., 2010) o que produz uma diminuição da absorção a 515 nm.



**Figura 8 - Formas radicalar (1) e não-radicalar (2) do DPPH**  
**Fonte: Alves et al (2010)**

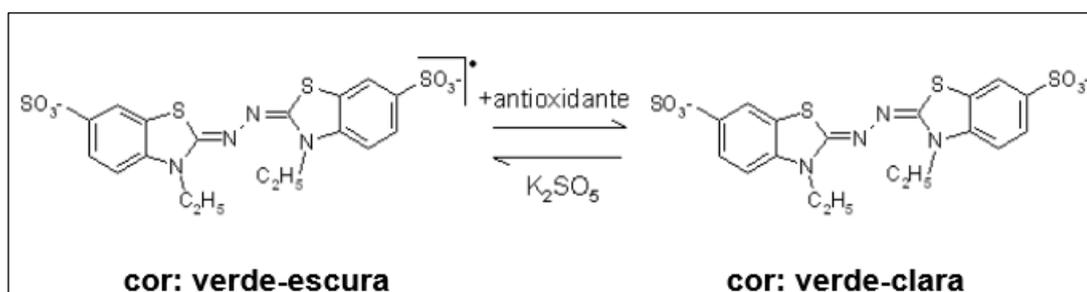
Outros métodos normalmente utilizados são o FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), que é baseado na capacidade de redução do ferro, e o ABTS, baseado na captura do cátion radical  $ABTS^{\cdot+}$  (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) (MORGADO et al., 2010).

No método FRAP, quando está em meio ácido, o complexo férrico-tripiridiltriaquina é reduzido ao ferroso (Figura 9), ocorrendo mudança em sua coloração para azul na presença de substâncias antioxidantes (MORGADO et al., 2010).



**Figura 9 - Reação do FRAP: redução do complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe III-TPZ) em complexo ferroso (Fe II-TPZ) em meio ácido**  
 Fonte: Nunes et al. (2013)

Já o método ABTS consiste na habilidade dos antioxidantes presentes na amostra em capturar o cátion radical  $ABTS^+$  (Figura 10) (MORGADO et al., 2010), o que provoca mudança na coloração do meio reacional.



**Figura 10 - Estabilização do radical  $ABTS^+$  por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio**  
 Fonte: Rufino et al. (2007)

### 3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Há muito tempo os seres humanos vêm utilizando vegetais para o tratamento de doenças, mas apenas recentemente as plantas se tornaram objeto de estudo científico para tal. Hoje, os agentes antimicrobianos são comumente comercializados para tratar doenças infecciosas, porém seu uso indiscriminado fez com que os microorganismos patógenos aumentassem sua resistência. Na busca de novas drogas antimicrobianas, a utilização de vegetais é de grande interesse, uma vez que

apresentam grande diversidade de moléculas bioativas, muito superiores àquelas derivadas de sínteses químicas (NOVAIS et al., 2003), além do que, para a síntese de compostos ativos biologicamente, aqueles isolados dos produtos naturais servem de modelo.

Dos métodos utilizados para determinação da atividade antimicrobiana destaca-se o teste de difusão em ágar, por ser de simples execução e baixo custo. Neste teste, um micro-organismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa. A avaliação é feita de forma comparativa a um padrão biológico de referência, denominado controle positivo, onde emprega-se um quimioterápico padrão. Como controle negativo tem-se o solvente utilizado na diluição dos extratos. A técnica de difusão em disco, aceita pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e estabelecida como padrão pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), consiste em impregnar pequenos discos de papel filtro com a solução em estudo, os quais são colocados sobre o meio de cultura sólido previamente inoculado em placas de Petri com diferentes cargas microbianas. Para analisar a atividade antimicrobiana em extratos vegetais também é feita a determinação da mínima quantidade da substância necessária para inibir o crescimento de um micro-organismo, sendo este valor conhecido por Concentração Inibitória Mínima (CIM). Este método apresenta alta sensibilidade e demanda uma quantidade mínima de reagentes, possibilitando um maior número de réplicas e, então, um aumento na confiabilidade dos resultados (OSTROSKY et al., 2008).

### 3.5 O GÊNERO *Pereskia* E A ORA-PRO-NOBIS

A expressão ora-pro-nobis vem do latim e significa "rogai por nós". O vegetal assim denominado apresenta a seguinte classificação taxonômica: reino Plantae, classe Magnoliopsida, ordem Caryophyllales, família Cactaceae, gênero *Pereskia* (ALMEIDA; CORRÊA, 2012) e corresponde as espécies *Pereskia aculeata* Miller e *Pereskia grandifolia* How. As duas espécies são facilmente confundidas, especialmente quando elas não estão florescidas, uma vez que a distinção pode ser feita pela cor de suas flores: a *P. grandifolia* apresenta cor arroxeadas enquanto que a *P. aculeata* tem flores amareladas (PINTO; SCIO, 2014).

As espécies de *Pereskia* foram os primeiros cactos estudados por botânicos, sendo descritas no final do século 17. Elas são consideradas um modelo genérico da morfologia e fisiologia dos cactos primitivos, preservando algumas características perdidas em outros gêneros, como folhas desenvolvidas e suculentas, troncos lenhosos e relativamente não suculentos, com poucos espinhos, flores terminais e tendência arbórea ou arbustiva (PINTO; SCIO, 2014).

A ora-pro-nobis (*P. acuelata* Miller) é uma planta tropical e pode ser encontrada no Brasil desde a Bahia até o Rio Grande do Sul. Ela faz parte da flora brasileira nativa, podendo, também, ser cultivada como uma trepadeira. Seu cultivo é favorável devido a suas características agrônômicas, pois é uma planta rústica, vigorosa e que se propaga facilmente (TOFANELLI; RESENDE, 2011). Esta planta é uma angiosperma dicotiledônea, tendo suas folhas, caules, frutos e sementes bem caracterizados morfologicamente (QUEIROZ, 2012). Apresenta espinhos nos ramos (Figura 11) e suas folhas são carnudas e mucilaginosas (“baba”) (TOFANELLI; RESENDE, 2011).



**Figura 11 - Aspecto vegetativo da ora-pro-nobis**  
Fonte: Arquivo pessoal

Suas flores (Figura 12) são brancas, têm odor agradável e permanecem abertas por apenas um dia, florescendo no início da manhã e fechando-se ao entardecer (QUEIROZ, 2012). Seus frutos (Figura 13), verde quando imaturos e

alaranjados quando maduros, contêm folhas e espinhos na parte externa (QUEIROZ et al., 2009).



Figura 12 - Flores da *P. aculeata* Miller  
Fonte: Arquivo pessoal

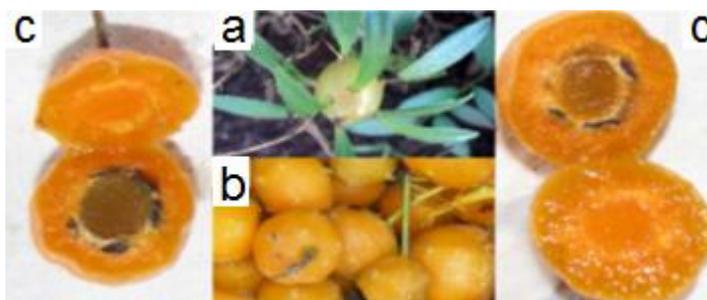


Figura 13 - Frutos da ora-pro-nobis. Em (a) ainda imaturos, apresentando folhas e espinhos. Em (b) quando estão totalmente maduros. Em (c), a aparência interna do fruto maduro  
Fonte: Queiroz et al. (2009)

As folhas da ora-pro-nobis podem enriquecer a qualidade da alimentação, pois contêm nutrientes importantes como carboidratos, lisina, cálcio, fósforo, magnésio, ferro, cobre e, principalmente, alto teor de proteínas (TOFANELLI; RESENDE, 2011). Além da função nutricional, segundo Couto (2006), a *P. aculeata* também é considerada uma planta medicinal.

Cientificamente, têm sido testados os extratos aquosos e/ou alcoólicos de folhas, caules e raízes da *P. aculeata* ao inseri-los em formulações terapêuticas, a fim de verificar suas atividades antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, cicatrizante e tripanocida (QUEIROZ, 2012). Como exemplo, no que se refere a ação cicatrizante

da *P. aculeata*, Sartor et al. (2010) avaliaram o potencial do extrato liofilizado, obtido em etanol a 92,8%, sobre feridas cutâneas experimentais em 12 ratos da linhagem Wistar. Como resultado, tais autores observaram eficácia do ponto de vista macroscópico, e o estudo histológico sugeriu que o extrato teve efeito benéfico na cicatrização inicial das feridas.

São inúmeras as plantas terapêuticas, e entre elas estão as do gênero *Pereskia*. Estas têm demonstrado potencial no tratamento de certos tipos de câncer e de doenças cardiovasculares. A espécie *P. aculeata* tem mostrado alguns benefícios, como o abrandamento de processos inflamatórios e na recuperação da pele em casos de queimadura, e suas folhas não apresentam relatos de toxicidade (SANTOS et al., 2011).

A busca por antioxidantes naturais também tem aumentado nos últimos anos (TURRA et al., 2007). Já foram encontradas espécies da família Cactaceae que apresentam compostos fenólicos e atividade antioxidante. No gênero *Pereskia*, destacam-se os frutos da *P. aculeata* Miller e as folhas de *P. bleo* (Kunth) DC e de *P. grandifolia* Haw (SOUSA et al., 2014).

## 4 MÉTODOS

As folhas da *P. aculeata* foram coletadas na região de Toledo – PR, coordenadas geográficas em 24°43'28.9"S e 53°44'01.2"W, em períodos distintos: verão e inverno. A exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná sob o número HPB 959. Os procedimentos de caracterização da *P. aculeata* seguiram conforme o fluxograma apresentado na Figura 14:

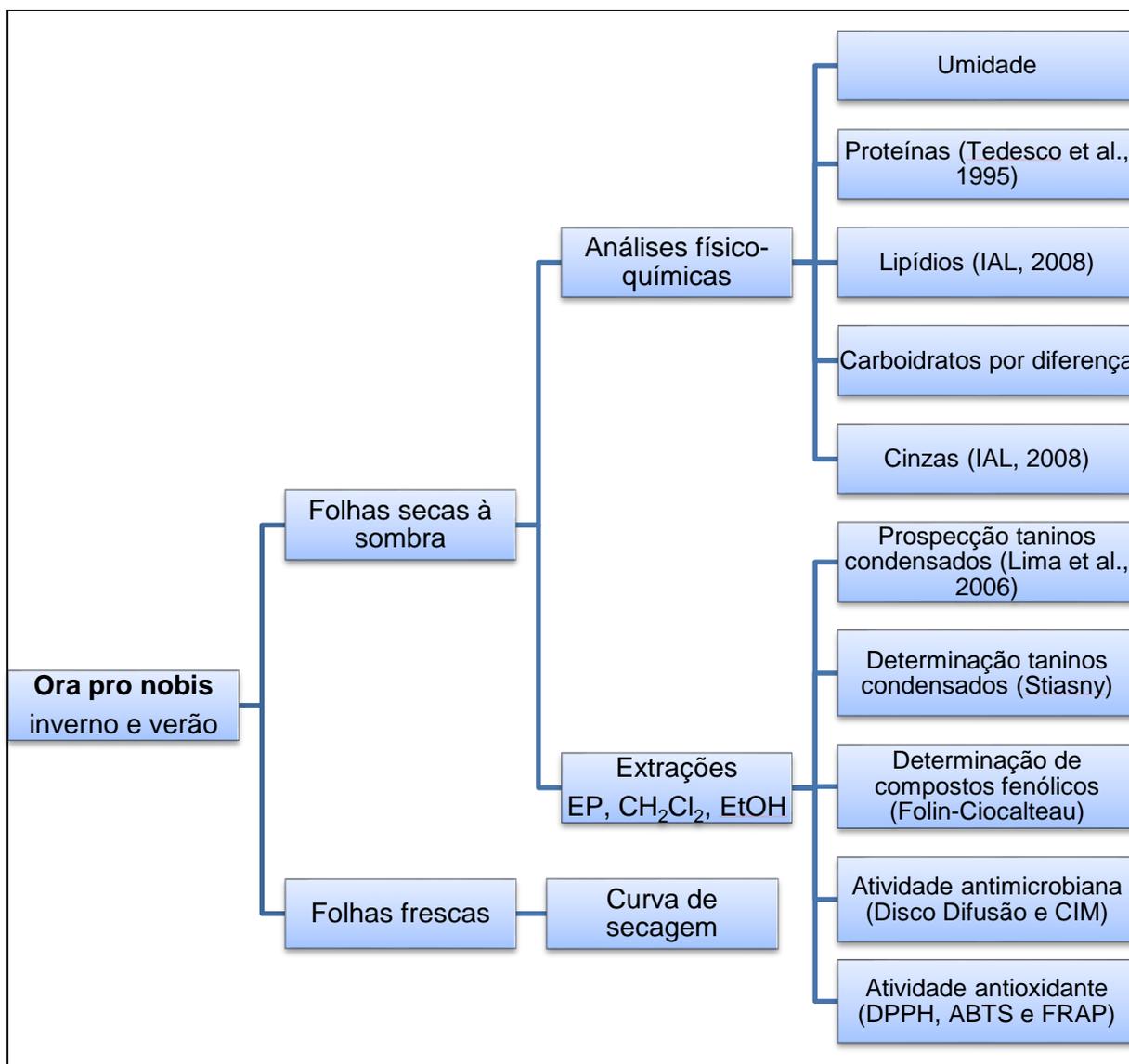


Figura 14 - Fluxograma das análises para caracterização da ora-pro-nobis

## 4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

### 4.1.1 Curva de secagem

Foi realizada a secagem das folhas da ora-pro-nobis utilizando-se uma metodologia adaptada de Almeida et al. (2014) e do Instituto Adolfo Lutz (2008): 20 g de folhas foram lavadas em água destilada, imersas em solução de hipoclorito de sódio a  $200 \mu\text{L L}^{-1}$  (200 ppm) durante 10 minutos e lavadas novamente em água destilada para retirar o excesso de cloro. O material vegetal foi secado com papel absorvente, picado em tamanho médio de  $1 \text{ cm}^2$  e alocado em peneira previamente tarada. O sistema (peneira contendo a amostra vegetal) foi aquecido a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  em estufa com circulação e renovação forçada de ar (Sterilifer – SXCR/40) e teve sua perda de massa acompanhada em balança semi-analítica (Marte – BL320H), inicialmente em intervalos regulares de 10 em 10 minutos, com espaçamento crescente no tempo de pesagem, até massa constante. O procedimento foi realizado em triplicata. Para calcular o teor de umidade em base úmida (% Ubu), foi utilizada a Equação 1:

$$\% Ubu = \frac{m_{\text{água}} (g)}{m_{\text{amostra}} (g)} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

$m_{\text{água}}$  = massa de água evaporada ao final da secagem (g);

$m_{\text{amostra}}$  = massa inicial de folhas (g).

A partir dos valores de massa obtidos, foi calculado o percentual de umidade do material (% Ubu) para cada momento de pesagem, tendo seus valores convertidos para razão de umidade (X), adimensional, conforme Equação 2:

$$X = \frac{U - Ue}{Uo - Ue} \quad \text{Eq. 2}$$

Dessa forma, foram plotadas as curvas de secagem relacionando a razão de umidade ( $X$ ) com o passar do tempo (min) para as duas coletas realizadas. Paralelamente, os dados experimentais obtidos foram ajustados às modelagens de Lewis e de Page (Equações 3 e 4, respectivamente), a fim de verificar qual delas melhor se ajusta à cinética de secagem para cada coleta do material vegetal.

$$X = \exp(-k \cdot t) \quad \text{Eq.3}$$

$$X = \exp(-k \cdot t^n) \quad \text{Eq.4}$$

$X$  = razão de umidade, adimensional;  
 $t$  = tempo de secagem, min;  
 $k$  = constantes de secagem,  $s^{-1}$ ;  
 $n$  = coeficiente do modelo, adimensional.

#### 4.1.2 Caracterização centesimal

As folhas de ora-pro-nobis foram secadas a sombra e trituradas para caracterização centesimal em base seca, que compreendeu as determinações de umidade, lipídios, proteínas, cinzas e carboidratos. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram submetidos ao teste  $t$  de Student (teste de comparação entre duas médias), em função da sazonalidade.

O teor de carboidratos foi calculado por diferença, em que é subtraído de 100 a soma dos percentuais de umidade, lipídios, proteínas e cinzas. Neste caso, o teor de carboidratos engloba a fibra alimentar total.

A umidade ainda contida na folha seca à sombra foi determinada pelo método padrão de secagem, em estufa com circulação e renovação forçada de ar (Sterilifer – SXCR/40) a  $105 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas, até massa constante. O percentual de umidade em base seca (%U<sub>bs</sub>) foi determinado conforme a Equação 5:

$$\%Ubs = \frac{\text{massa da água evaporada (g)}}{\text{massa do material seco (g)}} \times 100 \quad \text{Eq.5}$$

A determinação de lipídios (extrato etéreo) e de cinzas foi realizada com base na metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008), sem modificações.

O teor de proteína bruta foi determinado de acordo com Tedesco et al. (1995): Digestão das amostras: 0,2 g de *P. aculeata* seca e triturada foi pesada em tubo digestor, onde foram adicionados 1 mL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e 0,7 g de mistura catalítica (100 g de sulfato de sódio (NaSO<sub>4</sub>); 10 g de sulfato de cobre pentaidratado (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) e 1 g de selênio). Os tubos foram levados para aquecimento em bloco digestor até aproximadamente 400 °C. Após observar a coloração verde clara nos tubos, essa temperatura foi mantida por uma hora. Em seguida, os tubos foram retirados do bloco digestor, deixados para esfriarem para, então, adicionar entre 5 e 10 mL de água destilada. As amostras foram analisadas em triplicata. O branco passou por procedimento idêntico as amostras.

Destilação: o frasco foi conectado ao destilador de nitrogênio, onde foram adicionados 10 mL de hidróxido de sódio (NaOH) a 40%. A velocidade de destilação esteve entre 6 e 10 mL por minuto. Coletou-se, 50 mL do destilado em erlenmeyer, contendo 10 mL da solução de indicador ácido bórico.

Titulação: as amostras e o branco foram titulados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,1 mol L<sup>-1</sup> (coloração rosa). O teor de proteínas foi calculado conforme Equação 6:

$$\% \text{ proteína} = \frac{(A - B) \times f \times 0,1 \times 0,014 \times 6,25}{\text{massa da amostra (g)}} \times 100 \quad \text{Eq.6}$$

A = volume gasto do titulante para titular a amostra (mL);

B = volume gasto do titulante para titular o branco (mL);

f = fator de correção do ácido sulfúrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

Como essa análise tem por base a determinação de nitrogênio contido na amostra, para o cálculo de proteína bruta é utilizado um fator que converte o teor de nitrogênio em proteína bruta, sendo este fator igual a 6,25, pois considera-se que a maioria das proteínas contém aproximadamente 16% de nitrogênio (GALVANI; GAERTNER, 2006).

#### 4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Parte das folhas coletadas foram secas à sombra e trituradas em liquidificador. Os extratos foram obtidos por meio de extração a frio, pesando-se, em balança semi-analítica (Marte – BL320H), 200 g de folhas secas e trituradas de cada coleta (inverno e verão). Foram realizadas extrações sucessivas utilizando solventes em ordem crescente de polaridade, sendo eles: éter de petróleo (Vetec), diclorometano (Alphatec) e etanol (Dinâmica). A troca de solventes ocorreu após 48 horas de extração em cada solvente, seguido por filtração e recolhimento dos filtrados. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo (Quimis – Q344M2) à pressão reduzida por bomba de vácuo (Quimis – Q955B) e temperatura de 40 °C. Em seguida, permaneceram em capela de exaustão até a completa evaporação dos solventes e foram armazenados em refrigerador para análises posteriores. Os extratos foram nomeados de acordo com o solvente extrator e a estação de coleta das folhas (Quadro 1).

**Quadro 1 - Siglas para identificação dos extratos analisados**

<b>Solvente extrator</b>	<b>Coleta de inverno</b>	<b>Coleta de verão</b>
Éter de petróleo	EPI	EPV
Diclorometano	DCMI	DCMV
Etanol	ETI	ETV

O rendimento de cada extrato foi calculado utilizando-se a Equação 7:

$$Rend. (\%) = \frac{\text{massa do extrato seco (g)}}{\text{massa inicial de folhas secas (g)}} \times 100 \quad Eq.7$$

### 4.3 ANÁLISES DE METABÓLITOS

#### 4.3.1 Teste qualitativo para taninos condensados

Para certificação da presença de taninos condensados nos extratos foi feita uma adaptação da metodologia de Lima et al. (2006). Em tubos de ensaio, cada extrato foi hidratado em concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup> com auxílio de banho ultrassônico (Unique USC-2800). A cada 2 mL de amostra hidratada foram adicionadas, 10 gotas de cloreto férrico a 1% em metanol. Em seguida, os extratos foram agitados para verificação da formação de um precipitado verde, o qual indica a presença de taninos condensados. Foi feito, também, um teste em branco, utilizando-se apenas água e o cloreto férrico a 1% em metanol.

#### 4.3.2 Determinação de taninos condensados – Número de Stiasny (NS)

A determinação de taninos condensados foi realizada com base nas metodologias de Low et al. (2015) e de Aires et al. (2016). Desta forma, 0,1 g de cada extrato foi dissolvido em 10 mL de água destilada com o auxílio de banho ultrassônico (Unique USC-2800). Em seguida, aos extratos hidratados foi adicionado 1 mL de ácido clorídrico 10 mol L<sup>-1</sup> e 2 mL de formaldeído a 37%. As soluções foram deixadas sob refluxo por 30 minutos e, em seguida, filtradas, lavando-se o precipitado com água destilada quente.

Os papéis de filtro utilizados foram identificados e secos em estufa com circulação de ar (Sterilifer – SXCR/40) antes da análise, e tiveram sua massa anotada. Por fim, os papéis de filtro contendo os precipitados foram colocados para secar na

estufa a 65 °C até peso constante. O percentual de taninos reativos nos extratos foi calculado conforme Equação 8:

$$NS (\%) = \frac{\text{massa do precipitado seco}}{\text{massa do extrato seco inicial}} \times 100 \quad \text{Eq. 8}$$

O procedimento foi realizado em triplicata e os resultados foram submetidos ao teste *t* de Student, em função da sazonalidade.

#### 4.3.3 Determinação de compostos fenólicos por Folin-Cicalteau

Esta análise foi realizada com base em Singleton et al. (1999). Para tal, foi utilizado o ácido gálico como padrão de referência em soluções aquosas com diferentes concentrações, variando de 2,5 a 125 ppm, para que fosse possível plotar uma curva de calibração relacionando a absorbância com a concentração das soluções padrão e, então, ser obtida a equação de regressão linear.

Em tubos de ensaio, foi acrescentado 0,5 mL de cada uma das diferentes concentrações de ácido gálico juntamente a 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau diluído em água destilada 1:10 (v/v). A mistura foi deixada em repouso por 5 minutos e, em seguida, foi adicionado 2 mL de carbonato de sódio a 4% em cada tubo. O branco foi preparado da mesma maneira, apenas substituindo-se as soluções de ácido gálico por 0,5 mL de água destilada. Os tubos ficaram ao abrigo da luz por duas horas e, então, foram realizadas as leituras dos padrões em espectrofotômetro a 740 nm, zerando com o branco.

O mesmo procedimento foi realizado em triplicata para os seis extratos, que foram dissolvidos em acetona e diluídos conforme houve necessidade para que suas absorbâncias se enquadrassem na curva de calibração do padrão. Como branco foi utilizado acetona. Ao substituir as absorbâncias das amostras na equação de regressão linear, foi possível obter o resultado do teor de compostos fenólicos em mg de equivalente em ácido gálico por grama de extrato (mg EAG g<sup>-1</sup>).

#### 4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA *P. Aculeata*

##### 4.4.1 DPPH

Este procedimento foi realizado de acordo com a metodologia de Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995) e Ubeda et al. (2011). Primeiramente, foi construída uma curva de calibração de Trolox (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 0,02, 0,06, 0,1, 0,14, 0,18 e 0,22 mmol L<sup>-1</sup>, em metanol. Para obtenção da curva, foi misturado, em tubos de ensaio, 0,1 mL de cada concentração de Trolox com 3,9 mL de uma solução de DPPH (Sigma-Aldrich) a 0,025 g L<sup>-1</sup> em metanol. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 515 nm após 60 minutos de reação, sendo utilizado como branco o metanol.

Na sequência, seguiu-se o mesmo procedimento com os seis extratos, os quais foram dissolvidos e apropriadamente diluídos em acetona, em substituição as soluções de Trolox. Porém, neste caso foi utilizado como branco a acetona. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox equivalente por grama de extrato ( $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ ).

##### 4.4.2 ABTS

A determinação de atividade antioxidante pelo método do radical ABTS<sup>•+</sup> foi feita com base nas metodologias de Rufino et al. (2007) e Wootton-Beard; Moran; Ryan (2011). Inicialmente, foi formado o radical ABTS<sup>•+</sup> a partir da reação de 5 mL da solução de ABTS (Sigma-Aldrich) a 7 mmol L<sup>-1</sup> com 88  $\mu\text{L}$  da solução de persulfato de potássio a 140 mmol L<sup>-1</sup>, que foram incubados à temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 horas. Transcorrido esse tempo, 1 mL da solução ABTS<sup>•+</sup> foi diluída em etanol até a obtenção de uma solução com absorvância de 0,70 ( $\pm$  0,05) no comprimento de onda de 734 nm. Para realização das análises, em tubos de ensaio foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de cada amostra, devidamente diluídas, a 3 mL da solução

ABTS<sup>•+</sup> diluída em etanol. A mistura foi deixada ao abrigo da luz por 6 minutos e, então, foi determinada a absorbância em espectrofotômetro a 734 nm. Foi utilizado o antioxidante sintético Trolox como solução padrão nas concentrações de 100, 200, 400, 800 e 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em etanol. As leituras foram realizadas em triplicata e os resultados, expressos em mmol de Trolox equivalente por grama de extrato ( $\text{mmol TE g}^{-1}$ ).

#### 4.4.3 FRAP

Este procedimento foi realizado de acordo com as metodologias de Rufino et al. (2006) e Wootton-Beard; Moran; Ryan (2011). Próximo ao momento da análise foi preparada a solução FRAP, obtida pela combinação de 25 mL de solução tampão acetato de sódio (pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ e 2,5 mL de solução de cloreto férrico. Em seguida, foram transferidos 90  $\mu\text{L}$  de cada extrato (devidamente diluídos) para tubos de ensaio, onde foram adicionados 270  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2,7 mL (2700  $\mu\text{L}$ ) da solução FRAP. Os tubos foram agitados e deixados ao abrigo da luz durante 30 minutos a 37 °C. Decorrido esse tempo, foi realizada a leitura a 595 nm, em triplicata, para cada amostra. O reagente FRAP foi utilizado como branco. A curva padrão foi construída pelo mesmo procedimento reacional das amostras, havendo a substituição das amostras pelas soluções de sulfato ferroso nas concentrações de 0,2, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0  $\text{mmol L}^{-1}$ . Os resultados de atividade antioxidante foram expressos em mmol de equivalente em sulfato ferroso por grama de extrato ( $\text{mmol ESF g}^{-1}$ ).

#### 4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA *P. aculeata*

A atividade antimicrobiana dos extratos de ora-pro-nobis foi investigada contra bactérias e leveduras. Os micro-organismos utilizados foram obtidos pela American Type Culture Collection (ATCC®). Foram utilizadas as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, representantes dos grandes grupos

Gram negativas e Gram positivas, respectivamente, e as leveduras *Candida albicans* ATCC 10231 e *Candida tropicalis* ATCC 13803. As metodologias foram baseadas no protocolo padrão CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), antigo NCCLS (*National Committee For Clinical Laboratory Standards*), documentos M27-A3 (Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica), M44-A2 (Metodologia para Testes de Sensibilidade Antifúngica por Disco–Difusão para Leveduras), M02-A11 (Padrões de desempenho para testes em disco de susceptibilidade antimicrobiana), M7-A6 (Metodologia do Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico).

#### 4.5.1 Difusão em disco

O teste de atividade antimicrobiana por difusão em disco seguiu as metodologias de Rabanal et al. (2002) e Karaman et al. (2003), baseado nos protocolos CLSI (M44-A2; M02-A11), e foi realizado em triplicata. As bactérias foram inoculadas em ágar Mueller Hinton (Kasvi), e as leveduras, em ágar Sabouraud (Acumedia), que foram preparados conforme orientação do fabricante, esterilizados e mantidos sob refrigeração em placas de Petri de 15 cm de diâmetro.

O procedimento prosseguiu com repiques de culturas inoculadas nos mesmos meios de cultura e incubadas por 24 h a 35 °C, para obtenção de culturas ativas. Em tubo de ensaio contendo solução salina estéril a 0,9% (SSE), as cepas foram suspensas com turbidez equivalente a escala Mc Farland 0,5, que corresponde a aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia (UFC) por mL. Em seguida, as suspensões microbianas foram semeadas de maneira uniforme sobre os meios de cultura apropriados, com o auxílio de *swabs* estéreis.

Para o preparo dos extratos, 0,01 g dos extratos brutos foram pesados em eppendorf e dissolvidos em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), com auxílio de agitador do tipo vortex e aquecimento em banho-maria. Em seguida, foram acrescentados 900 µL de SSE, obtendo-se uma concentração de 10000 µg mL<sup>-1</sup> (solução mãe). Também foram utilizados os extratos em mais duas diluições: diluição 10<sup>-1</sup> (500 µL da solução mãe + 500 µL de SSE) e diluição 10<sup>-2</sup> (500 µL da solução

anterior + 500  $\mu\text{L}$  de SSE). Os padrões antimicrobianos utilizados para controle positivo foram norfloxacino e tetraciclina, para as bactérias, e fluconazol e anfotericina B, para as leveduras. Os padrões foram preparados pesando-se 0,001 g em eppendorf, onde foi acrescentado 10  $\mu\text{L}$  de DMSO e 990  $\mu\text{L}$  de SSE, obtendo-se uma concentração de 1  $\text{mg mL}^{-1}$ . Foi utilizada a SSE como controle negativo.

Após o preparo das soluções, discos de papel filtro de 5 mm de diâmetro, esterilizados, foram impregnados com 10  $\mu\text{L}$  dos extratos e suas diluições, dos controles positivos e do controle negativo e, então, colocados sobre o meio de cultura previamente inoculado com o micro-organismo de interesse. Após o procedimento, as placas permaneceram em estufa microbiológica por um período de 24 a 48 h em temperatura entre 35 e 37  $^{\circ}\text{C}$  para as bactérias e um período de 48 a 72 h com temperatura entre 25 e 27  $^{\circ}\text{C}$  para as leveduras. Ao término do período de incubação, os halos de inibição, quando formados, foram mensurados com um paquímetro.

#### 4.5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O teste foi realizado apenas para os extratos que apresentaram inibição de crescimento microbiano no teste de difusão em disco. O procedimento ocorreu de acordo com os autores citados anteriormente para o método de difusão em disco e também com os protocolos CLSI M27-A3 e M7-A6. Foram utilizadas placas com 96 poços dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). Foram preparadas soluções estoque pesando-se 20 mg (20000  $\mu\text{g}$ ) dos extratos de *P. aculeata*. Para preparar as soluções diluídas, acrescentou-se 10  $\mu\text{L}$  de DMSO a 990  $\mu\text{L}$  de solução estoque e, a partir dessa solução, transferiu-se 500  $\mu\text{L}$  para um eppendorf com 500  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller Hinton (Difco), obtendo-se a primeira diluição a ser testada, que é a de 10000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Este procedimento foi repetido até obtenção da menor diluição (156,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Todos os poços receberam 100  $\mu\text{L}$  de caldo (Mueller Hinton para bactérias e Sabouraud para leveduras). Em seguida, também foram adicionados aos poços 100  $\mu\text{L}$  das diluições dos extratos nas concentrações 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312,5, 156,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A linha H foi destinada aos controles, entre eles o controle negativo (caldo sem a adição de micro-organismo), controle positivo (caldo com a adição do micro-organismo) e controle com os padrões antimicrobianos (que foram diluídos a

1 mg mL<sup>-1</sup> para os testes). Após o procedimento, as placas permaneceram em estufa microbiológica por um período de 24 a 48 h em temperatura entre 35 e 37 °C. Decorrido esse tempo, foram acrescentados 20 µL do revelador 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC, Sigma Aldrich) a 0,5% e após 2 horas foi realizada a leitura. Os poços em que o extrato apresentou atividade antimicrobiana permaneceram incolores, enquanto aqueles que apresentaram crescimento microbiano exibiram coloração avermelhada.

#### 4.5.3 Atividade bactericida/bacteriostática

Este teste teve por base a metodologia de Avancini et al (2000) e foi realizado apenas para o extrato que apresentou atividade antibacteriana na análise anterior. A determinação de atividade bactericida ou bacteriostática foi feita pelo plaqueamento em ágar Mueller Hinton, utilizando-se alça bacteriológica, do poço de menor diluição do extrato que apresentou inibição do crescimento microbiano na análise de CIM. A leitura foi feita após 24 horas de incubação a 37 °C. Quando a placa aponta a formação de colônias bacterianas, constata-se que a atividade é bacteriostática (inibição do crescimento). Em caso de não haver colônias bacterianas após o período de incubação, conclui-se que o extrato apresenta atividade bactericida (morte das bactérias).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

#### 5.1.1 Curva de secagem

O teor de umidade das folhas frescas da ora-pro-nobis, coletadas em dezembro de 2015 (verão) e em junho de 2016 (inverno), foi determinado por método gravimétrico. As amostras foram lavadas, secadas, picadas e alocadas em peneiras (Figura 15) a fim de evitar o acúmulo de água na parte inferior, que ocorre quando se utiliza cápsulas de porcelana, por exemplo. Dentro da estufa, as peneiras eram trocadas de lugar a cada pesagem para maior homogeneidade no processo de desidratação.



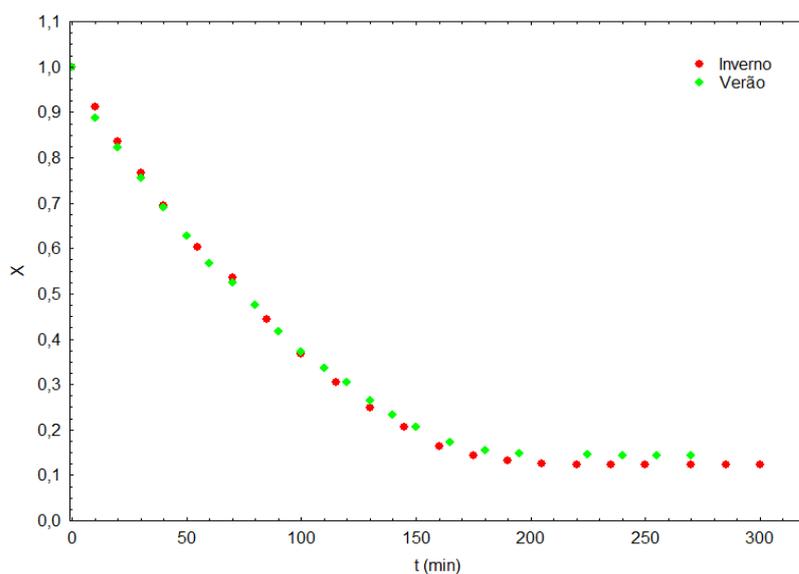
Figura 15 – a) Preparo das amostras para análise de umidade; b) amostras ao final do processo de secagem

Fonte: A autoria própria

As folhas frescas de ora-pro-nobis apresentaram alto teor de umidade em base úmida (% Ubu), chegando a 87,7% no período do inverno. De acordo com o teste estatístico, as amostras coletadas no inverno apresentaram diferença significativa no teor de umidade em relação às de verão (85,54%). Tal resultado corrobora com os estudos sazonais de plantas, pois sabe-se que nas diferentes épocas do ano o ambiente passa por mudanças climáticas (temperatura, umidade, luz) que acarretam em alterações nos constituintes dos vegetais (FIGUEIREDO, 2010). Em seus estudos,

Almeida (2012) encontrou teor de umidade de 88,41% nas folhas de *P. aculeata*, se aproximando dos valores encontrados neste trabalho para as duas coletas. Girão et al. (2003) obtiveram um teor de matéria seca de 14,55%, ou seja, 85,45% de umidade, também se aproximando aos resultados encontrados neste trabalho. Takeiti et al. (2009) e Souza (2014) encontraram, respectivamente, 89,5% e 95,74% de umidade nas folhas de ora-pro-nobis. Relacionando os resultados do presente trabalho com aqueles encontrados nos de Almeida (2012), Takeiti et al. (2009) e Souza (2014), pode-se sugerir que as folhas de ora-pro-nobis por eles analisadas foram coletadas na época de inverno.

As amostras de inverno e de verão apresentaram diferentes tempos de secagem para atingir a mesma umidade de equilíbrio (300 e 270 minutos, respectivamente), o que está relacionado com a umidade inicial das folhas de ora-pro-nobis. A partir dos dados obtidos a cada pesagem até massa constante, foi possível calcular o % Ubu durante a desidratação do material vegetal. Dessa forma, os valores foram convertidos para a razão de umidade (X) e, então, foram plotados os gráficos relacionando X com em função do tempo para as duas coletas realizadas (Figura 16).



**Figura 16 - Curvas de secagem das folhas de ora-pro-nobis**  
Fonte: Autoria própria

Os dados experimentais do processo de secagem foram ajustados aos modelos matemáticos de Lewis e de Page. Também foram obtidos as constantes e os

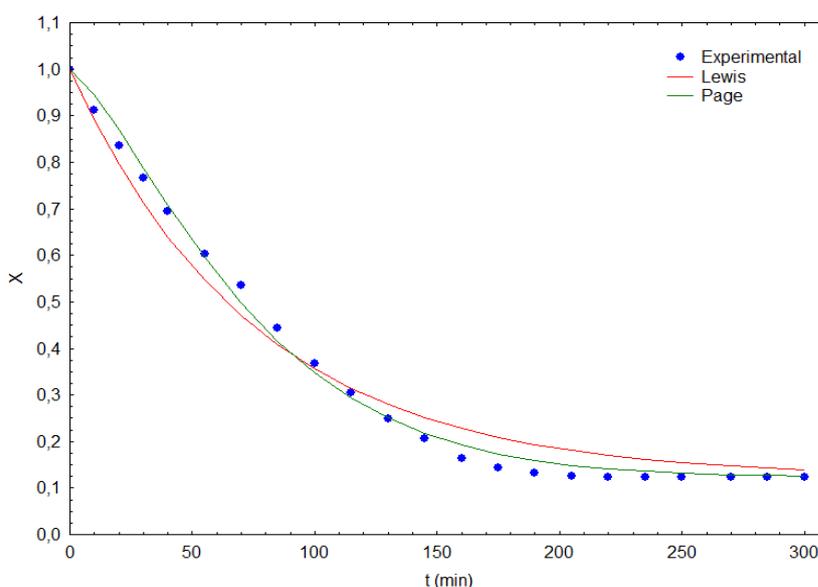
coeficientes de determinação para cada modelo (Tabela 1), e plotados os gráficos para comparação das modelagens de estudo cinético com os dados experimentais de cada coleta.

**Tabela 1 - Resumo dos ajustes dos modelos utilizados, a 70 °C**

Coleta	Lewis		Page		
	k	R <sup>2</sup>	k	n	R <sup>2</sup>
Inverno	0,0132	0,9890	0,0031	1,3231	0,9976
Verão	0,0134	0,9897	0,0042	1,2570	0,9964

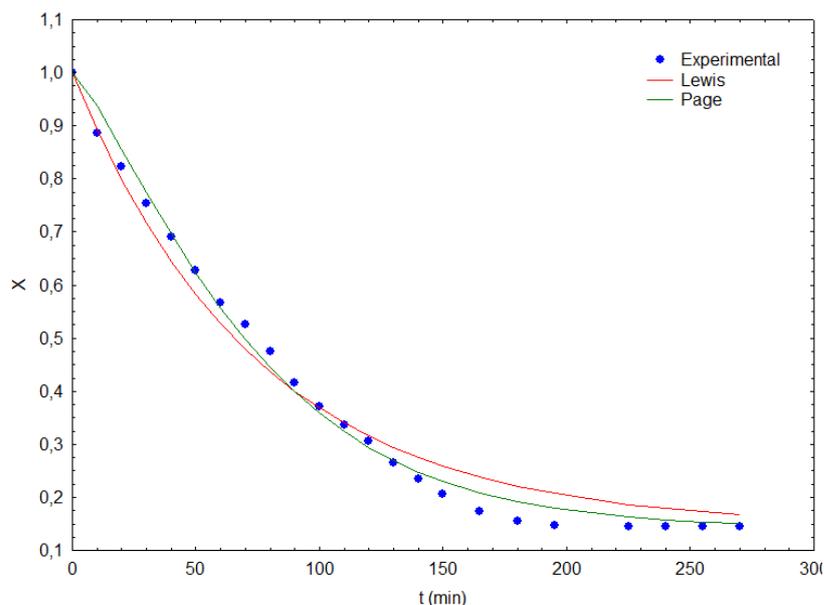
k = constantes de secagem; R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação; n = coeficiente do modelo.

A comparação dos dados experimentais com as modelagens citadas permitiu verificar que os dois modelos podem ser utilizados para representar o processo de secagem da ora-pro-nobis, pois apresentaram coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) superiores a 0,98 (Tabela 1). Contudo, o modelo de Page foi o que melhor se ajustou à cinética de secagem para ambas as coletas do material vegetal (Figuras 17 e 18). O ajuste da curva de secagem da *P. aculeata* na equação de Page define que há interferências no processo causadas pela resistência interna deste material (PAGE, 1949).



**Figura 17 - Comparação das modelagens com os dados experimentais da coleta de inverno**

Fonte: Autoria própria



**Figura 18 - Comparação das modelagens com os dados experimentais da coleta de verão**  
**Fonte: Autoria própria**

O processo de secagem de produtos é o meio mais utilizado para assegurar sua qualidade e estabilidade (CORRÊA et al., 2007), pois tanto os micro-organismos quanto as enzimas e seu metabolismo necessitam de água para suas atividades. Ao reduzir a disponibilidade de água, a velocidade das reações químicas e o desenvolvimento microbiano também serão minimizados (MARTINAZZO et al., 2007).

Em relação ao coeficiente de determinação ( $R^2$ ), foi observado que aqueles obtidos no modelo de Page apresentaram valores mais elevados (Tabela 1). Sousa et al. (2015) também verificaram altos valores de  $R^2$  no modelo de Page (acima de 0,99) para a secagem de folhas de juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart) a diferentes temperaturas. Já Martinazzo et al. (2010) utilizaram vários modelos matemáticos para estudar a secagem de folhas de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), dentre eles: o de Lewis, o de Page e também um modelo modificado de Page. Neste modelo de Page modificado, o valor de  $k$  também deve estar relacionado com o coeficiente “ $n$ ” ( $X = \exp [-(k \cdot t)^n]$ ). Dessa forma, tais autores concluíram que o modelo que melhor se ajustou aos dados observados da cinética de secagem do capim-limão foi o de Page modificado. Ao estudar a cinética de secagem das folhas de timbó (*Serjania marginata* Casar), Martins et al. (2015) utilizaram vários modelos matemáticos, inclusive o de Page. Porém, o modelo que melhor se ajustou a cinética

de secagem das folhas de timbó foi o de Midilli ( $X = a \cdot \exp(-t \cdot t^n) + b \cdot t$ ), onde  $a$ ,  $b$  e  $n$  são coeficientes do modelo, apesar de o modelo de Page também ter apresentado um valor elevado de  $R^2$  (acima de 0,99) para as diferentes temperaturas analisadas.

A partir dos trabalhos citados, pode-se notar que os estudos cinéticos não seguem uma modelagem padrão. Dessa forma, a determinação do melhor modelo matemático para representar a cinética de secagem depende da espécie de planta estudada (SOUSA et al., 2015).

As modelagens matemáticas são úteis na obtenção de uma estimativa do tempo necessário para reduzir a quantidade de água do produto, vindo a auxiliar nas tomadas de decisão e na melhoria da eficiência do processo. Avaliando a cinética de secagem de plantas medicinais, aromáticas e condimentares, é possível obter-se o modelo mais adequado para cada espécie vegetal (RADÜNZ, 2011).

### 5.1.2 Composição centesimal

A caracterização centesimal das folhas da *P. aculeata* foi feita em base seca para obtenção de uma melhor representatividade dos resultados, possibilitando confrontá-los com demais trabalhos. Para tal, as folhas foram coletadas em junho e em dezembro de 2015 (coletas de inverno e de verão, respectivamente), sendo deixadas para secagem à sombra em temperatura ambiente, visando minimizar possíveis variações qualitativas e/ou quantitativas de metabólitos, decorrente da secagem em temperaturas elevadas. Vale ressaltar que a planta analisada não teve nenhuma condição especial de cultivo. Feitas as análises, observou-se que as folhas não apresentaram diferença significativa no teor de lipídios e de carboidratos quando coletadas em épocas diferentes (Tabela 2). Contudo, as diferenças observadas nas demais determinações podem se justificar por temperatura, umidade, luz, incidência de pragas, disposição de minerais no solo, entre outros fatores, que são distintos para cada estação de coleta.

**Tabela 2 – Composição centesimal das folhas de ora-pro-nobis secadas a sombra**

Parâmetros	Composição $\bar{x} \pm \sigma$ (%)	
	Inverno	Verão
Umidade	13,49 <sup>a</sup> $\pm$ 0,38	7,47 <sup>b</sup> $\pm$ 0,16
Proteína bruta	11,55 <sup>a</sup> $\pm$ 0,43	17,91 <sup>b</sup> $\pm$ 0,75
Lipídios (extrato etéreo)	3,25 <sup>a</sup> $\pm$ 0,20	3,48 <sup>a</sup> $\pm$ 0,03
Cinzas	25,69 <sup>a</sup> $\pm$ 0,21	22,67 <sup>b</sup> $\pm$ 0,27
Carboidratos (por diferença)	46,03 <sup>a</sup> $\pm$ 0,08	48,47 <sup>a</sup> $\pm$ 1,06

$\bar{x}$ : média;  $\sigma$ : desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as duas coletas.

Na coleta de verão foi detectado menor teor de umidade (7,47%), porém, em contrapartida, foram encontrados os maiores teores de proteínas, carboidratos e lipídios. Isso era esperado, pois, em termos nutricionais, quanto maior o teor de umidade menor a quantidade de matéria seca e, conseqüentemente, menor a concentração dos outros constituintes (HONÓRIO et al., 2010).

O teor de cinzas, que constitui a fração de matéria mineral da ora-pro-nobis, teve um valor expressivo em sua composição. Segundo Queiroz et al. (2015) a composição da ora-pro-nobis sofre forte influência da luminosidade, e pode ser observada uma maior quantidade de cinzas quando a planta é cultivada em regiões de meia sombra, 21,8%, e totalmente sombreadas, chegando a 32,5%. Portanto, os valores obtidos neste trabalho, 25,69% no inverno e 22,67% no verão, estão de acordo com aqueles obtidos para regiões de meia sombra, ressaltando novamente que a planta em estudo foi cultivada sem nenhum manejo específico.

Conforme já evidenciado, a fração lipídica não se mostrou influenciada pela sazonalidade. Ainda assim, os resultados obtidos na análise de lipídios estão de acordo com vários autores, como Rocha et al. (2008), Girão et al. (2003) e Takeiti et al. (2009), que constataram os teores de 3,64%, 4,41% e 4,1% nas folhas, respectivamente, e com Almeida (2012), que encontrou 5,07% de lipídeos na farinha de ora-pro-nobis.

As folhas de ora-pro-nobis apresentaram um teor relativamente alto de proteínas, principalmente quando coletadas no verão, atingindo 17,91%. Tal valor se aproxima ao apresentado por Girão et al. (2003) (19,67%) e Mota et al. (2011) (20,94%), mas é inferior ao encontrado por Gonçalves et al. (2014) (27,79%) e por Takeiti et al. (2009) em folhas liofilizadas (28,4%). Souza (2014) relatou ter encontrado

14,38% de proteínas em sua amostra, podendo ser um indicativo de que a coleta de suas folhas foi realizada em época diferente da dos outros trabalhos. Essas diferenças nos teores de proteínas podem estar relacionadas a vários fatores, tais como idade fisiológica e origem botânica da planta (SOUZA, 2014), bem como a cuidados tomados desde a coleta e tratamento das amostras até a execução das análises. Ao comparar o teor de proteínas encontrado nas folhas de ora-pro-nobis com o de outras hortaliças, assume-se que seu consumo é aceitável como fonte de tal nutriente (QUEIROZ, 2012), pois também apresenta 75,90% de digestibilidade (TAKEITI et al., 2009). O teor de proteínas que pode ser encontrado nas folhas da ora-pro-nobis e sua alta digestibilidade justificam sua denominação popular como “carne dos pobres”.

A fração de carboidratos encontrada nas folhas da ora-pro-nobis se apresentou como composto majoritário (46,03% no inverno e 48,47% no verão). Como essa determinação foi realizada por diferença, cabe ressaltar que em tais valores estão inclusos, também, as fibras alimentares totais. Os resultados deste trabalho se encontram entre os de dois outros autores, que determinaram carboidratos por diferença de folhas desidratadas, sendo eles: Souza (2014), que obteve 58,99%, e Rocha et al. (2008), que obtiveram 36,18%. Tais divergências podem estar associadas principalmente aos fatores ambientais e sazonais já comentados anteriormente, evidenciando sua influência direta na composição de carboidratos e dos demais constituintes analisados.

## 5.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Os extratos brutos foram obtidos a partir de 200 g de folhas secas (inverno e verão) de *P. aculeata*, por extrações sucessivas com três solventes diferentes, em ordem crescente de polaridade (éter de petróleo, diclorometano e etanol). Após o tempo de cada extração, os sobrenadantes foram filtrados e rotaevaporados (Figura 19).



**Figura 19 - Preparação dos extratos brutos**  
**Fonte: Autoria própria**

Os extratos de maior rendimento foram os das amostras de verão, chegando a 2,28% para o extrato etanólico (Tabela 3).

**Tabela 3 – Massa e rendimento dos extratos brutos de *P. aculeata***

Extratos	Massa seca (g)	Rendimento (%)
EPI	2,842	1,42
DCMI	1,498	0,75
ETI	1,752	0,88
EPV	2,878	1,44
DCMV	3,032	1,52
ETV	4,569	2,28

EPI: Éter de petróleo – inverno; DCMI: Diclorometano – inverno; ETI: Etanol – inverno; EPV: Éter de petróleo – verão; DCMV: Diclorometano – verão; ETV: Etanol – verão.

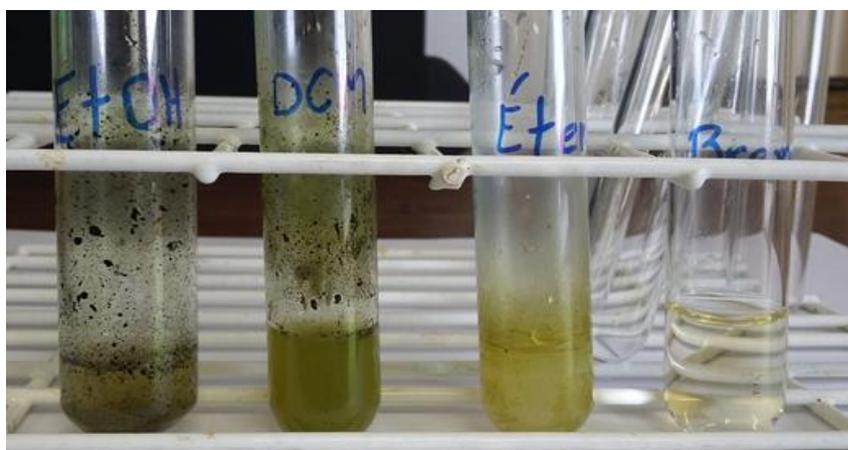
Das amostras de inverno, o extrato de maior rendimento foi o mais apolar, obtido com éter de petróleo (1,42%), enquanto que para a coleta de verão o maior rendimento foi o de maior polaridade, obtido com etanol (2,28%).

Klein (2015) realizou extrações similares a deste trabalho utilizando o capim annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) como material vegetal, porém obteve seu maior rendimento no extrato mais polar, tanto na coleta de inverno quanto na de verão. Essas variações são aceitáveis, pois, como citado anteriormente, são muitos os fatores que influenciam na composição das plantas, além do fato de cada espécie apresentar características singulares.

### 5.3 ANÁLISE DE METABÓLITOS

#### 5.3.1 Análise qualitativa e determinação de taninos condensados

O teste preliminar para evidenciar a presença de taninos condensados foi realizado para todas as amostras, juntamente a um branco (Figura 20). Nesse teste, a reação do cloreto férrico com os taninos condensados presentes na amostra resulta na formação de um complexo de ferro, que pode ser observado na forma de um precipitado verde escuro. Esses complexos foram evidenciados apenas nos extratos de alta e de média polaridade (obtidos com etanol e com diclorometano, respectivamente). O mesmo resultado foi obtido para as duas coletas do material vegetal, inverno e verão.



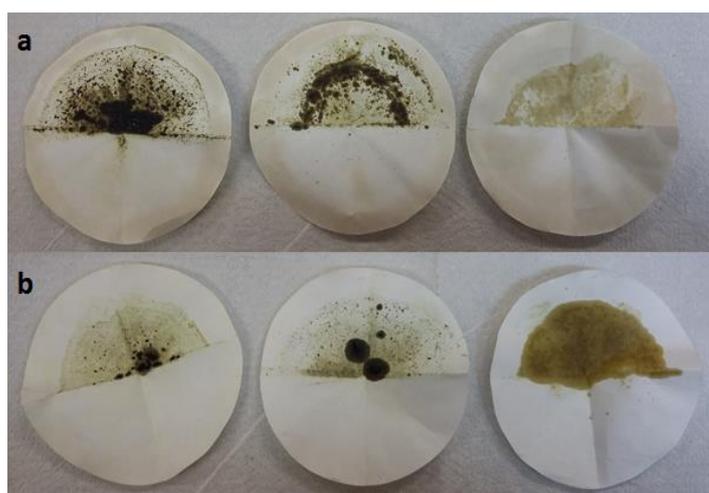
**Figura 20 - Teste qualitativo para taninos condensados – coleta de inverno. Extratos obtidos com: etanol, diclorometano, éter de petróleo, e o teste do branco (água), respectivamente**

**Fonte: A autoria própria**

Extratos apolares também podem apresentar alguma quantidade, ainda que pequena, de taninos condensados, visto que as moléculas destes apresentam certa apolaridade devido aos anéis aromáticos de suas estruturas.

A metodologia propunha a diluição dos extratos em água, porém a maior parte da amostra obtida com éter de petróleo ficou retida nas paredes do tubo de ensaio, como pode ser observado na Figura 20. Como foi obtido um resultado negativo no teste qualitativo, para os extratos EPI e EPV, optou-se pela realização de teste quantitativo (Número de Stiasny (NS)) também para esses extratos, a fim de verificar se o resultado obtido (negativo), não teria sido em função da polaridade dos extratos.

Na determinação de taninos condensados por NS foi observada a formação de precipitados em todos os extratos, alguns em maior quantidade, indicando a presença dos taninos em todas as frações da *P. aculeata*. Após a filtração, o resíduo foi colocado em estufa para posterior quantificação dos taninos reativos a partir da massa dos precipitados formados (Figura 21), utilizando a Equação 8.



**Figura 21 – Precipitados formados pela reação com formaldeído (Stiasny) nos extratos obtidos com etanol, diclorometano e éter de petróleo, respectivamente, para: a) coleta de inverno; b) coleta de verão**

**Fonte: Autoria própria**

Após análise dos dados, foi observado que houve diferença estatística significativa para o NS entre as amostras coletadas no inverno e no verão (Tabela 4). Como o NS evidencia a presença de taninos condensados, pode-se observar que os extratos obtidos a partir da amostra coletada no inverno apresentaram os maiores teores de tais compostos.

**Tabela 4 - Determinação de taninos condensados pela reatividade ao formaldeído (Número de Stiasny)**

Extratos	Número de Stiasny $\bar{x} \pm \sigma$ (%)	
	Inverno	Verão
Etanol	47,83 <sup>a</sup> $\pm$ 0,08	38,71 <sup>b</sup> $\pm$ 0,18
Diclorometano	9,40 <sup>a</sup> $\pm$ 0,31	7,75 <sup>b</sup> $\pm$ 0,19
Éter de petróleo	3,86 <sup>a</sup> $\pm$ 0,10	2,80 <sup>b</sup> $\pm$ 0,12

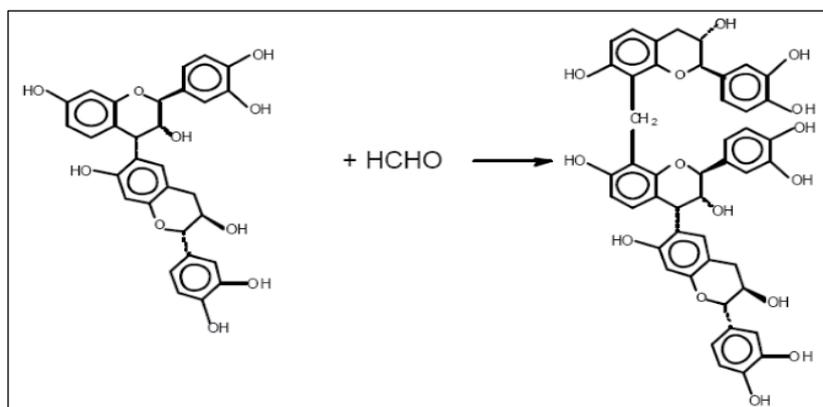
$\bar{x}$ : média;  $\sigma$ : desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as duas coletas.

O extrato etanólico, que apresenta a maior polaridade, exibiu um teor de taninos condensados de 47,83% no inverno e 38,71% no verão, valores aproximadamente 5 vezes maiores que os extratos obtidos com diclorometano (média polaridade) e aproximadamente 12 vezes maiores que os extratos obtidos com éter de petróleo (apolar). Este resultado já era esperado, tendo em vista que as moléculas de taninos condensados contemplam vários grupamentos hidroxila, os quais tem mais afinidade com substâncias de alta polaridade, como o etanol. Contudo, os taninos condensados se mostraram presentes também nos outros extratos, ainda que em pequena quantidade. Como suas moléculas possuem certa apolaridade na estrutura química, é válido sugerir que elas foram arrastadas pelos solventes mais apolares, os quais foram utilizados antes do etanol na fase das extrações sucessivas.

Viana (2013) não detectou a presença de taninos condensados na *P. aculeata* quando realizou a análise pelo método butanol-ácido. Porém, além de ter utilizado outro método, é válido ressaltar que suas amostras eram folhas secas em estufa a 65 °C, enquanto que neste trabalho as folhas foram secas a temperatura ambiente (visando reduzir a perda de compostos) e a análise foi realizada com extratos de diferentes polaridades, o que permitiu uma melhor extração dos taninos condensados das folhas de ora-pro-nobis.

A reação de Stiasny compreende submeter determinada amostra ao contato com formaldeído, em meio ácido aquecido, e possibilita determinar o Número de Stiasny (NS), que representa o percentual de taninos condensados reativos presentes na amostra (VIEIRA et al., 2014). O formaldeído atua como ligante entre as moléculas de taninos. Dessa forma, ocorre a ligação do formaldeído principalmente com os átomos de carbono do anel A, estabelecendo-se uma ligação entre as moléculas por grupos metilênicos (Figura 22). O anel A de uma unidade flavonoídica tende a ser

mais reativo que o anel B, pois apresenta caráter nucleofílico, o que pode explicar a alta reatividade dos taninos (ALMEIDA et al., 2010).



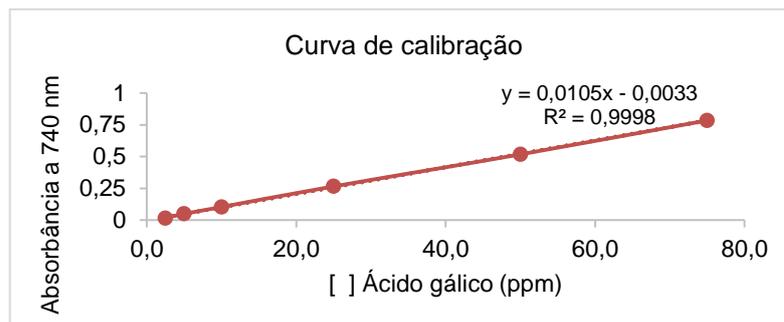
**Figura 22 - Formação da resina tanino-formaldeído pela reação entre tanino condensado e formaldeído**

Fonte: Almeida et al. (2010)

De acordo com Marchini (2015), essa alta reatividade dos taninos condensados com o formaldeído justifica sua grande aplicação no preparo ou modificação de resinas em indústrias de painéis de madeira.

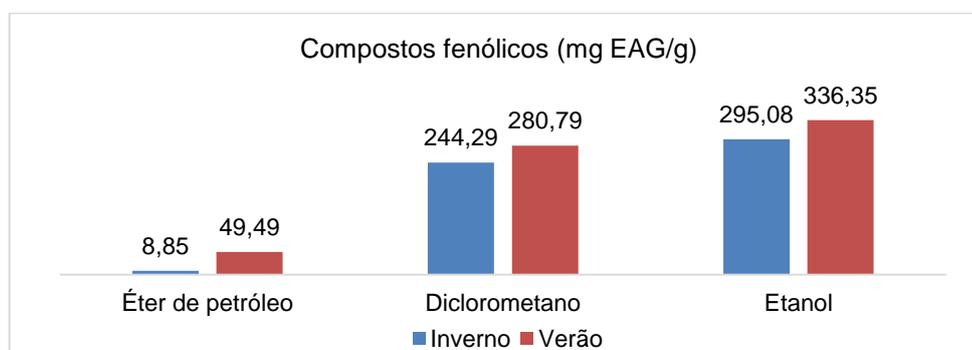
### 5.3.2 Determinação de compostos fenólicos por Folin-Ciocalteu

Esta determinação de compostos fenólicos tem base na redução do reagente Folin-Ciocalteu, composto pela mistura dos ácidos fosfomolibdico ( $H_3P(Mo_3O_{10})_4$ ) e fosfotúngstico ( $H_3P(W_3O_{10})_4$ ), pelos compostos fenólicos presentes na amostra, formando um complexo azul (SOUSA et al., 2014). A análise é feita por método espectrofotométrico e requer a elaboração de uma curva de calibração com um padrão de referência, como o ácido gálico. Dessa forma, foi plotado um gráfico (Figura 23) que relaciona a absorbância de diferentes concentrações do padrão, gerando a equação de regressão linear utilizada para quantificar o conteúdo fenólico das amostras em mg de equivalente em ácido gálico por grama de extrato ( $mg\ EAG\ g^{-1}$ ).



**Figura 23 - Curva de calibração do padrão ácido gálico**  
**Fonte: Autoria própria**

De posse da equação de regressão linear e das absorbâncias das amostras, foi realizada a determinação de compostos fenólicos das mesmas (Figura 24), sendo verificado que os extratos etanólicos apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos para ambas as estações de coleta (inverno: 295,08 mg EAG g<sup>-1</sup>; verão: 336,35 mg EAG g<sup>-1</sup>). Contudo, os extratos diclorometânicos também apresentaram elevado teor desses compostos. Já os extratos obtidos com éter de petróleo apresentaram baixo conteúdo de compostos fenólicos para ambas as estações.



**Figura 24 - Conteúdo fenólico dos extratos de folhas de ora-pro-nobis coletadas em diferentes épocas**  
**Fonte: Autoria própria**

Já era esperado que os compostos de alta e média polaridade contivessem alto conteúdo fenólico devido a polaridade de tais compostos e a suas estruturas químicas, que são constituídas por anéis aromáticos e grupamentos hidroxila. Todavia, os extratos de éter de petróleo também apresentaram algum conteúdo de compostos fenólicos, ainda que inferiores aos dos outros extratos analisados. Isso pode ter ocorrido pelo fato de alguns fenólicos apresentarem menos grupos hidroxila

na estrutura química, o que diminui sua polaridade, facilitando sua extração pelo solvente apolar – éter de petróleo.

Apesar das diferenças ressaltadas entre os diferentes extratos, é importante observar que os extratos das folhas coletadas no verão foram os que apresentaram maior teor de compostos fenólicos, independente do solvente extrator utilizado.

Em seus estudos, Sim, Sri Nurestri e Norhanom (2010) examinaram o conteúdo fenólico em extratos de folhas de *Pereskia grandifolia* e obtiveram como resultado 45,99 mg EAG g<sup>-1</sup> para o solvente acetato de etila e 19,08 mg EAG g<sup>-1</sup> para o solvente hexano. Apesar dos solventes utilizados e da espécie estudada por tais autores serem diferentes da deste trabalho, nota-se que os resultados são compatíveis, pois o extrato de menor polaridade (hexânico) também apresentou o menor conteúdo fenólico. Ao comparar o teor de compostos fenólicos da *P. aculeata* e da *P. grandifolia* observa-se uma diferença discrepante nos resultados, o que torna a primeira mais interessante tendo em vista a grande aplicabilidade de produtos naturais ricos em compostos fenólicos.

É comum realizar esta análise apenas em extratos obtidos com solventes de alta polaridade, como acetona 80% ou etanol 70%, por serem reportados como eficientes na extração de compostos fenólicos (JAYAPRAKASHA; SINGH; SAKARIAH, 2001). Porém, ao somar o conteúdo fenólico contido nos diferentes extratos de *P. aculeata* de cada estação (inverno: 548,22 mg EAG g<sup>-1</sup>; verão: 666,63 mg EAG g<sup>-1</sup>), obtêm-se aproximadamente o dobro do valor em relação apenas ao conteúdo dos extratos etanólicos (polares). Dessa forma, é importante frisar que os compostos fenólicos também estão presentes em outras frações do material vegetal, as quais devem ser quantificadas para um resultado mais preciso.

#### 5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

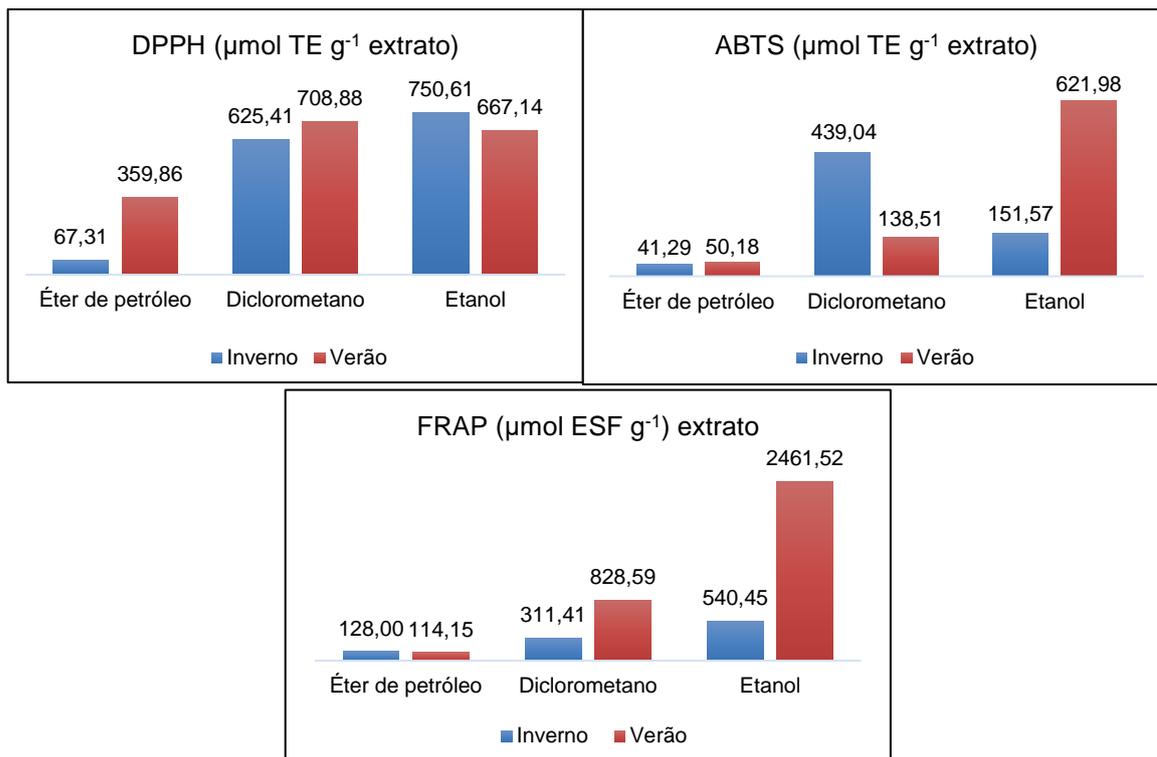
Para análise do potencial antioxidante *in vitro* dos extratos das folhas de ora-pro-nobis foram utilizados os métodos FRAP, ABTS e DPPH, cujas curvas de calibração apresentaram coeficientes de correlação (R<sup>2</sup>) igual a 0,9999, 0,9927 e 0,9994, respectivamente, o que assegura alta confiabilidade nos resultados.

**Tabela 5 - Resumo dos resultados de atividade antioxidante dos extratos**

<b>Extratos</b>	<b>FRAP (<math>\mu\text{mol ESF g}^{-1}</math>)</b>	<b>ABTS (<math>\mu\text{mol TE g}^{-1}</math>)</b>	<b>DPPH (<math>\mu\text{mol TE g}^{-1}</math>)</b>
EPI	128,00	41,29	67,31
DCMI	311,41	439,04	625,41
ETI	540,45	151,57	750,61
EPV	114,15	50,18	359,86
DCMV	828,59	138,51	708,88
ETV	2461,52	621,98	667,14
<b>Total inverno (EPI, DCMI, ETI)</b>	979,86	631,90	1443,33
<b>Total verão (EPV, DCMV, ETV)</b>	3404,26	810,67	1735,88

Dependendo dos constituintes presentes no material analisado, um método pode ser mais apropriado que outro na determinação de sua atividade antioxidante (SUCUPIRA et al., 2012). Após a realização das análises, verificou-se que a soma dos resultados dos extratos de verão apresentou os maiores valores para todos os métodos utilizados (Tabela 5). Na determinação de compostos fenólicos também foi verificado que os extratos de verão apresentaram os maiores teores, como era esperado, tendo em vista que tais compostos são os principais responsáveis pelo potencial antioxidante das substâncias.

Em se tratando das diferenças entre os extratos, foi observado que aqueles obtidos com o solvente apolar (éter de petróleo) foram os que mostraram os menores valores para atividade antioxidante nos três métodos utilizados (Figura 25). Dessa forma, pode-se dizer que o potencial antioxidante das amostras analisadas está diretamente relacionado com a polaridade das substâncias e do solvente extrator.



**Figura 25 - Resultados das análises de atividade antioxidante dos extratos em função da sazonalidade**  
**Fonte: Autoria própria**

Para todas os métodos foi verificada diferença significativa entre as coletas para os extratos de média e alta polaridade (diclorometano e etanol, respectivamente), diferente do extrato apolar, que apresentou diferença sazonal significativa apenas para o método DPPH.

A partir da visualização gráfica também pode ser observado que os resultados diferiram expressivamente entre os métodos. Isso ocorre porque as substâncias denominadas antioxidantes podem agir nos diferentes níveis de um processo oxidativo, seja diminuindo a concentração de oxigênio, quelando íons metálicos, ou decompondo produtos primários em outros não radicalares. Dessa forma, levando em consideração a aplicabilidade singular de cada tipo de ensaio, é recomendada a utilização de duas ou mais técnicas, visto que nenhum ensaio isolado poderá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (SUCUPIRA et al., 2012).

Não há estudos na literatura que relatem a influência da sazonalidade no potencial antioxidante das folhas de *P. aculeata*. Contudo, Sousa et al. (2014) analisou a influência do solvente extrator em folhas de ora-pro-nobis para o método DPPH CE<sub>50</sub>

e verificou que no extrato em acetona 80% ocorreu maior atividade antioxidante, seguido do extrato em etanol 70% e em água. Os três solventes analisados em tal trabalho são polares, porém a acetona é constituída por uma cadeia carbônica maior, diminuindo a polaridade do solvente. Assim, pôde ser extraída uma quantidade mais abrangente de substâncias responsáveis pelo potencial antioxidante, englobando compostos de média e alta polaridade, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho.

Souza (2014) verificou que os extratos das folhas de *P. aculeata* obtidos por infusão, aquoso, metanólico e etanólico apresentaram atividade antioxidante, porém os dois últimos exibiram os melhores resultados, o que também pode estar relacionado a menor polaridade do etanol e do metanol em relação a da água. Ainda assim, o extrato aquoso e a infusão também manifestaram alguma atividade, o que justifica a utilização da ora-pro-nobis na medicina popular por meio do consumo de sucos e chás.

## 5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

### 5.5.1 Difusão em disco

O teste de difusão em disco é utilizado para determinar o potencial de algum material sobre a inibição do crescimento radial de um micro-organismo. Neste estudo, o teste foi realizado para os extratos de *P. aculeata*, devidamente diluídos, frente a quatro micro-organismos diferentes, sendo eles: as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e as leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Esses micro-organismos foram selecionados pelo seu grau de importância, visto que são comuns as infecções causadas por eles. É importante ressaltar que em DMSO até 10%, concentração utilizada na diluição dos extratos, não ocorre inibição do crescimento dos micro-organismos (KARAMAN et al., 2003), não alterando os resultados da análise.

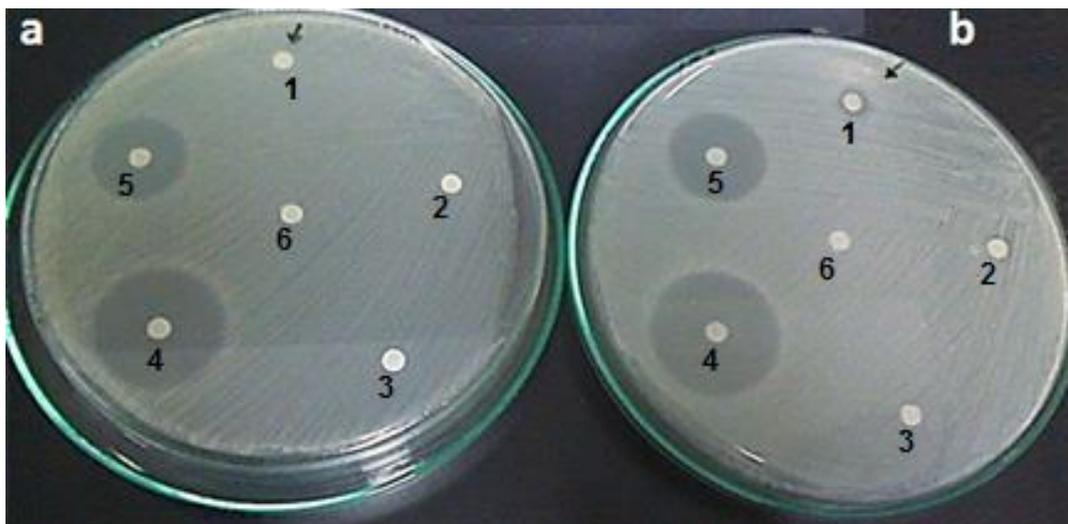


Figura 26 - Placas de teste de difusão em disco dos extratos EPV (a) e EPI (b) frente a bactéria *S. aureus*. Discos: (1) extrato a  $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; (2) extrato a  $5.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; (3) extrato a  $2.500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; (4) Tetraciclina; (5) Norfloxacino; (6) DMSO

Fonte: Autoria própria

Após todos os testes, realizados em triplicata, observou-se que apenas um dos extratos, o EPI, apresentou potencial de inibição de crescimento microbiano. Este extrato inibiu o crescimento da bactéria *S. aureus*, verificando-se halos de inibição nas duas maiores concentrações, que podem ser observados nos discos 1 e 2 ( $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $5.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente) da Figura 26b.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos e não esporulados. A espécie *S. aureus*, a mais importante do gênero, é responsável por cerca de 50 a 87% das infecções hospitalares (SILVA et al., 2010). A partir dos testes, observou-se que apenas uma das frações apolares das folhas de *P. aculeata*, referente a coleta de inverno, se mostrou com potencial de inibição do crescimento da *S. aureus*.

Os extratos EPI e EPV foram obtidos com o mesmo solvente, éter de petróleo, sobre as folhas secas de ora-pro-nobis, sendo que a única diferença entre eles foi a estação de coleta das folhas. Contudo, observou-se que apenas o EPI, obtido na coleta de inverno, apresentou potencial de inibição do crescimento microbiano. Com isso, presume-se que durante o inverno a *P. aculeata* produz alguma substância diferente, que foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*, ou, então, que houve variação na concentração de algum composto, vindo a apresentar atividades antimicrobianas distintas de acordo com a estação de coleta do material vegetal.

Souza et al. (2016) realizaram ensaios com diferentes extratos de *P. aculeata* (éter de petróleo, clorofórmio e metanol), nos quais o extrato de menor polaridade mostrou potencial antimicrobiano sobre as bactérias *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. As duas últimas foram testadas neste trabalho, porém não foi detectada atividade antimicrobiana frente a *E. coli* por nenhum dos extratos, independente da estação de coleta das folhas. Este fato pode estar relacionado aos diferentes fatores que afetam a sensibilidade do método de análise utilizado, tais como: meio de cultura, pH do sistema, disponibilidade de oxigênio, quantidade de inóculo e condições de incubação utilizados (OSTROSKY et al., 2008).

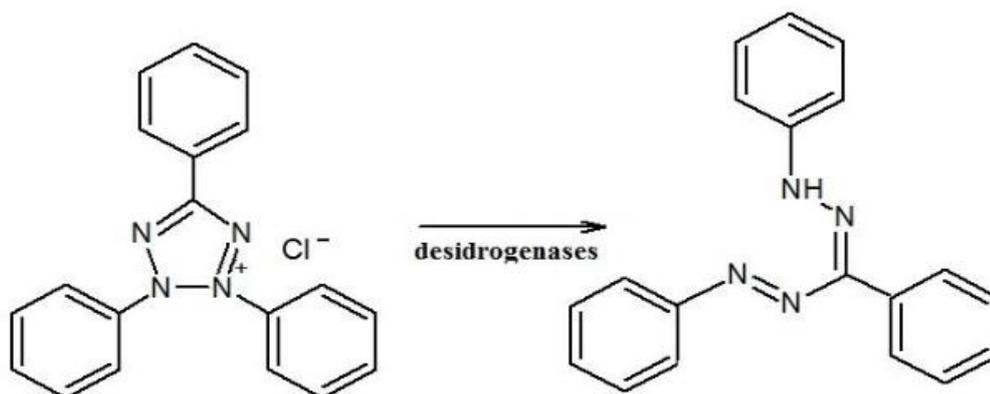
Os demais micro-organismos testados neste trabalho não tiveram seu crescimento influenciado pelos extratos das folhas de ora-pro-nobis. Da mesma forma, Santos et al. (2011) também verificaram que o extrato hidroalcoólico (92,8%) da *P. aculeata* não causou inibição no crescimento dos micro-organismos *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* e *Candida albicans*, que são patógenos bucais.

A resistência dos micro-organismos frente a antimicrobianos em geral vem sendo um problema no tratamento de infecções. Neste sentido, os produtos naturais ganham destaque como uma fonte alternativa na busca de novos agentes antimicrobianos (SILVA et al., 2010). Apesar de os resultados obtidos neste trabalho serem satisfatórios, é válido continuar realizando testes de atividade antimicrobiana com as folhas de *P. aculeata* frente a outros micro-organismos, tendo em vista o potencial medicinal desta planta que já é conhecido pela medicina popular.

#### 5.5.2 Concentração inibitória mínima (CIM)

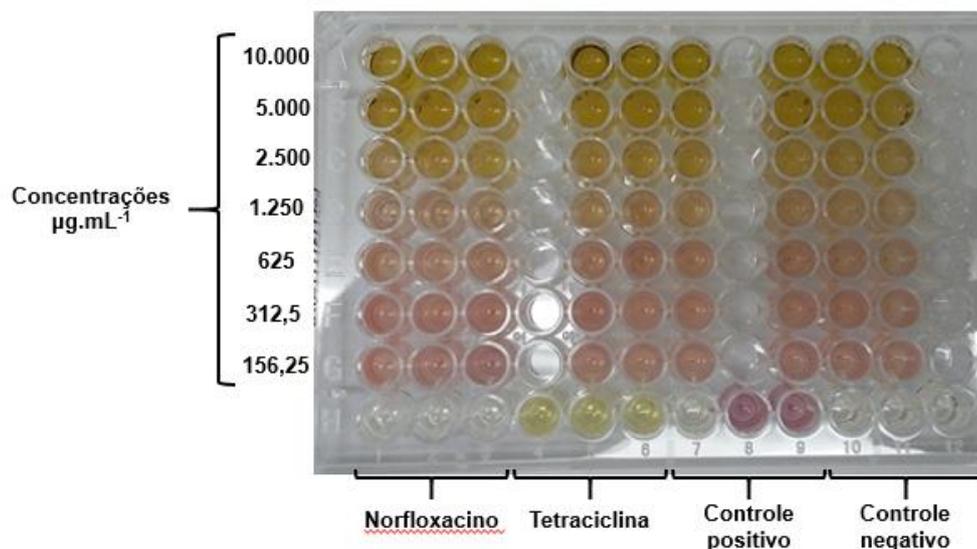
A CIM corresponde à menor diluição na qual é verificada ausência de crescimento microbiano. Assim, quanto menor a CIM, maior a eficácia do material analisado. As diluições do extrato EPI compreenderam as concentrações de 10.000 a 156,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  após serem transferidas para a placa de análise contendo o caldo Mueller Hinton, na qual, em seguida, foi adicionado o micro-organismo *S. aureus*.

Decorrido o tempo de crescimento do *S. aureus* (24 horas), foi adicionado aos poços o 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC – Sigma Aldrich), que é um revelador indicador de oxirredução utilizado para detectar a viabilidade celular. Seu mecanismo (Figura 27) tem base na redução enzimática do TTC, que é incolor, a 1,3,5-trifenilformazan, de coloração avermelhada. Este mecanismo só acontece em presença de células vivas devido as enzimas desidrogenases, que catalisam as reações respiratórias nas mitocôndrias durante a glicólise e o ciclo de Krebs (GABRIELSON et al., 2002; COSTA et al., 2008). Assim, pode-se dizer que a coloração é uma indicação positiva de células vivas por meio da detecção de respiração a nível celular (DUARTE et al., 2005; COSTA et al., 2008).



**Figura 27 - Oxirredução do 2,3,5 trifeniltetrazólio (incolor) a 1,3,5 trifenilformazan (avermelhado), em presença de células vivas**  
Fonte: Rozatto (2012)

Após decorrido o tempo de reação do TTC, foi verificado que a menor diluição onde ocorreu inibição do crescimento microbiano foi de  $2.500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , pois foi a diluição limite onde não houve mudança na coloração do meio reacional dos poços (Figura 28).



**Figura 28 - Placa de teste de microdiluição após aplicação do revelador TTC**  
 Fonte: Autoria própria

Na literatura ainda não há relatos de estudos envolvendo a análise de CIM das folhas de *P. aculeata*. Contudo, em se tratando de extratos de plantas, poderão haver variações nos resultados de CIM que estão atreladas a diferentes fatores, como o micro-organismo e a cepa utilizados, a origem e a época de coleta do vegetal, ao tratamento das amostras quanto a utilização do material fresco ou seco, entre outras (OSTROSKY et al., 2008).

### 5.5.3 Atividade bactericida/bacteriostática

Após verificar a inibição no crescimento do *S. aureus* na análise anterior, foi testado o tipo de ação desta atividade antibacteriana. A determinação *in vitro* da ação antibacteriana de alguma substância (para verificação se o agente é bactericida ou bacteriostático) é influenciada por vários fatores, como as condições de crescimento, a densidade bacteriana, a duração do teste, entre outros. Dessa forma, a maioria dos antibacterianos é melhor descrita como sendo potencialmente bactericida ou potencialmente bacteriostático (PANKEY; SABATH, 2004). Neste contexto, se um agente considerado bacteriostático estiver em altas concentrações, por exemplo, ele

poderá ser potente o suficiente para matar grande parte das bactérias, vindo a ser considerado, portanto, um agente bactericida (TNSolution, 2015).

O plaqueamento da mistura contida nos poços de diluição  $2.500 \mu\text{g mL}^{-1}$  (CIM) permitiu verificar que o extrato EPI apresenta ação potencialmente bacteriostática, pois foram observadas colônias bacterianas no meio de cultura após as 24 h de incubação. Ou seja, na concentração de  $2.500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , o extrato manteve a bactéria em seu estado estacionário de desenvolvimento (PANKEY; SABATH, 2004). Ao entrar em contato com o meio de cultura, ocorreu a diluição do extrato e as bactérias voltaram a se multiplicar, retomando o seu crescimento.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As folhas da ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) são ricas nutricionalmente, pois apresentam elevado teor de proteínas de alta digestibilidade e de carboidratos, que inclui as fibras alimentares, bem como de elevado conteúdo mineral (cinzas). Foram observadas algumas diferenças em relação as coletas, realizadas no inverno e no verão, porém o teor de lipídios e de carboidratos não se mostraram influenciados pela sazonalidade.

A cinética de secagem das folhas frescas melhor se ajustou ao modelo matemático de Page para ambas as coletas, ou seja, houveram interferências no processo de secagem causadas pela resistência interna deste material.

A análise de Folin-Ciocalteu dos diferentes extratos obtidos mostrou que os etanólicos, de inverno e de verão, apresentaram os maiores conteúdos de compostos fenólicos. Os extratos diclorometânicos também apresentaram elevado teor desses compostos. Era esperado que esses dois extratos exibissem alto conteúdo fenólico devido a polaridade de tais compostos e a suas estruturas químicas, que são constituídas, principalmente, por anéis aromáticos e grupamentos hidroxila. Contudo, os extratos obtidos com éter de petróleo também mostraram algum conteúdo fenólico, ainda que muito inferior ao dos outros extratos. Assim, vale ressaltar que os compostos fenólicos estão presentes em todas as frações (diferentes polaridades) do material vegetal, sendo importante analisar todas elas para obtenção de uma estimativa mais acurada. Outro ponto pertinente em relação a esta análise é que todos os extratos das folhas coletadas no verão apresentaram maior teor de compostos fenólicos, independente do solvente extrator utilizado.

Desde o teste preliminar foi observado que os extratos continham taninos condensados em sua composição. A determinação destes compostos pelo método de Stiasny permitiu verificar que no inverno há maiores teores de taninos condensados nas folhas de *P. aculeata*, independente do solvente extrator utilizado.

Quanto ao potencial antioxidante, observou-se que para os três métodos utilizados (DPPH, ABTS e FRAP) os extratos provenientes de folhas coletadas no verão apresentaram os maiores valores para todas as polaridades, corroborando com a análise de compostos fenólicos. Também foi observado que os resultados diferiram

expressivamente entre os métodos, o que é justificado pelo fato de que cada ensaio é distinto em relação as reações químicas que ocorrem em cada análise.

A análise de atividade antimicrobiana por difusão em disco revelou que apenas o extrato de inverno obtido com éter de petróleo apresentou ação sobre um micro-organismo, o *S. aureus*. Ao realizar a análise de CIM para este extrato, constatou-se que a menor concentração capaz de inibir o crescimento do *S. aureus* é de 2.500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . No teste quanto ao tipo de ação antibacteriana que ocorreu sobre o *S. aureus*, foi verificado que o extrato, a essa concentração, atua como agente potencialmente bacteriostático.

Em resumo, conclui-se que as folhas de ora-pro-nobis apresentam considerável importância nutricional e biológica, o que torna o cultivo deste vegetal interessante, uma vez que se trata de uma planta rústica, de fácil propagação, que pode ser utilizada como cerca-viva e contém flores e frutos também comestíveis.

## REFERÊNCIAS

AIRES, Alfredo; CARVALHO, Rosa; SAAVEDRA, Maria José. Valorization of solid wastes from chestnut industry processing: Extraction and optimization of polyphenols, tannins and ellagitannins and its potential for adhesives, cosmetic and pharmaceutical industry. **Waste Management**, v. 48, p. 457-464, 2016.

ALMEIDA, Martha E. F. **Farinha de folhas de cactáceas do gênero *Pereskia*: caracterização nutricional e efeito sobre ratos *Wistar* submetidos à dieta hipercalórica**. 2012. 128 f. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

ALMEIDA, Martha E. F.; CORRÊA, Angelita D. Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 42, n. 4, p. 751–756, 2012.

ALMEIDA, Martha E. F.; JUNQUEIRA, Allana M. B.; SIMÃO, Anderson A.; CORRÊA, Angelita D. Chemical characterization of the non-conventional vegetable known as ora-pro-nobis. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 431-439, 2014.

ALMEIDA, Natalie F.; MORI, Fábio A.; GOULART, Selma L.; MENDES, Lourival M. Study of reactivity of tannins of leaves and barks of Barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. **Scientia Forestalis**, v. 38, n. 87, p. 401-408, 2010.

ALVES, Clayton Q.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P.; BAHIA, Marcus V.; AGUIAR, Rosane M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ARAÚJO, Júlio M. A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**, 4. ed. Minas Gerais: UFV, 2008.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. Bacteriostatic and bactericidal activity of the *Baccharis trimera* (Less.) D.C. - *Compositae* decocto, as disinfectant or antiseptic. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 3, 2000.

BATTESTIN, Vania; MATSUDA, Luis K.; MACEDO, Gabriela A. Fontes e Aplicações de Taninos e Tanases em Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 1, 2004.

BESSA, Tatiana; TERRONES, Manuel G. H.; SANTOS, Douglas Q. Avaliação fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de *Cenchrus Echinatus*. **Horizonte Científico**, v. 1, n. 1, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 01, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade>>. Acesso em: 14 mai. 2015.

CORRÊA, Paulo C.; RESENDE, Osvaldo; MARTINAZZO, Ana P.; GONELI, André L. D.; BOTELHO, Fernando M. Modelagem matemática para a descrição do processo de secagem do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em camadas delgadas, **Engenharia Agrícola**, v.27, n. 2, p.501-510, 2007.

COSTA, Nilton P.; FILHO, Julio M.; NETO, José B. F.; KRZYZANOWKI, Francisco C.; HENNING, Ademir A. Teste de tetrazólio em semente de soja com acondicionamento abreviado - Série Sementes. **EMBRAPA**, Comunicado Técnico *on line*, Londrina, 2008.

COUTO, Mery E. O. **Coleção de plantas medicinais aromáticas e condimentares**. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 2006. 91 p. (Documentos, 157).

DEGENHARDT, Jorg; KOLLNER, Tobias G.; GERSHENZON, Jonathan. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1621-1637, 2009.

DEWICK, Paul M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2. ed. Chichester: Wiley, 2002.

DÔRES, Rosana G. R. das. **Análise morfológica e fitoquímica da fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.)**. 2007. 374 f. Tese (*Doctor Scientiae*) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

DUARTE, Marta C.; FIGUEIRA, Glyn M.; SARTORATTO, Adilson; REHDER, Vera L. G.; DELARMELINA, C. Anti-candida activity of brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, 2. ed., p. 305-311, 2005.

FIGUEIREDO, Andréa S. G. de. **Efeito da sazonalidade no perfil químico e na atividade antioxidante de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) e ação modulatória desta planta sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos**. 2010. 30 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

FILHO, Raimundo B. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, 2010.

GABRIELSON, Jenny; HART, Mark; JARELOV, Anna; KUHN, Inger; McKENZIE, Douglas; MALLBY, Roland. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of microbiological methods**, p. 63-73, 2002.

GALVANI, Fábio; GAERTNER, Eliney. Adequação da Metodologia Kjeldahl para determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta. **EMBRAPA**, Circular Técnica, Corumbá, 2006.

GIRÃO, Lúcio V. C.; FILHO, José C. S.; PINTO, José E. B. P.; BERTOLUCCI, Suzan K. V. Avaliação da composição bromatológica de ora-pro-nobis. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 2, 2003.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONÇALVES, Celso A.; LELIS, Roberto C. C.; BRITO, Edvã O., NASCIMENTO, Alexandre M. do. Produção de chapas de madeira aglomerada com adesivo uréia-formaldeído modificado com tanino de *Mimosa caesalpiniaefolia* Bentham (Sabiá). **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 1, p. 18-26, 2003.

GONÇALVES, J. P. Z.; SERAGLIO, J.; SILVA, L. L.; FERNANDES, S.C.; COSTELLI, M.C.; SAVIO, J. Quantificação de proteínas e análise de cinzas encontradas nas folhas e caule da ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20., 2014, Florianópolis. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br/s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/0167-26714-164573.pdf>>. Acesso em 01 ago. 2016.

HE, Wu; DOU, Huanjing; LI, Zhigang; WANG, Xiaogai; WANG, Lvjing; WANG, Ruiyong; CHANG, Junbiao. Investigation of the interaction between five alkaloids and human hemoglobin by fluorescence spectroscopy and molecular modeling.

**Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 123 p. 176–186, 2014.

HO, Shuk C.; CHUNG, Joanne W. Y. The effects of caffeine abstinence on sleep: A pilot study. **Applied Nursing Research**, v. 26, p. 80-84, 2013.

HONÓRIO, Josianne P.; PAOLONI, Danielle F.; MACEDO, Dione C. de; FERREIRA, Manoel E.; CIABOTTI, Sueli; SANTANA, Márcio J. de; PEREIRA, Lucas A. Efeito da adubação orgânica no teor de umidade, pH e acidez total titulável em cultivo de alface. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO INSTITUTO FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO, 3., 2010, Uberaba. **Anais eletrônicos...** Uberaba: IFTM, 2010. Disponível em: <[http://www.iftm.edu.br/proreitorias/pesquisa/3o\\_seminario/trabalhos/agro\\_efeito\\_da\\_adubacao\\_organica.pdf](http://www.iftm.edu.br/proreitorias/pesquisa/3o_seminario/trabalhos/agro_efeito_da_adubacao_organica.pdf)>. Acesso em: 03 jul. 2016.

HUSSEIN, Abdullah I.; ANWAR, Farooq; SHERAZI, Syed T. H.; PRZYBYLSKI, Roman. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 986-995, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4. ed. 1ª edição digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 285-290, 2001.

KARAMAN, I.; SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; OGÜTÇÜ, H.; SENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.85 p. 231-235, 2003.

KLEIN, Ana P. P. **Estudo fitoquímico das folhas de capimannoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) coletadas no inverno e verão**. 2015. 103 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2015.

KUPSKA, Magdalena; CHMIEL, Tomasz; JEĐRKIEWICZ, Renata; WARDENCKI, Waldemar; NAMIEŚNIK, Jacek. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for determination of the terpenes profile of blue honeysuckle berries. **Food Chemistry**, v. 152, p. 88-93, 2014.

LIMA, Ricardo. J. C. MORENO, Antonio J. D.; CASTRO, Solange F. L. de; GONÇALVES, José de R. S.; OLIVEIRA, Antonio B. de; SASAKI, José M. FREIRE, Paulo de T. C. Taninos hidrolisáveis em *Bixa orellana* L. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 507-509, 2006.

LOW, Jiun H.; RAHMAN, Wan A. W. A. JAMALUDDIN, Jamarosliza. The influence of extraction parameters on spent coffee grounds as a renewable tannin resource. **Journal of Cleaner Production**, v. 101. p. 222-228, 2015.

LUZIA, Débora M. M.; BERTANHA, Bruna J.; JORGE, Neuza. Sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.): potencial antioxidante e perfil de ácidos graxos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 2, p. 175-80, 2010.

MANGRICH, A. S. DOUMER, M. E.; MALLMANN, A. S.; WOLF, C. R.. Química verde no tratamento de águas: uso de coagulante derivado de tanino de *Acacia mearnsii*. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, p. 2-15, 2014.

MARCHINI, Helder R. **Extração dos taninos da espécie *Pinus taeda* no município de Curitiba – SC e sua avaliação para aplicação industrial como adesivo modificado**. 2015. 117 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2015.

MARTINAZZO, Ana P.; CORRÊA, Paulo C.; RESENDE, Osvaldo; MELO, Evandro C. Análise e descrição matemática da cinética de secagem de folhas de capim-limão, **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, n. 3, p. 301-306, 2007.

MARTINAZZO, A. P.; MELO, E. C.; CORRÊA, P. C.; SANTOS, R. H. S. Modelagem matemática e parâmetros qualitativos da secagem de folhas de capimlimão [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf], **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 488-498, 2010.

MARTINS, E. A. S.; LAGE, E. Z.; GONELI, A. L. D.; HARTMANN FILHO, C. P.; LOPES, J. G. Cinética de secagem de folhas de timbó (*Serjania marginata* Casar), **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 3, p. 238-244. 2015.

MATIAS, Edinardo F. F.; ALVES, Erivania F.; SILVA, Maria K. N.; CARVALHO, Victoria R. A.; FIGUEREDO, Fernando G.; FERREIRA, João V. A.; COUTINHO, Henrique D. M.; SILVA, João M. F. L.; RIBEIRO-FILHO, Jaime; COSTA, José G. M.

Seasonal variation, chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae) and the sabinene. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 45-53, 2016.

MONTEIRO, Julio M. ALBUQUERQUE, Ulysses P. de; ARAÚJO, Elcida de L.; AMORIM, Elba L. C. de. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORGADO, Cristiane M. A.; DURIGAN, José F.; LOPES, Valquíria G.; SANTOS, Leandra O. Conservação pós-colheita de goiabas 'kumagai': efeito do estágio de maturação e da temperatura de armazenamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1001-1008, 2010.

MOTA, Katiúscia. C.N.; ATHAYDE, Antônio A. R.; MEDEIROS, Silvana L. S.; FERREIRA-FILHA, Ana C. C. P.; PINTO, Elisângela R. A.; SILVA, Bruno C.; OLIVEIRA, Leonardo L. S.; CASTRO, Mariana R. Utilização da parte aérea da ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill) na dieta de leitões de 7-21 dias de idade. In: SEMANA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA IFMG, 4., 2011, Bambuí. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <[http://www.bambui.ifmg.edu.br/jornada\\_cientifica/2011/resumos/zootecnia/93.pdf](http://www.bambui.ifmg.edu.br/jornada_cientifica/2011/resumos/zootecnia/93.pdf)>. Acesso em: 14 out. 2016.

NEBO, Liliane; VARELA, Rosa M.; MOLINILLO, José M. G.; SAMPAIO, Olívia M.; SEVERINO, Vanessa G. P.; CAZAL, Cristiane M.; FERNANDES, Maria F. das G.; FERNANDES, João B.; MACÍAS, Francisco A. Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the Rutaceae and Meliaceae families. **Phytochemistry Letters**, v. 8, p. 226–232, 2014.

NOVAIS, T. S.; COSTA, J.F.O.; DAVID, J.P.L.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P. SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, supl. 2, p. 8-11, 2003.

NUNES, Clara dos R.; BERNARDES, Natalia R.; GLÓRIA, Lorena de L.; BARBOSA, João B.; PEREIRA, Sílvia M. de F.; OLIVEIRA, Daniela B. de. Atividade antioxidante e o teor de taninos e fenóis totais dos frutos de *Annona muricata* L. **Vértices**, v. 15, n. 3, p. 93-110, 2013.

OLIVEIRA, Luciana S. de; MUZITANO, Michelle F.; COUTINHO, Marcela A. S.; MELO, Giany O. de; COSTA, Sônia S. Plantas Medicinais como Recurso Terapêutico em Comunidade do Entorno da Reserva Biológica do Tinguá, RJ, Brasil – Metabólitos Secundários e Aspectos Farmacológicos. **Revista Científica Internacional**, v. 4, n. 17, 2011.

OLIVEIRA, Tânia T. de; SILVA, Rosimar R. da; DORNAS, Waleska C.; NAGEM, Tanus J. Flavonóides e Aterosclerose. **RBAC**, v. 42 n. 1, 2010.

OSTROSKY, Elissa A.; MIZUMOTO, Miriam K.; LIMA, Marcos E. L.; KANEKO, Telma M.; NISHIKAWA, Suzana O.; FREITAS, Beatriz R.. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PAGE, G. E. **Factors influencing the maximum of air drying shelled corn in thin layer**. Thesis (M.Sc.), Purdue University, Indiana, 1949.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864-870, 2004.

PAVARINI, Daniel P.; PAVARINI, Saulo P.; NIEHUES, Michael; LOPES, Norberto P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 5-16, 2012.

PINTO, Nicolas C. C.; SCIO, Elita. The biological activities and chemical composition of *Pereskia* species (Cactaceae) – A review. **Plant Food for Human Nutrition**, v. 69, n. 3, p. 189-195, 2014.

QUEIROZ, Carla. R. A. dos A. **Cultivo e composição química de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) sob déficit hídrico intermitente no solo**. 2012. 144 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2012.

QUEIROZ, Carla R. A. dos A.; MELO, Cláudia M. T.; ANDRADE, Reginaldo R. de; PAVANI, Luiz C.; MORAIS, Sérgio A. L. de. Composição centesimal de frutos de ora-pro-nóbis. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 34., 2009, Florianópolis. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <<http://sec.sbq.org.br/cdrom/34ra/resumos/T3296-1.pdf>>. Acesso em: 14 out. 2016.

QUEIROZ, Carla. R. A. dos A.; MORAES, Cristina M S.; ANDRADE, Reginaldo R.; PAVANI, Luiz C. Crescimento inicial e composição química de *Pereskia aculeata* Miller cultivada em diferentes luminosidades. **Revista Agrogeoambiental**, v. 7, n. 4, p. 93-104, 2015.

RABANAL, R. M.; ARIAS, A.; PRADO, B.; HERNANDEZ-PEREZ, M.; SANCHEZ-MATEO, C.C. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p. 287-292, 2002.

RADÜNZ, L. L.; AMARAL, A. S.; MOSSI, A. J.; MELO, E. C.; ROCHA, R. P. Avaliação da cinética de secagem de carqueja, **Engenharia na agricultura**, v. 19, n.1, p. 19-27, 2011.

ROCHA, Débora R. C.; PEREIRA JR, Geraldo A.; VIEIRA, Gilmar; PANTOJA, Lílian; SANTOS, Alexandre S.; PINTO, Nísia A. V. D. Macarrão adicionado de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) desidratado. **Alimentos e nutrição**, v.19, n.4, p. 459-465, 2008.

RUFINO, Maria do S. M.; ALVES, Ricardo E.; BRITO, Edy S. de; MORAIS, Selene M. de; SAMPAIO, Caroline de G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; SAURA-CALIXTO, Fulgencio D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>+</sup>, **EMBRAPA**, Comunicado Técnico *on line*, Fortaleza, 2007.

\_\_\_\_\_. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do Ferro - FRAP, **EMBRAPA**, Comunicado Técnico *on line*, Fortaleza, 2006.

SANTOS, Ariane G.; TIBURCIO, Camila S.; SARTOR, Claudenice F. P.; CORTEZ, Lúcia E. R. Avaliação das atividades antimicrobiana sobre patógenos bucais e hemolítica das folhas de *Pereskia aculeata*. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR, 7., 2011, Maringá. **Anais...** Maringá: Editora CESUMAR, 2011.

SARTOR, Claudenice F. P.; AMARAL, Valéria; GUIMARÃES, Hudson E. T.; BARROS, Kellen N.; FELIPE, Daniele F.; CORTEZ, Lúcia E. R.; VELTRINI, Vanessa C. Estudo da ação cicatrizante das folhas de *Pereskia aculeata*. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 2, p. 149-154, 2010.

SILVA, Dirceu J.; QUEIROZ, Augusto C. de. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. 3. ed. 6. reimpressão. Viçosa: UFV, 2012.

SILVA, V. A.; FREITAS, A. F. R.; PEREIRA, M. S. V.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, A. V.; HIGINO, J. S. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 452-455, 2010.

SIM, K. S.; SRI NURESTRI, A. M.; NORHANOM, A. W. Phenolic content and antioxidant activity of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae) extracts. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, n. 23, p. 248-254, 2010.

SIMÕES, Claudia M. O.; SCHENKEL, Eloir P., MELLO, João C. P. de, MENTZ, Lilian A., PETROVICK, Pedro R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: UFSC, 2004.

SINGLETON, Vernon L.; ORTHOFER, Rudolf; LAMUELA-RAVENTÓS, Rosa M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*. **Methods in enzymology**, v. 299, n.15, p. 152-178, 1999.

SOUSA, Cleyton M. M.; SILVA, Hilris R.; VIEIRA-JR, Gerardo M.; AYRES, Mariane C. C.; COSTA, Charllyton L. S. da; ARAÚJO, Delton S.; CAVALCANTE, Luis C. D.; BARROS, Elcio D. S.; ARAÚJO, Paulo B. M.; BRANDÃO, Marcela S.; CHAVES, Mariana H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

SOUSA, F. C.; MARTINS, J. J. A.; ROCHA, A. P. T.; GOMES, J. P.; PESSOA, T.; MARTINS, J. N. Predição de modelos sobre a cinética de secagem de folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n. 2, p. 195-200, 2015.

SOUSA, Raquel M. F.; LIRA, Camila S.; RODRIGUES, Amanda O.; MORAIS, Sérgio A. L.; QUEIROZ, Carla R. A. A.; CHANG, Roberto; AQUINO, Francisco J. T.; MUÑOZ, Rodrigo A. A.; OLIVEIRA, Alberto de. Antioxidant activity of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) leaves extracts using spectrophotometric and voltammetric assays *in vitro*. **Bioscience Journal**, v. 30, supplement 1, p. 448-457, 2014.

SOUZA, Lucécia F. **Aspectos fitotécnicos, bromatológicos e componentes bioativos de *Pereskia aculeata*, *Pereskia grandifolia* e *Anredera cordifolia***. 2014. 125 f. Tese (Doutorado em fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

SOUZA, Lucécia F.; CAPUTO, Lucia; BARROS, Ingrid B. I. de; FRATIANNI, Florinda; NAZZARO, Filomena; DE FEO, Vincenzo. *Pereskia aculeata* Muller (Cactaceae) Leaves: Chemical Composition and Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1487, 2016.

SUCUPIRA, Natália R.; SILVA, Aline B. da; PEREIRA, Gerlândia; COSTA, Juliana N. da. Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

TAKEITI, Cristina Y.; ANTONIO, Graziella C.; MOTTA, Eliana M. P.; COLLARES-QUEIROZ, Fernanda P.; PARK, Kil J. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 1, n. 60, p. 148-160, 2009.

TARAHOVSKY, Yury S.; KIM, Yuri A.; YAGOLNIK, Elena A.; MUZAFAROV, Eugeny N. Flavonoid-membrane interactions: Involvement of flavonoid-metal complexes in raft signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1838, p. 1235-1246, 2014.

TEDESCO, Marino J.; GIANELLO, Clesio; BISSANI, Carlos A.; BOHNEN, Humberto.; VOLKWEISS, Sérgio J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS, 1995.

TNSolution. **Bactericida vs. Bacteriostático**. 2015. Disponível em: <<http://tnsolution.com.br/2015/11/18/bactericida-vs-bacteriostatico/>>. Acesso em: 29 dez. 2016.

TOFANELLI, Mauro B. D.; RESENDE, Sueilo G. Sistemas de condução na produção de folhas de ora-pro-nobis. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 3, p. 466–469, 2011.

TURRA, Andersson F.; MARÇAL, Flaviano J. B.; BARETTA, Irinéia P.; TAKEMURA, Orlando S.; LAVERDE JR, Antonio. Avaliação das propriedades antioxidantes e susceptibilidade antimicrobiana de *Pereskia grandifolia* Haworth (Cactaceae). **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 11, n. 1, p. 9-14, 2007.

UBEDA, C.; HIDALGO, C.; TORIJA, M. J.; MAS, A.; TRONCOSO, A. M.; MORALES, M. L. Evaluation of antioxidant activity and total phenols index in persimmon vinegars produced by different processes. **LWT – Food Science and technology**, v. 44, p. 1591-1596, 2011.

VAISHNAV, Preeti; DEMAINE, Arnold L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 223 – 229, 2010.

VIANA, Mayara M. S. **Potencial nutricional, antioxidante e atividade biológica de hortaliças não convencionais**. 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de São João del Rei, Sete Lagoas, 2013.

VIEIRA, Luanne M.; SOUSA, Mariana S. B.; MANCINI-FILHO, Jorge; DE LIMA, Alessandro. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 888-897, 2011.

VIEIRA, Michel C.; LELIS, Roberto C. C.; RODRIGUES, Nayara D. Propriedades químicas de extratos tânicos da casca de *Pinus oocarpa* e avaliação de seu emprego como adesivo. **Cerne**, v. 20, n. 1, p. 47-54, 2014.

WOOTTON-BEARD, Peter C.; MORAN, Aisling; RYAN, Lisa. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. **Food Research International**, v. 44, n. 1, 217–224, 2011.

YUNES, Rosendo A; CECHINEL FILHO, Valdir. **Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 3 ed. Itajaí: Univali, 2012.