



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



SIMONE SILVA JACOBSEN

**FRACIONAMENTO BIOGUIADO E IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DE
COMPOSTOS FENÓLICOS ANTIOXIDANTES EM FOLHAS DE ORA-
PRO-NÓBIS (*Pereskia aculeata*)**

DISSERTAÇÃO

**Pato Branco
2023**

SIMONE SILVA JACOBSEN

**FRACIONAMENTO BIOGUIADO E IDENTIFICAÇÃO DE
COMPOSTOS FENÓLICOS ANTIOXIDANTES EM FOLHAS DE
*Pereskia aculeata***

**Bioguided fractionation and identification of antioxidant phenolic
compounds in *Pereskia aculeata* leaves**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Dra Tatiane Luiza Cadorin Oldoni.

**Pato Branco
2023**



Atribuição – Uso Não Comercial (CC BY-NC) - Permite que outros remixem, adaptem e criem obras derivadas sobre a obra licenciada, sendo vedado o uso com fins comerciais. As novas obras devem conter menção ao autor nos créditos e também não podem ser usadas com fins comerciais. Porém as obras derivadas não precisam ser licenciadas sob os mesmos termos desta licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Pato Branco**



SIMONE DA SILVA JACOBSEN

FRACIONAMENTO BIOQUIADO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS ANTIOXIDANTES EM FOLHAS DE PERESKIA ACULEATA

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos.

Data de aprovação: 30 de Agosto de 2023

Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Priscilla Siqueira Melo, Doutorado - Usp-Universidade de São Paulo

Dra. Sirlei Dias Teixeira, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 30/08/2023.

AGRADECIMENTOS

Ao concluirmos uma etapa, é necessário agradecer aqueles que estiveram ao nosso lado, pois, sem apoio, nada somos.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, presente na hora da angústia sem ele eu não teria força suficiente para desenvolver este trabalho.

A toda minha família, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

A UTFPR e ao PPGTP juntamente com o corpo docente por ter me proporcionado realizar este mestrado e com isso, me aprimorar profissionalmente.

Agradeço em especial a minha orientadora Profa. Dra Tatiane Luiza Cadorin Oldoni pelo aceite, pelo apoio, tolerância, paciência, orientação, amizade e pelas conversas que tivemos no decorrer do curso. Mas, acima de tudo, pela confiança que sempre me passou em suas palavras e atitudes, por compartilhar seus conhecimentos, pelo carinho, e por ter cumprido seu papel, como orientadora, professora e pessoa, de forma exemplar. Muito obrigada!

A Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira e a Josiane Ascari por participarem como membros da banca de qualificação desse trabalho, pelas valiosas colocações e contribuições que colaboraram grandemente para o aprimoramento do trabalho.

Pelas amizades criadas no decorrer do curso em especial a Edenes Loss, Anna Paula Simon, Suelen Santos, Fernanda Knob, Ana Paula Klein Hendges, enfim a todos os presentes na Central de análises e LAQUA que estiveram ao meu lado para momentos agradáveis de conversa, assim como, para o auxílio nas horas de dificuldades, pela ajuda prestada durante a trajetória, pelo incentivo e força.

A amizade e companheirismo foi ferramenta para tornar a conclusão desse trabalho mais prazerosa. Por isso, quero expressar agradecimentos a todos que estiveram ao meu lado continuamente me apoiando e incentivando em todos os momentos.

*“Educar verdadeiramente não é ensinar fatos novos ou enumerar fórmulas
prontas, mas sim preparar a mente para pensar”*

(Albert Einstein)

RESUMO

Pereskia aculeata Miller é uma espécie com características trepadeiras, pertencente à família Cactaceae. Essa planta, resistente à seca e adaptada ao clima quente, está amplamente distribuída nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, sendo conhecida no país como Ora-pro-nóbis. *P. aculeata* é extremamente valorizada do ponto de vista nutricional, contudo, ainda são poucos os estudos sobre sua constituição fitoquímica. Dentro desse contexto, esse estudo avaliou o potencial antioxidante das folhas de *P. aculeata*, além de identificar, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas, os possíveis compostos responsáveis pela bioatividade. Foi obtido extrato hidroalcolico das folhas de *P. aculeata* e, em seguida, fez-se o fracionamento desse extrato utilizando solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e butanol). O extrato e as frações foram avaliados pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e determinação do teor de compostos fenólicos totais. Além disso, realizou-se a identificação e quantificação das substâncias presentes nos mesmos por meio das técnicas cromatográficas UPLC-ESI-QTOF-MS/MS e CLAE-DAD, respectivamente. Essas análises indicaram que os extratos obtidos de solventes mais polares apresentaram os melhores resultados de atividade antioxidante. Sendo que as frações de acetona e butanol apresentaram os melhores resultados para DPPH (229,41 e 236,48 $\mu\text{mol g}^{-1}$, respectivamente) e FRAP (1343,17 e 1215,77 $\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$, respectivamente). Rutina e isoquercetina foram os compostos majoritários nas frações de butanol e acetona. Enquanto, ácido caféico e ácido ferúlico foram os compostos majoritários na fração de acetato de etila e diclorometano, respectivamente. Quercetina-3-O-xilosideo, Kaempferol-3-O-arabinosideo, trealose, feruloiltiramina, ácido (10*E*,15*E*)-9,12,13-trihidroxiocadeca-10,15-dienóico, ácido 9,12,13-trihidroxiocadec-10-enóico e ácido 16-hidroxi-9-oxocadeca-10,12,14-trienóico foram identificados por massas de alta resolução e reportados pela primeira vez nas amostras de *P. aculeata*. Sugere-se que a melhor atividade antioxidante encontrada no extrato hidroalcolico e nas frações de acetona e butanol de *P. aculeata*, se deve a presença de rutina e isoquercetina nessas amostras. Os bons resultados de ABTS, DPPH e FRAP obtidos com as frações de acetona e butanol, sugerem que essas amostras podem ser utilizadas para dar continuidade aos estudos das folhas de *P. aculeata*.

ABSTRACT

Pereskia aculeata Miller is a species with climbing characteristics, belonging to the Cactaceae family. This plant, resistant to drought and adapted to hot weather, is widely distributed in the South, Southeast, Midwest and Northeast regions of Brazil, being known in the country as Ora-pro-nobis. *P. aculeata* is extremely valuable from a nutritional point of view, however, there are still few studies on its phytochemical constitution. Within this context, this study evaluated the antioxidant potential of *P. aculeata* leaves, in addition to identifying, using high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry, the possible compounds responsible for the bioactivity. A hydroalcoholic extract of *P. aculeata* leaves was obtained, and then this extract was fractionated using solvents of different polarities (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, acetone and butanol). The extract and fractions were evaluated by ABTS, DPPH, FRAP methods and determination of total phenolic compounds. In addition, the substances present in them were identified and quantified using and HPLC-ESI-QTOF-MS/MS and HPLC-DAD, respectively. These analyzes showed that extracts obtained from more polar solvents showed the best results for antioxidant activity. The acetone and butanol fractions presented the best results for DPPH (229.41 and 236.48 $\mu\text{mol g}^{-1}$, respectively) and FRAP (1343.17 and 1215.77 $\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$, respectively). Rutin and isoquercetin were the major compounds in the butanol and acetone fractions. While, caffeic acid and ferulic acid were the major compounds in the ethyl acetate and dichloromethane fraction, respectively. Quercetin-3-O-xyloside, Kaempferol-3-O-arabinoside, trehalose, feruloyltyramine, (10*E*,15*E*)-9,12,13-trihydroxyoctadeca-10,15-dienoic acid, 9,12,13-trihydroxyoctadec-10-enoic acid and 16-hydroxy-9-oxooctadeca-10,12,14- trienoic acid were identified by high-resolution masses and reported for the first time in *P. aculeata* samples. It is suggested that the best antioxidant activity found in the hydroalcoholic extract and in the acetone and butanol fractions of *P. aculeata* is due to the presence of rutin and isoquercetin in these samples. The good ABTS, DPPH and FRAP results obtained with the acetone and butanol fractions suggest that these samples can be used to continue studies of *P. aculeata* leaves.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies reativas radicalares e não radicalares	28
Tabela 2 –Informações nutricionais <i>Pereskia aculeata</i>	36
Tabela 3 - Rendimento do Extrato hidroalcólico e Frações.....	43
Tabela 4 - Figuras de mérito dos padrões de compostos fenólicos separados por CLAE-DAD.	44
Tabela 5 - Teores dos compostos fenólicos identificados por CLAE-DAD no extrato hidroalcólico e frações das folhas de <i>P. aculeata</i>	46
Tabela 6 - Compostos identificados por HPLC-ESI-QTOF-MS/MS no extrato hidroalcólico e frações das folhas de <i>P. aculeata</i>	62
Tabela 7 - Capacidade Antioxidante do Extrato Hidroalcólico e Frações das folhas de <i>P. aculeata</i> . 68	
Tabela 8 – Atividade Antioxidante de folhas de <i>P. aculeata</i> relada na literatura	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pereskia aculeata (A) Flor, (B) Frutos e (C) Folhas	16
Figura 2 - Núcleo fundamental dos flavonoides	21
Figura 3 -Via metabólica da biossíntese de compostos fenólicos	21
Figura 4 - Estrutura fundamental de uma A) flavona e de uma B) isoflavona	22
Figura 5 - Estrutura fundamental de um A) flavonol e de uma B) flavanona	23
Figura 6 - Estrutura fundamental de um A) flavanol e de uma B) antocianina	23
Figura 7 - Esqueleto fundamental dos ácidos fenólicos.....	24
Figura 8 - Tanino A) Condensado e B) Hidrolisável.....	25
Figura 9 - Núcleo de um fenilpropanoide e estrutura fundamental de uma lignana	25
Figura 10 - Estrutura química da quercetina	26
Figura 11 – Reação de doação de elétrons de antioxidantes para neutralizar o radical DPPH	32
Figura 12 - Redução do complexo Fe ³⁺ /tripiridiltriazina (TPTZ).	32
Figura 13 -Neutralização do radical ABTS•+	33
Figura 14 - Fluxograma das etapas referentes as atividades desenvolvidas durante o estudo das folhas de Pereskia aculeata	35
Figura 15 - Esquema que representa o preparo da solução estoque e das diluições utilizadas nas análises antioxidantes	37
Figura 16 - - Preparação do extrato hidroalcolico das folhas de Pereskia aculeata: A) folhas trituradas; B) folhas + solvente extrator; C) extrato depois de liofilizado	42
Figura 17 - Filtrados resultantes dos cinco dias de extração com hexano	42
Figura 18 - Cromatograma dos padrões fenólicos – (1) Ácido Gálico, (2) Catequina, (3) Ácido Clorogênico, (4) Ácido Vanílico, (5) Ácido Cafeico, (6) Epicatequina, (7) Ácido Cumárico, (8) Ácido ferúlico, (9) Rutina, (10) Isoquercetina, (11) Ácido Isoclorogênico, (12) Astragalina, (13) Ácido Salicílico, (14) Miricetina, (15) Quercetina, (16) Ácido Cinâmico e (17) Canferol.....	45
Figura 19 - Cromatograma do EH - ácido gálico (1), ácido cafeico (5), ácido cumárico (7), ácido ferúlico (8), rutina (9), isoquercetina (10), quercetina (15) e ácido cinâmico (16).....	47
Figura 20 - Cromatograma da fração hexânica - ácido gálico (1), ácido cafeico (5), ácido cumárico (7), ácido ferúlico (8), rutina (9), isoquercetina (10), quercetina (15) e ácido cinâmico (16).....	48
Figura 21 - Cromatograma da fração em diclorometano - ácido gálico (1), ácido vanílico (4), ácido cafeico (5), ácido cumárico (7), ácido ferúlico (8), rutina (9), isoquercetina (10) e ácido cinâmico (16)	49
Figura 22 - Cromatograma da fração em acetato de etila - ácido gálico (1), ácido vanílico (4), ácido cafeico (5), ácido cumárico (7), ácido ferúlico (8), rutina (9), isoquercetina (10), quercetina (15) e ácido cinâmico (16).....	50
Figura 23 - Cromatograma da fração em acetona –ácido cafeico (5), ácido cumárico (7), ácido ferúlico (8), rutina (9), isoquercetina (10), quercetina (15) e ácido cinâmico (16).....	51
Figura 24 - Cromatograma da fração em butanol - ácido gálico (1), ácido cafeico (5), ácido cumárico (7), ácido ferúlico (8), rutina (9), isoquercetina (10) e quercetina (15).....	52
Figura 25 - Gráfico de scores dos dados obtidos por CLAE das folhas de P. aculeata	54

Figura 26 - Gráfico de loadings dos dados obtidos por CLAE das folhas de <i>P. aculeata</i>	55
Figura 27 - Proposta de fragmentação da rutina.....	56
Figura 28 - Proposta de Fragmentação do Ácido Caftárico	57
Figura 29 -Proposta de fragmentação ácido caféico, ácido cumárico e ácido ferúlico	58
Figura 30 - Proposta de fragmentação do Canferol-3-O-arabinosideo	60
Figura 31 - Proposta de fragmentação da feruloiltiramina	61
Figura 32 - Estrutura química da Rutina	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ABTS - 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
- CLAE - Cromatografia Líquida de alta eficiência
- DAD - detector de arranjo de fotodiodos (do inglês: Diode Array Detector)
- TCF – Teor de Fenólico Totais
- DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- EAG Equivalente de Ácido Gálico
- EAT Equivalente de Ácido Tânico
- EAA Equivalente de Ácido Ascórbico
- EH – Extrato Hidroalcolico
- ESI - Electrospray ionization
- Fr-Ace - Fração em acetona
- Fr-AcOEt – Fração em Acetato de Etila
- Fr-But – Fração em Butanol
- Fr-DCM – Fração em Diclorometano
- Fr-Hex – Fração em hexano
- FRAP - poder de redução do ferro (do inglês: Ferric Reducing Antioxidant Power)
- HPLC - High performance liquid chromatography
- LD – Limite de Detecção
- LQ- Limite de Quantificação
- m/z - Relação massa/carga
- MS – Mass Spectrometer
- PANC – Planta Alimentícia não Convencional
- QTOF - Quadrupole Time-of-Flight
- Tr - Tempo de Retenção
- UV - Região de comprimento de onda no ultravioleta
- λ_{\max} - Comprimento de onda máximo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 PLANTAS MEDICINAIS	15
3.1.1 <i>Pereskia aculeata</i>	15
3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	19
3.2.1 Compostos fenólicos	20
3.3 ANTIOXIDANTES	27
3.4 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	29
3.4.1 Determinação do teor de fenólicos totais	30
3.4.2 Capacidade de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH•)	31
3.4.3. Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)	32
3.4.4 Capacidade de sequestro do radical ABTS	32
3.5 ESTUDOS BIOGUIADOS	33
4 METODOLOGIA	35
4.1 MATERIAL VEGETAL	36
4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	36
4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	37
4.3.1 Preparo da solução estoque e diluições	37
4.3.2 Capacidade de sequestro do radical ABTS	38
4.3.3 Capacidade de sequestro do radical DPPH	38
4.3.4 Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)	39
4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	39
4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM ARRANJO DE DIODOS E FLUORESCÊNCIA (CLAE-DAD-FL)	40
4.6 HPLC-ESI-QTOF-MS/MS	40
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 RENDIMENTOS DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO E FRAÇÕES	43
5.2 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO E FRAÇÕES POR CLAE-DAD	44
5.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO E FRAÇÕES POR HPLC-ESI-QTOF-MS/MS	56
5.4 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO E FRAÇÕES	68
6 CONCLUSÃO	75
7 REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

Devido a capacidade de sintetizar metabólitos secundários, as plantas são utilizadas pelo homem desde a antiguidade para diversos fins, como tratamento de doenças e na agricultura, como bioherbicidas (RODRIGUES; SOUZA FILHO; FERREIRA, 2009; PEREIRA, 2012).

Dentre as principais classes de metabólitos secundários pode-se destacar a dos compostos fenólicos. Esses compostos se caracterizam por desempenhar diferentes funções na planta, como proteção contra estresse biótico e abiótico (ALBUQUERQUE et al., 2021).

Os flavonoides são os compostos fenólicos mais abundantes e dependendo do nível de oxidação e saturação do anel C, eles podem ser classificados em: flavonas, isoflavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis e antocianinas. Os ácidos fenólicos, por sua vez, fazem parte do grupo dos não flavonoides e contêm anel fenólico e uma função de ácido carboxílico (DE LA ROSA et al., 2019).

Ácidos fenólicos e flavonoides apresentam uma boa atividade antioxidante, pois podem doar um átomo de hidrogênio e/ou um elétron aos radicais livres, causando a quebra da reação em cadeia de oxidação, ou seja, podem evitar e/ou retardar o estresse oxidativo (DURAZZO et al., 2019).

O estresse oxidativo pode ser responsável pela geração de radicais livres que atacam as células, levando à doenças graves, como câncer, doenças cardiovasculares, aterosclerose, distúrbios neurológicos, hipertensão e *diabetes mellitus* (YASHIN et al., 2017).

Pode-se dizer que as principais fontes de antioxidantes naturais são principalmente os compostos fenólicos vegetais que podem ocorrer em todas as partes das plantas (GULCIN, 2020). Contudo, a análise dessas substâncias bioativas costuma ser complexa e demorada, devido à baixa quantidade de compostos que são produzidos pelas plantas. Uma alternativa para contornar esse problema é a realização de testes bioguiados, que podem fornecer aos pesquisadores informações relevantes sobre a potencialidade do material em estudo (HOCHHEIM et al., 2020).

Um estudo de fracionamento/isolamento bioguiado busca, por meio da purificação do extrato bruto, utilizando técnicas cromatográficas e análises que determinem a atividade biológica de interesse, descobrir em quais frações/subfrações

a atividade está concentrada e, finalmente, isolar e caracterizar os constituintes químicos responsáveis pelo potencial. Adicionalmente, os componentes químicos isolados podem ser considerados marcadores químicos da matriz estudada (DA CUNHA; ROQUE, 2010; HOCHHEIM et al., 2020).

Pereskia aculeata Miller, popularmente conhecida como ora-pro-nóbis, tem despertado o interesse dos pesquisadores pelo fato de que, desde a antiguidade, as Cactáceas são amplamente utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças (NETO et al., 2020). Sabe-se que uma estratégia na investigação de plantas medicinais, consiste em combinar informações baseadas nas alegações feitas pelas sociedades humanas, presentes ou passadas, de um dado efeito terapêutico com estudos químicos e farmacológicos. Esse ramo de estudo, conhecido como etnofarmacologia, pode ser um valioso atalho para a descoberta de fármacos (ELISABETSKY, 2003; LEÃO, CAMPELO, SILVA, 2021).

Além disso, as folhas e frutos dessa espécie, apresentam conteúdo mucilaginoso e baixa toxicidade, o que torna essa planta muito interessante para ser utilizada nas indústrias farmacêutica e alimentícia (SILVA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019).

É importante destacar que grande parte das atividades observadas para essa espécie, podem ser atribuídas à composição química de *P. aculeata*, com predomínio de compostos fenólicos, como derivados do ácido caféico, quercetina, caempferol e derivados do glicosídeo isorhamnetina (PINTO et al., 2016; SOUZA; ABREU, 2017; VARGAS, 2017). Apesar dessa espécie ser muito valorizada do ponto de vista nutricional e etnofarmacológico, as informações sobre sua constituição fitoquímica ainda são limitadas, assim como, os resultados obtidos para fracionamento bioguiado são, ainda, muito escassos.

Dentro desse contexto, é imprescindível a realização de estudos para determinar o perfil dos compostos bioativos presentes em *P. aculeata*, visando o melhor aproveitamento dessa espécie. Desta forma, o objetivo deste trabalho é determinar a composição química das folhas de *P. aculeata*, com a finalidade de identificar compostos que apresentam elevada atividade antioxidante por meio do fracionamento bioguiado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir, a partir do fracionamento bioguiado do extrato hidroalcoólico das folhas de *Pereskia aculeata*, extratos com elevada atividade antioxidante e identificar, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas, os compostos responsáveis pela bioatividade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fracionar o extrato hidroalcoólico de *P. aculeata* usando solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e butanol);
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do extrato e das frações pelos métodos: capacidade de sequestro do radical ABTS, capacidade de sequestro do radical DPPH, poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) e determinação do teor de compostos fenólicos totais;
- Identificar e quantificar os compostos fenólicos das frações preparadas a partir das folhas de *P. aculeata* por meio da HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS e CLAE-DAD.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais vêm sendo usadas pela população para fins medicinais há mais de 4000 anos. Elas são usadas como alternativa terapêutica no tratamento de inúmeras doenças, contudo, a busca pelos constituintes ativos presentes nas plantas medicinais só teve início no século XIX. Dentre os exemplos importantes de constituintes ativos isolados de plantas podemos destacar a morfina, a codeína, a atropina e a cafeína (DUTRA et al., 2016).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo, compreendendo mais de 46.000 espécies vegetais e 116.000 espécies animais, correspondendo a mais de 20% do total de espécies do mundo. Essa rica biodiversidade é fonte de recursos para o país (MMA, 2020).

A busca por novos agentes terapêuticos de maior eficiência e menores efeitos colaterais intensificou as pesquisas com plantas medicinais. Essas espécies estão envolvidas em uma série de tratamentos para várias doenças humanas, apresentando vantagens como baixo custo, acessibilidade e, geralmente, menos efeitos colaterais (RIBEIRO et al., 2018). Estima-se que cerca de 30% dos medicamentos terapêuticos disponíveis sejam derivados de fontes naturais (DUTRA et al., 2016).

3.1.1 *Pereskia aculeata*

Pereskia aculeata Miller (Figura 1), popularmente conhecida como ora-pro-nóbis, que no latim significa “rogai por nós”, é uma espécie com características trepadeiras, pertencente à família Cactaceae. Essa família compreende 129 gêneros e 1450 espécies. São reconhecidos 39 gêneros e 260 espécies no território brasileiro, dos quais 14 gêneros e 187 espécies são endêmicas, com grande percentagem de espécies ameaçadas de extinção (ZAPPI et al, 2015).

Figura 1 - *Pereskia aculeata* (A) Flor, (B) Frutos e (C) Folhas



Fonte: Madeira et al. (2018)

O gênero *Pereskia* é composto por 17 espécies, sendo que, no Brasil são reconhecidas 7 espécies, dentre as quais *P. aculeata* e *P. grandifolia* são as comumente encontradas (ZAPPI et al, 2015; MACIEL et al., 2019). As espécies desse gênero, possuem folhas suculentas bem desenvolvidas, caules finos lenhosos e relativamente não suculentos, com poucos espinhos, flores solitárias dispostas em picos terminais e hábitos arbóreos ou arbustivos (OGBURN; EDWARDS, 2009); ZAPPI et al, 2015).

P. aculeata é originária da América tropical e destaca-se por ser uma planta rústica, ou seja, resistente à seca e adaptada ao clima quente (DE ALMEIDA; CORRÊA, 2012), além disso, é uma espécie de fácil propagação (TOFANELLI; RESENDE, 2011). No Brasil, ela está amplamente distribuída nas regiões Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo), Centro-Oeste (Goiás) e Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Sergipe) (ZAPPI et al, 2015).

No Brasil, essa planta também é conhecida como Lobolôbô, Espinho-de-Santo-Antônio, Surucucú, Cipó-Santo, Azedinha e Espinho-Preto (ZAPPI et al, 2015).

3.1.1.1 Características químicas e biológicas de *Pereskia aculeata*

Pereskia aculeata é considerada uma planta alimentícia não convencional (PANC), suas folhas são amplamente utilizadas para o consumo humano pois são ricas em proteínas (TAKEITI et al., 2009; ALMEIDA et al., 2014; TURANI; BRITES, 2018). Esse elevado conteúdo proteico lhe rendeu a denominação de “carne dos pobres” em muitas comunidades pobres brasileiras.

As folhas de *P. aculeata* podem ser utilizadas na preparação de saladas, sopas, omeletes e tortas, e a farinha de folhas pode servir como elemento enriquecedor na formulação de pães, bolos e massas. Além disso, sua mucilagem pode substituir ovos em preparações alimentícias. Os frutos de *P. aculeata* podem ser aplicados na fabricação de sucos, geleias, mousses e licores; enquanto suas sementes podem ser germinadas para produzir brotos comestíveis. Tendo em vista a vasta aplicação culinária e as interessantes propriedades nutricionais dessa espécie, ela pode ser considerada um superalimento. Na cidade de Diamantina (MG), por exemplo, quase 80% da população consome regularmente esse nutritivo vegetal (GARCIA et al., 2019).

Essa planta também apresenta altos teores de lipídios, além de apresentar quantidades significativas de ferro, cálcio e aminoácidos essenciais como lisina, leucina e valina (TAKEITI et al., 2009; ALMEIDA et al., 2014; TURANI; BRITES, 2018). As folhas e frutos dessa espécie apresentam baixa toxicidade e conteúdo mucilaginoso, o que permite a sua utilização na indústria farmacêutica e alimentícia (SILVA et al., 2017; MARTIN et al., 2017; SILVA et al., 2017; SILVA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019).

Estudos relatam que a incorporação da farinha de ora-pro-nóbis em diferentes produtos industriais, pode ser uma maneira eficaz de incentivar o consumo de produtos mais saudáveis. Uma vez que, essa farinha pode trazer benefícios à saúde, destacando a melhora da motilidade intestinal, a redução da gordura visceral e do perfil lipídico e o aumento dos níveis de HDL-c (BARBALHO et al., 2016).

O interesse pelo estudo envolvendo esta espécie baseou-se no fato de que, desde a antiguidade, as cactáceas são amplamente utilizadas na medicina tradicional para o alívio de queimaduras, cicatrização de úlceras, entre outras patologias (NETO et al., 2020).

Estudos mostram que a fração hexânica de extrato metanólico de *P. aculeata* apresentou resultados promissores para atividades anti-inflamatórias aguda e crônica, contra diferentes agentes irritantes, sem apresentar sinais clínicos de toxicidade (PINTO et al., 2015). Sendo que, a fração hexânica, inclusive, apresentou potencial mais relevante para ser utilizada no tratamento de feridas cutâneas do que a fração metanólica (PINTO et al., 2016).

Extratos de folhas obtidos com éter de petróleo (VARGAS, 2017) e clorofórmio (SOUZA et al., (2016), apresentaram potencial de inibição de crescimento microbiano sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*. Por outro lado, o extrato hidroalcoólico foi muito potente frente ao microrganismo *Klebsiella pneumoniae* (MIC = 5 mg mL⁻¹), sendo, inclusive mais potente que o antibiótico ampicilina (MIC = 10 mg mL⁻¹) (GARCIA et al., 2019).

Além disso, extratos de diferentes polaridades obtidos de folhas de *P. aculeata*, apresentaram efeito citotóxico e antioxidante (PINTO et al., 2012; SOUZA et al., 2016). Grande parte dessas atividades mencionadas anteriormente, podem ser atribuídas à vasta composição química de *P. aculeata*, com predomínio de compostos fenólicos, taninos, alcaloides e flavonoides (PINTO et al., 2016; SOUZA; ABREU, 2017; VARGAS, 2017).

Garcia et al. (2019), sugerem que a atividade antimicrobiana exibida pelo extrato de *P. aculeata*, contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, se deve à presença de um amplo espectro de fitoquímicos, com atividade antibiótica.

Vargas (2017), observou a presença de compostos fenólicos nos extratos de éter de petróleo, diclorometano e metanol, sendo que, a quantidade desses compostos foi muito maior nos extratos de alta polaridade. Além disso, destaca-se que as folhas coletadas no verão apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos quando comparada com o inverno. Enquanto, no inverno observa-se a maior concentração de taninos condensados.

Pinto et al. (2015), identificaram isômeros de triptamina, abrina, mescalina, hordenina, petunidina, di-*terc*-butilfenol e quercetina, em extratos hidroalcoólicos de folhas de *P. aculeata*, por UPLC-MS/MS e confirmaram o potencial analgésico da espécie.

Em outro estudo, foram identificados dez compostos fenólicos, no extrato hidroetanólico obtidos das folhas de *P. aculeata*, sendo dois ácidos fenólicos (derivados do ácido caféico) e oito flavonoides (quercetina, caempferol e derivados do

glicosídeo isorhamnetina). O ácido caftárico foi o principal constituinte fenólico do extrato, respondendo por mais de 49% do conteúdo fenólico, seguido pela quercetina-3-O-rutinosídeo (14,99%) e isorhamnetina-O-pentosídeo-O-rutinósido (9,56%) (GARCIA et al., 2019).

Agostini-Costa et al. estudaram o perfil de carotenoides das folhas (2014) e frutos (2012) de *P. aculeata* e identificaram luteína, β -caroteno e α -caroteno entre os compostos majoritários. Segundo os autores, os conteúdos de α e β -caroteno indicaram que as folhas e frutos de *Pereskia* podem ser boas fontes de pró-vitamina A e antioxidantes.

Dentro desse contexto, é imprescindível a realização de mais estudos para investigar o perfil completo dos compostos bioativos, presentes em *P. aculeata*, visando o melhor aproveitamento dessa espécie, seja na alimentação ou como planta funcional/medicinal. Novos estudos esclarecendo as reais propriedades e estimulando o uso adequado dessa espécie na alimentação e saúde, também podem trazer benefícios adicionais para a conservação da biodiversidade (AGOSTINI-COSTA, 2020).

3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Diferente dos animais, as plantas não podem fugir de predadores, ou mesmo, ir em busca de alimento para sobreviver. Em vez disso, elas desenvolveram uma espécie de comunicação química para garantir sua sobrevivência. Ou seja, as plantas são capazes de sintetizar metabólitos que apresentam uma grande diversidade estrutural e de grupos funcionais (TISSIER et al., 2015).

Os metabólitos produzidos pelas plantas podem ser divididos em dois grandes grupos, primários e secundários (especializados). Os metabólitos primários estão presentes em todos os organismos vivos e são essenciais à vida, já os metabólitos secundários, são específicos de cada espécie ou gênero e participam das interações que ocorrem no próprio organismo da planta ou com células de outros organismos (LARCHER, 2000; FILHO, 2010).

Essa segunda classe de compostos, se destaca por apresentar diversas aplicações em muitas áreas, como na indústria farmacêutica, de alimentos e na agricultura (VAISHNAV; DEMAINE, 2011). Uma das aplicações mais antigas dos

metabólitos secundários é para o tratamento de doenças, pois os remédios eram preparados a partir de ervas e folhas (PAVARINI et al., 2012).

O tipo e a quantidade de metabólitos secundários produzidos por uma planta variam dependendo da espécie, assim como são afetados por fatores bióticos e abióticos (TUNGMUNNITHUM et al., 2018). Dentre as principais classes de metabólitos secundários pode-se destacar a dos compostos fenólicos.

3.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos representam o segundo grupo mais abundante de compostos orgânicos no reino vegetal. Eles desempenham diferentes funções na planta, como suporte estrutural e proteção contra radiação solar ultravioleta (UV), proteção contra estresse biótico e abiótico, pigmentação entre outras (ALBUQUERQUE et al., 2021).

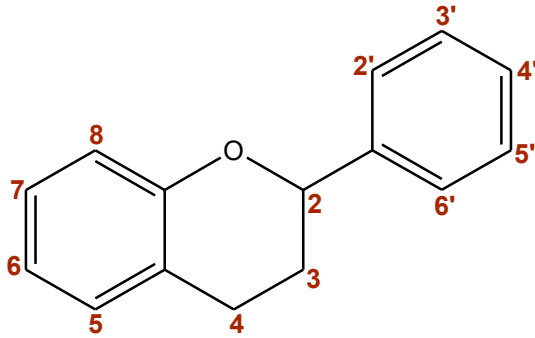
Quando inseridos na dieta humana, os compostos fenólicos fornecem proteção contra doenças crônicas não transmissíveis, principalmente devido a sua atividade antioxidante (DE LA ROSA et al., 2019). Conseqüentemente, observa-se um grande interesse em plantas comestíveis que contenham antioxidantes (SABIR; et al., 2017).

Os compostos fenólicos se caracterizam por conter pelo menos um anel aromático com um grupo hidroxila em sua estrutura. Eles apresentam uma grande variabilidade estrutural e, podem ser classificados em dois grupos principais: flavonoides e não flavonoides.

Os flavonoides são os compostos fenólicos mais abundantes, com cerca de 8000 compostos. O esqueleto dos flavonoides é composto por dois anéis fenila (A e B) unidos por um anel pirano heterocíclico (anel C). Ou seja, possuem uma estrutura marcada pela presença de um esqueleto com 15 átomos de carbono na forma C6-C3-C6 (núcleo flavan) (ALBUQUERQUE et al., 2021).

Várias classes de flavonoides diferem no nível de oxidação e saturação do anel C, enquanto os compostos individuais dentro de uma classe, diferem no padrão de substituição dos anéis A e B. As diferenças na estrutura e substituição irão influenciar a estabilidade do radical fenoxil e, portanto, as propriedades antioxidantes dos flavonoides (SIMÕES et al., 2014). O esqueleto básico e a numeração dos átomos de carbono nos flavonoides são mostrados na Figura 2.

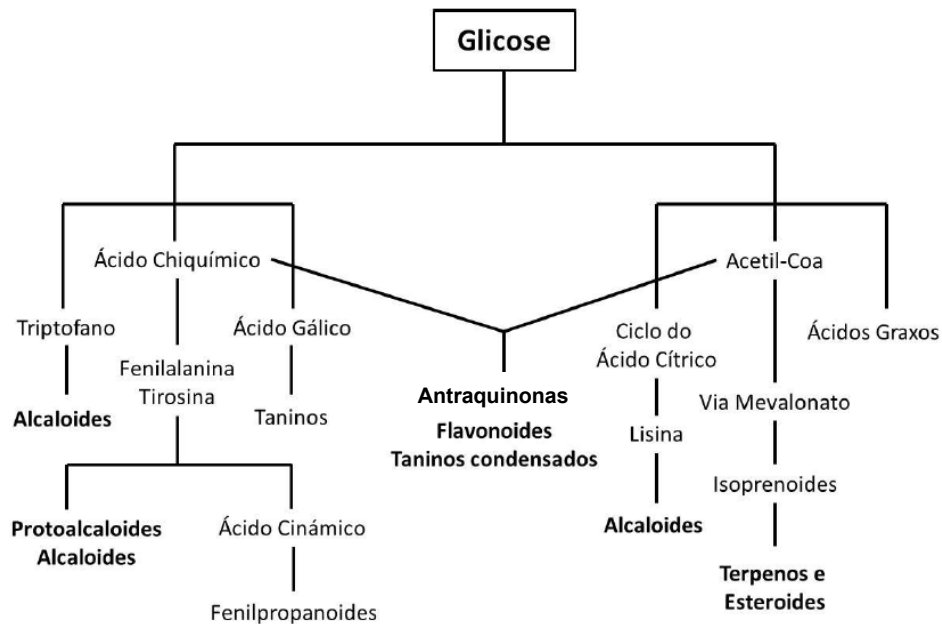
Figura 2 - Núcleo fundamental dos flavonoides



Fonte: Autoria própria

Os flavonoides são sintetizados principalmente a partir da combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados (Figura 3) (OOTANI et al., 2013).

Figura 3 -Via metabólica da biossíntese de compostos fenólicos



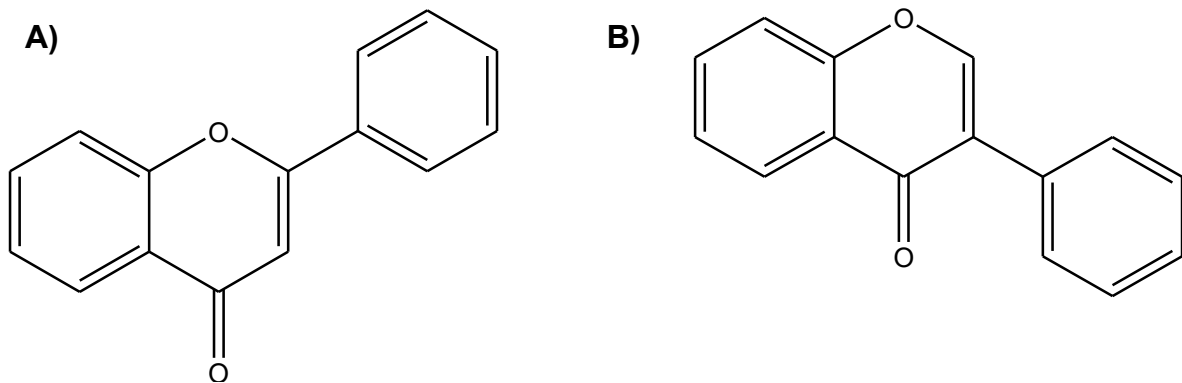
Fonte: Hendges, 2015

As flavonas são a estrutura mais básica dos flavonoides. Elas contêm um grupo carbonila em C4, uma ligação dupla entre C2 e C3 e um anel B está ligado a C2 (Figura 4A), luteolina e apigenina são as flavonas mais abundantes; a presença

de grupos hidroxila livres em seus anéis A e B é responsável por sua atividade antioxidante (DE LA ROSA et al., 2019; ALBUQUERQUE et al., 2021).

As isoflavonas são flavonas nas quais o anel B está ligado ao C3 em vez de C2 (Figura 4B). Mais de 2.000 isoflavonoides já foram identificados, sendo as isoflavonas as mais conhecidas (DURAZZO et al.; 2019; DE LA ROSA et al., 2019; ALBUQUERQUE et al., 2021).

Figura 4 - Estrutura fundamental de uma A) flavona e de uma B) isoflavona

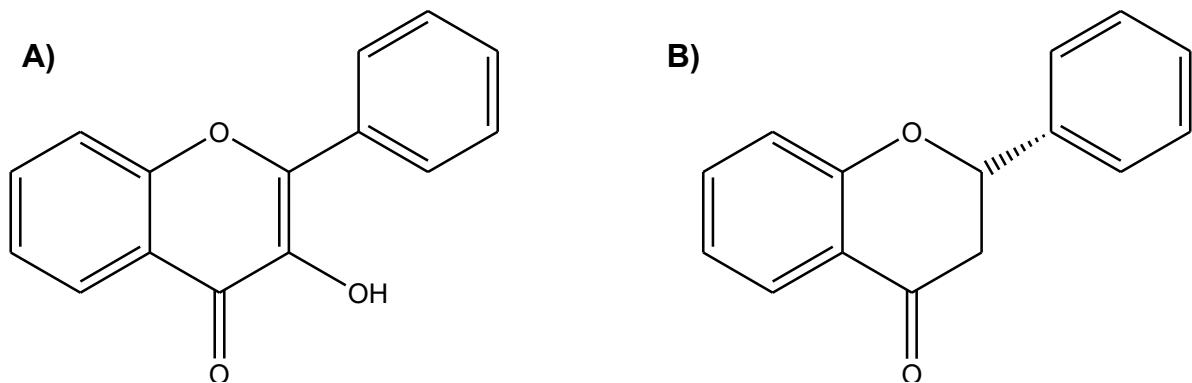


Fonte: Autoria própria

Os flavonóis são flavonas hidroxiladas em C3 (Figura 5A). Devido ao seu padrão de hidroxilação, eles apresentam boa atividade antioxidante. A hidroxila em C3 aumenta a estabilidade do radical flavonoide formado, uma vez que o composto tenha atuado como um eliminador de radicais. Dentre os principais flavonóis, podemos destacar o caempferol, a quercetina e a miricetina (DURAZZO et al., 2019; DE LA ROSA et al., 2019; ALBUQUERQUE et al., 2021).

Em flavanonas (Figura 5B) e diidroflavonóis (ou flavanonóis), o anel C não apresenta ligação dupla entre C2 e C3, eles também possuem o grupo carbonila em C4 e os diidroflavonóis contêm OH em C3. Dentre as flavanonas, podemos destacar a naringenina e a hesperidina (DURAZZO et al., 2019; DE LA ROSA et al., 2019; ALBUQUERQUE et al., 2021).

Figura 5 - Estrutura fundamental de um A) flavonol e de uma B) flavanona

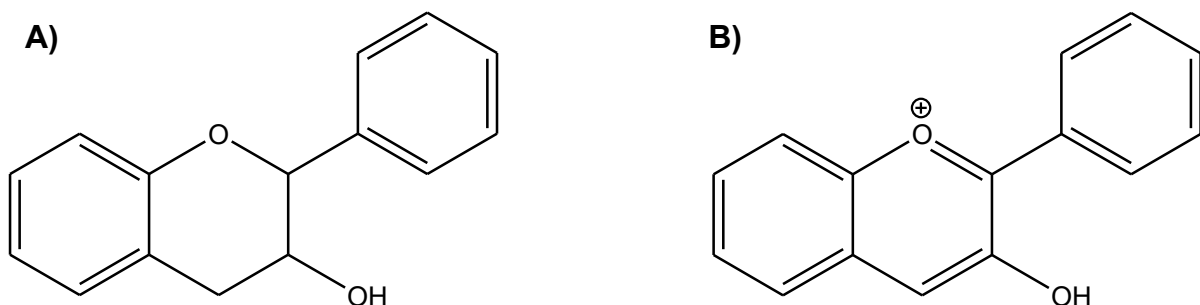


Fonte: Autoria própria

Flavanóis ou flavan-3-ols não possuem a ligação dupla entre C2 e C3 e o grupo carbonila em C4, e contêm uma hidroxila em C3 (Figura 6A). São o maior subgrupo de flavonoides, sendo que os principais compostos dessa classe são catequina e epicatequina (DURAZZO et al., 2019; DE LA ROSA et al., 2019; ALBUQUERQUE et al., 2021).

As antocianinas são derivadas de flavanóis que possuem um grupo hidroxila em C3 (Figura 6B). Além disso, elas têm duas ligações duplas (uma entre o átomo de oxigênio e carbono e a outra entre o carbono 3 e 4), e há falta de oxigênio cetônico na posição 4. Portanto, sua estrutura é basicamente descrita como sendo um íon flavílio. Na natureza existem 17 antocianidinas naturais, sendo a cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina, pelargonidina e malvidina as espécies mais comuns. As antocianinas são responsáveis pela cor de várias frutas, vegetais e flores (DURAZZO et al., 2019; DE LA ROSA et al., 2019; ALBUQUERQUE et al., 2021).

Figura 6 - Estrutura fundamental de um A) flavanol e de uma B) antocianina

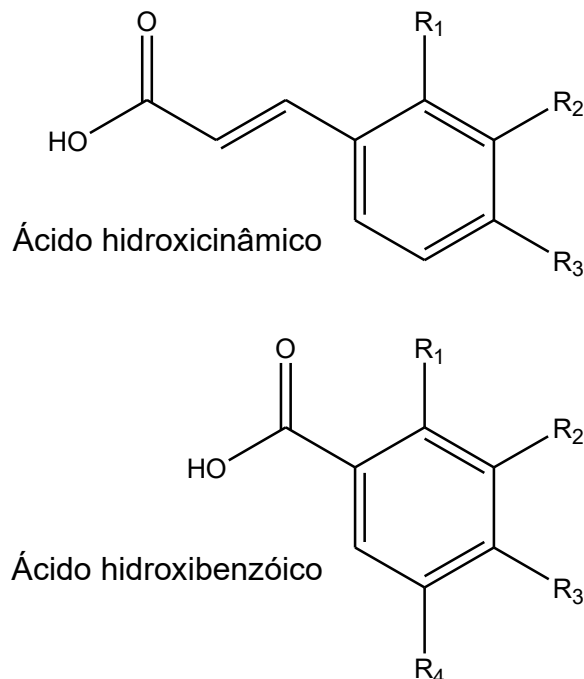


Fonte: Autoria própria

Dentre os compostos que fazem parte do grupo dos não flavonoides estão os ácidos fenólicos, que contêm anel fenólico e uma função de ácido carboxílico. Os ácidos fenólicos podem ser divididos, de acordo com o esqueleto carbônico, em ácidos hidroxibenzoicos, C6-C1 (que são derivados do ácido benzoico), ácidos hidroxicinâmicos, C6-C3 (que são derivados do ácido cinâmico) e outros ácidos hidroxifenílicos (acético, propanoico e pentaenoico), diferindo entre eles no comprimento da cadeia que contém o grupo carboxílico (Figura 7) (DURAZZO et al., 2019).

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e seus derivados, depende do número e da posição dos grupos hidroxila, ligados ao anel aromático e da presença de substituintes. Por exemplo, devido à conjugação das ligações duplas do anel com $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$, que aumenta a capacidade de estabilizar os radicais livres, os ácidos hidroxicinâmicos, são antioxidantes mais eficazes do que os ácidos hidroxibenzoicos (GULCIN, 2020).

Figura 7- Esqueleto fundamental dos ácidos fenólicos

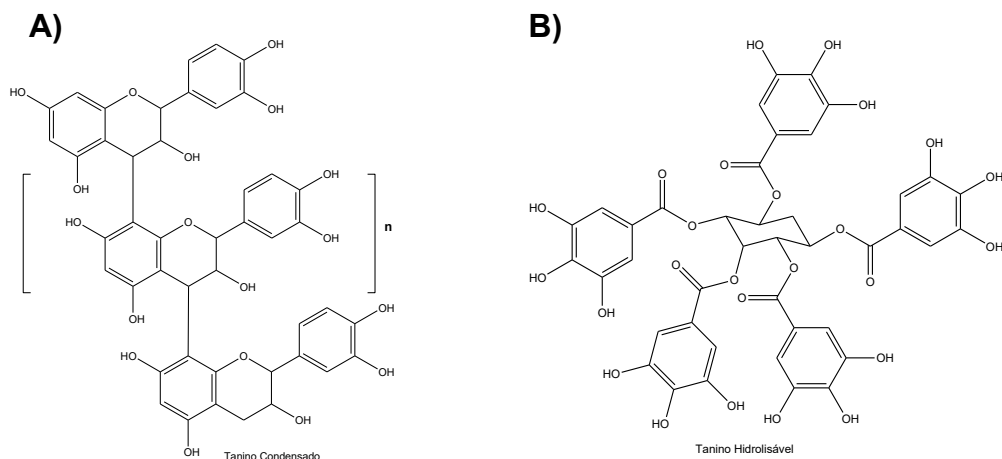


Fonte: Autoria própria

Os taninos, são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico conhecidos por conferir sabor adstringente e amargo a algumas frutas e

podem ser divididos em duas subclasses: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (Figura 8). Os taninos condensados são formados pela condensação de duas ou três unidades de flavan-3-ol. Já os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central cujas funções hidroxila são esterificadas com ácido gálico, por exemplo (SIMÕES, 2014; SEKOWSKI et al., 2014).

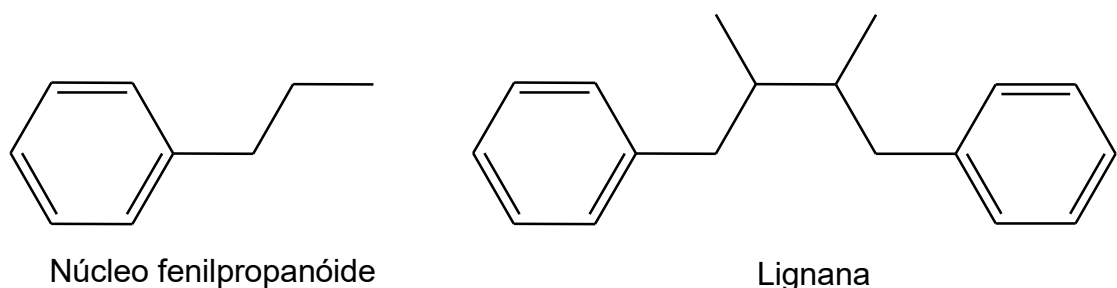
Figura 8 - Tanino A) Condensado e B) Hidrolisável



Fonte: Autoria própria

Outra classe de compostos fenólicos muito importante, são as lignanas (Figura 9), que exibem diferentes estruturas químicas, no entanto, a estrutura básica é composta pela combinação de dímeros fenilpropanoides (C6-C3), ligados pelos carbonos centrais das cadeias laterais (ALBUQUERQUE et al., 2021).

Figura 9 - Núcleo de um fenilpropanoide e estrutura fundamental de uma lignana



Fonte: Autoria própria

Os compostos fenólicos são considerados antioxidantes devido à doação de um átomo de hidrogênio e/ou um elétron aos radicais livres, causando a quebra da

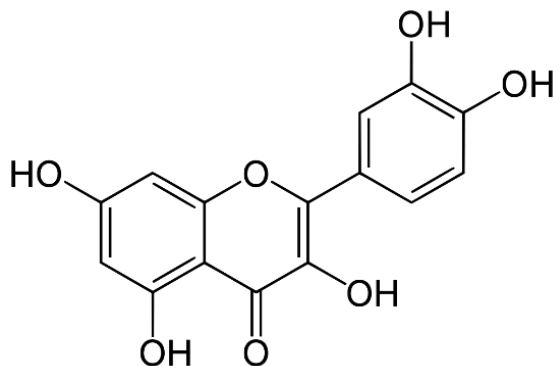
reação em cadeia de oxidação. Nos organismos, um processo oxidativo pode ser responsável pela geração de radicais livres que atacam as células, levando a doenças graves, como câncer, doenças cardiovasculares, aterosclerose, distúrbios neurológicos, hipertensão e *Diabetes mellitus*, devido ao estresse oxidativo (ALBUQUERQUE et al., 2021).

A presença da ligação dupla C2-C3, conjugada com um grupo carbonila em C4, é conhecida por ser responsável pela deslocalização de elétrons do anel B, aumentando a atividade de eliminação de radicais (WOJDYŁO et al., 2007).

Wojdyło e colaboradores (2007) analisaram 32 extratos de plantas de 21 famílias botânicas e identificaram dentre os principais ácidos fenólicos, o ácido caféico, *p*-cumárico, ferúlico e neoclorogênico. Entre os flavonoides predominantes nas plantas analisadas destacam-se a quercetina, luteolina e apigenina. Em algumas plantas estudadas, foi observada uma correlação positiva e significativa entre a atividade antioxidante e os fenólicos totais, medidos por análise de HPLC, revelando que os compostos fenólicos eram os componentes antioxidantes dominantes.

A quercetina tem uma estrutura catecol no anel B, bem como, ligação dupla entre C2-C3, em conjunto com um grupo carbonila em C4, no anel C (Figura 10), permitindo a estabilização do radical fenoxi por deslocalização de elétron. A presença combinada de um grupo 3-hidroxi com uma ligação dupla C2-C3, aumenta adicionalmente a estabilização de ressonância para a deslocalização de elétrons; portanto, tem maior potencial antioxidante (TIAN et al., 2021; WOJDYŁO et al., 2007).

Figura 10 - Estrutura química da quercetina



Fonte: Autoria própria

Na indústria alimentícia, os compostos fenólicos têm sido utilizados como conservantes devido às suas atividades antioxidante e antimicrobiana (SORDINI et al., 2019). Eles também têm sido usados em alimentos processados, para melhorar suas propriedades funcionais e fornecer benefícios à saúde do consumidor (PASRIJA et al., 2015).

Na indústria de cosméticos, os compostos fenólicos têm sido utilizados para absorver a radiação ultravioleta. Isso é possível pois esses compostos possuem cromóforos em suas estruturas evitando a penetração da radiação solar na pele. A proteção UV foi descrita para alguns compostos fenólicos, como a quercetina, o resveratrol e os ácidos hidroxicinâmicos, que apresentavam fator de proteção solar (FPS) variando de 7 a 30 (CHERUBIM et al., 2019).

Alguns compostos fenólicos também têm sido usados, para elaborar formulações de embalagens com propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Os ácidos gálico e caféico, têm sido utilizados em biofilmes à base de quitosana para inibir o crescimento de *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (WANG et al., 2019).

3.3 ANTIOXIDANTES

Antioxidante é uma substância que inibe a oxidação do substrato, quando presente em baixa concentração em comparação com a de um substrato oxidável no meio (HALLIWELL; GUTTERIDGE 2007).

São substâncias que, quando presentes nos alimentos ou no corpo em concentrações muito baixas, atrasam, controlam ou previnem os processos oxidativos que levam à deterioração da qualidade dos alimentos ou ao início e propagação de doenças degenerativas no corpo (GULCIN, 2020).

Eles podem ser classificados de acordo com o mecanismo de ação, em antioxidantes primários e secundários. Antioxidantes primários, agem como doadores de hidrogênio ou aceitadores de radicais livres, inibindo a reação em cadeia da oxidação. Já os antioxidantes secundários, previnem ou retardam a oxidação, suprimindo os promotores da oxidação, incluindo íons metálicos, oxigênio singlete, enzimas pró-oxidativas e outros oxidantes. Alguns antioxidantes secundários promovem a decomposição de hidroperóxidos em espécies não radicais ou absorvem a radiação UV (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Os antioxidantes podem ser sintetizados em laboratório ou ocorrer naturalmente em plantas, animais e microrganismos. Os antioxidantes de ocorrência natural podem ser isolados de seu material de origem como compostos puros ou podem ser utilizados na forma de extratos brutos, para possível uso em aplicações nutracêuticas/farmacêuticas (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Os antioxidantes sintéticos caíram um pouco em descrédito, pois são suspeitos de serem uma das principais causas de carcinogênese. Com isso, a busca por antioxidantes naturais aumentou significativamente e, muitos desses compostos têm sido empregados em produtos médicos e farmacêuticos, como compostos substitutos dos antioxidantes artificiais (TUNG MUNNITHUM et al., 2018).

Espécies reativas têm função biológica importante, contudo, quando sua produção se dá em excesso, pode ocorrer um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a capacidade do sistema biológico de desintoxicar os intermediários reativos ou de reparar o dano resultante, e isso dá origem ao que chamamos de estresse oxidativo (GRANATO et al., 2018).

O estresse oxidativo é uma consequência inevitável da vida em uma atmosfera rica em oxigênio, ele é resultado de um desequilíbrio entre as espécies reativas e as defesas antioxidantes. As espécies reativas são capazes de dar origem à reações em cadeia, ou seja, reações que envolvem uma série de etapas, cada uma das quais, forma um radical livre que desencadeia a próxima etapa (PERRONE et al., 2012). Existem três fases: iniciação, propagação e terminação, e existem diferentes espécies de radicais livres.

Os radicais livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons desemparelhados, que são altamente instáveis e ativos em reações químicas com outras moléculas. Eles derivam de três elementos: oxigênio, nitrogênio e enxofre (Tabela 1) (GULCIN, 2020).

Tabela 1 - Espécies reativas radicalares e não radicalares

Espécies reativas de oxigênio		Espécies reativas de oxigênio – não radicalares	
Radical hidroxila	OH•	Peróxido de hidrogênio	H ₂ O ₂
Radical superóxido	O ₂ •-	Oxigênio singleto	¹ O ₂
Radical peroxil	ROO•	Ozônio	O ₃
Radical de dióxido de nitrogênio	NO ₂ •	Hipoclorito	HOCl
Radical de óxido nítrico	NO•	Ácido nitroso	HNO ₂

Radical tiol

RS•

Cloreto de nitrila

NO₂Cl

 Fonte: Adaptado de Gulcin, 2020

Qualquer que seja a fonte de radicais livres, eles são realmente perigosos devido aos seus efeitos tóxicos, capazes de danificar todos os componentes da célula, incluindo proteínas, lipídios e DNA (VASCONCELOS et al., 2007; PERRONE et al., 2012).

A alta concentração de radicais livres nas células e tecidos pode ser induzida por vários fatores, como radiação gama, UV e de raios-X, estresse, alimentos poluídos, condições ambientais adversas, tabagismo, alcoolismo e dependência de drogas. O estresse oxidativo crônico pode levar a uma variedade de doenças, incluindo câncer, doenças cardíacas e a aceleração do envelhecimento (YASHIN et al., 2017).

As plantas produzem um vasto repertório de metabólitos secundários, no entanto, as principais fontes de antioxidantes naturais são principalmente os fenólicos vegetais que podem ocorrer em todas as partes das plantas, incluindo frutas, vegetais, sementes, nozes, folhas, raízes, farinhas e cascas (GULCIN, 2020).

Os antioxidantes naturais, como compostos fenólicos e flavonoides, podem evitar o estresse oxidativo. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redox, como adsorção e neutralização de radicais livres, extinção do oxigênio singlete e tripleto ou decomposição de peróxidos. Em geral, os flavonoides têm atividades antioxidantes mais altas contra os radicais peroxila do que os ácidos fenólicos devido a vários grupos hidroxila (YASHIN et al., 2017).

3.4 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Uma variedade de métodos tem sido usada para determinar a capacidade antioxidante de extratos (plantas). Os métodos relatados incluem compostos fenólicos totais, ensaio de ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS), método de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH•), poder redutor do ferro (FRAP), além de abordagens eletroquímicas, métodos voltamétricos e espectrofotométricos (YASHIN et al., 2017). Recentemente, uma abordagem rápida baseada na espectroscopia de infravermelho próximo foi desenvolvida para a

determinação do conteúdo total de polifenóis e da atividade antioxidante em uma erva chinesa (MA et al., 2016).

Os ensaios químicos para medição da atividade antioxidante são simples, rápidos e geralmente automatizados, e são amplamente utilizados na triagem inicial e avaliação de novos compostos antioxidantes ou extratos de produtos naturais (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Esses métodos apresentam peculiaridades em relação aos mecanismos de ação, alvos (ou seja, H₂O₂ ou radical DPPH), pH, tempo e temperatura, e o uso de padrões para construir curvas analíticas, que são usados para gerar resultados quantitativos em termos de atividade antioxidante. Até agora, nenhum único método informa verdadeiramente a capacidade antioxidante total de uma amostra específica, com isso vários métodos são necessários (YASHIN et al., 2017).

Os métodos baseados em transferência de elétron único detectam a capacidade de um antioxidante potencial de transferir um elétron para reduzir qualquer composto, incluindo metais, carbonilas e radicais. Os métodos baseados em transferência de átomo de hidrogênio medem a capacidade clássica de um antioxidante de extinguir os radicais livres pela doação de hidrogênio (GULCIN, 2020).

Os ensaios de transferência de um átomo de hidrogênio incluem a capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC), a inibição da lipoperoxidação, o ensaio de branqueamento da crocina e o ensaio de branqueamento do β-caroteno. Da mesma forma, os métodos de transferência de elétron único são compostos de capacidade antioxidante de redução de íon cúprico (CUPRAC), capacidade de redução férrica do plasma (FRAP), capacidade de redução do reagente de fenol de Folin-Ciocalteu, efeitos de eliminação em relação a 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico (ABTS), entre outros (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Os métodos de determinação da atividade antioxidante *in vitro* podem fornecer uma medida da eficácia dos compostos estudados (ROMULO, 2020).

3.4.1 Determinação do teor de fenólicos totais

O conteúdo fenólico total é amplamente utilizado para avaliação de extratos antioxidantes, incluindo extratos de ervas, especiarias e frutas, cereais e leguminosas,

entre outros. O ensaio Folin-Ciocalteu é o método bem conhecido para determinação de conteúdo fenólico total (ROMULO, 2020).

O ensaio Folin-Ciocalteu tem muitas vantagens, incluindo sua simplicidade, reprodutibilidade e robustez. Ele depende da transferência de elétron, ou seja, é baseado na redução do reagente Folin-Ciocalteu por compostos fenólicos em condições alcalinas, está associado ao poder redutor dos antioxidantes fenólicos (SHAHIDI; ZHONG, 2015). A redução do reagente Folin-Ciocalteu dá origem a um cromóforo azul. Esta cor azul exibe uma ampla absorção de luz com um comprimento de onda máximo de 765 nm. Quanto maior a concentração de fenóis no sistema, maior intensidade de absorção da luz (GULCIN, 2020; ROMULO, 2020).

O ácido gálico é o padrão de referência comumente usado, e os resultados de conteúdo fenólico total são geralmente expressos como equivalentes de ácido gálico (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

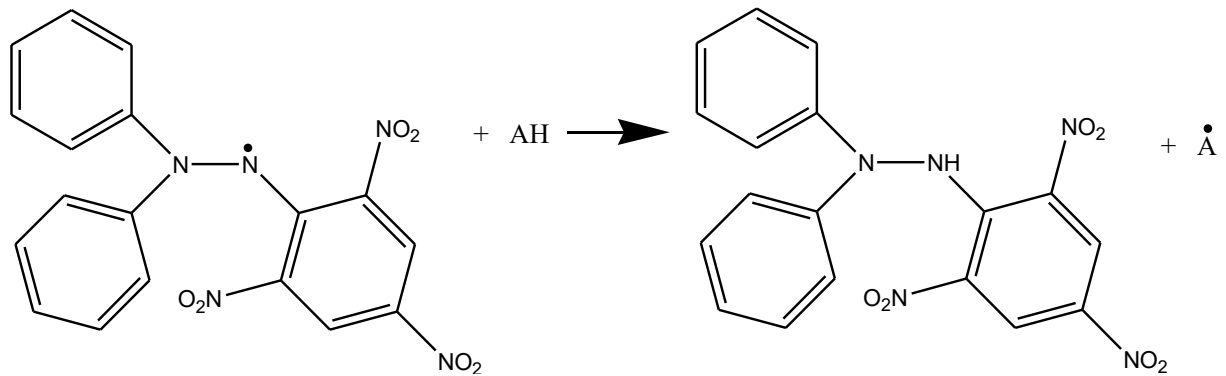
3.4.2 Capacidade de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH•)

O ensaio de eliminação de radicais DPPH está entre os métodos mais usados para o estudo de antioxidantes. DPPH está disponível comercialmente e não precisa ser preparado antes do ensaio, ele é um radical cromógeno estável com uma cor púrpura profunda (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

O ensaio de eliminação de DPPH é baseado na doação de elétrons de antioxidantes para neutralizar o radical DPPH (Figura 13). A reação é acompanhada pela mudança de cor do DPPH medido a 517 nm, e a descoloração atua como um indicador da eficácia antioxidante. Após a reação do antioxidante com o DPPH a solução perde a cor púrpura para o amarelo pálido (ROMULO, 2020).

Mesmo sendo um ensaio simples e que não exige tratamento especial da amostra, a sensibilidade do ensaio de DPPH pode ser afetada por uma série de fatores, como o tipo e a quantidade de solvente utilizado, a presença e concentração de hidrogênio e íon metálico e o frescor do reagente DPPH (SHAHIDI; ZHONG, 2015). O ensaio é rápido, simples, reproduzível e comparável a outros métodos antioxidantes, como ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico) (ROMULO, 2020).

Figura 11 – Reação de doação de elétrons de antioxidantes para neutralizar o radical DPPH

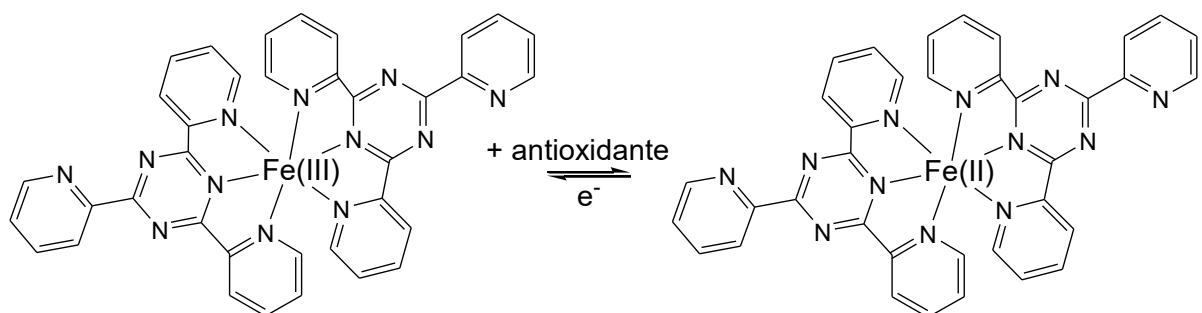


Fonte: Autoria própria

3.4.3. Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

Esse método é baseado na transferência de elétron e mede a redução do complexo $[\text{Fe}^{3+} - (\text{TPTZ})_2]^{+3}$ (tripiridiltriazina), para o complexo ferroso de cor azul intensa $[\text{Fe}^{2+} - (\text{TPTZ})_2]^{+2}$ por antioxidantes (Figura 14). Esse ensaio é realizado em condições de pH ácido (pH 3,6) com o objetivo de manter a solubilidade do ferro e, mais importante, conduzir a transferência de elétrons. As alterações são avaliadas por meio de espectrofotômetro no comprimento de onda de 593 nm. FRAP pode ser aplicado a alimentos, extratos de plantas, bebidas, chá, vegetais, suco, especiarias e frutas (GULCIN, 2020; SHAHIDI; ZHONG, 2015; ROMULO, 2020).

Figura 12 - Redução do complexo Fe³⁺/tripiridiltriazina (TPTZ).



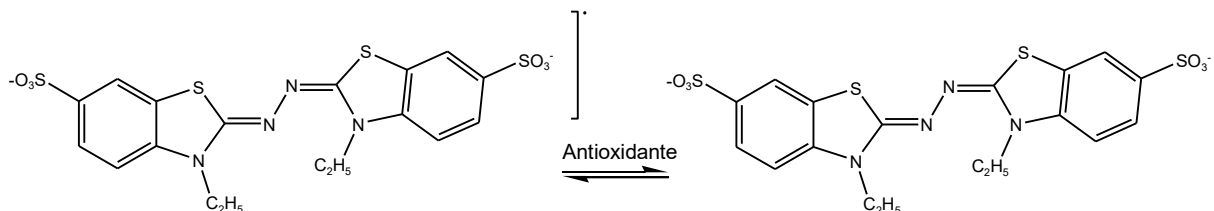
Fonte: Autoria própria

3.4.4 Capacidade de sequestro do radical ABTS

O ensaio mede a capacidade dos antioxidantes de eliminar o cátion radical estável ABTS•⁺ (2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico)), um cromóforo

azul-esverdeado com absorção máxima em 734 nm que diminui sua intensidade na presença de antioxidantes. $ABTS^{\bullet+}$ pode ser gerado a partir de ABTS na presença de agentes oxidantes fortes. Os antioxidantes podem neutralizar o cátion radical $ABTS^{\bullet+}$ por redução direta via doação de elétrons ou por extinção de radical via doação de átomo de hidrogênio, e o equilíbrio desses dois mecanismos é geralmente determinado pela estrutura antioxidante e pelo pH do meio. A extensão da descoloração da cor azul esverdeada, quantificada como uma diminuição da absorbância a 734 nm, depende da duração da reação, da atividade antioxidante intrínseca e da concentração na amostra (GULCIN, 2020; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Figura 13 -Neutralização do radical $ABTS^{\bullet+}$



Fonte: Autoria própria

3.5 ESTUDOS BIOGUIADOS

Embora as plantas apresentem uma rica diversidade estrutural de metabólitos secundários, a análise de substâncias bioativas costuma ser complexa e longa, devido à baixa quantidade de compostos que são produzidos pelas plantas.

Além disso, em função da complexidade dos extratos brutos os testes bioguiados podem fornecer aos pesquisadores informações relevantes para ajudá-los a decidir se intensificam ou não a purificação das frações. Assim, o isolamento de novos compostos e a determinação de suas estruturas químicas é facilitado porque apenas frações de maior relevância biológica são investigadas posteriormente (HOCHHEIM et al., 2020).

Os testes bioguiados são aqueles que lidam principalmente com amostras complexas, nos quais é necessário algum fracionamento prévio para reduzir sua complexidade (HOCHHEIM et al., 2020). O fracionamento bioguiado vem sendo utilizado em muitos trabalhos com o objetivo de buscar novos compostos ativos (SGARIGLIA et al., 2011; OLDONI et al., 2019; SAADA et al., 2021; NJANPA et al., 2021; LYTRA et al., 2021; OLDONI et al., 2021).

A primeira etapa do processo de isolamento bioguiado consiste na escolha da planta, em seguida ocorre a preparação de um extrato bruto levando em consideração a natureza química dos compostos bioativos de interesse. Além disso, o extrato bruto também pode ser fracionado com solventes variados. Extratos e frações assim obtidos são, então, testados quanto à sua atividade. E por fim, depois de identificados os extratos ou frações nos quais a atividade biológica está concentrada, os mesmos, serão purificados por técnicas cromatográficas (DA CUNHA; ROQUE, 2010).

Sendo assim, pode-se dizer que o estudo bioguiado tem por objetivo monitorar a atividade biológica de interesse, aumentando as chances de isolar um composto com elevado potencial biológico, ou obter um grupo de substâncias ativas. Contudo, é preciso ter em mente que a alta atividade biológica de um extrato bruto, ou uma fração, pode ser resultado de vários compostos com atividade baixa ou moderada, agindo de forma sinérgica. Neste caso, o fracionamento/isolamento pode romper essa interação, resultando em um declínio da atividade biológica, e o composto isolado obtido pode não apresentar um desempenho satisfatório.

Sangiovanni et al. (2018) combinaram uma abordagem bioguiada robusta com uma análise abrangente da fração de tanino dos extratos de castanha e encontraram evidências para o uso potencial de nutracêuticos à base de castanha na gastrite humana.

Em outro trabalho foi realizada uma abordagem bioguiada com base em ensaios antioxidantes *in vitro*, citotóxicos e antimicrobianos a fim de determinar os grupos bioativos, o que resultou no isolamento e identificação de vários compostos químicos bioativos do extrato metanólico de *S. cypria* (LYTRA et al., 2021).

Um exemplo de fármaco que se encontra hoje disponível no mercado e que foi identificado por meio de um fracionamento bioguiado é o Acheflan®, lançado pela Aché, uma das maiores farmacêuticas da América do Sul (SILVEIRA et al., 2021).

Oldoni et al. (2021) realizaram o isolamento de compostos com atividade antioxidante por meio de ensaio bioguiado das folhas de *Moringa oleífera* e relataram a presença de três compostos fenólicos com alta atividade antioxidante (isoquercitrina e astragalina e ácido 3-O-cafeoilquínico) na fração de acetato de etila.

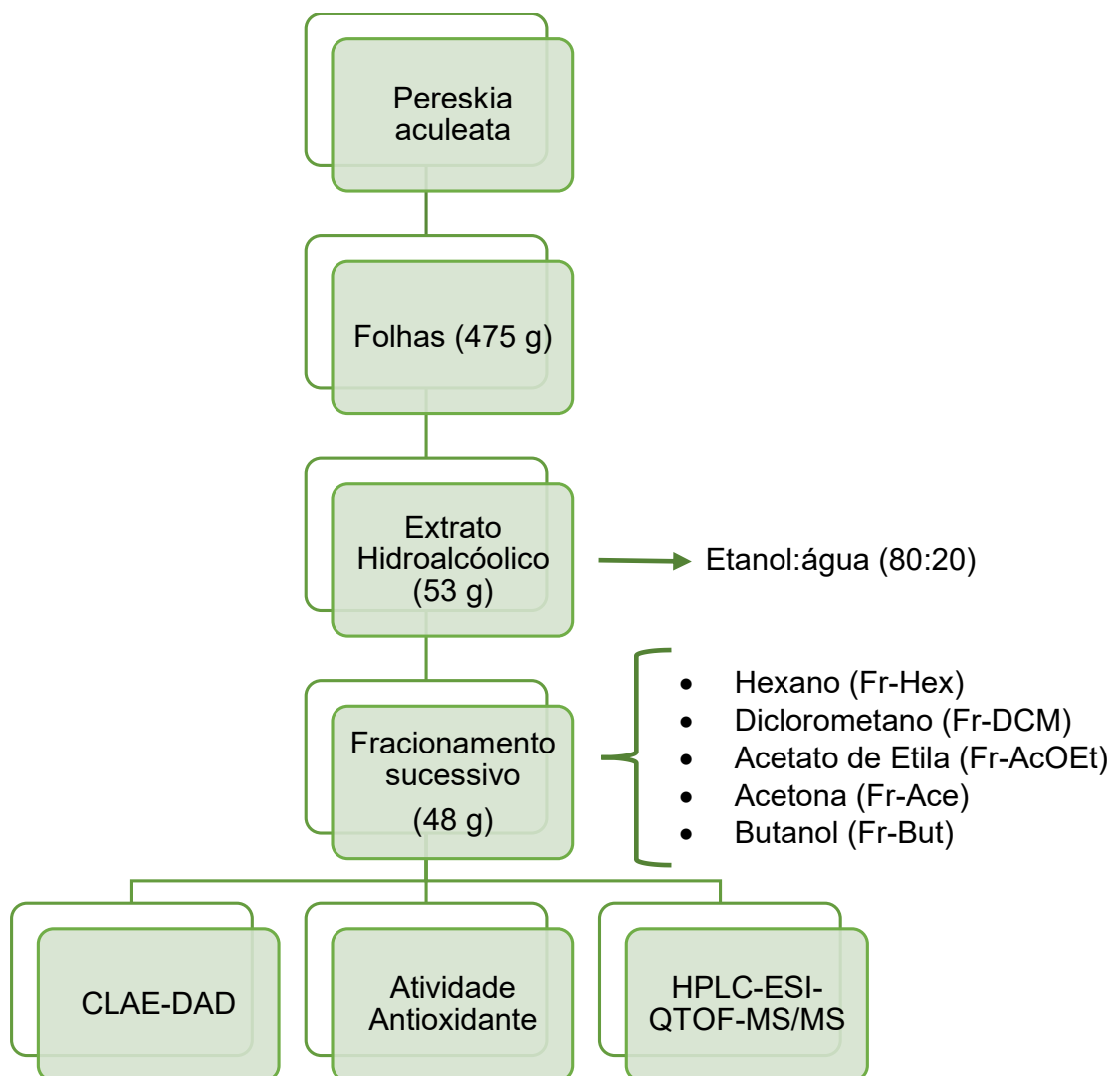
Em outros estudos, duas proantocianidinas (A1 e A2) com atividade antioxidante foram isoladas da pele do amendoin por meio de fracionamento bioguiado (OLDONI et al., 2016). Enquanto que, dois isoflavonoides bioativos (vestitol e neovestitol), e uma chalcona foram isolados da fração clorofórmica de própolis

vermelha. Essa fração foi estudada pois apresentou forte atividade antioxidante e antimicrobiana nos ensaios de atividade (OLDONI et al., 2011).

4 METODOLOGIA

A figura 14 apresenta a metodologia seguida nesse trabalho (Figura 14).

Figura 14 - Fluxograma das etapas referentes as atividades desenvolvidas durante o estudo das folhas de *Pereskia aculeata*



Fonte: Autoria própria

4.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas de *P. aculeata* trituradas (pó), foram doadas pela empresa Proteios Nutrição Funcional Ltda-Me de Ribeirão Preto – SP. As informações nutricionais fornecidas pela empresa encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 – Informações nutricionais *Pereskia aculeata*

Descrição	Quantidade por porção	%VD
Valor energético	16 Kcal	0,8
Carboidratos	1,17 g	0,6
Proteínas	2,1 g	2,8
Gorduras totais	<0,5 g	0,2
Gorduras saturadas	<0,5 g	---
Gorduras trans	0	ND
Fibra alimentar	3,9 g	15,6
Sódio	<5 mg	---

Porção de 10g = 1 colheres de sopa

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Primeiramente foi preparado um extrato hidroalcolico (EHPA), utilizando 475 g de folhas secas e trituradas (pó), de *P. aculeata* e uma mistura de etanol:água (80:20 v/v) como solvente, com renovação do solvente em intervalos de 24 h, e um total de 5 trocas de solvente. A massa total das folhas foi dividida em vários frascos de Erlenmeyer e o volume de solvente utilizado em cada extração foi de 100 mL, o suficiente para cobrir as folhas. A extração foi realizada à temperatura ambiente, sob agitação constante (Mesa agitadora SL-183, SOLAB). O extrato foi então filtrado e concentrado em evaporador rotativo à pressão reduzida e temperatura de 40 °C e, em seguida, liofilizado.

Depois de obtido o extrato hidroalcolico (EHPA), 48 g do mesmo, foi submetido à extração sólido-líquido, utilizando a seguinte sequência de: Hexano (Fr-Hex), Diclorometano (Fr-DCM), Acetato de Etila (Fr-AcOEt), Acetona (Fr-Ace) e *n*-Butanol (Fr-But), sob agitação constante e com renovação dos solventes a cada 24h. A decisão de troca de solvente foi definida pela coloração do filtrado, ou seja, a redução na coloração do filtrado indicava que estava na hora de substituir o solvente

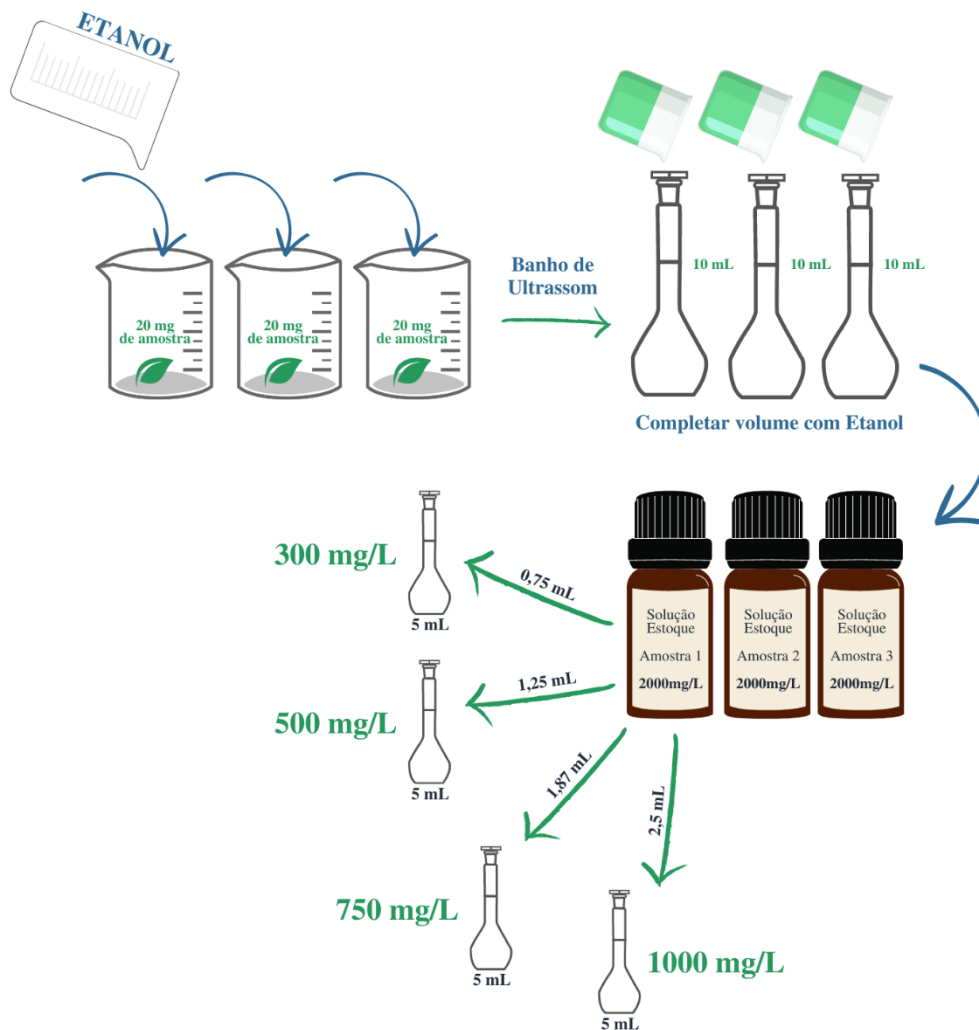
extrator. Isso aumenta as chances de se obter um bom rendimento. As frações assim obtidas foram filtradas e rotaevaporadas em evaporador rotativo.

4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.3.1 Preparo da solução estoque e diluições

A figura 15 apresenta o esquema utilizado no preparo da solução estoque e das diluições. É importante destacar que esse procedimento foi realizado para o extrato hidroalcolico e para as frações de *P. aculeata*.

Figura 15 - Esquema que representa o preparo da solução estoque e das diluições utilizadas nas análises antioxidantes



Fonte: Autoria própria

As soluções estoque foram preparadas em triplicata. Para isso pesou-se 20 mg de amostra liofilizada em um béquer e adicionou-se etanol aos poucos até solubilização completa da amostra. O banho de ultrassom foi utilizado para ajudar na solubilização das amostras. Em seguida, a solução foi transferida para um balão de 10 mL. A partir da solução estoque foram preparadas as diluições utilizadas nos testes de atividade antioxidante (300 mg L⁻¹, 500 mg L⁻¹, 750 mg L⁻¹ e 1000 mg L⁻¹).

4.3.2 Capacidade de sequestro do radical ABTS

A capacidade de sequestrar o radical ABTS foi determinada pela metodologia descrita por Re et al. (1999), com algumas modificações. Para a obtenção do radical ABTS foram misturados 5 mL de uma solução estoque de ABTS (7 mmol L⁻¹) com 88 µL de uma solução de persulfato de potássio (140 mmol L⁻¹). Essa mistura foi mantida no escuro, à temperatura ambiente por 16h. Em seguida, 1 mL da mistura contendo o radical ABTS foi diluído com álcool etílico (P.A), até que se observou uma absorbância de 0,70 ± 0,05 a 734 nm. Essa solução foi preparada e usada no mesmo dia.

Depois de preparada a solução com o radical ABTS, foram transferidos 3 mL da mesma para um tubo de ensaio, em local escuro, juntamente com 30 µL da amostra a ser testada. As soluções assim obtidas, foram homogeneizadas com auxílio de vórtex e após 6 min realizou-se a leitura com espectrofotômetro em 734 nm. Como referência para dosagem de quantificação foi utilizado Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) em uma faixa de 100 a 2000 µmol L⁻¹. Os resultados foram expressos em µmol de Trolox por g de extrato ou fração (µmol g⁻¹).

Para essa análise foi considerada a diluição de 1000 mg L⁻¹ para o EHPA e as demais frações analisadas.

4.3.3 Capacidade de sequestro do radical DPPH

A análise da capacidade de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi realizada como descrito por Brand-Williams et al. (1995), com algumas modificações. Para essa análise foram misturados 0,5 mL de amostra em estudo, com 3 mL de álcool etílico a 80% e 0,3 mL da solução de DPPH em concentração de 0,5 mmol L⁻¹. Após 1h em repouso, foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 517

nm. O controle foi preparado substituindo-se a alíquota da amostra por 0,5 mL de etanol 80%. Para a obtenção da curva padrão foram seguidas as mesmas condições descritas acima, substituindo-se as diluições das amostras por Trolox, em concentrações de 15, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados foram expressos em μmol de Trolox por grama de extrato ou fração.

Para essa análise diferentes diluições foram consideradas dependendo da amostra analisada: Fr-Ace e Fr-But 300 mg L^{-1} , Fr- AcOEt e Fr-Hex 500 mg L^{-1} , Fr-DCM 750 mg L^{-1} e EHPA 100 mg L^{-1} .

4.3.4 Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)

A análise pelo método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996). O reagente FRAP foi preparado utilizando-se 25 mL de tampão acetato (300 mmol L^{-1} , pH 3,6); 2,5 mL de solução 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ, 10 mmol L^{-1} em 40 mmol L^{-1} de HCl) e 2,5 mL de FeCl_3 (20 mmol L^{-1} em solução aquosa). Em seguida, foram misturados 100 μL da amostra a ser testada com 3,0 mL do reagente FRAP em tubos de ensaio, que permaneceram durante 30 min em banho-maria (37 °C) e no escuro. Para a quantificação, foi construída uma curva analítica padrão de sulfato ferroso, nas concentrações de 200, 500, 1000, 1500 e 2000 mg L^{-1} , e os resultados foram expressos como μmol de sulfato ferroso por grama de amostra ($\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$). Foi realizada a leitura da absorbância com espectrofotômetro a 595 nm, zerado com reagente FRAP.

Para essa análise foi considerada a diluição de 750 mg L^{-1} para todas as amostras analisadas (EHPA, Fr-But, Fr-AcOEt, Fr-Ace, Fr-DCM, Fr-Hex).

4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico do reagente Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton et al. (1999). Para essa análise, realizou-se uma mistura de 0,5 mL da amostra a ser testada com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (10%) e 2 mL de carbonato de sódio 4%. Os tubos foram deixados em repouso por 2 horas no escuro e a temperatura ambiente. Após esse tempo, foram realizadas as leituras em 740 nm utilizando-se um

espectrofotômetro. O controle foi preparado substituindo-se a alíquota da amostra por 0,5 mL de água destilada. Para a quantificação, foi elaborada uma curva analítica padrão de ácido gálico, nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 mg L⁻¹. Os resultados foram expressos em mg de equivalente ácido gálico por grama de amostra (mg EAG g⁻¹ amostra).

4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM ARRANJO DE DIODOS E FLUORESCÊNCIA (CLAE-DAD-FL)

A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo Varian 920-LC utilizando coluna ACES C-18 V 13-7417 (250 x 4.6 mm, 5 µm de tamanho de partícula). A fase móvel foi uma mistura de água: ácido acético (98:2) (solvente A) e água: acetonitrila: ácido acético (58:40:2) (solvente B). A taxa de fluxo foi de 1,0 mL min⁻¹ no modo gradiente, começando com 5% de solvente B a 25% B em 20 min, 85% B em 40 min, 85% B em 45 min, 95% B em 48 min, 95% B em 51 min, 5% B em 54 min e 5% B em 64 min. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 30 °C e foi injetado um volume de 10 µL de cada amostra.

As amostras foram preparadas dissolvendo 10 mg do extrato hidroalcolico e frações, em 1 mL de metanol grau HPLC. Depois de solubilizadas, as amostras foram filtradas utilizando filtro de seringa de 25 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho de poro e na sequência foram injetadas.

A caracterização dos extratos foi realizada por comparação, com padrões autênticos, de tempo de retenção e absorção característica no ultravioleta (ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido cafeico, epicatequina, ácido cumárico, ácido ferúlico, rutina, isoquercetina, ácido isoclorogênico, astragalina, ácido salicílico, miricetina, ácido *trans*-cinâmico, quercetina e canferol). Para a quantificação dos compostos identificados foi construída uma curva de calibração (2,5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm e 50 ppm).

4.6 HPLC-ESI-QTOF-MS/MS

O extrato e as frações que apresentaram melhor atividade antioxidante foram analisados usando um cromatógrafo líquido de ultra-alta performance acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução (UHPLC Shimadzu). A separação de

componentes individuais foi realizada usando uma coluna Supelco Ascentis C18 (4,6 mm x 250 mm – 5 µm). A fase móvel foi uma mistura de água: ácido acético 1% (solvente A) e água: acetonitrila (60:40) 1% ácido acético (solvente B). A taxa de fluxo foi de 1,0 mL min⁻¹ no modo gradiente, começando com 5% de solvente B a 25% B em 20 min, 85% B em 40 min, 85% B em 45 min, 95% B em 48 min, 95% B em 51 min, 5% B em 54 min e 5% B em 64 min. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 30 °C.

Os experimentos de MS foram realizados em um espectrômetro de massas de alta resolução Q-TOF MAXIS 3G (Bruker Daltonics Corporation, Germany), equipado com fonte de ionização por electrospray. A fonte foi operada no modo de ionização negativo, ajustado para 4500 V com potencial de deslocamento da placa final de -500 V. Os parâmetros do gás de secagem foram ajustados para 8 L min⁻¹ a 200 °C e pressão do gás de névoa a 3 bar. Os dados foram coletados na faixa de *m/z* 100 a 1000 com taxa de aquisição de 5 Hz.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de quantificação por CLAE e de atividade antioxidante foram expressos como média ± desvio padrão dos ensaios realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada no software Jamovi versão 2.3.28. Os dados foram comparados pela análise de variância de um critério (ANOVA one--way) com um nível de confiança de 95%. Nos grupos com diferença estatística significativa, aplicou--se o teste post--hoc de Tukey e as diferenças foram consideradas significativas entre os grupos com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das folhas de *Pereskia aculeata* foi produzido um extrato utilizando uma mistura de etanol e água (80:20) que foi denominado de Extrato Hidroalcolico (EHPA) (Figura 16). Na sequência, este extrato foi concentrado e solventes orgânicos (hexano, diclorometano, butanol, acetona e acetato de etila) foram utilizados na etapa de fracionamento com o objetivo de extrair compostos químicos com potencial antioxidante.

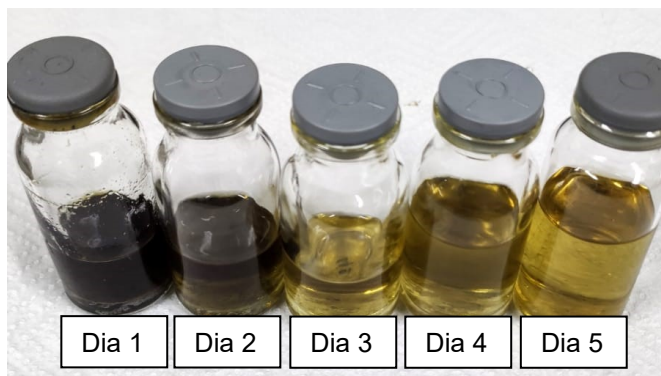
Figura 16 - - Preparação do extrato hidroalcolólico das folhas de *Pereskia aculeata*: A) folhas trituradas; B) folhas + solvente extrator; C) extrato depois de liofilizado



Fonte: Autoria própria

Os solventes orgânicos utilizados foram renovados a cada 24h, caracterizando assim uma extração exaustiva (Figura 17). Ainda, um objetivo do estudo foi avaliar os compostos químicos presentes no extrato e frações.

Figura 17 - Filtrados resultantes dos cinco dias de extração com hexano



Fonte: Autoria própria

É interessante destacar que o valor de proteínas observado para o material vegetal fornecido pela Proteios Nutrição Funcional Ltda-Me (Tabela 2), encontra-se dentro de uma faixa já relatada na literatura (13,1g – 28,99 g para 100 g). Por outro lado, o teor de carboidratos encontra-se abaixo da faixa relatada na literatura (29,53 g – 54,5 g para 100 g) e o valor de fibras está acima do relatado na literatura (9,8 g – 21,6 g para 100 g) (TAKEITI et al., 2009; ALMEIDA et al., 2014; TURANI; BRITES, 2018).

5.1 RENDIMENTOS DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO E FRAÇÕES

A Tabela 3 apresenta os rendimentos do extrato hidroalcoólico e das frações obtidas das folhas de *P. aculeata*. O EHPA foi obtido com 11% de rendimento, sendo esse resultado semelhante ao observado por Carvalho et al. (2014) onde foram relatados rendimentos entre 8,9 e 11% para extratos preparados a partir de folha de *P. aculeata* e etanol 95% (v/v) como solvente.

Tabela 3 - Rendimento do Extrato hidroalcoólico e Frações

Amostras	Massa (g)	Extrato Hidroalcoólico* (%)	Folhas** (%)
EHPA	53		11
Fr-Hex	5,89	12,27	1,24
Fr-DCM	1,17	2,43	0,24
Fr-AcOEt	0,41	0,85	0,08
Fr-Ace	0,65	1,35	0,13
Fr-But	0,09	0,18	0,03

*Rendimento em função do extrato hidroalcoólico

**Rendimento em função da quantidade de folhas utilizadas na preparação do extrato hidroalcoólico

Observa-se que a fração hexânica apresentou maior rendimento, seguida das frações em diclorometano e acetona. Por outro lado, a fração butanólica apresentou o menor rendimento.

Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Pinto et al. (2012) que realizaram a maceração das folhas de *P. aculeata* (1 kg) com metanol até a exaustão e obtiveram 14% de rendimento (140 g) para o extrato bruto. Esse extrato foi dissolvido em água/metanol (8:2 v/v) e depois fracionado com diferentes solventes em ordem crescente de polaridade. Os autores concluíram que a fração hexânica (38 g) apresentou maior rendimento, seguida das frações em diclorometano (12 g), butanol (7 g) e acetato de etila (1 g).

Em outro estudo, os extratos das folhas de *P. aculeata* foram preparados em água, etanol 70% e acetona 80%, com rendimentos de 17, 16 e 14%, respectivamente (SOUSA, 2014).

5.2 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO E FRAÇÕES POR CLAE-DAD

O extrato hidroalcólico das folhas de *P. aculeata* e as frações obtidos com diferentes solventes foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com o objetivo de determinar a composição fenólica dessas amostras.

O método utilizado foi otimizado para a separação de dezessete compostos fenólicos (Figura 18), dos quais nove são ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferrúlico, ácido isoclorogênico A, ácido salicílico e ácido cinâmico), três são flavonoides glicosilados (rutina, isoquercetina e astragalina), três são flavonoies (miricetina, quercetina e canferol) e dois são flavanóis (catequina e epicatequina). Algumas figuras de mérito obtidas para o método cromatográfico são descritas na Tabela 4 e estão de acordo com as orientações apresentadas pela Conferência Internacional de Harmonização ICH (2005).

Tabela 4 - Figuras de mérito dos padrões de compostos fenólicos separados por CLAE-DAD.

	Compostos Fenólicos	Tr (min)	λ_{max} (mn)	Curva de Calibração	R²	LD (mg L⁻¹)	LQ (mg L⁻¹)
1	Ácido Gálico	5,81	271	$y = 0.427x - 0.067$	0,9995	0,07	0,30
2	Catequina	17,32	278	$y = 0.427x - 0.067$	0,9998	1,00	2,00
3	Ácido Clorogênico	18,49	324	$y = 0.427x - 0.067$	0,9995	0,50	1,50
4	Ácido Vanílico	19,68	259	$y = 0.427x - 0.067$	0,9994	0,07	0,50
5	Ácido Cafeico	20,67	322	$y = 0.427x - 0.067$	0,9999	0,10	0,50
6	Epicatequina	23,95	278	$y = 0.427x - 0.067$	0,9994	1,00	2,50
7	Ácido Cumárico	27,67	309	$y = 0.427x - 0.067$	0,9997	0,20	0,50
8	Ácido ferrúlico	30,05	322	$y = 0.427x - 0.067$	0,9996	0,10	0,30
9	Rutina	30,88	254/354	$y = 0.427x - 0.067$	0,9928	0,30	1,00
10	Isoquercetina	31,53	253/354	$y = 0.427x - 0.067$	0,9996	0,40	1,00
11	Ácido Isoclorogênico	32,23	324	$y = 0.427x - 0.067$	0,9959	1,00	3,50
12	Astragalina	33,51	263/345	$y = 0.427x - 0.067$	0,9998	0,10	0,30

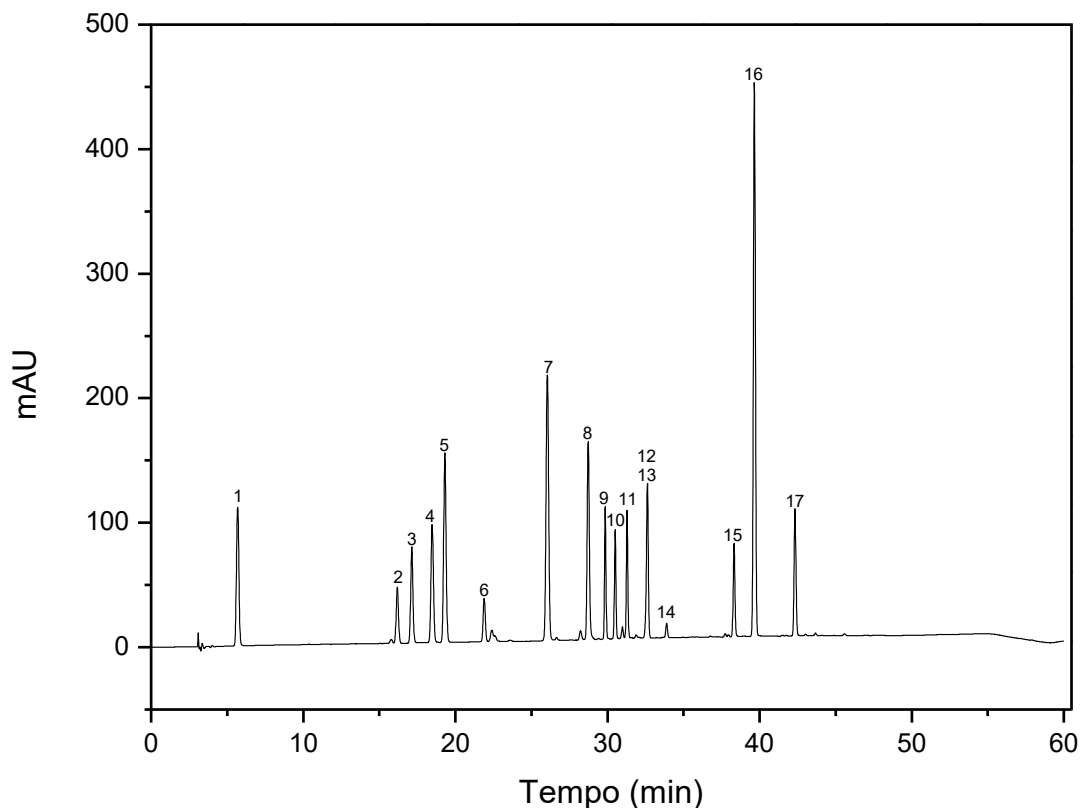
13	Ácido Salicílico	33,51	301	$y = 0.427x - 0.067$	0,9999	0,30	0,50
14	Miricetina	34,73	371	$y = 0.427x - 0.067$	0,9964	1,00	5,00
15	Quercetina	38,84	252/371	$y = 0.427x - 0.067$	0,9968	0,50	2,00
16	Ácido Cinâmico	40,2	276	$y = 0.427x - 0.067$	0,9997	0,20	0,50
17	Canferol	42,59	262/366	$y = 0.427x - 0.067$	0,9989	0,50	2,00

Fonte: Dados experimentais.

Tr: tempo de retenção; λ_{max} : máximos de absorção; LD: Limite de Detecção; LQ: Limite de Quantificação.

Na figura 18 observa-se o cromatograma dos compostos fenólicos utilizados para construir a curva de calibração.

Figura 18 - Cromatograma dos padrões fenólicos – (1) Ácido Gálico, (2) Catequina, (3) Ácido Clorogênico, (4) Ácido Vanílico, (5) Ácido Cafeico, (6) Epicatequina, (7) Ácido Cumárico, (8) Ácido ferúlico, (9) Rutina, (10) Isoquercetina, (11) Ácido Isoclorogênico, (12) Astragalina, (13) Ácido Salicílico, (14) Miricetina, (15) Quercetina, (16) Ácido Cinâmico e (17) Canferol.



Os compostos que apresentam menor afinidade com a fase estacionária e maior afinidade com a fase móvel eluem com menor tempo de retenção. Por se tratar de uma coluna de fase reversa (C18), os compostos mais polares, como ácido gálico,

catequina e ácido clorogênico, eluem primeiro, ou seja, apresentam maior interação com a fase móvel. Já os compostos como quercetina, ácido cinâmico e canferol eluem no final da corrida cromatográfica, ou seja, apresentam maior interação com a fase estacionária e maior tempo de retenção.

Os compostos fenólicos identificados no extrato hidroalcolico e nas frações foram quantificados e o resultado encontra-se na tabela 5.

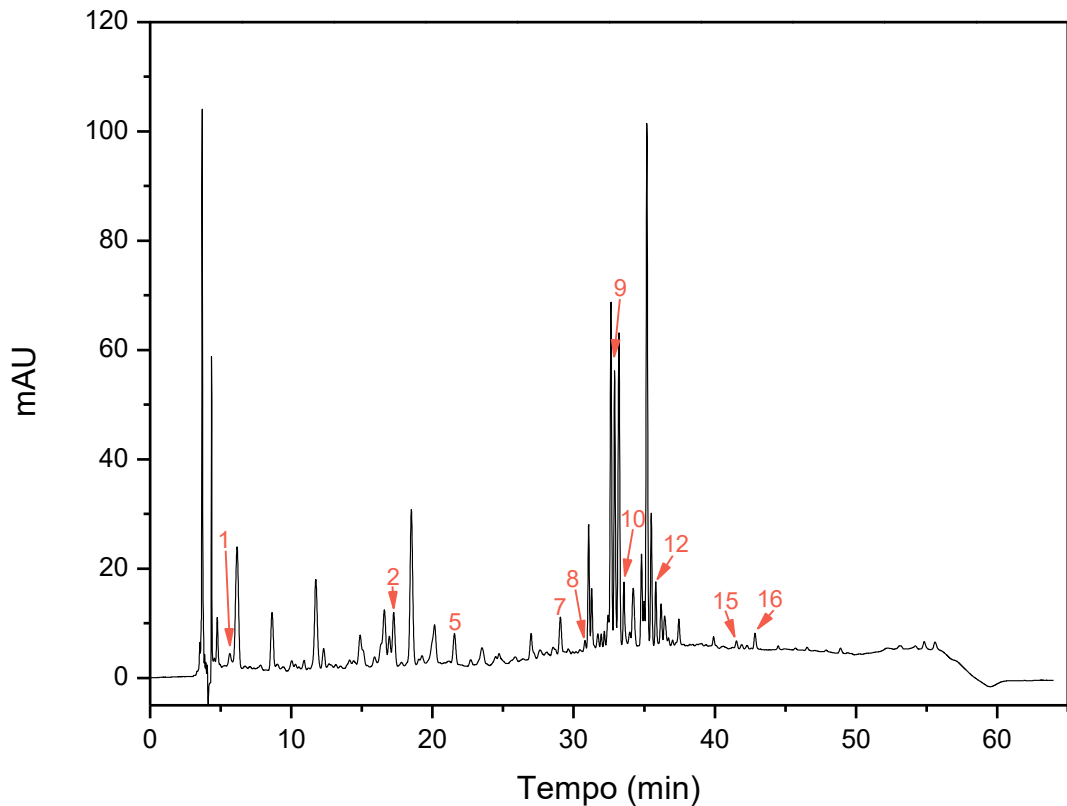
Tabela 5 - Teores dos compostos fenólicos identificados por CLAE-DAD no extrato hidroalcolico e frações das folhas de *P. aculeata*.

Compostos	Fr-AcOEt	Fr-Ace	Fr-But	Fr-DCM	Fr-Hex	EHPA
mg g ⁻¹						
Ácido gálico	1,49 ± 0,13 ^b	<LD	<LD	1,88 ± 0,13 ^a	<LD	0,71 ± 0,13 ^c
Ácido Vanílico	5,53 ± 0,28 ^a	<LD	<LD	3,04 ± 0,28 ^b	<LD	0,27 ± 0,00 ^c
Ácido Cafeico	22,56 ± 1,05^a	12,32 ± 0,27 ^b	6,77 ± 0,44 ^c	1,45 ± 0,09 ^d	1,56 ± 0,17 ^d	2,09 ± 0,35 ^d
Ácido Cumárico	21,05 ± 1,12 ^a	8,47 ± 0,07 ^b	4,38 ± 0,34 ^c	4,50 ± 0,24 ^c	1,19 ± 0,12 ^d	1,31 ± 0,23 ^d
Ácido Ferúlico	9,12 ± 0,57 ^a	3,37 ± 0,19 ^b	1,93 ± 0,11 ^c	8,06 ± 0,86^a	0,75 ± 0,00 ^c	0,75 ± 0,19 ^c
Rutina	6,78 ± 0,24 ^c	37,54 ± 1,25^a	39,07 ± 3,74^a	1,63 ± 0,00 ^c	6,22 ± 0,72^c	20,98 ± 5,22^b
Isoquercetina	5,10 ± 0,28 ^{cd}	14,27 ± 0,49 ^b	21,46 ± 1,86 ^a	2,49 ± 0,00 ^e	2,82 ± 0,28 ^{de}	5,76 ± 1,23 ^c
Quercetina	6,49 ± 0,50 ^a	4,80 ± 0,58 ^b	4,29 ± 0,29 ^b	<LD	0,40 ± 0,00 ^c	0,48 ± 0,38 ^c
Ácido Cinâmico	3,64 ± 0,18 ^a	1,62 ± 0,08 ^b	<LD	4,12 ± 0,29 ^a	1,90 ± 0,23 ^b	0,77 ± 0,07 ^c
TOTAL	81,76	82,39	77,90	27,17	14,84	33,12

Os valores em negrito se referem a quantidade do composto majoritário encontrado em cada amostra

O cromatograma do EHPA (Figura 19) indica a presença de ácido gálico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, rutina, isoquercetina, quercetina e ácido cinâmico nesse extrato.

Figura 19 - Cromatograma do EH - ácido gálico (1), ácido cafeico (5), ácido cumárico (7), ácido ferúlico (8), rutina (9), isoquercetina (10), quercetina (15) e ácido cinâmico (16)



Observa-se que dos compostos identificados a rutina (9) apresenta-se em maior quantidade ($20,98 \text{ mg g}^{-1}$), seguida da isoquercetina (10) ($5,76 \text{ mg g}^{-1}$). É importante destacar que apesar de o EHPA apresentar-se como uma mistura complexa, foi possível obter uma boa separação e, assim, identificar e quantificar vários compostos fenólicos.

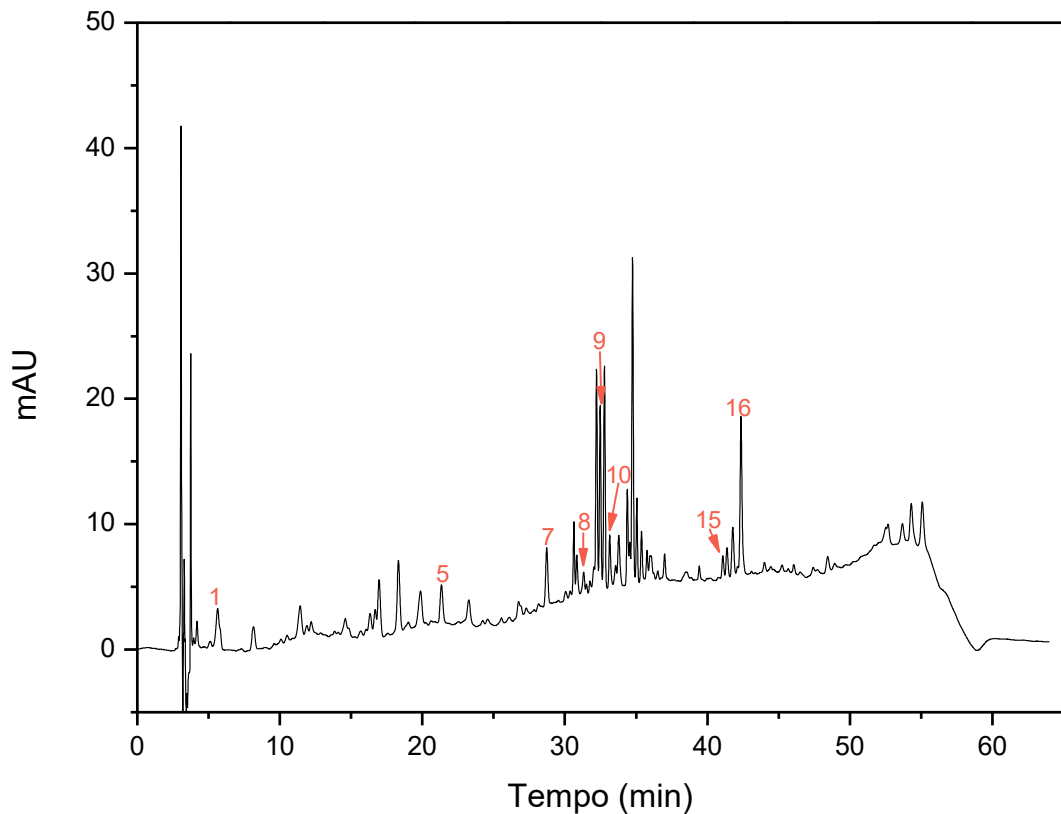
Em estudo realizado por Garcia et al. (2019) com extrato hidroalcolico das folhas de *P. aculeata* foram identificados dez compostos fenólicos, destacando-se o ácido caftárico como composto majoritário, seguido da rutina (GARCIA, et al, 2019). O flavonoide quercetina também foi identificado em extrato hidroalcolico de *P. aculeata* por Pinto et al. (2015).

Cruz et al. (2021) observaram a presença de ácido cafeico, rutina e quercetina em vários extratos de folhas de *P. aculeata* obtidos com diferentes proporções de água, etanol e acetona. A quercetina e a rutina foram identificadas em todos os extratos. Além disso, destaca-se que a rutina foi o composto mais abundante em todas as amostras. As maiores quantidades de ácido cafeico, rutina e quercetina foram observadas no extrato hidroalcolico com 60% de água e 40% etanol.

A rutina apresenta uma ampla gama de usos farmacológicos (como antimicrobiano, antifúngico e antialérgico) principalmente devido às suas expressivas propriedades antioxidantes, especialmente como eliminador de radicais livres (GARCIA et al., 2019).

A partir do extrato hidroalcolólico foram obtidas as frações Fr-Hex, Fr-DCM, Fr-AcOEt, Fr-Ace e Fr-But. Na fração hexânica foram identificados ácido gálico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, rutina, isoquercetina, quercetina e ácido cinâmico (Figura 20).

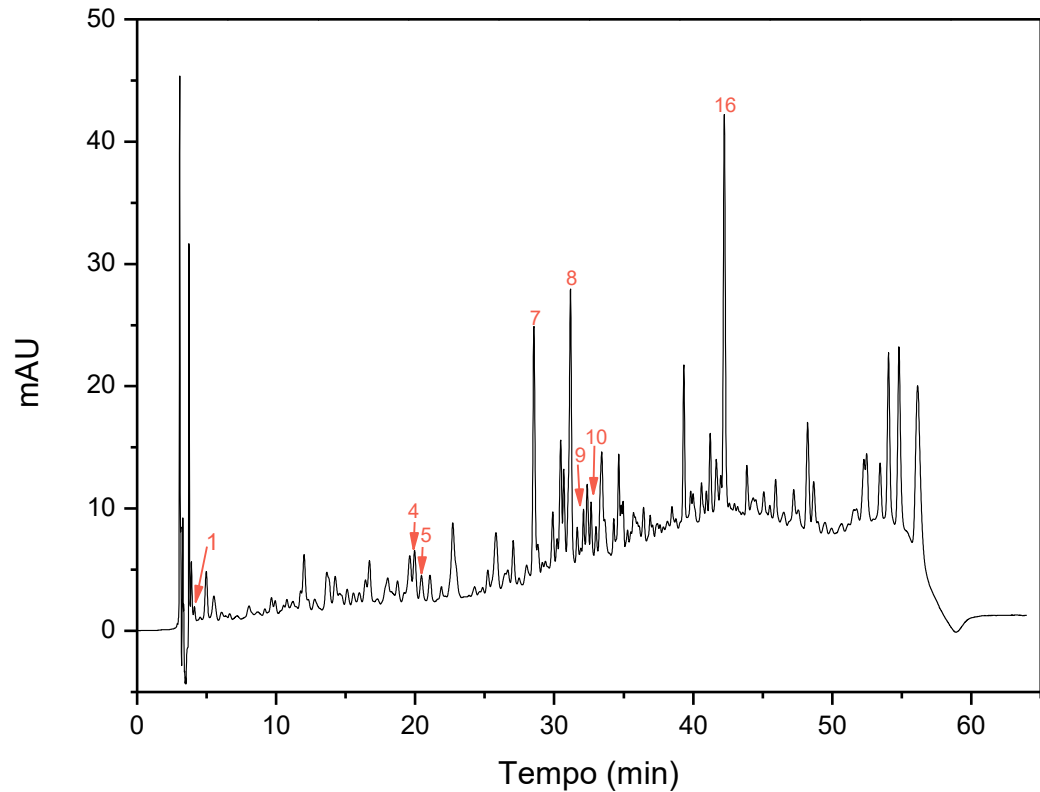
Figura 20 - Cromatograma da fração hexânica - ácido gálico (1), ácido cafeico (5), ácido cumárico (7), ácido ferúlico (8), rutina (9), isoquercetina (10), quercetina (15) e ácido cinâmico (16)



Esses compostos foram identificados no EH, contudo, suas concentrações de maneira geral, diminuíram na Fr-Hex, com exceção do ácido cinâmico cuja concentração dobrou. Dos compostos identificados, novamente, a rutina (9) apresenta-se em maior quantidade (6,22 mg g⁻¹), seguida da isoquercetina (10) (2,82 mg g⁻¹).

Na fração em diclorometano foram identificados ácido gálico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, rutina, isoquercetina e ácido cinâmico.

Figura 21 - Cromatograma da fração em diclorometano - ácido gálico (**1**), ácido vanílico (**4**), ácido cafeico (**5**), ácido cumárico (**7**), ácido ferúlico (**8**), rutina (**9**), isoquercetina (**10**) e ácido cinâmico (**16**)

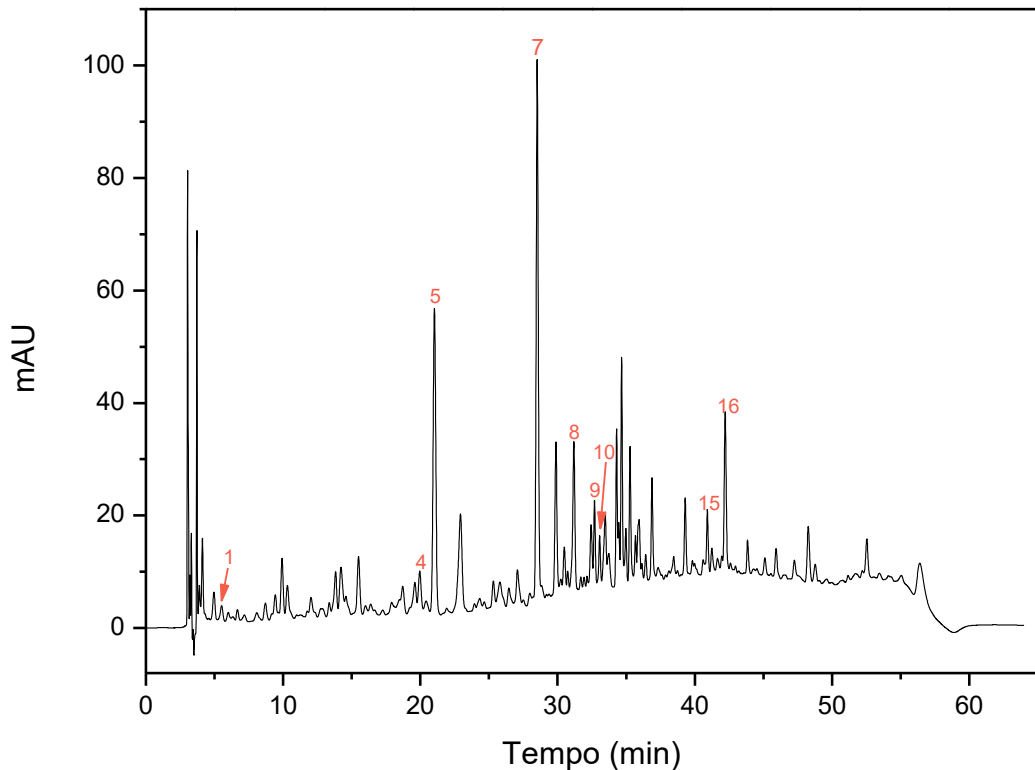


Observa-se que dos compostos identificados o ácido ferúlico (**8**) apresenta-se em maior quantidade ($8,06 \text{ mg g}^{-1}$), seguido do ácido cumárico (**7**) ($4,50 \text{ mg g}^{-1}$).

A concentração de ácido ferúlico na Fr-DCM é maior do que a encontrada nas demais amostras, sendo estatisticamente igual, apenas, a concentração observada na Fr-AcOEt.

Na fração de acetato de etila (Figura 22) foi possível identificar a maior quantidade de compostos fenólicos, sendo eles, ácido gálico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, rutina, isoquercetina, quercetina e ácido cinâmico.

Figura 22 - Cromatograma da fração em acetato de etila - ácido gálico (**1**), ácido vanílico (**4**), ácido cafeico (**5**), ácido cumárico (**7**), ácido ferúlico (**8**), rutina (**9**), isoquercetina (**10**), quercetina (**15**) e ácido cinâmico (**16**)



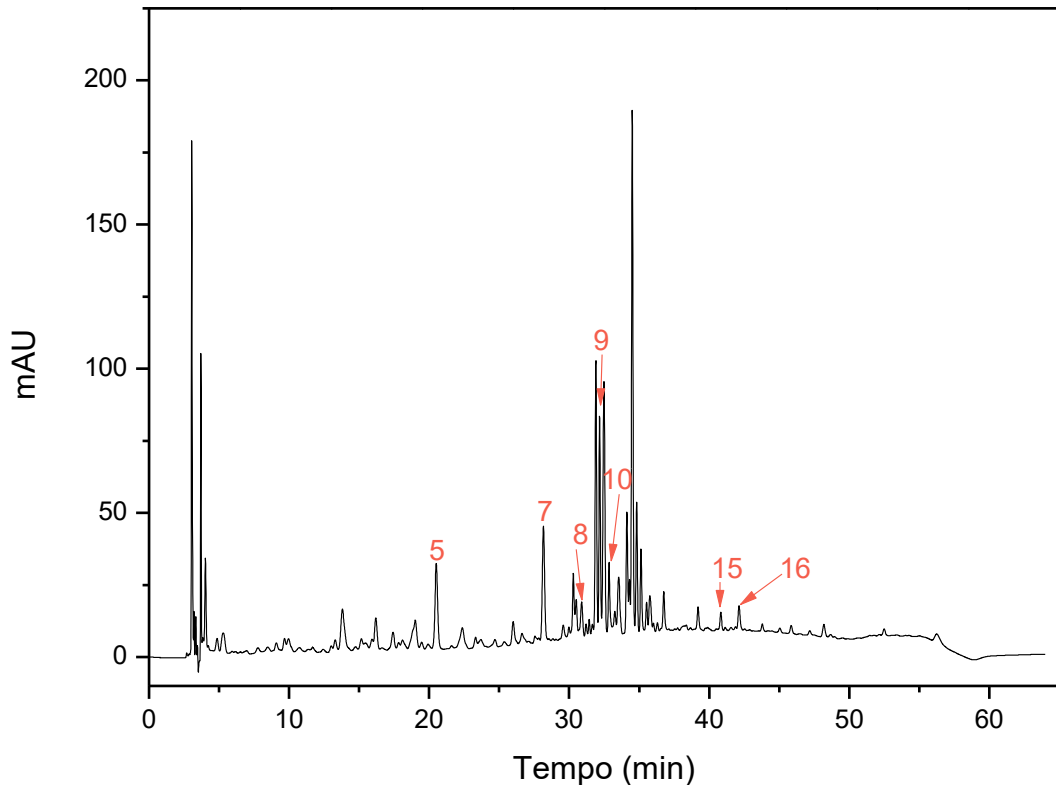
Observa-se que dos compostos identificados o ácido caféico (**5**) apresenta-se em maior quantidade ($22,56 \text{ mg g}^{-1}$), seguido do ácido cumárico (**7**) ($21,05 \text{ mg g}^{-1}$). Ambos os compostos se encontram em maior quantidade nessa fração sendo estatisticamente diferentes das concentrações observadas nas outras amostras.

É importante destacar que as concentrações de ácido caféico e ácido cumárico na Fr-AcOEt são 10 e 16 vezes maiores que as concentrações desses compostos no EHPA, respectivamente.

O ácido vanílico (**4**) foi identificado no extrato hidroalcolico e nas frações diclorometano e acetato de etila nas concentrações de $0,27 \text{ mg g}^{-1}$, $3,04 \text{ mg g}^{-1}$, $5,53 \text{ mg g}^{-1}$ e, respectivamente, sendo a concentração desse composto estatisticamente diferentes nas três amostras.

Na fração em acetona (Figura 23) foram identificados ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, rutina, isoquercetina, quercetina e ácido cinâmico.

Figura 23 - Cromatograma da fração em acetona – ácido cafeico (5), ácido cumárico (7), ácido ferúlico (8), rutina (9), isoquercetina (10), quercetina (15) e ácido cinâmico (16).

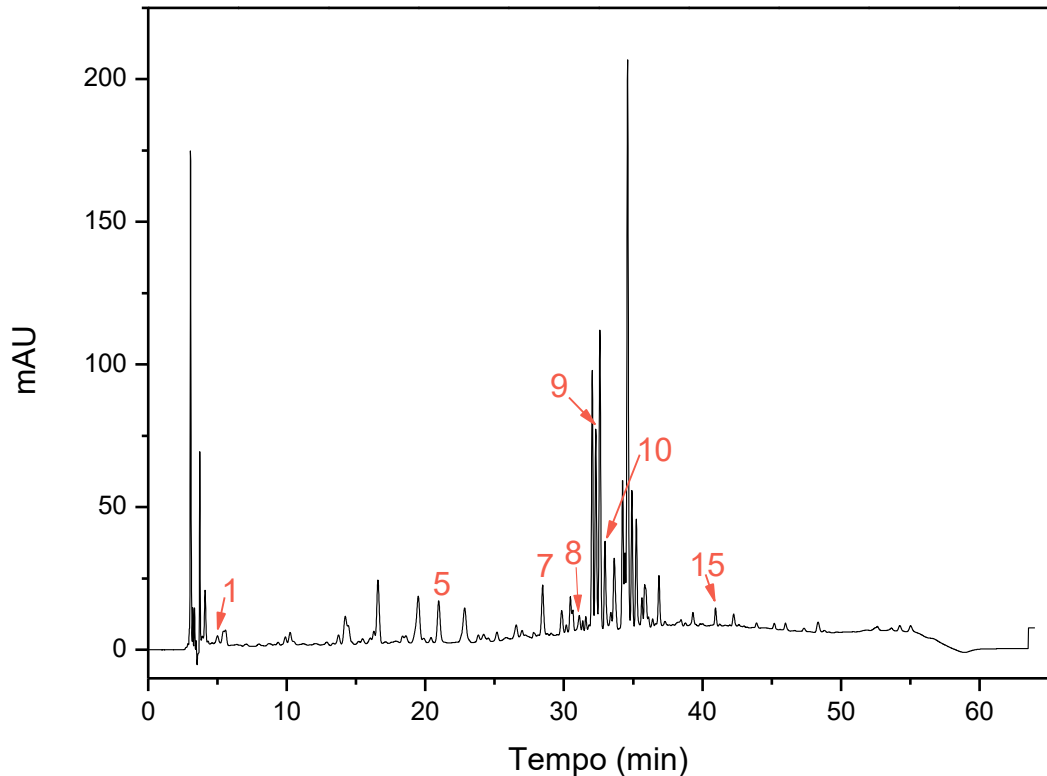


Observa-se que dos compostos identificados rutina (9) apresenta-se em maior quantidade ($37,54 \text{ mg g}^{-1}$), seguido de isoquercetina (10) ($14,27 \text{ mg g}^{-1}$). A concentração de rutina é 1,8 vezes maior do que a encontrada no EHPA.

O ácido cafeico também se encontra em grande quantidade na Fr-Ace, sendo que sua concentração é 5,9 vezes maior nessa amostra do que no EHPA. Por outro lado, esse composto não foi relatado em extratos de acetona e etanol das folhas de *P. aculeata* no estudo de Cruz et al. (2021).

Na fração de butanol (Figura 24) foram identificados ácido gálico, cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, rutina, isoquercetina e quercetina.

Figura 24 - Cromatograma da fração em butanol - ácido gálico (**1**), ácido cafeico (**5**), ácido cumárico (**7**), ácido ferúlico (**8**), rutina (**9**), isoquercetina (**10**) e quercetina (**15**)



Observa-se que dos compostos identificados rutina (**9**) apresenta-se em maior quantidade ($39,07 \text{ mg g}^{-1}$), seguida de isoquercetina (**10**) ($21,46 \text{ mg g}^{-1}$). A concentração de rutina é maior do que a encontrada no EH e demais frações, sendo apenas estatisticamente igual à da Fr-Ace.

É importante destacar que existem poucos estudos na literatura que realizaram o fracionamento a partir o extrato hidroalcoólico de folhas de *P. aculeata*. O fracionamento com diferentes solventes mostrou-se uma alternativa interessante para se obter frações com maior concentração de compostos fenólicos, uma vez que, a concentração dos compostos analisados foi sempre maior nas frações do que no extrato hidroalcoólico.

Estudos relatam a presença de ácido clorogênico em altas quantidades em algumas amostras obtidas de folhas de *Pereskia aculeata*, seguido dos ácidos cafeico, p-cumárico e ferúlico em menores quantidades (SOUZA, 2014; AGOSTINI-COSTA, 2020). Neste trabalho o ácido clorogênico, assim como, catequina, epicatequina, ácido isoclorogênico, ácido salicílico, astragalina, miricetina e canferol não foram identificados.

De acordo com Agostini-Costa (2020), quercetina, isorhamnetina e canferol constituem os principais flavonóis encontrados na família Cactaceae. Contudo, essas agliconas podem conter diferentes estruturas de glicosídeos que ainda precisam ser completamente determinadas em todos os cactos, especialmente nas espécies silvestres. Além disso, o efeito das frações glicosídicas, como antimicrobianos, anti-inflamatórios, cicatrizantes e contra doenças metabólicas, também deve ser melhor investigado.

Torres et al. (2022) realizaram uma sequência de extrações das folhas de *P. aculeata*: extração com fluido supercrítico, extração com líquido pressurizado usando etanol e água e observaram a presença de vários compostos fenólicos. Em especial, os derivados de flavonoides e ácidos orgânicos como derivados de quercetina, ácido cafeico e caftárico, canferol, rutina e derivados de isorhamnetina.

Em estudo com as polpas dos frutos de *P. aculeata* observou-se a presença de altos teores de ácido cafeico ($4,9 \text{ mg kg}^{-1}$), rutina ($3,9 \text{ mg kg}^{-1}$) e hesperidina ($1,7 \text{ mg kg}^{-1}$). Já nas sementes observou-se quantidades detectáveis de galangina ($1,1 \text{ mg kg}^{-1}$) e ácido ferúlico ($0,3 \text{ mg kg}^{-1}$) (HOFF et al., 2022).

Sabe-se que os efeitos genéticos, assim como, as condições ambientais e fisiológicas têm alto impacto no tipo de composto bioativo, influenciando na complexidade da composição dos cactos, e todos esses efeitos ainda precisam ser mais bem estudados nas espécies de Pereskioideae mais consumidas (AGOSTINI-COSTA, 2020).

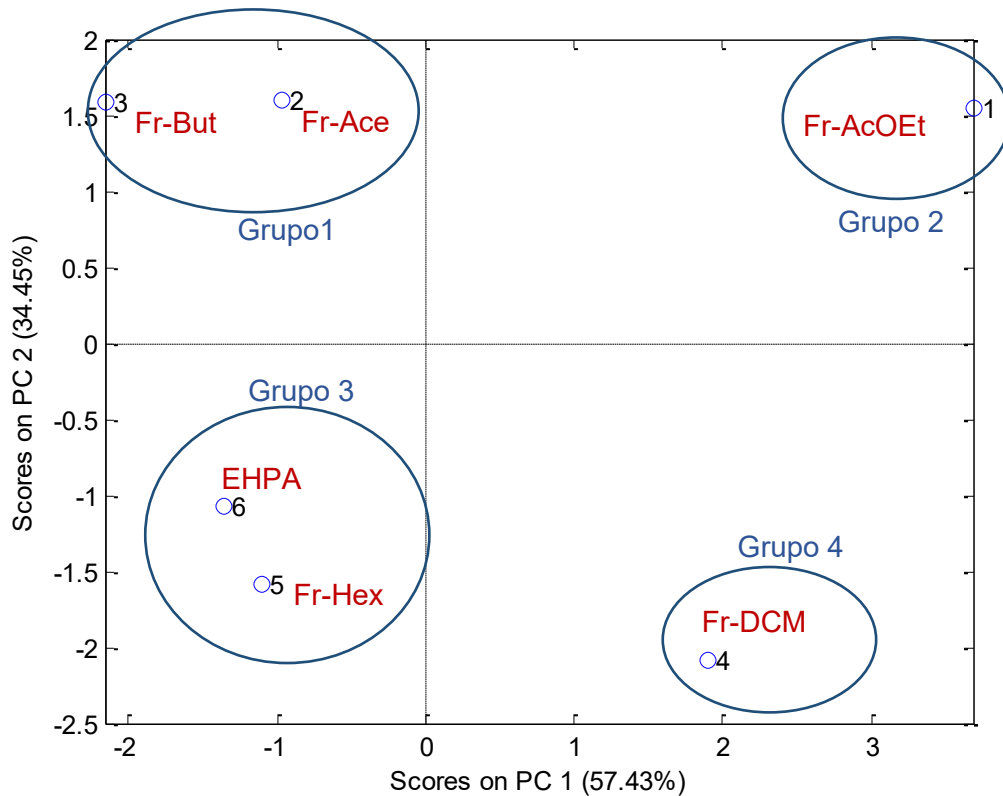
5.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

Os dados obtidos pela análise quantitativa, do extrato e das frações, por CLAE foram analisados por PCA. Com a PCA é possível verificar a formação de grupos entre as amostras e quais variáveis são responsáveis por esses agrupamentos (JESUS et al., 2019).

A matriz X é formada por 9 colunas e 6 linhas. As duas primeiras PCs juntas explicam 91,88% da variância total dos dados (PC1 57,43% e PC2 34,45%) (Figura 25).

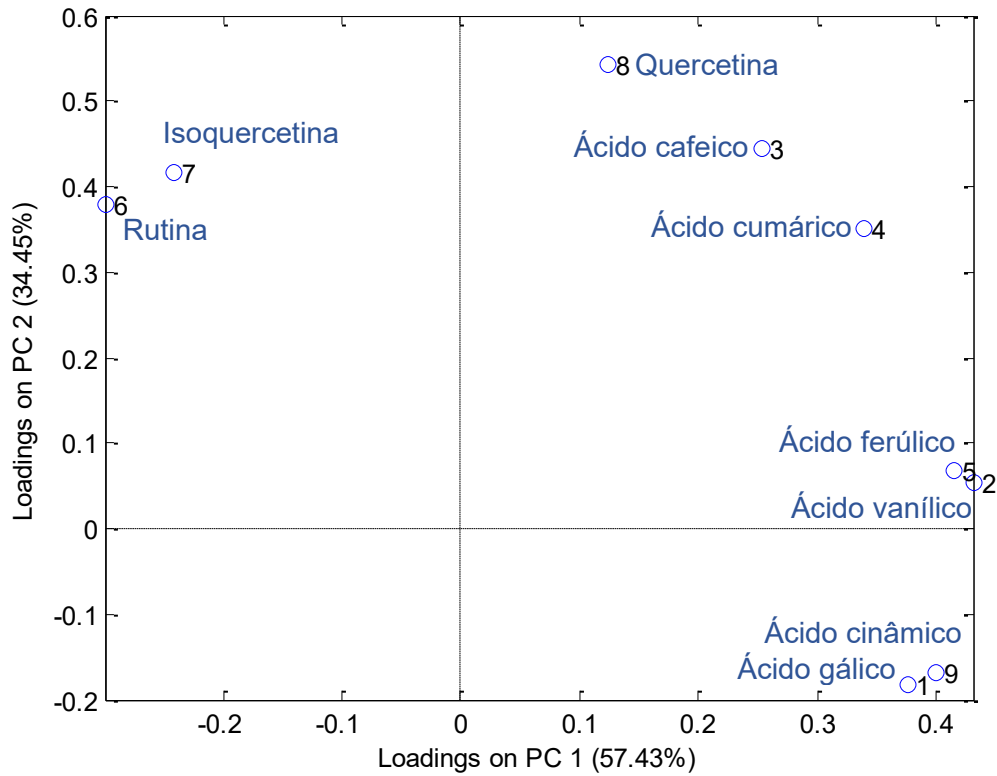
O gráfico de *scores* indicou a formação de 4 grupos. O grupo 1 é formado por Fr-Ace e Fr-But, o grupo 2 é formado pela Fr-AcOEt, o grupo 3 é formado por EHPA e Fr-Hex e, por fim, o grupo 4 é formado pela Fr-DCM.

Figura 25 - Gráfico de *scores* dos dados obtidos por CLAE das folhas de *P. aculeata*



Quando se analisa o gráfico de *loadings* (Figura 26) é possível observar que rutina e isoquercetina estão presentes em maior quantidade em Fr-Ace e Fr-But, ou seja, essas substâncias são responsáveis por agrupar as duas frações e separá-las das demais amostras.

Figura 26 - Gráfico de *loadings* dos dados obtidos por CLAE das folhas de *P. aculeata*



É possível observar que as substâncias, quercetina, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido vanílico e ácido cumárico, são responsáveis por separar a Fr-AcEOt das demais amostras, pois estão em maior quantidade nessa fração. Foi possível concluir, na análise por CLAE, que a Fr-AcEOt apresenta maior quantidade desses compostos, quando comparado ao extrato e as demais frações.

O ácido cinâmico e o ácido gálico encontram-se em maior quantidade na Fr-DCM, ou seja, são os responsáveis pela separação dessa amostra das demais. Por outro lado, quando analisamos o EHPA e a Fr-Hex observa-se que essas amostras possuem as menores quantidades de todos os compostos analisados, e, por isso, foram agrupadas pela PCA.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO E FRAÇÕES POR HPLC-ESI-QTOF-MS/MS

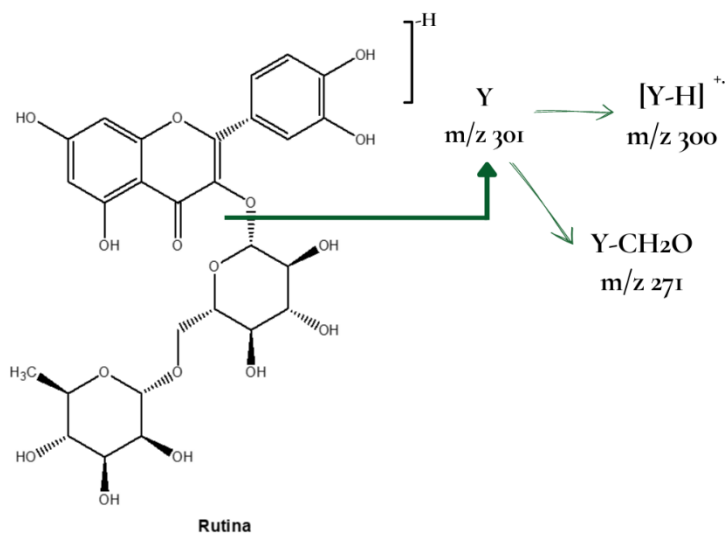
O extrato hidroalcolico e as frações das folhas de *P. aculeata* foram analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução. Para identificação foram considerados os seguintes critérios: comparação de massa exata (ppm), fórmula molecular, comparação com a literatura e bancos de dados como: GNPS (do inglês: Global Natural Products Social Molecular Networking) e PubChem.

A análise por espectrometria de massas de alta resolução resultou na identificação de 7 compostos na Fr-But, 8 compostos na Fr-Ace, 9 compostos no EH, 10 compostos nas Fr-Hex e Fr-DCM e 14 compostos na Fr-AcOEt (Tabela 6).

A rutina e a isoquercetina foram identificadas em todas as amostras analisadas, exceto na fração acetato de etila e diclorometano, respectivamente. É importante destacar que a rutina e a isoquercetina também foram identificadas nas amostras na análise por CLAE.

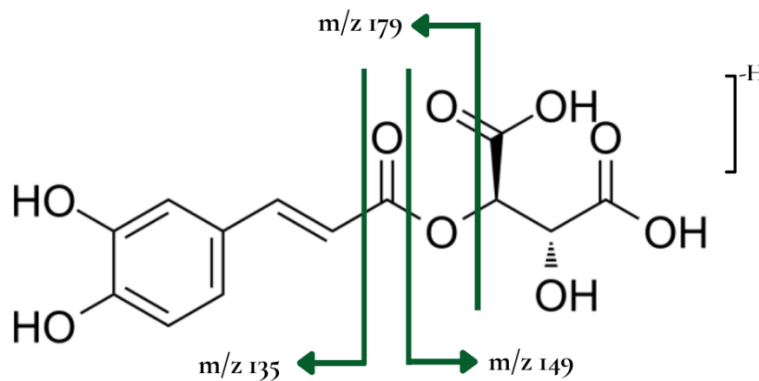
Tanto a rutina (Figura 27) quanto a isoquercetina apresentaram íon fragmento característico resultante da eliminação da porção de açúcar $[Y]^-$ e do radical H, produzindo o íon radical $[Y - H]^\cdot$ em m/z 300, além disso observa-se o íon fragmento em m/z 271 devido à perda de $[Y - CHO]$ (KUMAR et al., 2017).

Figura 27 - Proposta de fragmentação da rutina



Alguns ácidos orgânicos foram identificados nas amostras analisadas. O composto identificado em 20,7 min, no EHPA, apresentou íon precursor m/z 311 [H-1], que produziu os fragmentos com m/z 179, 149 e 135 característicos da fragmentação do ácido caftárico (Figura 28). Esse composto já foi reportado em outros trabalhos como composto majoritário no extrato hidroalcolico das folhas de *P. aculeata* (GARCIA et al., 2019; CRUZ et al., 2021). Ácido caftárico tem sido investigado por seus potenciais antioxidantes, anti-inflamatórios e antimutagênicos (GARCIA et al., 2019)

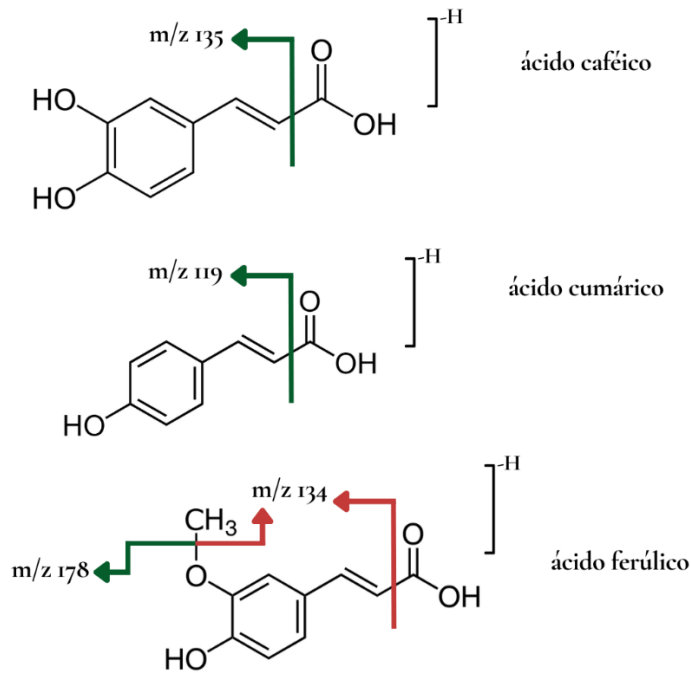
Figura 28 - Proposta de Fragmentação do Ácido Caftárico



Os ácidos cafeico, cumárico e ferúlico foram identificados em 23,5 min, 30,1 min e 31,9 min, respectivamente, na fração de acetato de etila. Esses ácidos orgânicos foram identificados em todas as amostras analisadas por CLAE, porém, destacam-se como compostos majoritários na fração de acetato de etila. O ácido ferúlico também foi identificado por espectrometria de massas de alta resolução na fração de diclorometano em 31,9 min.

Tanto o ácido caféico quanto o ácido cumárico apresentam fragmentos correspondentes a perda de dióxido de carbono, com m/z 134 e 119 [M-H-CO₂]⁻, respectivamente. Já o ácido ferúlico apresenta dois fragmentos com m/z de 178 e 134 que correspondem a perda de grupo metila [M-H-CH₃]⁻ e perda de grupo metila e dióxido de carbono [M-H-CO₂-CH₃]⁻, respectivamente (Figura 29).

Figura 29 -Proposta de fragmentação ácido caféico, ácido cumárico e ácido ferúlico



O ácido cafeico encontrado nas folhas de *P. aculeata* tem potencial de inibir a geração de espécies reativas de oxigênio enfatizando novamente a utilização dessa planta como fonte alternativa de compostos fenólicos, principalmente para populações mais carentes. Os ácidos cafeico, cumárico e ferúlico também se destacam por apresentarem atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória, auxiliando na prevenção de diversas doenças crônicas não transmissíveis, como câncer e diabetes (SOUZA et al., 2021).

O ácido azeláico foi identificado em todas as amostras analisadas, exceto no extrato hidroalcolóico. Esse composto também foi identificado por Souza et al. (2022) em estudo com folhas de *P. aculeata* coletadas em diferentes estações do ano. Os autores observaram que o ácido azeláico está presente nas amostras de inverno, e não foi identificado nas amostras de outono. Sugere-se que o fragmento com m/z 125 seja correspondente a perda de uma molécula de água e dióxido de carbono [$M-H-CO_2-H_2O$].

O ácido (10E,15E)-9,12,13-trihidroxiocetadeca-10,15-dienóico foi identificado em 44,2 min na fração hexânica, enquanto o ácido 16-hidroxi-9-oxooctadeca-10,12,14-trienóico foi identificado em 40 min na fração acetona. Nas frações diclorometano e acetato de etila foram identificados os ácidos (10E,15E)-9,12,13-

trihidroxiocetadeca-10,15-dienóico; 9,12,13-trihidroxiocetadec-10-enóico e 16-hidroxi-9-oxooctadeca-10,12,14-trienóico.

Os três ácidos mencionados anteriormente ainda não tinham sido identificados em amostras de *P. aculeata*, contudo, os ácidos (10E,15E)-9,12,13-trihidroxiocetadeca-10,15-dienóico e 9,12,13-trihidroxiocetadec-10-enóico foram reportados em estudos com o extrato de *Glochidion velutinum*, sendo que essas amostras parecem apresentar efeitos citotóxicos promissores contra células de câncer de próstata e mama (SHAH et al, 2022).

A isoramnetina é um flavonol que, assim como, seus derivados glicosilados, como Isoramnetina-O-pentosídeo-O-rutinosídeo, Isoramnetina-O-pentosídeo-O-hexosídeo e Isoramnetina-3-O-rutinosídeo, já foi reportada em outros estudos com *Pereskia aculeata* (GARCIA et al., 2019; HOFF et al., 2022). Neste trabalho foram encontrados Isoramnetina-3-O-galactosídeo-6"-ramnosídeo em todas as frações analisadas e Isoramnetina-3-O-glicosídeo em todas as frações, exceto na fração diclorometano.

Tanto a Isoramnetina-3-O-glicosídeo quanto a Isoramnetina-3-O-galactosídeo-6"-ramnosídeo apresentam fragmentos com m/z correspondente a perda das moléculas de açúcar. Isoramnetina-3-O-glicosídeo apresenta um fragmento com m/z 315 que corresponde a perda da porção glicosídeo $[Y]^-$, um íon radical $[Y - H]^\cdot$ em m/z 314 e um íon fragmento em m/z 271 que corresponde a perda do radical CH_3 do íon $[Y]^-$, seguida pela perda adicional de CHO (SRISEADKA et al., 2012). Já a Isoramnetina-3-O-galactosídeo-6"-ramnosídeo apresenta um fragmento com m/z 299 que corresponde a perda das duas moléculas de açúcar e de um grupo metila.

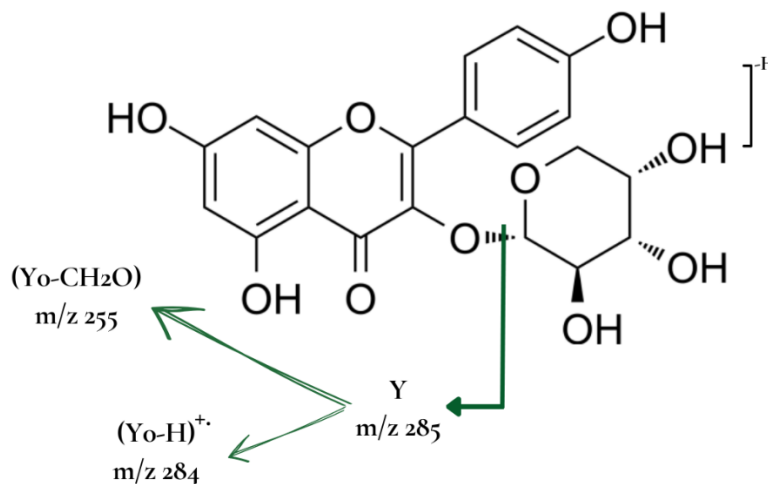
Quercetina-ramnosídeo-hexosídeo-pentosídeo foi identificada no extrato hidroalcolóico e na fração hexânica em 29,6 min e 29,7 min, respectivamente. Esse mesmo composto foi identificado no trabalho de Cruz et al. (2021) em extrato otimizado de folhas de *P. aculeata*.

Quercetina-3-O-xilosídeo foi identificada em todas as frações analisadas, exceto na fração de diclorometano. Quercetina e seus derivados glicosilados como, quercetina-O-pentosídeo-O-rutinosídeo e quercetina-O-pentosídeo-O-hexosídeo foram anteriormente reportadas em amostras das folhas de *P. aculeata* (GARCIA et al, 2019; SOUZA et al., 2021).

Tanto a quercetina-ramnosideo-hexosideo-pentosideo quanto a quercetina-3-O-xilosideo apresentam fragmentos correspondentes à perda de moléculas de açúcares, com m/z 300 e 301, respectivamente.

Canferol-3-O-arabinosideo foi identificado apenas no extrato de acetato etila em 35,1min com íon precursor m/z 417,0907, que fragmenta em m/z 284 íon característico da perda da molécula de açúcar $[Y]^-$ e do radical H, produzindo o íon radical $[Y-H]^-$. Observa-se também íon fragmento em m/z 255 referente a perda de grupo $[Y-CH_2O]^-$ (Figura 30) (KUMAR et al.,2017).

Figura 30 - Proposta de fragmentação do Canferol-3-O-arabinosideo



Garcia et al. (2019) identificaram no extrato hidroalcolico das folhas de *P. aculeata* um outro derivado do canferol, o canferol-3-O-rutinoside. É importante destacar que na análise por CLAE não foi identificado canferol.

O dissacarídeo trealose foi identificado no extrato hidroalcolico e nas frações de butanol e de acetona com íon precursor m/z 341,11, que fragmenta em m/z 179 correspondente ao grupo C₆H₁₁O₆. Esse composto também foi reportado no trabalho de Liberal e colaboradores (2021), onde analisou-se o extrato hidroetanólico e infusões obtidas a partir de uma planta alimentícia não convencional, a *L. canadensis* que é popularmente conhecida como “almeirão roxo”.

Trealose é utilizado em uma ampla variedade de produtos, incluindo produtos farmacêuticos, alimentos e cosméticos. Esse açúcar tem sido foco de inúmeros estudos pois possui propriedades físicas e químicas muito peculiares, que o diferenciam dos outros açúcares (OHTAKE; WANG, 2011).

A Feruloiltiramina foi identificada em 39 min e 38,9 min nas frações diclorometano e acetato de etila, respectivamente, sendo pela primeira vez reportada nas folhas de *P. aculeata*. Observa-se íon com m/z 148 característico do fragmento $[M-H-C_9H_9O_2]$ (Figura 31). A *trans*-feruloiltiramina e 7'-etoxi-*trans*-feruloiltiramina foram identificadas em outras espécies da família Cactaceae (MACIEL et al., 2016), assim como outros compostos contendo nitrogênio (fenetilaminas, alcalóides isoquinolínicos e betalaínas) (AGOSTINI-COSTA, 2020).

Figura 31 - Proposta de fragmentação da feruloiltiramina

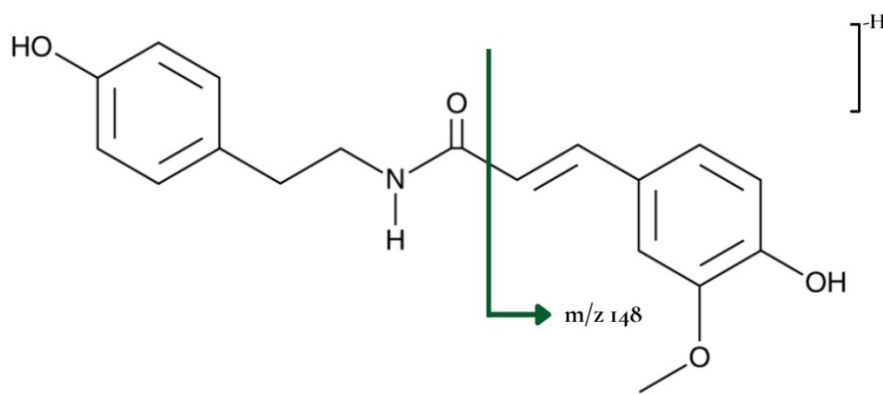


Tabela 6 - Compostos identificados por HPLC-ESI-QTOF-MS/MS no extrato hidroalcolico e frações das folhas de *P. aculeata*

EXTRATO HIDROALCÓOLICO								
Nome do composto sugerido	tR(min)	Fórmula Molecular	Desvio padrão da massa (ppm)	Massa Medida (Da)	Massa Teórica (Da)	Fragmentos m/z	Classe	Referência
Trealose	2,8	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	4,40	341,1105	341,1090	89,0257 (47,17) 179,0561 (28,30)	Dissacarídeo	GNPS:Pubchem: Cod:5878729
Ácido cítrico	4,1	C ₆ H ₈ O ₇	6,28	191,0209	191,0197	111,0098 (100) 87,0082 (43,21)	Ácido carboxílico	GNPS:Pubchem: Cod:311
Ácido Caftárico	20,7	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	10,61	311,0436	311,0403	179,0358 (100) 149,0153 (53,97) 135,0454 (49,21)	Composto Polifenólico	PUBChem:Cod:6 440397
Quercetina-Ramnosideo-Hexosideo-Pentosideo	29,6	C ₃₂ H ₃₈ O ₂₀	-0,94	741,1913	741,1920	300,0277 (100) 271,0273 (93,02) 255,0333	Flavonol	GNPS:Pubchem. Cod:5280805
Rutina	30,7	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	5,42	609,1493	609,1460	(48,84) 300,0339 (36,96) 300,0305 (100) 271,0267	Flavonol	GNPS:Pubchem: Cod:5280804
Isoquercetina Isoramnetina-3-O-galactosídeo-6"-ramnosideo	31,9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	5,18	463,0904	463,0880	(75,61) 301,0370 (50) 271,0221 (71,05) 299,0247	Flavonol	GNPS:Pubchem: Cod:44259338
Quercetina-3-O-xilosideo	33,1	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	3,21	623,1640	623,1620	(49,09) 300,0303 (100) 301,0327	Flavonol	GNPS:Pubchem. Cod:5878729
	33,4	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	4,62	433,0800	433,0780	(82,14) 271,0220 (68,63)	Flavonol	

Isoramnetin-3-O-glicosídeo	34,3	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	4,19	477,1058	477,1038	315,0461 (100) 314,0458 (66,67) 271,0271 (36,14)	Flavonol	Pubchem: Cod: 5318645
FRAÇÃO HEXÂNICA								
Sacarose	2,7	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	9,38	341,1122	341,1090	179,0601 (100) 161,0491 (40,82) 143,0382 (39,58)	Dissacarídeo	GNPS: Pubchem: Cod: 5988
Ácido Cítrico	3,9	C ₆ H ₈ O ₇	9,42	191,0215	191,0197	111,0096 (100) 87,0092 (48,28)	Ácido Carboxílico	GNPS: Pubchem: Cod 311
Quercetina-Ramnosídeo-Hexosídeo-Pentosídeo	29,7	C ₃₂ H ₃₈ O ₂₀	2,97	741,1942	741,1920	300,0336 (100) 300,0342 (64,71) 271,02	Flavonol	GNPS: Pubchem
Rutina	31,2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	5,42	609,1493	609,1460	(61,76) 255,0299 (26,47) 300,0309 (100) 301,0339	Flavonol	Cod: 5280805 GNPS: Pubchem:
Isoquercetina	31,9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	8,85	463,0921	463,0880	(77,78) 271,0285 (55,56)	Flavonol	Cod: 5280804
Isoramnetina-3-O-galactosídeo-6"-ramnosídeo	33,2	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	9,95	623,1682	623,1620	271,0275 (70,45) 315,0562 (64) 299,0240 (61,11)	Flavonol	GNPS: Pubchem: Cod: 44259338
Quercetina-3-O-xilosídeo	33,6	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	9,47	433,0821	433,0780	300,0329 (100) 301,0334 (83,04) 271,0255 (68,63)	Flavonol	GNPS: Pubchem: Cod: 5878729
Isoramnetin-3-O-glicosídeo	34,3	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	8,80	477,1080	477,1038	315,0527 (100) 314,0476 (73,53) 271,0273 (69,70)	Flavonol	Pubchem: Cod: 5318645
Ácido azelaico	35,8	C ₉ H ₁₆ O ₄	11,76	187,0998	187,0976	125,1010 (100)	Ácido Dicarboxílico	Pubchem: Cod: 22 66
ácido (10E,15E)-9,12,13-	44,2	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	10,70	327,2215	327,2180	211,1361 (50) 229,1475 (36,73)	Outro octadecanóide	GNPS: Pubchem: Cod. 72732143

trihidroxiocadeca-
10,15-dienóico

FRAÇÃO DE DICLOROMETANO									
						179,0600 (100) 161,0474			Pubchem:Cod:59
Sacarose	2,7	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	10,55	341,1126	341,1090	(81,82) 143,0381 (72,78)	Dissacarídeo	88	
						111,0099 (100) 87,0099	Ácido		Pubchem:Cod:31
Ácido Cítrico	3,9	C ₆ H ₈ O ₇	13,09	191,0222	191,0197	(55,56)	Carboxílico	1	
						271,0265 (98,11) 300,0370			GNPS:Pubchem:
Rutina	31,3	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	14,28	609,1547	609,1460	(45,59) 255,0330 (34,57)	Flavonol		Cod: 5280805
						134,0396 (100) 178,0328	ácido		Pubchem:
Ácido Ferúlico	31,9	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	16,58	193,0542	193,0510	(31,82)	hidroxicinâmico		Cod:445858
Isoramnetina-3-O- galactosideo-6"- ramnosideo	33,5	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	14,28	623,1709	623,1620	271,0276 (77,05) 315,0601 (58,93) 299,0260 (54,05)	Flavonol		GNPS:Pubchem: Cod:44259338
							Ácido		GNPS:Pubchem
Ácido azelaico	35,7	C ₉ H ₁₆ O ₄	16,57	187,1007	187,0976	125,1003(100)	Dicarboxílico		Cod: 2266
						148,0547 (100) 178,0576			Pubchem:Cod:52
Feruloiltiramina	39,0	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	14,42	312,1286	312,1241	(72,50)	Fenol		80537
ácido (10E,15E)- 9,12,13- trihidroxiocadeca- 10,15-dienóico	44,2	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	14,36	327,2227	327,2180	211,1371 (54,22) 229,1495 (30,12)	Outro octadecanóide		GNPS:Pubchem: Cod.72732143
ácido 9,12,13- trihidroxiocadec-10- enóico	47,4	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	21,87	329,2384	329,2312	211,1359 (29,63) 229,1515 (15,58)	Outro octadecanóide		GNPS:Pubchem: Cod: 153001

Ácido 16-hidroxi-9-oxooctadeca-10,12,14-trienóico	48,1	C ₁₈ H ₂₈ O ₄	17,58	307,1964	307,1910	185,1222 (100) 235,1345 (34,62) 121,0656 (55,17)	Lipídeos	Pubchem: Cod:57137439
---	------	--	-------	----------	----------	---	----------	--------------------------

FRAÇÃO DE ACETATO DE ETILA

							Ácido	Pubchem:Cod:
Ácido Caféico	23,5	C ₉ H ₈ O ₄	16,76	179,0390	179,0360	135,0488 (100)	hidroxicinâmico	689043
								Pubchem:Cod:63
Ácido cumárico	30,1	C ₉ H ₈ O ₃	10,43	163,0439	163,0422	119,0534(100)	Ácido Cinâmico	7541
						134,0430 (100) 178,0289	Ácido	Pubchem:Cod:44
Ácido Ferúlico	31,9	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	19,17	193,0547	193,0510	(31,91)	hidroxicinâmico	5858
						300,0357 (100) 271,0288		GNPS:Pubchem
Isoquercetina	32,4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	17,92	463,0963	463,0880	(77,36) 301,0386 (47,22)	Flavonol	Cod:5280804
						151,0071 (100) 179,0041		GNPS/Pubchem:
Quercetina	40,6	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	22,92	301,0419	301,0350	(44,86)	Flavonol	Cod:5280343
							Ácido	GNPS/Pubchem:
Ácido azelaico	35,4	C ₉ H ₁₆ O ₄	22,98	187,1019	187,0976	125,1026 (100)	Dicarboxílico	Cod:2266
Isoramnetina-3-O-galactosideo-6"-ramnosideo	33,4	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	20,06	623,1745	623,1620	299,0299 (100) 271,0259 (81,08)	Flavonol	GNPS:Pubchem: Cod:44259338
Quercetina-3-O-xilosideo	33,4	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	17,78	433,0857	433,0780	300,0330 (100) 301,0378 (73,68) 271,0299 (41,86)	Flavonol	GNPS:Pubchem: Cod.5878729
Isoramnetin-3-O-glicosideo	34,3	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	19,28	477,1130	477,1038	314,0490 (51,81) 271,02749 (27,78)	Flavonol	GNPS:Pubchem: Cod:5318645
Canferol-3-O-arabinosideo	35,1	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	18,46	417,0907	417,0830	284,0382 (76,47) 255,0368 (50) 227,0382 (44)	Flavonol	GNPS:Pubchem: Cod:5481882

Feruloiltiramina	38,9	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	20,18	312,1303	312,1240	148,0558 (100) 178,0543 (59,26)	Fenol	GNPS:Pubchem: Cod:5280537
Ácido 16-hidroxi-9-oxooctadeca-10,12,14-trienóico	39,7	C ₁₈ H ₂₈ O ₄	22,79	307,1980	307,1910	185,1245 (100) 235,1369 (84,00) 121,0692 (47,06)	Lipídeo	GNPS/Pubchem: 57137439
ácido (10 <i>E</i> ,15 <i>E</i>)-9,12,13-trihidroxiocetadeca-10,15-dienóico	44	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	20,78	327,2248	327,2180	211,1379 (58) 229,1492 (42,86)	Outro octadecanóide	GNPS:Pubchem: Cod:72732143
ácido 9,12,13-trihidroxiocetadec-10-enóico	47,3	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	27,03	329,2401	329,2312	167,1458 (35,14) 211,1377 (18,87)	Outro octadecanóide	GNPS:Pubchem: Cod:153001

FRAÇÃO DE ACETONA

Trealose	2,7	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	21,99	341,1165	341,1090	89,0271 (55,17) 179,0595 (34,78)	Dissacarídeo	Pubchem:Cod:74 27
Rutina	31,2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	22,65	609,1598	609,1460	271,0320 (100) 255,0344 (54,10) 300,0370 (32,43)	Flavonol	GNPS:Pubchem Cod:5280805
Isoquercetina	32,4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	22,67	463,0985	463,0880	300,0336 (100) 301,0398 (40,79) 271,0268 (54,17)	Flavonol	Pubchem Cod: 5280804
Quercetina-3-O-xilosideo	33,5	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	21,71	433,0874	433,0780	300,0346 (100) 301,0394 (64) 271,0290 (50)	Flavonol	GNPS:Pubchem: Cod:5878729
Isoramnetina-3-O-galactosideo-6"-ramnosideo	33,5	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	22,15	623,1758	623,1620	271,0290 (65,79) 315,0542 (55,56) 299,0282 (42,68)	Flavonol	GNPS:Pubchem: Cod:44259338
Isoramnetin-3-O-glicosideo	34,3	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	22,43	477,1145	477,1038	314,0492 (53,95) 271,0281 (33,33)	Flavonol	Pubchem:Cod:53 18645

Ácido azelaico	35,9	C ₉ H ₁₆ O ₄	26,19	187,1025	187,0976	125,1005 (100)	Ácido Dicarboxílico	Pubchem:Cod:22 66
Ácido 16-hidroxi-9-oxooctadeca-10,12,14-trienóico	40,0	C ₁₈ H ₂₈ O ₄	25,72	307,1989	307,1910	185,1236 (100) 121,0715 (84,21) 235,1377 (68,42)	Lípídeos	GNPS/Pubchem: Cod:57137439
FRAÇÃO DE BUTANOL								
Trealose	2,7	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	25,51	341,1177	341,1090	89,0289 (48,28) 179,0552 (44,12)	Dissacarídeo	Pubchem:Cod:74 27
Rutina	31,1	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	25,28	609,1614	609,1460	271,0322 (100) 255,0362 (41,43) 300,0328 (33,93) 300,0348 (100) 301,0397	Flavonol	GNPS:Pubchem Cod:5280805
Isoquercetina	32,2	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	26,13	463,1001	463,0880	(39,39) 271,0276 (48,57)	Flavonol	GNPS:Pubchem Cod:5280804
Isoramnetina-3-O-galactosídeo-6"-ramnosídeo	33,5	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	24,87	623,1775	623,1620	271,0297 (71,67) 315,0578 (53,85) 299,0258 (44)	Flavonol	GNPS:Pubchem: Cod:44259338
Quercetina-3-O-xilosídeo	33,5	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	24,71	433,0887	433,0780	300,0347 (100) 301,0374 (45,83) 271,0299 (69,33)	Flavonol	GNPS:Pubchem: Cod:5878729
Isoramnetin-3-O-glicosídeo	34,4	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	25,15	477,1158	477,1038	314,0448 (55,26) 271,0276 (38,78)	Flavonol	Pubchem:Cod: 5318645
Ácido azelaico	36	C ₉ H ₁₆ O ₄	34,74	187,1041	187,0976	125,1007 (62,16)	Ácido Dicarboxílico	Pubchem:Cod:22 66

5.5 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO E FRAÇÕES

A capacidade antioxidante do extrato hidroalcóolico e das frações obtidas das folhas de *P. aculeata* foi determinada utilizando métodos baseados em diferentes mecanismos antioxidantes, isso permite detectar o potencial antioxidante de maneira mais abrangente.

Sabe-se que, é necessário empregar mais de dois métodos para que seja possível determinar a capacidade antioxidante total de extratos vegetais, uma vez que os compostos antioxidantes atuam por mecanismos distintos e que, até agora, nenhum único método informa verdadeiramente essa capacidade (GONÇALVES et al., 2019).

Os métodos utilizados neste trabalho foram: poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), capacidade de sequestro do radical DPPH e capacidade de sequestro do radical ABTS. Além disso, realizou-se a determinação do teor de compostos fenólicos totais (TCF).

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados das análises de atividade antioxidante para o extrato hidroalcóolico e frações.

Tabela 7 - Capacidade Antioxidante do Extrato Hidroalcóolico e Frações das folhas de *P. aculeata*

Amostras	TCF (mg EAG g ⁻¹)	ABTS (μmol g ⁻¹)	DPPH (μmol g ⁻¹)	FRAP (μmol FeSO ₄ g ⁻¹)
EHPA	84,10 ± 2,44 ^a	417,10 ± 26,65 ^b	455,24 ± 39,74 ^a	1107,19 ± 78,37 ^{cd}
Fr-Hex	22,70 ± 0,90 ^f	119,70 ± 7,82 ^c	83,62 ± 5,71 ^d	517,00 ± 24,43 ^e
Fr-DCM	44,20 ± 1,22 ^e	78,92 ± 7,41 ^d	63,85 ± 1,84 ^e	1048,57 ± 52,52 ^d
Fr-AcOEt	59,30 ± 1,05 ^c	494,85 ± 34,89 ^a	160,63 ± 11,47 ^c	1250,90 ± 98,23 ^{ab}
Fr-Ace	72,70 ± 1,14 ^b	482,30 ± 32,14 ^a	229,41 ± 22,62 ^b	1343,17 ± 90,81 ^a
Fr-But	54,60 ± 2,20 ^d	470,40 ± 13,52 ^a	236,58 ± 9,12 ^b	1215,77 ± 121,41 ^{bc}

Os valores apresentados são a média ± desvio padrão.

É importante destacar que a atividade antioxidante de amostras de folhas de *P. aculeata*, obtidas de fracionamento a partir o extrato hidroalcóolico, ainda não foi reportada na literatura. Contudo, são relatados alguns trabalhos que trazem a atividade antioxidante dessa planta como mostra a tabela 8.

Tabela 8 – Atividade Antioxidante de folhas de *P. aculeata* relada na literatura

Referência	Amostra	TCF	DPPH (EC50)	ABTS	FRAP
Sousa et al. (2014)	Extrato de Acetona 80%	117,8 EAG/g de extrato	49,1 µg/mL		
	Extrato Hidroetanólico (70%)	95,6 EAG/g de extrato	56,6 µg/mL		
	Extrato Aquoso	50,1 EAG/g de extrato	106,1 µg/mL		
Pinto et al. (2014)	Extrato Metanólico	17,27 EAT mg/g de extrato			
	Fração Hexânica	23,54 EAT mg/g de extrato			
	Fração Diclorometano	49,11 EAT mg/g de extrato			
	Fração de acetato de etila	3,95 EAT mg/g de extrato			
Souza et al. (2016)	Extrato em éter de petróleo	11,78 mg EAG/g de extrato	18,27 mg/mL		
	Extrato em Clorofórmio	5,17 mg EAG/g de extrato	81,09 mg/mL		
	Extrato em Metanol	15,04 mg EAG/g de extrato	7,09 mg/mL		
Carvalho et al. (2014)	Extrato Metanólico (plantas cultivadas em diferentes substratos)	108,2 a 139,4 mg/L			
Garcia et al. (2019)	Extrato Hidrometanólico	23,75 mg/g	72,9 µg/mL	(EC50) - 40,5 µg/mL	

Silva et al. (2018)	Extrato Metanólico	2,66 EAG/kg de planta seca.	44,99 g de trolox/kg de planta fresca.		
Maciel et al (2021)	Extrato Aquoso	151,5 mg EAG por grama de extrato			
Torres et al; (2022a)	Diferentes métodos e solventes	3,71 a 60,09 mg EAG/g de extrato	0,31 a 7,83 mg/mL		0,02 a 0,25 mmolTE (g ⁻¹)
Torres et al; (2022b)	Diferentes métodos e solventes	5 a 82 mg EAG/g de extrato	293 a 7829 µg/mL	362 a 1315 µmol de trolox/g	
Massocatto et al. (2022)	Extrato hidroalcolico		3351,5 µg/mL	EC50- 2851,7 µg/mL	17,7 µM TE/100 g peso seco
Cruz et al (2021)	Variando a proporção de água, etanol e acetona	23 a 66 09 mg EAG/g de extrato	11 a 44 mg EAA/g		29 a 62 mg EAA/g

No presente estudo, observou-se que o maior teor de compostos fenólicos foi encontrado no extrato hidroalcolóico, seguido da fração acetona, com diferença estatística significativa entre as duas amostras. O teor de fenólicos totais variou entre 22,70 e 84,10 mg EAG por grama de extrato ou fração.

Sousa et al. (2014) estudando os extratos de folhas de *P. aculeata* observaram resultados semelhantes a este, com a diferença que o extrato com o maior teor de fenóis totais foi o de acetona 80%, seguido do extrato em etanol 70%. Já no trabalho de Pinto (2012), observa-se que a fração diclorometano de folhas de *P. aculeata* apresentou maior teor de flavonoides e compostos fenólicos, seguida da fração hexânica e do extrato metanólico.

De acordo com Souza et al. (2016), o maior teor de compostos fenólicos também foi observado no extrato de maior polaridade, neste caso, o extrato metanólico. Contudo os teores relatados pelos autores são menores do que os observados no presente trabalho.

Por outro lado, Maciel et al. (2021) observaram que os compostos fenólicos foram os componentes majoritários encontrados no extrato aquoso de *P. aculeata*, relatando valores superiores aos obtidos no presente trabalho. Indicando que o solvente utilizado na extração pode ter influência significativa na extração dessa classe de compostos.

Além disso, outros tipos de compostos, como açúcares redutores, que também estão presentes nos extratos vegetais, e podem ser facilmente extraídos com solventes mais polares, também podem reduzir o reagente Folin Ciocalteu, resultando em valores superestimados de compostos fenólicos totais por este método. Por outro lado, os ensaios de Folin-Ciocalteu para determinar o conteúdo fenólico total é simples, conveniente e reprodutível (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Analisando os trabalhos de Torres et al. (2022a,b), observa-se que o teor de fenólicos totais está dentro da faixa relatada no presente estudo, muito embora, os métodos de extração utilizados pelos autores tenham sido diferentes do descrito nesse trabalho. Sendo que, os melhores resultados foram obtidos da extração com líquido pressurizado utilizando etanol como solvente (TORRES et al, 2022a) e nas extrações com líquido pressurizado utilizando etanol e água como solvente (TORRES et al, 2022a).

O ensaio com o radical ABTS mensura a capacidade antioxidante equivalente ao trolox. Para essa análise a capacidade das amostras variou entre 78,92 e 494,85 μmol de trolox por grama de extrato ou fração. Sendo que, os melhores resultados foram obtidos com as frações acetato de etila, acetona e butanol, sem diferença estatística significativa entre as três.

Em outro estudo, os resultados do ensaio com radical ABTS dos extratos de folhas de *P. aculeata* obtidos de várias extrações utilizando métodos diferentes variou de 362 a 1315 μmol de trolox/g, superando os valores obtidos no presente trabalho. Sendo que, o melhor resultado foi obtido da extração de líquido pressurizado utilizando etanol como solvente (TORRES et al., 2022b).

A análise de atividade antioxidante baseada na redução do radical DPPH apresentou melhor resultado com o extrato hidroalcolico, destacando-se por ser diferente estatisticamente de todas as amostras analisadas e praticamente o dobro do resultado obtido com a fração butanol que corresponde a segunda maior atividade, seguida da fração acetona. A fração butanólica e a de acetona não apresentaram diferença estatística significativa entre si, para essa atividade. A capacidade das amostras variou entre 63,85 e 455,24 μmol por grama de extrato ou fração.

De acordo com Souza et al. (2016) o extrato obtido com solvente de maior polaridade também apresentou maior porcentagem de inibição do radical DPPH. Nesse ensaio foi utilizado ácido ascórbico como padrão. A melhor atividade antioxidante foi associada ao maior teor de compostos fenólicos nesse extrato.

Sousa et al. (2014) avaliaram a atividade antioxidante das folhas de *P. aculeata* pelo método espectrofotométrico de sequestro de radical DPPH. Eles observaram que o extrato de acetona 80% mostrou a maior atividade antioxidante, seguido do extrato etanólico 70% e do extrato aquoso.

No trabalho de Torres et al. (2022b) observou-se que os resultados do ensaio de DPPH foi melhor no extrato de folhas de *P. aculeata* obtido por meio de extração com líquido pressurizado utilizando água como solvente, sendo esse resultado estatisticamente igual ao obtido com o antioxidante comercial (Butilhidroxitolueno).

Segundo Garcia et al. (2019) o extrato hidrometanólico de folha de *P. aculeata* apresentou valores relevantes de capacidade antioxidante, com atividades superiores ao Trolox nos ensaios DPPH e ABTS.

Embora os resultados obtidos por diferentes ensaios não sejam diretamente comparáveis devido a diferenças no mecanismo de captura de radicais em cada teste, Massocatto et al. (2022) observaram que a capacidade de eliminação de radicais, apesar de não ter sido significativa, foi maior quando medida pelo ensaio ABTS do que quando avaliada pelo ensaio DPPH.

Analisando a tabela 7, observa-se que os teores de FRAP variam de 1343,17 $\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ para a fração obtida a partir do solvente acetona, até 517 $\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ para a fração hexânica. Os resultados obtidos com a Fr-Acet e a Fr-AceOEt não apresentam diferença estatística significativa entre si.

No trabalho de Torres et al (2022a), a atividade antioxidante dos extratos das folhas de *P. aculeata* foi determinada pelos métodos DPPH e FRAP, onde observou-se que a amostra obtida da extração com líquido pressurizado utilizando água como solvente exibiu a melhor atividade antioxidante. Em geral, os extratos à base de água forneceram as melhores atividades antioxidantes pelos métodos avaliados.

Torres et al. (2022a) afirmam que os solventes polares foram mais eficientes na recuperação de compostos com atividade antioxidante das folhas de *Pereskia aculeata* e que a água e o etanol são essenciais para a obtenção de extratos com alta capacidade antioxidante. No presente estudo também se observou que os extratos obtidos de solventes mais polares apresentaram os melhores resultados de atividade antioxidante.

Considerando os resultados do presente estudo e os trabalhos citados acima, pode-se sugerir que o solvente e método de extração utilizados para preparar um extrato influenciam diretamente em sua composição final e, conseqüentemente, na sua bioatividade.

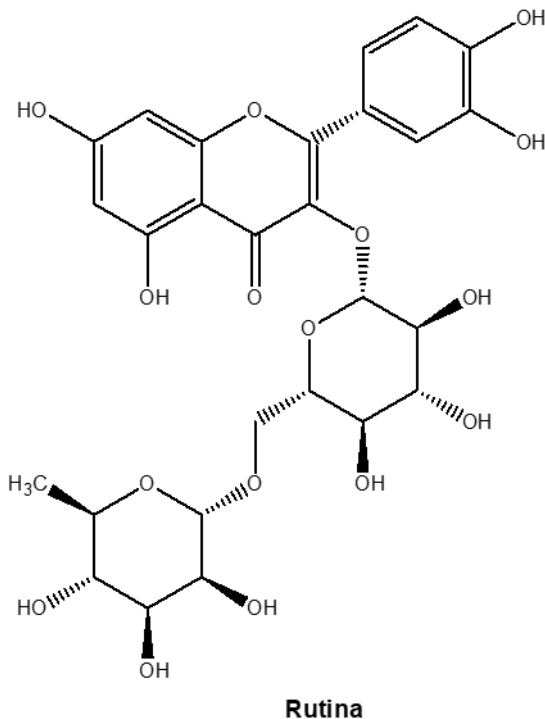
Em todos os ensaios antioxidantes avaliados observa-se que o extrato hidroalcolico e as frações polares apresentam as melhores bioatividades. Quando se compara o perfil químico do extrato hidroalcolico e das frações acetona e butanol observa-se que, todas são caracterizadas pela presença de rutina como substância majoritária em grande quantidade (22,8 mg – 39,0 mg).

O extrato hidroalcolico se destaca na atividade de sequestro do radical DPPH e apresenta rutina (22,8 mg) como composto majoritário. Além disso, o ácido caftárico, que já demonstrou interessante potencial antioxidante (GARCIA et al., 2019) só foi identificado no extrato hidroalcolico.

As frações acetona e butanol apresentam grandes quantidades de rutina (37 mg e 39 mg, respectivamente) e isoquercetina (14,27 mg e 21,46 mg, respectivamente), como foi observado nas análises de CLAE e, por isso, foram agrupadas pela PCA (Figuras 25 e 26), além disso, ambas demonstram boa atividade nos ensaios de DPPH e FRAP.

A rutina já foi reportada com boa atividade antioxidante. Esse composto se caracteriza pela presença da ligação dupla em C2-C3 no anel C, além da presença de hidroxilas fenólicas e sistema orto-dihidroxi no anel B que proporcionam deslocalização de elétrons e, conseqüentemente, contribuem para sua elevada bioatividade (Figura 32) (AYRES et al., 2009; (LATOS-BROZIO; MASEK, 2019).

Figura 32 - Estrutura química da Rutina



Dentro desse contexto, pode-se justificar a melhor atividade antioxidante encontrada no extrato hidroalcolóico e nas frações de acetona e butanol de *P. aculeata*, uma vez que a principal substância presente nessas amostras é a rutina.

É importante destacar que a fração de acetato de etila também apresentou boa atividade nos testes de ABTS e FRAP, e que, algumas substâncias que foram identificadas nessa amostra como: ácidos (10E,15E)-9,12,13-trihidroxi-octadeca-10,15-dienóico; 9,12,13-trihidroxi-octadec-10-enóico e 16-hidroxi-9-oxooctadeca-

10,12,14-trienóico, canferol-3-O-arabinosídeo e feruloiltiramina, foram relatadas pela primeira vez nas folhas de *P. aculeata*, mas parecem apresentar elevada bioatividade (SHAH et al, 2022; GARCIA et al., 2019).

As frações de acetona e butanol apresentaram grande quantidade de compostos fenólicos totais e bons resultados nas análises de ABTS, FRAP e DPPH. Além disso, essas amostras possuem altos teores de rutina e isoquercetina, substâncias conhecidas pela alta atividade antioxidante. Esses dados encorajam a continuação dos estudos com essas frações visando a busca por compostos de alto potencial antioxidante.

6 CONCLUSÃO

As folhas de *Pereskia aculeata* se mostraram como potencial fonte de compostos antioxidantes, o que pode agregar valor nutracêutico a esse alimento. Isso é extremamente relevante uma vez que essa PANC faz parte da dieta de algumas famílias, principalmente as de baixa renda, em alguns países.

Na fração de acetato de etila foi possível identificar a maior quantidade de compostos, tanto na análise por CLAE quando na análise por UPLC-ESI-QTOF-MS/MS.

Rutina foi o composto majoritário no extrato hidroalcolólico e nas frações de hexano, butanol e acetona. Enquanto, ácido caféico e ácido ferúlico foram os compostos majoritários na fração de acetato de etila e diclorometano, respectivamente.

Rutina, isoquercetina, ácido caféico, ácido cumárico e ácido ferúlico foram identificados em todas as amostras analisadas por CLAE. Quercetina-3-O-xilosídeo, Kaempferol-3-O-arabinosídeo, trealose, feruloiltiramina, ácido (10E,15E)-9,12,13-trihidroioctadeca-10,15-dienóico, ácido 9,12,13-trihidroioctadec-10-enóico e ácido 16-hidroxi-9-oxooctadeca-10,12,14-trienóico foram identificados por massas de alta resolução e reportados pela primeira vez nas amostras de *P. aculeata*

A atividade antioxidante está associada à presença de compostos fenólicos e observou-se que a eficiência do processo de extração desses compostos é dependente do solvente selecionado. Os extratos obtidos de solventes mais polares apresentaram os melhores resultados de atividade antioxidante.

O alto teor de compostos fenólicos nas frações de acetona e butanol pode ter uma correlação positiva com a boa atividade antioxidante observada nessas amostras nos ensaios de ABTS, DPPH e FRAP. Da mesma forma, a presença de rutina e isoquercetina, em grande quantidade nessas frações, pode ajudar a explicar essa maior atividade.

Sendo assim, as frações de acetona e butanol podem ser indicadas para continuação dos estudos com as folhas de *P. aculeata*, visando a obtenção de compostos com alta atividade antioxidante.

7 REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T. D. S.; WONDRACECK, D. C.; ROCHA, W. D. S.; SILVA, D. B. DA. Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of *Pereskia aculeata* Miller. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 34, n. 1, p. 234–238, 2012.
- AGOSTINI-COSTA, T. DA S. Bioactive compounds and health benefits of Pereskioideae and Cactoideae: A review. **Food Chemistry**, v. 327, p. 126961, 2020.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; PÊSSOA, G. K. A.; SILVA, D. B.; GOMES, I. S.; SILVA, J. P. Carotenoid composition of berries and leaves from a Cactaceae - *Pereskia* sp. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 178–184, 2014.
- ALBUQUERQUE, B. R.; HELENO, S. A.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. **Food and Function**, v. 12, n. 1, p. 14–29, 2021.
- DE ALMEIDA, M. E. F.; CORRÊA, A. 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, M. E. F. DE; JUNQUEIRA, A. M. B.; SIMÃO, A. A.; CORRÊA, A. D. Caracterização Química Das Hortaliças Não-Convencionais Conhecidas Como Ora-Pro-Nobis. **Biosci. J.**, v. 30, p. 431–439, 2014.
- AYRES, Mariane C. C.; CHAVES, Mariana H.; RINALDO, Daniel; VILEGAS, Wagner; JÚNIOR, Gerardo M. V. Constituintes Químicos e Atividade Antioxidante de Extratos das Folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Quim. Nova**, v. 32, n. 6, p. 1509-1512, 2009.

BARBALHO, S. M.; GUIGUER, É. L.; MARINELLI, P. S.; et al. *Pereskia aculeata* Miller Flour: Metabolic Effects and Composition. **Journal of Medicinal Food**, v. 19, n. 9, p. 890–894, 2016.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–76, 1996.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

CARVALHO, Eber Goulart; SOARES, Cristina Pacheco; BLAU, Lorena; MENEGON Renato Farina; JOAQUIM, Walderez Moreira. Wound healing properties and mucilage content of *Pereskia aculeata* from different substrates. *Rev Bras Farmacogn*, 24, p. 677-682, 2014.

CHERUBIM, D. J. DE L.; BUZANELLO MARTINS, C. V.; OLIVEIRA FARIÑA, L.; DA SILVA DE LUCCA, R. A. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 19, n. 1, p. 33–37, 2019.

CRUZ, Thiago Mendanha; SANTOS, Jânio Sousa; CARMO, Mariana Araújo Vieira do; HELLSTRÖM, Jarkko; PIHLAVA, Juha-Matti; AZEVEDO, Luciana; GRANATO, Daniel; MARQUES, Mariza Boscacci. Extraction optimization of bioactive compounds from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) leaves and their in vitro antioxidant and antihemolytic activities. **Food Chemistry**, v. 361, n. 130078, 2021.

DA CUNHA, Antônio P.; ROQUE, Odete R. **Obtenção de moléculas com atividade farmacológica a partir de material vegetal e sua transformação em medicamento**. In: DA CUNHA, Antônio P. (Coord.). *Farmacognosia e fitoquímica*. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010.

DURAZZO, A.; LUCARINI, M.; SOUTO, E. B.; et al. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 9, p. 2221–2243, 2019.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

ELISABETSKY, Elaine. Etnofarmacologia. **Cienc. Cult**, v. 55, n. 3, p. 35-36, 2003.

FILHO, R. B. Assuntos Gerais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229–239, 2010.

GARCIA, J. A. A.; CORRÊA, R. C. G.; BARROS, L.; et al. Phytochemical profile and biological activities of “Ora-pro-nobis” leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. **Food Chemistry**, v. 294, p. 302–308, 2019.

GRANATO, D.; SHAHIDI, F.; WROLSTAD, R.; et al. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? **Food Chemistry**, v. 264, p. 471–475, 2018.

GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology**, v. 94, p. 651-715, 2020.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine** (4th ed.). Oxford: Oxford University Press, 888p. 2007.

HENDGES, A. P. P. K. **Estudo Fitoquímico das Folhas de Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) Coletadas no Inverno e Verão**. 2015. 105f. Dissertação Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2015.

HOCHHEIM, S.; PACASSA BORGES, P.; BOEDER, A. M.; et al. A bioguided approach for the screening of antibacterial compounds isolated from the hydroalcoholic extract of the native brazilian bee’s propolis using mollicutes as a model. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1–7, 2020.

HOFF, Rodrigo; DAGUER, Heitor; DEOLINDO, Carolina T. P.; MELO, Ana Paula Zapelini de; DURIGON, Jaqueline. Phenolic compounds profile and main nutrients parameters of two underestimated non-conventional edible plants: *Pereskia aculeata* Mill. (ora-pro-nóbis) and *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke (tarumã) fruits. **Food Research International**, v. 162, 112042, 2022.

HUANG, Dejian; OU, Boxin; PRIOR, Ronald L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **J. Agric. Food Chem**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

ICH (2015). Validation of analytical procedures: Methodology. ICH harmonised tripartite guideline. Disponível em: <<http://www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgps/therapeut>>.

DE LA ROSA, L. A.; MORENO-ESCAMILLA, J. O.; RODRIGO-GARCÍA, J.; ALVAREZ-PARRILLA, E. **Phenolic compounds**, 2019.

LARCHER, Walter. **Ecofisiologia Vegetal**. São Paulo: Rima, 2000.

LATOS-BROZIO, Malgorzata; MASEK, Anna. Structure-Activity Relationships Analysis of Monomeric and Polymeric Polyphenols (Quercetin, Rutin and Catechin) Obtained by Various Polymerization Methods. **Chem. Biodiversity**, v. 16, e1900426, 2019.

LEÃO, Maria C. B.; CAMPELO, Yanka D.; DA SILVA, Luciane L. Ethnopharmacology as a complementary therapy in primary care: an integrative review. **Research, Society and Development**, v. 10, n.13, e427101321593, 2021.

LI, X. Solvent effects and improvements in the deoxyribose degradation assay for hydroxyl radical-scavenging. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2083–2088, 2013.

LIBERAL, Â.; COELHO, C.T.P.; FERNANDES, Â.; CARDOSO, R.V.C.; DIAS, M.I.; PINELA, J.; ALVES, M.J.; SEVERINO, V.G.P.; FERREIRA, I.C.F.R.; BARROS, L. Chemical Features and Bioactivities of *Lactuca canadensis* L., an Unconventional Food Plant from Brazilian Cerrado. **Agriculture**, v. 11, 734, 2021.

LYTRA, K.; TOMOU, E. M.; CHRYSARGYRIS, A.; et al. Bio-Guided investigation of *Sideritis cypria* methanol extract driven by in vitro antioxidant and cytotoxic assays. **Chemistry and Biodiversity**, v. 18, n. 3, 2021.

MA, L.; ZHANG, Z.; ZHAO, X.; ZHANG, S.; LU, H. The rapid determination of total polyphenols content and antioxidant activity in: *Dendrobium officinale* using near-infrared spectroscopy. **Analytical Methods**, v. 8, n. 23, p. 4584–4589, 2016.

MACIEL, Jéssica K. S.; CHAVES, Otemberg S.; FILHO, Severino G. Brito; TELES, Yanna C. F.; FERNANDES, Marianne G.; ASSIS, Temilce S.; FERNANDES, Pedro Dantas; ANDRADE, Alberício Pereira de; FELIX, Leonardo P.; SILVA, Tania M. S.; RAMOS, Nathalia S. M.; SILVA, Girliane R.; SOUZA, Maria de Fátima Vanderlei de. New Alcamide and Anti-oxidant Activity of *Pilosocereus gounellei* A. Weber ex K. Schum. Bly. Ex Rowl. (Cactaceae). **Molecules**, v. 21, n. 11, 2016.

MACIEL, V. B. V.; YOSHIDA, C. M. P.; GOYCOOLEA, F. M. Agronomic Cultivation, Chemical Composition, Functional Activities and Applications of *Pereskia* Species – A Mini Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 4573–4584, 2019.

MACIEL, V. B. V.; BEZERRA, R. Q.; CHAGAS, E. G. L.; YOSHIDA, C. M. P.; CARVALHO, R. A. Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller): a potential alternative for iron supplementation and phytochemical compounds. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, p. e2020180, 2021.

MADEIRA, R. N.; BOTREL, N.; AMARO, G. B.; MELLO, R. A. C.; TELLES, C. C.; JUNQUEIRA, A. M. R.; SILVA, D. B. **Grupos de Uso e as Espécies Prioritárias**. In: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial Plantas para o Futuro: Região Nordeste. Brasília-DF: MMA, 2018.

MARTIN, A. A.; DE FREITAS, R. A.; SASSAKI, G. L.; EVANGELISTA, P. H. L.; SIERAKOWSKI, M. R. Chemical structure and physical-chemical properties of mucilage from the leaves of *Pereskia aculeata*. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 20–28, 2017.

MASSOCATTO, Adriana Muniz; SILVA, Nyéssia Fernanda de Souza; KAZAMA, Caroline Calixto; PIRES, Michele Dal Bem; TAKEMURA, Orlando Seiko; JACOMASSI, Ezilda; RUIZ, Ana Lúcia Tasca Gois; JUNIOR, Antonio Laverde. Biological Activity Survey of *Pereskia aculeata* Mill. and *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae). **Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 1, p.156-165, 2022.

MMA. Biodiversidade. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em <<https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade>>. Acesso em 30 de outubro de 2020.

NETO, J. A. R.; TARÔCO, B. R. P.; SANTOS, H. B. DOS; et al. Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach. **Journal of Ethnopharmacology**, 2020.

NJANPA, C. A. N.; WOUAMBA, S. C. N.; YAMTHE, L. R. T.; et al. Bio-guided isolation of anti-leishmanial natural products from *Diospyros gracilescens* L. (Ebenaceae). **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 21, n. 1, p. 1–12, 2021.

OGBURN, R. M.; EDWARDS, E. J. Anatomical variation in Cactaceae and relatives: Trait lability and evolutionary innovation. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 2, p. 391–408, 2009.

OHTAKE, Satoshi; WANG, John. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 6, p. 2020-2053, 2011.

OLDONI, T. L. C.; MERLIN, N.; BICAS, T. C.; et al. Antihyperglycemic activity of crude extract and isolation of phenolic compounds with antioxidant activity from *Moringa oleifera* Lam. leaves grown in Southern Brazil. **Food Research International**, v. 141, 2021.

OLDONI, T. L. C.; MERLIN, N.; KARLING, M.; et al. Bioguided extraction of phenolic compounds and UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS characterization of extracts of *Moringa oleifera* leaves collected in Brazil. **Food Research International**, v. 125, p. 108647, 2019.

OLDONI, T. L.C.; MELO, P. S.; MASSARIOLI, A. P.; MORENO, I. A.M.; BEZERRA, R. M.N.; ROSALEN, P. L.; SILVA, G. V.J. da; NASCIMENTO, A. M.; ALENCAR, S. M. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. **Food Chemistry**, v. 192, p. 306-312, 2016.

OLDONI, T. L. C.; CABRAL, I. S. R; D'ARCE, M. A. B. R.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M.; NASCIMENTO, A. M.; ALENCAR, S. M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian própolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n. 2, p. 208-213, 2011.

OLIVEIRA, N. L.; RODRIGUES, A. A.; OLIVEIRA NEVES, I. C.; et al. Development and characterization of biodegradable films based on *Pereskia aculeata* Miller mucilage. **Industrial Crops and Products**, v. 130, p. 499–510, 2019.

OOTANI, M.; AGUIAR, R.; RAMOS, A. C.; et al. Use of essential oils in agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162–174, 2013.

PASRIJA, D.; EZHILARASI, P. N.; INDRANI, D.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of green tea polyphenols and its effect on incorporated bread quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 289–296, 2015.

PAVARINI, D. P.; PAVARINI, S. P.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1–4, p. 5–16, 2012.

PEREIRA, Renata J.; CARDOSO, Maria das G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PERRONE, S.; TATARANNO, M. L.; STAZZONI, G.; BUONOCORE, G. Oxidative

stress and free radicals related diseases of the newborn. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 3, n. 7, p. 1043–1050, 2012.

PINTO, N. D. C. C.; DUQUE, A. P. D. N.; PACHECO, N. R.; et al. *Pereskia aculeata*: A plant food with antinociceptive activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 12, p. 1780–1785, 2015.

PINTO, N. D. C. C.; MACHADO, D. C.; DA SILVA, J. M.; et al. *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 330–337, 2015.

PINTO, N. DE C. C.; CASSINI-VIEIRA, P.; SOUZA-FAGUNDES, E. M. DE; et al. *Pereskia aculeata* Miller leaves accelerate excisional wound healing in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 131–136, 2016.

PINTO, N. DE C. C.; SANTOS, R. C. DOS; MACHADO, D. C.; et al. Cytotoxic and antioxidant activity of *Pereskia aculeata* Miller. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 63–69, 2012.

PRASNIEWSKI, A.; SILVA, C. DA; AYRES, B. R. B.; et al. Characterization of phenolic compounds by UHPLC-QTOF-MS/MS and Functional properties of *Syzygium malaccense* leaves. **South African Journal of Botany**, v. 139, p. 418–426, 2021.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; et al. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

RIBEIRO, V. P.; ARRUDA, C.; EL-SALAM, M. A.; BASTOS, J. K. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: A review. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 253–268, 2018.

RODRIGUES, I.M.C.; SOUZA FILHO, A.P.S.; FERREIRA, F.A. Estudo Fitoquímico de *Senna Alata* por duas Metodologias. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 27, n. 3, 2009.

ROMULO, A. The Principle of Some in vitro Antioxidant Activity Methods: Review. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 426, n. 1, 2020.

SAADA, M.; WASLI, H.; JALLALI, I.; et al. Bio-guided fractionation of *Retama raetam* (Forssk.) Webb & Berthel polar extracts. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 1–16, 2021.

SABIR, S.; ATHAYDE, M.; BOLIGON, A.; ROCHA, J. B. SABIR et al 2009.pdf. **South African Journal of Botany**, v. 113, p. 318–323, 2017.

SANGIOVANNI, E.; PIAZZA, S.; VRHOVSEK, U.; et al. A bio-guided approach for the development of a chestnut-based proanthocyanidin-enriched nutraceutical with potential anti-gastritis properties. **Pharmacological Research**, v. 134, p. 145–155, 2018.

SEKOWSKI, S.; IONOV, M.; KASZUBA, M.; et al. Biophysical studies of interaction between hydrolysable tannins isolated from *Oenothera gigas* and *Geranium sanguineum* with human serum albumin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 623–628, 2014.

SGARIGLIA, M. A.; SOBERÓN, J. R.; SAMPIETRO, D. A.; QUIROGA, E. N.; VATTUONE, M. A. Isolation of antibacterial components from infusion of *Caesalpinia paraguariensis* bark. A bio-guided phytochemical study. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 395–404, 2011.

SHAH, S. L.; BASHIR, K.; RASHEED, H. M.; RAHMAN, J. U.; IKRAM, M.; SHAH, A. J.; MAJRASHI, K. A.; ALNASSER, S. M.; MENAA, F.; KHAN, T. LC-MS/MS-Based Metabolomic Profiling of Constituents from *Glochidion velutinum* and Its Activity against Cancer Cell Lines. **Molecules**, v. 27, p. 9012, 2022.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757–781, 2015.

SILVA, D. O.; SEIFERT, M.; NORA, F. R.; et al. Acute toxicity and cytotoxicity of *Pereskia aculeata*, a highly nutritious Cactaceae plant. **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 4, p. 403–409, 2017.

SILVA, Débora O.; SEIFERT, Maurício; SCHIEDECK, Gustavo; DODE, Juliana S.; NORA, Leonardo. Phenological and physicochemical properties of *Pereskia aculeata* during cultivation in south Brazil. **Horticultura Brasileira**, v. 36, p. 325-329, 2018.

SILVA, S. H.; NEVES, I. C. O.; OLIVEIRA, N. L.; et al. Extraction processes and characterization of the mucilage obtained from green fruits of *Pereskia aculeata* Miller. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111716, 2019.

SILVEIRA, E. R.; CARVALHO, J. C. S.; MATOS, T. M. **X Botânica no Inverno**. São Paulo: Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo, 2021.

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

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

SORDINI, B.; VENEZIANI, G.; SERVILI, M.; et al. A quanti-qualitative study of a phenolic extract as a natural antioxidant in the frying processes. **Food Chemistry**, v. 279, p. 426–434, 2019.

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.; OVIVEIRA, Alberto de. Atividade Antioxidante de Extratos de Folhas de Ora-pro-Nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) Usando Métodos Espectrofotométricos e Voltamétricos *In Vitro*. **Biosci. J.**, v. 30, p. 448-457, 2014.

SOUZA, T. C. L. **Perfil de compostos fenólicos extraídos de folhas de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) (Dissertação)**, 2014. Campinas, Brasil: Universidade de Campinas, Unicamp.

SOUZA, A. T. DE; ABREU, G. A. **Prospecção fitoquímica da hortaliça não convencional *Pereskia aculeata* Miller (ora-pro-nóbis)**. Pato Branco - Pr, 2017.

SOUZA, L. F.; CAPUTO, L.; DE BARROS, I. B. I.; et al. *Pereskia aculeata* muller (Cactaceae) leaves: Chemical composition and biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, 2016.

SOUZA, Antonio Henrique de; MENDONÇA, Henrique de Oliveira Prata; PAULA, Ana Cardoso Clemente Filha Ferreira de; AUGUSTI, Rodinei; FANTE, Camila Argenta; MELO, Júlio Onésio Ferreira; CARLOS, Lanamar de Almeida. Influence of Harvest Time on the Chemical Profile of *Pereskia aculeate* Mill. Using Paper Spray Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 27, p. 4276, 2022.

TAKEITI, C. Y.; ANTONIO, G. C.; MOTTA, E. M. P.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; PARK, K. J. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, p. 148–160, 2009.

TIAN, C.; LIU, X.; CHANG, Y.; et al. Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin. **South African**

Journal of Botany, v. 137, p. 257–264, 2021.

TISSIER, A.; ZIEGLER, J.; VOGT, T. Specialized Plant Metabolites: Diversity and Biosynthesis. **Ecological Biochemistry: Environmental and Interspecies Interactions**, p. 14–37, 2015.

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

TORRES, Talyta M. S.; ÁLVAREZ-RIVERA, Gerardo; MAZZUTTI, Simone; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, Jose David; CIFUENTES, Alejandro; IBÁÑEZ, Elena; FERREIRA, Sandra Regina Salvador. Neuroprotective potential of extracts from leaves of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*) recovered by clean compressed fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 179, 105390, 2022a.

TORRES, Talyta M. S.; GUEDES, Jhonyson A. C.; BRITO, Edy Sousa de; MAZZUTTI, Simone; FERREIRA, Sandra Regina Salvador. High-pressure biorefining of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 181, 105514, 2022b.

TUNGMUNNITHUM, D.; THONGBOONYOU, A.; PHOLBOON, A.; YANGSABAI, A. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. **Medicines**, v. 5, n. 3, p. 93, 2018.

TURANI, D.; BRITES, J. S. R. **Caracterização química e otimização da extração de compostos fenólicos e antioxidantes de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) desidratado**, 2018.

VAISHNAV, P.; DEMAINE, A. L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 2, p. 223–229, 2011.

VARGAS, A. G. DE. **Influência Da Sazonalidade Na Composição Química E Nas Atividades Antioxidante E Antimicrobiana Das Folhas De Ora-Pro-Nobis (*Pereskia aculeata* Miller) (Dissertação)**, 2017. UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. D. F.; et al. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: Main analytical methods for their determination. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

ZAPPI, D.; TAYLOR, N.; SANTOS, M.R.; LAROCCA, J. 2015 Cactaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB70>>. Acesso em 11 de junho de 2020.

WANG, Y.; DU, H.; XIE, M.; et al. Characterization of the physical properties and biological activity of chitosan films grafted with gallic acid and caffeic acid: A comparison study. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 22, 2019.

WOJDYŁO, A.; OSZMIAŃSKI, J.; CZEMERYŚ, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, 2007.

YASHIN, A.; YASHIN, Y.; XIA, X.; NEMZER, B. Antioxidant activity of spices and their impact on human health: A review. **Antioxidants**, v. 6, n. 3, p. 1–18, 2017.