



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

Stéfany Costa Quezadas

**Avaliação do perfil químico e da ação biológica de metabólitos
secundários de *Pereskia aculeata* Miller (ora-pro-nóbis)**

Araraquara, SP
2022

Stéfany Costa Quezadas

Avaliação do perfil químico e da ação biológica de metabólitos secundários de *Pereskia aculeata* Miller (ora-pro-nóbis)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica Bioquímica.

Orientador: André Gonzaga dos Santos

Coorientadora: Bárbara Paes Miglioli da Mata

Araraquara, SP

2022

-
- Q511a** Quezadas, Stéfany Costa.
Avaliação do perfil químico e da ação biológica de metabólitos secundários de *Pereskia aculeata* Miller (ora-pro-nóbis) / Stéfany Costa Quezadas. – Araraquara: [S.n.], 2022.
84 f. : il.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
- Orientador: André Gonzaga dos Santos.
Coorientadora: Bárbara Paes Miglioli da Mata.
1. Ora-pro-nóbis. 2. Embriotoxicidade. 3. Química verde. 4. Compostos fenólicos. I. Santos, André Gonzaga dos, orient. II. Mata, Bárbara Paes Miglioli da, coorient. III. Título.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar em todas as decisões e realizar tantas obras em minha vida. Obrigada, Senhor, pelas oportunidades que colocastes em meu caminho, pela sabedoria que me destes para reconhecer e compreender a Vossa vontade e pela força que me concedestes para enfrentar os momentos difíceis.

A meus pais, Zilene e José Rubens, por serem meu apoio, minha luz, minha força e por fazerem o possível e o impossível para que esse sonho se realizasse. A minha irmã, Bruna, por me incentivar, sonhar comigo e por ser o meu maior exemplo, profissional e pessoal. A minha avó Enia, por ser minha inspiração, meu porto-seguro e primeira professora, da escola e da vida. A minha prima e amiga Ayla, por nunca me deixar desistir. A minha avó Mercedes, pelo carinho e cuidado e, aos demais familiares, por me acompanharem neste processo. Vocês são o bem mais valioso que possuo. Amo vocês.

A meu orientador, Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, pela oportunidade de conhecer mais sobre o universo dos produtos naturais. Agradeço pelos ensinamentos, compreensão e, acima de tudo, por incentivar todos os seus alunos a utilizarem a ciência como ferramenta para mudar a realidade em que vivemos. A minha coorientadora Bárbara por, mais que uma mentora, tornar-se uma grande amiga. Aos meus amigos Janaína e Winner, pela ajuda, conversas e tantos momentos que tornaram essa trajetória mais divertida. Aos demais colegas do Laboratório de Farmacognosia, especialmente Caio e Isabela, pela disposição em ajudar.

A minha grande amiga, ouvinte, conselheira e confidente, Júlia, por me abraçar desde o primeiro dia e ser parte essencial desta trajetória. A sua família, Sílvia, Márcio e Rafael, por se tornarem minha família longe de casa. A minha grande amiga Mariana, por sua amizade, conselhos, desabafos e tantos momentos preciosos que vivemos juntas ao longo desses anos, além de ser a melhor colega de apartamento que alguém poderia ter. A meus amigos, presentes que Araraquara me deu, Mariane, Stephanie, Ingrid, Juliana, Nayara, Sara, Amanda, Lucas, Paloma, Nilton e Wilian e aos amigos que trago de Tanabi, Bruna, Ana Vitória, Fábio e José Paulo, por estarem ao meu lado em todos os momentos.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pelos ensinamentos, recursos, oportunidades e experiências. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

RESUMO

Diante da realidade das mudanças climáticas e da questão da segurança alimentar no mundo, o estudo de novas fontes alimentares benéficas à saúde e cujo uso seja seguro torna-se bastante relevante. Os 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável definidos pela Organização das Nações Unidas (ONU) revelam esta preocupação, visando alcançar, entre outras metas, a promoção da agricultura sustentável e a erradicação da fome. Tendo em foco o desenvolvimento sustentável, é necessário que sejam realizados estudos de fontes alimentares alternativas com aplicação dos princípios de Química Verde, de modo a ampliar o conhecimento acerca dessas espécies, reduzindo os efeitos nocivos gerados ao ambiente. Nesse contexto, as Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) merecem destaque por apresentar quantidades significativas de nutrientes e substâncias, especialmente metabólitos secundários, com potenciais benefícios à saúde. O uso na alimentação das folhas e outras partes da PANC ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) tem sido valorizado devido ao alto teor de proteínas nas folhas e à presença de outros nutrientes importantes. Este trabalho objetivou avaliar a composição química de metabólitos secundários das folhas de *P. aculeata*, sua ação antioxidante e a embriotoxicidade em modelo de animal alternativo *zebrafish*. O teor de compostos fenólicos totais de extrato etanólico e hidroetanólico de folhas foi de 7,1% e 3,4% (m/m), respectivamente. No ensaio de atividade antioxidante com o radical DPPH, não foram obtidos resultados coerentes, com valores de absorbância do branco altos, o que pode indicar a presença de compostos interferentes nos extratos com absorbância no comprimento de onda utilizado (517 nm). No ensaio de embriotoxicidade utilizando o modelo *zebrafish*, não foi observado efeito embriotóxico do extrato etanólico. Na análise dos dois extratos por cromatografia em camada delgada, os perfis cromatográficos mostraram-se idênticos nas condições utilizadas. Além disso, foi realizado o desenvolvimento de método cromatográfico por HPLC-UV, obtendo-se a melhor condição cromatográfica com fase móvel composta por água acidificada com 2% de ácido acético e acetonitrila. A análise dos cromatogramas indicou que o extrato hidroetanólico apresenta maior conteúdo de substâncias polares do que o extrato etanólico, como esperado. Por outro lado, na análise do extrato utilizando NADES, observou-se predominância de substâncias com menor polaridade, o que está relacionado à natureza química do solvente

mentol:cânfora 1:1. Na análise por UHPLC-UV, foram testadas diversas condições, obtendo-se melhor separação dos picos com fase móvel água acidificada com 2% de ácido acético e etanol. Por fim, na análise do óleo essencial por GC-MS, foi observado um grande número de componentes, apesar do baixo rendimento da extração do óleo. Assim, nota-se a presença de nutrientes e metabólitos secundários com potencial benefício à saúde e pode-se prever a segurança do consumo da ora-pro-nóbis, a fim de que seja incluída na rotina alimentar das populações, além de seu potencial farmacológico, que deve ser investigado em novos estudos.

Palavras-chave: ora-pro-nóbis; embriotoxicidade; química verde; compostos fenólicos.

ABSTRACT

Considering the reality of climate changes and the issue of food security in the world, the search for new food sources with health benefits becomes very relevant. The 17 Sustainable Development Goals (SDGs) defined by the United Nations reveal this concern, aiming to achieve, among other goals, the promotion of sustainable agriculture and the eradication of hunger. Thus, bearing in mind the sustainable development, it is necessary to carry out studies of alternative food sources with applications of the principles of Green Chemistry, in order to expand the knowledge about these species, reducing the harmful effects generated to the environment. In this context, Non-Conventional Edible Plants (PANCs) are presented as alternative sources of nutrients, in addition to containing other substances, especially secondary metabolites, with potential health benefits. The edible use of the leaves and other parts of the PANC *ora-pro-nobis* (*Pereskia aculeata* Mill.) has been valued due to the high protein content in leaves and the presence of other important nutrients. This study aimed to evaluate the chemical composition of secondary metabolites from *P. aculeata* leaves, their antioxidant activity and embryotoxicity in the *zebrafish* model. The contents of total phenolic compounds were determined for the ethanolic and hydroethanolic extracts as 7.1% e 3.4% (w/w), respectively. In the DPPH radical assay, no consistent results were obtained, indicating the presence of interfering compounds in the extracts with absorbance at the wavelength used (517 nm). No embryotoxic effect were observed for the ethanolic extract in the *zebrafish* assay. In the analysis of the two extracts by thin layer chromatography, the chromatographic profiles were identical under the conditions used. Moreover, a chromatographic method was developed by HPLC-UV, obtaining the best chromatographic condition with mobile phase composed of acidified water with 2% acetic acid and acetonitrile. The analysis of the chromatograms indicated that the hydroethanolic extract presents a higher content of polar substances than the ethanolic extract, as expected. In the analysis of the extract using NADES, a predominance of substances with lower polarity was observed, which is related to the chemical nature of the solvent menthol:camphor 1:1. On the other hand, in the analysis by UHPLC-UV, several conditions were tested, obtaining better separation of the peaks with mobile phase acidified water with 2% acetic acid and ethanol. Finally, in the essential oil analysis by GC-MS, a large number of components were observed, despite the low yield of oil

extraction. Thus, the presence of nutrients and secondary metabolites with potential health benefits can be noted and it is possible to predict the safety of ora-pro-nóbis consumption, so that it can be included in the population's eating routine, besides its pharmacological potential, which should be investigated in new studies.

Keywords: ora-pro-nóbis; embryotoxicity; green chemistry; phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estruturas químicas de metabólitos secundários identificados em *P. aculeata*.....21
- Figura 2** - Curva analítica de ácido gálico (0,625 a 20 µg/mL) obtida com reagente de Folin-Ciocalteu a partir da leitura das soluções em espectrofotômetro em 760 nm e valores de absorbância dos extratos.....38
- Figura 3** - Curvas de sobrevivência de embriões de *zebrafish* expostos a diferentes concentrações de extrato etanólico de *P. aculeata* segundo intervalos de hpf.....42
- Figura 4** - Embrião de *zebrafish* 72 hpf do grupo controle (A) e exposto à maior concentração do extrato etanólico de *P. aculeata* (B).....43
- Figura 5** - Cromatoplaça (sílica gel) da análise por CCD de extrato hidroetanólico 70% (1) e de extrato etanólico (2) de folhas de *P. aculeata* realizada em fase móvel tolueno: acetato de etila: metanol: ácido acético 5,3:4:0,5:0,2.....44
- Figuras 6.1-2** - Cromatogramas de extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* (pré-tratamento 1) eluído com fase móvel composta por água acidificada a 2% de ácido acético (A) e metanol (B), coluna Ascentis® C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), condição 1 (Tabela 1), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL e detector UV/Vis em comprimentos de onda de 250 nm (1) e 350 nm (2).....45
- Figuras 7.1-4** - Cromatogramas de extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* (pré-tratamento 2) eluído com fase móvel composta por água acidificada a 2% de ácido acético (A) e acetonitrila (C), coluna Ascentis® C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), condição 14 (Tabela 2), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL e detector UV/Vis em comprimentos de onda de 250 nm (1 e 3 - ampliação) e 350 nm (2 e 4 - ampliação)47

Figuras 8.1-4 - Cromatogramas de extrato etanólico de folhas de *P. aculeata* (pré-tratamento 2) eluído com fase móvel composta por água acidificada a 2% de ácido acético (A) e acetonitrila (C), coluna Ascentis® C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), condição 14 (Tabela 2), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL e detector UV/Vis em comprimentos de onda de 250 nm (1 e 3 - ampliação) e 350 nm (2 e 4 - ampliação).....48

Figuras 9.1-4 - Cromatogramas de extrato NADES de folhas de *P. aculeata* (pré-tratamento 3) eluído com fase móvel composta por água acidificada a 2% de ácido acético (A) e acetonitrila (C), coluna Ascentis® C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), condição 14 (Tabela 2), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL e detector UV/Vis em comprimentos de onda de 250 nm (1 e 3 - ampliação) e 350 nm (2 e 4 - ampliação).....50

Figuras 10.1-2 - Cromatogramas de extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* (pré-tratamento 1) eluído com fase móvel composta por água acidificada a 1% de ácido acético (A) e etanol (B), coluna ACQUITY® UPLC HSS T3 (100 mm x 2,1 mm x 1,8 µm), condição 1 (Tabela 3), vazão 0,2 mL/min, volume de injeção 10 µL e detector UV/Vis em comprimentos de onda de 250 nm (1) e 350 nm (2).....52

Figuras 11.1-2 - Cromatogramas de extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* (pré-tratamento 2) eluído com fase móvel composta por água acidificada a 2% de ácido acético (A) e etanol (B), coluna ACQUITY® UPLC HSS T3 (100 mm x 2,1 mm x 1,8 µm), condição 3 (Tabela 3), vazão 0,3 mL/min, volume de injeção 10 µL e detector UV/Vis em comprimentos de onda de 250 nm (1) e 350 nm (2).....54

Figuras 12.1-4 - Cromatogramas completo do OE de folhas frescas de *P. aculeata* em coluna capilar Agilent® (19091S-433) de sílica fundida (30 m x 250 µm x 0,25 µm), gás Hélio (99,999%) como gás de arraste, vazão de 1 mL/min, temperatura do injetor e da fonte de íons 250°C, volume de injeção 0,1 µL, modo split (1:10), temperatura do forno de 60°C a 250 °C a uma velocidade de 3°C/min, tempo de análise de 60 min (1) e suas ampliações (2-4)55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Condições cromatográficas (tempo de gradiente e %B) utilizadas para análise em HPLC-UV de extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata*.....32
- Tabela 2** - Condições cromatográficas (tempo de gradiente e %C) utilizadas para análise em HPLC-UV de extratos etanólico e hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata*.....33
- Tabela 3** - Condições cromatográficas (tempo de gradiente e %B) utilizadas para análise em UHPLC-UV de extratos etanólico e hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata*, utilizando fase móvel composta por água acidificada com 1 ou 2% de ácido acético (A) e etanol (B).....35
- Tabela 4** - Condições cromatográficas (tempo de gradiente e %B) utilizadas para análise em UHPLC-UV de extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata*, utilizando fase móvel composta por água acidificada a 2% de ácido acético (A) e metanol (B).....35
- Tabela 5** - Dados obtidos pela realização do ensaio de avaliação da atividade antioxidante de extratos etanólico e hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata*, utilizando radical DPPH.....40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

DL 50: Dose Letal 50

DPPH: Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila

GC: *Gas Chromatography* (Cromatografia Gasosa)

GC-FID: *Gas Chromatography with Flame Ionization Detector* (Cromatografia Gasosa acoplada a Detector por Ionização de Chama)

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

HPLC-DAD-ESI/MSⁿ: *High Performance Liquid Chromatography with Diodo Array Detector and Electrospray Ionization Mass Detector* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos e Detector de Massas de Ionização por Eletrospray).

UHPLC: *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)

DV: Desvio padrão

EPR: *Electric Paramagnetic Resonance* (Ressonância Paramagnética Nuclear)

FR: Fase reversa

h_{FE} : Altura da fase estacionária

hpf: Horas pós fecundação

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL-6: Interleucina-6

MS: *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas)

NADES: *Natural Deep Eutectic Solvents* (Solventes Eutéticos Naturais Profundos)

OCDE: Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OE: Óleo essencial

OMS: Organização Mundial da Saúde

ONU: Organização das Nações Unidas

PANC: Plantas Alimentícias Não Convencionais

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

R_s: Resolução

SDGs: *Sustainable Development Goals* (Objetivos de Desenvolvimento Sustentável)

SisGen: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

t_R: Tempo de retenção

UV: Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 Botânica e uso tradicional	17
3.2 Composição nutricional	19
3.3 Fitoquímica	20
3.4 Atividade farmacológica e desenvolvimento de novos produtos	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Materiais e equipamentos	25
4.2 Coleta e preparo do material vegetal	26
4.2.1 Perda por dessecação em balança com radiação por infravermelho	27
4.3 Obtenção dos extratos hidroetanólico 70% e etanólico de folhas de <i>P. aculeata</i>	27
4.4 Obtenção de extrato de folhas de <i>P. aculeata</i> utilizando NADES lipofílicos	28
4.5 Obtenção do óleo essencial das folhas de <i>P. aculeata</i>	28
4.6 Determinação do teor de compostos fenólicos totais	28
4.7 Determinação da atividade antioxidante utilizando o radical DPPH	28
4.8 Ensaio de embriotoxicidade utilizando zebrafish	29
4.9 Análise dos extratos etanólico e hidroetanólico por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	30
4.10 Pré-tratamento das amostras para análise por cromatografia líquida (HPLC-UV e UHPLC-UV)	30
4.10.1 Pré-tratamento para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-UV)	30
4.10.2 Pré-tratamento para análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC-UV)	31
4.11 Desenvolvimento de métodos analíticos por cromatografia líquida (HPLC-UV e UHPLC-UV)	32
4.11.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-UV)	32
4.11.2 Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC-UV)	34

4.12 Identificação de metabólitos secundários do óleo essencial por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Perda por dessecação em balança com radiação por infravermelho	37
5.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais	37
5.3 Determinação da atividade antioxidante utilizando radical DPPH	39
5.4 Ensaio de embriotoxicidade utilizando zebrafish	41
5.5 Análise dos extratos etanólico e hidroetanólico 70% por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	43
5.6 Desenvolvimento de métodos analíticos por cromatografia líquida (HPLC-UV e UHPLC-UV)	44
5.6.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-UV)	44
5.6.2 Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC-UV)	51
5.7 Identificação de metabólitos secundários do óleo essencial por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)	54
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

A fome é uma condição que atinge, diariamente, diversas populações em todo o mundo. Dados publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2019 estimam que 25,9% da população global já passaram fome ou não possuem acesso regular a uma alimentação nutritiva e em quantidade adequada, além de reportarem que cerca de 690 milhões de pessoas no mundo encontram-se em situação de desnutrição (FAO, 2020). Atualmente, o contexto gerado pela pandemia da Covid-19 tem intensificado a situação de vulnerabilidade de muitas comunidades atingindo, em 2020, o número de 811 milhões de indivíduos afetados pela falta de alimento (FAO, 2021). No Brasil, o cenário não é diferente. De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), cerca de 3 milhões de domicílios enfrentam situação de insegurança alimentar grave, deparando-se com quantidade insuficiente de comida para alimentar a todos os moradores (IBGE, 2020).

Diante desse cenário, os 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (*Sustainable Development Goals* - SDGs) elaborados pela Organização das Nações Unidas (ONU) e adotados por diversos países, descrevem uma preocupação com a garantia da qualidade de vida a todas as populações, juntamente com o desenvolvimento sustentável. Destaca-se, nesse sentido, o objetivo 2, o qual visa a erradicar a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover agricultura sustentável (UNITED NATIONS, 2015). Nesse contexto, a busca por fontes alternativas de nutrientes torna-se essencial para reduzir as desigualdades e garantir o crescimento sustentável e a alimentação segura e saudável a todos. Dados de 2021 registram que, apesar de serem cultivadas mais de seis mil espécies alimentares, apenas nove representam cerca de 66% das culturas ao redor do mundo, sendo elas cana-de-açúcar, milho, arroz, trigo, batata, soja, palma, beterraba e mandioca (JONES *et al.*, 2021). Assim, o estudo de espécies que representem alternativas a estas culturas e sejam novas fontes de nutrientes de cultivo adaptável às mudanças climáticas deve ser ampliado, a fim de que se possa incorporá-las na rotina alimentar das populações.

A grande biodiversidade brasileira apresenta-se como uma importante aliada nessa busca por fontes alimentares alternativas, já que espécies vegetais nativas vêm sendo utilizadas ao longo dos anos, por parte dos brasileiros, na alimentação e

na medicina tradicional para o tratamento de doenças (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Entre essas espécies destacam-se aquelas classificadas como Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC), as quais são comumente desconhecidas por parte da população em algumas regiões e não compõem a matriz agrícola convencional de determinado país (KINNUP; LORENZI, 2014). No que se refere a esse grupo de espécies vegetais, merece destaque *Pereskia aculeata* Mill., popularmente conhecida como “ora-pro-nóbis” ou “carne-de-pobre”, amplamente utilizada na culinária típica de algumas regiões e na medicina tradicional para o tratamento de inflamações e cicatrização de feridas (AGOSTINI-COSTA, 2020).

Pertencente à família Cactaceae, a ora-pro-nóbis é classificada como um arbusto semilenhoso e de ramos longos, que crescem fixando-se em apoios (KINNUP; LORENZI, 2014). Possui folhas com espinhos e o arbusto pode atingir até 10 m de altura (DUARTE; HAYASHI, 2005). No Brasil, é uma planta nativa das regiões Sul, Sudeste e Nordeste (KINNUP; LORENZI, 2014), podendo também ser encontrada na região Centro-Oeste (ZAPPI *et al.*, 2020). Nessas localidades, a ora-pro-nóbis é localizada com facilidade, mas raramente é cultivada comercialmente, sendo mais comumente encontrada em quintais e hortas (KINNUP; LORENZI, 2014) ou feiras populares.

O uso de *P. aculeata* na culinária é mais comum nas antigas regiões mineradoras de Minas Gerais, locais onde é utilizada no preparo de sopas, refogados, omeletes, entre outros pratos (DIAS *et al.*, 2005). Os frutos podem ser utilizados no preparo de sucos e geleias e as flores também podem ser consumidas em saladas ou como acompanhamentos em pratos com carnes (KINNUP; LORENZI, 2014). A composição nutricional da ora-pro-nóbis justifica seu uso na culinária regional, já que apresenta elevados teores de proteínas, fibras dietéticas totais, minerais (principalmente cálcio, magnésio, manganês e zinco), vitaminas A e C e ácido fólico (TAKEITI *et al.*, 2009).

No que se refere ao perfil químico da *P. aculeata*, são encontrados poucos estudos relacionados à composição desta espécie. Alguns estudos identificaram metabólitos secundários nas folhas da ora-pro-nóbis como flavonoides, carotenoides, derivados de ácido benzoico, fenilpropanoides, esteróis, monoterpenos, sesquiterpenos, um alcaloide indólico e fenetilaminas (PINTO; SCIO, 2014; PINTO *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2016; GARCIA *et al.*, 2019; AGOSTINI-COSTA, 2020). A presença destes metabólitos secundários pode

justificar o potencial farmacológico da ora-pro-nóbis, frequentemente utilizada na medicina tradicional como anti-inflamatória, cicatrizante e emoliente (PINTO; SCIO, 2014).

Recentemente, alguns estudos têm demonstrado o potencial da *P. aculeata* para o desenvolvimento de novos produtos, tanto farmacêuticos quanto alimentares. Entre as pesquisas de potenciais ações biológicas, citam-se a ação tripanocida e antitumoral (VALENTE *et al.*, 2007), além da atividade antimicrobiana (GARCIA *et al.* 2019). Na área de alimentos, têm sido realizados estudos utilizando a farinha obtida das folhas de *P. aculeata* na fabricação de produtos como pães e salsichas (MARTINEVSKI *et al.* 2013; SOBRINHO *et al.*, 2015), a fim de aprimorar características sensoriais e nutricionais desses produtos.

Assim, diante do amplo uso da ora-pro-nóbis na medicina e culinária tradicionais de algumas regiões, é importante a realização de novos estudos visando aprofundar o conhecimento acerca do perfil químico, ação biológica e toxicidade dessa espécie. Contudo, tendo como foco o desenvolvimento sustentável, mais do que buscar fontes alternativas de nutrientes, é fundamental avaliar a aplicação dos princípios de Química Verde nestes estudos, a fim de que sejam geradas quantidades mínimas de resíduos nocivos à saúde e ao ambiente (LENARDÃO *et al.*, 2003).

Nesse contexto, merecem destaque os chamados *Natural Deep Eutectic Solvents* (NADES), uma classe de solventes sustentáveis obtidos através da mistura de substâncias do metabolismo primário comum em células vivas, tais como colina, aminas, açúcares, poliálcoois e ácidos carboxílicos (BUBALO *et al.*, 2018), ou do metabolismo secundário, como cânfora, mentol e citrônolol (LOMBA *et al.*, 2021; FAN *et al.*, 2021). A extração de metabólitos secundários de espécies vegetais utilizando os NADES apresenta uma série de vantagens, em termos de aplicação dos princípios de Química Verde, sobre a extração com solventes orgânicos convencionais, tais como baixa toxicidade, baixo custo, fácil produção e biodegradabilidade (CUNHA; FERNANDES, 2018).

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o perfil químico de metabólitos secundários de *P. aculeata*, sua ação antirradicalar e toxicidade, a fim de se ampliar o conhecimento disponível acerca da composição química, atividade biológica e segurança desta espécie. Tendo como foco o desenvolvimento sustentável, a ora-pro-nóbis representa importante fonte alimentar alternativa e a possibilidade de

extração de seus metabólitos com o uso dos NADES contribui para a busca de novas técnicas baseadas nos princípios de Química Verde, permitindo o desenvolvimento de processos menos nocivos ao ambiente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil químico de metabólitos secundários das folhas de *P. aculeata*, sua ação antirradicalar e sua embriotoxicidade em modelo de animal alternativo *zebrafish*.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Desenvolver métodos cromatográficos para a análise de componentes não voláteis de extratos de *P. aculeata*;
- b) Identificar metabólitos secundários voláteis no óleo essencial de *P. aculeata*;
- c) Avaliar a ação antirradicalar de extratos de folhas de *P. aculeata* empregando o radical DPPH;
- d) Avaliar a embriotoxicidade dos extratos de folhas de *P. aculeata* através do uso do modelo animal alternativo *zebrafish*;
- e) Avaliar a extração de metabólitos secundários das folhas de *P. aculeata* utilizando NADES.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Botânica e uso tradicional

Pereskia aculeata Mill., popularmente conhecida como ora-pro-nóbis, apresenta-se como um arbusto semilenhoso com ramos longos que crescem fixando-se em apoios como uma trepadeira (KINNUP; LORENZI, 2014). Suas folhas são simples, com ápice agudo, formato elíptico e nervuras laterais (ZAPPI *et al.*, 2020), possuem textura carnosa e atingem entre 3 a 8 cm de comprimento (KINNUP; LORENZI, 2014). As flores podem ser encontradas na cor branca (MACIEL *et al.*, 2019) ou amarelada (PINTO; SCIO, 2014) e os frutos são globosos e

amarelos com sementes pretas (KINNUP; LORENZI, 2014). Pertencente à família Cactaceae e gênero *Pereskia*, é uma espécie natural de florestas tropicais, mas pode crescer domesticamente em áreas urbanas e rurais (MACIEL *et al.*, 2019).

Sendo um vegetal típico de regiões tropicais, *P. aculeata* é principalmente encontrada no continente americano, sul e sudeste da África e nordeste e sudeste da Austrália (AGOSTINI-COSTA, 2020). No Brasil, é encontrada nos biomas Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampas, de modo que sua distribuição se dá entre as regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (ZAPPI *et al.*, 2020), locais onde é popularmente conhecida por ora-pro-nóbis, carne-de-pobre, cipó-santo e espinho-de-santo-antônio (AGOSTINI-COSTA, 2020).

Apesar de sua utilização como ingrediente em pratos típicos da culinária regional, os cultivos de ora-pro-nóbis são raramente realizados com fins comerciais. Na região de Minas Gerais, é comum encontrar cultivos da planta em quintais e hortas, salvo algumas variedades que são empregadas para paisagismo (KINNUP; LORENZI, 2014). Nos últimos anos, *P. aculeata* tem despertado o interesse dos consumidores, aparecendo em cardápios de restaurantes de alta gastronomia no Rio de Janeiro e em São Paulo, o que resultou em um aumento no mercado dessa hortaliça (RODRIGUES, 2017). Além da folha fresca, alguns agricultores familiares também realizam o cultivo da ora-pro-nóbis com a finalidade de comercializar a farinha obtida das folhas dessa espécie, estabelecendo parcerias com empresas locais. Devido aos elevados teores de proteína presentes nas folhas de *P. aculeata*, a farinha pode ser utilizada na indústria alimentícia para enriquecer a composição nutricional de bebidas, massas, pães e biscoitos (RODRIGUES, 2017).

Nos locais em que é encontrada, a ora-pro-nóbis é tradicionalmente utilizada na alimentação (DIAS *et al.*, 2005). Em sua forma fresca, as folhas e flores são consumidas em saladas, refogados e omeletes, enquanto a farinha obtida das folhas secas pode ser utilizada no preparo de tortas e massas caseiras (ROCHA *et al.*, 2008). Além de sua utilização na culinária, as folhas também são conhecidas na medicina popular por seu potencial emoliente e aplicação no tratamento de inflamações, queimaduras de pele e cicatrização de feridas, propriedade relacionada ao alto conteúdo de mucilagem que as folhas dessa espécie apresentam (PINTO; SCIO, 2014; CARVALHO *et al.*, 2014). Os frutos, além de serem utilizados na alimentação para preparação de geleias e sucos (KINNUP; LORENZI, 2014)

também apresentam uso tradicional na medicina popular por suas atividades expectorante e anti-sifilítica (PINTO; SCIO, 2014; CARVALHO *et al.*, 2014).

3.2 Composição nutricional

O uso tradicional da ora-pro-nóbis na culinária regional torna-a a principal fonte de proteína disponível em algumas comunidades menos favorecidas (ALMEIDA *et al.*, 2014; PINTO *et al.*, 2015a). Tal fato se deve aos elevados teores de proteínas presentes nas folhas dessa espécie, calculados entre 18,5 e 28,4% (m/m) em base fresca (MERCÊ *et al.*, 2001; GIRÃO *et al.*, 2003; TAKEITI *et al.*, 2009), demonstrando-se superiores aos teores (m/m) de outros vegetais como couve (1,6%), alface (1,3%), milho (7,6 a 10,0%) e feijão (18,0 a 20,0%) (MERCÊ *et al.*, 2001). Vale ressaltar que, recentemente, um estudo realizado por Botrel *et al.* (2019) estabeleceu comparações entre o perfil de aminoácidos e composição proteica de diferentes clones de ora-pro-nóbis, determinando valores de proteína entre 16,6 e 23,9% (m/m) em base seca. As variações nos valores de proteína desse estudo são explicadas como decorrentes da idade fisiológica da planta, origem botânica, manejo agrônomo, composição do solo e/ou variabilidade genética (BOTREL *et al.*, 2019). As folhas dessa espécie apresentam excelente perfil de aminoácidos (ALBUQUERQUE *et al.*, 1991), destacando-se, entre os aminoácidos essenciais, leucina (BOTREL *et al.*, 2019) e triptofano (TAKEITI *et al.*, 2009).

Ainda sobre a composição nutricional das folhas, *P. aculeata* apresenta elevados níveis de fibras dietéticas totais, minerais e vitaminas (TAKEITI *et al.*, 2009; PINTO; SCIO, 2014). Os valores de fibras dietéticas totais foram estimados em 39,1 g/100g em base seca, destacando-se o conteúdo de fibras solúveis (5,2 g/100g) (TAKEITI *et al.*, 2009). Dentre o conteúdo de minerais, destacam-se cálcio (3.420 mg/100g), magnésio (1.900 mg/100g), manganês (46,40 mg/100g) e zinco (26,70 mg/100g), valores determinados nas folhas frescas por Takeiti *et al.* (2009). Esses mesmos autores também determinaram os valores de vitamina A (2.333 UI/100g), vitamina C (185,8 mg/100g), ácido fólico (19,3 mg/100g) e β -caroteno (4,2 mg/100g) em base fresca. O conteúdo de α - e β -caroteno foi determinado por Agostini-Costa *et al.* (2014) nas folhas frescas, resultando em valores entre 2,5-4,9 μ g/g e 13,8-47,0 μ g/g respectivamente. Esses valores indicam que as folhas de ora-pro-nóbis podem

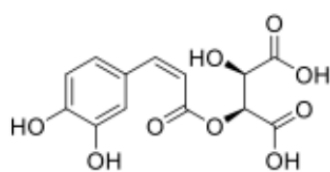
ser boas fontes de pró-vitamina A, cujos níveis variam entre 121,1 a 410,8 µg de equivalente de ácido retinóico por 100g (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2014).

E, ainda, somam-se às informações sobre composição nutricional estudos que determinaram baixos níveis de lipídeos, como metil palmitato, metil estearato e metil oleato nas folhas de *P. aculeata* (MERCÊ *et al.*, 2001; GIRÃO *et al.*, 2003; TAKEITI *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Dessa forma, considerando-se o conteúdo proteico, perfil de aminoácidos e níveis de minerais e vitaminas, o consumo das folhas de ora-pro-nóbis apresenta vários benefícios, de modo a torná-la uma opção alternativa na composição de uma dieta nutritiva.

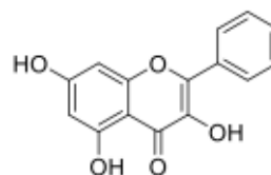
3.3 Fitoquímica

No que se refere à fitoquímica de *P. aculeata*, foram identificados flavonoides, carotenoides, derivados de ácido benzoico, fenilpropanoides, esteróis, monoterpenos, sesquiterpenos, um alcalóide indólico e fenetilaminas (Figura 1) (PINTO; SCIO, 2014; PINTO *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2016; GARCIA *et al.*, 2019; AGOSTINI-COSTA, 2020). Estudos realizaram a determinação dos compostos fenólicos em base seca, resultando em valores entre 0,2 a 87,2 mg de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico por grama de folha seca (ALMEIDA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2018; AGOSTINI-COSTA, 2020; SOUZA *et al.*, 2021), e em extratos, dos quais destacam-se os extratos hidroetanólico 70% e acetona 80% com os valores mais elevados, 95,6 e 117,8 mg de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico por grama de extrato (ALMEIDA *et al.*, 2014).

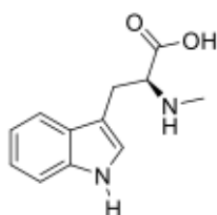
Figura 1 - Estruturas químicas de metabólitos secundários identificados em *P. aculeata*.



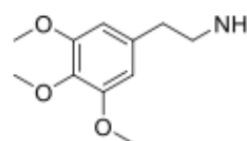
ácido *cis*-cafárico
FENILPROPANOIDE



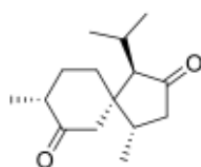
quercetina, R = OH
canferol, R = H
isoramnetina, R = OC
FLAVONÓIS



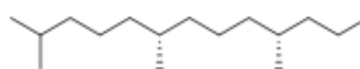
abrina
ALCALÓIDE INDOLICO



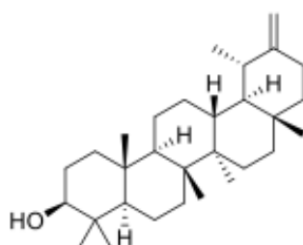
mescalina
FENILETILAMINA



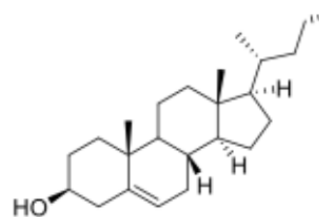
acoreno
SESQUITERPENIO



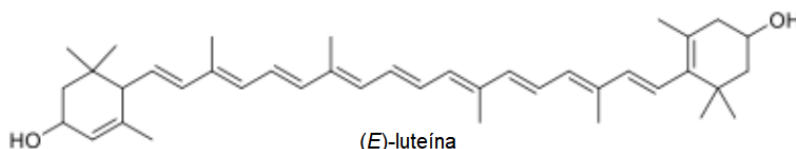
fítol
DITERPENIO



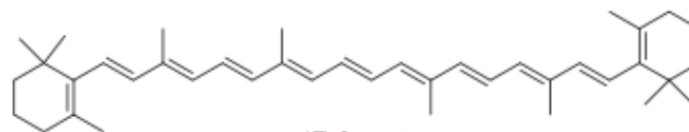
taraxasterol
TRITERPENIO



sítoesterol
ESTEROIDE



(*E*)-luteína



(*E*)-β-caroteno

Fonte: Elaborado pela autora.

Sobre os compostos fenólicos presentes nas folhas de ora-pro-nóbis, os valores determinados por Pinto *et al.* (2012) em extrato metanólico para o conteúdo de fenólicos totais (17,3 mg de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido tânico por grama de extrato) e para o conteúdo de flavonoides (13,1 mg de flavonoides totais equivalentes à rutina por grama de extrato) sugerem uma predominância dos flavonoides entre os compostos fenólicos. Em outro estudo, Souza *et al.* (2021) definiram o conteúdo de flavonoides e de antocianinas em base seca encontrando, respectivamente, os valores 12,2 mg de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico por grama de folha seca e 1,2 mg de antocianinas equivalentes a cianidina-3-glicosídeo por grama de folha seca.

Ainda em relação ao perfil químico das folhas de *P. aculeata*, Garcia *et al.* (2019) determinaram os conteúdos de fenilpropanoides totais, flavonoides totais e compostos fenólicos totais em extrato hidroetanólico 70% através de método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos e Detector de Massas de Ionização por Eletrospray (HPLC-DAD-ESI/MSⁿ), obtendo os valores 12,3%, 11,4% e 23,7% respectivamente. Foram encontrados derivados de ácido cafeico e flavonoides, os quais foram identificados e quantificados como ácido *cis*-caftárico (9,5% m/m), ácido *trans*-caftárico (2,2% m/m), derivados de ácido cafeico (0,57% m/m), quercetina-3-O-rutinosídeo (3,6% m/m), isorhamnetina-O-pentosídeo-O-rutinosídeo (2,3% m/m), quercetina-O-pentosídeo-O-rutinosídeo (2,1% m/m), isorhamnetina-3-O-rutinosídeo (1,3% m/m), kaempferol-3-O-rutinosídeo (0,8% m/m), quercetina-O-pentosídeo-O-hexosídeo (0,7% m/m) e isorhamnetina-O-pentosídeo-O-hexosídeo (0,6% m/m).

Além disso, outros compostos ainda foram quantificados nas folhas de ora-pro-nóbis, como os taninos condensados, em extrato aquoso, hidroetanólico 70% e acetona 80%, através de ensaio com vanilina sulfúrica, obtendo-se, respectivamente, 2,6, 4,0 e 7,6 mg de taninos condensados totais equivalentes à catequina por grama do extrato (SOUSA *et al.*, 2014). Ademais, triterpenos, esteróis e outros compostos minoritários como sitosterol (24,7%), taraxasterol (11,6%), campesterol (9,0%), taraxerol (7,1%), stigmasterol (6,9%) e o diterpeno fitol (4,5%) também foram identificados por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS) em fração hexânica de extrato metanólico (PINTO *et al.*, 2015b). Alguns estudos utilizando Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

acoplada a Espectrometria de Massas UHPLC-MS/MS identificaram triptamina, um alcaloide indólico e as fenetilaminas mescalina e hordenina nas folhas de ora-pro-nóbis (PINTO *et al.*, 2015a).

Em relação à composição do óleo essencial das folhas de *P. aculeata*, poucos estudos são encontrados. Entre eles, Souza *et al.* (2016) realizaram análise do óleo essencial obtido das folhas secas por hidrodestilação, obtendo-se um rendimento de 0,02% m/m. Foram identificados 24 compostos por GC-MS, incluindo hidrocarbonetos monoterpênicos (0,6%), monoterpênicos oxigenados (16,0%), sesquiterpênicos oxigenados (44,9%), hidrocarbonetos diterpênicos (5,1%) e não-terpênicos (24,4%). Destacam-se acoreno (30,0%), (Z,Z)-metil-4,6-hexadecadieno (16,3%), 1-nonadecanol (6,2%), (5E,9E)-farnesil acetona (5,7%), ciclopentadecanolídeo (5,5%) e fitol (5,1%), encontrados majoritariamente na composição.

A mucilagem presente nas folhas de ora-pro-nóbis foi estudada por Martin *et al.* (2017) através da análise de polissacarídeos por GC-MS e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), permitindo caracterizá-la como um heteropolissacarídeo formado principalmente por uma cadeia de unidades de β -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4) parcialmente substituídas por arabinose. Além disso, também foi identificada a presença de ácido galacturônico parcialmente esterificado e unidades de fucose (MARTIN *et al.*, 2017).

3.4 Atividade farmacológica e desenvolvimento de novos produtos

P. aculeata apresenta grande potencial bioativo, sendo descritas na literatura atividades antioxidante, antibacteriana, tripanocida, citotoxicidade em linhagens de células tumorais, anti-inflamatória e cicatrizante (MACIEL *et al.*, 2019; VIEIRA *et al.*, 2019). A atividade antioxidante foi avaliada por ensaio com radical DPPH em extratos aquoso, hidroetanólico 70% e acetona 80%, e os valores de Concentração Efetiva 50 (CE₅₀) foram descritos como 106,1, 56,6 e 49,1 μ g/mL, respectivamente (SOUSA *et al.*, 2014).

Em relação à atividade antibacteriana, estudos mostraram que extratos hidroetanólicos, metanólicos, clorofórmicos e de éter de petróleo foram capazes de inibir o crescimento de algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GARCIA *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2016). Souza *et al.* (2016) também

demonstraram o potencial antifúngico de alguns desses extratos em espécies de *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.*

Também foi descrito potencial tripanocida para extrato aquoso das folhas de ora-pro-nóbis, o qual foi capaz de eliminar completamente a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* em 24 h (VALENTE *et al.*, 2007). Ademais, em estudos *in vitro*, os extratos das folhas de *P. aculeata* (aquoso, metanólico, clorofórmico, diclorometano:metanol 1:1 e éter de petróleo) também apresentaram citotoxicidade em diferentes linhagens de células tumorais (VALENTE *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2016).

Além disso, o potencial anti-inflamatório e cicatrizante dessa espécie vegetal também é amplamente descrito (SARTOR *et al.*, 2010; PINTO *et al.*, 2015a; MACIEL *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2014; PINTO *et al.*, 2016; PINTO *et al.*, 2015b). Pinto *et al.* (2015b) demonstraram que a fração hexânica de extrato metanólico das folhas foi capaz de reduzir os níveis de Interleucina 6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) em ratos, demonstrando seu potencial anti-inflamatório tópico. Esta mesma fração foi empregada por Fontes *et al.* (2019) na elaboração de um creme farmacêutico em concentrações entre 6 e 12% (Inflativ[®]), também agindo em inflamações tópicas agudas e crônicas em modelos animais.

Observa-se, portanto, que as atividades biológicas de *P. aculeata* descritas na literatura tornam-na uma espécie de grande interesse na pesquisa científica e promissora na busca por novos fármacos e medicamentos. Contudo, seu principal potencial relaciona-se ao ramo alimentício, já que alguns estudos descreveram o uso da farinha obtida das folhas de ora-pro-nóbis no desenvolvimento de outros produtos com a finalidade de enriquecer o conteúdo nutricional destes (TAKEITI *et al.*, 2009; LIMA JÚNIOR *et al.*, 2013; BARBALHO *et al.*, 2016). Outro potencial dessa espécie que também pode ser explorado é a utilização da mucilagem presente nas folhas, das quais podem ser extraídos os hidrocoloides, aplicados como espessantes, gelatinizantes e emulsificantes de alimentos (RESENDE *et al.*, 2016).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e equipamentos

Balança analítica: Marte®, modelo AY220.

Balança com radiação por infravermelho: GEHAKA®, modelo IV 2000.

Cartucho para extração em fase sólida: Agilent SampliQ® C18 (15 x 10mm; 55 µm).

Coluna cromatográfica para HPLC-UV: Ascentis® C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), Supelco.

Coluna cromatográfica para UHPLC-UV: ACQUITY® UPLC HSS T3 (100 mm, 2,1 mm X 1,8 µm).

Coluna cromatográfica para GC-MS: Agilent®, modelo 19091S-433 de sílica fundida (30 mm x 250 µm x 0,25 µm; 5% de difenilsiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano).

Cromatógrafo a gás: Agilent®, 7890A, equipado com detector MSD, 5975C.

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência - HPLC (Shimadzu®): bomba binária LC-6AD, desgaseificador, injetor manual com loop de 20 µL, detector UV/VIS de comprimento de onda variável SPD-20A, programa gerenciador do cromatógrafo CBM-20A e de dados LC solution® versão 1.25 SP4.

Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência - UHPLC (Waters®): modelo ACQUITY® H-class PLUS com bomba quaternária, desgaseificador, injetor automático com loop de 10 µL, detector UV, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados ACQUITY UPLC H-Class.

Estufa de secagem de material vegetal com circulação de ar: Fanem®, modelo 320-SE.

Espectrofotômetro no UV: Shimadzu®, modelo 1800 manual.

Placas de sílica gel para CCD: Macherey-Nagel® (espessura 0,20 mm).

Filtro de membrana para extratos: 0,22 µm, PVDF, Milipore®.

Filtro de membrana para óleo essencial: 0,20 µm, Chromafil®.

Liofilizador: Christ®, modelo alpha 2-4 LD plus.

Microscópio automático: GE Healthcare®, modelo IN Cell Analyser 200.

Moinho de facas: Tecnal®, modelo TE 148.

Padrão de ácido gálico: Impex®, CAS: 5995-86-8.

Padrão de *n*-alcanos: Sigma Aldrich®, C8 - C20.

Padrão de quercetina: Sigma Aldrich®, CAS: 117-39-5.

Reagente Folin-Ciocalteu: Dinâmica®, CAS: 10213-10-2, 10102-40-6.

Rotaevaporador: Heidolph®, modelo Hei-VAP-Advantage.

Solventes:

- a) **Água ultrapura:** Merck Milipore®, modelo Direct® - Q 3 UV.
- b) **Solvente grau cromatográfico:** metanol J. T. Baker®; ácido acético J. T. Baker®; hexano Anidrol®; acetonitrila J. T. Baker®.
- c) **Solvente grau PA:** etanol LS Chemicals®; acetato de etila LS Chemicals®; heptano Dinâmica®, tolueno LS Chemicals®, metanol LS Chemicals®, ácido acético LS Chemicals®.
- d) **NADES:** mentol Dinâmica®, CAS: 89-78-1; cânfora Êxodo Científica®, CAS: 76-22-2.

Ultrassom: Odontobras®, modelo 2840D.

4.2 Coleta e preparo do material vegetal

As folhas de *Pereskia aculeata* Mill. foram coletadas no dia 22 de outubro de 2020, no município de Araraquara-SP, em área urbana - 21° 47' 28,777" S e 48° 11' 17,675" O, 643 m de altitude, no período da manhã (entre 7 e 8h). Este estudo foi registrado (Anexo 1) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) do Conselho de Gestão do

Patrimônio Genético do Ministério do Meio Ambiente, sob o código AE422BB (Unesp, 48.031.918 / 0001-24).

As folhas foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar (Fanem®, modelo 320-SE) a 40°C durante 3 dias, período no qual foi realizado o controle de perda de umidade através da pesagem de uma amostra do material até massa constante. Para tanto, foram pesadas 4,0 g do material vegetal, em unicata, e realizaram-se as pesagens com intervalo de 12-12h. A moagem do material foi realizada em moinho de facas (Tecnal®, modelo TE 148) e o material seco e moído foi armazenado em recipiente de vidro vedado em geladeira.

4.2.1 Perda por dessecação em balança com radiação por infravermelho

Para a análise de perda por dessecação, foi pesado 1,0 g do material vegetal seco e moído e submetido a aquecimento em balança com radiação no infravermelho (GEHAKA®, modelo IV 2000) por 5 min. Este procedimento foi realizado em duplicata e o resultado foi expresso como a média dos dois valores obtidos em porcentagem (% m/m) (BRASIL, 2010).

4.3 Obtenção dos extratos hidroetanólico 70% e etanólico de folhas de *P. aculeata*

Para obtenção dos extratos, as folhas secas e moídas foram submetidas à sonicação com agitação ocasional, realizada em três etapas de 20 min em banho de ultrassom (Odontobras®, modelo 2840D). Foram utilizados etanol 70% (extrato hidroetanólico) e etanol (extrato etanólico) como líquidos extratores na proporção 1:15 (m/v). As soluções extrativas obtidas foram filtradas em papel de filtro. A secagem do extrato etanólico foi realizada por rotaevaporação (aparelho Heidolph®, modelo Hei-VAP-Advantage), seguida de secagem do material residual em capela e dessecador com sílica gel ativada. Para o extrato hidroetanólico 70%, após a rotaevaporação foi realizada a liofilização (Christ®, modelo alpha 2-4 LD plus) para remoção da água presente na solução extrativa e, posteriormente, secagem do material residual em capela sob fluxo de ar e dessecador com sílica gel ativada. Os extratos secos foram mantidos em frascos de vidro vedados, identificados e sob refrigeração.

4.4 Obtenção de extrato de folhas de *P. aculeata* utilizando NADES lipofílicos

Para a obtenção dos extratos a partir de NADES, as folhas secas e moídas foram submetidas à extração com mentol e cânfora 1:1 (m/m) (SEKHARAN *et al.*, 2021; CUNHA; FERNANDES, 2018) por sonicação (Odontobras®, modelo 2840D) em uma etapa de 20 min na proporção 1:10 (m/v). O NADES foi preparado sob agitação e aquecimento com controle de temperatura, a fim de não ultrapassar 80°C.

4.5 Obtenção do óleo essencial das folhas de *P. aculeata*

A obtenção do óleo essencial das folhas de ora-pro-nóbis foi realizada em aparelho tipo Clevenger, com o material vegetal fresco rasurado. Para a extração do óleo essencial, foram utilizados 450 g de material vegetal com adição de 2,5 L de água deionizada a balão de fundo redondo com capacidade de 5 L. O conteúdo obtido por hidrodestilação foi coletado e realizou-se uma extração líquido-líquido, utilizando 90 mL de éter dietílico em três etapas. Após eliminação do solvente por secagem em capela sob fluxo de ar, o óleo essencial obtido foi identificado e armazenado em frasco de vidro em congelador comum (-14 °C a -25 °C).

4.6 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais foi realizada por fotometria no visível, com utilização de método de oxirredução empregando reagente de Folin-Ciocalteu e realização de curva analítica com padrão ácido gálico, conforme descrito por Singleton *et al.* (1999). As amostras foram preparadas em triplicata, com sua absorbância medida em 760 nm, utilizando espectrofotômetro UV/Vis de cubetas (Shimadzu®, modelo 1800 manual). Foram realizadas leituras dos extratos etanólico e hidroetanólico 70% em concentração de 3 mg/mL (em etanol). A curva analítica de ácido gálico foi obtida com 6 soluções do padrão (triplicata) em concentrações entre 0,625 a 20 µg/mL (em etanol). Os resultados obtidos foram expressos em teor de compostos fenólicos totais equivalentes a ácido gálico (% m/m).

4.7 Determinação da atividade antioxidante utilizando o radical DPPH

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada utilizando-se o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), de acordo com o método proposto por Sharma e

Bhat (2009), com algumas alterações. Foram preparadas, em triplicata, soluções com diferentes concentrações dos extratos etanólico e hidroetanólico 70% (25, 50, 100, 200, 400 e 800 µg/mL). A solução de DPPH• foi preparada a 280 µM em etanol. Estas concentrações referem-se às soluções inicialmente preparadas.

No preparo das misturas reacionais, foram utilizados 3 mL das soluções com diferentes concentrações dos extratos etanólico e hidroetanólico 70% e 1 mL da solução de DPPH•. As concentrações finais obtidas nas misturas reacionais foram 18,75; 37,5; 75; 150; 300 e 600 µg/mL para ambos os extratos. A solução de DPPH• apresentou concentração de 70 µM na mistura reacional. Como branco foram utilizados 3 mL das soluções com diferentes concentrações dos extratos e 1 mL de etanol. As reações foram incubadas em temperatura ambiente por 30 min ao abrigo de luz e, em seguida, realizou-se a leitura da absorbância em 517 nm utilizando espectrofotômetro UV/Vis de cubetas (Shimadzu®, modelo 1800 manual). A partir dos valores de absorbância obtidos foram calculadas as médias e a porcentagem de inibição do radical DPPH, segundo a Equação 1.

Equação (1) - Cálculo da porcentagem de inibição do radical DPPH.

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{A_{\text{máx}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{máx}}} \right) \times 100$$

% Inibição = porcentagem de inibição do radical DPPH
 A máx = absorbância do radical DPPH na ausência de amostra em 517 nm
 A amostra = absorbância do radical DPPH na presença de amostra em 517 nm

4.8 Ensaio de embriotoxicidade utilizando *zebrafish*

O ensaio para avaliação da embriotoxicidade de extrato etanólico de folhas de *P. aculeata* foi conduzido em modelo animal alternativo utilizando embriões de *Danio rerio* (popularmente conhecido como *zebrafish*), de acordo com Singulani *et al.* (2018) e seguindo as recomendações da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) (OCDE, 2013). Por serem utilizados indivíduos em fase embrionária, não houve necessidade de autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais.

O extrato etanólico de folhas de *P. aculeata* foi testado em três diferentes concentrações: 50, 100 e 200 µg/mL. Os animais foram mantidos em aquário com controle de temperatura (28 ± 0,5 ° C) em ciclo de 14h de luz e 10h de escuro. Após a coleta, os embriões foram mantidos em meio embrionário, formado composto por

NaCl 10 mM; KCl 0,34 mM; 0,66 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,66 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e suplementado com 0,00003% de azul de metileno. Esses embriões foram transferidos para placas de 96 poços incubadas a 28° C e a observação foi realizada em microscópio invertido após 24, 48 e 72 horas pós fecundação (hpf), conforme recomendado pela OCDE (OCDE, 2013). A captura das imagens foi realizada em microscópio automático IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare®). As curvas de sobrevivência foram traçadas utilizando-se o método de Kaplan-Meier e comparadas através do teste de log-rank.

4.9 Análise dos extratos etanólico e hidroetanólico por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para realização da análise dos extratos etanólico e hidroetanólico 70% por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), foram utilizadas cromatoplasas de sílica gel Macherey-Nagel® (espessura 0,20 mm) cortadas nas dimensões de lâminas microscópicas. As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em etanol e aplicadas nas cromatoplasas com auxílio de capilar de vidro. A fase móvel foi constituída por tolueno: acetato de etila: metanol: ácido acético 5,3:4:0,5:0,2 (v/v). A revelação das substâncias foi realizada por vaporização com anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento em estufa a 110° C por cerca de 10 min.

4.10 Pré-tratamento das amostras para análise por cromatografia líquida (HPLC-UV e UHPLC-UV)

4.10.1 Pré-tratamento para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-UV)

Para análise por HPLC, foram realizados três tipos de pré-tratamento por extração em fase sólida (EFS). Em todos os pré-tratamentos (itens 4.10.1 e 4.10.2) foi realizada a ativação do cartucho com metanol e condicionamento com o primeiro eluente.

Nos dois primeiros procedimentos foi utilizado cartucho Agilent SampliQ® (C18; 15 x 10 mm, 55 µm) constituído por sílica de fase reversa (FR). No pré-tratamento 1, foram pesados 20 mg do extrato etanólico, solubilizados em 1 mL de metanol:água 95:5 (v/v) e eluídos com 4 mL desta mesma solução. As amostras foram secas em capela sob fluxo de ar e, posteriormente, em dessecador com sílica gel ativada sob pressão reduzida. Em seguida, as mesmas foram solubilizadas em

0,5 mL de metanol: água 1:1 (v/v) e filtradas utilizando-se filtro de membrana PVDF 0,22 µm (Milipore®).

Para o pré-tratamento 2, foram pesados 10 mg dos extratos etanólico e hidroetanólico 70%, solubilizados em 1 mL metanol:água 95:5 (v/v) e eluídos com 4 mL desta mesma solução. As amostras foram secas em capela sob fluxo de ar e, posteriormente, em dessecador com sílica gel ativada sob pressão reduzida. Em seguida, as mesmas foram solubilizadas em 0,5 mL de acetonitrila: água 1:1 (v/v) e filtradas utilizando-se filtro de membrana PVDF 0,22 µm (Milipore®).

O pré-tratamento 3 foi realizado apenas com o extrato obtido pela extração via NADES (descrito no item 4.4). Utilizou-se cartucho de plástico para EFS vazio com o filtro inferior e preenchido com sílica gel 63-200 µm. A altura da fase estacionária (h_{FE}) foi de 1,5 cm e a fase móvel foi composta por heptano (eluente 1) e acetato de etila (eluente 2). Foi eluído 1 mL do extrato de NADES com 2 mL de heptano para eliminação de interferentes (fração heptano) e, em seguida, eluíram-se os analitos de interesse com 4 mL de acetato de etila. As amostras foram secas em capela sob fluxo de ar e em dessecador com sílica gel, solubilizadas em 3,5 mL de acetonitrila:água 1:1 (v/v) e filtradas em membrana PVDF 0,22 µm (Milipore®).

4.10.2 Pré-tratamento para análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC-UV)

Para análise por UHPLC-UV, foram realizados dois tipos de pré-tratamento das amostras, ambos por EFS utilizando cartucho Agilent SampliQ® (C18; 15 x 10 mm, 55 µm) constituído por sílica de FR. No pré-tratamento 1, foram utilizados 10 mg dos extratos etanólico e hidroetanólico 70%, os quais foram solubilizados em 1 mL de etanol:água 85:15 (v/v). Esses extratos foram eluídos com 4 mL de etanol:água 85:15 (v/v), seguido de secagem das amostras, as quais foram solubilizadas posteriormente em 1 mL de etanol:água 75:25 (v/v) e filtração em membrana PVDF 0,22 µm (Milipore®).

Para o pré-tratamento 2, foram pesados 20 mg dos extratos, os quais foram solubilizados em 1 mL de solução etanol:água 05:95 (v/v) e eluídos com 4 mL desta mesma solução (fração etanol 5%) para eliminação de interferentes polares, especialmente açúcares. Em seguida, eluíram-se os analitos de interesse utilizando uma solução de etanol:água 85:15 (v/v) (fração etanol 85%) e, por fim, foi realizada a lavagem do cartucho (interferentes de baixa polaridade) eluindo com etanol 100%

(v/v) (fração etanol). As amostras foram submetidas à secagem em capela, solubilizadas em 1 mL de etanol:água 15:85 (v/v) e filtradas em membrana PVDF 0,22 µm (Milipore®).

4.11 Desenvolvimento de métodos analíticos por cromatografia líquida (HPLC-UV e UHPLC-UV)

4.11.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-UV)

Inicialmente, utilizou-se um gradiente exploratório para análise do extrato hidroetanólico 70% por HPLC-UV. A análise foi realizada em aparelho Shimadzu®, utilizando coluna Ascentis® C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), fase móvel composta por água acidificada com 2% de ácido acético (A) e metanol (B) em 5 - 100% B em 35 min, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e detecção em 250 e 350 nm. Nesta condição de gradiente exploratório, foi analisado o extrato hidroetanólico 70% sob o pré-tratamento 1.

A partir dos cromatogramas obtidos nesta primeira análise, foram realizadas modificações no tempo de gradiente e composição da fase móvel, com a finalidade de aprimorar a resolução (R_s) dos picos. As novas análises foram realizadas apenas com o extrato hidroetanólico 70%, com a finalidade de aprimorar o método, submetido ao pré-tratamento 1. Foram testados métodos com água acidificada a 2% de ácido acético (A) e metanol (B) e água acidificada a 2% de ácido acético (A) e acetonitrila (C). As condições testadas estão descritas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Condições cromatográficas (tempo de gradiente e %B) utilizadas para análise em HPLC-UV de extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata*.

Condição ^a	Fase Móvel (%B) e tempo (min)
Condição 1	5 - 100 %B (0-35 min)
	5 %B (0-5 min)
	5 - 35 %B (5-7 min)
Condição 2	35 - 70 %B (7-40 min)
	70 - 100 %B (40-45 min)
	100 %B (45-50 min)
Condição 3	5 %B (0-5 min)
	5 - 35 %B (5-7 min)
	35 - 60 %B (7-40 min)
	60 - 100 %B (40-45 min)

Condição 4	100 %B (45-50 min)
	5 %B (0-8 min)
	5 - 25 %B (8-10 min)
	25 - 45 %B (10-40 min)
	45 - 100 %B (40-42 min)
Condição 5	100 %B (42-45 min)
	5 %B (0-5 min)
	5 - 20 %B (5-7 min)
	20 %B (7-20 min)
	20 - 30 %B (20-22 min)
	30 %B (22-35 min)
	30 - 45 %B (35-42 min)
Condição 6	45 - 100 %B (42-55 min)
	100 %B (55-57 min)
	5 %B (0-5 min)
	5 - 10 %B (5-7 min)
	10 %B (7-16 min)
	10 - 25 %B (16-18 min)
	25 - 100 %B (18-50 min)
	100 %B (50-55 min)

^aCondições cromatográficas: coluna Ascentis® C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm); fase móvel água acidificada a 2% de ácido acético (A) e metanol (B); volume de injeção 20 µL, vazão 1 mL/min e detector UV/Vis em comprimentos de onda 250 e 350 nm. Em todas as análises apresentadas na Tabela 1, foi utilizado como amostra o extrato hidroetanólico 70% submetido ao pré-tratamento 1. **Fonte:** Elaborado pela autora.

Tabela 2. Condições cromatográficas (tempo de gradiente e %C) utilizadas para análise em HPLC-UV de extratos etanólico e hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata*.

Condição ^a	Fase Móvel (%B) e tempo (min)	Condição ^a	Fase Móvel (%B) e tempo (min)
Condição 1 ^b	5 - 100 %C (0-35 min)	Condição 8 ^c	10 - 75 %C (0-40 min)
			75 - 100 %C (40-42 min)
			100 %C (42-47 min)
Condição 2 ^b	5 %C (0-5 min)	Condição 9 ^c	10 - 70 %C (0-40 min)
	5 - 7 %C (5-7 min)		
	7 %C (7-16 min)		
	7 - 15 %C (16-18 min)		
	15 - 100 %C (18-50 min)		
	100 %C (50-55 min)		

Condição 3 ^b	5 %C (0-5 min)	Condição 10 ^c	5 %C (0-5 min)
	5 - 25 %C (5-7 min)		5 - 70 %C (5-40 min)
	25 - 60 %C (7-40 min)		70 - 100 %C (40-42 min)
	60 - 100 %C (40-45 min)		
	100 %C (45-50 min)		
Condição 4 ^b	5 %C (0-5 min)	Condição 11 ^c	10 - 70 %C (0-30 min)
	5 - 30 %C (5-7 min)		70 - 100 %C (30-32 min)
	30 - 40 %C (7-40 min)		
	40 - 100 %C (40-45 min)		
	100 %C (45-50 min)		
Condição 5 ^b	5 %C (0-5 min)	Condição 12 ^c	10 - 90 %C (0-30 min)
	5 - 25 %C (5-7 min)		90 - 100 %C (30-32 min)
	25 - 35 %C (7-17 min)		
	35 - 45 %C (17-27 min)		
	45 - 70 %C (27-29 min)		
	70 - 100 %C (29-40 min)		
Condição 6 ^c	100 %C (40-45 min)	Condição 13 ^{c,d}	10 %C (0-5 min)
	5 %C (0-5 min)		10 - 90 %C (5-30 min)
	5 - 90 %C (5-40 min)		90 - 100 %C (30-32 min)
	90 - 100 %C (40-42 min)		
	100 %C (42-47 min)		
Condição 7 ^c	10 - 80 %C (0-40 min)	Condição 14 ^c	10 - 90 %C (0-40 min)
	80 - 100 %C (40-42 min)		90 - 100 %C (40-42 min)
	100 %C (42-47 min)		100 %C (42-47 min)

^aCondições cromatográficas: coluna Ascentis® C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm); fase móvel água acidificada a 2% de ácido acético (A) e acetonitrila (C); volume de injeção 20 µL, vazão 1 mL/min e detector UV/Vis em comprimentos de onda 250 e 350 nm. ^bAmostra submetida a pré-tratamento 1. ^cAmostra submetida a pré-tratamento 2. ^dExcepcionalmente na condição 13 a fase móvel foi composta por água acidificada a 2% de ácido acético (A) e acetonitrila acidificada a 2% de ácido acético (B). **Fonte:** Elaborado pela autora.

4.11.2 Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC-UV)

As análises por UHPLC-UV foram realizadas utilizando-se sistema UPLC ACQUITY Waters®, acoplado a detector no UV/Vis (UHPLC-UV). A separação cromatográfica foi realizada em coluna ACQUITY UPLC HSS T3 (1,8 µm, 2,1 mm x 100 mm). Realizou-se a detecção em comprimentos de onda de 250 e 350 nm. Foram testadas três diferentes fases móveis, sendo elas: água com 1% de ácido acético (A) e etanol (B) água acidificada a 2% de ácido acético (A) e etanol (B), e

água acidificada a 2% de ácido acético (A) e metanol (B). Iniciou-se a análise com gradiente exploratório partindo de 5 a 100% B em 10 min, vazão de 0,2 mL/min e volume de injeção de 10 µL. Para as demais análises, foram alterados os parâmetros de tempo de gradiente, vazão e % B, conforme descrito nas Tabelas 3 e 4. Algumas análises foram realizadas apenas com o extrato hidroetanólico 70%.

Tabela 3. Condições cromatográficas (tempo de gradiente e %B) utilizadas para análise em UHPLC-UV de extratos etanólico e hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata*, utilizando fase móvel composta por água acidificada com 1 ou 2% de ácido acético (A) e etanol (B).

Condição ^a	Fase Móvel (%B) e tempo (min)
Condição 1 ^b	5 - 100 %B (0-10 min)
Condição 2 ^c	5 - 100 %B (0-10 min)
Condição 3 ^c	5 %B (0-3 min)
	5 - 35 %B (3-4 min)
	35 - 55 %B (4-8 min)
	55 - 100 %B (8-12 min)
	100 %B (12-15 min)
Condição 4 ^c	25 - 25 %B (0-10 min)
	25 - 60 %B (10-12 min)
	60 - 95 %B (12-22 min)
	95 - 100 %B (22-23 min)
	100 %B (23-25 min)
Condição 5 ^c	5 - 20 %B (0-2 min)
	20 - 25 %B (2-12 min)
	25 - 60 %B (12-14 min)
	60 - 95 %B (14-24 min)
	95 - 100 %B (24-25 min)
	100 %B (25-27 min)

^aCondições cromatográficas: coluna ACQUITY® UPLC HSS T3 (1,8 µm, 2,1 mm X 100 mm); volume de injeção 10 µL, e detector UV/Vis em comprimentos de onda 250 e 350 nm. ^bFase móvel composta por água acidificada a 1% de ácido acético (A) e etanol (B); vazão 0,2 mL/min; amostras submetidas a pré-tratamento 1. ^cFase móvel composta por água acidificada a 2% de ácido acético (A) e etanol (B); vazão 0,3 mL/min; amostra submetida a pré-tratamento 2. **Fonte:** Elaborado pela autora.

Tabela 4. Condições cromatográficas (tempo de gradiente e %B) utilizadas para análise em UHPLC-UV de extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata*,

utilizando fase móvel composta por água acidificada a 2% de ácido acético (A) e metanol (B).

Condição ^a	Fase Móvel (%B) e tempo (min)	Condição ^a	Fase Móvel (%B) e tempo (min)
Condição 1	3 %B (0-5 min)	Condição 5	35 - 55 %B (0-8 min)
	3 - 45 %B (5-7 min)		55 - 70 %B (8-10 min)
	45 - 55 %B (7-15 min)		70 - 90 %B (10-15 min)
	55 - 100 %B (15-17 min)		90 - 100 %B (15-16 min)
	100 %B (17-19 min)		100 %B (16-18 min)
Condição 2	0 - 5 %B (0-5 min)	Condição 6	30 - 55 %B (0-8 min)
	5 - 40 %B (5-7 min)		55 - 70 %B (8-10 min)
	40 - 55 %B (7-15 min)		70 - 90 %B (10-15 min)
	55 - 100 %B (15 a 17 min)		90 - 100 %B (15-16 min)
	100 %B (17 a 19 min)		100 %B (16-18 min)
Condição 3	0 - 10 %B (0-5 min)	Condição 7	25 - 55 %B (0-8 min)
	10 - 40 %B (5-7 min)		55 - 70 %B (8-10 min)
	40 - 55 %B (7-15 min)		70 - 90 %B (10-15 min)
	55 - 100 %B (15-17 min)		90 - 100 %B (15-16 min)
	100 %B (17-19 min)		100 %B (16-18 min)
Condição 4	40 - 57 %B (0-8 min)	Condição 8	15 %B (0-4 min)
	57 - 90 %B (8-15 min)		15 - 37 %B (4-6 min)
	90 - 100 %B (15-17 min)		37 %B (6-14 min)
	100 %B (17-19 min)		37 - 50 %B (14-16 min)
			50 - 90 %B (16-24 min)
			90 - 100 %B (24-25 min)
			100 %B (25-27min)

^aCondições cromatográficas: coluna ACQUITY® UPLC HSS T3 (1,8 µm, 2,1 mm X 100 mm); volume de injeção 10 µL, detector UV/Vis em comprimentos de onda 250 e 350 nm; fase móvel composta por água acidificada a 2% de ácido acético (A) e metanol (B); vazão 0,35 mL/min; amostras submetidas a pré-tratamento 2. **Fonte:** Elaborado pela autora.

4.12 Identificação de metabólitos secundários do óleo essencial por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)

As análises das amostras foram realizadas em um cromatógrafo a gás (GC) Agilent®, modelo 7890A, equipado com injetor automático modelo G4513A e com fonte de ionização por elétrons (EI-MS) operando em 70 eV. A separação cromatográfica foi realizada em coluna capilar Agilent®, modelo 19091S-433, de sílica fundida (30 m x 250 µm d. i. x 0,25 µm). Foi utilizado gás hélio (99,999%) como gás de arraste, a um fluxo constante de 1,0 mL/min. A temperatura do injetor e da

fonte de íons foi de 250°C. As amostras foram preparadas em hexano grau espectroscópico e o volume de injeção de amostra foi de 1,0 µL, modo split (1:10). A temperatura do forno foi programada de 60°C a 250°C a uma velocidade de 3°C/min, por 60 minutos. Os espectros de massas foram registrados com um intervalo de varredura de 0,5 s na faixa de massas de 40 a 600 Da.

Identificaram-se os componentes nas amostras do óleo essencial (OE) baseando-se nos respectivos índices de retenção relativos a uma série homóloga de *n*-alcanos (C8 - C20, Sigma Aldrich®) nas mesmas condições da amostra. Posteriormente, foi realizada a identificação através dos espectros de massas, os quais foram comparados com os espectros contidos nas bibliotecas do sistema de dados do GC.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perda por dessecação em balança com radiação por infravermelho

A secagem do material vegetal em estufa com circulação de ar em temperatura controlada foi realizada com a finalidade de remover a água livre presente nas folhas da planta. Este processo é importante, pois a presença de água nas folhas, mesmo após a coleta do material, favorece o desenvolvimento de reações do metabolismo vegetal, bem como o crescimento de microorganismos capazes de degradar o material.

O resultado obtido após a realização da determinação de umidade, em duplicata, foi na média de 6,0% ± 0,2 (m/m). Este teor encontra-se abaixo do limite máximo de 14% descrito na literatura (SIMÕES *et al.*, 2017). Obter teores de umidade abaixo do limite é essencial para garantir que a quantidade de água residual presente nas folhas após a secagem em estufa não cause deterioração das substâncias a serem analisadas.

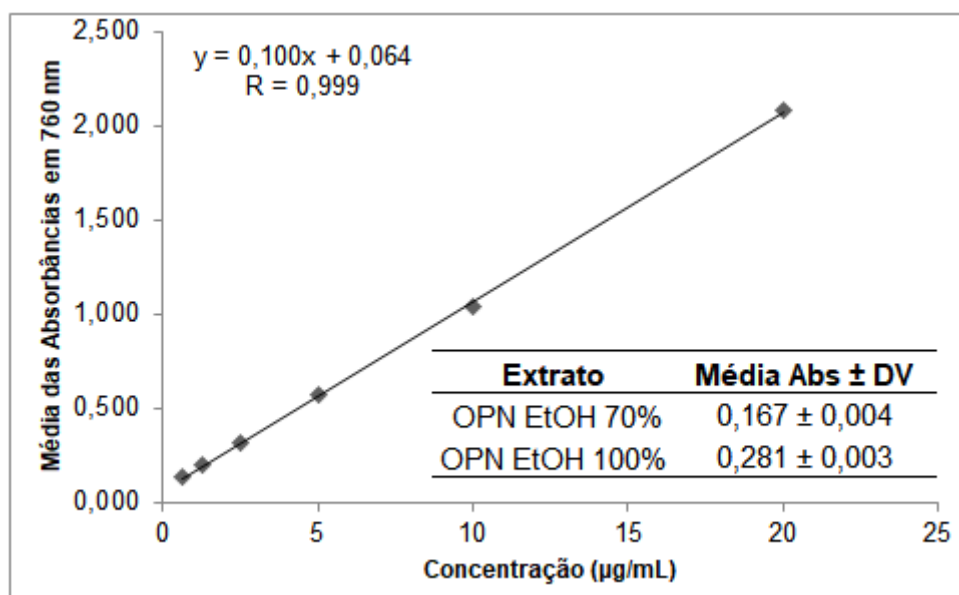
5.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O método empregado neste trabalho para a determinação do teor de compostos fenólicos totais utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu, o qual é composto por uma mistura complexa de cátions. Quando em contato com compostos fenólicos presentes nas amostras, o reagente de Folin-Ciocalteu sofre redução e ocorre a formação do complexo azul de molibdênio, que apresenta absorção em

comprimento de onda de 760 nm (SOUSA *et al.*, 2014). Os compostos fenólicos presentes em espécies vegetais possuem importante atividade antioxidante sendo, portanto, capazes de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu.

Com a média dos resultados das leituras de absorvância das soluções do padrão ácido gálico em diferentes concentrações, obteve-se a curva analítica apresentada na Figura 2, com os valores de x correspondentes às diferentes concentrações das soluções de ácido gálico e y correspondente aos respectivos valores de leitura da absorvância em 760 nm. Através do gráfico plotado, determinou-se a equação da reta correspondente ($y = 0,100x + 0,064$), bem como a correlação entre as variáveis através do coeficiente de correlação de Pearson ($R = 0,999$).

Figura 2 - Curva analítica de ácido gálico (0,625 a 20 µg/mL) obtida com reagente de Folin-Ciocalteu a partir da leitura das soluções em espectrofotômetro em 760 nm e valores de absorvância dos extratos.



Nota: A tabela inserida na Figura 2 mostra os valores das médias das absorvâncias obtidos para os extratos etanólico (OPN EtOH 100%) e hidroetanólico 70% (OPN EtOH 70%) de *P. aculeata* na determinação do teor de compostos fenólicos totais. (Abs) absorvância; (DV) desvio padrão. **Fonte:** Elaborado pela autora.

A partir dos valores da leitura de absorvância, calculou-se a média e o desvio padrão (DV) para os extratos etanólico e hidroetanólico 70%, resultando em $0,281 \pm 0,003$ e $0,167 \pm 0,004$, respectivamente. Estes valores médios foram aplicados na equação obtida pela curva analítica para determinar o teor de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico. Os valores obtidos para os extratos etanólico e hidroetanólico 70% foram, respectivamente, 7,1% e 3,4% (m/m).

Os resultados dos valores de compostos fenólicos totais para os extratos encontrados neste estudo diferem do teor encontrado para plantas em geral. Para a maioria das espécies vegetais, o teor de compostos fenólicos em extrato etanólico costuma ser inferior ao extrato hidroetanólico 70%, o que não foi observado em nossos resultados. A literatura descreve 8,7% (m/m) (SOUZA *et al.*, 2021) de compostos fenólicos totais em folhas secas de ora-pro-nóbis. Em relação aos extratos de *P. aculeata*, a porcentagem varia de acordo com o tipo de extrato avaliado. Esses valores encontram-se entre 0,5 a 11,8% (SOUZA *et al.*, 2016; ALMEIDA *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2021), sendo 0,5% (m/m) para extrato clorofórmico (SOUZA *et al.*, 2016), 1,2% (m/m) para extrato obtido com éter de petróleo (SOUZA *et al.*, 2016), 1,5% (m/m) para extrato metanólico (SOUZA *et al.*, 2016), 5,0% (m/m) para extrato aquoso (SOUSA *et al.*, 2014), 9,6% (m/m) para extrato hidroetanólico 70% (SOUSA *et al.*, 2014) e 11,8% (m/m) para extrato obtido com acetona 80% (SOUSA *et al.*, 2014). Dessa forma, os teores encontrados nos resultados apresentados estão dentro da faixa descrita pela literatura.

A discrepância encontrada, contudo, pode ser explicada como consequência da diferença do solvente extrator, o que pode ter influenciado em termos de seletividade e eficiência da extração. Além disso, é importante destacar também que o método possui limitações intrínsecas, já que demais compostos redutores podem reagir com os componentes do reagente de Folin-Ciocalteu e formar o complexo azul de molibdênio, influenciando, portanto, na intensidade da cor da reação e, consequentemente, no valor da leitura da absorbância (EVERETTE *et al.*, 2010).

5.3 Determinação da atividade antioxidante utilizando radical DPPH

O método empregado neste trabalho para determinação da atividade antioxidante dos extratos de *P. aculeata* utiliza DPPH[•], um radical de coloração violeta e que apresenta máxima absorção de luz no espectro visível em cerca de 517 nm. Uma vez em contato com substâncias que apresentam atividade antioxidante, o DPPH[•] em sua forma livre é reduzido e, por consequência, ocorre decréscimo de sua absorbância em 517 nm (SOARES *et al.*, 1997). Portanto, quando uma solução de DPPH[•] entra em contato com soluções de extratos vegetais que possuem atividade antirradicalar, ocorre redução do radical pelos metabólitos secundários presentes nos extratos e a intensidade da coloração violeta diminui, o

que é detectado através da leitura da absorbância destas soluções em comprimento de onda de 517 nm.

A leitura da absorbância da solução de radical DPPH preparada em etanol (após a diluição - mistura 3 mL de etanol + 1 mL solução do radical DPPH) foi de 0,230. Com os valores obtidos após as leituras das absorbâncias das soluções dos extratos, foi calculada a média das absorbâncias para cada concentração e, em seguida, a porcentagem de inibição do radical DPPH segundo a Equação 1. A Tabela 5 apresenta os dados obtidos no ensaio.

Tabela 5 - Dados obtidos pela realização do ensaio de avaliação da atividade antioxidante de extratos etanólico e hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata*, utilizando radical DPPH.

Extrato Etanólico							
Concentração (µg/mL)	A	B	C	Média das absorbâncias	Abs Branco	Abs Real	% Inibição
600	0,799	0,802	0,772	0,791	0,604	0,187	18,696
300	0,527	0,530	0,518	0,525	0,300	0,225	2,174
150	0,407	0,400	0,391	0,399	0,147	0,252	-9,565
75	0,330	0,328	0,326	0,328	0,072	0,256	-11,304
37,5	0,296	0,300	0,298	0,298	0,036	0,262	-13,913
18,75	0,280	0,306	0,286	0,291	0,018	0,273	-18,696
Extrato Hidroetanólico 70%							
Concentração (µg/mL)	A	B	C	Média das absorbâncias	Abs Branco	Abs Real	% Inibição
600	0,551	0,562	0,562	0,558	0,286	0,273	-18,696
300	0,386	0,396	0,396	0,393	0,129	0,264	-14,783
150	0,320	0,320	0,330	0,323	0,058	0,262	-13,913
75	0,301	0,297	0,297	0,298	0,026	0,272	-18,261
37,5	0,286	0,290	0,287	0,288	0,013	0,276	-20,000
18,75	0,281	0,285	0,279	0,282	0,006	0,278	-20,870

Nota: A tabela contém dados de concentração (µg/mL) dos extratos etanólico e hidroetanólico 70%, absorbância em 517 nm de cada uma das triplicatas (A, B e C), média das absorbâncias das triplicatas (Média das absorbâncias), valor de absorbância em 517 nm de 3 mL das soluções dos extratos e 1 mL de etanol (Abs Branco), valor da média das absorbâncias subtraído do valor de absorbância branco (Abs Real) e valor da porcentagem de inibição seguindo a Equação 1 (% Inibição). **Fonte:** Elaborado pela autora.

Os dados da porcentagem de inibição observados (Tabela 5) não foram coerentes, incluindo resultados negativos. Os valores de absorbância dos brancos (3 mL das soluções dos extratos + 1 mL de etanol) foram altos, o que prejudica a análise, já que indica que há compostos interferentes nos extratos absorvendo no

mesmo comprimento de onda - 517 nm - utilizado para leitura da absorbância do radical DPPH. Desta forma, possíveis soluções incluem o uso de outro tipo de detecção como Ressonância Paramagnética Nuclear (EPR) (HERCULANO *et al.*, 2007) ou metodologia que utilize outro tipo de radical. Ainda, cabe ressaltar que a absorbância da solução final de DPPH usada como controle (absorbância máxima, Equação 1) foi baixa - 0,230 -, o que, de acordo com Sharma e Bhat (2009), não é adequado.

A literatura descreve elevada atividade antioxidante para extratos de folhas de ora-pro-nóbis. Sousa *et al.* (2014) avaliaram a atividade antirradicalar de extratos de folhas de *P. aculeata* utilizando radical DPPH. A CE_{50} encontrada para extrato hidroetanólico 70% foi de 56,6 µg/mL. Carvalho *et al.* (2014) avaliaram a porcentagem de inibição do DPPH* para extrato hidroetanólico 95% de folhas de *P. aculeata* (em concentração final de 0,01% (m/v)) entre 17 e 19,9%. A atividade antirradicalar encontrada em *P. aculeata* pode estar relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos nas folhas, principalmente flavonoides e ácidos fenólicos.

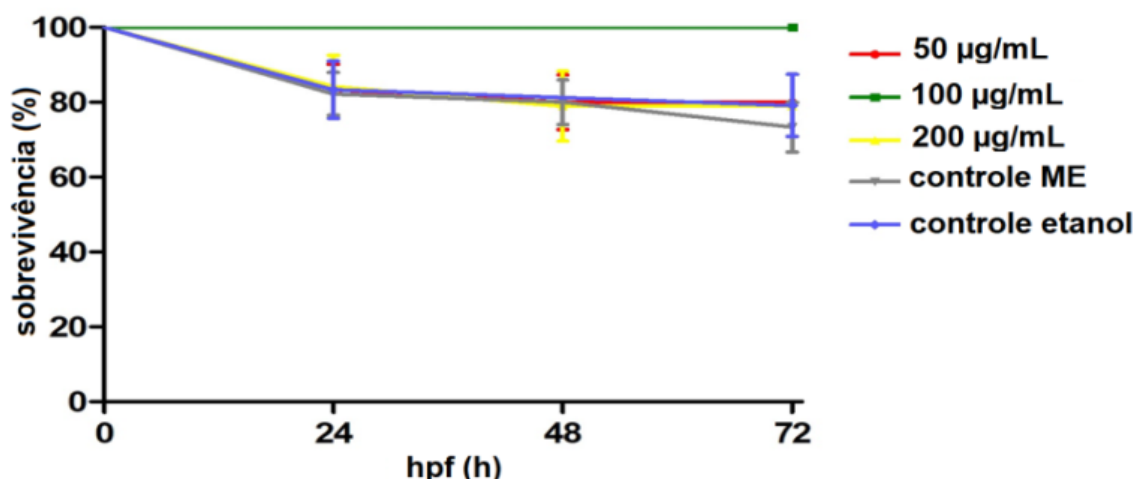
5.4 Ensaio de embriotoxicidade utilizando *zebrafish*

A avaliação da embriotoxicidade dos extratos de folhas de *P. aculeata* foi realizada utilizando método que permite avaliar a taxa de mortalidade e alterações morfológicas em embriões de *Danio rerio* (ou *zebrafish*), provocadas por efeitos embriotóxicos das amostras. O *zebrafish* é uma espécie de peixe de água doce que tem sido utilizada recentemente como modelo animal alternativo em pesquisas, principalmente pela facilidade em sua manutenção e reprodução, custo reduzido e metodologias de estudo bem descritas. Além disso, o genoma desta espécie encontra-se totalmente sequenciado e, por possuir genes homólogos em mamíferos, é possível prever os resultados em humanos através da experimentação nestes animais, sem a necessidade de uso de mamíferos (SCHNEIDER *et al.*, 2009).

Para esta análise, foi utilizado apenas o extrato etanólico, em função de ser o extrato que apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos totais no ensaio realizado previamente (descrito no item 5.2). Após a observação dos embriões nos períodos determinados, foi plotado o gráfico de curva de sobrevivência a partir da porcentagem de embriões vivos (%) *versus* hpf para cada uma das três concentrações de extrato etanólico utilizadas no ensaio e para todas as amostras, sendo elas: três concentrações do extrato etanólico (50, 100 e 200 µg/mL) e dois

controles (meio embriônico - ME e meio etanólico), seguindo recomendações da OCDE (OCDE, 2013). Conforme apresentado na Figura 3, as concentrações de 50 e 200 µg/mL resultaram em mortes dos embriões, porém sem diferença estatística quando comparadas com os meios controle. Por outro lado, a concentração de 100 µg/mL não resultou em mortes e houve uma diferença estatística na comparação destes dados com os meios controle, porém de modo positivo, já que todos os embriões permaneceram vivos após a exposição ao extrato nesta concentração. Este resultado pode ser explicado devido à elevada taxa de sobrevivência encontrada também nos dois controles (superiores a 70% após as 72 hpf).

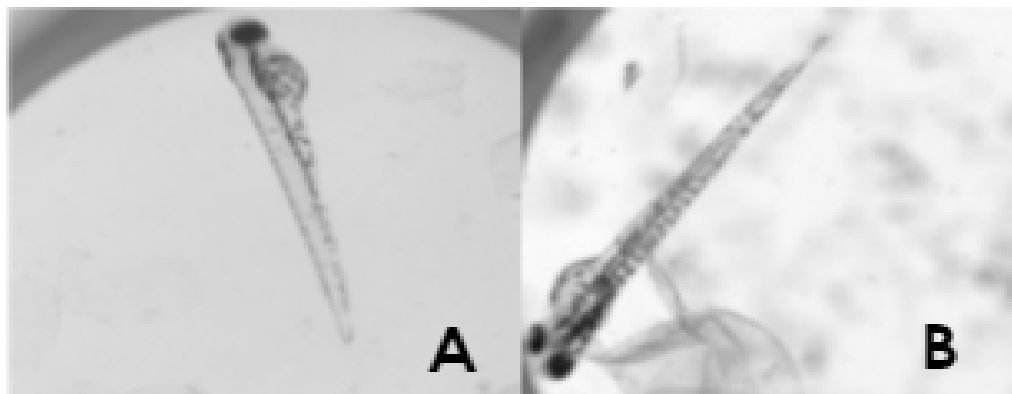
Figura 3 - Curvas de sobrevivência de embriões de *zebrafish* expostos a diferentes concentrações de extrato etanólico de *P. aculeata* segundo intervalos de hpf.



Nota: O gráfico representa dados combinados expressos como erro médio e erro padrão de um mínimo de dois experimentos diferentes. (ME) meio embriônico. **Fonte:** Elaborado pela autora.

Foi realizada também a observação dos fenótipos dos embriões por microscopia e captura de imagens. Conforme demonstrado na Figura 4, não foram observados efeitos embriotóxicos do extrato etanólico nas concentrações utilizadas, pois nenhum dos grupos de indivíduos apresentou desenvolvimento anormal, patologias embrionárias ou alterações na eclosão dos ovos. Estes resultados, portanto, sugerem ausência de efeitos embriotóxicos do extrato etanólico das folhas de *P. aculeata* nas concentrações utilizadas, indicando de modo preditivo a segurança do consumo de ora-pro-nóbis.

Figura 4 - Embrião de *zebrafish* 72 hpf do grupo controle (A) e exposto à maior concentração do extrato etanólico de *P. aculeata* (B).



Fonte: Dados da autora.

A literatura dispõe de poucos dados referentes à toxicidade de extratos de ora-pro-nóbis. Silva *et al* (2017) realizaram ensaios de avaliação da toxicidade aguda de extratos secos de *P. aculeata* utilizando ratos Wistar. A administração dos extratos em diferentes concentrações não gerou sintomas de toxicidade aguda em nenhum dos grupos, e a dose letal 50 (DL50) foi calculada em valor superior a 5000 mg/kg. Dessa forma, dentro da classificação definida pela OCDE, os autores classificam a ora-pro-nóbis na classe 5, sendo a classificação mais baixa em termos de toxicidade.

5.5 Análise dos extratos etanólico e hidroetanólico 70% por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os extratos etanólico e hidroetanólico 70% de *P. aculeata* foram analisados por CCD com o intuito de avaliar a presença de determinadas classes de metabólitos secundários, principalmente as de menor polaridade. Após a eluição e revelação da cromatoplaça, obteve-se o resultado apresentado na Figura 5. Na condição de análise empregada, os perfis cromatográficos dos dois extratos mostraram-se idênticos. As bandas com coloração roxa observadas sugerem a presença de terpenos nos extratos. Além disso, pode-se notar que além dos componentes dos extratos que eluíram, outros continuaram retidos na origem. Tal fato se deve à natureza química da fase móvel utilizada, que apresenta média a baixa polaridade. Assim, os componentes que se apresentam retidos na origem possuem natureza polar, e os componentes que eluíram pela placa apresentam de média a alta polaridade.

Figura 5 - Cromatoplaça (sílica gel) da análise por CCD de extrato hidroetanólico 70% (1) e de extrato etanólico (2) de folhas de *P. aculeata* realizada em fase móvel tolueno: acetato de etila: metanol: ácido acético 5,3:4:0,5:0,2 (v/v).



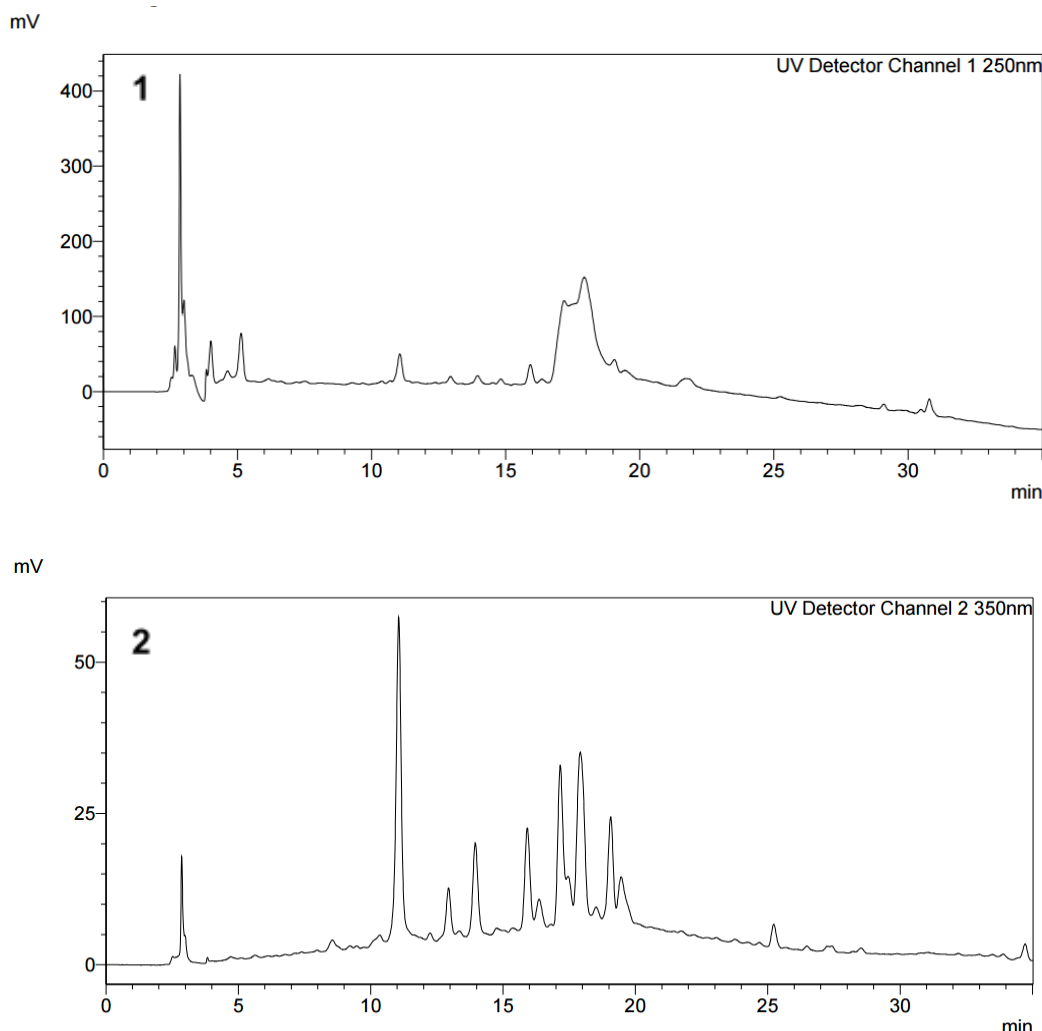
Fonte: Dados da autora.

5.6 Desenvolvimento de métodos analíticos por cromatografia líquida (HPLC-UV e UHPLC-UV)

5.6.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-UV)

Para desenvolvimento do método de análise dos extratos por HPLC, a princípio analisou-se o extrato hidroetanólico 70% em um gradiente exploratório (5-100 %B em 35 min), utilizando água acidificada com 2% de ácido acético (A) e metanol (B) como fase móvel (condição 1, Tabela 1). Os cromatogramas obtidos nesta condição estão apresentados nas Figuras 6.1-2.

Figuras 6.1-2 - Cromatogramas do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* (pré-tratamento 1) eluído com fase móvel composta por água acidificada a 2% de ácido acético (A) e metanol (B), coluna Ascentis® C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), condição 1 (Tabela 1), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL e detector UV/Vis em comprimentos de onda de 250 nm (1) e 350 nm (2).



Fonte: Dados da autora.

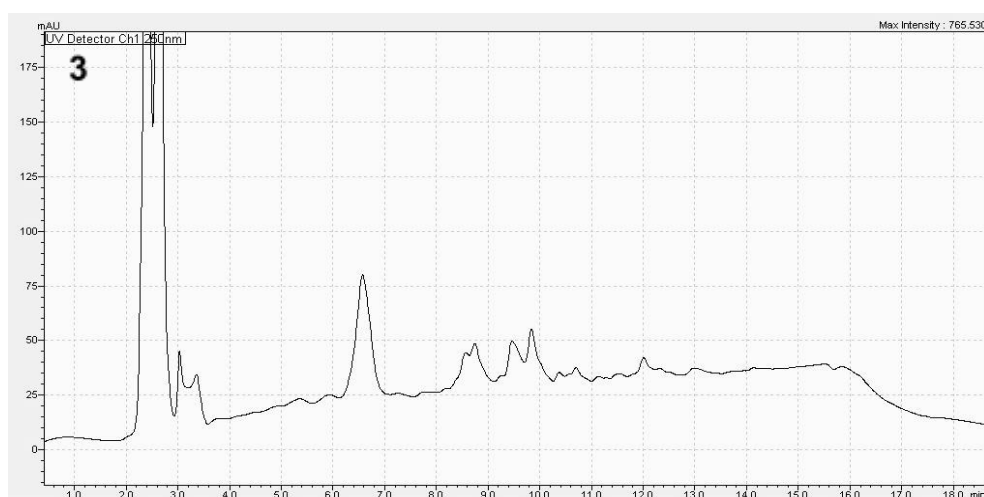
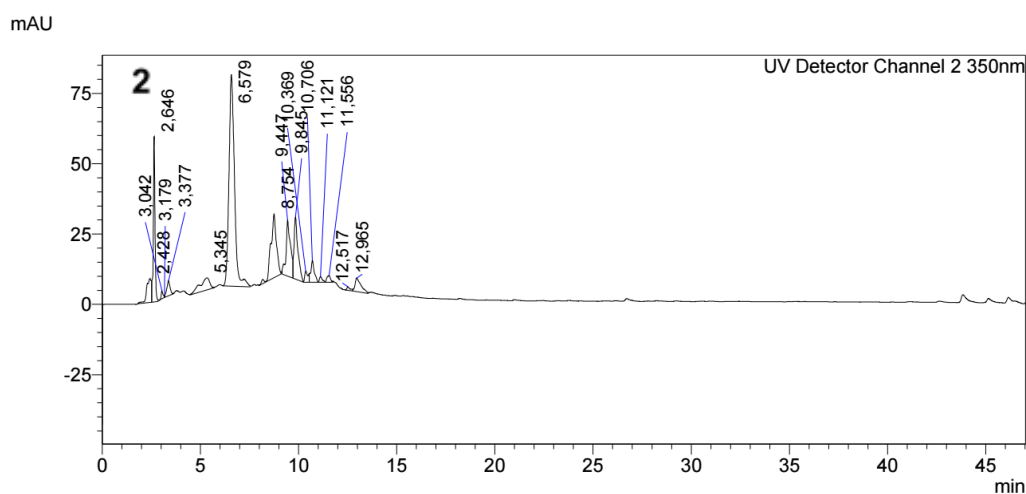
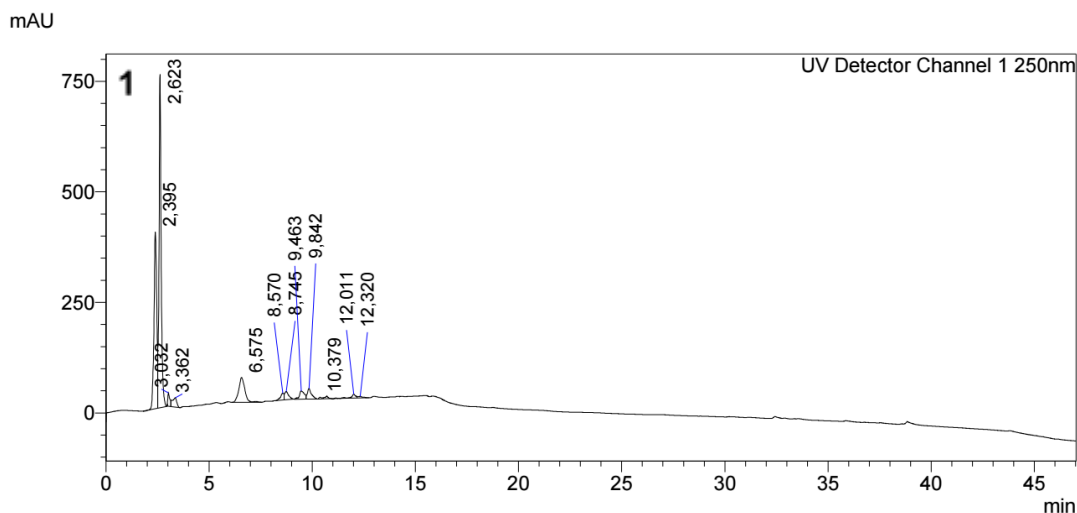
A partir dos resultados obtidos nos cromatogramas apresentados acima, foram realizadas alterações nos parâmetros da análise a fim de se aprimorar a separação cromatográfica e obter-se melhor R_s dos picos. Os cromatogramas resultantes dessas análises estão apresentados nos Apêndices de 1 a 17. Dentre as condições testadas, a melhor R_s foi obtida com água acidificada com 2% de ácido acético (A) e acetonitrila (C), em um gradiente 10 - 90 %C em 30 min, como descrito na condição 14 (Tabela 2). Dessa forma, foram analisadas as três amostras (extratos etanólico, hidroetanólico 70% e NADES) nesta condição e os cromatogramas obtidos estão apresentados nas Figuras 7.1-4, 8.1-4 e 9.1-4. Os extratos etanólico e

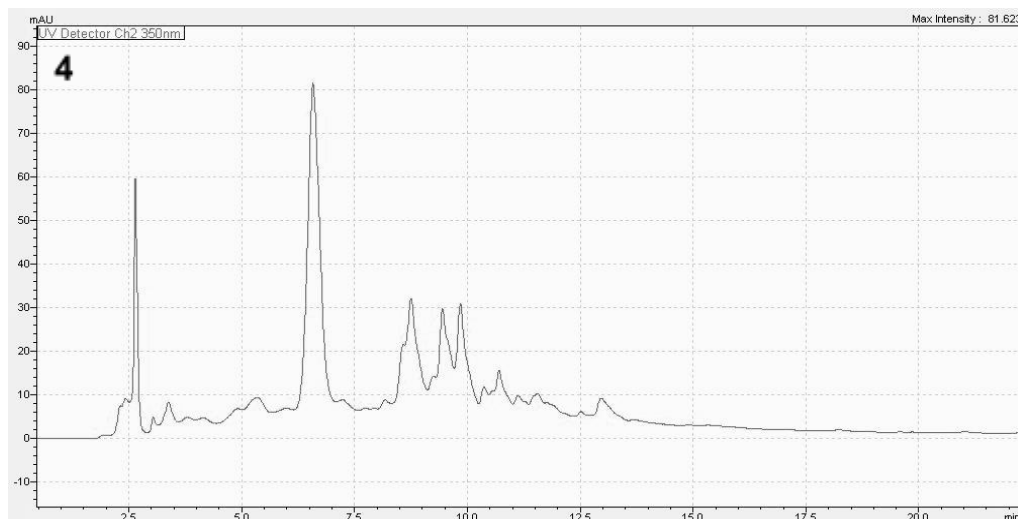
hidroetanólico 70% foram preparados segundo o pré-tratamento 2 e o extrato NADES, segundo o pré-tratamento 3. Após pré-tratamento das amostras, as concentrações finais obtidas foram 8,6 mg/mL para o extrato etanólico e 16,2 mg/mL para o extrato hidroetanólico 70%.

A comparação dos cromatogramas dos três extratos demonstra que o extrato hidroetanólico 70% (Figuras 7.1-4) é constituído de substâncias mais polares, com tempo de retenção (t_R) menor do que 13 min em 250 e 350 nm, como seria esperado devido à maior polaridade da mistura etanol: água em relação ao etanol puro. Já o extrato etanólico (Figuras 8.1-4) apresentou perfil mais complexo em 350 nm, também com picos com t_R maior do que 13 min. Com relação ao extrato de NADES (Figuras 9.1-4), o perfil químico em 250 nm demonstra a predominância de substâncias de menor polaridade (maior t_R), o que é coerente com a composição do NADES empregado (mentol: cânfora). Nota-se para todos os extratos analisados uma baixa sensibilidade na detecção, mesmo utilizando-se concentrações consideradas altas, o que pode estar relacionado à presença de substâncias que não possuem grupos cromóforos nos extratos, incluindo metabólitos primários, como a mucilagem presente nas folhas de ora-pro-nóbis.

Com relação ao extrato hidroetanólico 70%, apesar das diversas tentativas de otimização das condições cromatográficas, a melhor condição de análise foi em gradiente exploratório com comprimento de onda de 350 nm (Figura 7.2).

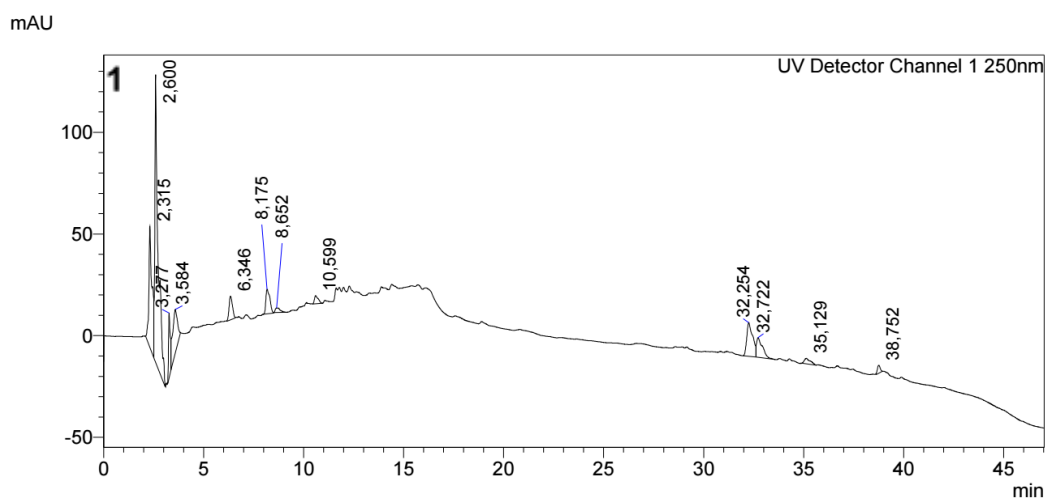
Figuras 7.1-4 - Cromatogramas do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* (pré-tratamento 2) eluído com fase móvel composta por água acidificada a 2% de ácido acético (A) e acetonitrila (C), coluna Ascentis® C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), condição 14 (Tabela 2), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL e detector UV/Vis em comprimentos de onda de 250 nm (1 e 3 - ampliação) e 350 nm (2 e 4 - ampliação).



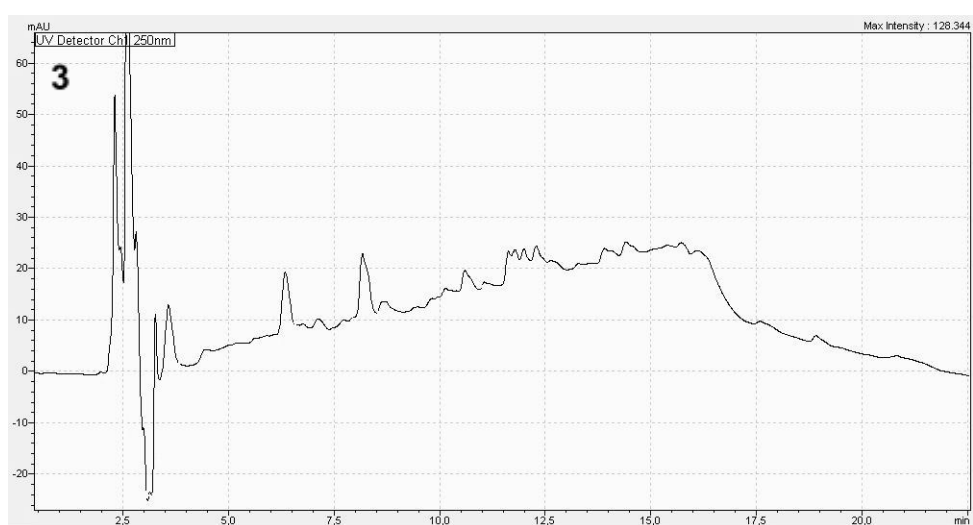
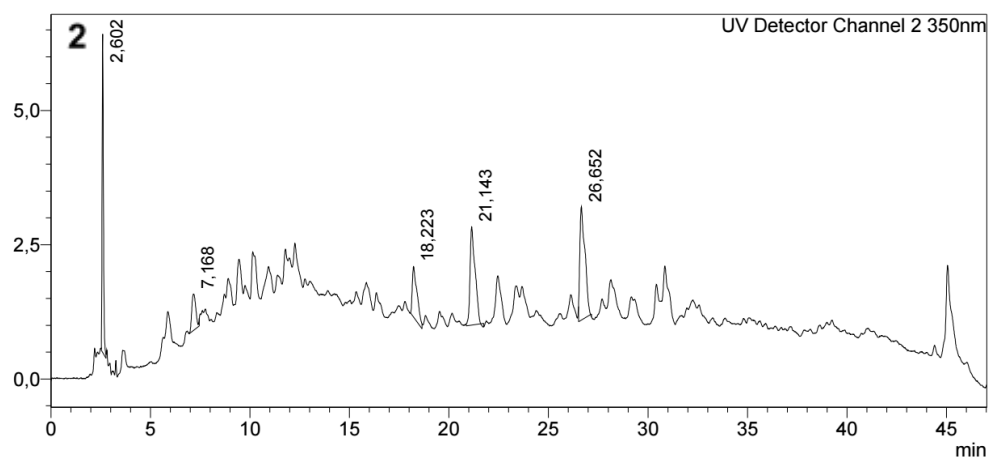


Fonte: Dados da autora.

Figuras 8.1-4 - Cromatogramas do extrato etanólico de folhas de *P. aculeata* (pré-tratamento 2) eluído com fase móvel composta por água acidificada a 2% de ácido acético (A) e acetonitrila (C), coluna Ascentis® C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), condição 14 (Tabela 2), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL e detector UV/Vis em comprimentos de onda de 250 nm (1 e 3 - ampliação) e 350 nm (2 e 4 - ampliação).

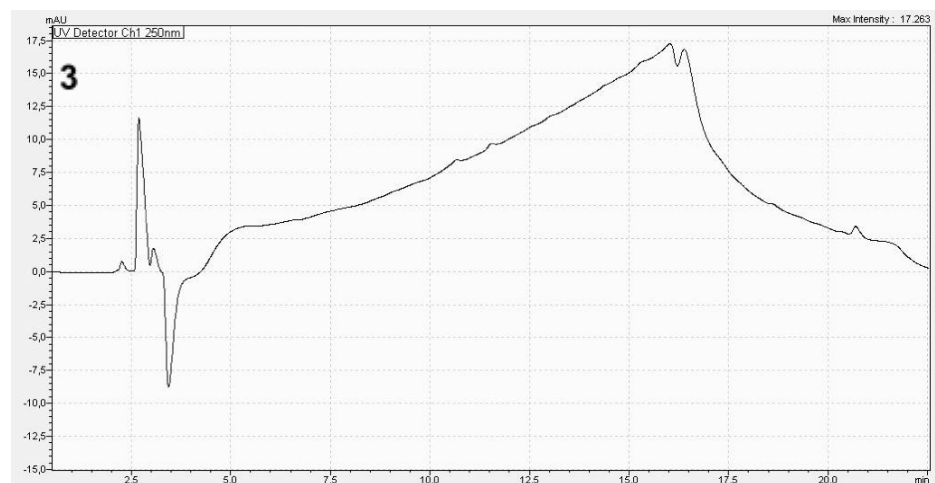


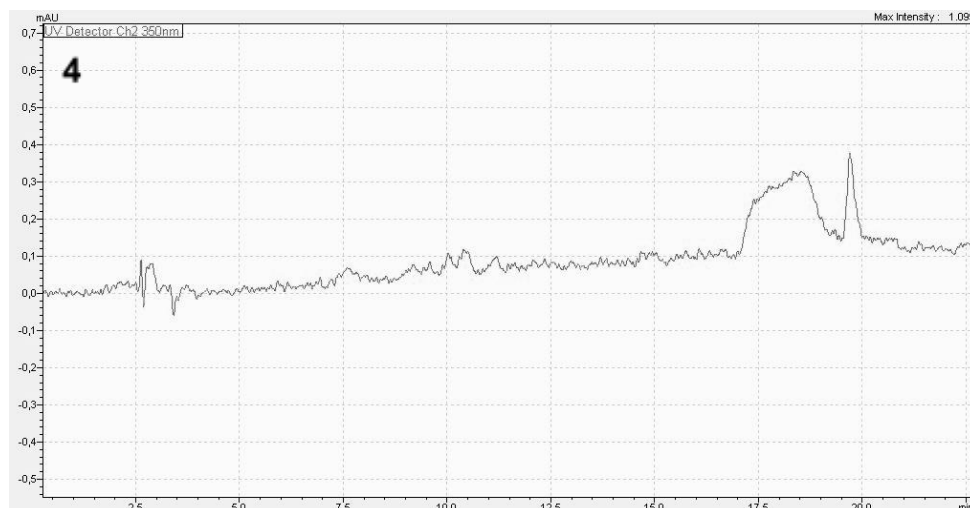
mAU



Fonte: Dados da autora.

Figuras 9.1-4 - Cromatogramas do extrato NADES de folhas de *P. aculeata* (pré-tratamento 3) eluído com fase móvel composta por água acidificada a 2% de ácido acético (A) e acetonitrila (C), coluna Ascentis® C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), condição 14 (Tabela 2), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL e detector UV/Vis em comprimentos de onda de 250 nm (1 e 3 - ampliação) e 350 nm (2 e 4 - ampliação).



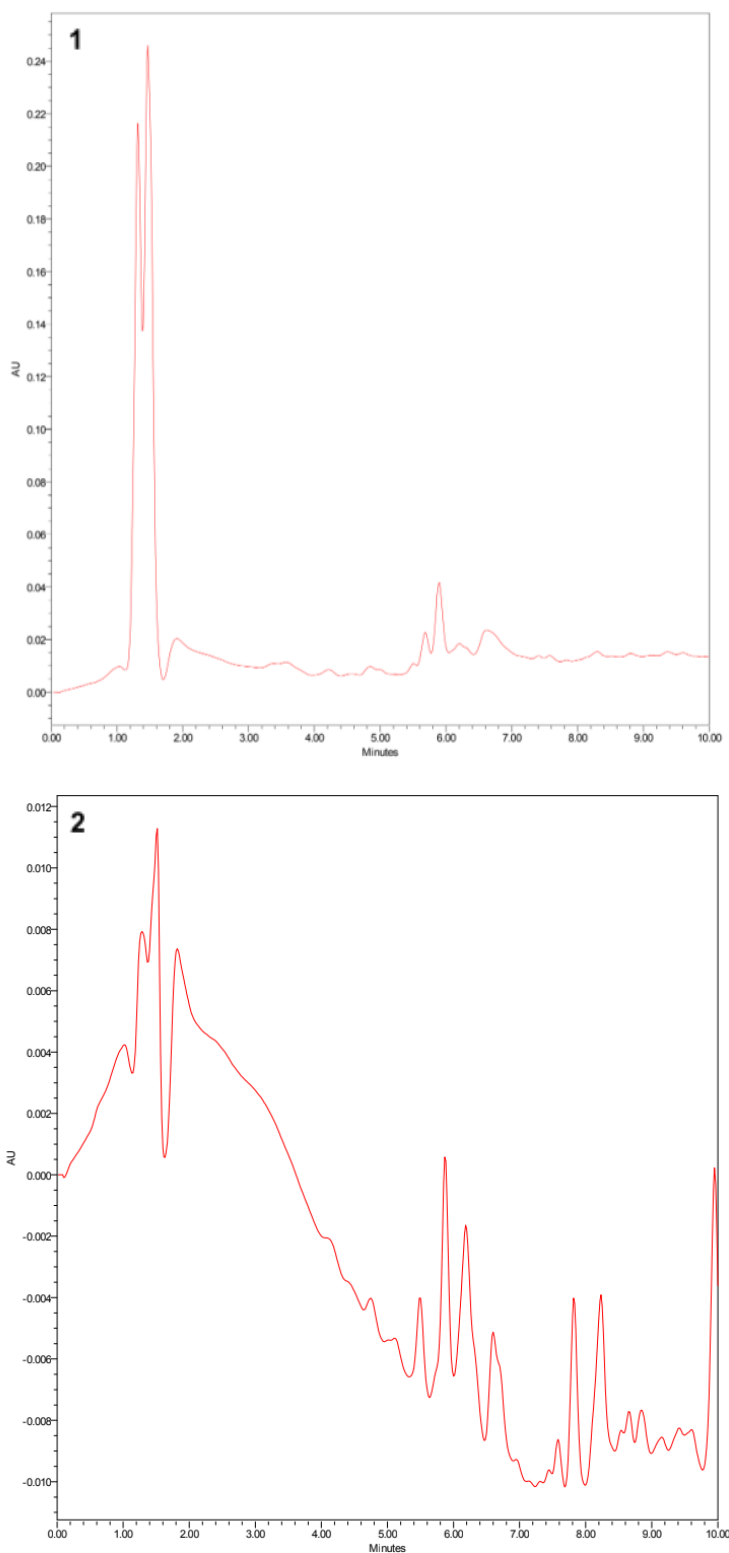


Fonte: Dados da autora.

5.6.2 Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC-UV)

Neste trabalho, a análise por UHPLC-UV teve por objetivo o desenvolvimento de método baseado nos princípios de Química Verde. Dessa forma, como modificador orgânico foi utilizado o etanol, solvente de melhor classificação em *rankings* (PRAT *et al.*, 2014). Além disso, no pré-tratamento das amostras analisadas por UHPLC-UV, também se optou por utilizar etanol como substituto ao metanol. Inicialmente, a análise foi realizada com o extrato hidroetanólico 70% em gradiente exploratório (5 - 100% B) e, a partir dos cromatogramas obtidos, foram realizadas mudanças na composição da fase móvel e outros parâmetros com a finalidade de otimizar-se os resultados. As Figuras 10.1-2 apresentam os cromatogramas obtidos na primeira análise.

Figura 10.1-2 - Cromatogramas do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* (pré-tratamento 1) eluído com fase móvel composta por água acidificada a 1% de ácido acético (A) e etanol (B), coluna ACQUITY® UPLC HSS T3 (100 mm x 2,1 mm x 1,8 µm), condição 1 (Tabela 3), vazão 0,2 mL/min, volume de injeção 10 µL e detector UV/Vis em comprimentos de onda de 250 (1) e 350 nm (2).

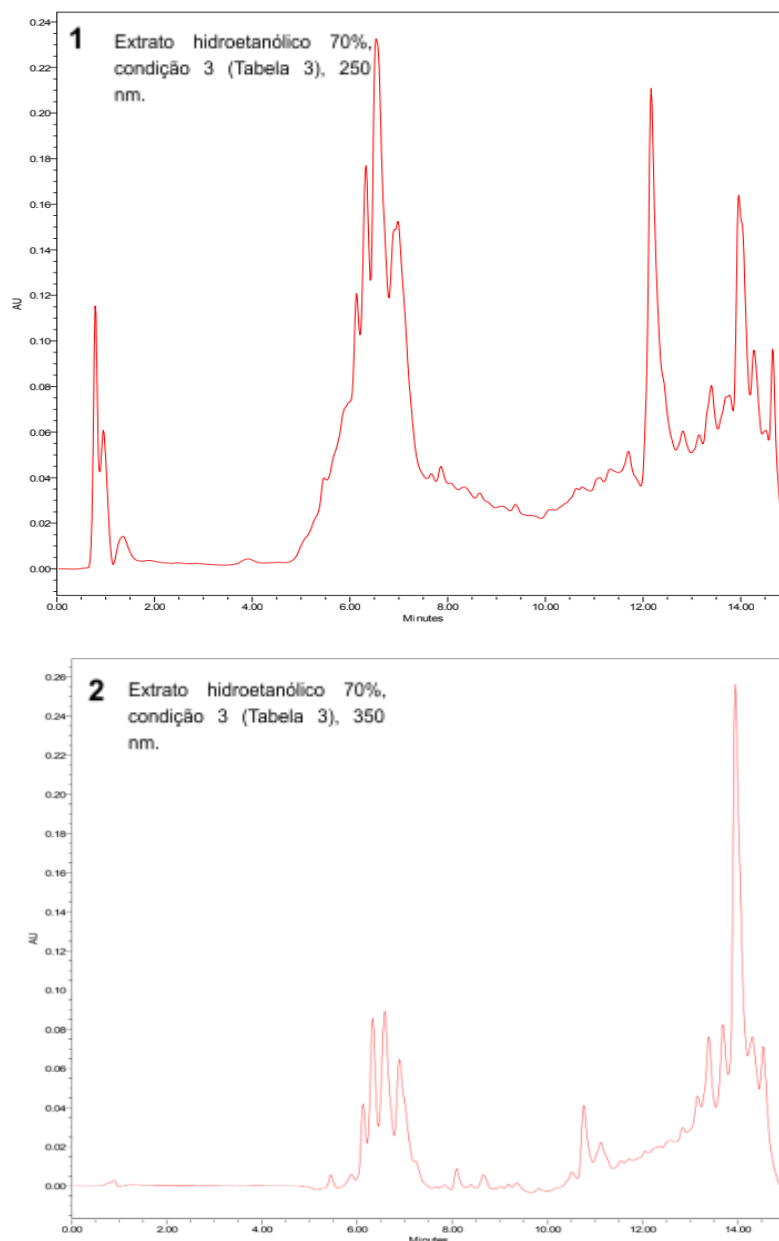


Fonte: Dados da autora.

Na análise do extrato hidroetanólico 70%, foram observados picos nos cromatogramas com $t_R > 2$ min, com valores de áreas/alturas pequenos. Na tentativa de aumentar a sensibilidade para tais substâncias, as análises foram realizadas com as amostras submetidas a um novo procedimento de pré-tratamento (pré-tratamento 2), com variações na EFS, sendo: aumento da massa de extrato de 10 para 20 mg e variação na composição da fase móvel, iniciando-se com etanol:água 05:95 (v/v) (eliminação de possíveis interferentes polares sem cromóforos), seguido de etanol:água 85:15 (v/v) (eluição dos analitos sem interferentes lipofílicos) e etanol:água 100:0 (v/v) para avaliação da retenção dos analitos de interesse. Além disso, foram realizadas alterações no método por UHPLC-UV na composição da fase móvel (%B) e no tempo de gradiente. Para realização das estimativas das novas condições a serem testadas, utilizou-se como base o t_R dos picos dos cromatogramas obtidos inicialmente e a %B correspondente. Os cromatogramas estão apresentados nos Apêndices 18 a 33.

Ao comparar os cromatogramas obtidos nestas análises, é possível observar que o pré-tratamento 2 mostrou ser interessante para a análise de componentes de média polaridade do extrato hidroetanólico 70% em UHPLC-UV, já que nas análises em que as amostras foram submetidas a este tratamento, houve uma redução na área/altura dos picos iniciais. No que se refere à otimização da fase móvel, a condição 3 (Tabela 3) foi a que apresentou melhor R_s entre os picos. Os cromatogramas referentes à análise do extrato hidroetanólico 70% nesta condição estão apresentados nas Figuras 11.1-2.

Figuras 11.1-2 - Cromatogramas do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* (pré-tratamento 2) eluído com fase móvel composta por água acidificada a 2% de ácido acético (A) e etanol (B), coluna ACQUITY® UPLC HSS T3 (100 mm x 2,1 mm x 1,8 µm), condição 3 (Tabela 3), vazão 0,3 mL/min, volume de injeção 10 µL e detector UV/Vis em comprimentos de onda de 250 (1) e 350 nm (2).



Fonte: Dados da autora.

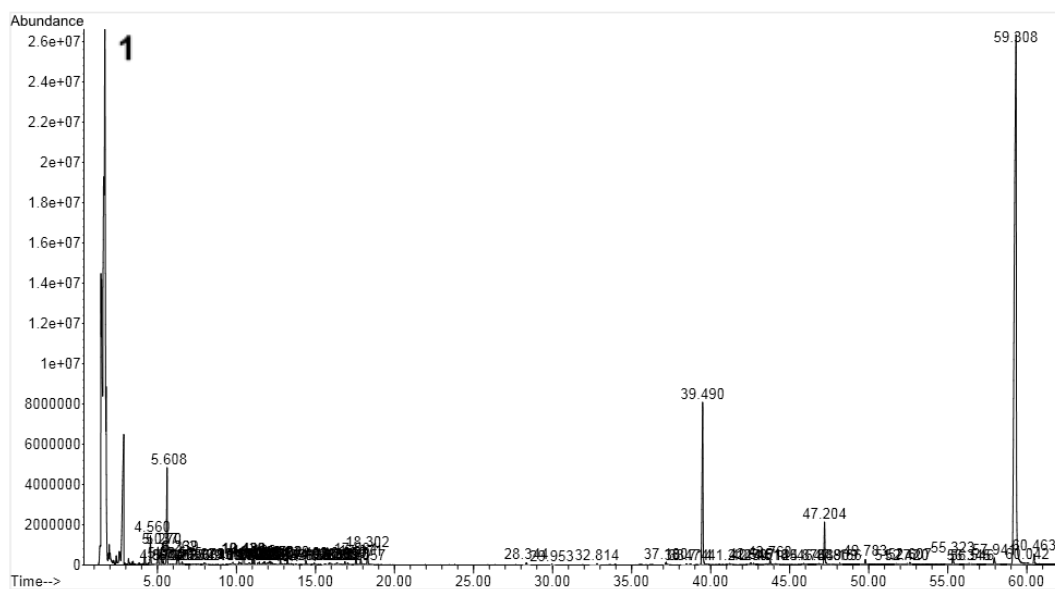
5.7 Identificação de metabólitos secundários do óleo essencial por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)

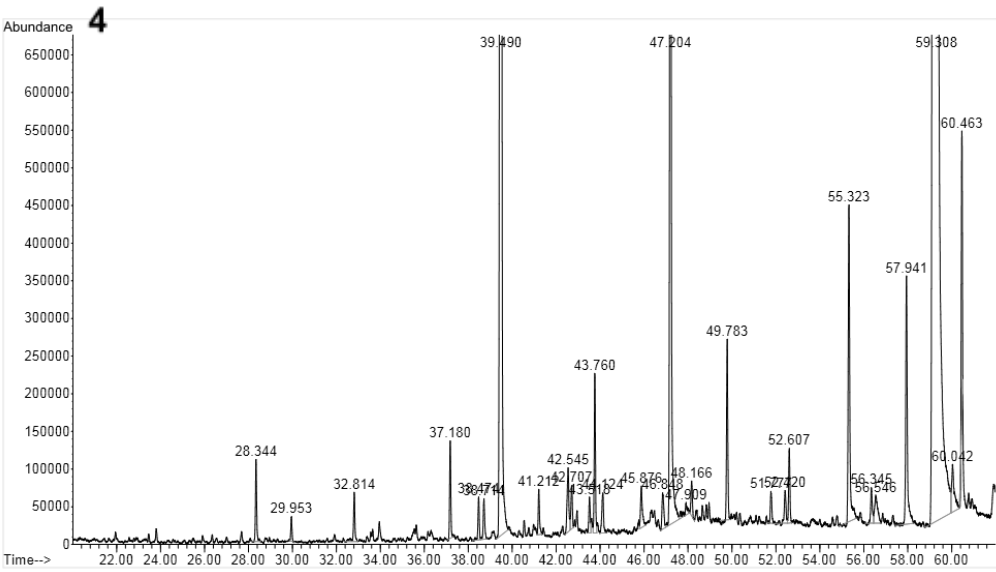
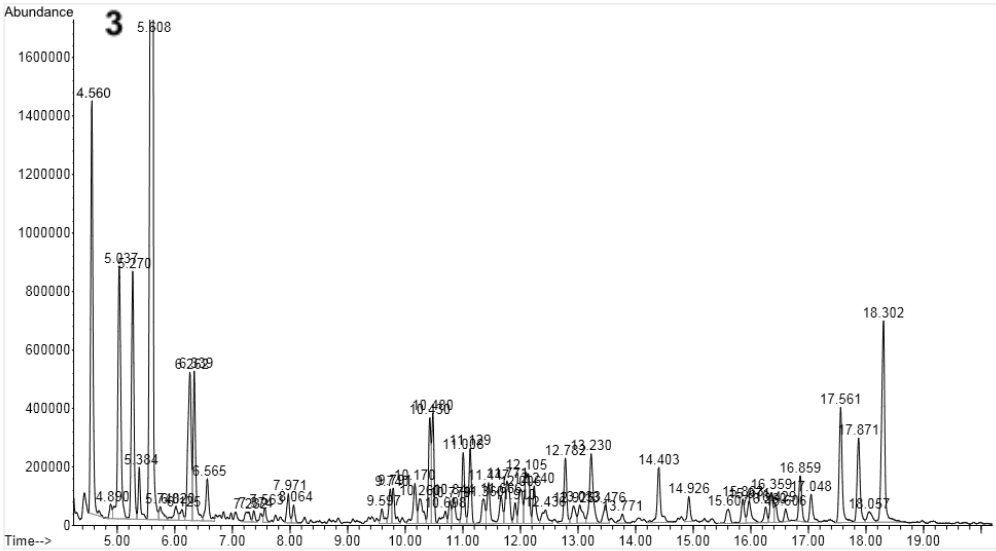
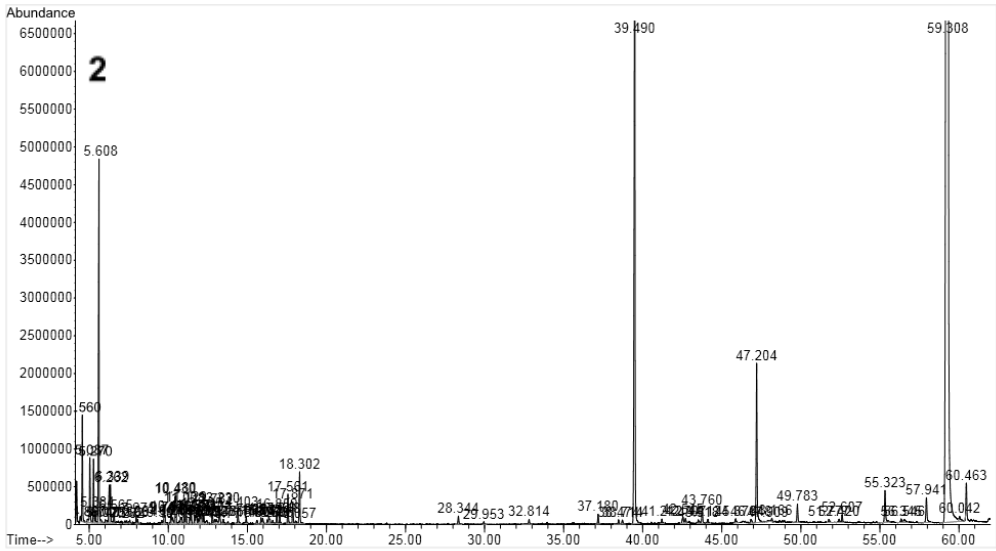
Após a extração do OE por hidrodestilação utilizando aparelho tipo Clevenger, calculou-se o rendimento da extração, resultando em 0,03% (m/m). Este valor

demonstrou o baixo rendimento da extração, porém está de acordo com o valor descrito na literatura. Souza *et al.* (2016) realizaram a análise do OE de folhas secas de ora-pro-nóbis obtido por hidrodestilação e obtiveram um rendimento de 0,02% (m/m).

As análises por GC-MS demonstraram a presença de grande número de componentes, conforme cromatograma apresentado nas Figuras 12.1-4. Apesar da presença desses picos no cromatograma, observou-se dificuldades na identificação dos componentes pelos espectros de massas. Foi observado um baixo índice de similaridade entre os componentes do óleo e os componentes das bibliotecas de espectros (menor que 20%), o que dificulta a identificação desses componentes. Apesar do baixo índice de similaridade, foram identificados um sesquiterpeno, diterpenos e alcanos de cadeia longa.

Figura 12. 1-4 - Cromatograma completo do OE de folhas frescas de *P. aculeata* em coluna capilar Agilent® (19091S-433) de sílica fundida (30 m x 250 µm x 0,25 µm), gás Hélio (99,999%) como gás de arraste, vazão de 1 mL/min, temperatura do injetor e da fonte de íons 250°C, volume de injeção 0,1 µL, modo split (1:10), temperatura do forno de 60°C a 250°C a uma velocidade de 3°C/min, tempo de análise de 60 min (1) e suas ampliações (2-4).





Fonte: Dados da autora.

Souza *et al.* (2016) realizaram a extração e análise do óleo essencial de *P. aculeata*. A análise do OE foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada a Detector por Ionização de Chama (GC-FID), resultando na identificação de 24 compostos, representando 91% do total do OE. Dentre os compostos identificados pelos autores, destacam-se sesquiterpenos oxigenados, sendo acoreno o componente majoritário.

6 CONCLUSÃO

Após a realização dos experimentos deste trabalho, é possível observar a presença de metabólitos secundários e demais componentes nas folhas de *P. aculeata* com potencial benéfico à saúde. O extrato etanólico apresentou aproximadamente o dobro do teor de compostos fenólicos totais quando comparado com o extrato hidroetanólico 70%, porém ambos os valores obtidos encontram-se dentro da faixa descrita na literatura para extratos de *P. aculeata*.

Apesar de a atividade antioxidante apresentar-se bem descrita pela literatura, os resultados obtidos para a avaliação dessa atividade utilizando radical DPPH foram inconclusivos. Os elevados valores de absorbância apresentados pelo branco (soluções dos extratos) mostraram a presença de compostos interferentes nos extratos, com absorbância no mesmo comprimento de onda utilizado no ensaio. Portanto, devem ser realizados novos estudos utilizando-se outros tipos de detecção ou metodologia.

No que se refere à avaliação da embriotoxicidade do extrato etanólico, utilizando-se modelo animal alternativo *zebrafish*, não foram observados efeitos embriotóxicos do extrato nas concentrações testadas. Esse resultado permite prever, portanto, a segurança no consumo da ora-pro-nóbis.

Em relação às análises por cromatografia, apesar do resultado da análise por CCD ter indicado semelhanças dos extratos etanólico e hidroetanólico 70% nas condições utilizadas, as análises por HPLC-UV mostraram perfis diferentes. Na análise por HPLC-UV, é possível observar maior conteúdo de substâncias de maior polaridade no extrato hidroetanólico 70% quando comparado com o extrato etanólico, o que já era esperado em razão da natureza química dos solventes extratores. Para o extrato obtido com NADES, também se observa maior conteúdo de substâncias de menor polaridade (também relacionado à natureza química do solvente).

Na análise por UHPLC-UV, foi possível realizar adaptações no método utilizando etanol, solvente melhor classificado em rankings. Apesar de ser necessário realizar aprimoramentos nessas metodologias, a possibilidade de adaptação do método cromatográfico para UHPLC-UV com etanol e utilização dos NADES como solventes extratores de metabólitos da ora-pro-nóbis representa formas de estudo mais adaptadas aos princípios de Química Verde. A composição do OE foi investigada através da técnica de GC-MS, onde apesar do baixo rendimento da extração, foi notada a presença de uma série de compostos, incluindo diterpenos, um sesquiterpeno, alcanos de cadeia longa, entre outros.

Assim, diante das observações realizadas neste trabalho, pode-se prever um consumo seguro da ora-pro-nobis, além de sugerir a presença de metabólitos secundários com potenciais benefícios à saúde. Essas informações contribuem para o uso da ora-pro-nóbis como fonte alternativa de proteínas e demais nutrientes, a fim de que possa ser incorporada cada vez mais na rotina alimentar das populações, garantindo alimentação saudável e segura. Ademais, novos estudos devem ser realizados para aprimorar o conhecimento acerca das atividades biológicas dessa espécie, o que contribuirá para o desenvolvimento de novos produtos e fármacos. E, ainda, a possibilidade de adaptação destes estudos para que se adequem aos princípios de Química Verde contribuirá com o desenvolvimento sustentável, através da projeção de novos processos e produtos com redução da geração de substâncias nocivas ao ambiente.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T.S. *et al.* Carotenoid composition of berries and leaves from a Cactaceae-*Pereskia* sp. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 178-184, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.09.015>.
- AGOSTINI-COSTA, T.S. Bioactive compounds and health benefits of Pereskioideae and Cactoideae: a review. **Food Chemistry**, v. 327, p.126961, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126961>.
- ALBUQUERQUE, M. G. P. T. *et al.*, Composição centesimal e escore de aminoácidos em três espécies de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill., *P. bleu* De Candolle e *P. pereskia* (L) Karsten). **Boletim SBCTA**, v. 25, n. 1, p. 7-12, 1991.
- ALMEIDA, M.E.F. *et al.* Caracterização química das hortaliças não-convencionais conhecidas como ora-pro-nobis. **Bioscience Journal**, v. 30(1), p. 431-439, 2014.
- BARBALHO, S.M. *et al.* *Pereskia aculeata* Miller Flour: metabolic effects and composition. **Journal of Medicinal Food**, v. 19, n.9, p. 890-894, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2016.0052>.
- BOTREL, N. *et al.* **Estudo comparativo da composição proteica e do perfil de aminoácidos em cinco clones de ora-pro-nóbis**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Embrapa Hortaliças; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019. Disponível em:<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/203973/1/BPD-196-29-10-2019-2b1.pdf>.
- BRASIL (2010). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Farmacopeia Brasileira. 6 ed. v. 1. Brasília: Anvisa. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>. Acesso em: 26 mai 2022.
- BUBALO, M. C. *et al.* New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 52-73, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.001>.
- CARVALHO, E.G. *et al.* Wound healing properties and mucilage content of *Pereskia aculeata* from different substrates. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 6, p. 677-682, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.11.008>.
- CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Extraction techniques with deep eutectic solvents. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 105, p. 225-239, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.001>.
- DIAS, A.C.P. *et al.* Avaliação do consumo de hortaliças não convencionais pelos usuários das unidades do Programa Saúde da Família (PSF) de Diamantina-MG. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 3, p. 279-284, 2005.

DUARTE, M.R. e HAYASHI, S.S. Estudo anatômico de folha e caule de *Pereskia aculeata* Mill.(Cactaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 103-109, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000200006>.

EVERETTE, J. D. *et al.* Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8139-8144, 2010. DOI:<https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1021/jf1005935>.

FAN, C. *et al.*, A theoretical study on terpene-based natural deep eutectic solvent: relationship between viscosity and hydrogen-bonding interactions. **Global Changes**, v. 5, n. 3, p. 2000103, 2021. DOI: <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1002/gch2.202000103>

FAO, IFAD, UNICEF, WFP e WHO. **The State of Food Security and Nutrition in the World 2020**. Transforming food systems for affordable healthy diets. Roma, FAO, 2020. Disponível em: <https://www.fao.org/3/ca9692en/online/ca9692en.html>.

FAO, IFAD, UNICEF, WFP e WHO. **The State of Food Security and Nutrition in the World 2021**. Transforming food systems for affordable healthy diets. Roma, FAO, 2021. Disponível em: <https://www.fao.org/publications/sofi/2021/en/>.

FONTES, E. S., MELLO DA SILVA, J. e PINTO, N. C. C. **Formulação farmacêutica fitoterápica na forma de creme anti-inflamatório contendo a partição hexânica do extrato metanólico das folhas de *Pereskia aculeata* Miller (ora-pro-nobis)**. Depositante: Universidade Federal de Juiz de Fora. BR 102015017575. Depósito: 23 jul. 2015. Concessão: 24 abr. 2019. Disponível em: <https://www.ufjf.br/lpnb/producoes/patentes/>. Acesso em: 13 abr. 2021.

FUNARI, C.S. *et al.*, Natural deep eutectic solvents and aqueous solutions as an alternative extraction media for propolis. **Food Research International**, v. 125, p.108559. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108559>.

GARCIA, J.A. *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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.074>.

GIRÃO, L.V.C. *et al.* Avaliação da composição bromatológica de ora-pro-nobis. **Anais Congresso Brasileiro de Olericultura**, p. 43, 2003.

HERCULANO, R. D. *et al.*, Optimization of a novel nitric oxide sensor using a latex rubber matrix. **Journal of Applied Sciences**, v. 7, n. 23, p. 3801-3805, 2007.

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares: 2017-2018: análise da segurança alimentar no Brasil**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; Coordenação de Trabalho e Rendimento: 2020. Rio de Janeiro: IBGE, 2020. 65 p. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101749.pdf>.

JONES, S. K. *et al*, Agrobiodiversity Index scores show agrobiodiversity is underutilized in national food systems. **Nature Food**, v. 2, n. 9, p. 712-723, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00344-3>.

KINNUP, V.F. e Lorenzi, H. Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, São Paulo, SP/Brasil. (2014).

LENARDÃO, E. J. *et al*, “Green Chemistry” - Os 12 princípios da Química Verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100020>.

LIMA JUNIOR, F.A. *et al*. Response surface methodology for optimization of the mucilage extraction process from *Pereskia aculeata* Miller. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p. 38-47, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.012>.

LOMBA, L. *et al*, Applications of Deep Eutectic Solvents related to health, synthesis, and extraction of natural based chemicals. **Applied Sciences**, v. 11, n. 21, p. 10156, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/app112110156>.

MACIEL, V.B. *et al*. Agronomic Cultivation, Chemical Composition, Functional Activities and Applications of Pereskia Species—A Mini Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 24, p. 4573-4584, 2019. DOI: <https://doi.org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.2174/0929867325666180926151615>.

MARTIN, A.A. *et al*. Chemical structure and physical-chemical properties of mucilage from the leaves of *Pereskia aculeata*. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 20-28, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.020>.

MARTINEVSKI, C.S. *et al*. Utilização de bertalha (*Anredera cordifolia* (TEN.) Steenis) e ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) na elaboração de pães. **Alimentos e Nutrição**, v. 24, n. 3, p. 272, 2013.

MERCÊ, A.L.R. *et al*. Complexes of arabinogalactan of *Pereskia aculeata* and Co²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, and Ni²⁺. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, p. 29-37, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00078-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00078-X).

NAÇÕES UNIDAS. The 2030 Agenda for Sustainable Development, 2015. Disponível em: <https://sdgs.un.org/goals>. Acesso em 13 de abr. de 2021.

OCDE. **Guideline for Testing of Chemicals**, 236. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OCDE, Paris, França. Disponível em: <http://www.oecd.org>, 2013.

OLIVEIRA, V.B. *et al*. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, p. 170–179, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.011>.

OLIVEIRA, D.D.C.D.S. *et al*. Composição mineral e teor de ácido ascórbico nas folhas de quatro espécies olerícolas não-convencionais. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 472-475, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362013000300021>.

PINTO, N.D.C.C. *et al.* Cytotoxic and antioxidant activity of *Pereskia aculeata* Miller. **Pharmacology online**, v. 3, p. 63-69, 2012.

PINTO, N.D.C.C. e SCIO, E. The biological activities and chemical composition of *Pereskia* species (Cactaceae)—A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, n. 3, p. 189-195, 2014. DOI: <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11130-014-0423-z>.

PINTO, N.D.C.C. *et al.* *Pereskia aculeata*: A plant food with antinociceptive activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53(12), p. 1780-1785, 2015(a). DOI: <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.3109/13880209.2015.1008144>.

PINTO, N.D.C.C. *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(b). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.032>.

PRAT, D. *et al.* A survey of solvent selection guides. **Green Chemistry**, v. 16, p. 45-46, 2014. DOI: 10.1039/C4GC01149J .

RESENDE, J. V. *et al.* **Processo de extração de hidrocolóides da *Pereskia aculeata* Miller**. Depositante: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Universidade Federal de Lavras. PI 1102426A2. Depósito: 29 jun. 2011. Concessão: 26 abr. 2016. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/9413>. Acesso em 13 abr. 2021.

ROCHA, D. R. C. *et al.* Macarrão adicionado de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) desidratado. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 4, p. 459-465, 2008.

RODRIGUES, P. **Sistema de produção facilita o cultivo de ora-pro-nóbis para agricultores familiares**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/22218694/sistema-de-producao-facilita-o-cultivo-de-ora-pro-nobis-para-agricultores-familiares>.

SARTOR, C.F.P. *et al.* Estudo da Ação Cicatrizante das Folhas de *Pereskia aculeata*. **Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 2, p. 149-154, 2010.

SCHNEIDER, A. C. R. *et al.* Implementation of a new experimental animal model: Zebrafish. **Revista Hospital das Clínicas de Porto Alegre**, v. 29, n.2, p. 100-103, 2009.

SEKHARAN, T. R. *et al.* pH, viscosity of hydrophobic based Natural Deep Eutectic Solvents and the effect of curcumin solubility in it. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 14620-14633, 2021. DOI: <https://doi.org/10.33263/BRIAC116.1462014633>.

SHARMA, O. P.; BHAT, K. B. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1202-1205, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>.

SILVA, D. O. et al., Acute Toxicity and Cytotoxicity of *Pereskia aculeata*, a Highly Nutritious Cactaceae Plant. **Journal of Medicinal Food**, v. 20 (4), p. 1 - 7, 2017. DOI: 10.1089/jmf.2016.0133.

SILVA, A.P.G.D. et al, Ripe Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) fruits express high contents of bioactive compounds and antioxidant capacity. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n.3, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-29452018749>.

SIMÕES, C.M.O. et al, **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 7 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Artmed. p. 833, 2017.

SINGLETON, V. L. et al Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p.152-178, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).

SINGULANI, J.L. et al, Potential of the association of dodecyl gallate with nanostructured lipid system as a treatment for paracoccidioidomycosis: In vitro and in vivo efficacy and toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, p. 630-636, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.013>.

SOARES, J.R. et al, Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. **Free Radical Research**, v. 26, p. 469-478, 1997. DOI: 10.3109/10715769709084484.

SOBRINHO, S.S. et al. Emulsified cooked sausages enriched with flour from ora-pro-nobis leaves (*Pereskia aculeata* Miller). **International Food Research Journal**, v. 22, n. 1, p. 318-323 , 2015.

SOUSA, R.M. et al. Atividade antioxidante de extratos de folhas de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) usando métodos espectrofotométricos e voltamétricos *in vitro*. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 448-457, 2014.

SOUZA, L.F. et al. *Pereskia aculeata* Muller (Cactaceae) Leaves: chemical composition and biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, n. 9, p. 1478, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17091478>.

SOUZA, A.H. et al. Influence of thermal processing on the characteristics and chemical profile of ora-pro-nobis by PS/MS paper spray. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, e12110212119, 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12119>.

TAKEITI, C.Y. et al. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60(sup1), p.148-160, 2009. DOI: 10.1080/09637480802534509.

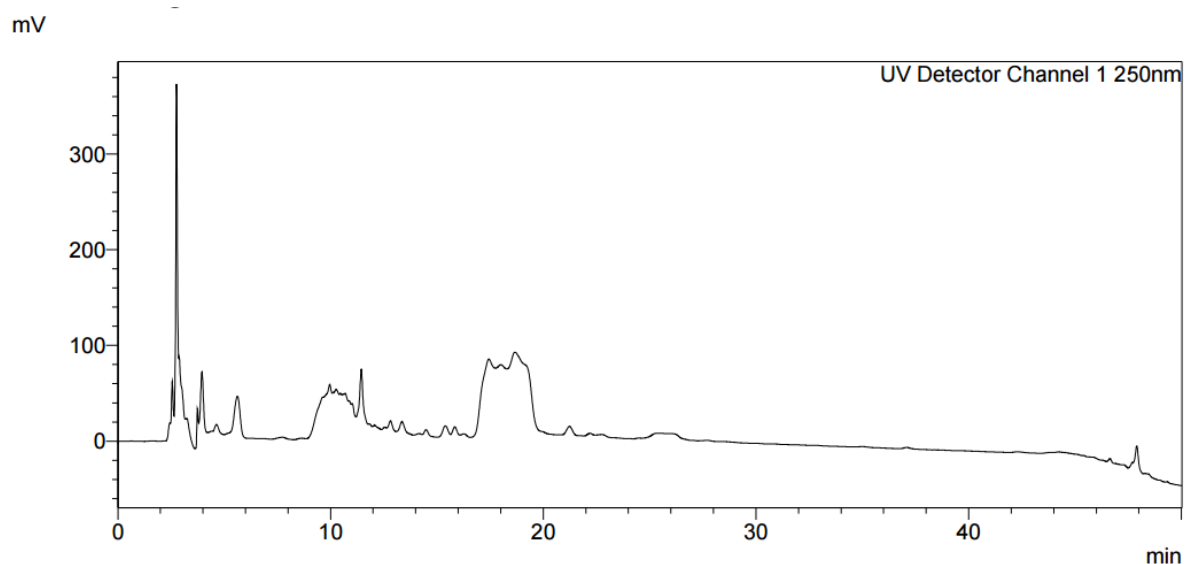
VALENTE, L.M.M. et al. Evaluation of the antitumor and trypanocidal activities and alkaloid profile in species of Brazilian Cactaceae. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 3, p. 167-172, 2007.

VIEIRA, C.R. et al. Effect of *Pereskia aculeata* Mill. in vitro and in overweight humans: A randomized controlled trial. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 7, e12903, 2019. DOI: 10.1111/jfbc.12903.

ZAPPI, D. e TAYLOR, N.P. 2020. Cactaceae in Flora do Brasil 2020. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB1633>. Acesso em: 13 abr. 2021.

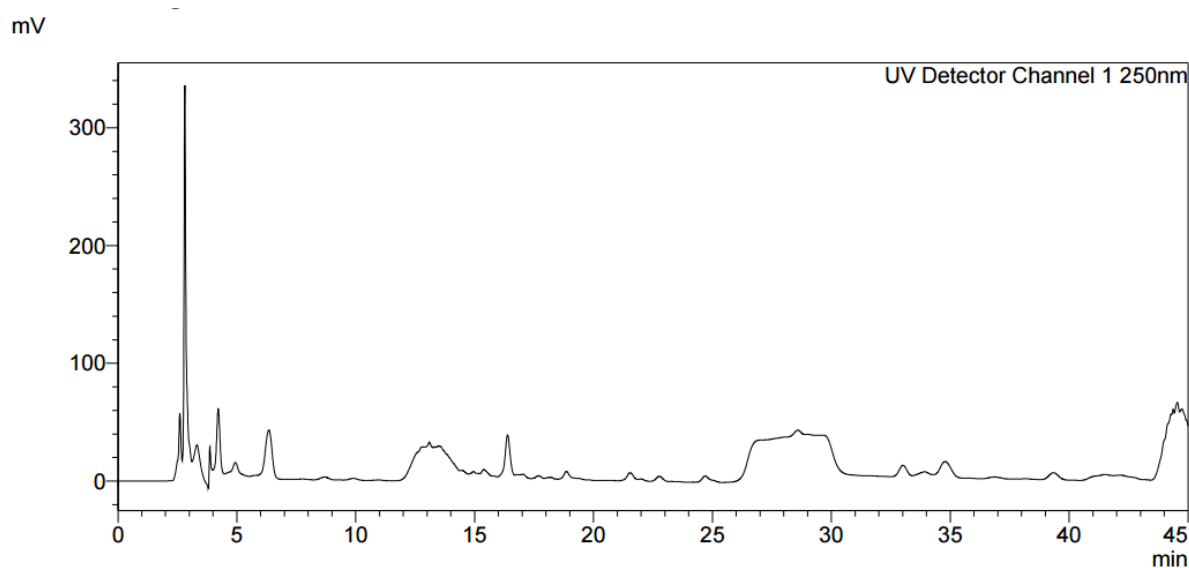
Apêndices

Apêndice 1 - Cromatograma da análise em HPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 2 (Tabela 1) em 250 nm.



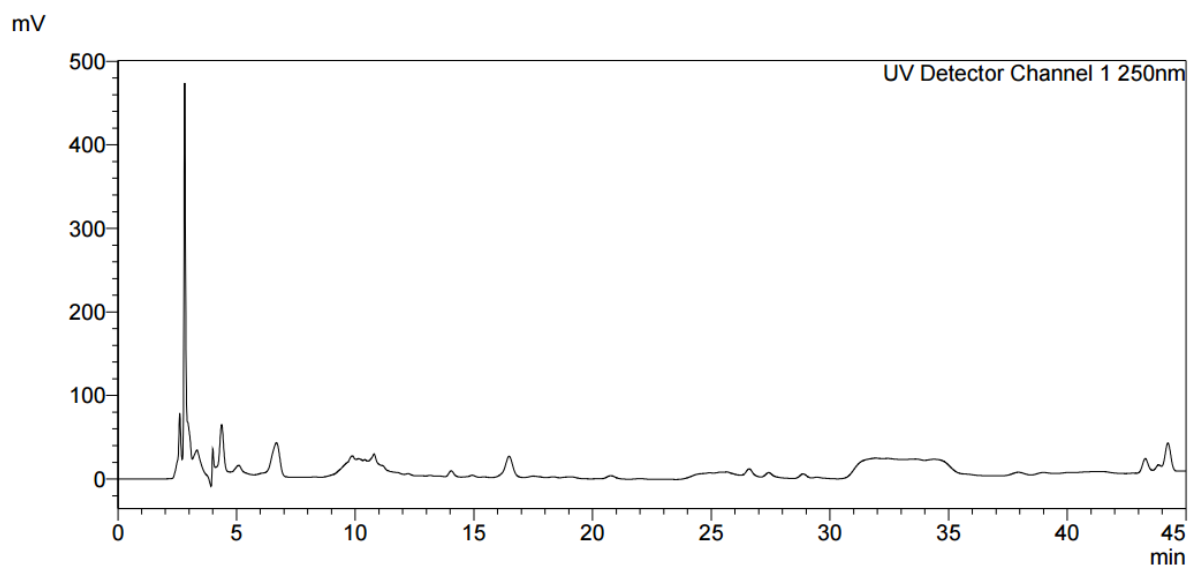
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 2 - Cromatograma da análise em HPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 4 (Tabela 1) em 250 nm.



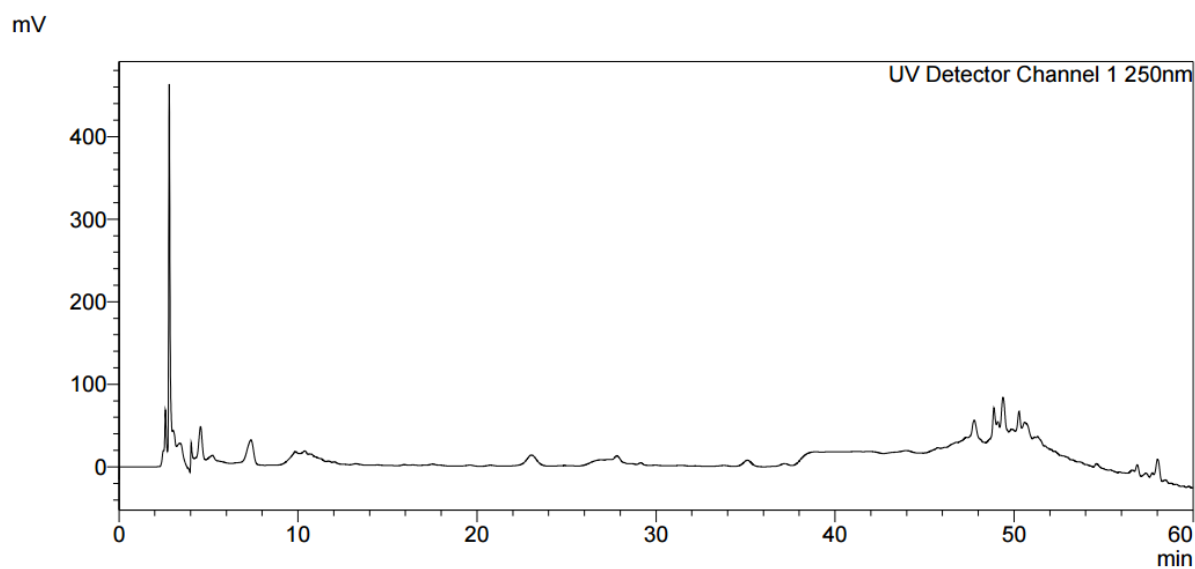
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 3 - Cromatograma da análise em HPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 5 (Tabela 1) em 250 nm.



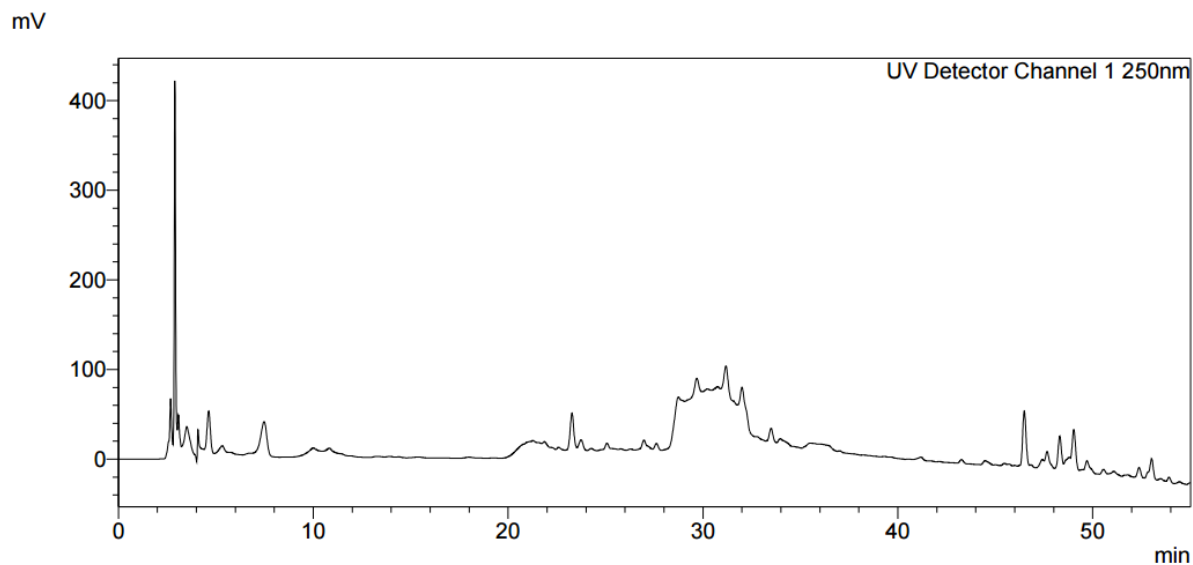
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 4 - Cromatograma da análise em HPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 6 (Tabela 1) em 250 nm.



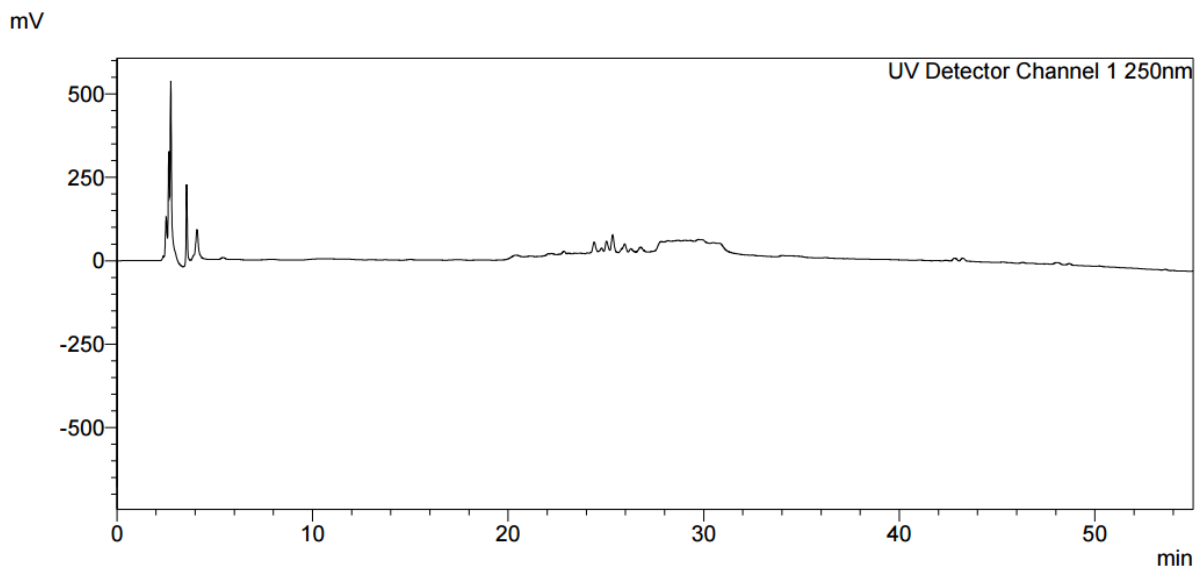
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 5 - Cromatograma da análise em HPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 1 (Tabela 2) em 250 nm.



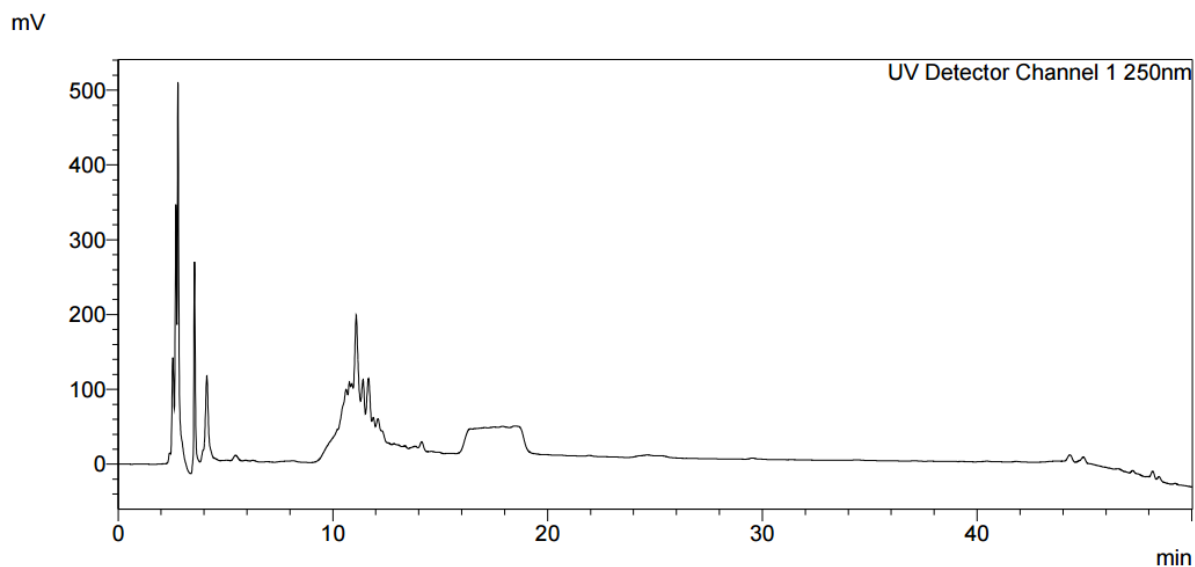
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 6 - Cromatograma da análise em HPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 2 (Tabela 2) em 250 nm.



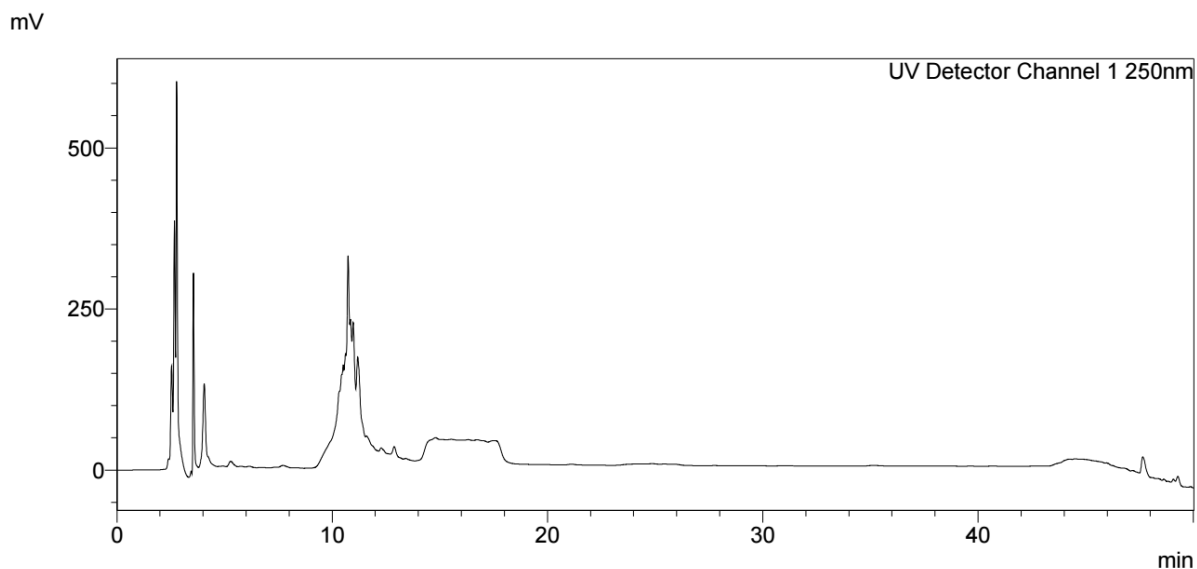
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 7 - Cromatograma da análise em HPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 3 (Tabela 2) em 250 nm.



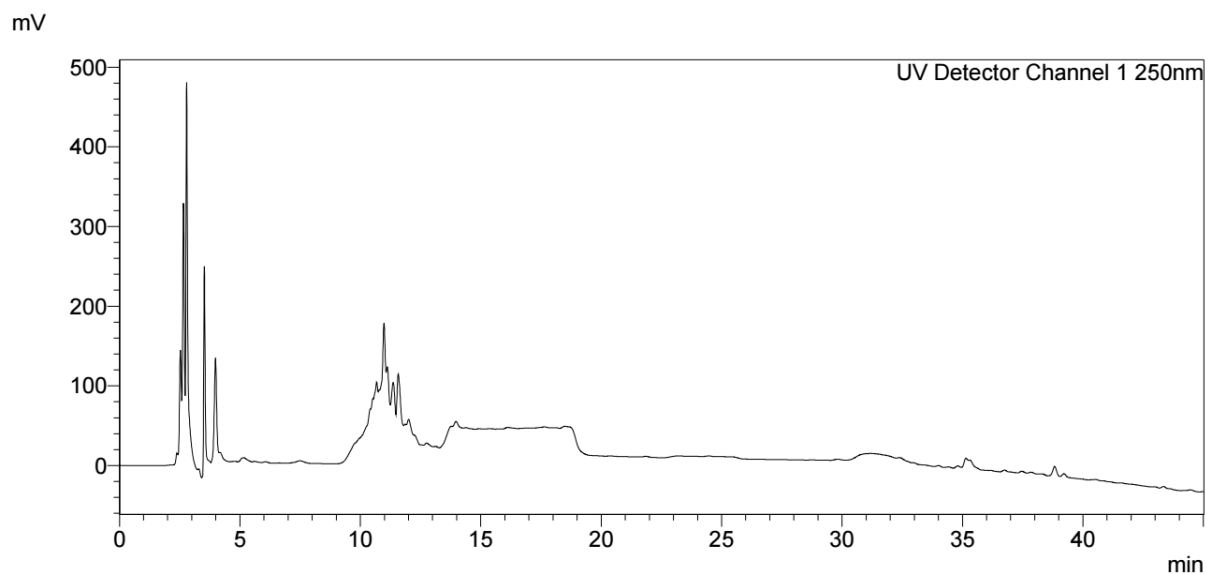
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 8 - Cromatograma da análise em HPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 4 (Tabela 2) em 250 nm.



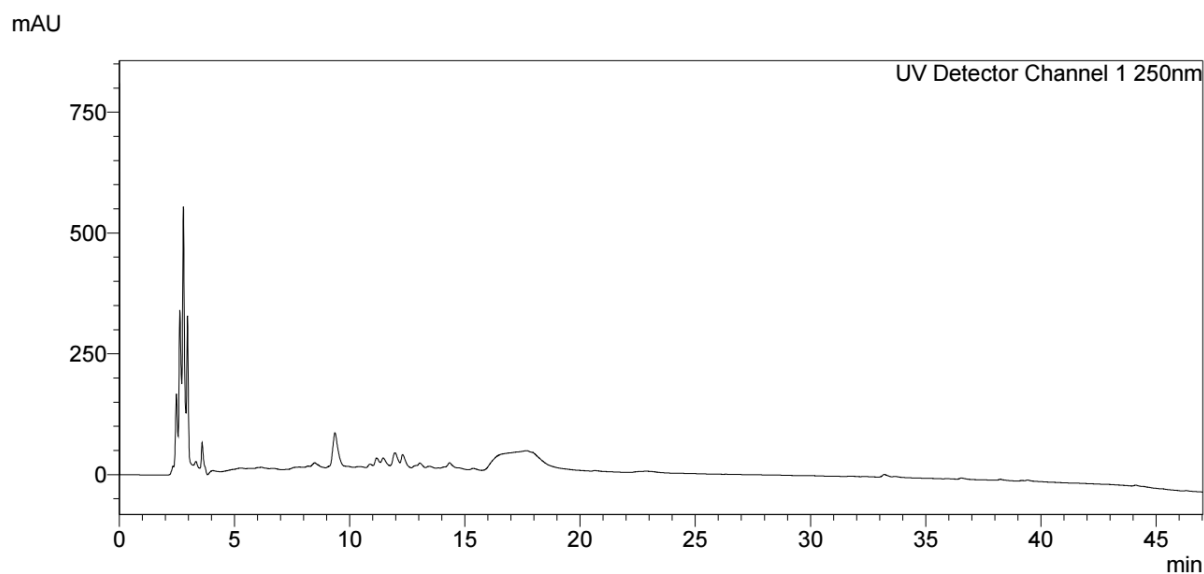
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 9 - Cromatograma da análise em HPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 5 (Tabela 2) em 250 nm.



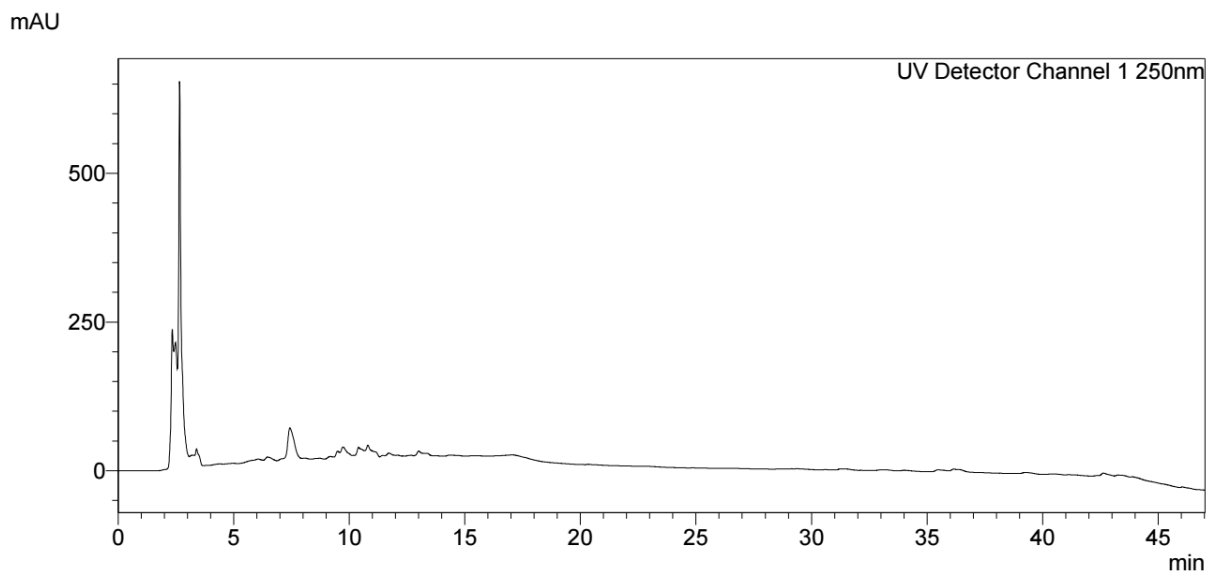
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 10 - Cromatograma da análise em HPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 6 (Tabela 2) em 250 nm.



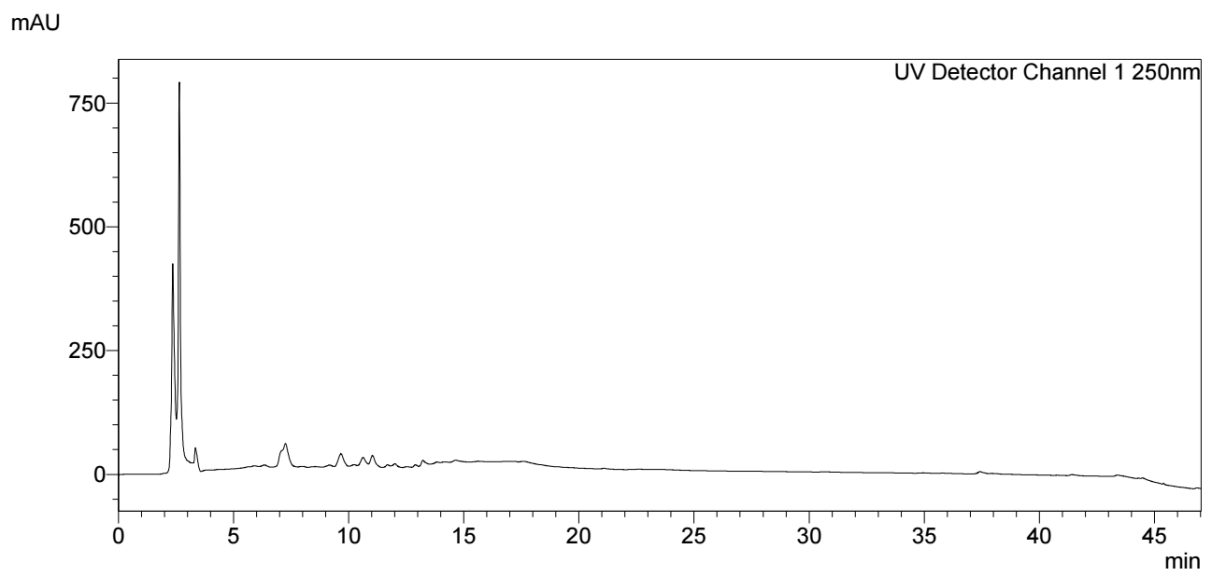
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 11 - Cromatograma da análise em HPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 7 (Tabela 2) em 250 nm.



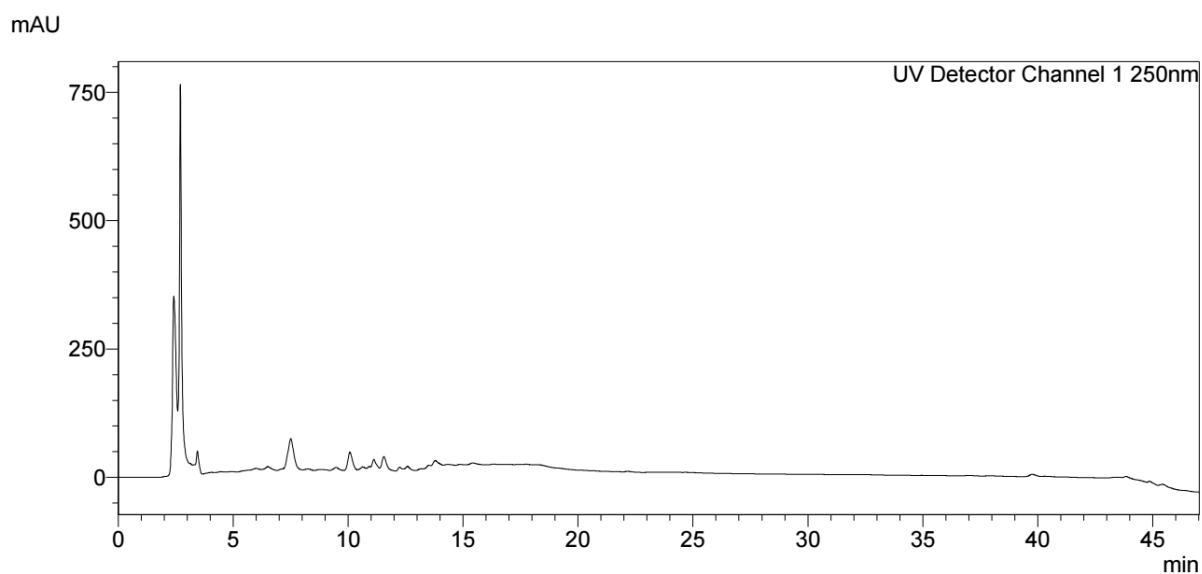
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 12 - Cromatograma da análise em HPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 8 (Tabela 2) em 250 nm.



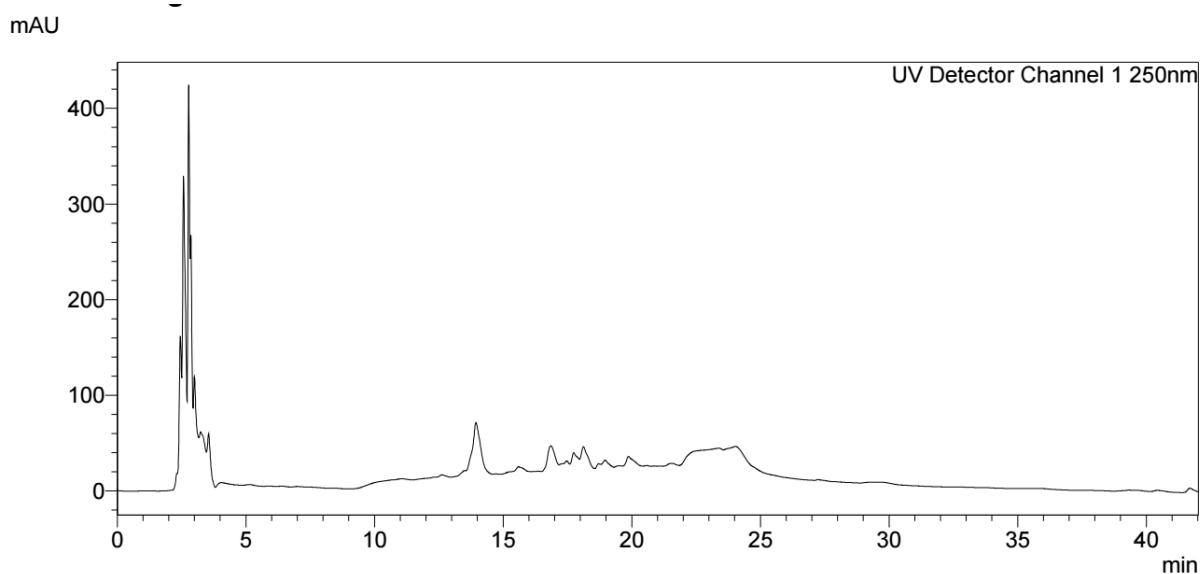
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 13 - Cromatograma da análise em HPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 9 (Tabela 2) em 250 nm.



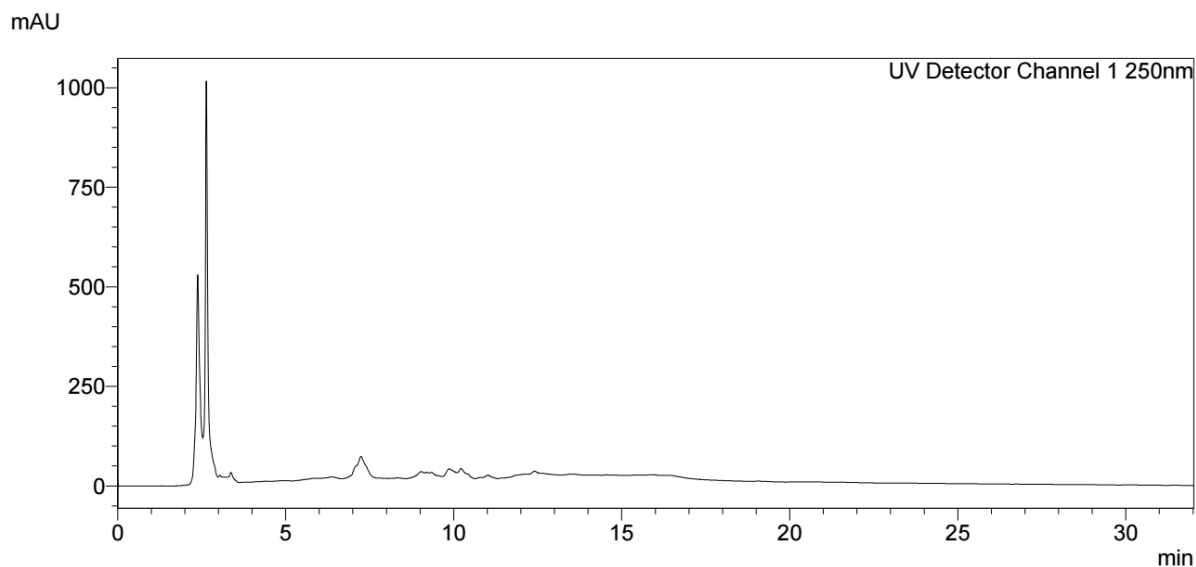
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 14 - Cromatograma da análise em HPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 10 (Tabela 2) em 250 nm.



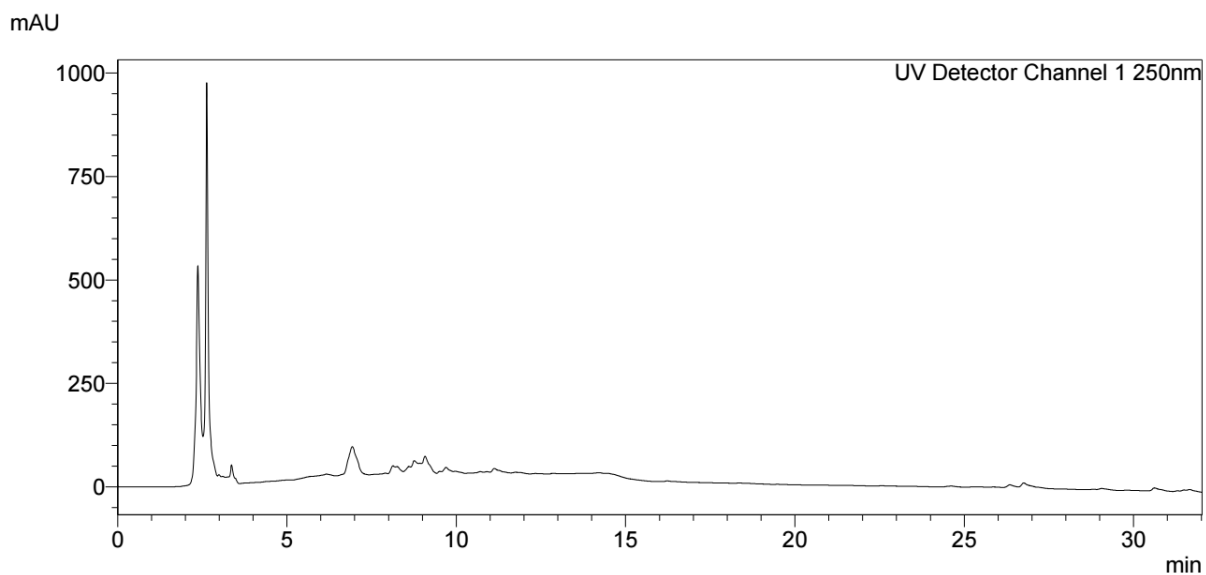
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 15 - Cromatograma da análise em HPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 11 (Tabela 2) em 250 nm.



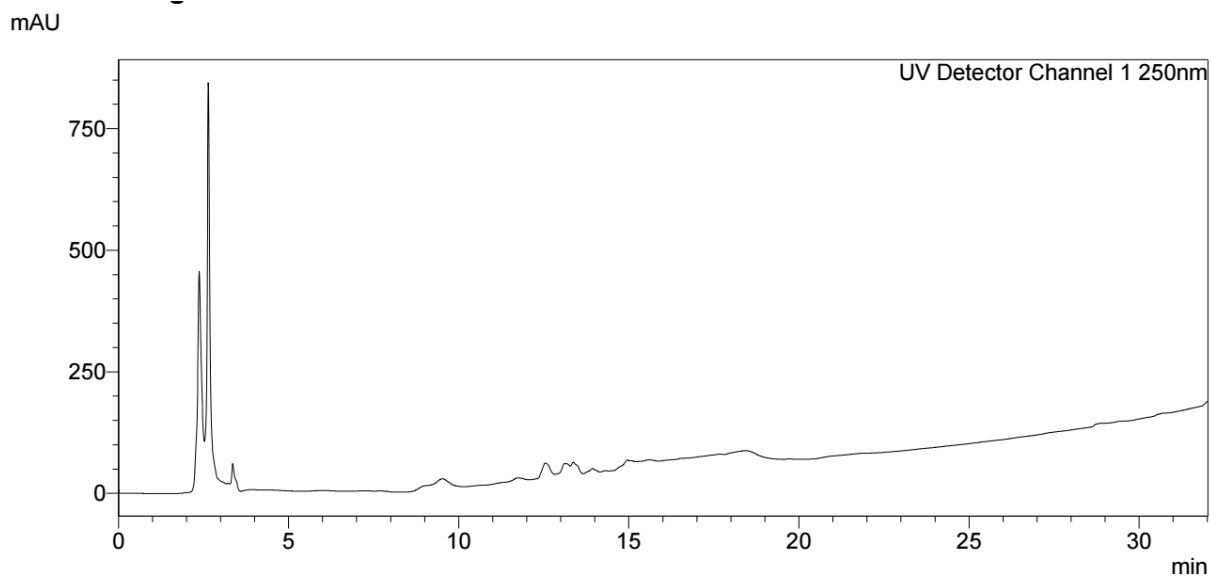
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 16 - Cromatograma da análise em HPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 12 (Tabela 2) em 250 nm.



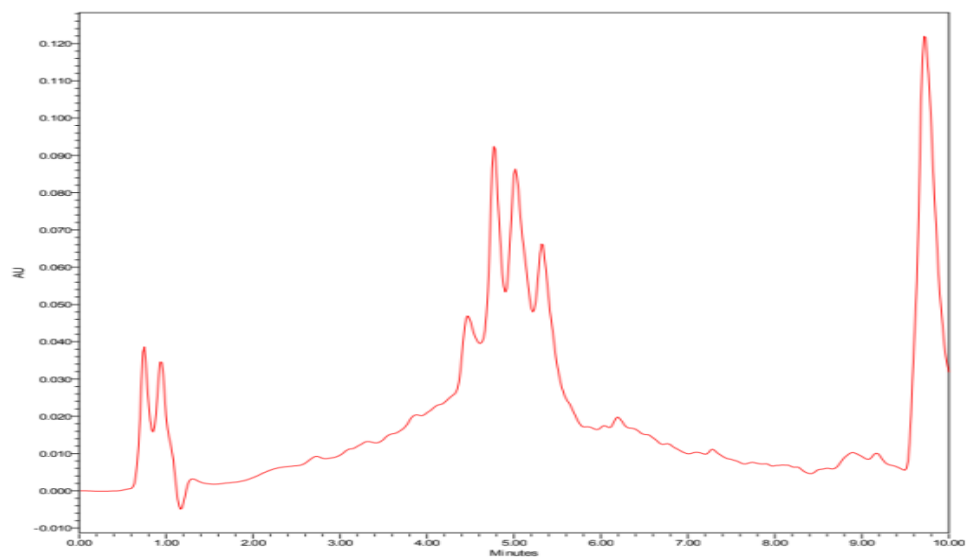
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 17 - Cromatograma da análise em HPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 13 (Tabela 2) em 250 nm.



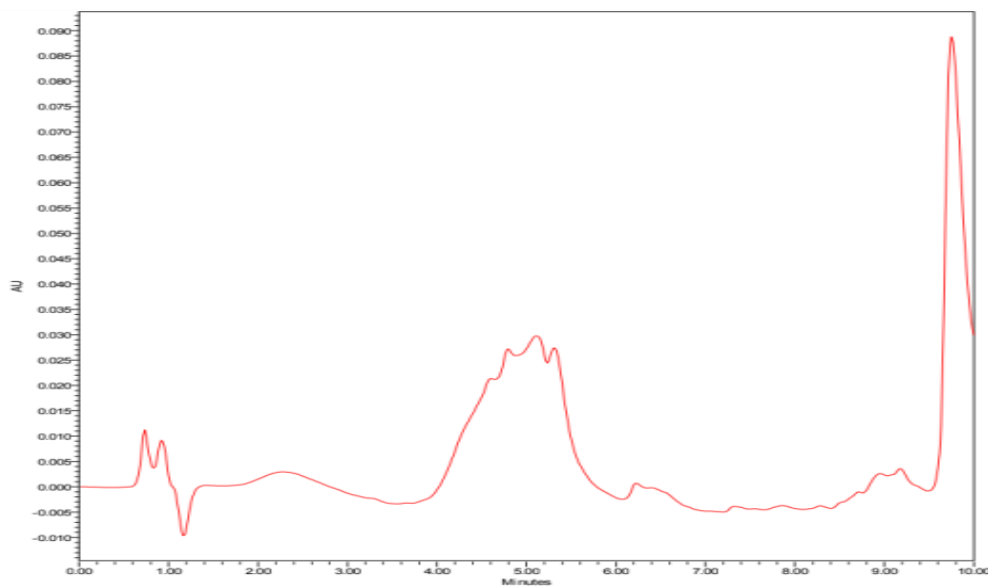
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 18 - Cromatograma da análise em UHPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 2 (Tabela 3) em 250 nm.



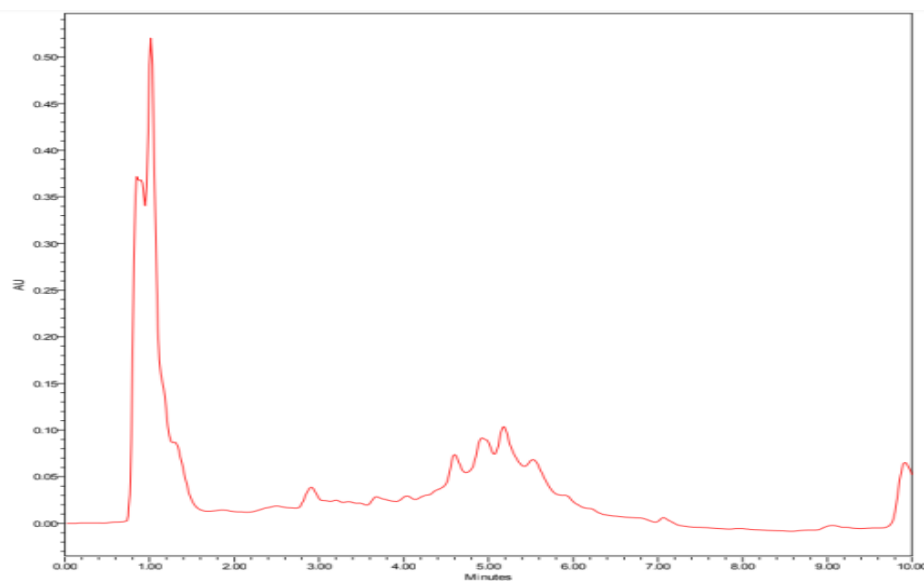
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 19 - Cromatograma da análise em UHPLC-UV do extrato etanólico de folhas de *P. aculeata* na condição 2 (Tabela 3) em 250 nm.



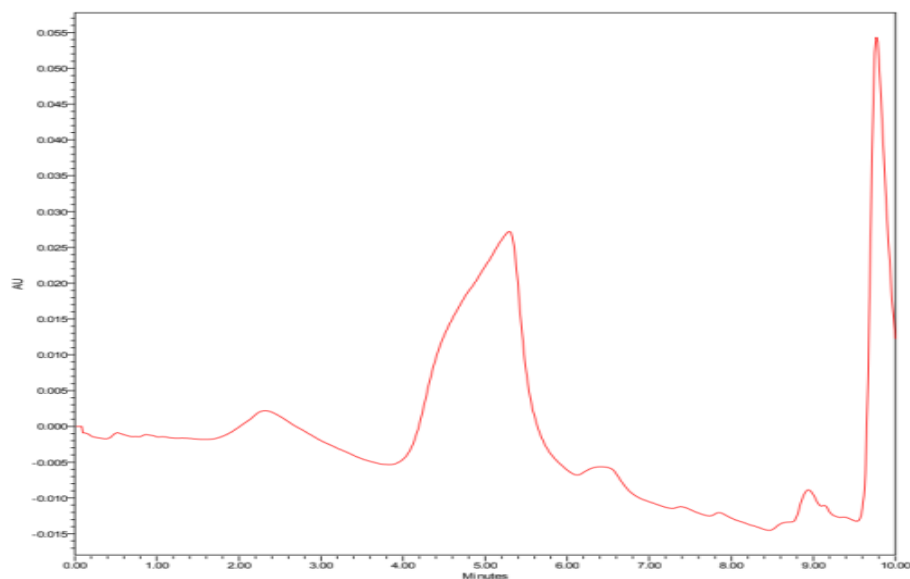
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 20 - Cromatograma da análise em UHPLC-UV da fração etanol 5% do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 2 (Tabela 3) em 250 nm.



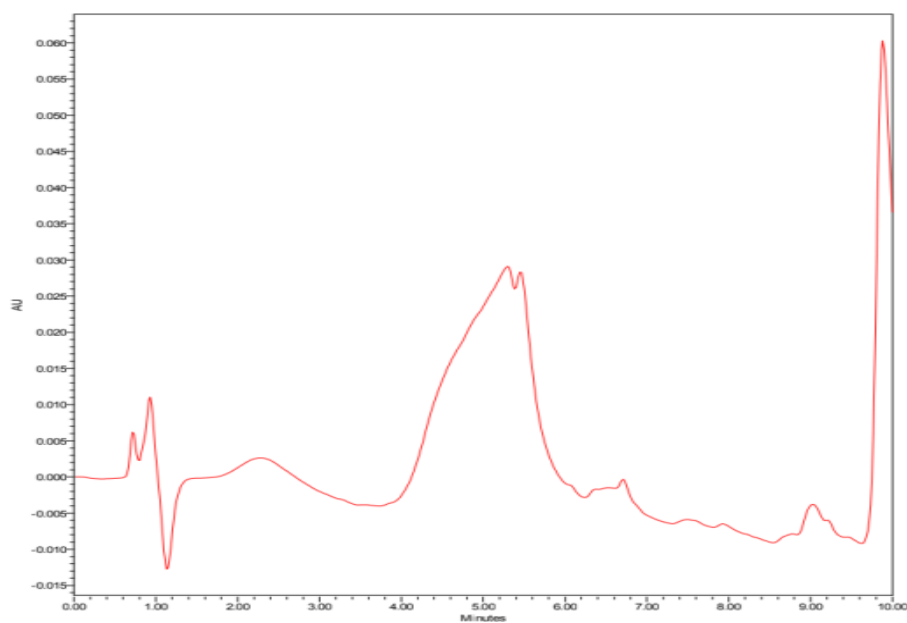
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 21 - Cromatograma da análise em UHPLC-UV da fração etanol 5% do extrato etanólico de folhas de *P. aculeata* na condição 2 (Tabela 3) em 250 nm.



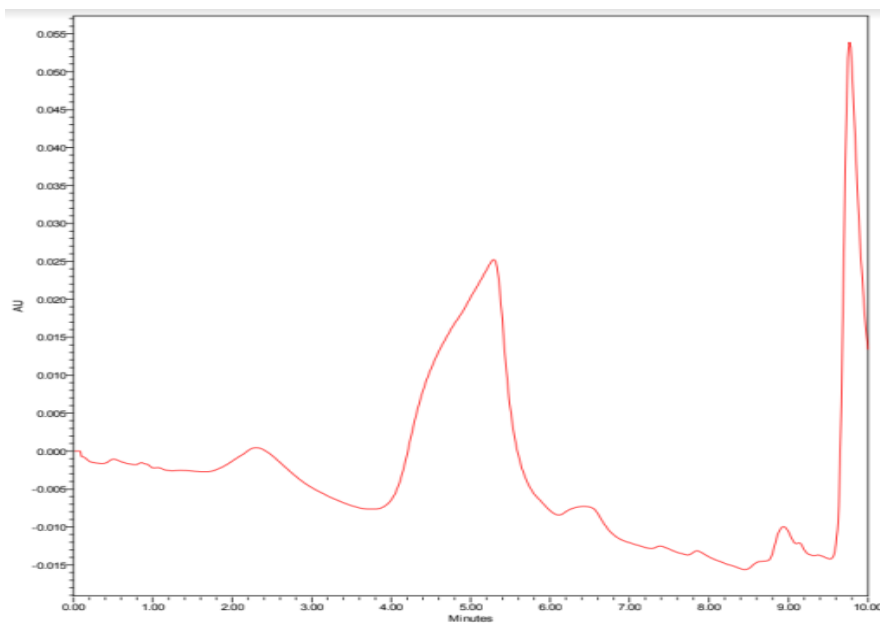
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 22 - Cromatograma da análise em UHPLC-UV da fração etanol do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 2 (Tabela 3) em 250 nm.



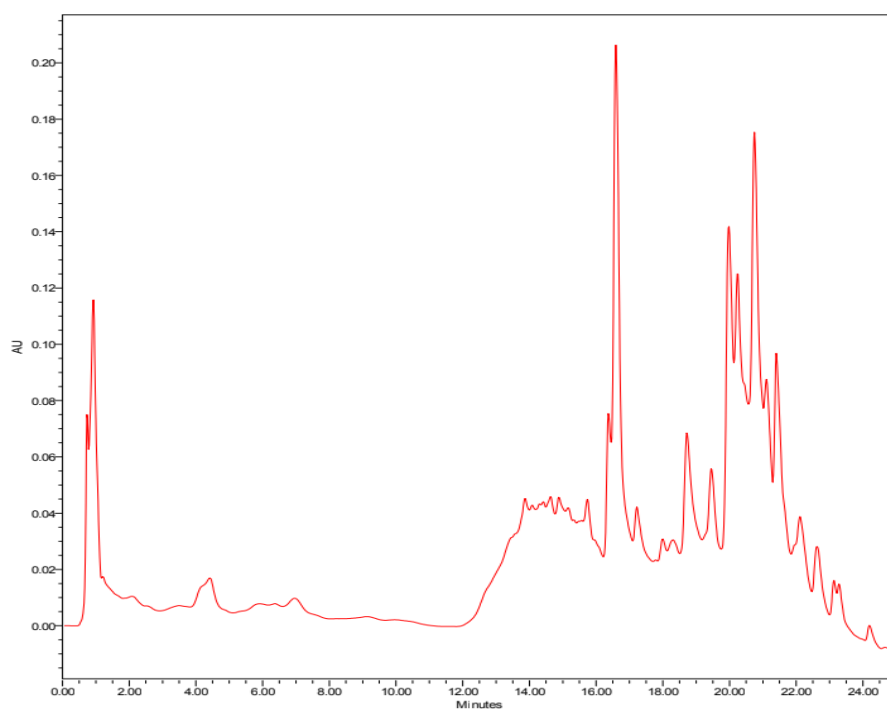
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 23 - Cromatograma da análise em UHPLC-UV da fração etanol do extrato etanólico de folhas de *P. aculeata* na condição 2 (Tabela 3) em 250 nm.



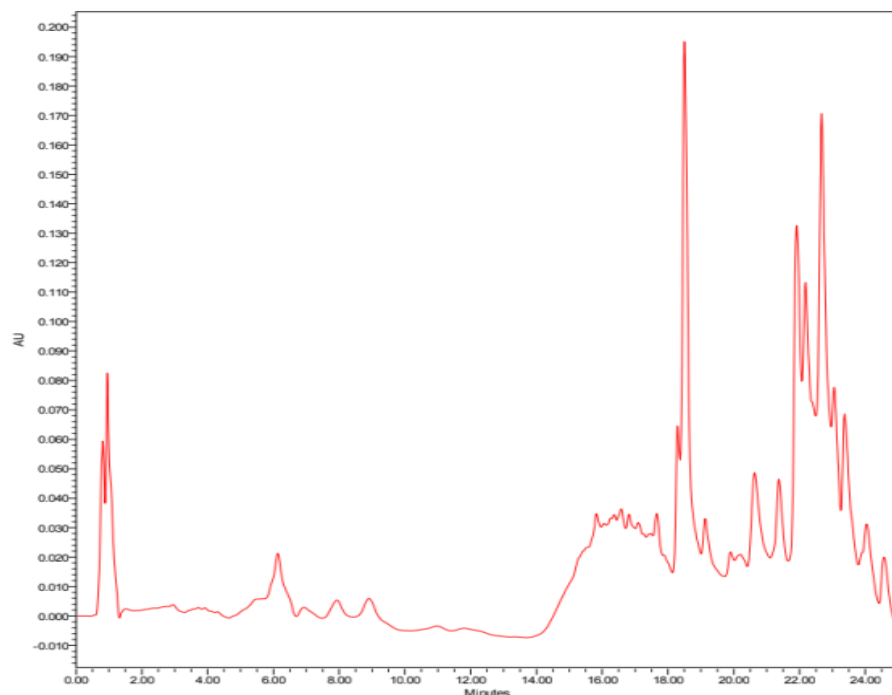
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 24 - Cromatograma da análise em UHPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 4 (Tabela 3) em 250 nm.



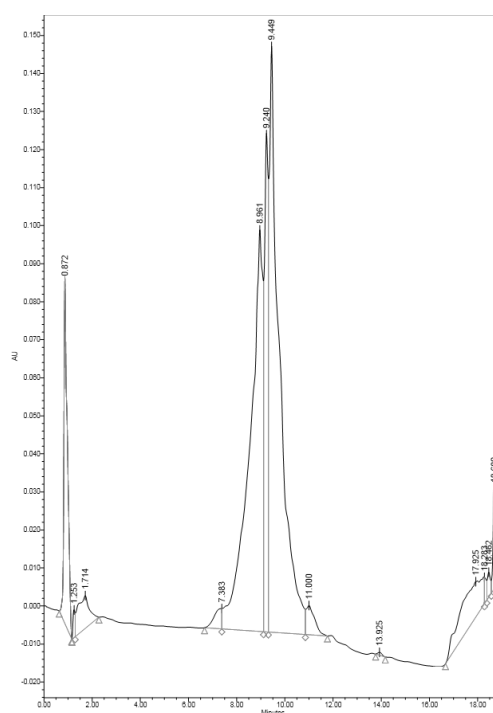
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 25 - Cromatograma da análise em UHPLC-UV do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 5 (Tabela 3) em 250 nm.



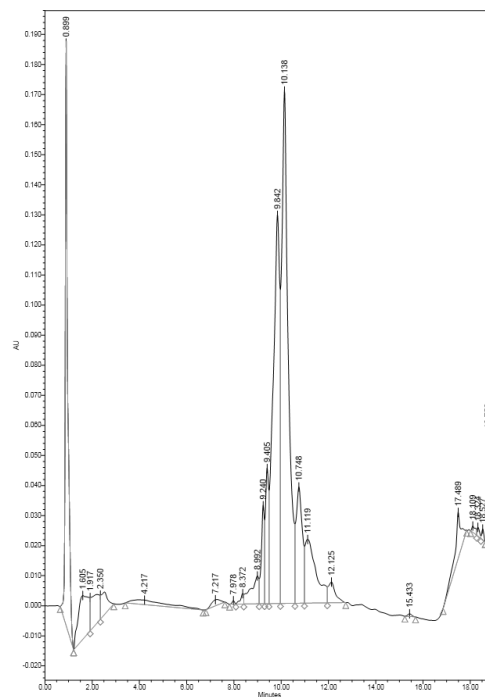
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 26 - Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 1 (Tabela 4) em 250 nm.



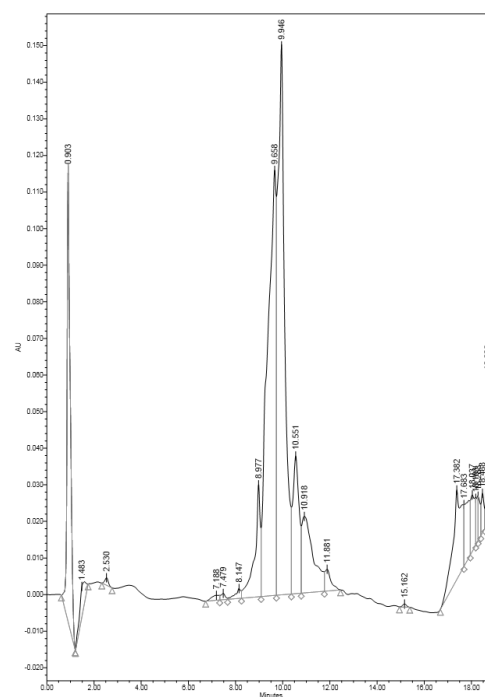
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 27 - Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 2 (Tabela 4) em 250 nm.

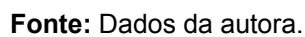


Fonte: Dados da autora.

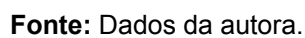
Apêndice 28 - Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 3 (Tabela 4) em 250 nm.



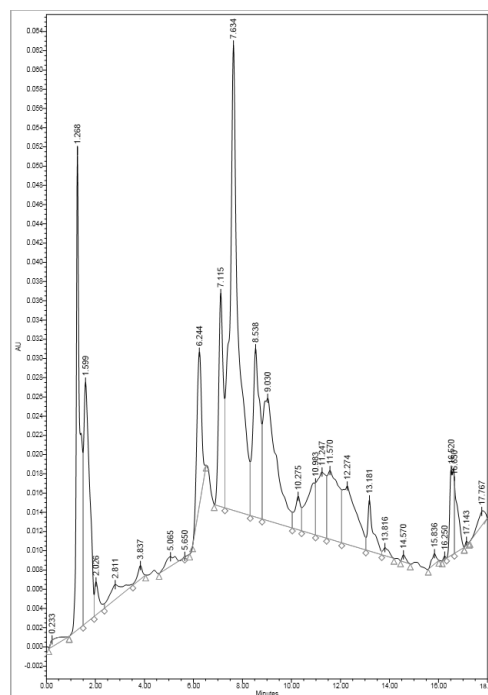
Fonte: Dados da autora.



Apêndice 30 - Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 5 (Tabela 4) em 250 nm.

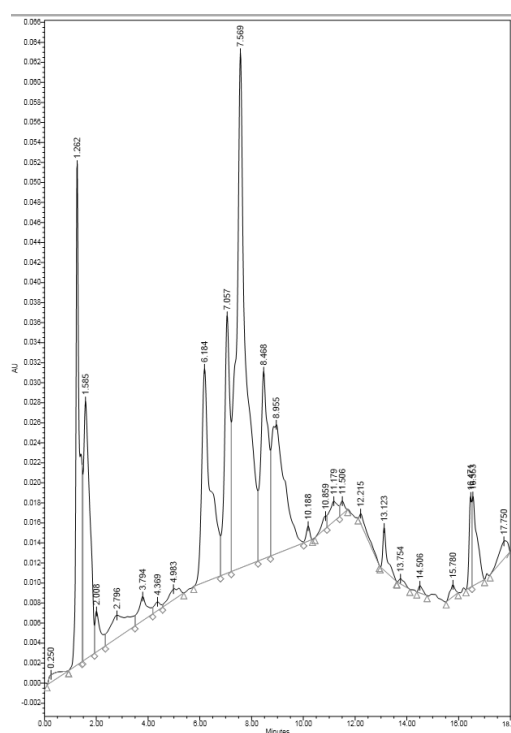


Apêndice 31 - Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 6 (Tabela 4) em 250 nm.



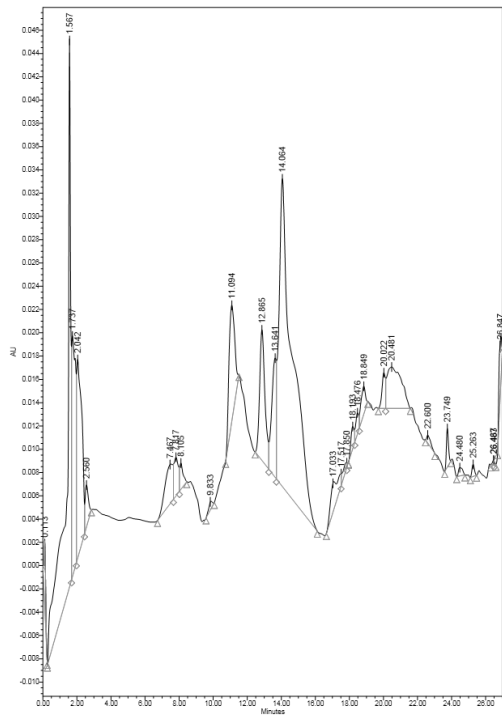
Fonte: Dados da autora.

Apêndice 32 - Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 7 (Tabela 4) em 250 nm.



Fonte: Dados da autora.

Apêndice 33 - Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *P. aculeata* na condição 8 (Tabela 4) em 250 nm.



Fonte: Dados da autora.

Anexo

Anexo 1. Cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº AE422BB

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro:	AE422BB
Usuário:	UNESP
CPF/CNPJ:	48.031.918/0001-24
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético/CTA
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Garcinia brasiliensis
Pouteria campechiana
Hymenaea courbaril
Genipa americana
Licania tomentosa
Caryocar brasiliensis
Pereskia aculeata
Xanthosoma sagittifolium
Varronia curassavica
Gênero e espécie

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **PERFIL METABOLÔMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO-CONVENCIONAIS**

Equipe

André Gonzaga dos Santos	UNESP
BARBARA PAES MIGLIOLI DA MATA	UNESP
CAIO HUMBERTO PEREGO	UNESP
STÉFANY COSTA QUEZADAS	UNESP
DÉBORA OKADA GIMENES	UNESP

Parceiras no Exterior

Technical University of Munich
The University of Queensland

Data do Cadastro: **30/09/2021 21:46:06**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **19:07 de 19/04/2022**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**