

Teresa Cristina de Toledo Francisco

Análise de hidrolisados proteicos de *Pereskia aculeata* Miller (Ora-Pro-Nóbis)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química, UNESP, Araraquara/SP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Araraquara/SP
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

F818a Francisco, Teresa Cristina de Toledo
Análise de hidrolisados proteicos de Pereskia aculeata
Miller (Ora-Pro-Nóbis) / Teresa Cristina de Toledo Francisco.
- Araraquara : [s.n.],2018
82 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Eduardo Maffud Cilli

1. Pereskia. 2. Peptídeos. 3. Hidrolisados de proteína.
4. Antimicóticos. 5. Antibacterianos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Análise de hidrolisados proteicos de Pereskia aculeata Miller (Ora-Pro-Nóbis)"

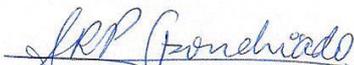
AUTORA: TERESA CRISTINA DE TOLEDO FRANCISCO

ORIENTADOR: EDUARDO MAFFUD CILLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Profª. Drª. SANDRA REGINA POMBEIRO SPONCHIADO
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. NORIVAL ALVES SANTOS FILHO
Campus Experimental de Registro / UNESP - Registro

Araraquara, 26 de setembro de 2018

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Teresa Cristina de Toledo Francisco

Nome em citações bibliográficas: FRANCISCO, T. C. T.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP. Rua Prof. Francisco Degni, 55. Quitandinha – Araraquara/SP – Brasil.

Anglo. Avenida Queiroz Filho, 1599. Vila Harmonia – Araraquara/SP – Brasil.

Etec Sylvio de Mattos Carvalho. Rua Cesário Mota, 644. Centro – Matão/SP – Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2016 – 2018 – Mestrado em Biotecnologia (Conceito CAPES 6). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil. Título “Análise de hidrolisados proteicos de *Pereskia aculeata* Miller (Ora-Pro-Nóbis)”. Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli.

2009 – 2010 – MBA em Gerenciamento Ambiental. Centro Universitário Central Paulista, UNICEP, Brasil. Título: “Agrotóxicos ou orgânicos? Uma questão de sustentabilidade”. Orientadora: Profa. Dra. Elisabete Gabriela Castellano.

1989 – 1992 – Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, Brasil.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2018 - Capacitação: "Vulnerabilidades e Riscos Socioambientais: O aluno em Ação no Espaço" (Carga horária: 40).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2018 - Capacitação: "Laboratório Virtual de Educação em Biologia online" (Carga horária: 40h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2017 - Capacitação: "Coach em grupo – autoconhecimento e sintonia de equipe" (Carga horária: 2h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2016 - Curso de Atualização: "Introdução a LIBRAS – Online 2ª edição/2016". (Carga horária: 90h).

Secretaria da Educação do Estado de São Paulo. Brasil.

2016 - Capacitação: "Atividades experimentais em Biologia" (Carga horária: 20h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2015 - Capacitação: "Portinari-Arte e Meio Ambiente" (Carga horária: 16h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2015 - Capacitação: "Escola de Inverno" (Carga horária: 40h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2015 – Capacitação: "Agenda Ambiental na Administração Pública - A3P" (Carga horária: 20h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2015 - Capacitação: "Prevenção de Acidentes do Trabalho", para os componentes da CIPA (Carga horária:20h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2015 – Capacitação em “Água em curso”. (Carga horária: 12h).

Agência Nacional de Água, ANA, Brasil.

2015 - Capacitação em "Planejamento Interdisciplinar das Práticas de Ensino e Avaliação por Competência". (Carga horária: 50h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2015 - Capacitação em "Avaliação e Reorientação de Aprendizagem".

(Carga horária: 4h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2015 - Capacitação em “Planejamento, Manejo e Gestão de Bacias”. (Carga horária: 40h).

Agência Nacional de Águas, ANA, Brasil.

2015 -Capacitação em "NSA- Sistema Acadêmico". (Carga horária: 4h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2014 - Capacitação em "Práticas Interdisciplinares para Professores de Ciências da Natureza". (Carga horária: 40h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2014 - Capacitação em “Prevenção de Acidentes para Componentes da CIPA”.

(Carga horária: 20h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2014 - Capacitação em "Seminário Soberania Alimentar e Geração de Renda e da VII Feira de Troca de Sementes e Mudas Tradicionais dos Quilombos do Vale do Ribeira e da V Feira Estadual de Troca de Sementes Tradicionais e Crioulas do Estado de São Paulo”. (Carga horária: 16h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2014 - Capacitação em "Seminário Internacional de Boas Práticas de Sustentabilidade. (Carga horária: 16h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2014 - Treinamento "Atendimento de Urgência e Emergência em Situações de Riscos". (Carga horária: 2h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2014 - Capacitação em "Agentes de Abandono de Área". (Carga horária: 4h).
Escola Superior de Bombeiros, ESB, Brasil.

2013 - Capacitação em "Encontro com Docentes - Metodologia e Avaliação". (Carga horária: 4h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2013 - Capacitação em "Trabalhando os roteiros de aprendizagem". (Carga horária: 20h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2013 – Capacitação em "Segurança e Meio Ambiente". (Carga horária: 40h).
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2013 - Capacitação em "Processo de Avaliação na Educação Profissional". (Carga horária: 40h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2013 - Capacitação em "O professor e o aluno em sala de aula: procedimentos didáticos". (Carga horária: 4h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2013 - Capacitação em "Análise de impacto ambiental e indicadores da qualidade de água". (Carga horária: 32h).
Embrapa, EMBRAPA, Brasil.

2013 - Capacitação em "Desenvolvimento de Material Didático para Gestão de Energia. (Carga horária: 8h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2013 - Capacitação em "Sistema de Tratamento de água e resíduos". (Carga horária: 40h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2013 - Capacitação em "Biogeografia: Conservação de Ecossistemas Naturais". (Carga horária: 40h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2012 - Capacitação em "Desafios e aprendizagens para a formação de uma cultura sus. (Carga horária: 8h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2011 - Aperfeiçoamento "História da África e das Culturas Afro-Brasileiras". (Carga horária: 195h).

UNIAFRO, UFMG, Brasil.

2011 - Capacitação em "Colóquio Interestadual - Histórias e Culturas Africanas e Afro-brasileiras na Escola". (Carga horária: 16h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2011 - Capacitação em "Blogs - Portal Clickideia". (Carga horária: 4h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2011 - Capacitação em "Congresso Técnico InterEtecs". (Carga horária: 7h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2010 - Capacitação em "Videoconferência: Critérios, Instrumentos e Registros de Avaliação". (Carga horária: 3h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2010 - Capacitação Inicial - Nível 01 do Portal Clickideia. (Carga horária: 4h).

Clickideia Tecnologia Educacional, CLICKIDEIA, Brasil.

2010 - Curso de Treinamento para Cipeiros. (Carga horária: 20h).
Treinamentos e Assessoria e Segurança no Trabalho, DBA, Brasil.

2010 - Curso da CIPA- Comissão Interna de Prevenção de Acidentes. (Carga horária: 20h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2009- Capacitação em "Videoconferência: A Arte de Nicolas Poussin". (Carga horária: 2h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2009 - Programa de Capacitação do Projeto de Qualificação do Trabalhador. (Carga horária: 24h).

Governo do Estado de São Paulo, GOVERNO/SP, Brasil.

2009 - Capacitação em "Aprendizagem baseada em Projetos - uma nova estratégia de ensino". (Carga horária: 48h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2009 - Capacitação em "DNA Forense". (Carga horária: 80h).

Portal Educação de Campo Grande, PE, Brasil.

2009 - Capacitação em "Práticas de Sustentabilidade". (Carga horária: 4h).

Portal Educação de Campo Grande, PE, Brasil.

2009 - Capacitação em "Videoconferência: Arte e cultura na sala de aula". (Carga horária: 3h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2008 - Capacitação em "Direito Ambiental". (Carga horária: 60h).

Portal Educação de Campo Grande, PE, Brasil.

2008 - Minicurso "Photoshop". (Carga horária: 2h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2008 - Minicurso "Formatação Word 2007". (Carga horária: 2h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2008 - Capacitação em "Videoconferência - TCC: Uma metodologia para educação e trabalho". (Carga horária: 3h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2007 - Capacitação em "Videoconferência: Planejamento do Ensino". (Carga horária: 3h).

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

2003 - Capacitação em "Técnicas de Engenharia Genética e Biologia num Enfoque Físico-Químico". (Carga horária: 8h).

Master Anglo Araraquara, ANGLO, Brasil.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Resumo publicado em periódicos

FRANCISCO, T. C. T. CILLI, E. M. Extração de peptídeos e quantificação de aminoácidos de *Pereskia aculeata* Miller (Ora-Pro-Nóbis) para ensaios antimicrobianos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 39, suple.1, 2018.

Divulgação científica

FRANCISCO, T. C. T. Urbanização e Sustentabilidade. **A Tribuna**, Araraquara, 28 out. 2009.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

CAMARGO, A. A.; **FRANCISCO, T. C. T.** Sistema de Avaliação versus Dificuldades de Aprendizagem. In: II Simpósio Ensino Médio Técnico, 2013, São Paulo. **Processos de Avaliação**, 2013. p. 57-61.

MATOS, E. P.; FRANCISCO, T. C. T. Análise Bioliterária de Coletânea de Mia Couto. In: Os fios que nos unem - Centro Paula Souza, 2011, São Paulo. I Colóquio Interstadual "História e Culturas Africanas e Afro-Brasileiras na Escola", 2011. p. 63-66.

Apresentações de Trabalho

FRANCISCO, T. C. T; CILLI, E. M. Extração de peptídeos e quantificação de aminoácidos de *Pereskia aculeata* Miller (Ora-Pro-Nóbis) para ensaios antimicrobianos. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

FRANCISCO, T. C. T. Ecoempreendedorismo e Sustentabilidade. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

FRANCISCO, T. C. T. Sistema de avaliação versus dificuldades de aprendizagem. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

FRANCISCO, T. C. T. Preservação e Conservação Ambiental. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

FRANCISCO, T. C. T. Conscientização e Orientação Sexual. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

FRANCISCO, T. C. T. Floresta Amazônica. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

FRANCISCO, T. C. T. Análise bioliterária de coletânea de Mia Couto. 2011. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

DEMAIS TIPOS DE PRODUÇÃO TÉCNICA

FRANCISCO, T. C. T. Probabilidade Simples, Condicional e Leis. 2016. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRAS

IVV Congresso Farmacêutico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. 2018. (Congresso)

Excelência em Liderança - Gestão de Pessoas. 2013. (Seminário).

II Simpósio do Ensino Médio e Técnico. Sistema de avaliação versus dificuldades de aprendizagem. 2013. (Simpósio).

World Café Pedagógico. 2013. (Encontro).

Etec "Sylvio de Mattos Carvalho". Floresta Amazônica. 2012. (Seminário).

Etec "Sylvio de Mattos Carvalho". Conscientização e Orientação Sexual. 2012. (Seminário).

Etec "Sylvio de Mattos Carvalho". Preservação e Conservação Ambiental. 2012. (Seminário).

I Colóquio Interestadual. Análise bioliterária de coletânea de Mia Couto. 2011. (Seminário).

XII Olimpíada Brasileira de Astronomia e Astronáutica. 2009. (Olimpíada).

XVI Feira Tecnológica - Palestra "Green Box". 2008. (Seminário).

XVI Feira Tecnológica - Palestra "MS- Power Point". 2008. (Seminário).

XVI Feira Tecnológica - Palestra "Talento só, não basta". 2008. (Seminário).

Encontro Pedagógico - Colégio Obejtivo. 2005. (Encontro).

PRIONS: Novo limite entre o vivo e o não-vivo/ A classificação dos seres vivos: atualização/ Experimentos de química em sala de aula. 2004. (Exposição).

Agradecimentos

Ao Ser Supremo por me conceder a dádiva da vida, num aprendizado diário e constante de fé, amor e persistência.

À minha família que, mesmo “distante”, me proporcionou a calma da correria do dia a dia.

Ao meu Amor pelo carinho, amizade, companheirismo e pela incansável dedicação, incentivo, estímulo, preocupação e paciência. Obrigada. Amo você.

Ao pequeno agricultor, Ulisses Serafim, pela doação do material para desenvolvimento deste trabalho. Obrigada.

Ao prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli, pela oportunidade, confiança depositada, pelos ensinamentos e orientações. Muito obrigada.

Aos companheiros do Laboratório: Paulo, Julia, Natália, Matheus, Mariana, Carol, Norival e, em especial, Jaff por auxiliarem no desenvolvimento do trabalho.
Muito obrigada!

Aos funcionários do Instituto de Química de Araraquara, UNESP, por estarem sempre à disposição quando foi necessário, em especial às secretárias da Pós-Graduação em Biotecnologia.

A CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas quando tocarem uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Gustav Jung

RESUMO

A hortaliça ora-pro-nóbis - *Pereskia aculeata* oferece múltiplos benefícios ao ser humano. Pertencente à família das cactáceas, está entre as que possuem maior teor proteico, com algumas variedades chegando a mais de 25%. A ora-pro-nóbis é fonte potencial de substâncias bioativas, com folhas tenras, grossas, equiparado ao do caruru, da couve e do espinafre. É uma espécie nutracêutica, com características de alimento funcional com propriedades protetoras e medicinais, sendo constatada a relação do uso da ora-pro-nóbis com a redução do risco de incidência de várias doenças como varizes, câncer de cólon, tumores intestinais e diabetes. Diante do exposto, esse estudo visou a extração e quantificação de proteínas e peptídeos, análise e quantificação de aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e possíveis atividades antibacterianas e antifúngicas. Neste contexto, o maior teor proteico obtido foi em extração aquosa (91 µg/mg de material) e entre as extrações hidroalcoólicas, em 30% de metanol, foi de 70 µg/mg de material. Análises cromatográficas, em 220nm e 280nm, indicaram a presença de proteínas e aminoácidos aromáticos, em todos os extratos. A quantificação de aminoácidos corroborou com os dados reportados na literatura, com exceção da lisina que apresentou, em média, 10 vezes maior. No que diz respeito aos ensaios antimicrobianos, os extratos não apresentaram efeitos inibitórios. Este estudo identificou a presença de todos os aminoácidos essenciais, com potencial aplicação farmacológica, podendo auxiliar no tratamento de patologias relacionadas às deficiências proteicas.

Palavras chaves: *Pereskia*, Proteína, Hidrolisados, Antimicrobiana.

ABSTRACT

The vegetable ora-pro-nóbis - *Pereskia aculeata* offers multiple benefits to the human being. It belongs to the family of cacti and it is among the highest protein content with some varieties reaching more than 25%. Ora-pro-nóbis is a potential source of bioactive substances with tender and thick leaves similar to caruru, cabbage and spinach. It is a nutraceutical species with characteristics of functional feed with protective and medicinal properties. It is being observed a relation of the use of the ora-pro-nóbis with the reduction of the risk of incidence of several diseases such as varicose veins, colon cancer, intestinal tumors and diabetes. Thus, this study aims at the extraction and quantification of proteins and peptides, the analysis and quantification of amino acids by High Performance Liquid Chromatography, and the anti-bacterial and anti-fungal activities. In this context, the highest protein content was in aqueous extraction (91 µg/mg of material) and in 30% of methanol between the hydroalcoholic extractions was 70 µg/mg of material. Chromatographic analyzes indicated the presence of proteins and aromatic amino acids in all the extracts in 220nm and 280nm. The amino acid quantification corroborated with the data reported in literature, except from the lysine presented 10 times higher on average. With regard to antimicrobial testing, the extracts cannot be legitimated. This study identified the presence of all essential amino acids with the strong pharmacological application, and may assist in the treatment of pathologies related to protein deficiencies.

Keywords: *Pereskia*, Protein, Hydrolysates, Antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição geográfica mundial da espécie *Pereskia aculeata* Miller, representada por círculos.....30
- Figura 2.** Área sombreada no mapa caracteriza a distribuição geográfica da família Cactaceae no continente americano.31
- Figura 3.** Ora-pro-nóbis, *Pereskia aculeata* Miller: trepadeira (A), folhas (B), espinhos (C), flor (D), flor (E) e fruto (F).....33
- Figura 4.** Fluxograma simplificado dos experimentos realizados neste trabalho39
- Figura 5.** Fluxograma de fracionamento em coluna de EFS.....43
- Figura 6.** Eluatos obtidos após aplicação em coluna de EFS* das extrações com NaCl 0,1 M (A) (EXTSAL1), com 30% de metanol (B) (EXT30MET1), com 70% de metanol (C) (EXT70MET1), aquosa (D) (EXTAGUA2) seguida de 30% de metanol (E) (EXT30MET2) e 70% de metanol (F) (EXT70MET2).....51
- Figura 7.** Perfis cromatográficos em 220 nm e 280 nm da OPN eluída em coluna de EFS: 100% solução A (A e C), 30% de solução B (B e D) – fração extraída em 30% Metanol (EXT30MET1). Utilizou-se 1 mg/mL de amostra para análise.53
- Figura 8.** Perfis cromatográficos em 220 nm e 280 nm da OPN eluída em coluna de EFS: 100% solução A (A e C), 30% de solução B (B e D) – fração extraída em 70% Metanol (EXT70MET1). Utilizou-se 1 mg/mL de amostra para análise.54
- Figura 9.** Perfis cromatográficos em 220 nm e 280 nm da OPN eluída em coluna de EFS: 100% solução A (A e C), 30% de solução B (B e D) – fração extraída em solução de NaCl (EXTSAL1). Utilizou-se 1 mg/mL de amostra para análise.55
- Figura 10.** Perfis cromatográficos em 220 nm e 280 nm da OPN eluída em coluna de EFS: 100% solução A (A e C), 30% de solução B (B e D) – fração extraída em água (EXTAGUA2). Utilizou-se 1 mg/mL de amostra para análise.56
- Figura 11.** Perfis cromatográficos em 220 nm e 280 nm da OPN eluída em coluna de EFS: 100% solução A (A e C), 30% de solução B (B e D) – fração extraída em 30% de metanol (EXT30MET2). Utilizou-se 1 mg/mL de amostra para análise.57
- Figura 12.** Perfis cromatográficos em 220 nm e 280 nm da OPN eluída em coluna de EFS: 100% solução A (A e C), 30% de solução B (B e D) – fração extraída em 70% de metanol (EXT70MET2). Utilizou-se 1 mg/mL de amostra para análise.58
- Figura 13.** Perfil cromatográfico de aminoácidos presentes na amostra OPN água da

fração 30% de solução B.....	60
Figura 14. Perfil de picos purificados da fração 100 % solução A da extração aquosa (EXTAGUA2).....	64
Figura 15. Ensaio antifúngico do extrato bruto da extração aquosa (EXTAGUA2) (2). <i>Aspergillus niger</i> (A), <i>Aspergillus flavus</i> (B), <i>Aspergillus fumigatus</i> (C), <i>Aspergillus nidulans</i> (D) e <i>Aspergillus parasiticus</i> (E). Miconazol (1) e Extrato bruto da extração aquosa (EXTAGUA2) (2).	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de aminoácidos de carnes frescas e percentual fornecido por cada 100 g.	26
Tabela 2. Teor proteico das amostras.....	48
Tabela 3. Massas (mg) das respectivas extrações após EFS e liofilização.	52
Tabela 4. Composição de aminoácidos e teor proteico, em massa ($\mu\text{g}/\text{mg}$), nas diferentes frações de extração e sedimentados retidos no filtro, bem como dados encontrados na literatura.....	62
Tabela 5. Composição de aminoácidos e teor proteico, em massa ($\mu\text{g}/\text{mg}$), nos diferentes eluatos.	63
Tabela 6. CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) para as amostras estudadas em diferentes linhagens bacterianas.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

atm – atmosfera

BDA – Batata Dextrose Ágar

BSA – Albumina Soro Bovino

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EFS - Extração em Fase Sólida

OPN - Ora-pro-Nóbis

PANC – Plantas Alimentícias Não Convencionais

pH – potencial hidrogeniônico

pK – constante de dissociação

v/v – volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Hortaliça não convencional	24
1.2	Ora-pró-nobis – <i>Pereskia aculeata</i> Miller	27
1.1.1	<i>Pereskia aculeata</i> Miller e atividade biológica	34
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivo geral	37
2.2	Objetivos específicos	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	Coleta e processamento das folhas de OPN	40
3.2	Obtenção de extratos	40
3.2.1	Extração de OPN triturada em água pura	40
3.2.2	Extração salina e hidroalcoólicas	40
3.2.3	Extrações aquosa e hidroalcoólicas sequenciais	41
3.3	Quantificação proteica	41
3.4	Fracionamento em coluna de EFS (Extração de Fase Sólida)	41
3.5	Hidrólise	44
3.5.1	Hidrólise dos extratos salino e hidroalcoólicos	44
3.5.2	Hidrólise parcial da amostra triturada e sedimentada	44
3.6	Análises por CLAE dos extratos salino, hidroalcoólicos e aquoso	44
3.6.1	Análise das frações obtidas por EFS, modo analítico	44

3.6.2 Purificação das frações obtidas por EFS, modo semipreparativo.....	44
3.6.3 Análise dos aminoácidos	45
3.7 Ensaios antimicrobianos	45
3.7.1 Antibacterianos	45
3.7.1.1 Preparação das amostras para avaliação antibacteriana	45
3.7.2 Antifúngicos	46
3.7.2.1 Preparação das amostras para avaliação antifúngica	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Quantificação proteica.....	48
4.2 Filtração em coluna de EFS (Extração de Fase Sólida)	50
4.3 Análises cromatográficas dos extratos fracionados por EFS e perfil de aminoácidos por CLAE	52
4.4 Análises dos ensaios antimicrobianos	65
5 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

A medicina atual deve muito de seus avanços à sabedoria popular e ao conhecimento do poder de plantas. Apesar de ainda causar polêmica entre adeptos da medicina complementar e da medicina tradicional, o uso de plantas medicinais e fitoterápicos é crescente e já conta com a regulamentação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e apoio do Sistema Único de Saúde (SUS). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças (MONTEIRO, 2011).

Quando uma espécie vegetal é usada com fins terapêuticos, seja ela cultivada ou não, é designada por planta medicinal (BRASIL, 2006, BRASIL, 2011). Essas plantas possuem substâncias químicas ativas farmacologicamente (princípios ativos), normalmente em conjunto com um grupo de substâncias que fazem parte da constituição daquele vegetal (FURLAN, 1999; CALIXTO, 2000).

O governo brasileiro tem promovido ações para o desenvolvimento do setor que envolve a pesquisa e a produção de plantas medicinais, a partir da publicação do decreto 5.813 de 22 de junho de 2006, criando a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. As diretrizes foram traçadas por meio do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2007). Entre seus fundamentos estão a ampliação das opções terapêuticas no Sistema Único de Saúde (SUS), o uso sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento industrial e tecnológico (BRASIL, 2007). Também tem sido estimulada a pesquisa envolvendo plantas nativas, de modo que possam ser exploradas e aproveitadas no complemento das necessidades nutricionais da população - “Guia Alimentar Para População Brasileira e Alimentos Regionais Brasileiros” (BRASIL, 2002; BRASIL, 2004).

No entanto, a maioria das plantas não convencionais é desconhecida, e um reduzido número delas apresenta comprovação científica, sendo paulatinamente estudadas por pesquisadores. Portanto, deve ser cada vez mais estimulada a divulgação do entendimento científico acerca dos benefícios ocasionados pela utilização alimentar dessas plantas não convencionais para a melhoria da saúde humana (SOUZA, 2009; BORGES, 2017). As hortaliças não convencionais são um grupo de espécies pouco exploradas da flora brasileira e podem constituir uma fonte de renda alternativa na atividade agropecuária, sobretudo na agricultura familiar. Essas

hortaliças apresentam distribuição limitada à determinada região, não fazendo parte de uma cadeia produtiva, à semelhança das hortaliças convencionais. Essas poderiam exercer grande influência na alimentação e na cultura de populações tradicionais, porém não recebem o devido interesse da comunidade e conseqüentemente também não despertaram o interesse de empresas das áreas de fertilizantes, sementes ou agroquímicos (BRASIL, 2010).

Visando aumentar o conhecimento do biota brasileiro, extratos aquosos e/ou alcoólicos de folhas, caules ou raízes têm sido testados e inseridos em formulações terapêuticas, para ações antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, cicatrizante e tripanocida (QUEIROZ, 2012). Mesmo com estas aplicações, há pouquíssima exploração comercial de hortaliças não convencionais.

1.1 Hortaliça não convencional

O Brasil possui uma vasta biodiversidade de plantas nas quais são encontrados ricos nutrientes e minerais. As plantas alimentícias não convencionais (PANC), muitas vezes inconvenientes e denominadas daninhas, pragas, inços e invasoras, são espécies relevantes frente aos problemas climáticos que afetam a produção de plantas alimentícias convencionais, e contribuem para a diversificação de cultivos agrícolas e viabilização econômica de pequenas propriedades. Dentre as PANC destacam-se as hortaliças não-convencionais (HONC), que vem sendo caracterizadas pela sua importância ecológica, econômica, pelo alto valor nutricional, fácil cultivo e baixo custo (KINUPP, 2007; ROCHA et al., 2008).

Na literatura e no meio técnico, há certa indefinição quanto à denominação deste grupo de hortaliças. Por vezes, são identificadas, por uma vertente de técnicos, como “hortaliças tradicionais”. Denominá-las dessa forma, em referência ao seu cultivo associado a populações tradicionais, é também uma forma de valorar a questão cultural agregada a estas espécies; entretanto, pode causar confusão por alusão às hortaliças mais corriqueiramente consumidas (BRASIL, 2010). Outros autores utilizam o termo “não convencionais” para aquelas que não receberam a devida atenção por parte da comunidade científica, econômica e pela sociedade como um todo, resultando em consumo apenas em algumas localidades ou regiões (ALMEIDA et al., 2014).

As hortaliças são plantas herbáceas, geralmente de ciclo curto e tratos cul-

turais intensos e compreendem todos os vegetais cultivados em horta, cujas partes comestíveis são caule, flores, frutos, raízes, sementes frescas e folhas (BRASIL, 2010; PIGOLI, 2012). Classificam-se genericamente em legumes (quando utilizado a fruta ou a sementes), verduras (parte comestível de cor verde), tubérculos e raízes (parte subterrânea das espécies), e bulbos e talos (ORNELLAS, KAJISHIMA, VERRUMA-BERNARDI, 2007; PHILIPPI, 2006).

Hortaliças não convencionais são plantas produzidas geralmente em pequenas proporções, sendo assim limitadas a determinadas localidades ou regiões, e dessa forma sem grande valor comercial, diferentemente das hortaliças convencionais (alface, agrião, entre outras) as quais estão organizadas enquanto cadeia produtiva (DIAS et al., 2005). No conjunto de hortaliças não-convencionais o cultivo é de forma marginal e rudimentar (KINUPP, 2007). As hortaliças não convencionais não necessitam de grandes quantidades de insumos e condições de pré-plantio devido a sua rusticidade, por isso podem ser utilizadas na agricultura familiar como fonte de renda e de diversificação agrícola (VIANA et al., 2015).

Entre as hortaliças não convencionais podemos citar: almeirão-de-árvore (*Cichorium intybus* L.), araruta (*Maranta arundinacea* L.), azedinha (*Rumex acetosa* L.), beldroega (*Portulaca oleracea* L.), bertalha (*Basella alba* L.), capuchinha (*Tropaeolum majus* L.), capiçoba (*Erechtites valerianifolius*), caruru (*Amaranthus* spp.), chicória-do-pará (*Eryngium foetidum* L.), cúbio (*Solanum sessiliflorum* D.), inhame (cará - *Dioscorea* spp.), jacatupé (*Pachirrhizus tuberosus*), jambu (*Acmella oleracea* L.), labaga (*Rumex obtusifolius* L.), mangarito (*Xanthosoma maffaffa*), maria-gorda (*Talinum paniculatum*), maxixe (*Cucumis anguria* L.), maxixe-do-reino (*Cyclanthera pedata* L.), peixinho (*Stachys lanata* L.), serralha (*Sonchus oleraceus* L.), taioba (*Xanthosoma sagittifolium* L.), taro (inhame; *Colocasia esculenta* L.), vinagreiras (*Hibiscus acetosella* L. e *Hibiscus sabdariffa* L.), entre outras, que fizeram e/ou fazem parte da cultura brasileira introduzidas por colonizadores europeus ou por escravos africanos (BRASIL, 2010). Segundo Kinupp e Barros (2008), as frutas e hortaliças não-convencionais geralmente apresentam teores de minerais e proteínas significativamente maiores, além de serem mais ricas em fibras e compostos com funções antioxidantes que as fontes de hortaliças convencionais, favorecendo assim, uma dieta de melhor qualidade nutricional. Esses mesmos autores determinaram os teores de proteínas em 69 hortaliças, mostrando o potencial das cactáceas do gênero *Pereskia* como plantas de conteúdo proteico elevado. A Resolução da Diretoria Co-

legiada (RDC) nº 54 de 2012 (BRASIL, 2012) determina que, para um alimento ser considerado fonte de proteína deverá ter no mínimo 6% de proteína, e se possuir 12% de proteína poderá ser considerado de alto valor proteico. Conforme essa determinação, as folhas secas das plantas do gênero *Pereskia* estudadas apresentaram teor médio de proteínas maior que 14%, e, de acordo com a legislação vigente, podem ser consideradas como alimento de alto valor proteico (BRASIL, 2012).

A carne é uma excelente fonte de proteínas e de aminoácidos (Tabela 1) cuja composição atende as necessidades dietéticas humanas (WILLIAMS, 2007), fornecendo os nove aminoácidos essenciais que os humanos necessitam para seu crescimento e desenvolvimento, sendo eles a fenilalanina, valina, treonina, metionina, leucina, isoleucina, lisina, triptofano e histidina, em proporções aproximadas às necessidades humanas (MACEDO et al, 2008).

Tabela 1 - Composição de aminoácidos de carnes frescas e percentual fornecido por cada 100 g.

Aminoácidos	Bovino	Suínos	Ovinos	Aves
Arginina	13,7	12,2	12,7	12,8
Cistina	2,60	2,60	2,70	2,60
Histidina	7,50	8,90	6,70	6,20
Isoleucina	10,4	9,20	9,70	9,50
Leucina	16,3	14,5	15,0	15,4
Lisina	18,5	19,7	20,3	18,4
Metionina	5,50	5,60	5,30	4,90
Fenilalanina	9,10	7,90	8,00	9,20
Treonina	9,40	8,90	9,70	8,50
Triptofano	2,60	2,30	2,70	2,30
Tirosina	7,80	7,60	7,30	7,20
Valina	10,7	9,90	10,0	9,80

Fonte: Varnam & Sutherland (1995); Philippi (2008).

Contudo, o consumo de carne bovina tem sido desaconselhado devido à sua gordura rica em ácidos graxos saturados e conseqüentemente a problemas que daí possam advir para a saúde do consumidor, tais como aparecimento de várias doenças crônicas, como o câncer e as doenças cardiovasculares (LOPES, 2015).

Segundo o Guia Alimentar para a População Brasileira, desenvolvido pelo

Ministério da Saúde, o consumo de hortaliças contribui para a prevenção da obesidade e das doenças crônicas associadas (BRASIL, 2014; BRASIL, 2015). A busca, por parte dos diversos segmentos da sociedade, pelo consumo de alimentos alternativos tem sido impulsionada pela necessidade de se tentar minimizar os problemas nutricionais da população utilizando-se recursos mais acessíveis a todos (MADRUGA et al., 2004). De acordo com as definições do International Plant Genetic Resources Institute - IPGRI (2006), atual *Bioversity International*, culturas subutilizadas são aquelas que já foram largamente utilizadas e que caíram em desuso devido a fatores agronômicos, genéticos, econômicos, sociais e culturais. Definidas por Eyzaguirrem Padulosi e Hodgkin (1999) como “culturas negligenciadas”, são cultivadas primariamente em seus centros de origem por agricultores familiares. Para ser considerada subutilizada ou negligenciada, uma espécie deve preencher requisitos como necessidade de poucos insumos externos para a sua produção, adaptação à produção orgânica, ser cultivável em áreas marginais, contribuir para a estabilidade dos ecossistemas frágeis, ser integrável ao sistema produtivo dos agricultores familiares, apresentar importância tradicional local ou regional, ser de fácil armazenamento e processamento, e apresentar aptidão de mercado, alto valor nutritivo e/ou medicinal e múltiplos usos (IPGRI, 2006).

Embora o consumo de hortaliças não convencionais seja estimulado pelo governo brasileiro, faz-se necessário assegurar por meio da pesquisa científica o consumo seguro, com informações que revelem as características nutricionais e também antinutricionais, visto que as últimas, embora não sejam tóxicas em si, atuam no organismo impedindo a absorção de nutrientes essenciais para o ser humano (BRASIL, 2010; FIRMO et al., 2011).

De acordo com Santos et al. (2010), entre as várias hortaliças não convencionais que apresentam propriedades terapêuticas, as do gênero *Pereskia*, apresentam uma elevada ação na saúde humana, especialmente no auxílio de tratamento de certos tipos de cânceres e doenças cardiovasculares. Como são plantas de elevado teor nutricional, também têm sido utilizadas como fontes suplementares de alimentação para seres humanos e animais. Na medicina, a grande vantagem da planta é no abrandamento dos processos inflamatórios e como emoliente na recuperação da pele em casos de queimadura (MARINELLI, 2016).

1.2 Ora-pró-nobis – *Pereskia aculeata* Miller

O Brasil está entre os países de maior diversidade biológica do mundo, com cerca de 22% da diversidade mundial (CONSERVAÇÃO INTERNACIONAL, 2011), da qual 56.000 espécies são de plantas superiores, 162 de cactáceas e 123 delas endêmicas (GIULIETTI et al., 2002). Porém, ainda há poucos estudos em relação às plantas brasileiras (KINUPP; BARROS, 2008; KINUPP, 2007). Muitas delas, além de serem utilizadas na alimentação humana são também utilizadas como fitoterápicos (HOLLIS; SCHEINVAR, 1995; DUARTE; HAYASHI, 2005; SILVA JÚNIOR et al., 2010).

A família Cactaceae é representada por 124 gêneros e 1.427 espécies e está dividida em três subfamílias que são: a) Opuntioideae, que apresenta espécies tipo árvore ou arbusto, com folhas suculentas e aréolas axilares com espinhos, divididas em cinco gêneros; b) Pereskioideae, representada pelo gênero *Pereskia*, com hastes não suculentas, folhas grandes, aréolas axilares com espinhos e c) Cactoidae, a mais numerosa, com 91 gêneros, geralmente árvores sem folhas ou com vestígios de folhas e hastes suculentas com aréolas bem desenvolvidas (BARTHLOTT; HUNT, 1993). Edwards e Diaz (2006) referendam ainda uma quarta subfamília, a Maihuenioideae.

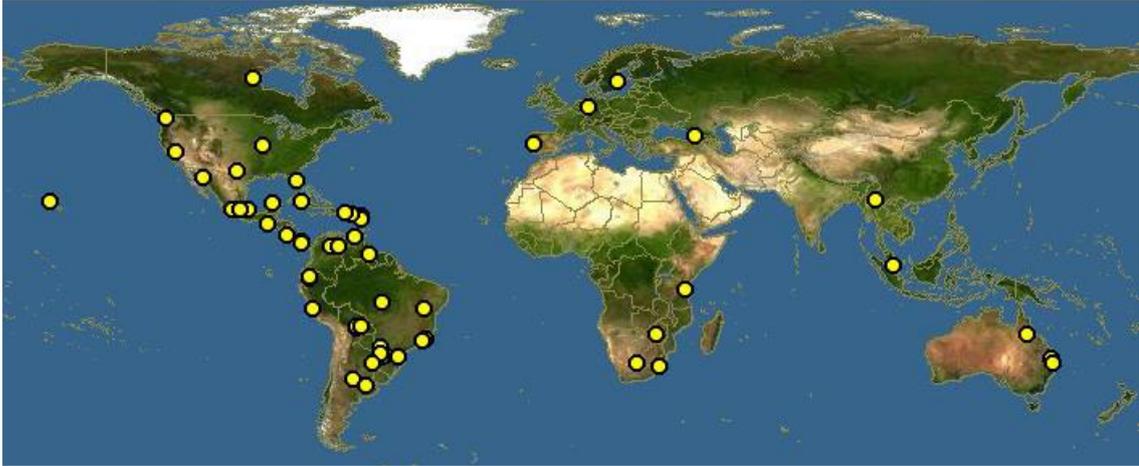
Inicialmente, o gênero *Pereskia* foi descrito como *Peireskia*, por Plumier, em 1703. De acordo com Hollis e Scheinvar (1995), essa designação foi uma homenagem ao cientista francês Nicolas Claude Fabri de Peiresc (1580-1637). Linnaeus usou o nome *Cactus pereskia*, em 1753, mas é atribuído a Miller, em 1754, a elevação do nome para o nível de “gênero”, considerada como primeira classificação válida (BUTTERWORTH; WALLACE, 2005).

No Brasil, a “ora-pro-nóbis” (OPN) é o nome popular dado às variedades comestíveis mais comuns do gênero *Pereskia* - *Pereskia grandifolia* Haworth e *Pereskia aculeata* Miller (CASTRO; SCIO, 2014; EDWARDS; NYFELER; DONOGHUE, 2005; TURRA et al., 2007). O nome indígena é *mori* ou *guaiapá* (tupi-guarani) e significa “planta que produz frutos com muitos espinhos finos”; o termo *aculeata* vem do latim e significa espinho, agulha (ACCORSI; DOSOUTO, 2006). A *Pereskia aculeata* Mill. é encontrada nos documentos oficiais brasileiros desde 2002 e popularmente conhecida como “ora-pro-nóbis” (OPN), que do latim significa “rogai por nós”. No Brasil, além de ser conhecida como ora-pro-nóbis, possui designações populares como: lobrobó, lobrodo, guaiapá, groselha-da-américa, cereja-de-barbados, cipó-

santo, matavelha, trepadeira-limão, espinho-preto, jumbeba, espinho-de-santo-antônio e rosa-madeira.

Ela pertence à classe Magnoliopsida, ordem Caryophyllales, família Cactaceae e gênero *Pereskia* (ALMEIDA; CORRÊA, 2012; ALMEIDA et al., 2014; BRASIL, 2002; BRASIL, 2004; BRASIL, 2010), classificada como exótica por Marchese et al. (2006) e como nativa não endêmica por Zappi et al. (2012). A OPN é uma planta nativa, originária dos trópicos, perene, com caules finos e geralmente se apresenta na forma de trepadeira, podendo atingir dez metros de altura, com ramos longos, espinhos, folhas carnudas e com presença de mucilagem (DUARTE; HAYASHI, 2005; TOFANELLI; RESENDE, 2011), sendo aproveitada em sopas e refogados (QUEIROZ, 2015; ROSA; SOUZA, 2003), bem como em farinhas, saladas, tortas e massas alimentícias como o macarrão (ROCHA et al., 2008). É encontrada no Brasil, do Rio Grande do Sul até o nordeste e cresce em diferentes biomas (CARVALHO et al., 2014; TURRA et al., 2007). Ela também é encontrada nos Estados Unidos (Flórida) (SWIRSK et al., 1997) e no sul da África (MORAN; ZIMMERMANN, 1991). Segundo Almeida Filho e Cambraia (1974) a *Pereskia aculeata* é nativa da América Tropical, mas pode ser encontrada, também, na Índia Oriental (Figura 1).

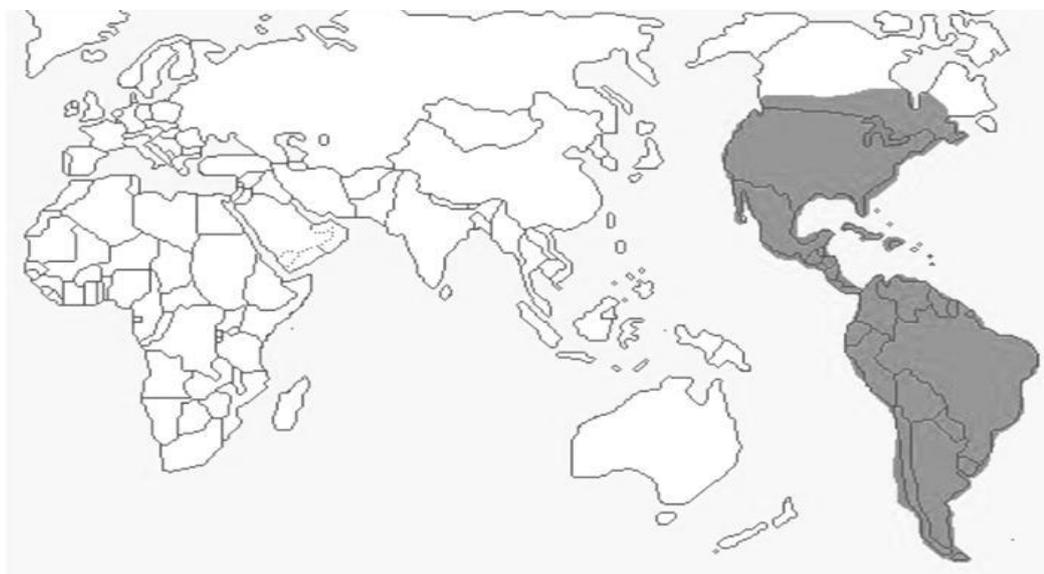
Figura 1. Distribuição geográfica mundial da espécie *Pereskia aculeata* Miller, representada por círculos.



Fonte: Missouri Botanical Garden Database (2015) e Taylor et al. (2015).

Provavelmente, a região noroeste da América do Sul tenha sido o centro original da diversificação e propagação do gênero *Pereskia* (BUTTERWORTH; WALLACE, 2005) e, a partir daí, as cactáceas povoaram desde regiões ligeiramente méxicas do Caribe, América Central e a América do Sul. Isso inclui o norte da Argentina, Costa andina do Peru, oeste do Paraguai e Uruguai e leste do Brasil, embora também sejam encontradas em climas frios e úmidos (Figura 2) (ARIAS; PÉREZ, 2006).

Figura 2. Área sombreada no mapa caracteriza a distribuição geográfica da família Cactaceae no continente americano.



Fonte: Porto (2009).

Na Austrália ela faz parte de uma lista de espécies não nativas consideradas daninhas e de grande potencial para causar danos ambientais, em função da alta quantidade de espinhos e capacidade de crescimento, com formação de moitas densas, não obstante haja o conhecimento declarado de planta com alto valor nutritivo e medicinal (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2003).

A OPN é uma planta de fácil cultivo, resistente a seca e adapta-se aos diversos tipos de solos, não sendo exigente em fertilidade (BRASIL, 2010). *Pereskia aculeata* Miller é uma trepadeira arbustiva (Figura 3 A), caules sublenhosos ou lenhosos, com ramos longos e espinhos na axila das folhas elípticas e carnosas considerada detentora do maior número de caracteres primitivos da família Cactaceae. As folhas da ora-pro-nobis são carnudas e mucilaginosas, forma elíptica e simétrica, com cerca de 7 cm de comprimento e 3 cm de largura (Figura 3 B) (DUARTE; HAYASHI, 2005). Seu pecíolo é curto, agrupando-se de duas a seis folhas em ramos laterais, contendo espinhos em seu caule sublenhoso (Figura 3 C), (TOFANELLI; RESENDE, 2011). As flores são de coloração branca, com miolo alaranjado (Figura 3 D) e odor atraente, dessa forma atraem abelhas (Figura 3 E), as quais têm papel fundamental, com função de espalhar o pólen abundante proveniente das flores da *P. aculeata* Miller. Tanto as folhas como as flores da *P. aculeata* Miller são comestíveis (VARGAS, 2017). As flores possuem cerca de 4 cm de diâ-

metro e seus receptáculos possuem de 6 a 8 bractéolas foliares que aparecem nos frutos, mas quando estes amadurecem, elas caem (ROSA; SOUZA, 2003). O período em que essas permanecem abertas é rápido, cerca de um dia (BOKE, 1966), da manhã ao entardecer.

Por ser uma planta trepadeira, seu caule é do tipo ereto na fase jovem e rasteiro na fase adulta. Possui espinhos agrupados entre si presentes no tronco de forma alongada e finos; nos ramos os espinhos são curtos, recurvados e geralmente aos pares e voltados para baixo. Também pode haver nas axilas das folhas espinhos solitários ou agrupados em três (DUARTE; HAYASHI, 2005), no entanto, esses arranjos são raros. Os frutos podem ainda apresentar formato arredondado, oval ou piriforme, de coloração verde-amarelado, amarelo-alaranjado ou avermelhado (Figura 3 F) (BRASIL, 2010; MORTON, 1987). Os frutos também apresentam acúleos (ROSA; SOUZA, 2003).

Figura 3. Ora-pro-nóbis, *Pereskia aculeata* Miller: trepadeira (A), folhas (B), espinhos (C), flor (D), flor (E) e fruto (F).



Fonte: A, B, C, D e E: Autora; F: Shaman Australis.

Devido aos elevados teores de proteínas apresentados pelas cactáceas do gênero *Pereskia*, essa planta é denominada "carne de pobre" (ROCHA et al., 2008), pois já foi identificado na *Pereskia aculeata* Mill. alto conteúdo proteico, variando de 17,40% para 28,59% em suas folhas (ALMEIDA et al., 2014, ROCHA et al., 2008, TAKEITI et al., 2009). Almeida et al. (2014) e Rocha et al. (2008) em estudos com folhas de OPN secas, relataram também elevados teores de fibras e minerais, em destaque ao cálcio (3.800 mg.100 g⁻¹) e ferro (28,12 mg.100 g⁻¹).

As folhas dessas cactáceas podem ser consumidas *in natura*, processadas ou adicionadas à preparados cozidos e assados (ALMEIDA; CORRÊA, 2012; MARTINEVSKI et al., 2013). Entretanto, ainda que utilizada tradicionalmente na alimentação humana, pouco é conhecido sobre a inocuidade dessa planta (SOUZA et al., 2009). Além de serem consumidas como hortaliças e do potencial para a exploração agrícola nutricional, constituem importante influência em culturas locais. A OPN é consumida por algumas comunidades tanto rurais quanto urbanas e contribuem para complementar a alimentação, inclusive com redução de custos e aprimoramento da economia familiar (ALMEIDA; CORREA, 2012).

A OPN ainda apresenta um número limitado de estudos, como a maioria das hortaliças não convencionais, não sendo conhecidas cientificamente suas propriedades. Por isso, faz-se necessário o conhecimento técnico sobre os componentes químicos e suas atividades biológicas (KINUPP, 2006; SOUZA et al., 2009).

1.1.1 *Pereskia aculeata* Miller e atividade biológica

Há muito tempo acredita-se que o consumo de vegetais auxilie na prevenção de doenças e numerosos estudos têm demonstrado que a ingestão adequada de vegetais está associada à redução do risco de desenvolvimento de obesidade, diabetes, problemas cardiovasculares, hipertensão, osteoporose, câncer e da redução da morbimortalidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

O Brasil possui um biota com grande diversidade de espécies. Entre elas encontram-se muitas com potencial para serem usadas como alimento, suprimindo necessidades nutricionais humanas e também podendo agir como medicamentos fitoterápicos para isolamento de princípios ativos e tratamento de doenças (FIRMO et al., 2011). Segundo Filho (2010), essa diversidade da flora brasileira apresenta uma das mais ricas fontes de substâncias naturais com potencial químico e metabó-

licos.

Os metabólitos têm suas atividades investigadas desde a Grécia antiga na experimentação *in vivo* com diferentes plantas (PAVARINI et al., 2012). Muitos fármacos importantes são provenientes de produtos naturais ou tem estes como protótipo, considerando a quase infinita diversidade e complexidade de estruturas moleculares que a natureza fornece (YUNES; CECHINEL FILHO, 2012). As aplicações desses metabólitos para o ser humano são variadas, pois podem agir como agentes antibacterianos, antifúngicos, redutores do colesterol, imunossupressores, antiparasitários, herbicidas, entre outros (VAISHNAV; DEMAIN, 2010).

Mesmo sendo pouco estudada, sabe-se que a OPN apresenta, em média, 20% de teor proteico e 85% de digestibilidade, além de elevados valores de aminoácidos essenciais, destacando-se a lisina, leucina e valina, podendo apresentar ação no tratamento e prevenção de patologias relacionadas a deficiências proteicas (ROCHA et al., 2008; MAZIA, 2012) e suas folhas não apresentam relatos de toxicidade (SANTOS et al., 2011). Por serem plantas de alto teor nutricional têm sido utilizadas como fontes suplementares de alimentação para seres humanos e animais. Somado a isso, estudos preliminares demonstram grandes possibilidades destas plantas virem a serem aproveitadas como agentes medicinais, sob diversas formas de aplicação (TAN et al., 2004).

De acordo com Couto (2006), a OPN é também considerada planta de uso medicinal. Cientificamente, extratos aquosos e/ou alcóolicos de folhas, caules ou raízes têm sido testados e inseridos em formulações terapêuticas, para ações antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, analgésicas, dermatológicas, cicatrizante, tripanocida e antioxidante (ROYO et al., 2005; VALENTE et al., 2007; KINUPP; BARROS, 2008; OLIVEIRA, 2008; BARROS et al., 2009; SARTOR et al., 2010). Segundo Almeida e Corrêa (2012), o uso de OPN está associada principalmente ao tratamento de anemia, câncer, cicatrização, osteoporose e à constipação intestinal (ALMEIDA; CORRÊA, 2012). Noelli (1998) relata o uso da casca da OPN como adstringente pelos índios Guaranis e Champs et al. (2003) relatam seu uso popular para tratamento de feridas. Outros levantamentos etnofarmacológicos revelam seu uso como forma de combate à anemia (DAMASCENO; BARBOSA, 2008).

O governo brasileiro tem promovido ações para o desenvolvimento do setor que envolve a pesquisa e a produção de plantas medicinais, a partir da publicação do decreto 5.813 de 22 de junho de 2006, criando a Política Nacional de Plantas

Medicinais e Fitoterápicos. As diretrizes estão definidas por meio do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2007), sendo assim, faz-se necessária a identificação de compostos bioativos presentes em plantas medicinais, como *Pereskia aculeata* Miller.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi isolar e extrair proteínas e peptídeos de *Pereskia aculeata* Miller com possíveis atividades biológicas.

2.2 Objetivos específicos

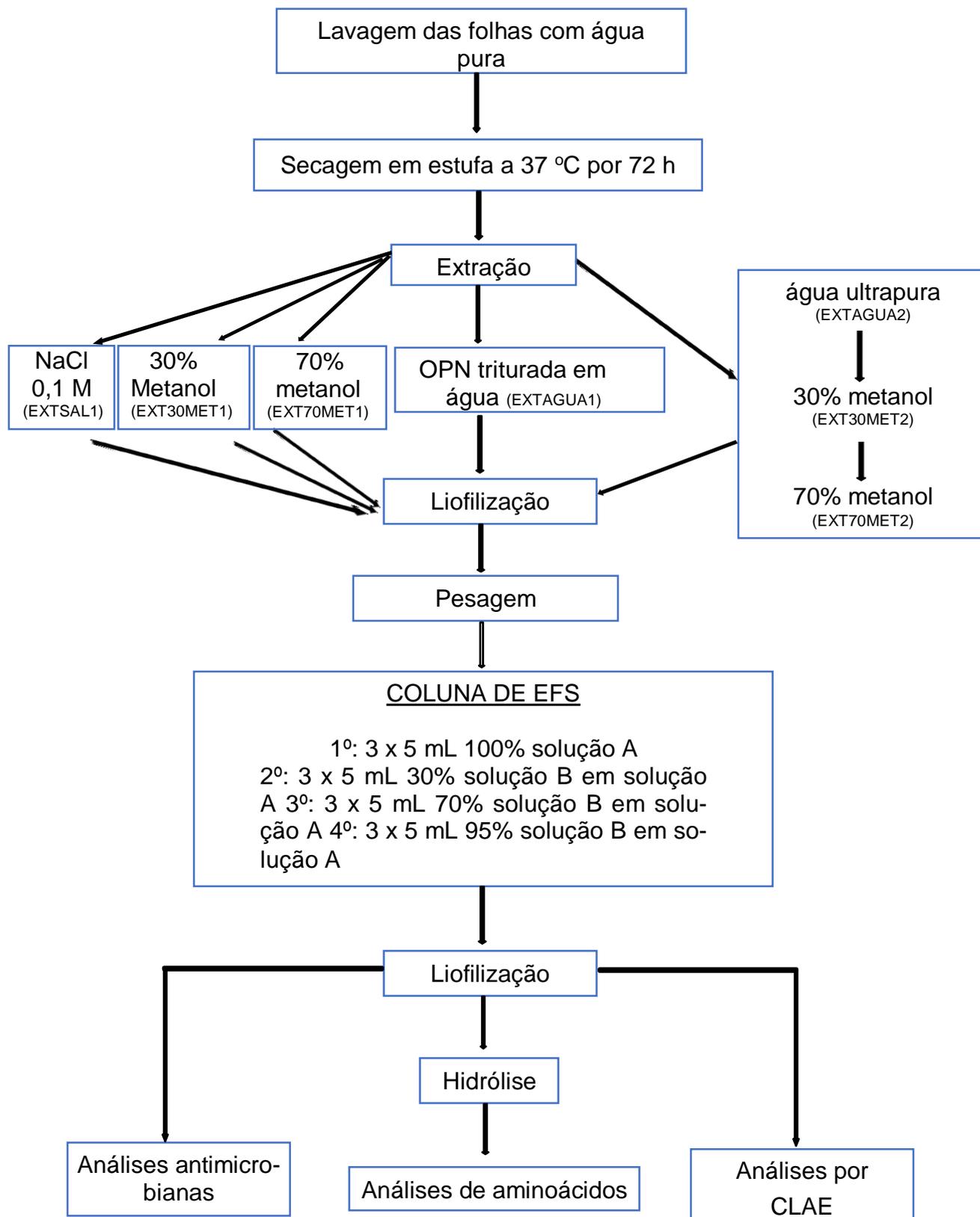
- Desenvolver um método simplificado de extração de proteínas e peptídeos;
- Analisar o teor e composição de aminoácidos por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência);
- Avaliações antibacterianas e antifúngicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais de extração e análise das frações obtidas foram realizados no Laboratório de Síntese e Estudos de Biomoléculas (LaSEBio) do Instituto de Química da UNESP - Araraquara sob orientação do Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli. Os ensaios antibacterianos foram realizados no laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular do Instituto de Física da USP – São Carlos, campus II, sob orientação da Profa. Dra. Ilana L. B. C. Camargo. Os ensaios antifúngicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/SP - USP, sob orientação do Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães.

A Figura 4 descreve, simplificada, os procedimentos realizados.

Figura 4. Fluxograma simplificado dos experimentos realizados neste trabalho



Fonte: Autora.

3.1 Coleta e processamento das folhas de OPN

As folhas de *Pereskia aculeata* Miller foram fornecidas por um pequeno agricultor da região de Alfenas, MG; localizada a 21° 25' 45" de latitude S e 45° 56' 50" de longitude W. O clima da região é subtropical úmido, quente e temperado (KOTTEK et al., 2006). A temperatura média anual em Alfenas é de 20,2 °C e a pluviosidade média anual é 1.516 mm.

A colheita das folhas ocorreu entre outubro de 2016 e abril de 2017, sendo acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer. Posteriormente, as folhas foram descongeladas e lavadas com água ultrapura. Seguidamente, foram desidratadas em estufa a 37 °C por 72 h. Após a secagem as folhas de OPN foram trituradas manualmente com o auxílio de almofariz e pistilo.

A exsicata da planta foi registrada no Herbário SPFR (Herbário do Departamento de Biologia da FFCLRP - USP, Ribeirão Preto – SP) sob o número 17.155.

Vários protocolos de extração foram utilizados, como descritos a seguir.

3.2 Obtenção de extratos

3.2.1 Extração de OPN triturada em água pura.

Inicialmente, as folhas secas foram maceradas em água com auxílio de almofariz e pistilo por aproximadamente 20 min, na proporção de 1:20 (m/v).

O extrato obtido foi filtrado a vácuo, liofilizado e armazenado em freezer para análises posteriores (EXTAGUA1). O material retido no filtro, denominado sedimentado, foi armazenado em freezer para análises posteriores.

3.2.2 Extração salina e hidroalcoólicas

Para obtenção dos extratos, as folhas secas foram maceradas com auxílio de almofariz e pistilo por aproximadamente 20 min, e o material obtido foi submetido a diferentes soluções.

A extração salina foi realizada por maceração utilizando solução de NaCl 0,1 M na proporção de 1:20 (m/v; EXTSAL1). Para extração com solução hidroalcoólica, outras amostras de folhas secas e trituradas foram utilizadas na proporção de 1:20

(m/v). As soluções hidroalcoólicas utilizadas para maceração continham 30% metanol (EXT30MET1) e 70% metanol (EXT70MET1) em água ultrapura.

Os extratos obtidos foram filtrados a vácuo, liofilizados e armazenados em freezer para análises posteriores. O material retido no filtro, denominado sedimentado, foi armazenado em freezer para análises posteriores.

3.2.3 Extrações aquosa e hidroalcoólicas sequenciais

Em outro procedimento, o material triturado foi submetido a extrações com soluções aquosa e hidroalcoólicas de modo sequencial. Inicialmente 5 g de folhas trituradas foram acondicionadas em frasco Erlenmeyer e extraídas com 40 mL de água ultrapura, em mesa agitadora, durante 10 min a 130 rpm.

O sobrenadante foi filtrado à vácuo e o material sólido, retido no filtro, era retornado ao frasco Erlenmeyer. O processo foi repetido nove vezes. Após a décima extração aquosa, o extrato líquido foi transferido para tubos falcon e em seguida liofilizados para as extrações posteriores (EXTAGUA2).

A parte sólida retida no filtro passou por extrações com soluções hidroalcoólicas contendo 30% metanol (EXT30MET2) e em seguida 70% de metanol (EXT70MET2), repetindo o mesmo processo descrito anteriormente. Os extratos hidroalcoólicos foram concentrados em rota- evaporadores e posteriormente liofilizados. O material retido no filtro, denominado sedimentado, foi armazenado em freezer para análises posteriores.

3.3 Quantificação proteica

Para a quantificação proteica foi utilizado o método descrito por Bradford (1976), utilizando o reagente de Bradford (Sigma®). A curva padrão foi obtida utilizando Albumina Soro Bovino (BSA) em concentrações de 1,05 µg/mL a 16,9 µg/mL.

3.4 Fracionamento em coluna de EFS (Extração de Fase Sólida)

Na tentativa de identificar frações de peptídeos/compostos com diferentes polaridades, foram utilizadas colunas de EFS de acordo com o protocolo colocado na Figura 5.

Para o experimento foi utilizado cartucho do tipo C18 com 500 mg de resina. Os extratos (água ultrapura, 30% de metanol, 70% de metanol e NaCl 0,1 M) foram ressuspensos em 0,045% de ácido trifluoracético – TFA em água (solução A) e levados ao Vortex, por 1 min; em seguida foram submetidos ao banho de ultrassom por 1 min e centrifugados. Posteriormente foram eluídos na coluna de EFS conforme o procedimento abaixo:

1º - aplicação na coluna e lavagem com 3 volumes de 5 mL de solução A;

2º - a coluna foi lavada com 3 volumes de 5 mL de solução contendo 30% de solução com 0,036% TFA em acetonitrila (solução B) e 70% de solução A;

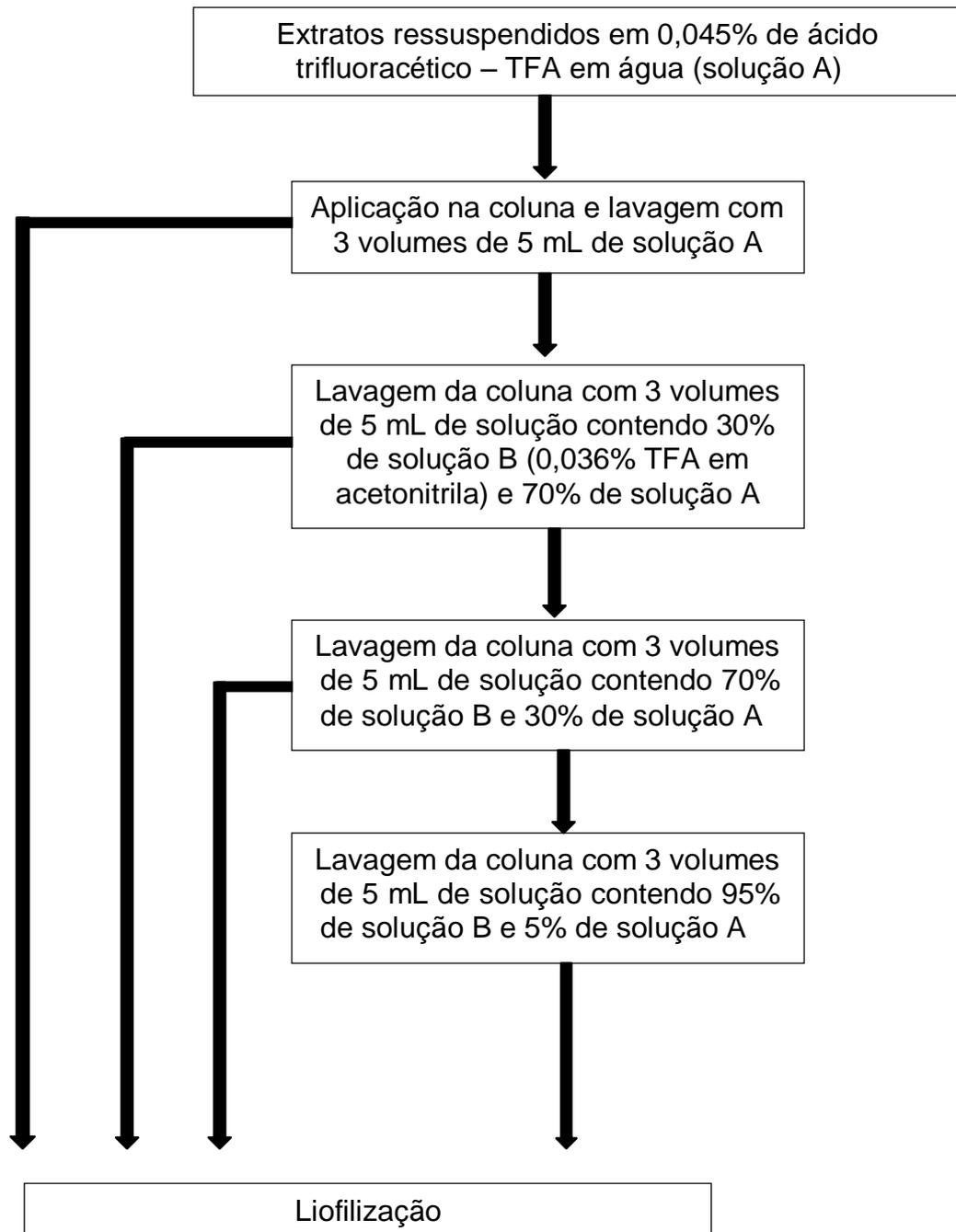
3º - a coluna foi lavada com 3 volumes de 5 mL de solução contendo 70% de solução B e 30% de solução A.

4º - a coluna foi lavada com 3 volumes de 5 mL de 95% de solução B e 5% de solução A.

Todas as frações foram recolhidas e acondicionadas em frascos de cintilação, liofilizadas e armazenadas em freezer, para posterior análise.

As frações obtidas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Figura 5. Fluxograma de fracionamento em coluna de EFS.



Fonte: Autora.

3.5 Hidrólise

3.5.1 Hidrólise dos extratos salino e hidroalcoólicos

As amostras obtidas anteriormente também foram avaliadas em relação ao teor e composição de aminoácidos. Para isso, aproximadamente 1 mg das frações obtidas por EFS foram submetidas a solução de HCl - 6 M (1 mL) e fenol 5% em água (50 µL) a 110 °C por 48 h, após borbulhamento de nitrogênio gasoso por 1 min. Após o período de incubação, as amostras foram submetidas ao speedvac por 16 h, para retirada do solvente.

3.5.2 Hidrólise parcial da amostra triturada e sedimentada

Visando a obtenção de peptídeos do material extraído, realizou-se a hidrólise parcial das proteínas existentes. Para isso foram tomadas alíquotas de aproximadamente 0,5 g da amostra triturada e sedimentada, em dois tubos de ensaio. Essas foram submetidas a solução de ácido clorídrico (HCl) 1 M (5 mL), e após borbulhamento de nitrogênio gasoso por 1 min, foram incubadas na estufa à 65 °C, retirando-se 100 µL de solução após 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h. Na alíquota retirada foi adicionado 100 µL de NaOH (1 M) com posterior diluição com 2,8 mL de 70% solução B em cada tubo. A solução obtida foi eluída na coluna de extração em fase sólida (EFS), filtradas em membrana e analisadas por CLAE.

3.6 Análises por CLAE dos extratos salino, hidroalcoólicos e aquoso

3.6.1 Análise das frações obtidas por EFS, modo analítico

Para as avaliações das frações obtidas por EFS foi utilizada a técnica de CLAE com uma coluna C18 de diâmetro com partícula de 5 µm (150 mm X 4,6 mm). O gradiente utilizado foi de 5 a 95% de solução B em 30 minutos, sendo solução A (água + 0,045% TFA) e solução B (acetonitrila + 0,036% TFA). A detecção foi realizada nos comprimentos de ondas de 220 nm e 280 nm.

3.6.2 Purificação das frações obtidas por EFS, modo semipreparativo

Para purificação das frações obtidas por EFS foi utilizada a técnica de CLAE com uma coluna C12 Jupiter Proteo de diâmetro com partícula de 10 µm (250 mm X

10 mm). O gradiente utilizado foi de 5 a 45% de solução B em 120 min, sendo solução A (água + 0,045% TFA) e solução B (acetonitrila + 0,036% TFA). Para detecção, o comprimento de onda utilizado foi de 220 nm.

3.6.3 Análise dos aminoácidos

As amostras que sofreram hidrólise ácida, foram solubilizadas em 500 µL de solução de 0,2 M de citrato de sódio (pH 2,2) e filtradas em unidade filtrante GV Millex - Millipore antes de serem injetadas no aparelho - alíquota de 10 µL.

As análises de aminoácidos foram efetuadas pelo método da derivatização pós-coluna por orto-ftalaldeído (OPA) em um analisador automático Shimadzu LC-10A/C-47A. A coluna de separação utilizada foi a Shim-Pack Amino-NA. A detecção ocorreu por fluorescência em comprimento de onda de excitação de 350 nm e de emissão em 450 nm. O sistema foi calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos (1000 nmol.mL⁻¹), obtendo-se um valor para o tempo de saída de cada aminoácido e o fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração da amostra.

3.7 Ensaios antimicrobianos

3.7.1 Antibacterianos

A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada frente aos microrganismos *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Enterococcus faecium* (VRE16), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Acinetobacter baumannii* (ACI50).

3.7.1.1 Preparação das amostras para avaliação antibacteriana

As bactérias foram semeadas por método de esgotamento em placas de Brain Heart Infusion (BHI) Ágar e incubadas em estufa à 37°C por 24 h. Após a incubação, o caldo de bactérias foi preparado, selecionando uma bactéria isolada da placa e inoculando em 10 mL de meio BHI. O caldo foi incubado em estufa a 37°C de 16 a 18 h, de modo que as bactérias se encontrem em fase 'log' de crescimento para o experimento. Uma solução estoque 100x concentrada das amostras foram

obtidas por diluição em água. Posteriormente a solução estoque foi diluída 1:100 em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado (MHCA) segundo o Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013). A partir disso, o extrato bruto e as frações obtidas, 100% de solução A e 30% de solução B, da extração água foram testadas em 512 µg/mL, segundo o CLSI (2013), ou na maior concentração em que foi possível dissolver o composto sem que houvesse precipitação.

Para o controle negativo e controle positivo foram adicionados caldo Mueller Hinton Cátion ajustado 1% DMSO. O controle negativo corresponde ao meio de cultura sem a adição da bactéria e composto, permanecendo estéril; já o controle positivo refere-se ao controle de crescimento das bactérias, correspondendo ao meio de cultura com a adição das bactérias, sem o composto. As bactérias foram então ajustadas em solução salina no Densimat até a escala de 0,5 Mc Farland (equivalente a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Um volume de 200 µL desta solução ajustada foram adicionadas a 1,8 mL de meio MHCA. Desta solução, 5 µL foram adicionados a cada poço, da microplaca de 96 poços.

A incubação foi feita a 37°C e a leitura visual dos resultados após 24 h. Os testes foram realizados em duplicatas.

3.7.2 Antifúngicos

A avaliação da atividade antifúngica *in vitro* foi realizada frente aos microrganismos *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus niger*.

3.7.2.1 Preparação das amostras para avaliação antifúngica

Para avaliação da atividade antifúngica também foi realizada pela técnica de difusão em ágar seguindo a metodologia descrita por Farag e colaboradores (2016). As amostras de extrato bruto de OPN e as extrações aquosas fracionadas, 100% solução A e 30% solução B, foram liofilizadas. Após liofilização, 200 mg de cada amostra foi solubilizada em 1 mL água esterilizada, originando uma solução na concentração 200 mg/mL. Como controle da inibição de crescimento foi utilizada solução de miconazol na concentração de 500 µg/mL. A suspensão de esporos, na concentração de 1×10^4 esporos/mL, dos fungos *Aspergillus sp* foram espalhados, com

auxílio da alça de drigalski, em placas de Petri contendo meio BDA (Batata – Dextrose – Ágar), onde poços de 0,5 cm de diâmetro por 0,5 cm de profundidade foram perfurados nos meios com auxílio de ponteiros autoclavados e 100 µL das amostras e 70 µL do antifúngico controle foram aplicadas em diferentes poços nas placas. As placas foram incubadas a 30°C por 48 h. A avaliação foi feita pelo halo de inibição. Os testes foram realizados em duplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quantificação proteica

Para verificar o teor de proteínas da OPN, as diferentes frações obtidas foram avaliadas em relação ao teor de proteína ($\mu\text{g}/\text{mg}$) pelo método de Bradford e estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Teor proteico das amostras.

EXTRAÇÃO	PROTEÍNA	
	($\mu\text{g}/\text{mg}$ de material)	(%)
OPN Triturada (EXTAGUA1)	48 \pm 0,13	4,8
NaCl 0,1 M (EXTSAL1)	46 \pm 0,37	4,6
30% Metanol (EXT30MET1)	70 \pm 0,33	7,0
70% Metanol (EXT70MET1)	45 \pm 0,34	4,5
Aquosa* (EXTAGUA2)	91 \pm 0,42	9,1
30% Metanol* (EXT30MET2)	47 \pm 0,12	4,7
70% Metanol* (EXT70MET2)	32 \pm 0,60	3,2

* extração sequencial.

Fonte: Autora.

Para a OPN triturada em água (EXTAGUA1), cujas folhas foram previamente desidratadas, a porcentagem de proteína foi de 4,8%. Esse valor aumenta para a extração aquosa após liofilização - 9,1% de proteína. A extração salina, em NaCl 0,1 M, resultou em 4,6 % de proteína, mostrando que a presença de sal (aumento da força iônica) diminui a extração proteica. Já na extração hidroalcoólica, utilizando 30% de metanol, o teor proteico foi de 7% de proteína; diminuindo para 4,5% em 70% de metanol. Os dados obtidos foram diferentes dos reportados na literatura, visto que Rodrigues (2016) determinou 15,71% de teor de proteína bruta de *Pereskia aculeata* Miller utilizando solução hidroalcoólica com 70% de etanol (v/v). Rocha et

al. (2008) obtiveram 22,9% de proteína bruta em folhas desidratadas; já os autores Takeiti et al. (2009), por meio do método de Kjeldhal, obtiveram 28,4% de proteínas em folhas frescas. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que o cálculo utilizado neste trabalho usa somente proteínas solúveis devido a limitação do método, enquanto os demais métodos consideram o teor total de proteínas. Além do que, essas diferenças nos teores de proteínas podem estar relacionadas a vários fatores, tais como idade fisiológica e origem botânica da planta (SOUSA, 2014).

Para confirmar a colocação acima, foi realizado a análise de aminoácidos do hidrolisado do material seco obtido. Os valores obtidos foram de 32,6% e 22,8%, os quais serão discutidos no item 4.3 (Tabela 4, página 59) mostrando que, independente do material estudado, o teor proteico se mantém acima de 20%. Esse dado será melhor discutido posteriormente. Somado a isso, o teor de aminoácido essenciais (fenilalanina, valina, leucina, isoleucina, treonina, metionina, lisina) foi de elevado em relação ao total da OPN. O triptofano não foi determinado, pois é degradado durante a hidrólise. Além de apresentar alto teor proteico, a OPN também possui 85% de digestibilidade (MAZIA, 2012), podendo-se sugerir aplicação farmacológica (FAHEY, 2005) no tratamento e prevenção de patologias relacionadas a deficiências proteicas (MAZIA, 2012; ROCHA et al., 2008). Comparando o teor de proteína na matéria seca de 4,2% descrito para o feijão cozido (TACO, 2011), a farinha desta cactácea apresenta aproximadamente 5 vezes mais - 23% (ROCHA et al., 2008; Silva et al. 2006). Como alguns grupos populacionais ainda apresentam dieta com acesso limitado às proteínas animais, o consumo de fontes vegetais ricas em proteínas e de alto valor biológico, como a OPN, poderá prevenir ou tratar carências nutricionais relacionadas a este nutriente (QUEIROZ et al., 2011). A Dose Diária Recomendada (DDR) para o consumo de proteínas na dieta está atualmente fixada em 50 gramas por dia para um adulto normal, sendo que o seu valor para ser calculada é cerca de 0,75 gramas por quilo de peso corporal, por dia (YOUNG; PELLETT, 1994).

Quando observamos os resultados da extração sequencial, podemos observar menor valor de proteínas. Esse resultado é o esperado, pois algumas proteínas já foram extraídas no solvente anterior, diminuindo o valor obtido.

4.2 Filtração em coluna de EFS (Extração de Fase Sólida)

Visando a obtenção de frações proteicas da OPN, foi utilizada a extração em fase sólida (EFS). A EFS é uma técnica de separação líquido-sólido extensamente usada para extrair analitos de amostras líquidas, mas também pode ser usada para amostras sólidas pré-extraídas com solventes (NOVÁKOVÁ; LCKOVÁ, 2009). Segundo Lanças (2004), a EFS, na sua forma mais comum, emprega fases sólidas também denominadas de sorventes, recheadas em cartuchos, nas formas de barril ou seringa, e os mecanismos de retenção são similares àqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna.

Esta etapa além de poder ser considerada uma etapa de purificação, garante a longevidade das colunas utilizadas na CLAE, evitando limpezas constantes no sistema de injeção (LANÇAS, 2004) e a contaminação das colunas. Segundo Hernández-Borges et al. (2007), a filtração utilizando EFS apresenta vantagens, pois há um menor consumo de solvente orgânico, não há formação de emulsões, é de fácil manuseio, apresenta altas porcentagens de recuperação do analito, produz volume reduzido de resíduos tóxicos e aumenta a concentração do analito. Porém a desvantagem está nos altos custos dos cartuchos, podendo ser utilizados apenas uma única vez (NOVÁKOVÁ; LCKOVÁ, 2009).

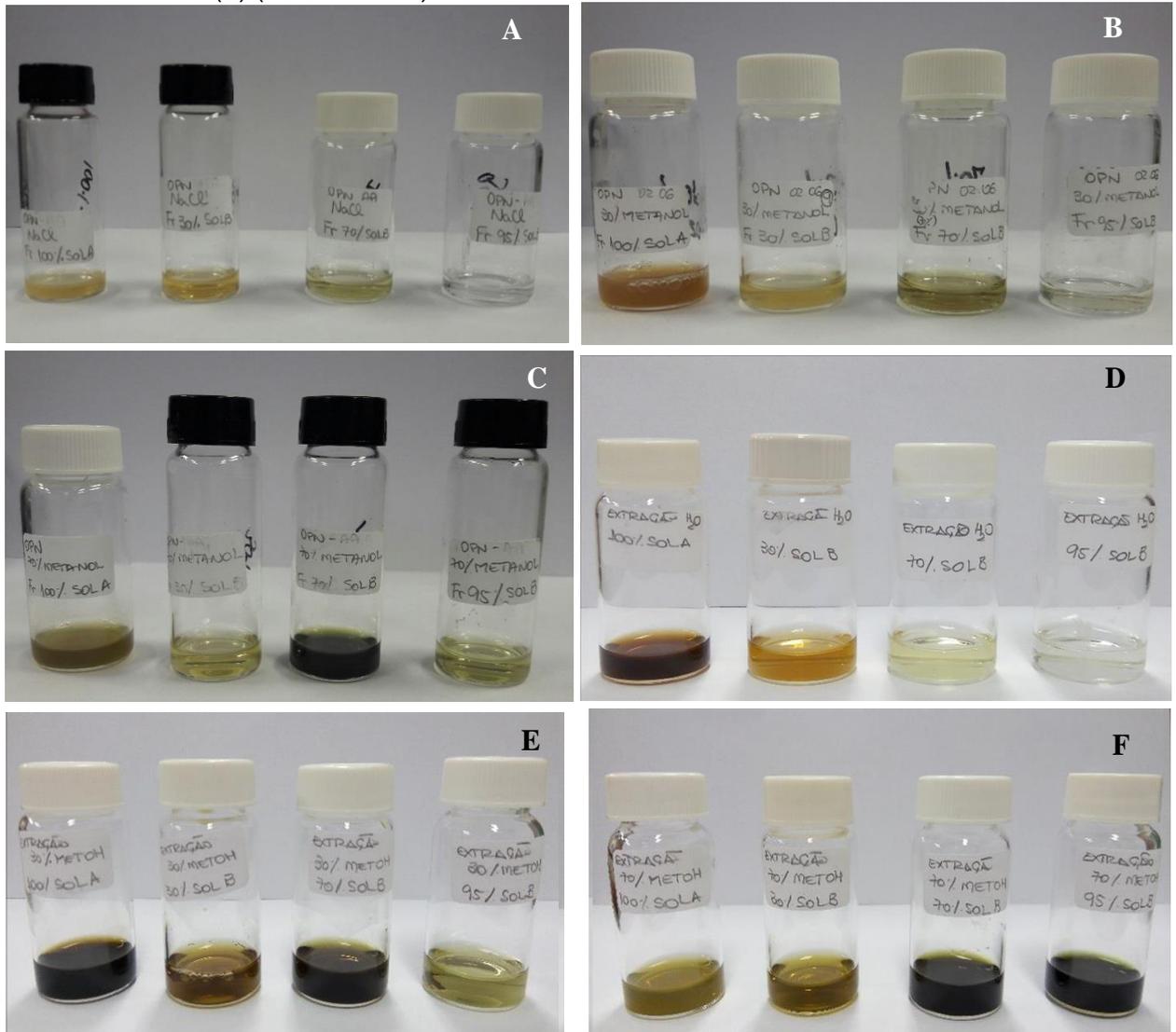
Segundo Jardim (2010), os procedimentos de extração em fase sólida contêm quatro etapas: 1) condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças de eluição da amostra; 2) introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; 3) limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito, etapa esta conhecida como lavagem com solvente ou *clean-up*; 4) eluição do analito.

Esta técnica simples já foi utilizada anteriormente no LaSeBio e se mostrou eficiente no isolamento de peptídeos cíclicos (ALTEI, et al., 2014; FERREIRA, et al., 2015). Neste trabalho, utilizou-se esta metodologia relativamente nova para isolamento de peptídeos em planta em substituições as demoradas colunas de separação de sílica, colunas de permeação em gel, etc.

As soluções resultantes do processo de extração em fase sólida após liofilização e dissolução em 1 mL das respectivas soluções estão apresentadas na Figura 6. Para Jardim (2010), os extratos de planta requerem um método de preparo adequado, já que apresenta uma matriz complexa, com muitos interferentes, além do que os

analitos se encontram em baixas concentrações; para isso é necessário preparo prévio da amostra, cujos objetivos principais estão envolvidos com a concentração dos analitos de interesse e a remoção do máximo dos interferentes.

Figura 6. Eluatos obtidos após aplicação em coluna de EFS* das extrações com NaCl 0,1 M (A) (EXTSAL1), com 30% de metanol (B) (EXT30MET1), com 70% de metanol (C) (EXT70MET1), aquosa (D) (EXTAGUA2) seguida de 30% de metanol (E) (EXT30MET2) e 70% de metanol (F) (EXT70MET2).



*Leitura de cada imagem feita da esquerda para direita: 100% de solução A, 30% de solução B, 70% da solução B e 95% da solução B.

Fonte: Autora.

A cor da solução obtida da eluição da extração de 70% metanol (EXT70MET2) com 70% e 95% de solução B, sugere um arraste maior de pigmentos (Figura 6C, 6E e 6F), sugerindo principalmente a presença de clorofila. Outras frações também mostraram alto teor de pigmentos pela coloração, principalmente as

extraídas com solventes mais apolares.

As massas obtidas após liofilização, partindo de 400 mg de massa de OPN, extraída em coluna de EFS, estão apresentadas na Tabela 3. Estes dados mostram que, os materiais mais polares estão em maior quantidade; e, de maneira geral, a fração de 95% de solução B apresentou menor quantidade de componentes, visto a menor massa obtida.

Tabela 3. Massas (mg) das respectivas extrações após EFS e liofilização.

EXTRAÇÃO	NaCl (EXTSAL1)	30% Metanol (EXT30MET1)	70% Metanol (EXT70MET1)	H ₂ O* (EXTAGUA2)	30% Metanol* (EXT30MET2)	70% Metanol* (EXT70MET2)
EFS						
100% Solução A	35 ± 2	36 ± 5	20 ± 8	210 ± 23	27 ± 6	11 ± 2
30% Solução B	3 ± 1	4 ± 2	2 ± 1	8 ± 3	2 ± 1	1 ± 0,03
70% Solução B	1 ± 0,2	3 ± 1	2 ± 1	0,1 ± 0,001	1 ± 0,5	0
95% Solução B	0	2 ± 1	3 ± 1	0	0	0
Σ (massas)	39 ± 3,2	45 ± 9	27 ± 11	218,1 ± 26	30 ± 7,5	12 ± 2,03

*extração sequencial.

Fonte: Autora.

A extração aquosa sem a presença de sal apresentou o maior rendimento em massa na extração com 100% de solvente A. No entanto, como esperado, ocorreu diminuição na massa das demais frações sequenciais, quando comparada com a extração direta do extrato.

4.3 Análises cromatográficas dos extratos fracionados por EFS e perfil de aminoácidos por CLAE

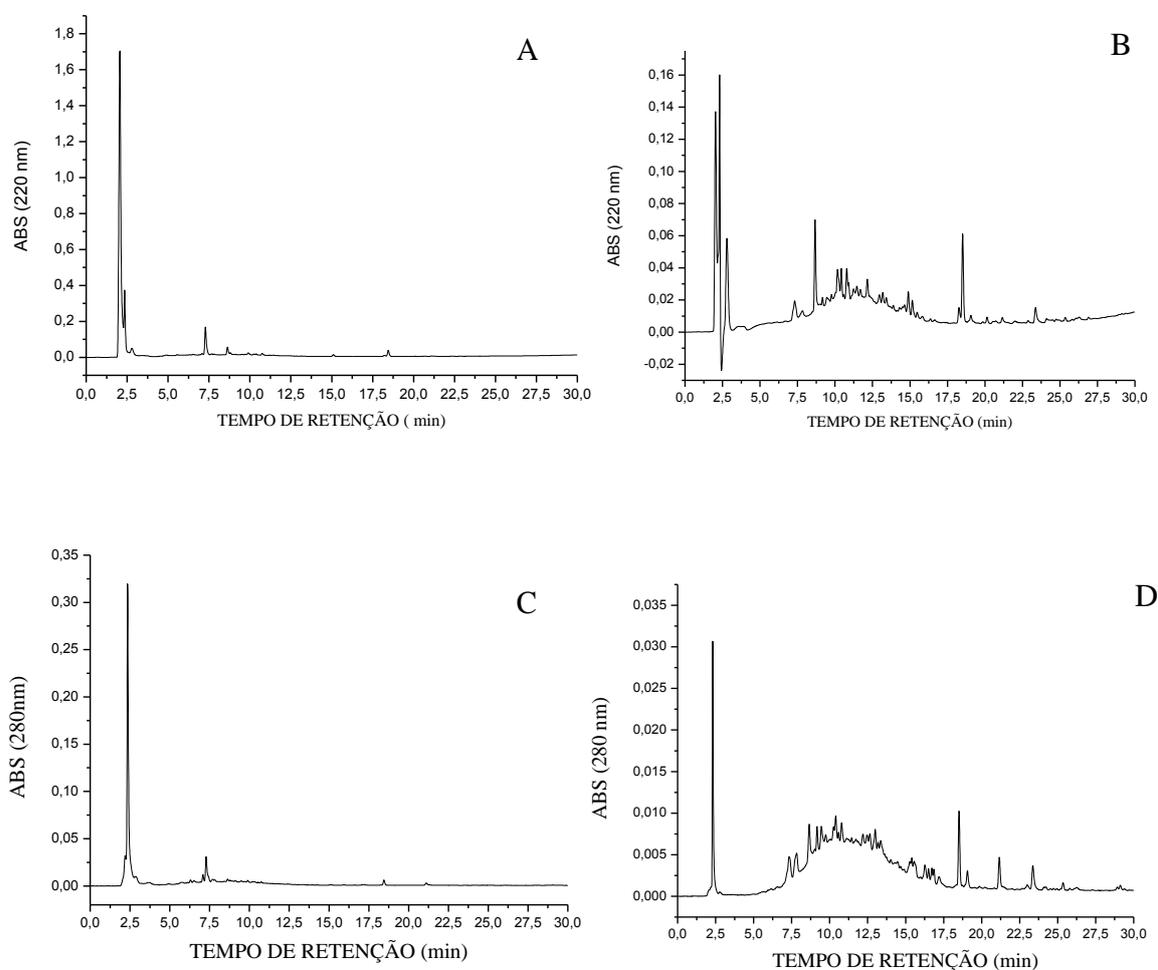
A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência consiste em um método analítico cuja principal finalidade é a separação, identificação e quantificação de diferentes substâncias químicas presentes em uma amostra, por meio de um mecanismo de interação seletiva entre as moléculas do soluto e as duas fases, uma estacionária e outra móvel (NELSON e COX, 2014). A fase estacionária refere-se à coluna cromatográfica e a fase móvel é o solvente, que flui continuamente através do sistema arrastando a amostra injetada pela coluna. Assim os componentes com maior interação na fase estacionária são seletivamente retidos por ela e enquanto os que apre-

sentam menor interação são transportados mais rapidamente pela fase móvel (CHUST, 1990; COLLINS, BRAGA; BONATO, 1997).

As proteínas mostram absorção nas regiões de 254 a 280 nm devido aos aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina), e 220 nm referente a ligação peptídica (NELSON; COX, 2014).

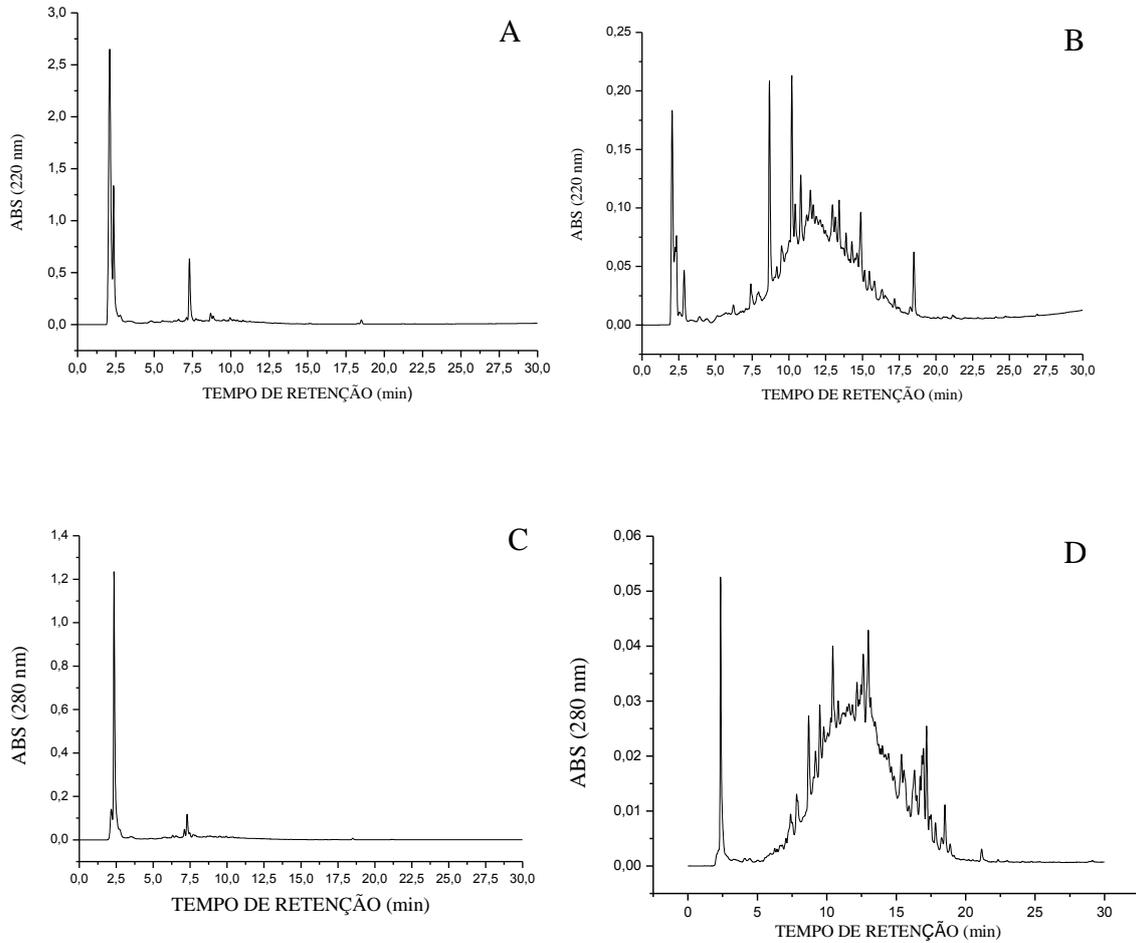
Nas Figuras 7, 8 e 9 estão os perfis cromatográficos dos extratos obtidos de 30% metanol (EXT30MET1), 70% metanol (EXT70MET1) e NaCl (EXTSAL1), respectivamente.

Figura 7. Perfis cromatográficos em 220 nm e 280 nm da OPN eluída em coluna de EFS: 100% solução A (A e C), 30% de solução B (B e D) – fração extraída em 30% Metanol (EXT30MET1). Utilizou-se 1 mg/mL de amostra para análise.



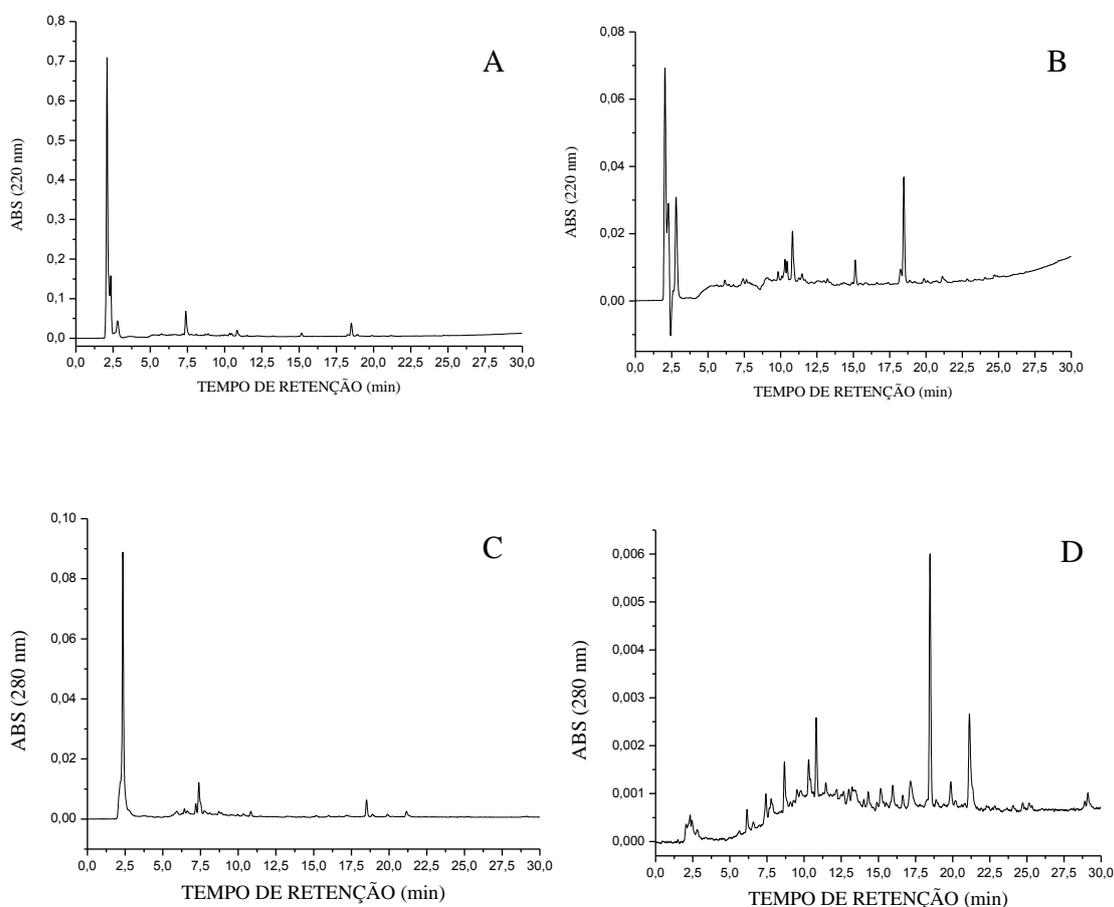
Fonte: Autora.

Figura 8. Perfis cromatográficos em 220 nm e 280 nm da OPN eluída em coluna de EFS: 100% solução A (A e C), 30% de solução B (B e D) – fração extraída em 70% Metanol (EXT70MET1). Utilizou-se 1 mg/mL de amostra para análise.



Fonte: Autora

Figura 9. Perfis cromatográficos em 220 nm e 280 nm da OPN eluída em coluna de EFS: 100% solução A (A e C), 30% de solução B (B e D) – fração extraída em solução de NaCl (EXTSAL1). Utilizou-se 1 mg/mL de amostra para análise.



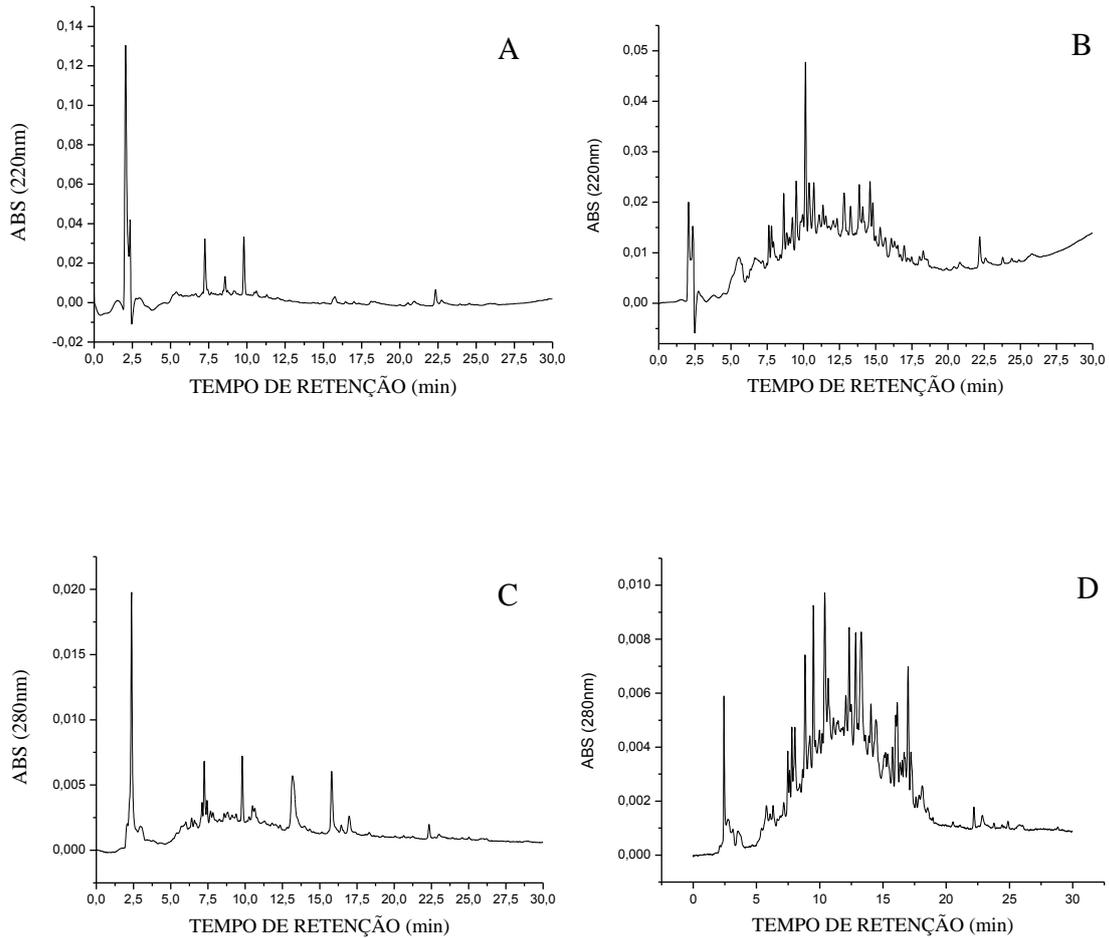
Fonte: Autora.

Independentemente do solvente de extração utilizado, a primeira fração eluída da coluna de extração em fase sólida em 100% de solvente A mostrou o mesmo perfil, isto é, a presença de um pico principal em 7,3 minutos e outros em menor concentração. Em 30% de solvente B podemos observar, como esperado, a presença de materiais mais hidrofóbicos, pois os picos mais expressivos aparecem com um maior tempo de retenção. As amostras extraídas em 70% e 95% de B não foram analisadas por apresentarem pequena massa.

A extração obtida com água também foi avaliada. Na Figura 10 estão apresentados os perfis cromatográficos das eluições da coluna de extração em fase sólida em 100% de solvente A, que mostrou a presença de três picos expressivos entre 7 e 10 minutos, e em 30% de solvente B, que novamente confirmou a presença de

materiais mais hidrofóbicos.

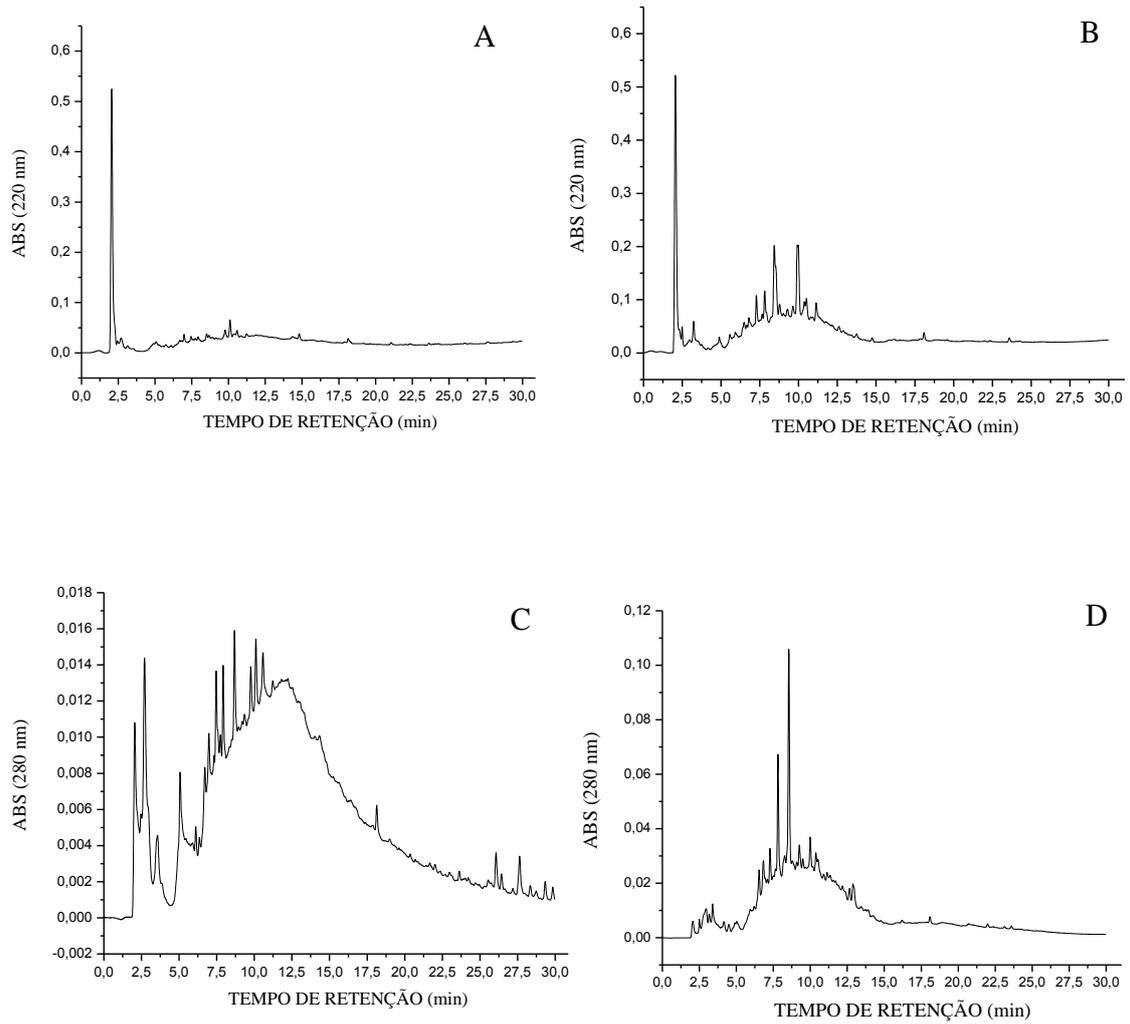
Figura 10. Perfis cromatográficos em 220 nm e 280 nm da OPN eluída em coluna de EFS: 100% solução A (A e C), 30% de solução B (B e D) – fração extraída em água (EXTA-GUA2). Utilizou-se 1 mg/mL de amostra para análise.



Fonte: Autora.

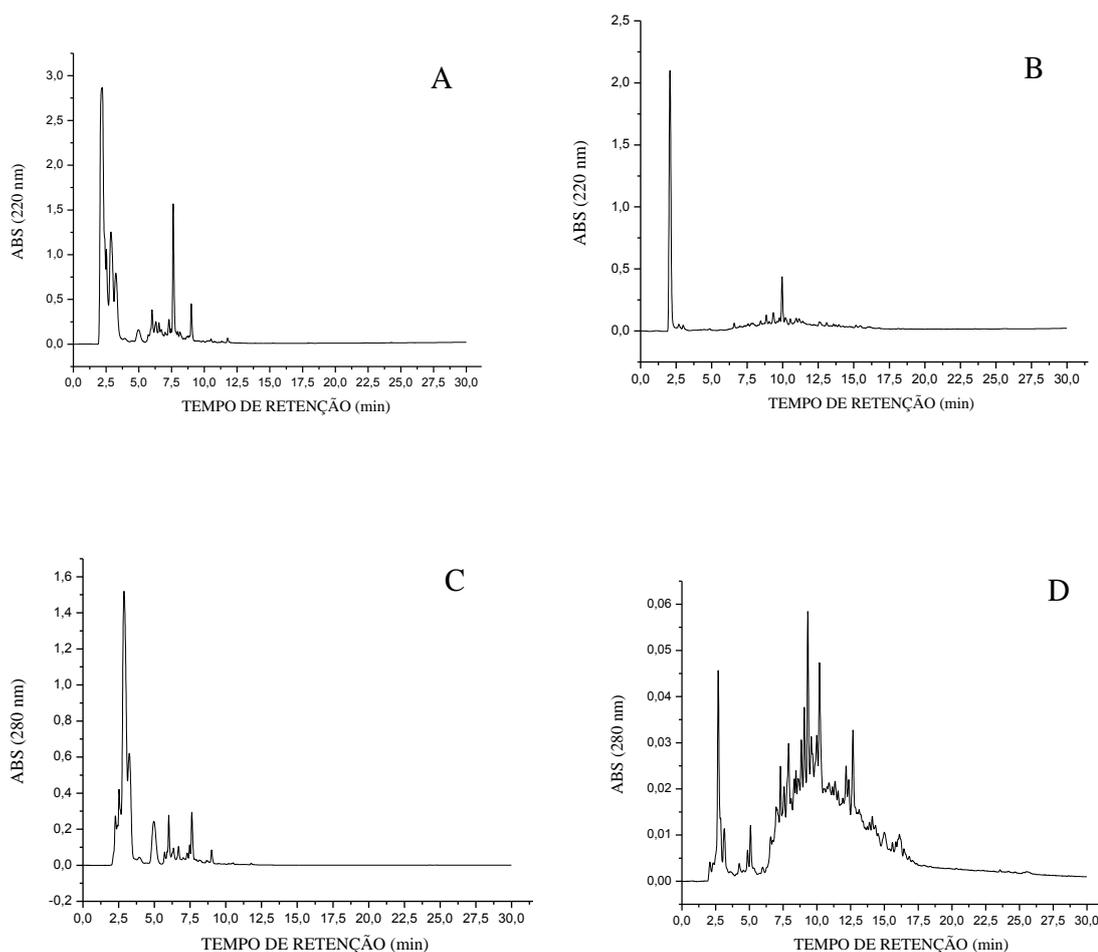
As Figuras 11 e 12 apresentam os perfis de soluções hidroalcoólicas sequenciais à extração aquosa.

Figura 11. Perfis cromatográficos em 220 nm e 280 nm da OPN eluída em coluna de EFS: 100% solução A (A e C), 30% de solução B (B e D) – fração extraída em 30% de metanol (EXT30MET2). Utilizou-se 1 mg/mL de amostra para análise.



Fonte: Autora.

Figura 12. Perfis cromatográficos em 220 nm e 280 nm da OPN eluída em coluna de EFS: 100% solução A (A e C), 30% de solução B (B e D) – fração extraída em 70% de metanol (EXT70MET2). Utilizou-se 1 mg/mL de amostra para análise.



Fonte: Autora.

Os cromatogramas obtidos (Figuras 7, 8, 9, 10, 11 e 12) sugerem a existência de possíveis compostos proteicos, já que no comprimento de onda de 220 nm ocorre a absorção da ligação peptídica. No entanto, deve ser ressaltado que não só ligações peptídicas absorvem no comprimento de onda 220 nm (COLLINS, BRAGA; BONATO, 1997). Para Zaia e Lichtig (1998), no comprimento de onda em 280 nm, em pH neutro, somente os aminoácidos triptofano, tirosina e cistina (ligação entre duas cisteínas) possuem uma absorvidade molar significativa. Como a maioria dos picos observados nos perfis cromatográficos foram identificados nos dois comprimentos de onda, isso é um indicativo que esses materiais sejam proteicos. Na elui-

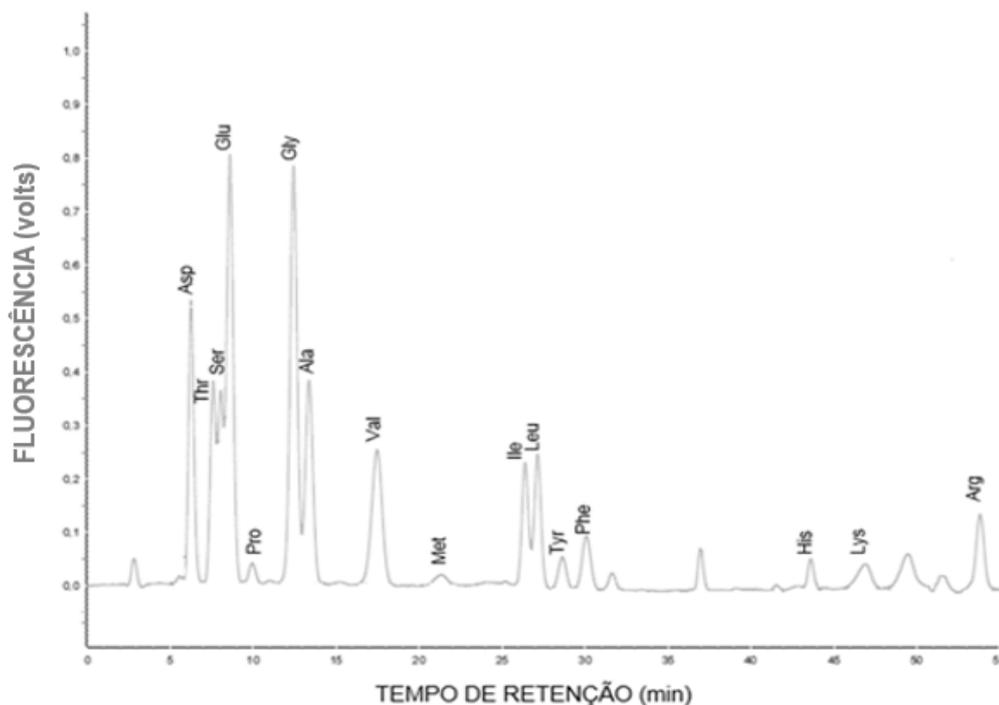
ção com 100% solução A, todos os perfis cromatográficos em 280 nm mostraram semelhanças com os obtidos em 220 nm, com exceção da extração 30% metanol sequencial.

Para confirmar a presença de proteínas ou peptídeos nos eluatos acima descritos, as amostras e eluatos foram submetidos a análise de aminoácidos para quantificação do teor proteico e da composição de aminoácidos.

A cromatografia de troca iônica é o método mais largamente empregado para separar, identificar e quantificar os aminoácidos presentes em uma mistura. Esta técnica explora primariamente as diferenças no sinal e na magnitude das cargas elétricas líquidas dos aminoácidos em um dado pH, as quais são previsíveis a partir de seus valores de pK_a e de suas curvas de titulação. A coluna cromatográfica consiste de uma coluna preenchida por partículas de resina sintética insolúvel em água e contendo grupos carregados; aquelas resinas com grupos fixos aniônicos são chamadas de resinas trocadoras de cátions e aquelas com grupos fixos catiônicos, resinas trocadoras de ânions (NELSON; COX, 2014). Na análise de aminoácidos a resina utilizada é a carregada negativamente. No entanto, somente a carga, dos aminoácidos, não é suficiente para a separação destes, visto que alguns aminoácidos possuem valores de pI muito próximos. Essa problemática é resolvida utilizando resinas de poliestireno, que adiciona a interação hidrofóbica entre as cadeias laterais dos aminoácidos e a malha polimérica apolar deste polímero na separação.

O perfil cromatográfico de um dos eluatos obtidos após a hidrólise ácida é mostrado na Figura 13.

Figura 13. Perfil cromatográfico de aminoácidos presentes na amostra OPN água da fração 30% de solução B.



Fonte: Autora.

Os aminoácidos serina, treonina, aspartato e glutamato, por serem polares e/ou carregados negativamente, apresentam tempo de retenção menor; enquanto que os aminoácidos prolina, glicina, alanina, valina, metionina, leucina, isoleucina e fenilalanina apresentaram um tempo maior de retenção, por pertencerem ao grupo dos aminoácidos com cadeia lateral apolar; seguido pela tirosina, e pela histidina, lisina e arginina, que são aminoácidos positivos. Esses últimos se ligam a coluna com maior força e, portanto, apresentam maior tempo de retenção.

A composição de aminoácidos nas diferentes extrações pode ser observada nas Tabelas 4 e 5. A comparação de alguns dados obtidos da OPN triturada com os descritos por Takeiti et al. (2009) foram similares para a maioria dos aminoácidos (Tabela 4). O teor de proteína obtido para a OPN triturada foi diferente em razão da época do ano de colheita. Os valores foram de 32,6% para as folhas colhidas em outubro de 2016 (OUT/16) e de 22,8% para as folhas colhidas em abril de 2017 (ABR/17), sendo a principal divergência entre as duas análises o resíduo de lisina. Se desconsiderarmos este aminoácido o teor proteico é igual para as duas amostras analisadas (aproximadamente 20%). Somado a isso, outros aminoácidos também apresentaram grandes divergências, foram o aspartato, prolina e leucina. Acreditamos que esta divergência deve estar ligada à época do ano de colheita. No entanto,

independente da amostra realizada o teor de aminoácidos foi elevado, mostrando a possibilidade de esta planta ser utilizada como suplemento proteico. O valor obtido por nós, acima de 22,8%, está próximo do obtido por Takeiti et al. (2009), que obteve 28,4 % de proteínas em folhas frescas. Conforme Mercê et al. (2001b), o aminoácido lisina constituiu 5,4% do conteúdo total de proteína neste vegetal (*P. aculeata* Mill.), que é de 2 a 23 vezes o conteúdo encontrado em vegetais, como couve e alface, e em cereais, como o milho comum e em leguminosas, como feijões. Segundo Almeida Filho e Cambria (1974), o teor de lisina em ora-pro-nobis foi de 1,153 g de lisina por 100 gramas de massa seca, maior se comparado com couve (0,44 g/100 g), milho (0,25 g/100 g), alface (0,05 g/100 g) e espinafre (0,02 g/100 g) (ATANASOVA, 2008; EPPENDORFER; BILLEM, 1996; RODRIGUES et al., 2001). Os valores obtidos neste trabalho foram bem superiores, isto é 3,27 g e 13,18 g por 100 g de material triturado. A avaliação do teor de aminoácidos realizada por Takeiti et al. (2009) evidenciou que essa espécie vegetal tem o triptofano como aminoácido abundante. Ressaltamos que na hidrólise ácida, o resíduo de triptofano é totalmente degradado.

Na extração salina, a composição de proteínas extraída foi de 52 mg/g, enquanto a maioria das proteínas permaneceram no material sedimentado após a extração (260,6 mg/g). Esse resultado também foi obtido na análise das extrações hidroalcolicas. No material sedimentado da extração sequencial com 30% de metanol o valor obtido foi de 28% de conteúdo proteico e 10,9% com 70% de metanol, o que mostra que a maioria das proteínas são do tipo fibrosas.

As quantificações proteicas das frações eluídas na coluna de extração em fase sólida foram inferiores a OPN triturada (Tabela 4), mostrando que apesar de “limpar” a amostra de pigmentos, a etapa de aplicação em colunas de extração em fase sólida possivelmente promoveu uma diminuição no conteúdo proteico.

A eluição do material obtido na fase aquosa, mostrou que em 100% de solvente A o teor proteico foi baixo, isto é, apenas 4,32% do material obtido era proteína. Esse valor aumentou para 20,8% quando a eluição foi de 30% de solvente B e 70% de solvente A. Já na eluição da fração extraída com 70% metanol, teor proteico foi o mais baixo de todos, o que mostra a polaridade intermediária das proteínas contidas na OPN. A composição de aminoácidos também variou com a amostra inicial e com o solvente utilizado, mostrando que as proteínas extraídas são diferentes.

Tabela 4. Composição de aminoácidos e teor proteico, em massa ($\mu\text{g}/\text{mg}$), nas diferentes frações de extração e sedimentados retidos no filtro, bem como dados encontrados na literatura.

* Valores de acordo com Takeiti et al. (2009) ($\mu\text{g}/\text{mg}$).

** Não encontrado na análise devido degradação em meio ácido.

*** Material retido no filtro, após o processo de filtração.

nd – não determinado

EXTRAÇÃO AA	OPN Triturada		H2O (EXTAGUA2)	NaCl (EXTSAL1)	NaCl (EXTSAL1) Sedimentado***	Dados da Literatura*
	OUT/16	ABR/17				
Asp	25,6	14,3	4,3	3,8	27,1	17,1
Thr	8,9	10,3	2,2	1,4	13,7	10
Ser	9,2	8,4	1,6	1,7	13,2	10
Glu	32,4	34,6	9,1	7,7	53,7	26,7
Pro	6,1	46,4	3,5	3,2	8,0	11,1
Gly	10,8	15,2	3,1	2,5	12,8	13,1
Ala	10,5	11,2	2,4	2,0	16,1	13,6
Val	10,4	11,9	2,3	2,3	14,4	12,8
Met	0,8	1,5	0,1	0,3	2,9	2,30
Ile	10,8	8,0	1,7	1,4	15,6	10,7
Leu	39,6	10,5	2,9	2,5	35,0	20,0
Tyr	6,9	4,7	1,1	1,8	14,7	12,1
Phe	8,9	6,4	1,2	1,7	17,0	12,7
His	3,6	1,7	0,5	0,4	6,3	5,9
Lys	131,8	32,7	11,0	16,0	6,9	14,3
Arg	10,2	10,6	2,7	3,0	3,2	14,4
Trp**	nd	nd	nd	nd	nd	55,2
TEOR PROTEICO	326,5	228,3	49,6	51,7	260,6	262,0

Fonte: Autora.

Tabela 5. Composição de aminoácidos e teor proteico, em massa ($\mu\text{g}/\text{mg}$), nos diferentes eluatos.

** Não encontrado na análise devido degradação em meio ácido.

nd – não determinado

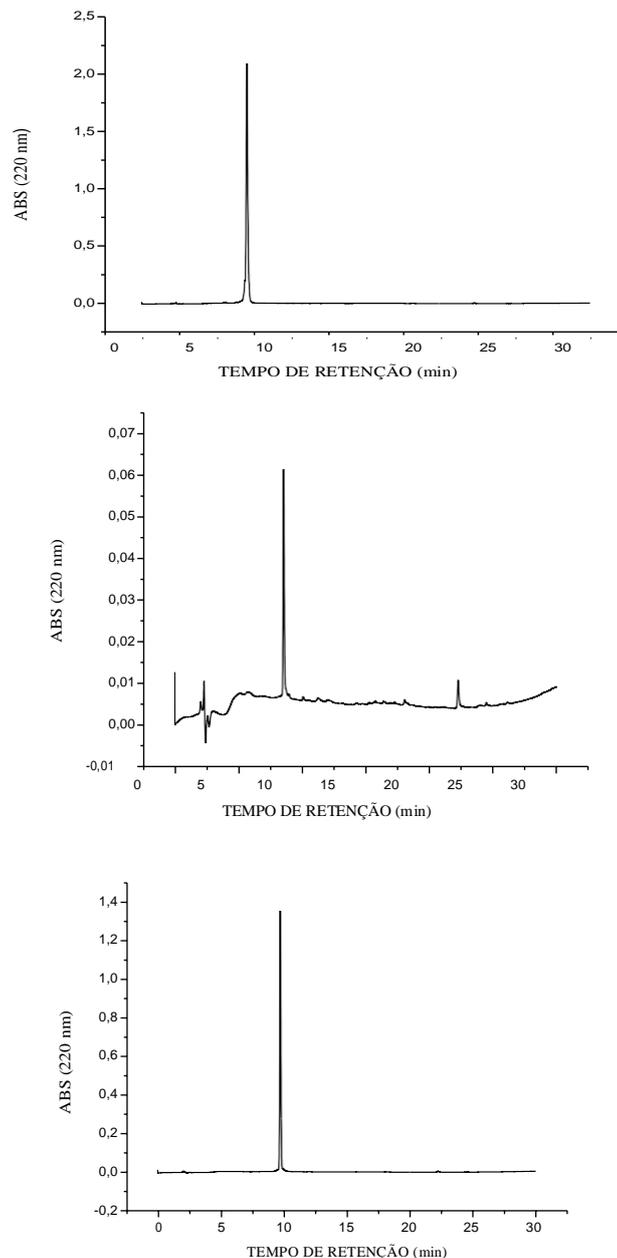
EXTRAÇÃO AA	H ₂ O (EXTAGUA2)		30% Metanol (EXT30MET2)		70% Metanol (EXT70MET2)	
	100% sol A	30% sol B	100% sol A	30% sol B	100% sol A	30% sol B
Asp	3,8	20,6	17,4	6,4	2,6	1,3
Thr	1,9	6,6	5,4	nd	1,3	0,8
Ser	1,4	10,9	6,7	nd	2,2	0,9
Glu	9,9	31,0	23,2	nd	5,9	2,0
Pro	2,5	18,3	4,9	6,9	1,6	1,2
Gly	2,5	12,9	6,6	6,3	2,2	0,9
Ala	2,2	9,3	5,7	10,6	1,3	0,6
Val	2,3	11,4	5,8	6,2	1,2	0,9
Met	0,3	1,6	0,8	1,4	0,3	0,1
Ile	1,6	5,2	6,0	6,3	1,1	0,6
Leu	2,5	12,5	9,6	12,4	1,1	0,4
Tyr	1,1	7,9	4,4	3,9	0,7	0,6
Phe	1,2	10,2	3,7	4,7	0,7	0,8
His	0,5	2,3	1,2	1,3	0,3	0,1
Lys	8,5	27,4	7,1	11,0	2,4	3,3
Arg	1,0	20,5	9,1	7,4	13,0	0,4
Trp**	nd	nd	nd	nd	nd	nd
TEOR PROTEI- CO	43,2	208,4	117,6	84,7	37,8	15,0

Fonte: Autora.

Um entendimento mais profundo dos dados obtidos requer estudos mais aprofundados dos materiais obtidos, tais como, hidrólise parcial das proteínas, purificação dos materiais, etc.

Visando a obtenção de materiais mais puros e com maior teor proteico, os eluatos obtidos da solução de 100% solução A da extração EXTAGUA2 (Figura 10) foram submetidos a CLAE em modo semipreparativo para purificação dos picos mais proeminentes. Dessa purificação, 3 materiais diferentes foram obtidos (Figura 14).

Figura 14. Perfil de picos purificados da fração 100 % solução A da extração aquosa (EXTAGUA2).



Fonte: Autora.

Devido a pequena massa obtida, a análise das frações puras não foi continuada.

4.4 Análises dos ensaios antimicrobianos

Nos últimos anos, a resistência de microrganismos patogênicos às múltiplas drogas tem aumentado devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, utilizados no tratamento de doenças infecciosas. Essa situação vem despertando a necessidade de busca de novas drogas. As plantas constituem em uma excelente fonte de substâncias para novas drogas antimicrobianas, tendo em vista que a diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese química (SILVA et al., 2010).

A resistência dos microrganismos frente aos antimicrobianos em geral vem sendo um problema no tratamento de infecções. Neste sentido, os produtos naturais ganham destaque como uma fonte alternativa na busca de novos agentes antimicrobianos (SILVA et al., 2010). A resistência bacteriana aos antimicrobianos é considerada como um problema inerente à terapia antimicrobiana, por este motivo é preciso sempre buscar novas fontes terapêuticas. Testar produtos naturais pode ser uma medida alternativa importante para ajudar a resolver esse problema de resistência (SILVA et al., 2010).

Segundo Vargas (2017), na literatura ainda não há relatos de estudos envolvendo a análise da concentração inibitória mínima (CIM) para microrganismos, das folhas de *P. aculeata*. Contudo, em se tratando de extratos de plantas, podem haver variações nos resultados de CIM, que estão atreladas a diferentes fatores, como o microrganismo, a cepa utilizada, a origem, a época de coleta do vegetal e o tratamento das amostras, entre outras (OSTROSKY et al., 2008).

O extrato bruto da extração aquosa (EXTAGUA2), e os eluatos obtidos da passagem em coluna de EFS com 100% solução A e 30% solução B, não apresentaram efeito inibitório, tanto para as linhagens de bactéria como para as linhagens de fungos estudados para este trabalho. Estas amostras foram escolhidas por apresentarem maior rendimento em massa, picos mais expressivos polares e possivelmente proteicos.

Na Tabela 6 é possível observar que o crescimento bacteriano foi superior na

concentração de 512 µg/mL, que, segundo o protocolo CLSI (2013), indica que nenhuma bactéria foi afetada pelas amostras testadas (extrato bruto da extração aquosa (EXTAGUA2), 100% solução A e 30% solução B).

Tabela 6. CIM (µg/mL) para as amostras estudadas em diferentes linhagens bacterianas.

LINHAGENS BACTERIANAS	CIM (µg/mL)		
	H ₂ O (EXTAGUA2)	H ₂ O (EXTAGUA2) 30% solução B	H ₂ O (EXTAGUA2) 100% solução A
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	>512	>512	>512
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 35984)	>512	>512	>512
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	>512	>512	>512
<i>E. faecium</i> (VRE16)	>512	>512	>512
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 700603)	>512	>512	>512
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	>512	>512	>512
<i>A. baumannii</i> (ACI 50)	>512	>512	>512

Fonte: Autora.

As plantas têm sua produção de metabólitos modificada sazonalmente, o que acarreta alterações na bioatividade dos mesmos, como atividade antioxidante e antimicrobiana. Dependendo da época em que o material é coletado e analisado (FIGUEIREDO, 2010; HUSSEIN et al., 2008; MATIAS et al., 2016), a quantidade e/ou natureza das substâncias ativas não é constante durante todo o ano (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). A variação da atividade, além das condições climáticas, também pode ser devida a diferenças no local de plantio, tipo de solo, grau de maturação, estocagem da matéria prima e métodos de análises utilizados (ROHANI-GHADIKOLAEI et al., 2012).

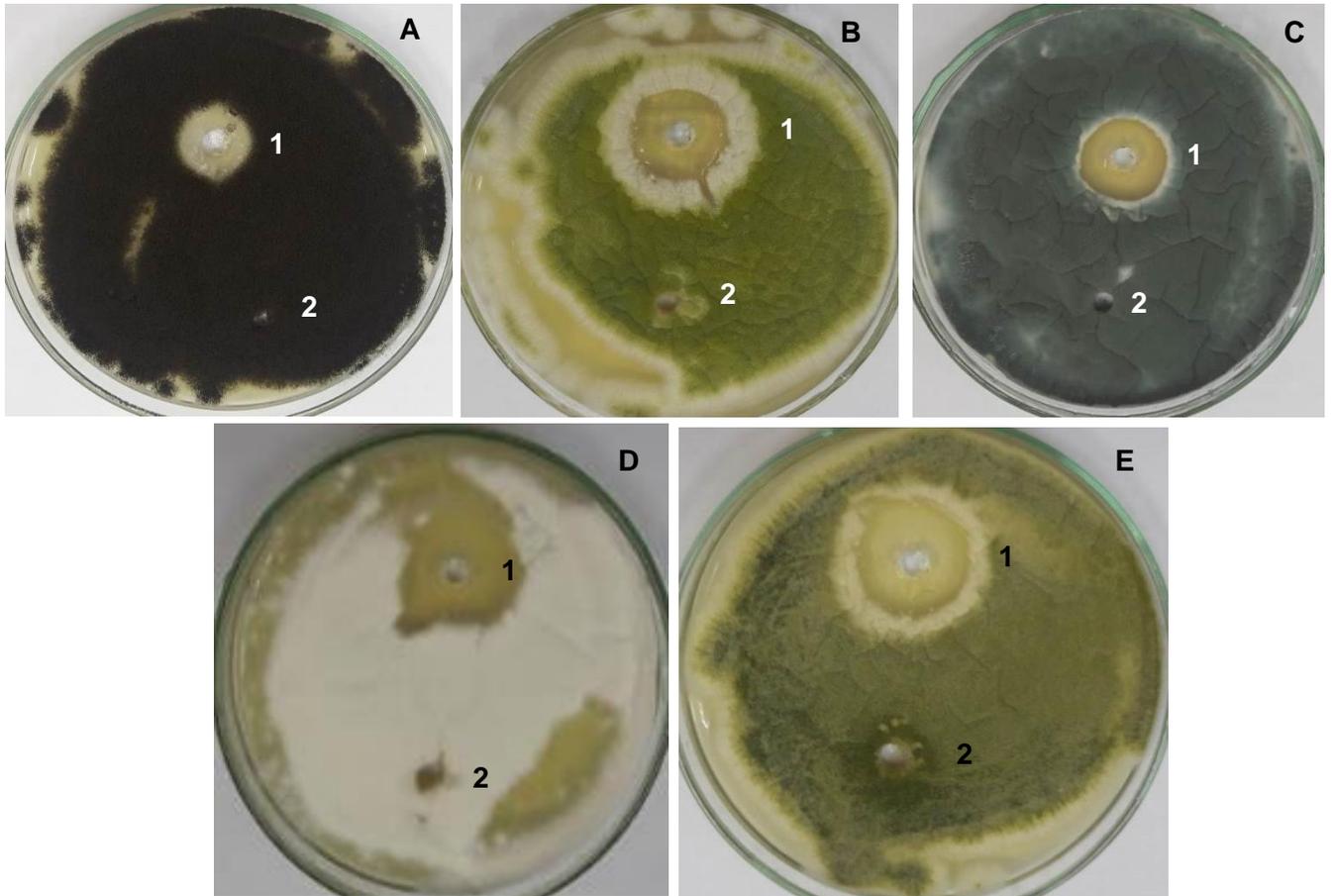
Segundo Vargas (2017), apenas frações apolares (éter de petróleo) dos extratos de folhas coletadas no inverno apresentaram potencial de inibição de crescimento microbiano para *Staphylococcus aureus*, presumindo-se que durante o inverno a *P. aculeata* produz alguma substância diferente capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*, ou, então, que houve variação na concentração de algum composto, vindo a apresentar atividades antimicrobianas distintas de acordo com a estação de coleta do material vegetal.

Souza et al. (2016) realizaram ensaios com diferentes extratos de *P. aculea-*

ta (éter de petróleo, clorofórmio e metanol), nos quais o extrato de menor polaridade mostrou potencial antimicrobiano sobre as bactérias *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. No trabalho, em questão, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* também foram testadas com os extratos, porém sem atividade antimicrobiana. Este fato pode estar relacionado aos diferentes fatores que afetam a sensibilidade do método de análise utilizado, tais como: meio de cultura, pH do sistema, disponibilidade de oxigênio, quantidade de inóculo e condições de incubação utilizados (OSTROSKY et al., 2008). Somado a isso, ressaltamos que o foco deste trabalho é a obtenção de frações proteicas com atividades, e outros materiais como flavonoídes e terpenos, entre outras classes de moléculas, podem ser as responsáveis pelos resultados positivos acima colocados.

Em fungos, os testes realizados não evidenciaram o aparecimento do halo de inibição (Figura 15), mostrando que os fungos não são afetados pelo extrato bruto da extração aquosa (EXTAGUA2), nem para as frações de 30% solução B e 100% solução A. Segundo os dados da literatura (SANTOS et al., 2011), o extrato bruto obtido através da maceração com etanol 92,8% de *Pereskia aculeata* Mill. foi testado no combate a formação de biofilme nos dentes, e não apresentou atividade frente aos organismos *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* e *Candida albicans* (patógenos bucais). Entretanto foi observado inibição no crescimento do microrganismo *Enterococcus faecalis*, quando exposto a ação do extrato de *Pereskia aculeata* Mill. nas concentrações de 0,25 g/mL e 0,50 g/mL. As análises feitas por Vargas (2017) com *Escherichia coli* e leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, quando extratos obtidos por extrações sucessivas com solventes em ordem crescente de polaridade (éter de petróleo, diclorometano e etanol), não apresentaram atividades antimicrobianas; reforçando a necessidade de considerar que os princípios ativos produzidos pelas plantas são modificados sazonalmente (FIGUEIREDO, 2010; HUSSEIN et al., 2008; MATIAS et al., 2016).

Figura 15. Ensaios antifúngicos do extrato bruto da extração aquosa (EXTAGUA2) (2). *Aspergillus niger* (A), *Aspergillus flavus* (B), *Aspergillus fumigatus* (C), *Aspergillus nidulans* (D) e *Aspergillus parasiticus* (E). Miconazol (1) e Extrato bruto da extração aquosa (EXTAGUA2) (2).



Fonte: Autora.

5 CONCLUSÕES

As análises das extrações das folhas de *Pereskia aculeata* Mill., popularmente conhecida como “gado verde”, submetidas ao CLAE, mostram a presença de alto teor de proteínas, corroborando com a literatura. A presença de determinados aminoácidos essenciais, importantes na ingestão diária também foi identificada, mostrando sua importância nutricional. A variação do teor de aminoácidos e da composição dos hidrolisados obtidos indicam que esses podem ser influenciados pela época do ano da colheita do material e pelas condições onde a planta se encontra. Apesar dessas variações, os dados mostram a possibilidade do uso da OPN como alternativa ao uso da carne como fonte primária de proteínas.

Os ensaios biológicos realizados, não indicaram efeito antimicrobiano e antifúngicos das amostras de OPN testadas, para as linhagens testadas.

REFERÊNCIAS

- ACCORSI, W.; DOSOUTO, R. Ladainha comestível. **Revista Globo Rural**, v. 244, p. 2, 2006.
- AMARO, G. B. et al. Recomendações técnicas para o cultivo de hortaliças em agricultura familiar. **Embrapa Hortaliças**. Brasília, DF, p. 16. 2007.
- ALMEIDA, M. E. F.; CORRÊA, A. D. Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 42, n. 4, p. 751-756, 2012.
- ALMEIDA, M. E. F. et al. Caracterização química das hortaliças não-convencionais conhecidas como Ora-pro-nobis. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, suplemento 1, p. 431-439, 2014.
- ALMEIDA FILHO, J.; CAMBRAIA, J. Estudo do valor nutritivo do “ora-pro-nobis” (*Pereskia aculeata* Mill.). *Revista Ceres*, Viçosa, MG, v. 21, n. 114, p. 105-11, 1974.
- ALTEI, W. F. et al. Jatrophidin I, a cyclic peptide from Brazilian *Jatropha curcas* L.: Isolation, characterization, conformational studies and biological activity. **Phytochemistry**, v. 107, p. 91-96, 2014.
- ARIAS, S.; PÉREZ, M. E. V. Diversidad y distribución de las Cactáceas en Guatemala. In: CANO, E. (Ed.). **Biodiversidad de Guatemala**, p. 229-238, 2006.
- ATANASOVA, E. Effect of nitrogen sources on the nitrogenous forms and accumulation of amino acid in head cabbage. **Plant, Soil and Environment**, v. 54, n. 2, p. 66–71, 2008.
- AUSTRALIAN GOVERNMENT. Leaf cactus (*Pereskia aculeata*) weed management guide. **Weeds in Australia - Publications and resources**, 2003. Disponível em: Acesso em: 31 agosto 2018.

BARBOSA, C. K. R. et al. Manejo e conservação pós-colheita de *Pereskia aculeata* Mill. em temperatura ambiente. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 30, S7002-S7009, 2012.

BARROS, K. N. et al. Desenvolvimento de uma pomada contendo extrato de *Pereskia aculeata*. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR, VI, 2009. Maringá. **Anais...** Maringá: Cesumar, p. 1-4, 2009.

BARTHLOTT, W; HUNT. D. R. **Cactaceae. In: The families and genera of vascular plants, v. II flowering plants – Dicotyledons.** KUBIZTKI, K; ROHWER, JG; BITTRICH, V. Berlin: Springer-Verlag, p. 161-197. 1993.

BOKE, N. H. Ontogeny and structure of the flower and fruit of *Pereskia aculeata*. **American Journal Of Botany**, v. 53, n. 6, p.534-542, 1966.

BORGES, C. K. G. D. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC): A divulgação científica das espécies na cidade de Manaus.** 2017. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ensino de Ciências na Amazônia) – Universidade do Estado do Amazonas, 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248–254, 1976.

BRASIL. **Alimentos Regionais Brasileiros.** Ministério da Saúde. Brasília, DF, n. 21, p. 140, 2002.

BRASIL. **Guia alimentar para a população brasileira.** Ministério da Saúde. Brasília, DF, p. 120, 2004.

BRASIL. **Decreto 5.813 de 22 de junho de 2006.** Aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Casa Civil. Brasília, DF, 2006.

BRASIL. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Ministério da saúde. Brasília, DF, p. 60, 2007.

BRASIL. **Manual de hortaliças não-convencionais**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Belo Horizonte, MG, p. 92, 2010.

BRASIL. **Hortaliças não convencionais (tradicionais)**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília, 2010.

BRASIL. **Formulário de fitoterápicos da farmacopeia brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, p. 126, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Alimentos regionais brasileiros**. 2. ed. Brasília, 2015. 484 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação-Geral de Alimentação e Nutrição. **Guia alimentar para a população brasileira**. 2. ed. Brasília, 2014. 156 p.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, 2003.

BUTTERWORTH, C. A.; WALLACE, R. S. Molecular phylogenetics of the leafy cactus genus *Pereskia* (Cactaceae). **Systematic Botany**, v. 30, n. 4, p. 800-808, 2005.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

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.

CASTRO, N. C. C.; SCIO, E. The biological activities and chemical composition of *Pereskia* Species (Cactaceae): a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 69, n. 3, p. 189-195, Sept. 2014.

CHAMP, M. et al. Advances in dietary fibre characterization: 1., definition of dietary fibre, physiological relevance, health benefits and analytical aspects. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 71-82, June 2003.

CHUST, R. B. Introdução à cromatografia de líquidos (HPLC). **Boletim SPQ**, v. 39, p. 43-53, 1990.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**, 7ª edição, Campinas: Unicamp, 1997.

CONSERVAÇÃO INTERNACIONAL. **Megadiversidade**. 2011. Disponível em: <<http://www.conservation.org.br/como/index.php?id=11>>. Acesso em: 05 set 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In: **23th Informational Supplement. CLSI document M100-S23**. Wayne: 2013.

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. 279-84, 2005.

DUARTE, M. R.; HAYASHI, S. S. Estudo anatômico de folha e caule de *Pereskia aculeata* Mill (Cactaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Paraná, v. 15, n. 2, p. 103-109, 2005.

EDWARDS, E. J.; DIAZ, M. Ecological physiology of *Pereskia guamacho*, a cactus with leaves. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, n. 2, p. 247- 256, 2006.

EDWARDS, E. J.; NYFELER, R.; DONOGHUE, M. J. Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 7, p. 1177-1188, 2005.

EPPENDORFER, W. H.; BILLEM, S. W. Free and Total Ammo Acid Composition of Edible Parts of Beans, Kale, Spinach, Cauliflower and Potatoes as Influenced by Nitrogen Fertilisation and Phosphorus and Potassium Deficiency. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 71, p. 449-458, 1996.

EYZAGUIRRE, P. B; PADULOSI, S.; HODGKIN, T. IPGRI's strategy for neglected and underutilized species and the human dimension of agrobiodiversity. En Prioritysetting for underutilized and neglected plant species of the Mediterranean region , ed.S. Padulosi.Roma: **International Plant Genetic Resources Institute**. 1999.

FAHEY, J. W. Moringa oleifera: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional Therapeutic and Prophylactic Properties. Part 1. **Trees for Life Journal**. v.1, n.5, 2005.

FARAG, A. M. et al. Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 42, p. 185-192, 2016.

FERREIRA, M. E. P. et al. Ribifolin, an Orbitide from *Jatropha ribifolia* , and Its Potential Antimalarial Activity. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 374-380, 2015.

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

FIRMO, W.C.A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, n. especial, 2011.

FURLAN, M. R. Cultivo de plantas medicinais. Cuiabá, MT: Sebrae, **Coleção Agroindústria**, v. 13, p 146, 1999.

GIULIETTI A. M. et al. Espécies endêmicas da caatinga. In: Sampaio EVSB, Giulietti AM, Virgínio J, Gamarra-Rojas CFL, editores. Vegetação e flora da caatinga. Recife: **Associação de Plantas do Nordeste**; 2002.

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

HERNÁNDEZ-BORGES, J. et al. Sample treatments prior to capillary electrophoresis–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v.1153, p. 214-226, 2007.

HOLLIS, H. B; SCHEINVAR, L. **El interesante mundo de las cactaceas**. p. 233, 1995

HUSSEIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 986-995, 2008.

IPGRI. Strategic framework for underutilized plant species research and development. Sri Lanka: **Global Facilitation Unit for Underutilized Species**, p. 40, 2006.

JARDIM, I. C. F. S. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v.2, n. 1, p. 13-25, 2010.

KINUPP, V. F. **Plantas alimentícias não-Convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS**. 2007. 590 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)- Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 846-857, 2008.

KOTTEK, M. et al. World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 15, n. 3, p. 259-263, 2006.

LANÇAS, F.M. Extração em Fase Sólida (SPE). Rima, São Carlos, 2004.

LOPES, A. F. **Efeito de diferentes métodos de confecção no valor nutricional da carne de bovino - estudo experimental nas carnes Barrosã e Mertolenga**. UNIVERSIDADE DE LISBOA. Faculdade de Medicina Veterinária. 209 f. 2015

MACEDO, L. M. A. et al. Composição Química e Perfil de Ácidos Graxos de Cinco Diferentes Cortes de Novilhas Mestiças (Nelore vs Charoles). **Semina**. Vol. 29. Núm. 3. p. 597 - 608, 2008.

MADRUGA, M.S. et al. Avaliação nutricional de uma dieta suplementada com multi-mistura: estudo em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 129-133, 2004.

MARCHESE, J. A. et al. Carbon isotope composition as a tool to control the quality of herbs and medicinal plants. **Photosynthetica**, v. 44, n. 1, p. 155-159, 2006.

MARINELLI, P. S. **Farinhas de moringa (Moringa Oleifera Lam.) e ora-pro-nóbis (Pereskia aculeata Mill.): biomateriais funcionais**. 2016. 59 f. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Materiais) – Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2016.

MARTINEVSKI, C. S. et al. Utilização de Bertalha (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) e Ora-Pro-Nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) na elaboração de pães. **Brazilian Journal Food and Nutrition**, Araraquara, n. 24, p. 255-370, 2013.

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

MAZIA, R. S. Influência do tipo de solo usado para o cultivo de *Pereskia aculeata* sobre propriedade proteica. **Revista Saúde e Pesquisa**, Maringá, v. 5, n. 1, p. 59-65, 2012.

MERCÊ, A. L. R. et al. Complexes of arabinogalactan of *Pereskia aculeata* and Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} and Ni^{2+} . **Bioresource Tecnologia**, Barking, v. 76, n. 1, p. 29-37, 2001a.

MERCÊ, A. L. R. et al. Fe (III) Galactomannan solid and aqueous complexes: potentiometric, EPR spectroscopy and thermal data. **Journal of Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 12, n. 6, p. 791-798, 2001b.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN DATABASE. **Global mapper**. Disponível em: <<http://www.discoverlife.org>>. Acesso em: 02 set. 2018.

MONTEIRO, C. Ora Pro Nobis ajuda no combate ao câncer. 02.2011. Correio de Uberlândia. Disponível em <<http://www.correiodeuberlandia.com.br/cidade-e-regiao/ora-pro-nobis-ajuda-no-combate-ao-cancer/>>. Acessado em: julho de 2016.

MORAN, V. C.; ZIMMERMANN, H. G. Biological control of cactus weeds of minor importance in South Africa. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.37, p.37-55, 1991.

MORTON, J. Barbados Gooseberry. In: **Fruits of warm climates**. Miami: Creative Resource Systems, p. 349–351, 1987.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6ª ed. Porto Alegre: ArteMed, 2014.

NOELLI, F.S. Múltiplos usos de espécies vegetais pela farmacognosia guarani através de informações históricas. **Diálogos**, v.2, p.117-199, 1998

NOVÁKOVÁ, L.; VLCKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bioanalytical methods: Chromatography and sample preparation. **Anal. Chim. Acta**, v. v. 656, p. 8-35, 2009.

OLIVEIRA, C. D. D. de. **Avaliação do potencial antimicrobiano e tripanocida de *Pereskia aculeata* Miller**. 2008. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de Franca. Franca, 2008.

ORNELLAS, L. H.; KAJISHIMA, S.; VERRUMA-BERNARDI, M. R. **Técnica dietética: seleção e preparo de alimentos**. 8. ed. São Paulo: Atheneu, 2007. 276 p.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PAVARINI, D. P. et al. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 5-16, 2012.

PHILIPPI, S. T. **Nutrição e técnica dietética**. 2. ed. Barueri: Manole, 2006. 424 p.

PIGOLI, D. R. **Alterações nutricionais em hortaliças decorrentes de diferentes métodos de cozimento**. 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrônomicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2012.

PORTO, M. R. A. **Caracterização físico-química e comportamento reológico da polpa do fruto de *Cereus hildmannianus***. 2009. 94 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

QUEIROZ, C. R. A. A. et al. Composição centesimal de frutos de ora-pro-nóbis. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 34., 2011, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2011.

QUEIROZ, C. R. A. A. **Cultivo e composição química de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) sob déficit hídrico intermitente no solo**. 2012. 144 f. Tese (Douto-

rado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2012.

QUEIROZ, C. R. A. A., Growing *Pereskia aculeata* under intermittent irrigation according to levels of matric potential reduction. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia, v. 45, n. 1, p. 1-8, 2015.

ROCHA, D. R. C. et al. Noodles added of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) dehydrated. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 4, p. 459-65, 2008.

RODRIGUES, A. S. **Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) e sua aplicação em mortadela**. 2016. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria - 2016.

RODRIGUES, P. B. et al. Aminoácidos Digestíveis Verdadeiros do Milheto, do Milho e Subprodutos do Milho, Determinados com Galos Adultos Cecectomizados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.6, p. 2046 - 2058, 2001.

ROSA, S.M.; SOUZA, L.A. Morfo-anatomia do fruto (hipanto, pericarpo e semente) em desenvolvimento de *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.25, n.2, p.415-428, 2003.

ROYO, V. de A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto de ramos de *Pereskia aculeata* Mill. In: ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, XIX, Ouro Preto, MG. **Anais...** Ouro Preto: SBQ, p. 171, 2005.

SANCHES, P.R.S. et al. A conjugate of the lytic peptide Hecate and gallic acid: structure, activity against cervical câncer, and toxicity. **Amino Acids**, v. 47, n. 7, p. 1433-1443, 2015.

SANTOS, A. G. et al. Estudo do efeito antimicrobiano do extrato bruto das folhas de *Pereskia aculeata* Mill. sobre patógenos bucais. In: MOSTRA INTERNA DE TRABA-

LHOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5., 2010, Maringá. **Anais...** Maringá: CESUMAR, 2010.

SANTOS, A. G. et al. Avaliação das atividades antimicrobiana sobre patógenos bucais e hemolítica das folhas de *Pereskia aculeata*. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR, 7., 2011, Maringá. **Anais...** Maringá: Editora CESUMAR, 2011.

SARTOR, C. F. P. et al. Estudo da ação cicatrizante das folhas de *Pereskia aculeata*. **Revista Saúde e Pesquisa**, Maringá, PR, v. 3, n. 2, p. 149-154, 2010.

SHAMAN AUSTRALIS BOTANICALS. *Pereskia aculeata* (Leaf Cactus) Plant. Disponível: <https://shaman-australis.com.au/shop/pereskia_aculeata_leaf_cactus_plant_pr_1848.php>. Acesso em 1 de agosto de 2018.

SILVA, M. C. et al. Teores de proteína fibra das folhas de taioba, ora-pro-nóbis, serralha e mostarda coletadas no município de Diamantina. In: JORNADA ACADÊMICA CIENTÍFICA E TECNOLOGIA DA UFVJM, Diamantina, MG. **Anais...** Diamantina, v. 8, p. 124, 2006.

SILVA, V.A. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Rev. bras. Plantas med.**, vol.12, n.4, pp. 452-455, 2010.

SILVA JÚNIOR, A. A. Da. et al. Pão de ora-pro-nóbis - um novo conceito de alimentação funcional. **Agropecuária Catarinense**, v. 23, n. 1, p. 35-37, 2010.

SOUSA, R. M. F. et al. Antioxidant activity of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) leaves extracts using spectrophotometric and voltammetric assays in vitro. **Bioscience Journal**, v. 30, supplement 1, p. 448-457, 2014.

SOUZA, M. R. M. O potencial do ora-pro-nobis na diversificação da produção agrícola familiar. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Pelotas, v. 4, n. 2, p. 3550-3554, nov. 2009.

SOUZA, L. F. et al. *Pereskia aculeata* Muller (Cactaceae) Leaves: Chemical Composition and Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1487, 2016.

SWIRSKI, E. et al. Other Subtropical Fruit Trees. Soft Scale Insects - Their Biology, **Natural Enemies and Control**, 1997.

TACO - **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 4. ed. Campinas: NEPAUNICAMP, 2011.

TAKEITI, C. Y. et al. Nutritive evaluation of non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Hants, v. 60, n. 1, p. 148-160, 2009.

TAN, M. L. et al. Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line. **School of Biological Science**, 2004.

TAYLOR, N. P. et al. **Cactaceae in lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB1636>>. Acesso em: 8 jun. 2018.

TOFANELLI, M. B. D.; RESENDE, S. G. Sistema de condução na produção de folhas de ora-pro-nóbis. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 3, p. 466-469, 2011.

TURRA, A. F. et al. Avaliação das propriedades antioxidantes e susceptibilidade antimicrobiana de *Pereskia grandifolia* Haworth (Cactaceae). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 11, n. 1, p. 9-14, 2007.

VAISHNAV, P; DEMAIN, A. L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 223 – 229, 2010.

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

VARGAS, A. G. **INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E NAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS DE ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata* Miller)**. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2017.

VIANA, M. M. S. et al. Phytochemical composition and antioxidant potential of unconventional vegetables. **Journal of Brazilian Agriculture**, v. 33, n. 4, p. 504–509, 2015.

WILLIAMS, P.G. Nutritional composition of red meat. **Nutrition & Dietetics**, 64, 113 - 119, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. **WHO Technical Report Series**, v. 916, 2003.

YOUNG, V. R.; PELLETT, P. L. Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. **American Journal Society for Clinical Nutrition**, v. 59, p. 1203-1212, 1994.

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

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, 1998.

ZAPPI, D.; TAYLOR, N.; MACHADO, M. Lista de espécies flora do Brasil, 2012.

Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB001633/>>. Acesso em: agosto de 2017.